

Activity of uk-3a: l-dihexylpicolinyl glutamate ester compound against Murine leukemia p-388 cells

Aktivitas senyawa analog uk-3a : l-diheksilpikolinil glutamat ester terhadap sel Murine leukimia p-388

Rika Wulandari*¹, Yulia Anita², dan Muhammad Hanafi²

¹ Balai Riset dan Standardisasi Industri Pontianak, Jl. Budi Utomo No. 41, Pontianak, 78243, Indonesia

² Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Kawasan Puspitek Serpong, Tangerang, 15314, Indonesia

*e-mail: wuland_tata@yahoo.co.id

Abstract: The new antibiotic, UK-3A, is a nine-ring dilactone derivative isolated from the mycelium *Streptomyces sp. 512-02* and has been shown to be active in inhibiting the growth of bacteria and cancer cells. The functional groups of hydroxy, amide, and nine-ring dilactone are the active groups present in UK-3A compounds. A new UK-3A, L-dihexylpicolinyl glutamate ester (HPG) was synthesized with two step, firstly, esterification reaction between L-glutamic acid and hexanol by p-TsOH as catalyst. Secondly, amidase reactions with 3-hydroxy-picolinic acid using DCC/DMAP. The final product was identified using UV, FT-IR, LC-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. The HPG produced was oily chocolate with a yield of 70.76%. The toxicity test of *Artemia salina* L shrimp larvae showed that HPG had an LC₅₀ value of 660.47 ppm. The activity of this compound was carried out on murine leukemia P-388 cancer cells, the HPG showed a better in inhibitory ability to cancer cell growth (IC₅₀) than UK-3A compounds, the value of 8.4 ppm.

Keywords: UK-3A; P-388; antibiotic

Abstrak: Antibiotik baru, UK-3A merupakan turunan dilakton cincin sembilan yang diisolasi dari miselium *Streptomyces sp. 512-02* dan terbukti aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan sel kanker. Gugus fungsi hidroksi, amida, dan dilakton cincin sembilan merupakan gugus aktif yang terdapat dalam senyawa UK-3A. Telah dilakukan sintesis senyawa analog UK-3A baru, L-diheksilpikolinil glutamat ester (HPG) melalui reaksi esterifikasi asam L-glutamat dengan heksanol menggunakan katalis p-TsOH dan reaksi amidasi dengan asam 3-hidroksi-pikolinat menggunakan DCC/DMAP. Senyawa hasil sintesis diidentifikasi dengan menggunakan UV, FT-IR, LC-MS, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR. HPG yang dihasilkan berupa *oily* coklat dengan rendemen 70,76%. Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L menunjukkan HPG memiliki nilai LC₅₀ sebesar 660,47 ppm. Uji aktivitas senyawa secara *in vitro* terhadap sel kanker murine leukemia P-388 memperlihatkan kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker (IC₅₀) yang lebih baik dibandingkan senyawa UK-3A yaitu 8,4 ppm.

Kata kunci: UK-3A; P-388; antibiotik

PENDAHULUAN

Kasus dan mortalitas kanker yang meningkat pesat di seluruh dunia menjadikan kanker sebagai penyebab utama kematian di sebagian besar wilayah. Pengendalian kanker dapat dilakukan dengan memahami faktor resiko potensial dan strategi yang harus diambil. Perkembangan terkini mengenai kasus kanker secara global telah dilaporkan oleh Badan Internasional untuk Penelitian Kanker (IARC). IARC memperkirakan bahwa kasus kanker baru dan kematian akibat kanker akan mencapai 18,1 juta kasus (Cai *et al.*, 2019). Kanker darah/leukemia merupakan penyakit kanker yang paling banyak terjadi di Indonesia

terutama sering dijumpai pada anak-anak (Kemenkes, 2011). Berbagai usaha dilakukan dalam menangani penyakit kanker salah satunya melalui penggunaan antibiotik.

Antibiotik baru, UK-3A merupakan turunan dilakton cincin sembilan yang diisolasi dari miselium *Streptomyces sp.* 512-02 yang memiliki gugus aktif seperti hidroksi, amida, dan dilakton cincin sembilan. UK-3A memiliki kemiripan dengan senyawa antimycin A₃ dan memiliki kesamaan struktur dengan senyawa UK-2A (Owen *et al.*, 2019), namun UK-3A tidak memiliki gugus metoksi pada piridin. Senyawa UK-3A terbukti aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan sel kanker leukemia P-388 namun aktivitasnya sebagai anti kanker masih relatif rendah. Berbagai usaha dilakukan untuk meningkatkan aktivitasnya salah satunya melalui modifikasi dilakton cincin sembilan menjadi struktur rantai terbuka dan melakukan variasi terhadap panjang rantai alifatik (Anita *et al.*, 2010). Modifikasi ini dapat dilakukan melalui reaksi esterifikasi dan amidasi. Diharapkan senyawa analog UK-3A yang dihasilkan memiliki aktivitas antikanker yang lebih baik terhadap sel murine leukemia P-388.

METODOLOGI

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam L-Glutamat, n-heksanol, asam hidrosipikolinat, benzena, diklorometana, methanol, piridin, etil asetat, aseton, asam p-toluenasulfonat monohidrat, N,N-dimetilaminopiridin, disikloheksilkarbodiimida, NaOH, Na₂CO₃, silika gel 60 F₂₅₄, kromatografi lapisan tipis, ninhidrin, larva telur *Artemia salina L.*, sel murine leukemia P-388.

Alat

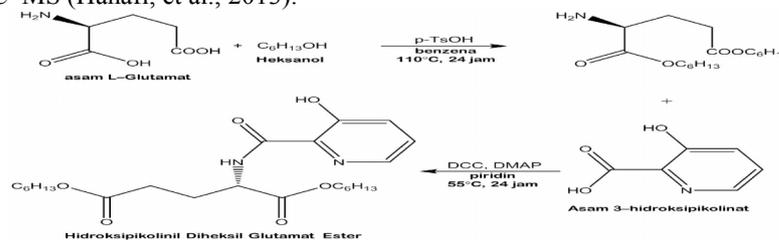
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, kolom kromatografi, evaporator buchi, spektrofotometer *Ultra Violet* (UV), spektrofotometer *Fourier Transformation Infra Red* (FT-IR), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS), ¹H dan ¹³C *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (NMR)

Prosedur Penelitian

Sintesis analog UK-3A

Sintesis analog UK-3A dilakukan melalui dua tahap yaitu reaksi esterifikasi dan amidasi (Gambar 1). Reaksi esterifikasi dilakukan dengan mereaksikan 0,005 mmol asam L-glutamat dengan 0,025 mmol heksanol dan 0,006 mmol katalis asam p-toluenasulfonat monohidrat di dalam 50 mL pelarut benzena. Kemudian campuran direfluks pada suhu 110 °C selama 24 jam sambil diaduk terus menerus. Produk yang dihasilkan selanjutnya dievaporasi dan dinetralkan dengan Na₂CO₃ 5% lalu diekstraksi dengan diklorometana dan akuades. Lapisan organik yang terbentuk dipisahkan dan disaring menggunakan MgSO₄ anhidrat yang selanjutnya dievaporasi dan dikristalisasi. Produk yang diperoleh dianalisis menggunakan IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, dan LC-MS.

Reaksi amidasi dilakukan dengan merefluks 0,003 mmol senyawa ester yang diperoleh dengan 0,006 mmol asam 3-hidrosipikolinat, 0,006 mmol aktivator DCC, dan 0,0012 mmol katalis DMAP dalam 15 mL pelarut piridin selama 24 jam pada suhu 55 °C. Kemudian hasil refluks dievaporasi dan dinetralkan dengan NaOH 1% hingga mencapai pH 7. Selanjutnya diekstraksi dengan akuades dan diklorometana hingga diperoleh endapan putih. Endapan disaring dan fasa organik yang diperoleh dievaporasi kemudian dikolom menggunakan silika gel 60 berukuran 240-300 mesh. Fraksi yang didapat diidentifikasi dengan IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, LC-MS (Hanafi, *et al.*, 2013).



Gambar1. Sintesis analog UK-3A : Hidroksipikolinil diheksil glutamate ester (HPG)

Uji toksisitas Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Sebanyak 10-15 ekor larva udang *Artemia salina L* berumur 1 hari ditempatkan dalam vial berisi 100 µL air laut. Selanjutnya ditambahkan 100 µL larutan sampel dan dibiarkan selama 24 jam kemudian dilakukan pengamatan. Blanko uji BSLT dilakukan dengan cara yang sama. Analisis data dilakukan dengan

menghitung jumlah *Artemia salina* L yang mati dan masih hidup. Presentase kematian dihitung dengan rumus Abbot's (Meyer *et al.*, 1982; Gajardo dan Beardmore, 2012).

$$\% \text{ Kematian} = \frac{A - B}{C} \times 100 \%$$

(1)

A adalah jumlah *Artemia salina* L yang mati pada kelompok percobaan

B adalah jumlah *Artemia salina* L yang mati pada kelompok blanko

C adalah jumlah *Artemia salina* L awal

Uji aktivitas antikanker in vitro terhadap sel murine leukemia P-388

Sel kanker murine leukemia P-388 dengan pertumbuhan pada fase logaritma dilarutkan dalam tabung kultur dengan jumlah sel sekitar 3×10^3 sel/mL dalam media RPMI 1640. Sel diinokulasikan dalam *microplate* 96 lubang dasar rata, dikulivikasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam untuk menumbuhkan sel. Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Pengenceran sampel dilakukan dengan menambahkan PBS (*phosphoric buffer solution* pH 7,30–7,65). Sampel dengan konsentrasi beragam ditambahkan ke dalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dengan *microplate mixer* dan disimpan 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-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida) dan dikocok menggunakan *microplate mixer*. Inkubasi dilakukan 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 sitotoksisitas ini dilakukan tiga kali ulangan (Kuncoro *et al.*, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

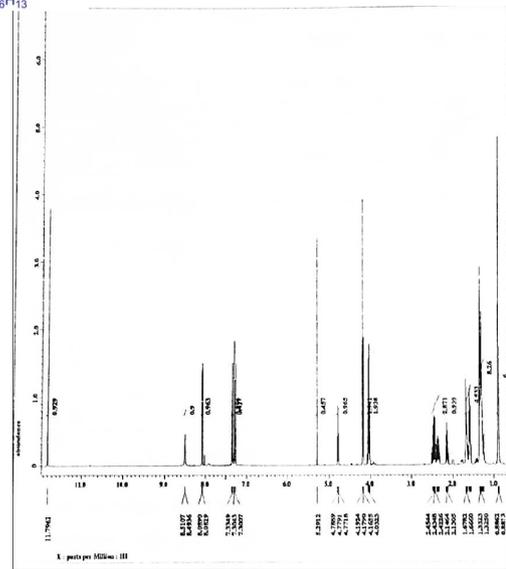
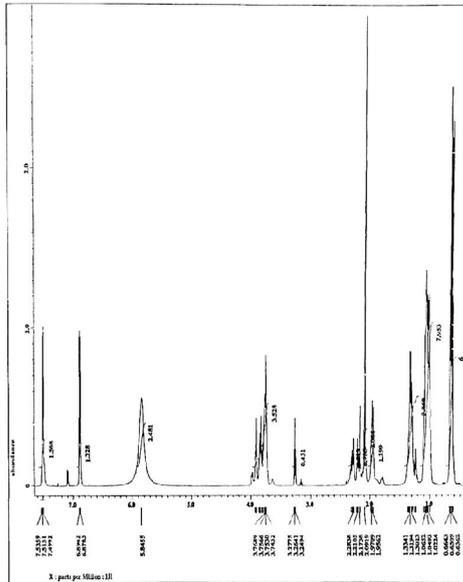
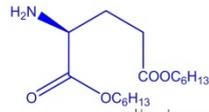
Reaksi esterifikasi asam L-glutamat dengan heksanol menghasilkan produk *oily* berwarna coklat dengan rendemen 87,52%. Keberhasilan reaksi esterifikasi ini ditandai dengan hilangnya gugus OH dari karboksilat pada daerah serapan 3045,80 cm⁻¹. Serapan gugus CH alifatik muncul pada daerah 2943,37 cm⁻¹ dan 2862,36 cm⁻¹ serta vibrasi ulur gugus karbonil C=O dan C-O dari suatu ester terlihat pada 1734,01 cm⁻¹ dan 1186,22 cm⁻¹. Serapan gugus amina (NH₂) terlihat pada daerah 3223,05 cm⁻¹ (Carey, 2000). Identifikasi LCMS menunjukkan adanya berat molekul (m/z) 315 g/mol yang sangat sesuai dengan berat molekul senyawa yang disintesis (C₁₇H₃₃O₄N). Produk esterifikasi juga telah dikonfirmasi oleh spektrum ¹H dan ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃) seperti yang dirangkum dalam Tabel 1.

Berdasarkan ¹H NMR, keberadaan diheksil ester ditandai dengan adanya puncak serapan pada $\delta = 4,04$ ppm (*t*, 4H, -OCH₂) yang berasal dari pergeseran kimia 4 proton dari 2 gugus metilen yang bertetanggaan dengan 1 gugus metilen dan oksigen. Sedangkan pada spektrum ¹³C NMR, diheksil ester ditunjukkan oleh puncak pada $\delta = 13,98$ ppm yang berasal dari karbon 2 gugus metil. Keberadaan 2 gugus karbonil terlihat pada pergeseran kimia $\delta = 172,40$ ppm dan 178,67 ppm (Carey, 2000).

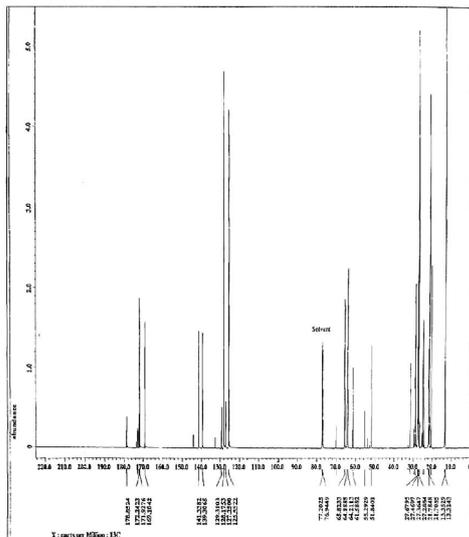
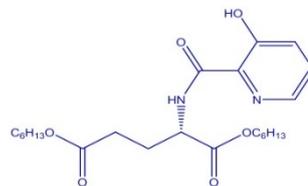
Hasil reaksi amidasi memberikan produk *oily* berwarna kuning kecoklatan dengan rendemen 70,76% dan mempunyai putaran optik +11,39°. Keberhasilan reaksi amidasi ditandai dengan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 267,6 nm dari spektrum UV. Berdasarkan spektrum IR, serapan gugus amida sekunder CONH dan gugus karbonil amida terlihat pada panjang gelombang 3369,64 cm⁻¹ dan 1649,14 cm⁻¹ secara berturut-turut. Pergeseran serapan gugus alifatik terjadi pada 2731,30 cm⁻¹, 2856,58 cm⁻¹, dan 2929,87 cm⁻¹. Analisis LCMS menunjukkan keberadaan senyawa target (C₂₃H₃₆O₆N₂) pada berat molekul m/z 436 g/mol. Hasil analisis ¹H NMR menunjukkan keberadaan 4 buah proton dari 2 gugus metilen yang berdekatan dan berinteraksi dengan atom oksigen pada $\delta = 4,04$ ppm (*t*, 2H, -OCH₂) dan $\delta = 4,16$ ppm (*t*, 2H, -OCH₂). Gugus amida dari 3-hidroksipikolinil amida ditunjukkan pada $\delta = 8,09$ ppm (*d*, 1H, CONH). Sedangkan pada spektrum ¹³C NMR, pergeseran kimia atom C gugus metin yang berdekatan dengan gugus karbonil dan nitrogen terlihat pada $\delta = 171,29$ ppm dan 172,63 ppm (Carey, 2000).

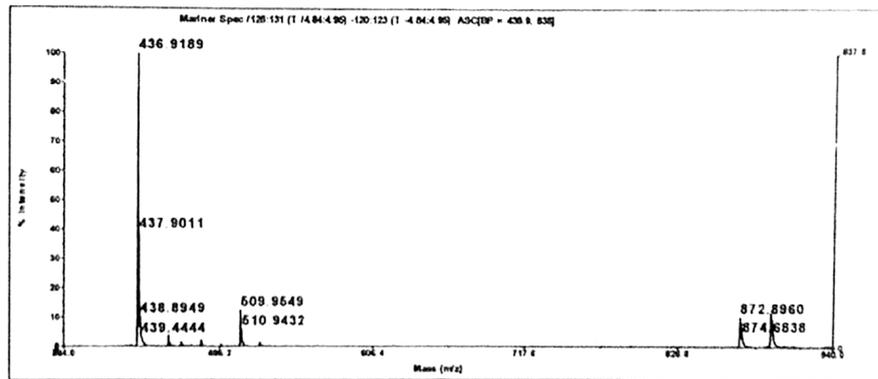
Tabel 1. ¹H dan ¹³C NMR produk esterifikasi dan amidasi
¹H NMR ¹³C NMR

Esterifikasi



Amidasi





Gambar 2. LC MS HPG

Uji toksisitas BSLT terhadap HPG dilakukan pada konsentrasi 100, 500, dan 1000 ppm. Hasil uji menunjukkan senyawa HPG memiliki nilai LC₅₀ sebesar 660,47 ppm. Suatu senyawa memiliki efek toksisitas yang signifikan jika nilai LC₅₀-nya ≤30 ppm (Meyer, *et.al*, 1982).

Tabel 2. Hasil uji toksisitas HPG terhadap larva udang *Artemia salina* L

	Persen Kematian (%)		LC ₅₀ (ppm)
	500 ppm	1000 ppm	
100 ppm	3,226	25,581	73,171
			660,47

Efek penghambatan senyawa HPG terhadap pertumbuhan sel kanker murine leukemia P-388 dilihat berdasarkan perbandingan jumlah sel yang mati dan sel yang tetap hidup setelah perlakuan dengan senyawa HPG. Perhitungan jumlah sel tersebut berdasarkan pengukuran dengan optical density menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 550 nm dan 700 nm. Sel hidup berbentuk bulat dan berwarna biru karena menyerap pereaksi warna dan sel mati berbentuk tidak teratur dan berwarna kuning. Besarnya intensitas larutan sebanding dengan jumlah sel hidup. Pengukuran tersebut akan menghasilkan nilai absorbansi (A), kemudian nilai A dimasukkan ke grafik untuk memperoleh nilai IC₅₀. Besarnya penghambatan yang dinyatakan dalam nilai IC₅₀ menunjukkan hambatan pertumbuhan sel kanker sebesar 50%. Konsentrasi sampel yang digunakan dalam uji sitotoksik ini yaitu dari 0–100 ppm. Hasil uji sitotoksitas senyawa HPG terhadap sel kanker murine leukemia P-388 sebesar 8,4 ppm. Senyawa HPG menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa UK-3A induk dan cis-platina sebagai kontrol positif. Pembukaan cincin dilakton beranggota sembilan pada senyawa induk UK-3A menjadi ester pada senyawa HPG meningkatkan aktivitasnya dalam menghambat sel kanker murine leukemia P-388. Selain itu juga dipengaruhi oleh kenaikan sifat lipofilitas suatu senyawa (Anita *et al.*, 2010).

Tabel 3. Hasil uji sitotoksitas senyawa analog UK-3A

Senyawa	IC ₅₀ (ppm)
HPG	8,4
cis-platina	12
UK-3A	38

SIMPULAN

Uji toksisitas HPG terhadap larva udang *Artemia salina* L memiliki nilai LC₅₀ sebesar 660,47 ppm. Uji aktivitas senyawa secara *in vitro* terhadap sel kanker murine leukemia P-388 memperlihatkan kemampuan penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker (IC₅₀) yang lebih baik dibandingkan senyawa UK-3A yaitu 8,4 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. M. Hanafi dan Puslitkim LIPI Serpong.

REFERENSI

- Anita, Y. *et al.* (2010) 'Synthesis of UK-3A analogue and assay on P-388 murine leukemia', (August 2015). doi: 10.22146/ijc.21701.
- Cai, Z. and Liu, Q. (2019) 'Understanding the Global Cancer Statistics 2018 : implications for', pp. 2016–2019.
- Carey, F. A. (2000) 'Organic Chemistry', .
- Gajardo, G. M. and Beardmore, J. A. (2012) 'The brine shrimp *Artemia* : adapted to critical life conditions', 3(June), pp. 1–8. doi: 10.3389/fphys.2012.00185.
- Hanafi, M. (2013) 'Synthesis and anticancer activity test of 2-hydroxy-n-phenylnicotinamide', 13(2), pp. 166–170. Available at: <https://journal.ugm.ac.id/ijc/article/view/21300>.
- Kuncoro, H. *et al.* (2017) 'Cytotoxic Activity Against P-388 Murine Leukemia Cell From *Lygodium Microphyllum* Herb.
- Meyer, B. N. *et al.* (1982) 'Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents', 45, pp. 31–34.
- Owen, W. J. *et al.* (2019) 'Synthesis and biological activity of analogs of the antifungal antibiotic UK-2A . III . Impact of modifications to the macrocycle isobutyryl ester position', (May). doi: 10.1002/ps.5511.
- Pp-pl, D. J. (2011) 'Pedoman penemuan dini kanker pada anak' *HUS DRAFT II*, Kementerian Kesehatan RI.