



## SINTESIS DAN KARAKTERISASI KONYUGAT DENDRIMER PAMAM G4-NIMOTUZUMAB

Adang H. Gunawan.<sup>1</sup>, Widyastuti Widjaksana.<sup>1</sup>, Lucky A. Paune<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka - BATAN Serpong

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Indonesia

### Key words :

konjugasi,  
nimotuzumab,  
dendrimer,  
PAMAM G4,  
NaIO<sub>4</sub>

### Abstrak

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI KONYUGAT DENDRIMER PAMAM G4-NIMOTUZUMAB.** Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) merupakan suatu senyawa polimer globular yang dapat digunakan untuk membawa obat/senyawa ke organ, jaringan, tumor atau kanker. Nimotuzumab merupakan antibodi monoklonal yang sangat spesifik dapat mengenali domain eksternal *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Pengkonjugasian dendrimer PAMAM dengan antibodi monoklonal Nimotuzumab sebagai *homing device* akan menghasilkan suatu sistem pembawa obat yang tertarget pada EGFR sehingga dapat mengurangi efek samping yang tidak diinginkan. Pada penelitian ini, Nimotuzumab diaktivasi dengan NaIO<sub>4</sub> dengan rasio 1:1, lalu dimurnikan dengan menggunakan ultrafiltrasi sentrifugasi dan dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV (Ultra Violet) dan Fourier Transform Infra Red (FTIR). Hasil aktivasi Nimotuzumab (CHO-Nimotuzumab) dikonjugasikan dengan dendrimer PAMAM G4 dengan rasio mol 1:4, kemudian dimurnikan menggunakan ultrafiltrasi sentrifugasi. Konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dikarakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer UV, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), Particle Size Analyzer (PSA) dan elektroforesis gel Sodium-Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS) page. Hasil karakterisasi CHO-Nimotuzumab menunjukkan bahwa gugus diol pada Nimotuzumab telah berhasil dioksidasi menjadi gugus aldehyd. Dan hasil karakterisasi konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab menunjukkan bahwa konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab telah berhasil dibuat dan dimurnikan dengan ukuran partikel rata-rata 12,29 nm.

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PAMAM G4-NIMOTUZUMAB CONJUGATE.** Polyamidoamine dendrimer (PAMAM) is a globular polymer compound that can be used to carry drugs / compounds to organ, tissue, tumor or cancer. Nimotuzumab is a specific monoclonal antibody which can recognize the external domain of epidermal growth factor receptor (EGFR). Conjugation of PAMAM dendrimer with Nimotuzumab monoclonal antibody as a homing device will produce a drugs targeted carrier system on EGFR in order to reduce unwanted side effects. In this study, Nimotuzumab was activated with NaIO<sub>4</sub> with ratio mole of 1:1, which then purified using ultrafiltration centrifugation and characterized by UV (Ultra violet) and Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectrophotometer. CHO-Nimotuzumab as a results an activation of Nimotuzumab, was then conjugated to G4 PAMAM dendrimer with mole ratio of 1:4, and then purified using ultrafiltration centrifugation. G4 PAMAM dendrimer - Nimotuzumab conjugates characterized using UV spectrophotometer, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Particle Size Analyzer (PSA) and Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS) page gel electrophoresis. Characterization results of CHO-Nimotuzumab indicated that diol groups on Nimotuzumab has been successfully oxidized to aldehyde. Characterization results of the PAMAM dendrimer G4-Nimotuzumab conjugate indicated that PAMAM G4 - Nimotuzumab has been successfully synthesized and purified with an average particle size of 12.29 nm.

Penulis Korespondensi

e-mail: [adanghg56@yahoo.com](mailto:adanghg56@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

Kanker merupakan kumpulan sel abnormal yang terbentuk oleh sel-sel yang tumbuh secara terus-menerus, tidak terbatas, tidak terkoordinasi dengan jaringan sekitarnya dan tidak berfungsi fisiologis. Kanker terjadi karena timbul dan berkembang biaknya jaringan sekitarnya (*infiltratif*) sambil merusaknya (*destruktif*), dapat menyebar ke bagian lain tubuh, dan umumnya fatal jika dibiarkan. Saat ini telah dicapai kemajuan yang pesat dalam bidang biologi molekuler, radioterapi, biomarker kanker dan kemoterapi, namun semua itu sampai saat ini masih belum mampu memperbaiki *survival rate* penderita kanker secara keseluruhan. Sebagian besar senyawa antikanker yang ada saat ini, tidak dapat membedakan secara jelas antara sel kanker dan sel normal, sehingga dapat menimbulkan efek samping dan toksisitas yang berbahaya bagi sel disekitarnya. Oleh karena itu, saat ini diperlukan suatu rancangan obat dengan sistem penghantaran yang spesifik ke target dan seminimal mungkin masuk ke organ/jaringan yang bukan target [1-2].

Untuk memperoleh sistem penghantaran obat yang dapat bekerja secara tertarget dapat digunakan konjugat dendrimer dengan antibodi monoklonal sebagai *homing device*. Dendrimer merupakan polimer bercabang yang berstruktur unik tiga dimensi, memiliki gugus-gugus fungsi yang dapat dimodifikasi pada permukaannya dan dapat membawa bahan aktif secara selektif langsung ke sasaran dan tidak menyebar ke organ/ jaringan lain yang tidak diinginkan. Keunggulan dendrimer sebagai sistem penghantaran obat (*drug delivery system*) terdapat pada struktur molekulnya yang bercabang-cabang dengan permukaannya yang sangat banyak, sehingga memungkinkan penyisipan zat untuk

diagnosa, terapi, atau molekul biologi aktif lainnya pada molekul dendrimer tersebut. Dendrimer poliamidoamin (PAMAM) adalah salah satu dendrimer dengan inti etilendiamin yang aman, non-imunogenik, sitotoksitas minimum, berukuran 1-100 nm, monodispers, dan memiliki rongga internal yang mampu menjerap obat ke dalamnya. Sifat unik yang dimiliki oleh dendrimer PAMAM ini mendorong penggunaannya secara luas dalam biomedikasi, terutama dalam hal penghantaran obat, terapi gen, terapi tumor, kemoterapi, dan diagnostik. Pengkonjugasian dendrimer dapat dilakukan dengan molekul pembawa yang spesifik ke target seperti peptida, asam folat, dan antibodi monoklonal [3-6].

Nimotuzumab merupakan obat kanker yang masuk golongan "terapi target". Berbeda dengan obat kanker konvensional yang dikenal sebagai kemoterapi, "terapi target" bekerja selektif dengan menjadikan zat-zat spesifik dalam tubuh yang berperan dalam proses pertumbuhan kanker sebagai "target" pengobatan. Dengan demikian, efek samping yang muncul dari pemberian obat "terapi target" jauh lebih ringan dibandingkan obat kanker konvensional. Yang menjadi "target" dari Nimotuzumab, suatu antibodi monoklonal, adalah reseptor epidermal growth factor (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR). Adanya EGFR dalam jumlah berlebih pada jaringan kanker seorang pasien menjadi indikasi bahwa kanker pasien tersebut adalah jenis kanker yang menjadi lebih cepat memburuk, pemberian obat kemoterapi dan radioterapi sering menjadi tidak efektif sehingga usia harapan hidup pasien menjadi lebih pendek. Ditemukannya terapi target terhadap EGFR ini membuka peluang lebih berhasilnya terapi kanker disertai peningkatan harapan dan kualitas hidup pasien. Nimotuzumab bukan satu satunya terapi target yang bekerja terhadap

EGFR, tetapi yang membedakannya dengan obat-obat serupa pendahulunya adalah aspek keamanannya. Dari berbagai penelitian diketahui bahwa EGFR ini banyak dijumpai pada penderita kanker kepala dan leher, kanker usus, kanker paru, glioma (salah satu jenis kanker otak), kanker esophagus, kanker pankreas, kanker prostat, kanker leher rahim, kanker payudara dan beberapa jenis kanker padat yang lain [7-10].

Pada penelitian ini, dendrimer PAMAM Generasi 4 (G4) dikonjugasikan dengan antibodi monoklonal Nimotuzumab sebagai *homing device*. Nimotuzumab bekerja sebagai inhibitor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) yaitu menghambat protein reseptor *epidermal growth factor* (EGF) yang banyak terdapat pada permukaan sel kanker, sehingga konjugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dapat digunakan sebagai sistem pembawa obat yang tertarget pada EGFR [8-9]. Sebelum tahap pengkonjugasian, Nimotuzumab diaktivasi terlebih dahulu dengan menggunakan natriumperiodat ( $\text{NaIO}_4$ ) sehingga gugus diol pada Nimotuzumab akan teroksidasi menjadi gugus aldehid yang dapat digunakan untuk konjugasi dengan gugus amin pada dendrimer PAMAM G4 [11-12]. Beberapa teknik karakterisasi yang dilakukan untuk memverifikasi terbentuknya kompleks senyawa PAMAM G4-Nimotuzumab dalam penelitian ini menggunakan beberapa teknik analisis mencakup analisis spektrum UV, FTIR, penentuan ukuran dan distribusi ukuran partikel konjugat serta pemeriksaan dengan teknik gel elektroforesis menggunakan akrilamida [12].

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan sintesis yang diikuti dengan karakterisasi dan pemastian terbentuknya senyawa konyugat PAMAM G4-nimotuzumab

dari hasil konyugasi antara PAMAM G4 dengan Nimotuzumab. Senyawa ini akan merupakan prekursor sistem penghantaran obat tertarget baik sebagai sediaan radiofarmaka (diagnosis dan terapi) ataupun sebagai media kontras untuk MRI dan CT Scan.

## TATA KERJA

Bahan yang digunakan adalah Nimotuzumab (TheraCIM, Kalbe Farma), larutan dendrimer PAMAM G4 10% dalam metanol (Sigma-Aldrich),  $\text{NaIO}_4$ , etilen glikol, ammonium asetat, asam asetat glasial, asam asetat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ , ammonium bikarbonat (E.Merck), bovine serum albumin (Sigma Aldrich), aqua bidestilata steril (PT. Ikaparmindo Putramas, Indonesia), dan  $\text{NaBH}_4$  (Fluka). Alat yang digunakan adalah Spektrofotometer Jasco UV-550, KCKT (Shimadzu SCL-10A) yang dilengkapi dengan kolom SEC 250, *Particle Size Analyzer* (PSA), protein filter Vivaspin dengan *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 30 dan 10 KD, kromatografi filtrasi gel kolom PD-10 dengan matriks Sephadex G-25 medium, *Centrifuge* (Hettich EBA 8S), Vortex/ mixer, pH meter (Seveneasy Mettler Toledo), timbangan analitik (Denver Instrument), mikropipet (Thermo Electron Corporation, Biohit dan Proline), aluminium foil, syringe, syringe filter, dan alat-alat gelas yang umum digunakan dalam labotatorium.

## Pemurnian dendrimer PAMAM G4.

Dendrimer PAMAM G4 10 % disimpan dalam methanol. Pelarut methanol dihilangkan dari dendrimer PAMAM G4 dengan cara penguapan dengan mengalirkan gas nitrogen. Residu hasil penguapan kemudian dilarutkan dalam air bebas mineral.

### **Aktivasi Antibodi Monoklonal Nimotuzumab (pembuatan CHO Nimotuzumab)**

Aktivasi Nimotuzumab dilakukan dengan mol rasio Nimotuzumab : NaIO<sub>4</sub> yaitu 1:230 (1,6 mg : 1,6 mg). Sejumlah dapar asetat pH 5,5 (0,4 mL) ditambahkan kedalam 320 µL larutan nimotuzumab 5 mg/mL. Campuran kemudian diaduk dengan vortex dan didinginkan pada suhu 2-8°C. Sejumlah NaIO<sub>4</sub> (1,6 mg) yang dilarutkan dalam 0,4 mL dapar asetat pH 5,5 di vortex kemudian didiamkan pada suhu 2-8°C serta dilindungi dari cahaya. Kedua larutan diatas kemudian dicampurkan dan iinkubasi selama 2 jam pada suhu 2-8°C dalam keadaan gelap. Sejumlah etilen glikol (8 µL) ditambahkan kedalam campuran, yang diikuti dengan inkubasi selama 30 menit pada suhu 2-8°C dalam keadaan gelap. Pada proses ini akan diperoleh larutan Nimotuzumab teroksidasi (CHO-Nimotuzumab). Larutan CHO-Nimotuzumab dimurnikan menggunakan filter protein Vivaspin 30 KD MWCO dengan cara disentrifugasi beberapa kali pada kecepatan 4000 rpm. Hasil pemurnian dilarutkan dalam larutan dapar fosfat 0,1 M pH 6,5 dengan volume akhir 500 µL.

### **Analisis CHO-Nimotuzumab dengan FTIR**

Untuk memastikan bahwa tahapan aktivasi Nimotuzumab telah berhasil, dilakukan analisa dengan menggunakan FTIR. Sebanyak 150 µL larutan CHO-Nimotuzumab dan dimasukkan kedalam vial. Lalu dialiri gas N<sub>2</sub> hingga kering dan serbuk di dalam vial diambil untuk analisis. Kemudian sebanyak ~ 50 mg sampel kering diukur dengan alat FTIR. Pemeriksaan spektrum IR dilakukan pada bilangan gelombang 400 sampai 4000 cm<sup>-1</sup>.

### **Konjugasi Nimotuzumab dengan Dendrimer PAMAM G4**

Konjugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dibuat dengan rasio molar nimotuzumab pada dendrimer 1 : 4. Sebanyak 20µL larutan dendrimer PAMAM G4 10% dalam metanol dialiri gas N<sub>2</sub> hingga kering. PAMAM G4 kemudian direkonsitusi dengan dengan 20µL dapar bikarbonat 50 mM pH 9. Ke dalam larutan ini kemudian ditambahkan larutan CHO-Nimotuzumab. Campuran kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu 2-8°C dalam keadaan terlindung dari cahaya. Kedalam konjugat ini kemudian ditambahkan sejumlah NaBH<sub>4</sub> (42 µL) dalam air dengan konsentrasi 4 mg/mL. Campuran diinkubasi kembali selama 3 jam pada suhu 2-8°C dan terlindung dari cahaya.

### **Pemurnian Konjugat Dendrimer PAMAM G4 - Nimotuzumab**

Pemurnian konjugat dilakukan dengan menggunakan 2 metode, yaitu dengan metode ultrafiltrasi sentrifugasi menggunakan filter protein Vivaspin 10 KD MWCO dan dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel kolom PD-10 dengan matriks Sephadex G-25 medium. Metode ultrafiltrasi dilakukan dengan cara memipet 200 µL larutan konjugat ke dalam filter protein Vivaspin 10 KD MWCO dan volume nya dicukupkan hingga 2 mL dengan dapar fosfat pH 6,5. Filter protein kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Sentrifugasi dilakukan 4 kali sehingga diperoleh volume akhir 150 µL. Tabung dibalik dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Kemudian tabung dibilas dengan menambahkan 50 µL dapar fosfat pH 6,5 yang diikuti sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Konjugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV.

#### **Analisis Konyugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dengan Spektrofotometer UV**

Hasil pemurnian dari metode ultrafiltrasi dan kolom PD-10 diuji dengan menggunakan Spektrofotometer Jasco UV-550, dengan cara membuat *baseline* terlebih dahulu dengan dapar fosfat 0,1 M pH 6,5. Lalu masing-masing fraksi dianalisis.

#### **Analisis Fraksi Pemurnian Konjugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dengan Pereaksi Biuret**

Fraksi-fraksi konjugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab hasil pemurnian dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel kolom PD-10 matriks Sephadex G-25 medium diuji secara kualitatif dengan pereaksi Biuret untuk mengetahui pada fraksi mana saja terdapat kandungan protein. Uji dilakukan dengan menggunakan NaOH 40% yang dibuat dengan cara melarutkan 4000 mg NaOH dalam 10 ml H<sub>2</sub>O dan CuSO<sub>4</sub> 0,5% yang dibuat dengan cara melarutkan 50 mg CuSO<sub>4</sub> dalam 10 ml H<sub>2</sub>O. Kemudian sebanyak 150 µL larutan sampel ditambah dengan 40 µL NaOH 40% dan 40 µL CuSO<sub>4</sub> 0,5%. Contoh yang mengandung protein akan memberikan warna biru ungu.

#### **Analisis Konyugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Standar Nimotuzumab murni, standar dendrimer PAMAM G4, dan dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab hasil pemurnian dengan filter protein Vivaspin dan PD-10 (Fraksi 4) diuji dengan menggunakan KCKT

(Shimadzu SCL-10A) yang dilengkapi dengan kolom SEC 250 (7,5 x 300 mm), detektor UV-VIS (280 nm) dengan fase gerak dapar fosfat 0,01N pH 7,5, volume injeksi contoh 50 µL, dan kecepatan alir 1 ml/menit.

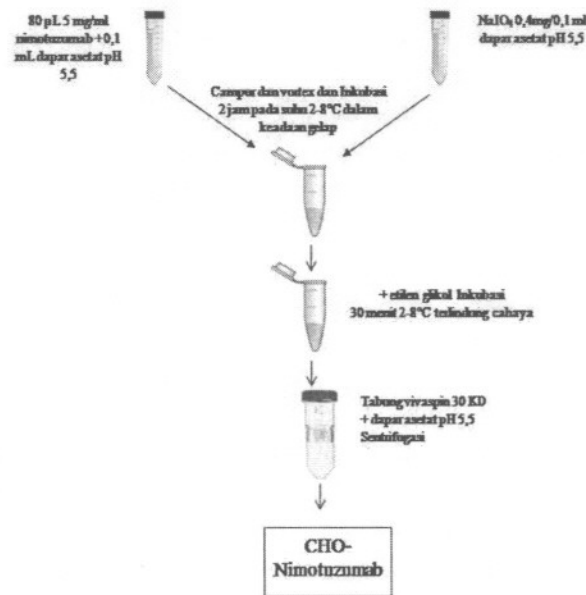
#### **Analisis Konjugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dengan Particle Size Analyzer (PSA)**

Ukuran dan distribusi ukuran partikel konjugat dendrimer PAMAM G4 – Nimotuzumab ditentukan dengan menggunakan alat PSA Delsa Nano C dengan metode *photon correlation spectroscopy* (PCS) Malvern dengan *scattering angle* 15°, 30°, dan 60°. Sejumlah (2mL) konjugat dendrimer PAMAM G4 – Nimotuzumab didispersikan dalam metanol dan kemudian dimasukkan ke dalam kuvet analisis. Analisis ukuran partikel dilakukan pada suhu 25°C.

#### **Analisis Konjugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab dengan Elektroforesis Gel**

Pemastian terbentuknya konjugat dendimer PAMAM G4-Nimotuzumab diuji menggunakan metode elektroforesis gel dengan akrilamida. Konyugat dendimer PAMAM G4-nimotuzumab, standar protein (10 – 250 KD), PAMAM G4, nimotuzumab dan CHO-nimotuzumab didestruksi dengan pemanasan selama 10 menit, kemudian dilakukan elektroforesis gel pada tegangan 250 volt selama 30 menit. Pelat gel akrilamida kemudian dicuci dengan larutan *Coomassie blue* sampai noda dari tiap sampel terlihat. Noda pada sampel dan standar dibandingkan, kemudian diidentifikasi berdasarkan berat molekul yang terdapat pada standar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Aktivasi Nimotuzumab dengan NaIO<sub>4</sub>

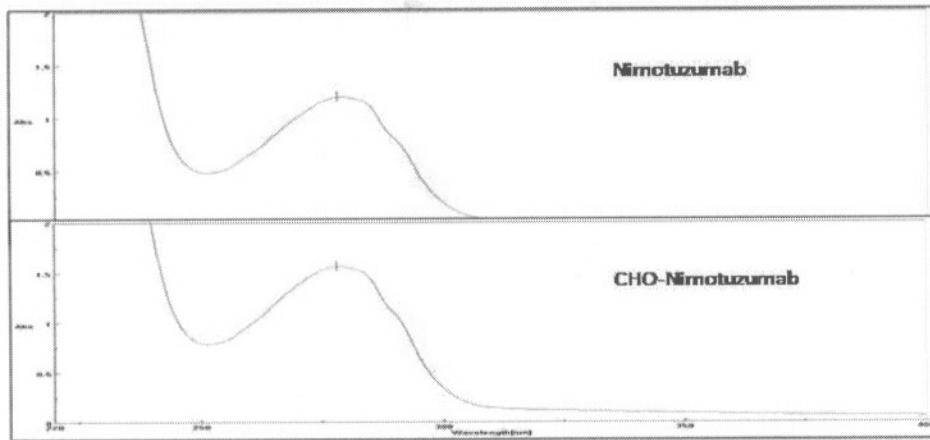
Aktivasi Nimotuzumab dilakukan dengan mereaksikan Nimotuzumab dengan larutan NaIO<sub>4</sub> dalam keadaan segar di dalam vial dengan rasio Nimotuzumab : NaIO<sub>4</sub> (1:1) (Gambar 1). NaIO<sub>4</sub> akan mengoksidasi gugus diol pada Nimotuzumab menjadi gugus aldehyd (CHO), gugus aldehyd inilah yang digunakan untuk mengkonjugasikan Nimotuzumab dengan gugus amin pada dendrimer PAMAM G4 [12].

Larutan campuran harus disimpan pada suhu 2-8°C dan terlindung dari cahaya karena sifat antibodi Nimotuzumab yang tidak stabil. Selama proses pengoksidasian, dapar yang digunakan yaitu dapar asetat pH 5,5 karena oksidasi dengan menggunakan NaIO<sub>4</sub> dalam dapar asetat memiliki efisiensi yang lebih baik dibandingkan dengan dapar fosfat.

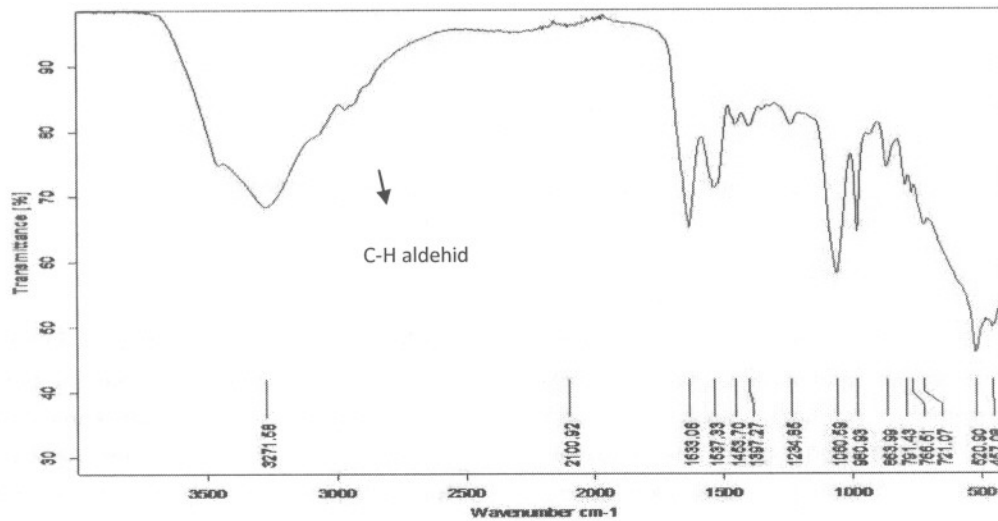
Pengoksidasian Nimotuzumab dengan NaIO<sub>4</sub> dihentikan dengan menggunakan

etilenglikol. Penghentian reaksi ini dilakukan untuk mencegah terjadinya oksidasi lanjutan pada bagian asam amino yang tidak diinginkan dari Nimotuzumab. Hasil aktivasi Nimotuzumab dengan NaIO<sub>4</sub> berupa larutan jernih dan tidak memiliki perbedaan warna larutan dengan larutan standar Nimotuzumab. Pemurnian CHO-Nimotuzumab dilakukan secara ultrafiltrasi sentrifugasi dengan menggunakan tabung vivaspin 30.000 MWCO (*Molecular Weight Cut Off*). Nimotuzumab memiliki bobot molekul ~160.000 g/mol sehingga akan tertahan dan tidak dapat melewati filter vivaspin sedangkan molekul lainnya seperti NaIO<sub>4</sub> dengan bobot molekul 213,89 g/mol dan etilenglikol dengan bobot molekul 62,07 g/mol akan melewati filter vivaspin 30KD, dengan demikian dapat diperoleh larutan yang mengandung CHO-Nimotuzumab murni.





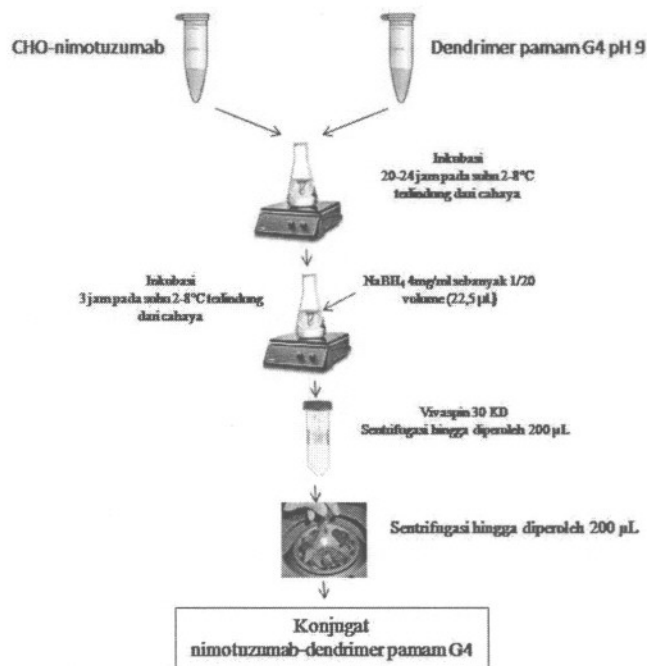
Gambar 2. Spektrogram dari Spektrofotometer UV/Vis Nimotuzumab dan CHO - nimotuzumab



Gambar 3. Spektrum hasil analisa dengan FTIR CHO-Nimotuzumab

Spektrogram dari hasil analisis CHO-Nimotuzumab dengan Spektrofotometer UV/Vis (Gambar 2) tidak dapat membedakan antara Nimotuzumab dengan CHO-Nimotuzumab, sehingga metode ini tidak dapat digunakan untuk karakterisasi ke 2

senyawa tersebut. Analisis dengan FTIR ini dilakukan untuk melihat keberadaan gugus fungsi spesifik yang terdapat pada CHO-Nimotuzumab khususnya gugus OH dan gugus Aldehid (CHO). Hasil spektrum yang diperoleh terdapat pada Gambar 3 .



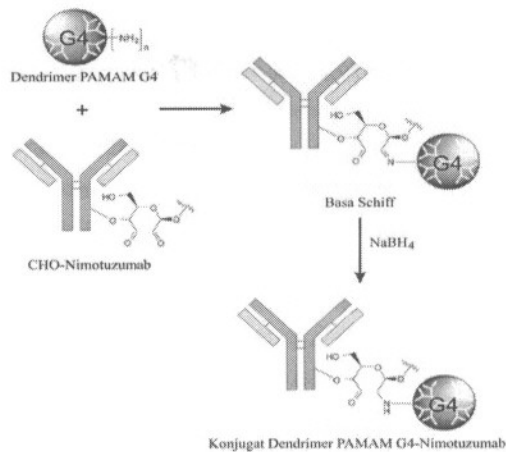
Gambar 4. Konjugasi Nimotuzumab dengan PAMAM G4

Dari hasil spektrum yang diperoleh dapat diketahui bahwa pada sampel CHO-Nimotuzumab, terdapat spektrum pada frekuensi  $1820-1600\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan  $\text{C}=\text{O}$  aldehyd, sedangkan apada  $2850$  dan  $2750\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan  $\text{CH}$  aldehyd, hal ini menunjukkan bahwa terdapat gugus aldehyd pada sampel CHO-Nimotuzumab. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa reaksi oksidasi gugus Diol (OH) menjadi Aldehyd (CHO) telah berhasil dilakukan.

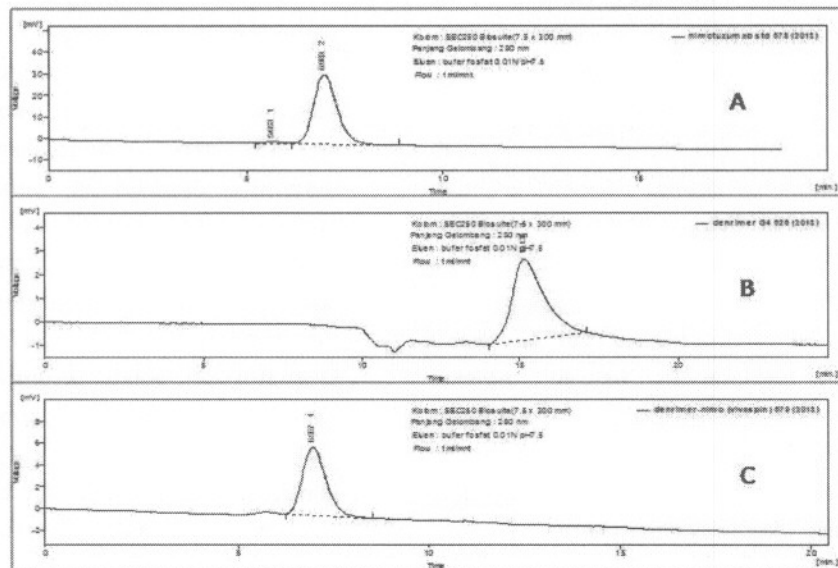
Pengkonyugasian Nimotuzumab dengan dendrimer PAMAM G4 (Gambar 4)

dilakukan dengan rasio mol  $1 : 4$  dalam dapar bikarbonat  $50\text{ mM}$  pH  $9$ , hal ini bertujuan untuk mengoptimalkan reaksi konyugasi yang terjadi. Konyugasi Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab berlangsung dalam suasana basa (pH  $9-10$ ) sehingga aldehyd pada nimotuzumab akan bereaksi dengan gugus amin sekunder pada dendrimer PAMAM G4 dan membentuk basa Schiff yang bersifat tidak stabil, sehingga diperlukan penstabil yaitu Natrium Borohidrida ( $\text{NaBH}_4$ ) dengan reaksi yang terjadi sebagai berikut:





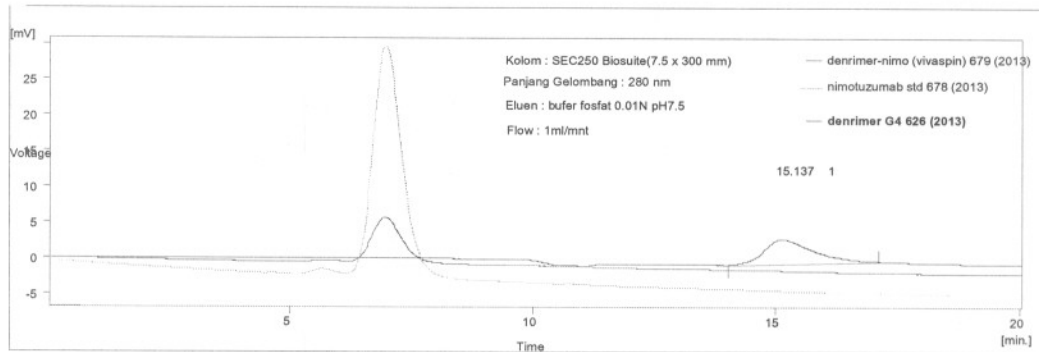
Gambar 5. Reaksi Konyugasi Nimotuzumab dengan Dendrimer PAMAM G4 (Hermanson, G. T., telah diolah kembali).



Gambar 6 . Kromatogram HPLC dari Nimotuzumab (A), PAMAM G4 (B) dan PAMAM G4-Nimotuzumab hasil pemurnian secara ultrafiltrasi sentrifugasi dengan tabung vivaspin 10 KD (C)

Pemurnian konyugat dilakukan dengan menggunakan metode ultra filtrasi sentrifugasi menggunakan tabung vivaspin 10 KD/10.000 MWCO dimana senyawa dengan berat molekul lebih kecil dari 10.000 g/mol akan melewati filter sedangkan senyawa dengan berat molekul lebih besar dari 10.000 g/mol akan tertahan dan tidak dapat

melewati filter. Dengan demikian nimotuzumab (160.000 g/mol) dan dendrimer PAMAM G4 (14,215g/mol) akan tertahan dan tidak dapat melewati filter pada tabung sedangkan  $\text{NaBH}_4$  dengan berat molekul 37,83 g/mol akan melewati filter, sehingga dapat diperoleh larutan yang mengandung konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab murni.



Gambar 7. Overlay Kromatogram Standar Nimotuzumab, Standar Dendrimer PAMAM G4, Konyugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab hasil pemurnian secara ultrafiltrasi sentrifugasi dengan tabung vivaspin 10 KD

Untuk memastikan bahwa yang terbentuk adalah PAMAM G4-Nimotuzumab, maka telah dilakukan uji menggunakan KCKT (Shimadzu SCL-10A) dengan membandingkan waktu retensinya dari standar nimotuzumab murni, standar dendrimer PAMAM G4, dan hasil pemurnian konyugat dengan vivaspin (Gambar 6 dan Gambar 7). Pemastian dengan metode KCKT, menggunakan kolom *size exclusion chromatography* (SEC), yaitu pemisahan berdasarkan ukuran molekul dimana molekul dengan ukuran lebih besar akan terelusi terlebih dahulu atau memiliki waktu retensi yang lebih cepat dibandingkan molekul yang ukurannya lebih kecil.

Dari hasil kromatogram yang diperoleh dapat diketahui bahwa waktu retensi dari standar Nimotuzumab 6,983 menit dan standar dendrimer PAMAM G4 15,137 menit, konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab hasil pemurnian dengan vivaspin terdapat pada waktu retensi 6,967 menit. Konyugat hasil pemurnian dengan tabung vivaspin memiliki waktu retensi yang tidak terlalu jauh bedanya dengan standar nimotuzumab, hal ini disebabkan karena pengkonyugasian dengan dendrimer PAMAM tidak memberikan perbedaan ukuran molekul yang signifikan.

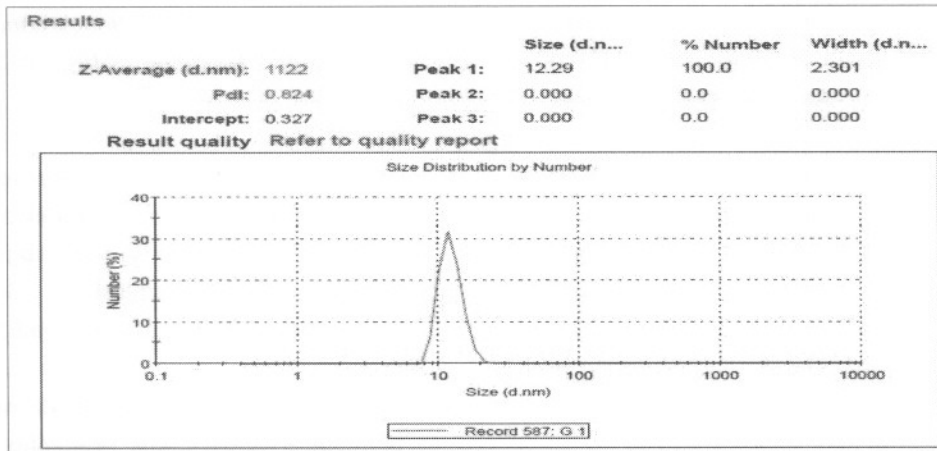
Dari kromatogram konyugat yang diperoleh, hanya terdapat 1 puncak yang menunjukkan bahwa sampel telah murni. Selain itu, tidak terdapat puncak pada menit ke 15, yang menunjukkan keberadaan dendrimer PAMAM G4 bebas pada larutan konyugat. Namun hasil dari analisa dengan KCKT ini belum dapat memastikan bahwa Nimotuzumab telah terkonyugasi dengan dendrimer PAMAM G4 karena pada kromatogram, waktu retensi sampel standar Nimotuzumab dan hasil konyugasinya tidak jauh berbeda, karena itu dibutuhkan uji lainnya untuk memastikan bahwa di dalam larutan sampel tersebut terdapat dendrimer PAMAM G4.

Untuk memastikan bahwa dalam larutan sampel terdapat Nimotuzumab dan dendrimer PAMAM G4 yang telah terkonyugasi dilakukan uji dengan menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Malvern. Antibodi Nimotuzumab merupakan larutan dan bukan partikel sehingga jika di uji dengan PSA tidak akan memberikan hasil berupa ukuran partikel, sedangkan dendrimer PAMAM G4 merupakan partikel dan dapat dianalisa ukuran partikelnya dengan menggunakan PSA. Oleh karena itu jika sampel yang diuji dengan PSA memberikan hasil ukuran partikel, dapat dipastikan bahwa

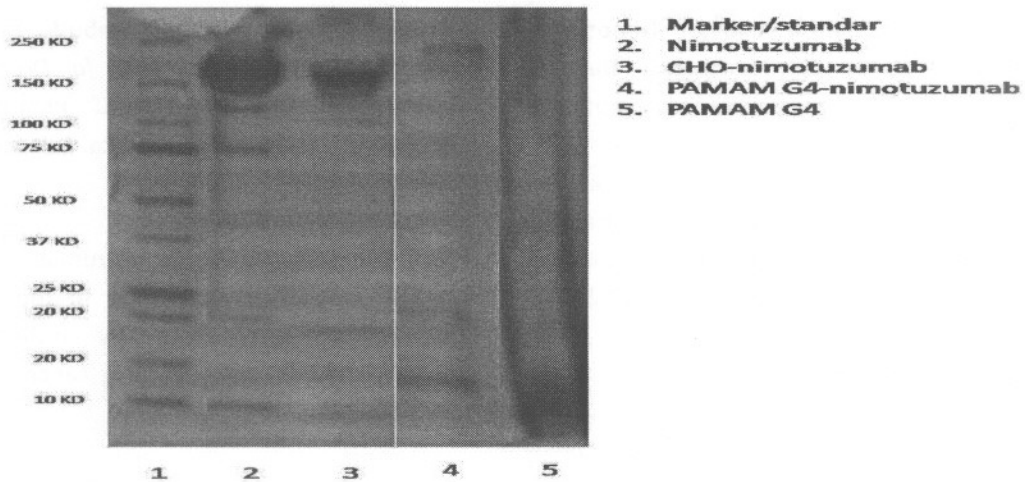
nimotuzumab telah terkonyugasi dengan dendrimer PAMAM G4.

Dari uji yang dilakukan diketahui ukuran partikel rata-rata larutan sampel yaitu 12,29 m (Gambar 8). Dari hasil analisa ini dapat disimpulkan bahwa terdapat

dendrimer PAMAM G4 pada larutan sampel, dan berdasarkan hasil uji dengan KCKT hanya diperoleh 1 puncak kromatogram sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel merupakan konyugat dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab murni.



Gambar 8. Hasil analisa dengan menggunakan Particle Size Analyzer (Malvern)



Gambar 9. Hasil analisis Nimotuzumab, CHO-nimotuzumab, DTPA-nimotuzumab, PAMAM G4-nimotuzumab dan PAMAM G4 dengan SDS page elektroforesis.

Visualisasi keberadaan unsur-unsur yang terdapat dalam reaksi pembentukan senyawa PAMAM G4-Nimotuzumab dilakukan dengan menggunakan metode elektroforesis gel (SDS page), diperlihatkan pada Gambar 9. Dari hasil analisis dengan metode elektroforesis gel (SDS page), dimana sampel terlebih dahulu didestruksi yaitu dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit, terlihat bahwa pada senyawa nomor 4 (PAMAM G4-nimotuzumab) masih terlihat adanya fraksi dari nimotuzumab dan PAMAM dari hasil destruksi tersebut. Dari data hasil elektroforesis gel (SDS page) dan diperkuat dengan hasil KCKT dimana hanya terdapat 1 puncak pada waktu retensi 6,967 menit, dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut adalah PAMAM G4-nimotuzumab.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi dan analisa dengan menggunakan Spektrofotometer UV, KCKT, PSA dan elektroforesis gel (SDS page) dapat disimpulkan bahwa aktivasi Nimotuzumab dengan  $\text{NaIO}_4$  dan konyugasi Dendrimer PAMAM G4 dengan Nimotuzumab telah berhasil dilakukan. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa larutan konyugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab yang terbentuk berupa larutan jernih, murni dan memiliki ukuran partikel rata-rata 12,29 nm.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Lucky A. Paune, Pembuatan Konjugat Dendrimer PAMAM G4-Nimotuzumab, *Skripsi Sarjana Farmasi*, Fakultas Farmasi Program S1 Reguler Universitas Indonesia, 2013.
2. Humani, T. S., Ramli, M., Rustendi, C. T., & Subur, M., Preparasi dan uji stabilitas <sup>177</sup>lu-dota-nimotuzumab sebagai radiofarmaka terapi kanker, (November), 2010, pp. 663-670.
3. Ciolkowski, M., Petersen, J. F., Ficker, M., Janaszewska, A., Christensen, J. B., Klajnert, B., & Bryszewska, M., Surface modification of PAMAM dendrimer improves its biocompatibility. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(6), 2012, pp. 815-817.
4. Tomalia D.A., Reyna L.A, Svenson S., *Dendrimers as multi-purpose devices for oncology drug delivery and diagnostic imaging*, Biochemical Society Transactions 35, part 1, 2007, pp.61-67.
5. Svenson S., Tomalia D.A., Dendrimers in biomedical applications –reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57., 2215-1137, 2005, Diunduh tgl 18-03-2007 dari : <http://www.sciencedirect.com>.
6. Drabu S., Khatri S., Babu S., *Dendrimers: Nanopharmaceuticals for Drug Delivery*, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, Vol. 1 Issue 2, 2010.
7. Press, D., Nimotuzumab, a novel monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor , in the treatment of non-small cell lung cancer, 2011, pp. 59-67.
8. Takeda M., Isamu Okamoto I., Yasumasa Nishima Y., Kazuhiko Nakagawa N.. Nimotuzumab, a novel monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in the treatment of non-small cell lung cancer, *Lung cancer : Targets and Therapy*, 2, 2011, pp. 59-67.

9. Fischer-durand, N., Salmain M., Rudolf B., Dai L., Jugé L., Guérineau V., Laprévotte O., et al., Site-specific conjugation of metal carbonyl dendrimer to antibody and its use as detection reagent in immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 407 (2), 2010, pp. 211-219.
10. Yin Z., Liu N., Ma M., Wang L., Hao Y., Zang X, A novel EGFR-targeted gene delivery system based on complexes self-assembled by EGF, DNA and activated PAMAM dendrimer, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2012, pp. 4625-4635.
11. Hens M., Vaidyanathan G., Zhao X.G., Bigner D.D., Zalutsky M.R., Anti EGFRvIII monoclonal antibody armed with <sup>177</sup>Lu : in vivo comparison of macrocyclic and acyclic ligands, *Nuclear Medicine and Biology*, 37, 2010, pp. 741-750.
12. Hermanson G.T., "Bioconjugate Technique", second ed., Elsevier, 2008, pp.130.