

DISERTASI

**MEKANISME KEMATIAN SEL PRIMER KANKER PAYUDARA
YANG DIINDUKSI SENYAWA 4-(*t*-BUTIL)-*N*-BENZOILUREA
SECARA *IN VITRO***



AGUSLINA KIRTISHANTI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME KEMATIAN SEL PRIMER KANKER PAYUDARA
YANG DIINDUKSI SENYAWA 4-(*t*-BUTIL)-*N*-BENZOILUREA
SECARA *IN VITRO***

**AGUSLINA KIRTISHANTI
NIM. 051617097309**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga:

Nama : Aguslina Kirtishanti, S.Si, M.Kes, Apt

NIM : 051617097309

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul :

Mekanisme Kematian Sel Primer Kanker Payudara Yang Diinduksi Senyawa 4-(*t*-butil)-*N*-Benzoilurea Secara *In Vitro*

adalah benar-benar merupakan konsep pemikiran dan hasil karya ilmiah saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Disertasi ini merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 20 Agustus 2020
Yang membuat pernyataan,



Aguslina Kirtishanti, S.Si, M.Kes, Apt

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya peserta Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga:

Nama : Aguslina Kirtishanti, S.Si, M.Kes, Apt

NIM : 051617097309

menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui Naskah Disertasi yang saya tulis dengan judul :

Mekanisme Kematian Sel Primer Kanker Payudara Yang Diinduksi Senyawa 4-(*t*-butil)-*N*-Benzoilurea Secara *In Vitro*

Untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet portal Garuda atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 20 Agustus 2020

Yang membuat pernyataan,



Aguslina Kirtishanti, S.Si, M.Kes, Apt

**MEKANISME KEMATIAN SEL PRIMER KANKER PAYUDARA
YANG DIINDUKSI SENYAWA 4-(*t*-BUTIL)-*N*-BENZOILUREA
SECARA *IN VITRO***

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Doktor Ilmu Farmasi
pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

Oleh :

**AGUSLINA KIRTISHANTI
NIM. 051617097309**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 27 AGUSTUS 2020**

Oleh :

Promotor

Ko-promotor



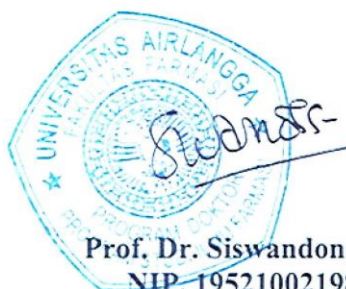
**Prof. Dr. Siswandono, Apt., M.S.
NIP. 195210021980021001**



**Prof. Dr. I Ketut Sudiana, M.Si
NIP. 195507051980031005**

Mengetahui,

Koordinator Program Studi Doktor Ilmu Farmasi



**Prof. Dr. Siswandono, Apt., M.S.
NIP. 195210021980021001**

Ujian Disertasi Tertutup

Tanggal 4 September 2020

PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua** : Prof. Dr. Suko Hardjono, M.S., Apt
- Anggota** : 1. Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt
2. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, M.Si
3. Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt
4. Prof. Edi Meiyanto, M.Si, Apt, Ph.D
5. Prof. Junaidi Khotib, M.Kes., Apt, Ph.D
6. Dr. Budi Suprapti, M.Si., Apt
7. Dr. Juni Ekowati, M.Si., Apt

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Nomor: 105/UN3.1.5/2020
Tanggal: 4 September 2020**

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala berkah dan rahmatNya kepada penulis dan keluarga sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Disertasi ini merupakan bagian akhir dari proses pendidikan S3 di Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Dengan selesainya disertasi ini, perkenankan penulis untuk menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt., selaku promotor, yang dengan tulus, penuh kesabaran dan perhatian yang begitu besar dalam memberikan bimbingan, wawasan, saran, arahan, nasehat, koreksi, dorongan semangat dan segenap ilmunya yang sangat bermanfaat kepada penulis, sejak penulis mulai mengikuti pendidikan S3 sampai dengan selesainya penyusunan naskah disertasi ini. Banyak pelajaran berharga yang penulis dapatkan dari beliau, terutama dalam menghadapi kendala dan masalah, dorongan semangat, ketekunan dan nasehat beliau dalam menghadapi setiap permasalahan sangat berarti bagi peneliti.

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, M.Si, selaku ko-promotor, yang dengan tulus dan penuh kesabaran telah banyak memberikan bimbingan, wawasan, arahan, saran, nasehat, koreksi dan dorongan semangat agar penulis segera menyelesaikan pendidikan S3. Ketekunan, semangat dan konsistensi beliau memberikan inspirasi dan pelajaran berharga kepada penulis.

Pemerintah Republik Indonesia cq. Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Ristekdikti), yang telah memberikan beasiswa dan dana hibah melalui hibah Penelitian Disertasi Doktor (PDD) kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan S3 di Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Surabaya (2015-2019), Prof. Ir. Joniarto Parung, M.M.B.A.T., Ph.D., yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan S3 di Universitas Airlangga dan Rektor Universitas Surabaya (2019-2023), Ir. Benny Lianto, M.M.B.A.T., yang juga telah memberikan kesempatan kepada penulis menyelesaikan pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Mohammad Nasih, MT., SE., Ak., CMA. yang telah menerima penulis dan memberikan kesempatan kepada penulis mengikuti pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Surabaya (2015-2019), Dr. Dra. Christina Avanti, M.Si., Apt., yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan S3 di Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Surabaya (2019-2023), Dr. Dra. Farida Suhud, M.Si., Apt., yang juga telah memberikan kesempatan kepada penulis menyelesaikan pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt., yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan S3.

Koordinator Program Studi Doktor Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt., yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan S3.

Ketua Departemen Klinis dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Surabaya masa bakti 2015-2019, Ike Dhiah Rochmawati, S.Farm., M.Farm.Klin., Apt., dan Dr. Rika Yulia, S.Farm., SpFRS, Apt., masa bakti 2019-2023, yang juga telah memberikan ijin dan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Dosen Pembina Mata Kuliah pada Program Studi S3 Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga: Prof. Dr. Siswandono, M.S., Apt.; Prof. Dr. Purwanto., Apt.; Prof. Dr. Muhamad Zainuddin, Apt.; Prof. Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt.; Prof. Junaidi Khotib, M.Kes, Apt, Ph.D; Chrismawan Ardianto, S.Farm, M.Sc., Ph.D, Apt; Mahardian Rahmadi, S.Si., M.Sc., Ph.D, Apt; Dr.rer.nat. Mulja Hadi Santosa, M.S., Apt yang telah memberikan ilmu, wawasan dan inspirasi kepada penulis selama menempuh pendidikan S3.

Para penguji ujian kualifikasi, ujian proposal, ujian kelayakan, ujian disertasi tertutup yang terdiri dari: Prof. Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si., Apt.; Dr. Suko Hardjono, M.S., Apt.; Prof. Edi Meiyanto, M.Si, Apt, Ph.D.; Prof. Junaidi Khotib, M.Kes, Apt, Ph.D.; Dr. Budi Suprapti, M.Si., Apt.; Dr. Juni Ekowati, M.Si., Apt yang telah memberikan saran, koreksi, dan motivasi kepada penulis selama mengikuti ujian dan menempuh pendidikan S3.

Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Surabaya yang telah memberikan dukungan moril, semangat, pengertian dan kesempatan kepada penulis dalam pendidikan S3 di Universitas Airlangga.

Dra. Lucia Endang Wuryaningsih, M.Si., Apt dan Devyani Diah Wulansari, S.Farm., M.Si., Apt sebagai tim pengajar Farmakologi, Dr. Rika Yulia, S.Farm., SpFRS, Apt; Dian Natasya Rahardjo, S.Farm., M.Farm.Klin., Apt; Ridho Islamie S.Farm., M.Si., Apt sebagai tim pengajar Anatomi Fisiologi Manusia, yang telah menyediakan waktu untuk menggantikan tugas penulis selama menempuh pendidikan S3 dan telah memberikan dukungan dan motivasi yang tak terhingga kepada penulis dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Prof. Supargiyono, DTM&H., S.U., Sp.Par(K) dari bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan bagian dari penelitian dan menggunakan fasilitas laboratorium untuk uji aktivitas sitotoksik.

Prof. Edi Meiyanto, M.Si, Apt, Ph.D selaku pimpinan Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) UGM yang telah membantu penulis dalam ketersediaan sel untuk penelitian dan dorongan motivasi dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Marcellino Rudyanto, M.Si., Apt, Ph.D., yang telah membantu penulis dalam menginterpretasikan hasil spektra NMR hasil penelitian. Dr. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt dan Dr. Tri Widiandani, S.Si., SpFRS., Apt, yang telah membantu penulis dalam ketersediaan bahan sintesis penelitian.

Dr. Dini Kesuma, S.Si, M.Si., Apt., yang telah memberikan wawasan dan waktunya untuk berdiskusi dengan penulis dan juga memberikan dorongan semangat dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Teman-teman seperjuangan dalam menempuh pendidikan S3: Bu Lisa Aditama, Bu Budiastuti, Bu Begum, Pak Arsyik, Pak Sentot, Pak Deddy, Bu Dewi Moo, Bu Aditya, Bu Victoria, Bu Julaeha dan Bu Ni Luh Dewi Aryani atas kebersamaan dalam suka maupun duka serta dukungan semangat untuk penulis dalam menyelesaikan pendidikan S3.

Pak Sutanto, Pak Angga, Pak Kushoiri, Pak Yanto, Bu Rumbiwati, Bu Niniek, Bu Rizki Fadillah, Pak Suparno, Bu Aristika Dinaryanti, Pak Eryk Hendrianto, dan Aida Ariyanti yang telah membantu penulis secara teknis dalam melakukan penelitian.

Kedua orang tua, almarhum Bapak Johan Kirtishanti dan Ibu Ellywati yang telah membesarkan, mendidik, menjaga dan memberikan teladan yang baik, dukungan moral dan materiil, serta memberikan dorongan semangat dan doa yang begitu tulus kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S3.

Kedua mertua, almarhum Ku Kian Sin dan almarhumah Sarijani Limaran Semoga beliau berdua mendapat tempat yang layak disisi Tuhan YME.

Saudara kandung tercinta, Agustina Johan, Trisna Johan, Erna Johan, Hendra Gunawan Johan dan Candra Gunawan Johan yang telah memberikan dukungan semangat, tenaga dan materiil serta doa yang tulus untuk penulis selama menyelesaikan studi S3. Saudara ipar terkasih, Halim Sutrisno, Hendra Tan, Thomas Budi Utomo, Shelly, Yenita Goeij, Pipik Limaran, Shen Liong, Tjitera Dewi Chin, Rina, Srijanah, Sulin, Kendall Seuser dan semua keponakan tersayang, yang telah memberikan motivasi dan doanya kepada penulis. Terima kasih atas segala dukungan dan warna kehidupan yang diberikan kepada penulis selama menjalani pendidikan S3.

Suami terkasih, Tjoen Foeng, yang memberikan warna suka dan duka dalam kebersamaan serta memberikan inspirasi kepada penulis untuk terus bersemangat dalam berkarya.

Anak-anak tercinta, Evelyn Quinn dan Raymond Eadward, pelita hati dan terang bagi penulis, penyejuk batin, pemberi motivasi dan energi yang luar biasa bagi penulis untuk menyelesaikan pendidikan S3.

Semua pihak, sahabat dan kerabat yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama menjalani pendidikan S3.

Akhir kata tidak ada gading yang tak retak, demikian pula disertasi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan masukan dari berbagai pihak untuk perbaikan disertasi ini. Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak terutama di bidang kesehatan, pendidikan dan penelitian.

Surabaya, Agustus, 2020
Penulis.

RINGKASAN**MEKANISME KEMATIAN SEL PRIMER KANKER PAYUDARA
YANG DIINDUKSI SENYAWA 4-(*t*-BUTIL)-*N*-BENZOILUREA
SECARA *IN VITRO****Aguslina Kirtishanti*

Jumlah kasus kanker baru terbanyak di Indonesia adalah kanker payudara. Insiden yang tinggi tersebut menjadikan kanker payudara sebagai masalah kesehatan yang penting untuk diperhatikan. Ditemukan sekitar 20% – 30% pasien kanker payudara yang mengekspresikan EGFR dan HER2 secara berlebihan dengan prognosis klinis yang buruk. Penelitian ini dilakukan untuk menjelaskan mekanisme kematian sel primer kanker payudara yang diinduksi senyawa 4-(*t*-butil)-*N*-benzoilurea secara *in vitro* melalui analisis hambatan sinyaling EGFR dan HER2 serta analisis peningkatan ROS. Senyawa 4-(*t*-butil)-*N*-benzoilurea (4TBBU) adalah senyawa kimia sintesis, dimana pada penelitian sebelumnya sudah dilakukan uji sitotoksik secara *Brine shrimp lethality test* (BST) dan terbukti memiliki aktivitas sitotoksik sehingga senyawa tersebut berpotensi untuk diteliti lebih lanjut mengenai mekanisme molekularnya terhadap kematian sel primer kanker payudara secara *in vitro*.

Aktivasi reseptor EGFR dan HER2 akan mengaktifasi beberapa jalur transduksi sinyal intraselular yaitu Ras-MAPK, PI3K/Akt, PLC γ , dan JAK-STAT. Jalur transduksi sinyal yang dikaji dalam penelitian ini adalah jalur Ras-MAPK dan JAK-STAT3 dimana jalur tersebut berperan terutama dalam proliferasi sel kanker. Senyawa 4TBBU diharapkan dapat menghambat proliferasi sel primer kanker payudara. Proliferasi sel kanker adalah pertambahan jumlah sel kanker yang tergantung pada keseimbangan antara pembelahan, diferensiasi dan kematian sel. Hambatan pada jalur sinyaling EGFR dan HER2 dapat menghambat pembelahan sel sedangkan kematian sel kanker payudara dianalisis melalui peningkatan ROS dalam sel primer kanker payudara. ROS adalah senyawa oksigen yang bersifat reaktif yang dapat menimbulkan kematian sel baik secara apoptosis maupun nekrosis. Semakin tinggi level ROS dalam sel primer kanker payudara maka semakin bersifat toksik dan menyebabkan kematian sel primer.

Sebelum senyawa 4TBBU disintesis dan dianalisis mekanisme molekularnya maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan yaitu uji *in silico* menggunakan program *Molegro Virtual Docker* (MVD). Uji *in silico* dilakukan untuk memprediksi aktivitas sitotoksik senyawa 4TBBU menggunakan reseptor EGFR dan HER2. Hasil uji *in silico* menghasilkan nilai *rerank score* (RS). Makin kecil nilai RS menyatakan makin kecil harga energi ikatan yang menunjukkan ikatan yang dihasilkan makin stabil sehingga diprediksi aktivitasnya semakin besar Berdasarkan hasil uji *in silico* sebagai uji pendahuluan, diprediksi senyawa 4TBBU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan hidroksiurea sebagai senyawa turunan urea yang paling sederhana, sehingga senyawa 4TBBU layak untuk disintesis dan dilanjutkan uji mekanisme molekular pada sel primer kanker payudara.

Sintesis senyawa 4TBBU dilakukan dengan mereaksikan 4-(*t*-butil)benzoilklorida dan urea melalui reaksi substitusi nukleofilik asil. Setelah diperoleh senyawa sintesis kemudian dilakukan uji kemurnian, identifikasi dan

konfirmasi struktur dengan spektroskopi IR, spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan spektroskopi masa (HRMS). Berdasarkan uji kemurnian, identifikasi dan konfirmasi struktur, dinyatakan bahwa senyawa 4TBBU hasil sintesis sudah sesuai.

Analisis mekanisme molekular terhadap kematian sel primer kanker payudara dilakukan menggunakan sel primer yang mengekspresikan EGFR dan HER2. Sel primer kanker payudara diperoleh dari isolasi jaringan biopsi pasien wanita kanker payudara. Sel primer hasil isolasi diidentifikasi menggunakan marker permukaan sel yaitu CD24, CD44, dan CD90 secara *flow cytometry* untuk memastikan bahwa sel primer yang diisolasi adalah sel kanker payudara. Selanjutnya untuk memastikan sel primer mengekspresikan EGFR dan HER2 maka diidentifikasi menggunakan antibodi monoklonal EGFR dan HER2 secara imunofluoresensi. Dari hasil isolasi dan identifikasi diketahui bahwa sel yang diperoleh adalah sel primer kanker payudara yang mengekspresikan EGFR dan HER2.

Setelah isolasi dan identifikasi sel primer kanker payudara, selanjutnya dilakukan uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro* menggunakan metode MTT. Sel yang digunakan dalam uji sitotoksik ini selain sel primer kanker payudara digunakan juga sel vero sebagai sel normal. Sel vero digunakan untuk mengetahui selektivitas senyawa 4TBBU terhadap sel primer kanker payudara dengan menghitung nilai *selectivity index* (SI). Nilai SI lebih dari 2 menyatakan senyawa tersebut memiliki selektivitas yang tinggi. Sebagai pembanding digunakan hidroksiurea yang memiliki kesamaan struktur dengan senyawa 4TBBU dan lapatinib sebagai obat antikanker yang telah digunakan secara klinis. Dari hasil uji aktivitas sitotoksik diketahui bahwa senyawa 4TBBU menunjukkan nilai IC_{50} yang lebih kecil ($\text{IC}_{50} = 0,61 \text{ mM}$) dibandingkan dengan senyawa pembanding hidroksiurea ($\text{IC}_{50} = 11,61 \text{ mM}$). Namun jika dibandingkan dengan lapatinib dengan nilai $\text{IC}_{50} = 0,05 \text{ mM}$, maka senyawa 4TBBU memiliki nilai IC_{50} lebih besar. Berdasarkan uji aktivitas sitotoksik pada sel primer kanker payudara diketahui bahwa senyawa 4TBBU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi daripada hidroksiurea dan lebih rendah daripada lapatinib.

Berdasarkan hasil uji sitotoksik pada sel vero sebagai sel normal, diketahui bahwa senyawa 4TBBU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi ($\text{IC}_{50} = 33,71 \text{ mM}$) dibandingkan hidroksiurea ($\text{IC}_{50} = 394,43 \text{ mM}$) dan lebih rendah dibandingkan lapatinib ($\text{IC}_{50} = 0,04 \text{ mM}$). Selanjutnya dihitung nilai SI dari tiap senyawa dan diperoleh bahwa senyawa 4TBBU memiliki SI sebesar 55,26, hidroksiurea sebesar 33,97, dan lapatinib sebesar 0,80. Hal ini berarti bahwa senyawa 4TBBU memiliki selektivitas yang tinggi terhadap sel primer kanker payudara sedangkan lapatinib bersifat tidak selektif terhadap sel primer kanker payudara.

Analisis hambatan sinyaling EGFR dan HER2 dilakukan menggunakan metode imunofluoresensi dengan melihat ekspresi protein pEGFR, pHER2, pRas, pSTAT3, Ki67 dan metabolit MDA. Analisis peningkatan ROS untuk mengetahui kematian sel primer kanker payudara dilakukan menggunakan metode *flow cytometry* dengan mengukur persentase ROS, apoptosis dan nekrosis. Sebagai pembanding pada analisis mekanisme molekular ini adalah lapatinib. Berdasarkan hasil analisis ekspresi protein dan metabolit dibuktikan bahwa senyawa 4TBBU bekerja dengan menurunkan ekspresi pEGFR, pHER2, pRas, pSTAT3, Ki67 dan meningkatkan metabolit MDA. Hal ini berarti senyawa 4TBBU bekerja dengan menghambat sinyaling EGFR dan HER2 sehingga transduksi sinyal intraselular terhambat dan menyebabkan ekspresi pRas dan pSTAT3 menurun dan pada akhirnya proliferasi sel menurun yang terlihat dari ekspresi Ki67 yang turun. Berdasarkan hasil analisis ROS dan apoptosis dibuktikan bahwa senyawa 4TBBU belum dapat meningkatkan persentase ROS dan apoptosis dalam sel primer kanker payudara. Hasil analisis nekrosis juga menunjukkan bahwa senyawa

4TBBU belum dapat memicu terjadinya nekrosis tetapi dari hasil analisis metabolit MDA menunjukkan bahwa metabolit MDA meningkat dengan pemberian senyawa 4TBBU. Hal ini dapat dijelaskan bahwa secara molekular sel yang mengalami nekrosis bukan hanya mengalami kerusakan pada membran sel tetapi kerusakan juga dapat terjadi pada membran nukleus dan membran organel. Bila membran nukleus atau membran organel rusak tetapi membran sel masih utuh maka fungsi sel sudah tidak berjalan sebagaimana mestinya dan dikatakan sel mulai mengalami kematian. Jadi senyawa 4TBBU dapat dikatakan bekerja dengan menginduksi kematian sel primer kanker payudara secara nekrosis.

Analisis jalur dilakukan untuk mengetahui hubungan antar variabel dalam mekanisme molekular pada penelitian ini. Berdasarkan hasil analisis jalur, senyawa 4TBBU memberikan pengaruh terhadap penurunan ekspresi pHER2 ($\beta=-0,989$; $p=0,000$) dan pEGFR ($\beta=-0,996$; $p=0,000$). Ekspresi pHER2 juga memberikan pengaruh terhadap ekspresi pRas ($\beta=0,547$; $p=0,000$) dan pSTAT3 ($\beta=0,993$; $p=0,000$). Hal ini berarti terdapat hubungan yang linier pada pemberian senyawa 4TBBU terhadap penurunan ekspresi pHER2 yang menyebabkan sinyaling HER2 untuk mengaktivasi Ras dan STAT3 menjadi terhambat sehingga ekspresi pRas dan pSTAT3 menurun. Pada analisis jalur pHER2-Ki67 dimana ekspresi pHER2 tidak berpengaruh terhadap ekspresi Ki67 ($\beta=0,035$; $p=0,939$). Ini berarti jalur tersebut belum dapat dijelaskan karena ada jalur lain yang tidak diteliti dalam penelitian ini. Dari analisis jalur diketahui bahwa ekspresi pEGFR memberikan pengaruh terhadap ekspresi pRas ($\beta=0,458$; $p=0,000$). Hal ini menyatakan bahwa pemberian senyawa 4TBBU dapat menurunkan ekspresi pEGFR sehingga aktivasi Ras terhambat dan menyebabkan ekspresi pRas turun. Ekspresi pEGFR tidak memberikan pengaruh terhadap ekspresi pSTAT3 ($\beta=0,150$; $p=0,478$). Ini berarti ada jalur lain yang tidak diteliti dalam penelitian ini yang dapat mengaktifkan STAT3 tanpa melalui EGFR. Jalur pEGFR-Ki67 menunjukkan bahwa ekspresi pEGFR berpengaruh terhadap ekspresi Ki67 secara langsung tanpa melalui jalur Ras dan STAT3 ($\beta=0,986$; $p=0,000$). Hal ini berarti terdapat sinyaling EGFR langsung menuju nukleus dan mempengaruhi Ki67 dalam nukleus. Pada jalur 4TBBU-Ki67 ditunjukkan bahwa senyawa 4TBBU tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap penurunan ekspresi Ki67 ($\beta=0,003$; $p=0,993$) yang berarti jalur ini belum dapat dijelaskan karena ada jalur lain yang tidak diteliti dalam penelitian ini. Pada analisis jalur pRas-Ki67 ($\beta=0,732$; $p=0,176$) dan pSTAT3-Ki67 ($\beta=-0,198$; $p=0,635$) menunjukkan bahwa ekspresi pRas dan ekspresi pSTAT3 tidak memberikan pengaruh terhadap ekspresi Ki67. Hal ini berarti mekanisme kerja senyawa 4TBBU terhadap penurunan ekspresi Ki67 melalui jalur Ras dan STAT3 belum dapat dijelaskan pada penelitian ini karena ada jalur lain dari Ras menuju Ki67 dan dari STAT3 menuju Ki67 yang tidak diteliti dalam penelitian ini.

Pada analisis jalur 4TBBU-ROS ($\beta=0,158$; $p=0,700$), ROS-apoptosis ($\beta=-0,213$; $p=0,554$), ROS-MDA ($\beta=0,071$; $p=0,844$), MDA-nekrosis ($\beta=0,525$; $p=0,119$), nekrosis-Ki67 ($\beta=-0,162$; $p=0,195$), apoptosis-Ki67 ($\beta=0,096$; $p=0,242$), tidak memberikan pengaruh secara langsung. Hal ini berarti bahwa jalur mekanisme kerja senyawa 4TBBU terhadap peningkatan ROS, apoptosis, MDA dan nekrosis belum dapat dijelaskan melalui penelitian ini.

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja senyawa 4TBBU melalui jalur sinyaling PI3K/Akt, PLC γ , *nuclear* EGFR, dan mekanisme kerja terhadap proses nekrosis dan apoptosis serta pada siklus sel. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada senyawa 4TBBU sebagai terapi kombinasi bersama obat antikanker yang telah digunakan secara klinis untuk mengurangi terjadinya resistensi pada obat antikanker tersebut.

SUMMARY

PRIMARY BREAST CANCER CELLS DEATH INDUCED BY 4-(*t*-BUTYL)-*N*-BENZOYLUREA: IN VITRO MECHANISM

Aguslina Kirtishanti

Breast cancer has the largest number of cases among all types of cancers in Indonesia. The increasing prevalence of breast cancer raises concerns and encourages further study on drug development. Approximately 20 - 30 % of patients with breast cancer have been found to overexpress EGFR and HER2 with poor clinical prognosis. This present study aims to explain the in vitro mechanism of breast cancer primary cell death induced by 4-(*t*-butyl)-*N*-benzoylurea compound through inhibition of EGFR and HER2 signaling and increasing ROS. 4-(*t*-butyl)-*N*-benzoylurea (4TBBU) is a synthetic chemical compound that has undergone a brine shrimp lethality test (BST) with proven cytotoxic activity. On that account, this compound is potential for further study on its cytotoxic activity and molecular mechanism against breast cancer.

The activation of the EGFR and HER2 receptors will subsequently activate several signal transduction pathways, Ras-MAPK, PI3K/Akt, PLC γ , and JAK-STAT. The signal transduction pathways studied in this study were the Ras-MAPK and JAK-STAT3 pathways where these pathways played a major role in the proliferation of cancer cells. The 4TBBU compound is expected to inhibit the proliferation of primary breast cancer cells. Cancer cell proliferation is the increase in the number of cancer cells depending on the balance between division, differentiation and cell death. Inhibition of the EGFR and HER2 signaling pathway can inhibit cell division. To see the primary cell death of breast cancer, the increase in ROS in primary cells was analyzed. ROS is a reactive oxygen compound that can cause cell death either by apoptosis or necrosis. The higher the level of ROS in primary breast cancer cells, the more toxic and causing primary cell death.

Before the synthesis and molecular mechanism test of 4TBBU compound, a preliminary in silico test using Molegro Virtual Docker (MVD) program was performed. This in silico test was required to predict the cytotoxic activity of 4TBBU compound using EGFR and HER2 receptors. The in silico test results yield the rerank score (RS). Smaller RS value indicates smaller value on binding energy. This smaller value on binding energy results in increasingly stable binding, from which higher cytotoxic activity is predicted. As suggested by this in silico modelling, 4TBBU compound has higher cytotoxic activity compared to hydroxyurea, yet smaller in comparison to lapanitib. Therefore, 4TBBU compound is eligible for synthesis proceeded by molecular mechanism assay on breast cancer cells.

4TBBU compound was synthesized by the reaction of 4-(*t*-butyl)benzoylchloride compound with urea through nucleophilic acyl substitution reaction. The synthetic compound formed was undergoing a purity test, identification and structure conformation measured with IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and mass (HRMS) spectroscopy. The result suggested that 4TBBU compound has favourable synthesized compound.

The in vitro cytotoxicity test and molecular mechanism on 4TBBU compound was performed on breast cancer primary cells, which was derived from an isolated tissue

biopsy of female patients with breast cancer. The isolated cells were identified using cell surface markers, CD24, CD44, and CD90 with flow cytometry method to confirm that the isolated cells were indeed breast cancer cells. To ensure that the primary cells expressed EGFR and HER2, they were identified using monoclonal antibody of EGFR and HER2, employing immunofluorescent technique. Once primary cells expressed EGFR and HER2, cytotoxic activity test and molecular mechanism assay were proceeded. The isolation and identification process stated that the cells derived were breast cancer primary cells that expressed EGFR and HER2.

In vitro cytotoxic activity test was performed on breast cancer primary cells and vero cells, under MTT assay method. As normal cells, vero cells serve as the indicator to investigate the selective toxicity of 4TBBU compound against breast cancer primary cells by calculating the selectivity index (SI) ratio. Selectivity Index ratio above 2 indicates a high selectivity of a compound. As a comparative study, HU was used due to the similarities of the structure. In addition, lapatinib, a widely used anticancer drugs for patients with HER2 positive breast cancer, was included. This cytotoxicity assay indicated a smaller value on the IC_{50} of 4TBBU compound, 0.61 mM, compared to reference compound HU, IC_{50} = 11,61 mM. However, 4TBBU compound demonstrated higher value when compared to the IC_{50} of lapatinib, 0,05 mM. As shown on the tissue culture assay against breast cancer primary cells, 4TBBU compound possessed higher cytotoxicity than HU, yet smaller in cytotoxic activity compared to lapatinib.

As investigated on the cytotoxicity assay against vero normal cells, 4TBBU compound indicated cytotoxic activity with IC_{50} of 33,71 mM, higher than HU, IC_{50} = 394,43 mM and lower than lapatinib, IC_{50} = 0,04 mM. The calculated SI ratio of each compound is as follows: 4TBBU with SI ratio = 55,26, HU = 33,97, and lapatinib = 0,80. This suggests that 4TBBU compound has great selective toxicity against breast cancer primary cells, while lapatinib shows unselective toxicity on those cells.

Molecular mechanism analysis to examine the expression of pEGFR, pHER2, pRas, pSTAT3, Ki67 proteins and MDA metabolite employed immunofluorescent technique, while to investigate the death of breast cancer primary cells, ROS percentage was adopted featuring apoptosis and necrosis under flow cytometry method. As the reference compound of molecular mechanism analysis, lapatinib was used.

From the investigation of metabolite and protein expression analysis, it is proven that 4TBBU compound acts on lowering the expression of pEGFR, pHER2, pRas, pSTAT3, and Ki67, yet increase the MDA metabolite. This means, 4TBBU functions on inhibiting EGFR and HER2 signaling pathways, enabling inhibition on intracellular signalling transduction. As a result, pRas dan pSTAT3 expression decreased and caused a lowering rate of cell proliferation, as seen on the smaller expression of Ki67. On account of ROS analysis with apoptosis and necrosis features included, it is suggested that 4TBBU compound could not enhance the percentage of ROS and apoptosis of breast cancer primary cells. The result of the necrosis analysis also showed that 4TBBU compound could not trigger necrosis whereas from the MDA metabolite analysis showed that the MDA metabolite increased by giving 4TBBU compound. This can be explained that molecularly, necrotized cells not only experience damage to the cell membrane but damage can occur to the nuclear and organelle membranes. If the nuclear and organelle membranes is damage but the cell membrane is still intact, then the cell is function has not run properly and it is said that the cell begins to experience death. The 4TBBU compound is proven to work by inducing necrosis of breast cancer primary cells.

A pathway analysis procedure was performed to examine the correlation among variables in molecular mechanism of this present study. This pathway analysis

suggested that 4TBBU-pHER2 ($\beta=-0,989$; $p=0,000$) and 4TBBU-pEGFR ($\beta=-0,996$; $p=0,000$) pathways provide instant effects and play an important role in lowering pHER2 and pEGFR expressions. pHER2 expressions also affects directly on pRas expressions, ($\beta= 0,547$; $p=0,000$) and pSTAT3 ($\beta=0,993$; $p=0,000$). This advocates an in line interdependence on 4TBBU supplementation against a lowered pHER2 expression that evokes HER2 signaling pathways to activate Ras and inhibits STAT3. This way, the expression of pRas and pSTAT3 is diminished. In the analysis of the pHER2-Ki67 pathway, pHER2 expression had no effect on the Ki67 expression ($\beta=0,035$; $p=0,939$). This means that the pathway cannot be explained because there are other pathways that were not examined in this study.

The pathway analysis suggested that the impact of pEGFR expression exists on pRas expression ($\beta=0,458$; $p=0,000$), but none on pSTAT3 expression, which is $\beta=0,150$; $p=0,478$. This confirms 4TBBU compound lowers pEGFR expressions, thus inhibits Ras activation and decreases the expression. Meanwhile, pathway and mechanism of 4TBBU compound against the lowering expression of pSTAT3 through EGFR signaling pathways remain unknown due to other existing pathways leading to STAT3 through EGFR which are not included in this research. The pEGFR-Ki67 pathways shows that pEGFR expression directly affects Ki67 expression without going through Ras and STAT3 pathways ($\beta=0,986$; $p=0,000$). This means that there is a direct EGFR signal to the nucleus and affects Ki67 in the nucleus.

The 4TBBU-Ki67 pathway, it was shown that the 4TBBU compound did not significantly influence the decrease in Ki67 expression ($\beta=0,003$; $p=0,993$), which means that the pathway can not be explained because there are other pathways that were not examined in this study. While the analysis of other pathways, pRas-Ki67 ($\beta=0,732$; $p=0,176$) and pSTAT3-Ki67 ($\beta=-0,198$; $p=0,635$), suggesting that the expressions of pRas and pSTAT3 have no impact on the expression of Ki67. All in all, mechanism of action of 4TBBU compound against the lowering expression of Ki67 through Ras pathways and STAT3 remains obscure due to other unexplored pathways in this study.

The pathway analysis of these compounds are as follows: 4TBBU-ROS ($\beta=0,158$; $p=0,700$), ROS-apoptosis ($\beta=-0,213$; $p=0,554$), ROS-MDA ($\beta=0,071$; $p=0,844$), MDA-nekrosis ($\beta=0,525$; $p=0,119$), nekrosis-Ki67 ($\beta= -0,162$; $p=0,195$), apoptosis-Ki67 ($\beta=0,096$; $p=0,242$), which indicates non impactful results. As suggested, action mechanism of 4TBBU compound against enhancing ROS percentage, apoptosis, MDA and necrosis remain unclear. This encourages further study to conduct searching for molecular mechanism of 4TBBU compound to evoke the death of breast cancer primary cells.

This present study suggests that it is crucial to conduct further experiments on 4TBBU compound as the combination cancer therapy, in line with the existing, clinically used drugs to minimize drug resistance on the anticancer treatment. In addition, future studies on finding the molecular mechanism of 4TBBU compound on few things like: on PI3K/Akt, PLC γ , nuclear EGFR signaling pathways, and the mechanism of action against necrosis and apoptosis processes as well as in the cell cycle.