

POTENSI PENGINDUKSI APOPTOSIS SENYAWA NIKOTINIL DIBUTIL GLUTAMAT ESTER TERHADAP SEL KANKER T47D

Chandra Risdian^{*}, Tjandrawati^{*}, Muhamad Hanafi^{**}, Yulia Anita^{**}, dan AMJ Putra^{**}

^{*}Pusat Penelitian Kimia LIPI

Jl. Cisit-Sangkuriang, Bandung 40135 Tel: (022)2503051, Fax: (022)2503240

E-mail:chan002@lipi.go.id

^{**}Pusat Penelitian Kimia LIPI, Kawasan PUSPIITEK Serpong, Tel: (021) 7560929, Fax: (021)7560549

ABSTRACT

Nicotinil Dibuthyl Glutamate Ester (NDBGE) is a synthetic compound that is an analog of antibiotic UK-3A from mycelium of Streptomyces sp.517-02. This compound was estimated to have anticancer activity similar to UK-3A. The aim of this research was to know the NDBGE's apoptotic inducing potency to human breast cancer T47D in vitro. DMEM + 1% PS + 10% FBS was added to human breast cancer T47D cells until cell concentration reached $1-5 \times 10^5$ cells/ml. NDBGE then was diluted by DMSO until 100ppm concentration. Propidium iodide with 50 μ g/ml concentration was added to the T47D cells. The analysis was conducted by flow cytometry method. The result was that the apoptosis percentage of the cells was 12,35%.

Keywords: Nicotinil Dibuthyl Glutamate Ester, Human breast cancer T47D, Apoptosis, Flow cytometry

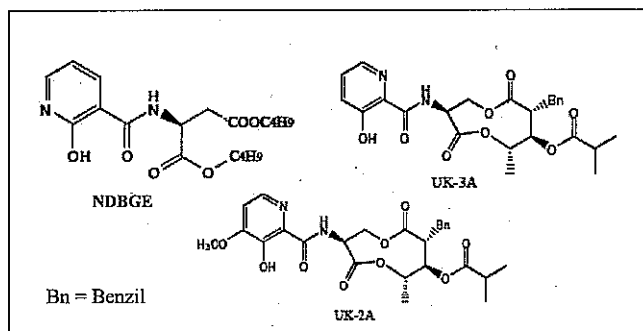
PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit yang timbul akibat perubahan DNA sehingga menimbulkan pertumbuhan sel yang cepat dan tidak terkontrol¹, serta dapat menyebar ke seluruh bagian tubuh². Kanker dapat menyerang manusia pada segala umur, dalam waktu yang lama bahkan akan dapat menyebabkan kematian. Cara untuk mengobati penyakit kanker biasanya dengan jalan operasi dan kemoterapi. Senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antibiotika baru, yaitu UK-2A sebagai komponen utama dan UK-3A sebagai komponen minor, telah diisolasi dari miselium *Streptomyces* sp. 517-02 dan dielusidasi³. Penelitian Ueki *et al.*⁴ menyatakan bahwa senyawa UK-3A memiliki aktivitas sebagai antibiotik, antifungi, dan antikanker. UK-3A memiliki potensi sebagai antikanker, tetapi aktivitasnya masih kurang tinggi (IC_{50} : 18-100 μ g/ml).

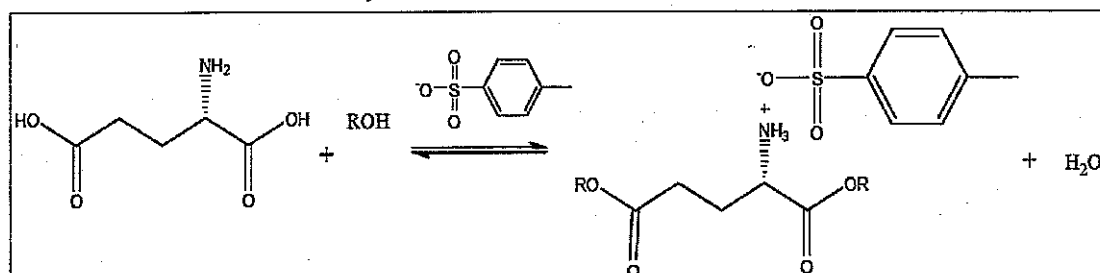
Aktivitas yang cukup tinggi pada senyawa UK-3A ditunjukkan oleh gugus hidroksi (OH) pada cincin piridin dan amida (CONH). Kedua

gugus ini menunjukkan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan sel kanker. Aktivitas yang cukup tinggi juga ditunjukkan oleh gugus lakton atau ester yang merupakan gugus yang mempunyai sifat sebagai gugus hidrofobik⁵. Nikotinil Dibutil Glutamat Ester (NDBGE) merupakan senyawa sintetik analog dengan UK-3A. Senyawa ini memiliki gugus hidroksi (OH), amida (CONH) dan ester seperti pada UK-3A. Dengan adanya gugus-gugus tersebut maka senyawa NDBGE diduga memiliki aktivitas antikanker seperti halnya pada senyawa UK-3A. Struktur molekul senyawa UK-2A, UK-3A, dan NDBGE dapat dilihat pada Gambar 1.

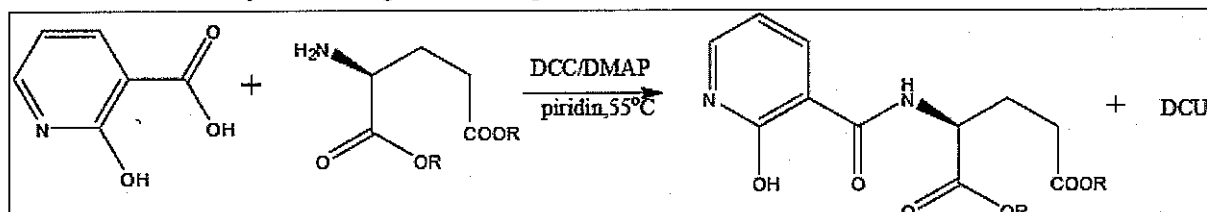
Senyawa NDBGE, yang merupakan senyawa analog UK-3, disintesis melalui dua tahap reaksi kimia, yaitu reaksi esterifikasi pada tahap pertama dan reaksi amidasi pada tahap kedua. Sintesis dimulai dengan mereaksikan senyawa asam L-glutamat dengan butanol menggunakan katalis asam *p*-toluenasulfonat, menghasilkan senyawa dibutil glutamat ester *p*-toluenasulfonat seperti pada Gambar 2. Dalam reaksi esterifikasi selain digunakan katalis asam



Gambar 1. Struktur molekul dari senyawa NDBGE, UK-3A, UK-2A



Gambar 2. Sintesis senyawa dialkil glutamat ester *p*-TsOH



Gambar 3. Reaksi pembentukan senyawa analog UK-3

mineral seperti HCl, HClO₄, H₂SO₄, dan *p*-toluensulfonat (*p*-TsOH) dapat juga digunakan aktivator dan katalis seperti DCC (N,N-disikloheksilkarbodiimida) dan DMAP (4-N,N-dimetilaminopiridin). DCC berfungsi untuk mengaktifkan gugus karboksilat, sedangkan katalis DMAP berfungsi untuk mempercepat laju reaksi⁶. Selanjutnya produk senyawa yang diperoleh, kemudian direaksikan dengan asam 2-hidroksi nikotinat dengan reaksi seperti Gambar 3.

Salah satu parameter yang dilihat pada aktivitas antikanker suatu senyawa adalah apoptosis. Apoptosis merupakan peristiwa kematian sel secara terprogram. Apoptosis ditandai dengan perubahan pada membran sel, nukleus yang menyusut, kromatin terkondensasi, serta DNA yang terfragmentasi. Yang berperan sebagai pusat dari proses apoptosis adalah kelompok enzim *cysteine-containing aspartate proteinases*, yang disingkat dengan istilah *caspase*⁷. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat potensi apoptosis senyawa NDBGE

secara *in vitro* terhadap salah satu jenis sel kanker yakni sel kanker payudara manusia T47D.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2008 di Laboratorium Bidang Kimia Bahan Alam Pangan dan Farmasi, Pusat Penelitian Kimia LIPI, Bandung.

Alat yang digunakan adalah *laminar air-flow*, mikroskop, sentrifus, botol T25, pelat sumur 96, inkubator CO₂, dan *flowcytometer COULTER® EPICS® XL™*. Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah sel kanker payudara manusia T47D yang merupakan sel koleksi dari Pusat Penelitian Kimia LIPI Bandung, media *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (DMEM), antibiotik *Penicillin-Streptomycin* (PS), *Foetal Bovine Serum* (FBS), *Newborn Calf Serum* (NCS), Enzim *Trypsin-EDTA*, larutan *Phosphat Buffer Solution* (PBS), H₂O₂, DMSO (Dimetil Sulfoksida),

Propidium Iodida (PI), serta senyawa analog UK-3 yaitu NDBGE.

Penentuan Konsentrasi H_2O_2 Sebagai Kontrol Positif Apoptosis

Metode yang digunakan mengikuti yang telah dikerjakan oleh McKeague *et al*⁸. Modifikasi dilakukan pada jumlah sel, konsentrasi PI yang digunakan, dan penggunaan FBS serta NCS. Sel kanker T47D ditambahkan media DMEM + 1% PS + 10% FBS dalam botol T25 hingga mempunyai volume 3 ml dengan konsentrasi sel sebanyak $1-5 \times 10^5$ sel/ml, lalu diinkubasi selama 15-18 jam di dalam inkubator CO_2 . Setelah diinkubasi 15-18 jam, sel tersebut kemudian diberikan konsentrasi H_2O_2 akhir yang berbeda-beda, yakni 0,0003%, 0,001%, 0,003%, dan 0,009%. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam pada inkubator CO_2 . Sel yang tidak diberikan H_2O_2 diuji sebagai kontrol negatif. Media sel dibuang dan sel dibilas 3 kali dengan larutan PBS. Sel diberikan 1 ml Tripsin-EDTA 0,25% untuk melepaskan perlekatan sel pada permukaan botol selama 2-3 menit hingga sel terlepas semuanya setelah diamati dengan mikroskop.

Aktivitas tripsin harus dihentikan dengan cara menambahkan 3 ml media DMEM + 10% NCS. Sel disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit untuk dipisahkan dengan medianya. Sel yang mengendap kemudian diresuspensi kembali dan ditambahkan alkohol 70% sebanyak 100 μ l lalu diinkubasi dalam lemari pendingin (suhu 8-15°C) selama 30 menit. Sel disentrifus kembali untuk memisahkannya dari alkohol. Sel yang mengendap diresuspensi kembali dan ditambahkan larutan PI 50 μ g/ml sebanyak 900 μ l. Sel diinkubasi pada suhu kamar di ruang yang gelap selama 15 menit. Analisis kemudian dilakukan dengan metode *flow cytometry* dengan bantuan perangkat lunak Expo32 ADC.

Pengujian Senyawa NDBGE Terhadap Sel Kanker T47D

Sebanyak 1 mg senyawa NDBGE dilarutkan dalam 100 μ l DMSO hingga diperoleh konsentrasi 1% larutan NDBGE. Sel kanker T47D diberikan media DMEM + 1% PS + 10% FBS dalam pelat sumur 96 sebanyak 4x8 sumur hingga memiliki volume masing-masing 180 μ l dengan konsentrasi sel akhir sebanyak 1×10^5 sel/

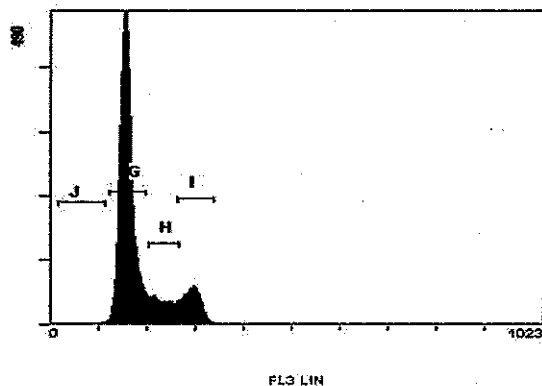
ml, lalu diinkubasi 15-18 jam di dalam inkubator CO_2 . Sel diujikan dengan 3 perlakuan yaitu dengan H_2O_2 , NDBGE, dan DMSO. H_2O_2 sebagai kontrol positif dengan konsentrasi yang sebelumnya telah ditentukan. Senyawa NDBGE dengan konsentrasi akhir 100ppm (dalam DMSO konsentrasi akhir 1%). DMSO dengan konsentrasi 1% untuk melihat apakah pelarut untuk NDBGE ini berpengaruh signifikan terhadap sel yang terapoptosis. Masing-masing perlakuan memiliki volume akhir 200 μ l tiap sumur. Sel T47D tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif.

Sel tersebut selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam pada inkubator CO_2 . Sel dibilas 3 kali dengan larutan PBS, lalu diberikan 1 ml Tripsin-EDTA 0,25% untuk melepaskan perlekatan sel pada permukaan flask selama 2-3 menit hingga sel terlepas semuanya. Aktivitas tripsin dihentikan dengan cara menambahkan 3 ml media DMEM + 10% NCS. Sel disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit untuk dipisahkan dengan medianya. Sel yang mengendap kemudian diresuspensi kembali dan ditambahkan alkohol 70% sebanyak 100 μ l lalu diinkubasi dalam lemari pendingin (suhu 8-15°C) selama 30 menit.

Sel disentrifus kembali untuk memisahkannya dari alkohol. Sel yang mengendap diresuspensi kembali serta ditambahkan larutan PI 50 μ g/ml sebanyak 900 μ l. Sel diinkubasi pada suhu kamar di ruang yang gelap selama 15 menit. Analisis kemudian dilakukan metode *flow cytometry* dengan bantuan perangkat lunak Expo32 ADC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada *cell cycle*, terdapat fase G1, fase S, dan fase G2/M. Pada fase G1 (*Growth 1*) banyaknya DNA adalah sebanyak 2n (diploid), umumnya sebagian besar sel berada pada fase G1. Pada fase S (*Synthesis*), sel mulai melakukan sintesis DNA untuk keperluan memperbanyak diri. Pada fase S, jumlah DNA sebanyak 2n + 4n. Sedangkan pada fase G2 (*Growth 2*)⁹, jumlah sel tidak sebanyak pada fase G1. Sel yang mengalami apoptosis dapat dilihat pada fase sebelum G1, karena jumlah DNA yang sangat sedikit akibat terfragmentasi (Gambar 4). DNA tersebut ditambahkan Propidium Iodida (PI) agar dapat berfluoresensi, alat *flow cytometer* akan mendeteksi banyaknya fluoresensi yang sebanding dengan konsentrasi DNA tiap sel.



Gambar 4. *Flow cytogram cell cycle* hasil analisis *flow cytometer*

Keterangan :

Sumbu X = Jumlah relatif DNA (terdeteksi sebagai sinyal yang diterima FL3)

Sumbu Y = Jumlah relatif sel yang dianalisis (maksimal 1024 digital channel)

J = fase apoptosis

G = fase G1

H = fase S

I = fase G2/M

Senyawa H_2O_2 merupakan molekul yang toksik bagi sel. Pada konsentrasi 0,01% sudah bisa menginduksi apoptosis pada sel kanker T47D hingga 6 jam, dan setelah itu sel akan mati (nekrosis)⁸. Karena sifatnya tersebut maka senyawa ini dijadikan sebagai kontrol positif terhadap terjadinya apoptosis pada sel. Namun, konsentrasinya harus ditentukan untuk sampel yang dilakukan selama 24 jam. Penentuan konsentrasi H_2O_2 selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Konsentrasi 0,003% H_2O_2 lebih baik daripada konsentrasi-konsentrasi lainnya. Pada sel yang normal (tidak diberi H_2O_2) terdapat sel yang mengalami apoptosis sebanyak 0,41%. Jumlah ini sangat sedikit jika dibandingkan dengan sel yang diberi perlakuan H_2O_2 . Pada sel kanker itu sendiri masih terjadi apoptosis, hanya saja frekuensi terjadinya apoptosis sangat jauh jumlahnya bila dibandingkan dengan jumlah sel yang terus-menerus berkembang¹. Pada konsentrasi 0,009% H_2O_2 , hampir semua sel sudah mati (nekrosis) sehingga pada saat analisis, yang terdeteksi hanya berjumlah 4 sel. Dengan demikian diketahui bahwa pada konsentrasi 0,009% H_2O_2 , larutan sudah terlalu toksik bagi sel. Oleh karena itu, konsentrasi H_2O_2 yang akan digunakan bagi kontrol positif adalah konsentrasi

Tabel 1. Persentase sel T47D yang terapoptosis selama 24 jam terhadap beberapa konsentrasi larutan H_2O_2

No.	Perlakuan	Jumlah sel Dianalisis	Jumlah sel terapoptosis	Persentase sel terapoptosis (%)
1.	Normal	14660	64	0,41
2.	0,0003% H_2O_2	38387	265	0,65
3.	0,003% H_2O_2	6302	137	2,14
4.	0,009% H_2O_2	4	0	0*)

*) sel sudah hampir mati semua (nekrosis)

sebanyak 0,003% H_2O_2 . Pada konsentrasi ini persentase sel yang mengalami apoptosis adalah sebanyak 2,14%.

Pengujian senyawa NDBGE hanya menggunakan konsentrasi sebesar 100ppm saja. Konsentrasi sebesar 100ppm tergolong konsentrasi yang sangat tinggi. Hasil dari pengujian senyawa NDBGE terhadap sel kanker T47D ternyata hanya dapat menginduksi apoptosis sel sebesar 12,35% (Tabel 2). Senyawa NDBGE hanya dapat menginduksi apoptosis sel sebesar 12,35%. Hasil ini masih tergolong rendah, karena konsentrasi yang digunakan sudah sangat tinggi yakni 100ppm atau 100 μ g/ml.

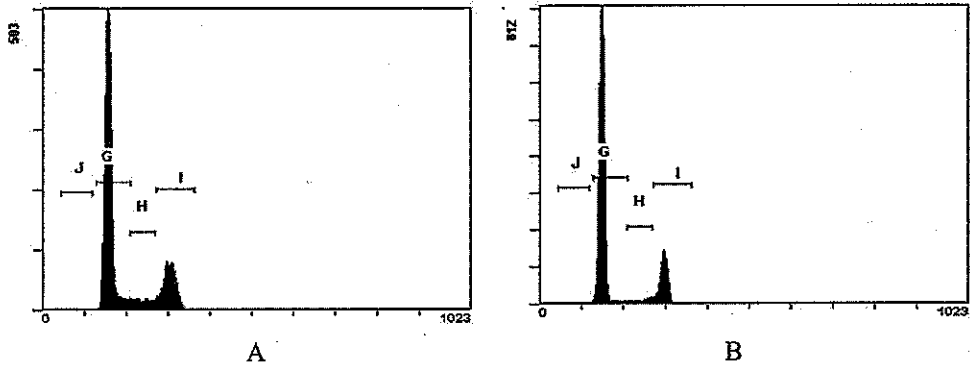
Senyawa UK-3A dan analognya, memiliki struktur yang mirip dengan antibiotik antimisin A3. antimisin A3 memiliki peran sebagai inhibitor Bcl-xL^{11,12}, yaitu enzim anti-apoptosis pada mitokondria. Oleh karena itu, besar kemungkinan bahwa NDBGE juga memiliki peran yang sama dengan antimisin A3 tersebut.

Penggunaan 1% DMSO tidaklah terlalu toksik bagi sel tersebut, sebab hanya bisa menginduksi apoptosis sebanyak 0,56%. Nilai ini masih di bawah kontrol positif yaitu 0,003% H_2O_2 . Untuk itu pada penelitian selanjutnya tidaklah bermasalah jika yang digunakan adalah 1% DMSO sebagai pelarut senyawa-senyawa yang diuji. Perbandingan *flow cytogram cell cycle* pada keempat perlakuan di atas dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.

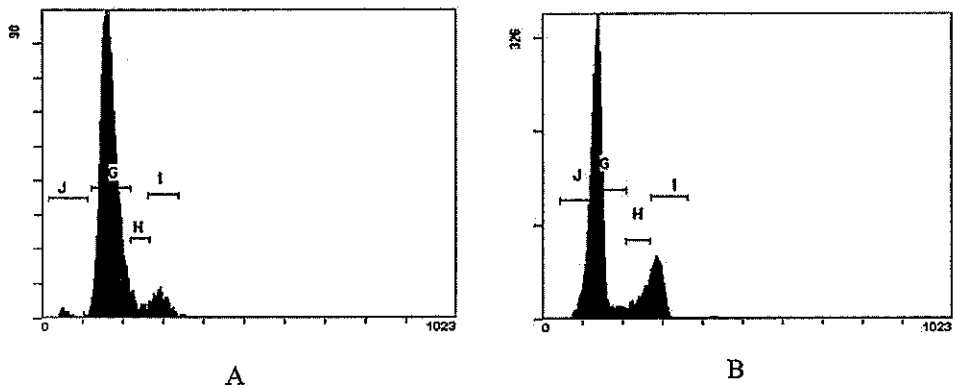
Terlihat pada daerah J (fase apoptosis) terdapat data yang tidak dapat ditemukan pada Gambar 5 sebelumnya. Hal ini menandakan pada Gambar 5, persentase apoptosis sangat kecil sekali sehingga sinyal yang ditangkap sangat lemah dan tidak terlihat dalam *flow cytogram*,

Tabel 2. Hasil uji senyawa NDBGE pada sel T47D

No.	Perlakuan	Jumlah sel dianalisis	Jumlah sel terapoptosis	Persentase sel terapoptosis (%)
1.	Normal	13472	21	0,15
2.	1% DMSO	14775	84	0,56
3.	0,003% H ₂ O ₂	5266	169	3,16
4.	100ppm NDBGE	13032	1853	12,35



Gambar 5. Flow cytogram cell cycle pada perlakuan normal (A) dan 1% DMSO (B)



Gambar 6. Grafik flow cytogram cell cycle pada perlakuan 0,003% H₂O₂ (A) dan (B) 100ppm NDBGE

berbeda dengan persentase apoptosis yang lebih besar pada Gambar 6, sehingga grafiknya timbul pada daerah J tersebut.

KESIMPULAN

Aktivitas senyawa NDBGE masih tergolong rendah, dengan konsentrasi yang sangat besar saja yakni 100ppm atau 100µg/ml hanya mampu menginduksi apoptosis pada sel T47D kurang dari 20%. Nilai ini jauh dari harapan, karena masih jauh dari angka 50%. Senyawa NDBGE perlu diteliti lagi potensinya dalam menginduksi sel kanker jenis lainnya. Penelitian untuk mengetahui potensi penginduksi apoptosis terhadap sel kanker T47D dari senyawa analog UK-3A lainnya juga perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Indah Primadona dan Sdr. Rina Andriyani yang telah memberikan saran secara teknis dan nonteknis dalam pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

¹Carson AD and Ribeiro JM.1993. "Apoptosis and Disease". *Lancet* 341: 1251-1254.

²Gabriel J. 2001. "Cancer: Health Promotion, Early Detection and Staging". Dalam: Gabriel J (ed.), *Oncology Nursing in Practice*. London: Whurr Publishers.

³Ueki M., Abe K., Hanafi M., Shibata K., Tanaka T., and Taniguchi M. 1996. "UK-3A a novel antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02, Fermentation, Isolation, and Biological Properties. *J. Antibiotic*, 49: 639-644.

- ⁴Ueki M., Kusumoto A., Hanafi M., Shibata K., Tanaka T., and Taniguchi M. 1997. "UK-3A a Novel Antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02, Fermentation, Isolation, Structure Elucidation and Biological Properties". *J. Antibiotic*, 50 (7): 551-555.
- ⁵Hanafi M. 1995. "Studies of Novel Antibiotics Metabolites from *Streptomyces* sp". 517-02: Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science. Japan: Osaka City University.
- ⁶Hanafi M., Trisnamurti RH., Thelma AB., Herlina. 1997. "Optimasi Pembentukan Senyawa Analog Antibiotik UK-3, 3-Hidroksipikolinil Serin Metil Ester". *Prosiding Seminar Nasional*. Himpunan Kimia Indonesia Cabang Jawa Barat. Bandung, 24-27 November 1997. Hlm 69-74.
- ⁷Koolman J., and Roehm KH. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme: Stuttgart.
- ⁸McKeague AL, Wilson DJ., Nelson and J. 2003. "Staurosporine-induced Apoptosis and Hydrogen Peroxide-Induced Necrosis in Two Human Breast Cell Lines". *Br. J. Cancer* 88: 125-131.
- ⁹Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF., Scheoer T. 2001. "Flow Cytometry in Biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 350-360.
- ¹⁰Al-Rubeai M, welzanbach K, Lloyd DR, and Emery. 1997. A Rapid method for Evaluation of Cell Number and Viability by Flow Cytometry. *Cytotechnology*, 24: 161-168.
- ¹¹Enyedy IJ., Ling Y., Nacro K., Tomita Y., Wu X., Cao Y., Guo R., Li B., Zhu X., Huang Y., Long YQ., Roller PP, Yang D., and Wang S. 2001. "Discovery of Small-molecule Inhibitors of Bcl-2 through Structure-based Computer Screening. *J. Med. Chem*, 44: 4313-4324.
- ¹²Shangary S., and Johnson DE. 2003. "Recent Advances in the Development of Anticancer Agents Targeting Cell Death Inhibitors in the Bcl-2 Protein Family. *Leukemia*, 17: 1470-1481.