

PENGGUNAAN [³H]-LEUSIN UNTUK MEMPELAJARI SENYAWA KOMPLEKS PERSEITOL·K⁺ YANG DIISOLASI DARI BENALU ALUS *Scurrula fusca* SEBAGAI INHIBITOR SINTESIS PROTEIN PADA SEL KANKER

Hendig Winarno

Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi – Batan

ABSTRAK

PENGGUNAAN [³H]-LEUSIN UNTUK MEMPELAJARI SENYAWA KOMPLEKS PERSEITOL·K⁺ YANG DIISOLASI DARI BENALU ALUS *Scurrula fusca* SEBAGAI INHIBITOR SINTESIS PROTEIN PADA SEL KANKER. Telah dilakukan pengujian aktivitas senyawa perseitol·K⁺ (2) yang diisolasi dari benalu alus *Scurrula fusca* (BL.) G. DON terhadap inhibisi sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus. Pengujian dilakukan dengan menggunakan L-[3,4,5-³H(N)] leusin dan pengukuran dilakukan dengan pencacah sintilasi cair. Hasil percobaan menunjukkan bahwa senyawa isolat tersebut menunjukkan aktivitas inhibisi sebesar 13% pada konsentrasi sampel 10⁻⁷ M. Aktivitas ini lebih tinggi dibandingkan senyawa perseitol (3) tanpa ion K⁺ yang hanya menunjukkan aktivitas inhibisi sebesar 5%. Keberadaan ion K⁺ dalam senyawa kompleks merupakan faktor esensial dalam aktivitasnya sebagai inhibitor sintesis protein oleh sel kanker. Percobaan yang sama yang dilakukan terhadap berbagai komposisi campuran senyawa perseitol (3) dan ion K⁺ dengan perbandingan molar 24:1, 22:1, 20:1, dan 18:1 menunjukkan bahwa komposisi perseitol : K⁺ = 20:1 memberikan aktivitas inhibisi tertinggi terhadap sintesis protein yaitu 40% pada konsentrasi 10⁻⁴ M. Aktivitas inhibisi ini lebih tinggi dibandingkan cycloheximide sebagai kontrol positif (25% inhibisi pada 0.5×10⁻⁶ M). Hal ini diduga pada komposisi perbandingan molar tersebut, perseitol (3) dan ion K⁺ membentuk senyawa kompleks perseitol·K⁺ seperti isolat benalu alus. Selain pengaruh keberadaan ion K⁺, perbandingan molar 20:1 merupakan faktor yang sangat berperan dalam aktivitasnya sebagai inhibitor sintesis protein oleh sel kanker

ABSTRACT

THE USE OF [³H]-LEUSIN TO STUDY THE COMPLEX OF PERSEITOL·K⁺ ISOLATED FROM BENALU ALUS *Scurrula fusca* AS SYNTHESIS PROTEIN INHIBITOR ON CANCER CELLS. The bioactivity test of the complex of perseitol·K⁺ (2) isolated from benalu alus *Scurrula fusca* (BL.) G. DON against protein synthesis by Ehrlich ascites cancer cell in mice has been done. The examination was done by L-[3,4,5-³H(N)] leucine incorporation and then the incorporation rate of [³H]-leucine was counted by liquid scintillation counter. The results showed that the complex of perseitol·K⁺ (2) exhibited the inhibitory activity of protein synthesis in 13% rather than perseitol free K⁺ ion (3) which only exhibited the inhibitory activity in 5%. The existence of K⁺ ion in the complex 2 is a essential factor on inhibitory activity against protein synthesis in Ehrlich ascites cancer cells in mice. The same procedure which has been examined onto perseitol (3) and K⁺ ion at various mole ratios, namely 24:1, 22:1, 20:1, and 18:1 showed that the molar ratio of 20:1 strongly inhibited the protein synthesis with 40% inhibition at 10⁻⁴ M. It was stronger than cycloheximide as positive control (25% inhibition at 0.5×10⁻⁶ M). Beside the existence of K⁺ ion in the complex 2, it is also suggested that the molar ratio of perseitol (3) and K⁺ ion (20:1) play a most important role on its activity.

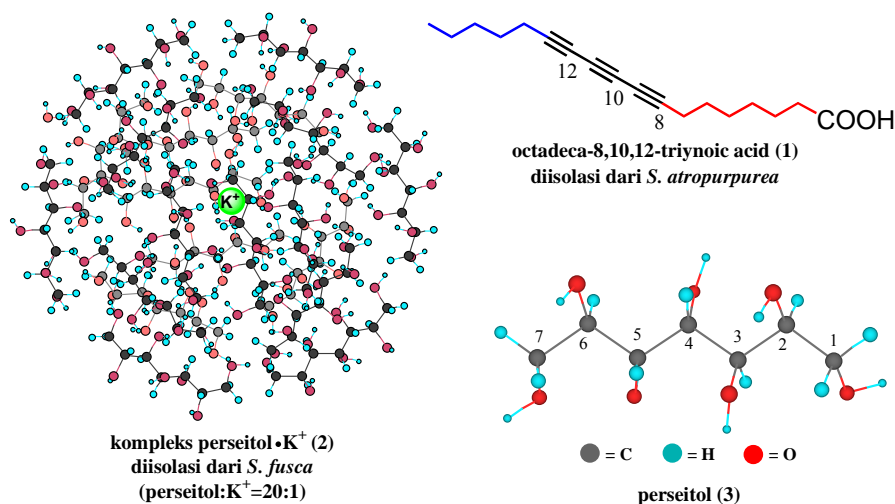
PENDAHULUAN

Benalu merupakan tanaman hemiparasit yang tumbuh di daerah tropis dan subtropis. Sebagai parasit, benalu tumbuh menempel pada tanaman lain secara spesifik. Beberapa jenis benalu telah dikenal sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai penyakit, misalnya di Jepang benalu *Viscum album* L. var. *Lutescens* MAKINO digunakan untuk obat sakit pinggang dan obat untuk wanita setelah melahirkan, sedangkan di Eropa *Viscum album* L. sejak lama digunakan sebagai obat antikanker^[1].

Indonesia yang dikenal sebagai negara yang kaya akan plasma nutfah terbesar kedua setelah Brazil merupakan laboratorium alam yang menarik bagi para peneliti. Pada tahun 2001-2003, telah diisolasi berbagai senyawa dari benalu teh *Scurrula atropurpurea* (BL.) DANS dan benalu alus *Scurrula fusca* (BL.) G. DON (Loranthaceae)^[2-4]. Dipilihnya kedua jenis benalu tersebut, karena rebusan kedua benalu ini telah banyak digunakan sebagai obat kanker di Indonesia. Diantara senyawa yang diisolasi, *octadeca-8,10,12-triynoic acid* (**1**) yang diisolasi dari benalu teh menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap invasi sel kanker pada pengujian menggunakan sel kanker MM1 dengan aktivitas 99,94% pada konsentrasi 10 µg/ml ($IC_{50} = 2,7$ µg/ml), sedangkan senyawa kompleks perseitol·K⁺ (**2**) yang diisolasi dari benalu alus tidak memberikan aktivitas terhadap invasi sel kanker^[2,3], tetapi menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap sintesis protein pada sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus yang diuji berdasarkan inhibisinya terhadap [³H]-leusin.

Seperti diketahui bahwa pengobatan penyakit kanker saat ini tidak lagi dititikberatkan pada inhibisi terhadap pembelahan sel dengan cara membunuh sel kanker menggunakan obat, karena efek toksisitas obat tersebut juga berakibat pada pembelahan sel normal, sehingga cara tersebut memiliki keterbatasan pada penggunaan dosis obat. Saat ini penelitian pencarian obat baru antikanker difokuskan pada faktor-faktor biologis dari sel kanker, misalnya faktor yang mendorong pertumbuhan kanker dan mekanisme pertumbuhan sel kanker, dengan harapan ditemukan obat baru yang spesifik tanpa mempengaruhi pertumbuhan sel normal. Sasarannya dititikberatkan pada pertumbuhan sel, sehingga berbagai skrining untuk obat antikanker yang saat ini dikembangkan antara lain: inhibitor terhadap sintesis protein/DNA/RNA, inhibitor terhadap DNA topoisomerase, inhibitor terhadap tubulin “assembly-disassembly”, inhibitor terhadap protein kinase, dan inhibitor terhadap invasi sel kanker. Jika proses tersebut dihambat, maka sel tidak dapat melakukan perkembangbiakan.

Pada percobaan ini, senyawa kompleks perseitol·K⁺ (**2**) yang diisolasi dari benalu alus diuji-coba aktivitasnya sebagai inhibitor terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus. Pengujian dilakukan dengan menggunakan senyawa protein bertanda tritium, yaitu L-[3,4,5-³H(N)] leusin dan pengukuran dilakukan dengan pencacah sintilasi cair.



Gambar 1. Struktur octadeca-8,10,12-triynoic acid, perseitol, dan kompleks perseitol·K⁺

BAHAN DAN METODE

Bahan. Senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) diisolasi dari benalu alus *Scurrula fusca* (BL.) G. DON. berdasarkan prosedur sebelumnya^[3,4]. Senyawa perseitol (3) standar diperoleh dari Nacalai, Japan. Sel kanker *Ehrlich ascites* diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas Farmasi Universitas Fukuyama, Jepang, yang ditanam pada tikus jantan jenis Wistar (200-220 g). L-[3,4,5-³H(N)] leusin dengan aktivitas 143,5 Ci/mmol diperoleh dari New England Nuclear (Boston, MA). Bahan kimia antara lain KSCN dan cycloheximidine berkualitas *analytical grade* diperoleh dari Wako, Japan.

Peralatan. Konfirmasi struktur senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) dilakukan dengan NMR 500MHz (JEOL JNM-Lambda 500 spectrometer), Japan. Peralatan untuk *bioassay* sel kanker dilakukan dengan menggunakan fasilitas Laboratorium Biokimia Fakultas Farmasi Universitas Fukuyama, sedang pengukuran emisi β⁻ (beta) dilakukan dengan pencacah sintilasi cair (Aloka LSc-1100) di Laboratorium Radioisotop, Fakultas Farmasi Universitas Fukuyama.

Bioassay antikanker senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) dan perseitol tanpa K⁺ (3)

Sel kanker *Ehrlich ascites* (diambil dari tikus) dalam larutan buffer Krebs-Ringer bikarbonat (pH 7.4, mengandung 5.0 mM glukosa dan 2% bovine serum albumin) ditempatkan dalam lubang plat dengan jumlah sel tiap lubang adalah 1x10⁸ sel. Ke dalam tiap lubang ditambahkan 5 μl larutan senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) dengan konsentrasi masing-masing

$2,0 \times 10^{-3}$ M, $2,0 \times 10^{-4}$ M, dan $2,0 \times 10^{-5}$ M. Kemudian ke dalam tempat yang sama ditambahkan 5 μ l larutan [3 H]-leusin (9,25 GBq). Setelah volume total dijadikan 1 ml dengan buffer Krebs-Ringer bikarbonat, suspensi diinkubasi selama 30 menit dalam kelembaban 5% CO₂, kemudian disentrifugasi 2500 rpm pada 4°C selama 5 menit. Setelah supernatan dibuang, padatan dicuci dengan 50 mM larutan buffer Tris-HCl dingin, kemudian disuspensikan dengan larutan buffer Krebs-Ringer bikarbonat 1.0 ml. Sebanyak 500 μ l dihomogenkan dengan ultrasonik selama 10 detik, selanjutnya 100 μ l hogenat di-spot-kan pada kertas Whatman 3 MM, 1,5x1,5 cm. Setelah kering, dicuci dengan 5% larutan asam trikloroasetat, kemudian dicuci berturut-turut dengan akuabides, etanol, dan dietil eter. Ke dalam larutan ditambahkan 5 ml larutan toluene-sintilator, kemudian radioaktivitas dari emisi β^- (beta) diukur dengan pencacah sintilasi cair. Prosedur yang sama juga diperlakukan untuk senyawa perseitol standar.

Bioassay antikanker campuran perseitol (3) dan ion K⁺ dengan perbandingan molar bervariasi

Untuk mengetahui efektivitas inhibisi dari senyawa kompleks antara perseitol (3) dengan ion K⁺ dengan komposisi perbandingan molar yang tepat, maka pengujian dilakukan dengan menggunakan campuran perseitol (3) dan 5 μ l KSCN 0,2M dengan perbandingan molar perseitol : ion K⁺ = 18:1, 20:1, 22:1, dan 24:1. Prosedur *bioassay* dilakukan dengan cara yang sama seperti pada *bioassay* terhadap senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) dan perseitol tanpa K⁺ (3).

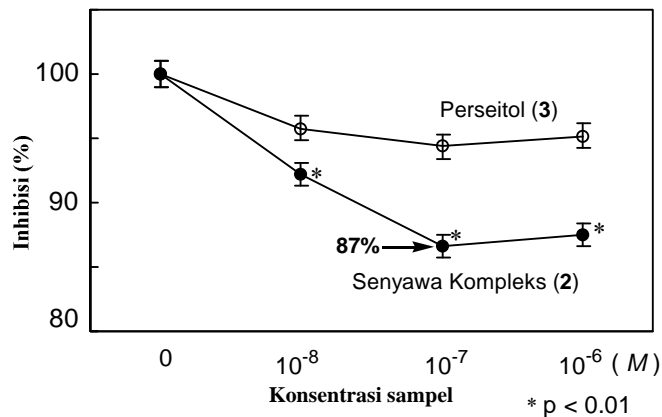
HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek inhibisi senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) terhadap sintesis protein oleh sel kanker Ehrlich ascites dari tikus

Senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) dengan perbandingan mol perseitol: K⁺ = 20:1 yang diisolasi dari benalu alus^[3,4] diuji aktivitas inhibisinya terhadap sintesis protein dari sel kanker *Ehrlich ascites* yang diambil dari tikus berdasarkan metode yang dikembangkan oleh ASHBY, *et al.*^[5] dan MORITA, *et al.*^[6]. Berdasarkan metode tersebut, pada penelitian ini sebagai protein dipilih L-[3,4,5- 3 H(N)] leusin. Penggunaan leusin bertanda radioisotop digunakan untuk memudahkan perhitungannya menggunakan pencacah sintilator cair. Data pengujian diperlihatkan pada Gambar 2.

Dari Gambar tersebut terlihat bahwa senyawa kompleks perseitol·K⁺ (2) yang diisolasi dari benalu alus menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa perseitol tanpa ion K⁺ (3). Meskipun hanya memberikan aktivitas inhibisi sebesar 13% pada konsentrasi 10^{-7} M, namun keberadaan ion K⁺

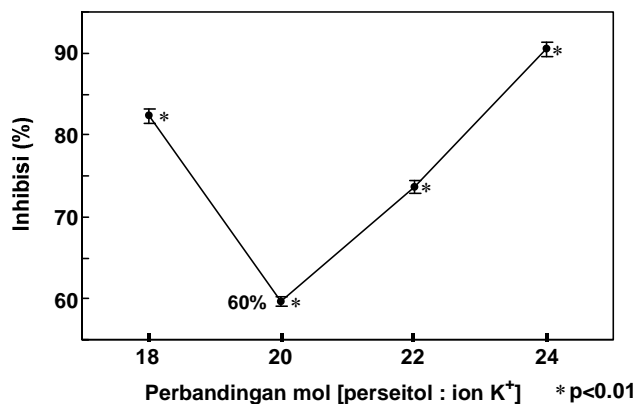
dalam senyawa kompleks merupakan faktor yang esensial dan memegang peranan penting di dalam aktivitasnya sebagai inhibitor terhadap sintesis protein oleh sel kanker. Dengan demikian, senyawa tersebut diduga merupakan salah satu zat aktif anti kanker dalam benalu alus *Scurrula fusca* yang selama ini rebusannya diyakini dapat menyembuhkan kanker di pulau Sumatra dan Sulawesi.



Gambar 2. Pengaruh inhibisi senyawa perseitol dan senyawa kompleks perseitol·K⁺ terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus didasarkan pada pengukuran [³H]-leusin

Efek inhibisi campuran perseitol (3) dan ion K⁺ dengan perbandingan molar bervariasi terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus

Pengujian terhadap campuran perseitol dan ion K⁺ dengan perbandingan molar bervariasi yaitu perseitol:ion K⁺= 18:1, 20:1, 22:1, dan 24:1 terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus menunjukkan bahwa pada perbandingan molar perseitol:ion K⁺= 20:1, memberikan aktivitas inhibisi tertinggi, yaitu 40% dibandingkan perbandingan molar lainnya (Gambar 3). Hal ini diduga bahwa pada perbandingan molar 20:1 terbentuk senyawa kompleks perseitol·K⁺ seperti halnya senyawa hasil isolasi, sedangkan pada perbandingan lainnya (18:1, 22:1, dan 24:1) tidak membentuk senyawa kompleks. Kenyataan ini memperkuat hipotesis sebelumnya bahwa kompleks perseitol·K⁺ (2) hasil isolasi mempunyai perbandingan molar 20:1. Dengan demikian komposisi perbandingan molar 20:1 diduga merupakan faktor yang berperan penting terhadap aktivitasnya sebagai inhibitor sintesis protein dari sel kanker.



Gambar 3. Efek inhibisi campuran perisitol (3) dan ion K⁺ dengan berbagai perbandingan mol terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* tikus didasarkan pada pengukuran [³H]-leusin

KESIMPULAN

Senyawa kompleks perisitol-K⁺ (2) yang diisolasi dari benalu alus *Scurrula fusca* (BL.) G. DON. menunjukkan aktivitas inhibisi terhadap sintesis protein oleh sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus. Perbandingan molar perisitol:ion K⁺ = 20:1 dari senyawa kompleks tersebut merupakan faktor yang esensial dalam aktivitasnya sebagai zat aktif antikanker terutama aktivitas inhibisinya terhadap sintesis protein.

Senyawa kompleks perisitol-K⁺ (2) diduga merupakan zat aktif antikanker yang rebusannya secara tradisional digunakan sebagai obat antikanker oleh masyarakat di pulau Sumatra dan Sulawesi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Hirotaka Shibuya, Prof. Dr. Takashi Ishizu dan Dr. Kazuyoshi Ohashi dari Lab Kimia Bahan Alam, Fakultas Farmasi, Universitas Fukuyama, Japan atas bimbingan dan fasilitas yang diberikan.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Tetsuo Morita, Fakultas Farmasi, Universitas Fukuyama, Japan atas saran, bimbingan dan fasilitas yang diberikan selama melakukan *bioassay* antikanker menggunakan sel kanker *Ehrlich ascites* dari tikus.

Penghargaan yang tinggi juga disampaikan kepada Etstuji Tsujino, Apt, M.Sc atas bantuannya selama melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. CHENG, R. K.-Y. Z., Anticancer research on Loranthaceae plants, *Drugs of the Future*, **22**, (1997) 519-530.
2. OHASHI, K., WINARNO, H., MUKAI, M., INOUE, M., PRANA, S. M., SIMANJUNTAK, P., AND SHIBUYA, H., Indonesian medicinal plants: XXV. Cancer cell invasion inhibitory effects of chemical constituents in the parasitic plant *Scurrula atropurpurea*, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**:3 (2003) 343-345.
3. WINARNO, H., Chemical study on Indonesian parasitic plants *Scurrula atropurpurea* and *S. fusca* (Loranthaceae), Disertasi Doktor, Fukuyama Univ., Fukuyama, Japan (2003).
4. ISHIZU, T., TSUJINO, E., WINARNO, H., OHASHI, K., AND SHIBUYA, H., A complex of perseitol and K⁺ ion from *Scurrula fusca* (Loranthaceae), *Tetrahedron Letters*, **42**:39 (2001) 6887-6889.
5. ASHBY, P., BENNETT, D. P., SPENCER, I. M., ROBINSON, D. S., Post-translational regulation of lipoprotein lipase activity in adipose tissue, *Biochim. J.*, **176** (1978) 865-872.
6. SERA, M., TANAKA, K., MORITA, T., UEKI, H., Increasing effect of vanadate on lipoprotein lipase activity in isolated rat fat pads, *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**:2 (1990) 291-297.