

PENGARUH PENINGKATAN LIPOFILISITAS PADA SENYAWA ANALOG UK-3A DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN SEL KANKER P-388

Hanafi, M., Y. Anita, AMJ. Putra, A. Darmawan, N. Artanti, Linar Z. Udin

Pusat Penelitian Kimia – LIPI, Kawasan Puspiptek, Kabupaten Tangerang 15314.
hanafi124@yahoo.com, myname_yulia@yahoo.com

INTISARI

UK-3A adalah Antibiotika UK-3A mempunyai struktur dilakton cincin sembilan, diisolasi sebagai minor komponen dari *Streptomyces* sp. 517-02. Antibiotika tersebut mempunyai potensi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P388 dan KB dengan nilai IC_{50} 38 dan 20 mg/mL. Untuk melihat kenaikan efek lipofilitas dari aktivitas anti kanker dari senyawa analog UK-3A, berdasarkan pada parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) dan nilai energy binding dengan protein BcL-xL. Senyawa-senyawa analog UK-3A, 3-hydroxypicolinyl serin metil ester disintesis dari asam 3-hidroksipikolinat dan L-serin metil ester kemudian senyawa tersebut diesterifikasi terhadap 3-hydroxypicolinyl serine methyl ester (A) dengan asam pentanoat(1), hexanoat(2), heptanoat(3), dan oktanoat (4). Senyawa-senyawa tersebut diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer 1H and ^{13}C FT-NMR, FTIR dan MS. Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa senyawa 3-hidroksipikolinil serin oktil metil ester (PSMOE) menunjukkan peningkatan aktivitas yang spesifik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P388 dengan nilai IC_{50} 15,4 mg/mL,

Kata kunci : Anti kanker, *Streptomyces* sp 517-02, UK-3A, Analog UK-3A, dan P388

ABSTRACT

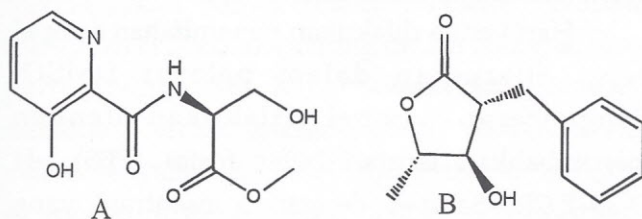
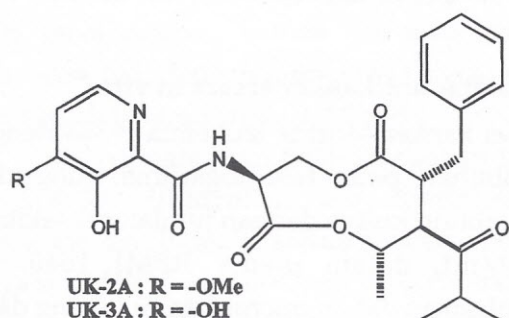
Antibiotic UK-3A contains a 9-membered dilactone ring. It had been isolated as a minor component from the mycelium of Streptomyces sp. 517-01. The antibiotic was hypothesized to be potential to inhibit the growth of leukemia cancer cell line of P388 and KB with IC_{50} 38 and 20 μ g/mL, respectively. To understand the effect of lipophilicity increase of the analogues on their anticancer activities based on QSAR parameter (Log P) and binding energy to BcL-xL protein. To produce analogues of UK-3A, 3-hydroxypicolinyl serine methyl ester (A) was synthesized from 3-hydroxypicolinic acid and L-serine methyl ester. The product was then esterified by pentanoic (1), hexanoic (2), heptanoic (3), and octanoic (4). The final products were confirmed with 1H and ^{13}C FT-NMR and FTIR spectra, and also MS spectra. Then they were tested against P388 Murine Leukemia cells. The result of bioassay showed lipophilicity increase of 3-hydroxypicolinyl serine methyl octhyl ester (PSMOE) correlated positively with their anticancer activity increase, with IC_{50} 15.4 mg/mL against P388 cell lines.

Keywords: Anticancer, *Streptomyces* sp 517-02, UK-3A, Analog UK-3A and P388

PENDAHULUAN

Senyawa antibiotika UK-3A merupakan senyawa dilakton cincin sembilan telah diisolasi dari micelium *Streptomyces* sp.517-02, yang mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan antikanker antara lain terhadap sel leukemia P388 dan KB, masing-masing

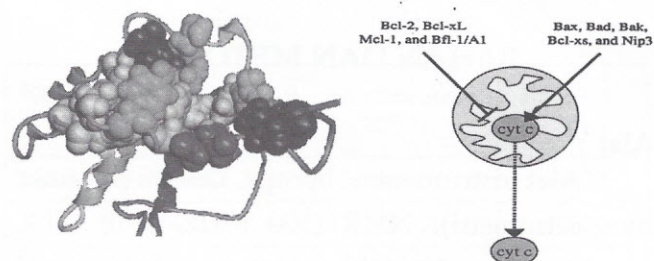
mempunyai nilai IC_{50} sebesar 38 dan 20 mg/mL secara *in-vitro*. Antibiotika UK-3A sebagai dilakton cincin sambilan apabila dihidrolisis menghasilkan senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil ester (A) dan ester lakton cincin 5 (B) (Gambar 1) mengakibatkan aktivitasnya menurun (tidak aktif) dalam menghambat sel kanker P388 maupun KB secara *in vitro*.¹⁻⁵



Gambar 1. Struktur Molekul UK-2A, UK-3, A dan B

Kematian sel ini diatur oleh suatu seri protein yang disebut protein pro-apoptosis⁶. Di dalam sel juga terdapat protein-protein anti-apoptosis yang dapat menghambat terjadinya apoptosis dengan mempengaruhi kerja protein-protein pro-apoptosis (Gambar 2). Dalam sel normal jumlah protein ini adalah proposional dengan protein pro-apoptosis, sehingga proses apoptosis dapat terjadi secara periodik. Tetapi pada beberapa sel kanker, protein anti-apoptosis ini terekspresi dengan jumlah yang sangat banyak, sehingga sel terus membelah secara tidak terkontrol dan menjadi sel kanker⁷. Bcl-xL adalah

salah satu dari protein anti-apoptosis pada sel kanker payudara. Diperkirakan jika protein ini dapat dihambat, sel kanker akan kembali mengikuti mekanisme apoptosis. Mendisain inhibitor Bcl-xL adalah dasar dari penemuan obat antikanker payudara yang spesifik⁸⁻¹¹.



Gambar 2. Protein Bcl-xL (kiri) menghambat kerja protein pro-apoptosis (kanan)

Sintesis senyawa analog UK-3A dilakukan dengan modifikasi berdasarkan hubungan struktur kimia dan aktivitas biologi (QSAR), maka untuk mensintesis senyawa analog dari UK-3A dapat dilakukan dengan memvariasikan gugus-gugus lebih bersifat non polar tanpa menghilangkan gugus aktifnya, diharapkan dapat menembus membran sel kanker yang bersifat hidrofobik. Dengan meningkatkan sifat lipofilisitas juga berdasarkan parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) dan energy docking dengan protein Bcl.xL.¹²⁻¹⁷ Berdasarkan parameter tersebut, senyawa sintetik baru tersebut merupakan analog dari senyawa induknya diharapkan mempunyai aktivitas biologi yang sama atau lebih besar, sehingga berpotensi sebagai calon obat anti kanker.

Untuk meningkatkan aktivitas senyawa A, maka dilakukan esterifikasi dengan beberapa asam guna meningkatkan lipofilisitasnya sehingga diharapkan dapat dengan mudah menembus dinding sel. Bila senyawa A

diesterifikasi dengan beberapa jenis asam yaitu pentanoat - oktanoat (1 - 4), ternyata diduga senyawa 4 menunjukkan aktivitas berdasarkan data QSAR.

Berdasarkan hasil tersebut maka pada makalah ini akan dilaporkan sintesis senyawa 4, identifikasi dan aktivitas nya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P388.

BAHAN DAN METODA

Alat :

Alat instrumentasi berupa, LC-MS (Mariner Biospectrometri), NMR (500 MHz, Jeol). TLC menggunakan plate Silika gel (E. Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 mm) dan kolom kromatografi, alat gelas sebelum digunakan dikeringkan dalam oven (70 °C). Semua reaksi dilakukan dibawah kondisi gas Nitrogen dengan cara mengisi balon dengan gas N₂.

Bahan:

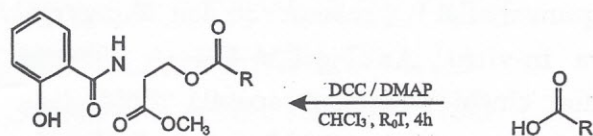
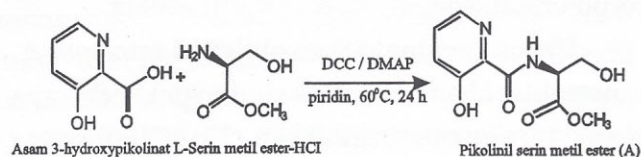
L-serin metil ester, asam 3-hidroksipikolinat, asam oktanoat, disikloheksilkarbodiimida (DCC) dan dimetilaminopiridin (DMAP), piridin, CDCl₃, kloroform, heksana, etil asetat, dan silka gel, sebagai fasa diam untuk pemurnian secara kolom kromatografi.

Metoda:

Terdapat 2 tahap sintesis analog UK-3A :

Pertama : Reaksi amidasi (senyawa A)

Kedua : Reaksi esterifikasi senyawa A dengan berbagai asam karboksilat seperti asam pentanoat (1), heksanoat (2), heptanoat (3), dan oktanoat (4)



Produk esterifikasi (analog-analog UK-3A)

- R = (1) C₅H₉ (PSMPE)
 (2) C₆H₁₁ (PSMHE)
 (3) C₇H₁₃ (PSMHPe)
 (4) C₈H₁₅ (PSMOE)

R = C₆H₉, C₇H₁₁, C₈H₁₃, C₉H₁₅

Gambar 2. Sintesis Senyawa Analog-analog UK-3A (Senyawa 1 - 4)

Uji aktivitas antikanker secara in vitro¹⁸

Sel kanker Murine leukemia P-388 dengan pertumbuhan pada fase logaritma, dilarutkan dalam tabung kultur dengan jumlah sel sekitar 3 10³ sel/mL dalam media RPMI 1640. Sel diinokulasikan dalam microplate 96 lubang dasar rata, dikultivasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam untuk menumbuhkan sel.

Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Pengenceran sampel dilakukan dengan menambahkan larutan bufer fosfat (PBS) pH (7,30-7,65). Sampel dengan konsentrasi yang beragam ditambahkan ke dalam sel dalam microplate lalu kocok dengan microplate mixer dan simpan kembali dalam inkubator Co₂. Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO dan kontrol positif digunakan senyawa standar cis-platina. Sel diinkubasi selama 48 jam, kemudian ditambahkan reagen MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] dan dikocok menggunakan microplate mixer. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam, kemudian ditambahkan stop solution (SDS) dan dikocok dengan baik tanpa meninggalkan busa yang mengganggu dalam pengamatan. Inkubasi dilanjutkan kembali selama 24 jam.

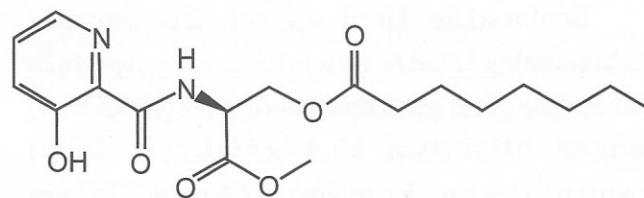
Pengukuran rapatan optis (OD) dilakukan 24 jam setelah penambahan stop solution. Uji aktivitas antikanker ini dilakukan dengan tiga kali ulangan.¹⁸

HASIL DAN DISKUSI

Hasil Sintesis senyawa A

Senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil ester (PSME) berupa kristal jarum berwarna putih dengan titik leleh 90-91°C, dengan rendemen 68,42 %. Untuk meningkatkan aktivitas senyawa A, maka dilakukan perancangan turunannya dengan melakukan esterifikasi dengan beberapa asam karboksilat. Hasil identifikasi dengan FT-NMR menunjukkan bahwa senyawa tersebut telah terbentuk, dengan munculnya signal amida pada daerah geseran kimia d_H 8,76 (d).

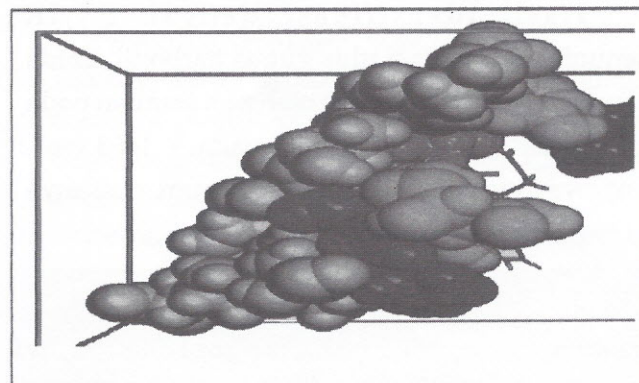
Pada pendahuluan telah dijelaskan bahwa bila UK-3A dihidrolisis dan menghasilkan senyawa A dan B, maka kedua senyawa tersebut ternyata tidak menunjukkan adanya aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker karena nilai $IC_{50} > 100$ mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa dilakton cincin sembilan mempunyai peranan penting dalam menghambat pertumbuhan sel kanker tersebut. Dengan demikian untuk meningkatkan aktivitasnya, maka senyawa A akan diesterifikasi dengan beberapa asam seperti asam pentanoat, heksanoat, heptanoat dan oktanoat. Untuk itu telah dilakukan kajian parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) menggunakan software hyperchem 7.0 dan Arguslab 4.0. Berdasarkan parameter QSAR tersebut (Tabel 1), menunjukkan bahwa senyawa 4 diduga paling aktif, dengan semakin besarnya nilai log P dan luas permukaan. Disamping itu bila dilihat energi interaksinya dengan protein Bcl.xL, maka senyawa tersebut mempunyai energi terkecil. Sebagai pembandingan dilakukan uji uji parameter QSAR dari obat komersial Taxol, Antimycin A3 atau senyawa UK-3A sendiri. Berdasarkan hasil tersebut menduga bahwa senyawa 4 berpotensi sebagai antikanker. Dengan demikian, maka senyawa 4 disintesis dan diuji aktivitasnya.



ambar 3. Struktur senyawa PSMOE (4)

Tabel 1. Hasil Perhitungan Parameter QSAR, UK-3A dan Analognya

No	Senyawa	Log P	Surface Area	Edocking Kcal/mol
	Antimycin	1.30	648,45	-10,24
	UK-3A	1.61	757,87	-11,65
	Taxol	2.25	819,35	-10,39
1	PSMPE	0.37	405,7	-9,70
2	PSMHE	0.76	530,0	-10,28
3	PSMHpE	1.16	567,17	-10,79
4	PSMOE	1.56	603,37	-11,93



Gambar 4. Virtual molecular docking senyawa 4 dalam menginhibitor Bcl-xL (Energi = -11.93 kcal/mol)

Tabel 2. Hasil Uji Sitotoksik terhadap Pertumbuhan Sel Kanker P388

No.	Senyawa	(IC_{50} μ g/mL) P388
1	UK-3A	38,4
2	PSMOE	15,4

Berdasarkan Hasil uji aktivitas senyawa analog-analog UK-3A, terbukti bahwa senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil oktil ester (PSMOE, 4) dengan nilai IC_{50} 15,4 g/mL (Table 2) menunjukkan kemampuannya dalam menghambat sel kanker P388. Hasil tersebut lebih baik dari pada aktivitas senyawa UK-3A. Hal ini dapat dinyatakan bahwa pembukaan cincin dilakton dapat digantikan dengan memvariasikan gugus ester yang bersifat non polar yaitu rantai panjang seperti asam oktanoat yang sesuai dengan sifat permeabilitas membran.

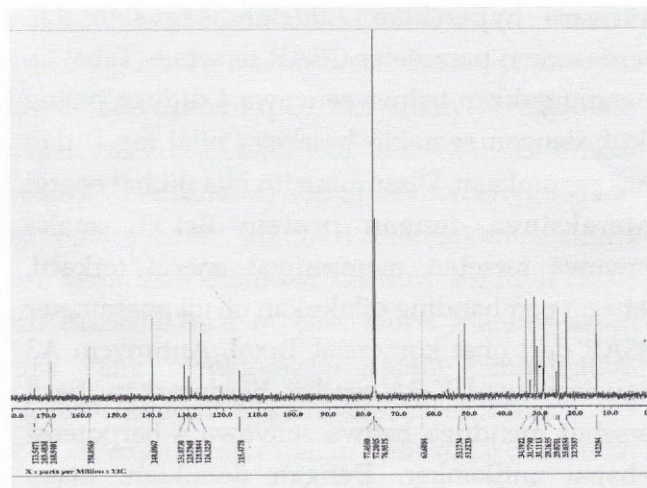
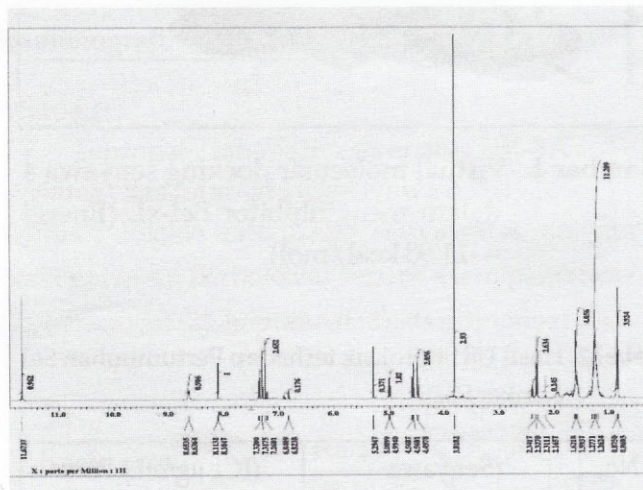
Untuk mensintesis senyawa 4, maka senyawa A diesterifikasi dengan asam oktanoat dengan adanya aktivator dan katalisator DCC dan DMAP dalam pelarut $CHCl_3$. Hasil esterifikasi tersebut menghasilkan senyawa 4 dengan rendemen 87,10 % (b/b), setelah melalui proses pemurnian menggunakan kromatografi kolom, dengan silica gel sebagai fasa diam dan fasa gerak nya campuran heksana - etil asetat..

Hasil identifikasi dengan FT-IR menunjukkan vibrasi ulur gugus karbonil amida maupun ester ditunjukkan oleh pita serapan pada V 1746 cm^{-1} dan tekukan NH pada V 1653 cm^{-1} . Senyawa 4 juga dianalisa oleh spektrum massanya

berat molekul (M^+) 365,93 g/mol. Senyawa 4 juga dibuktikan dengan spektrofotometer 1H -NMR dan ^{13}C -NMR (Gambar 5). Data dari spektrum 1H -NMR daerah geseran kimia d_H gugus amida (-CONH) ditunjukkan oleh puncak yang muncul pada d_H 8,65 (d) yang berinteraksi dengan gugus metin dan muncul downfield karena membentuk ikatan hidrogen intermolekuler, gugus hidroksil (-OH) d_H 11,67 (s) muncul downfield karena membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonil amida.

Data dari spektrum ^{13}C -NMR daerah geseran kimia gugus amida (-CONH) d_C 173,55.

Berdasarkan parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) dan melalui metode virtual molecular docking senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil oktil ester (PSMOE) dapat mengikat sisi aktif dari Bcl-xL yang lebih stabil dari UK-3A sendiri.¹¹⁻¹⁴ Hal ini berarti pembukaan cincin dilakton analog UK-3A lebih baik dalam menginhibitor Bcl-xL (protein anti-apoptosis). Jika protein ini dapat diinhibisi maka sel-sel kanker yang ada dapat mengikuti mekanisme apoptosis dengan baik, sehingga dapat mencegah terjadinya kanker.



Gambar 5. Spektrum 1H dan ^{13}C NMR

KESIMPULAN

Esterifikasi senyawa 3-hidroksipikolinat dengan asam oktanoat menghasilkan 3-Hidroksipokolinil serin metil oktil ester (4), dengan yang baik (87,10 %) Senyawa ini dapat meningkatkan lipofilisitas sebagai pengganti gugus dilakton cincin sembilan pada UK-3A. Dapat disimpulkan bahwa pembukaan cincin dilakton UK-3A dengan rantai panjang dapat menghambat aktivitas protein Bcl-xL. Dengan mendesain inhibitor Bcl-xL (ligan) merupakan proses dasar pencarian obat anti-kanker yang efektif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada LIPI, Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS), dan Osaka City University, yang telah mendukung pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ueki, M., Abe, M. Hanafi, K. Shibata, T. Tanaka, and M. Taniguchi. UK-2A, B, C and D, Novel Antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. I. Fermentation, Isolation, and Biological Properties. *J. Antibiotics*, 49 (7), 639, 1996.
2. Hanafi, M., K. Shibata, M. Ueki, and M. Taniguchi. UK-2A, B, C and D, novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. II. Structural elucidation. *J. Antibiotics*, 49, 1226-1231, 1996.
3. Ueki, M., A. Kusumoto, M. Hanafi, K. Shibata & M. Taniguchi. UK-3A, a novel antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. 517-02, Fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. *J. Antibiotics*, 50, 551-555, 1997
4. Anita, Y. et al., "Synthesis and cytotoxicity assay of analogues of UK-3A, a novel antifungal from *Streptomyces* sp. 517-02". *Indonesian Journal Of Chemistry*. Vol 7, No. 2, PPP 111-230, Yogyakarta, June 2007.
5. Hanafi, M. *Studies of Novel Antibiotic Metabolites from Streptomyces* sp. 517-02. Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka City University. Japan, 1995.
6. Simstein, R. et al. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine*, 228, 995 - 1003, 2003.
7. Ricci, M.S. et al. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The Oncologist*, 11, 342 - 357, 2006.
8. Ghobrial, I.M. et al. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.*, 55, 178-194, 2005.
9. Ferreira, C.G. et al. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 8, 2024-2034, 2002.
10. Mohamed I. Carcinoma of the Breast. In: Skeel R.T. (Ed.). *Handbook of Cancer Chemotherapy* (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
11. Putra, A.M.J. et al., 2007, "UK-2A analogues: potential inhibitors of Bcl-xL". *Prosiding Internatioanl Conference on Chemical Sciences (ICCS 2007)* Yogyakarta, May 24 - 26.
12. Enyedy, I.J. et al., 2001, "Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening". *J. Med. Chem.*, 44, 4313 - 4324.
13. Ferreira, C.G. et al., 2002, "Apoptosis: target of cancer therapy". *Clinical Cancer Research*, 8, 2024-2034.
14. Ghobrial, I.M. et al., 2005, "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy". *CA Cancer J. Clin.*, 55, 178-194.
15. <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>, 2007.
16. Shangary, S. et al., 2003, "Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family. *Leukemia*", 17, 1470 - 1481.
17. Patrick, G., 2001, *Instant notes in medicinal chemistry*. BIOS Scientific Publisher.
18. Sahidin; Hakim, E. H., et al., 2006, "Cytotoxic Properties of Oligostilbenoids from the Tree Barks of *Hopea Dryobalamides*"., 60c, 723.