

Desain, Sintesis Dan Uji Sitotoksitas analog UK-3A: Hidroksipikolinil Dioktil Glutamat Ester

(Design, Synthesis and Citotoxicity Assay of UK-3A analogue: Hydroxypicolinil Dioctyl Glutamic Ester)

YULIA ANITA*, MUHAMMAD HANAFI

Pusat Penelitian Kimia – LIPI, Kawasan Puspiptek, Kabupaten Tangerang 1531

Diterima 26 September 2010, Disetujui 7 Maret 2011

Abstrak: Antibiotika UK-3A telah diisolasi sebagai komponen minor dari *Streptomyces sp.* 517-02. Senyawa ini dielusidasi sebagai turunan dilakton yang memiliki 9 cincin. Senyawa analog UK-3A, yaitu ester 3-hidroksipikolinil dioktil glutamat disintesis dari L-glutamat dan oktanol, kemudian hasilnya direaksikan dengan 3-hidroksipikolinat. Produk akhir tersebut diidentifikasi dengan menggunakan ^1H dan ^{13}C FT-NMR, spektrofotometri FT-IR dan LC-MS. Uji *bioassay* menunjukkan bahwa senyawa ester 3-hidroksipikolinil dioktil glutamat menunjukkan aktivitas menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P388 dengan nilai IC_{50} 9.80 $\mu\text{g/mL}$, lebih tinggi dari aktivitas hambatan UK-3A dengan nilai IC_{50} 38.4 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: sitotoksitas, UK-3A, sel P388, ester 3-hidroksipikolinil dioktil glutamat.

Abstract: Antibiotic UK-3A had been isolated as a minor component from the mycelium of *Streptomyces sp.* 517-0. It was elucidated as a nine-member dilactone ring derivative. To produce an analog of UK-3A, i.e. hydroxypicolinil dioctyl glutamic ester, was synthesized from L-glutamic acid and octanol, and the product was then reacted with 3-hydroxypicolinic acid and dioctyl glutamic ester. The final product was identified by ^1H and ^{13}C FT-NMR, FT-IR spectrophotometry, and LC-MS. The it was tested for cytotoxic activity against P388 Murine Leukemia cells. The results showed that the 3-hydroxypicolinyl dioctyl glutamic ester has higher inhibition activity against P388 leukemia cells with IC_{50} value of 9.80 $\mu\text{g/mL}$ than the activity of UK-3A with IC_{50} value of 38.4 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: cytotoxic, UK-3A, P388, cells, 3-hydroxypicolinyl dioctyl glutamate ester.

PENDAHULUAN

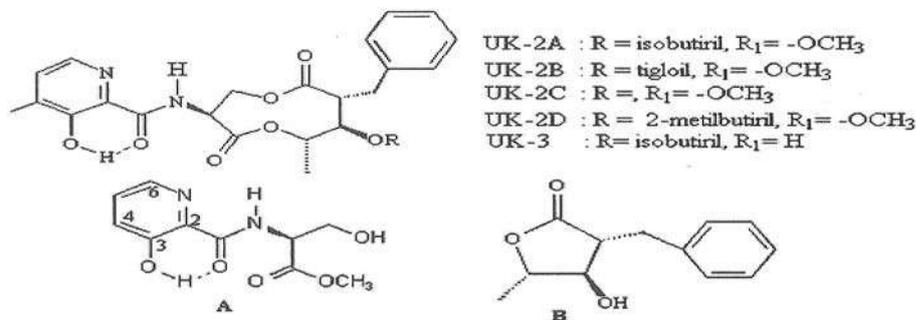
ANTIBIOTIKA UK-3A merupakan senyawa dilakton cincin sembilan yang telah diisolasi dari *micelium Streptomyces sp.* 517-02, dilaporkan mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker antara lain terhadap sel leukemia P-388⁽¹⁾. Senyawa antibiotika UK-3A mempunyai nilai IC_{50} sebesar 38.4 $\mu\text{g/mL}$ secara *in-vitro*⁽²⁾. Sebagai dilakton cincin sembilan, bila dihidrolisis Antibiotika UK-3A menghasilkan senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil ester (A) dan ester lakton cincin 5 (B) (Gambar 1) yang aktivitasnya menurun (sehingga tidak aktif) dalam

menghambat sel kanker P388 secara *in vitro*^(1,2,3).

Sintesis senyawa analog UK-3A dilakukan dengan modifikasi berdasarkan hubungan struktur kimia dan aktivitas biologi (QSAR). Untuk mensintesis senyawa analog dari UK-3A dapat dilakukan dengan memvariasikan gugus-gugus lebih bersifat nonpolar tanpa menghilangkan gugus aktifnya, sehingga senyawa yang dihasilkan dapat menembus membran sel kanker yang bersifat hidrofobik. Senyawa sintetik baru yang merupakan analog dari senyawa induknya diharapkan memiliki aktivitas biologi yang sama atau lebih besar⁽⁴⁾, sehingga berpotensi sebagai calon obat anti kanker.

Peningkat sifat lipofilisitas juga berdasarkan parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) dan *energy docking* dengan protein Bcl-xL^(5,6,7). Untuk meningkatkan aktivitas senyawa A, maka

* Penulis korespondensi, Hp. 085890693180
e-mail: myname_yulia@yahoo.com



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

dilakukan modifikasi struktur asam amino dan asam karboksilat guna meningkatkan lipofilisitasnya sehingga diharapkan dapat dengan mudah menembus dinding sel. Berdasarkan hasil (QSAR) dan *energy docking* dengan protein Bcl-xL, pada makalah ini akan dilaporkan sintesis analog UK-3A dengan mengganti gugus L-serin dengan L-glutamat dan membuat rantai panjang dari oktanol sehingga diharapkan cincin dilakton rantai terbuka yang dihasilkan mempunyai aktivitas yang lebih tinggi. Senyawa Hidroksipikolinil dioktil glutamat ester, diidentifikasi dan di uji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia P388.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. L-glutamat, asam 3-hidroksipikolinat, oktanol, disikloheksil karboimida (DCC) dan N,N-dimetilaminopiridin (DMAP). Pelarut yang digunakan meliputi piridin pa, benzen pa, heksana teknis, dan etil asetat teknis.

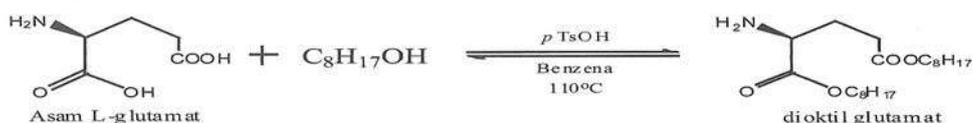
Alat. Instrumentasi berupa FT-IR, LC-MS (Mariner Biospectrometer), NMR (500 MHz, Jeol). TLC menggunakan plate Si-gel (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 mm) dan kolom kromatografi, alat gelas sebelum digunakan dikeringkan dalam oven (70 °C). Semua rekasi dilakukan dibawah kondisi gas Nitrogen dengan cara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

METODE. Terdapat 2 tahap sintesis analog UK-3A (Gambar 2), yang pertama adalah reaksi esterifikasi dan yang kedua adalah reaksi amidasi senyawa dioktil glutamat ester dengan asam 3- hidroksipikolinat.

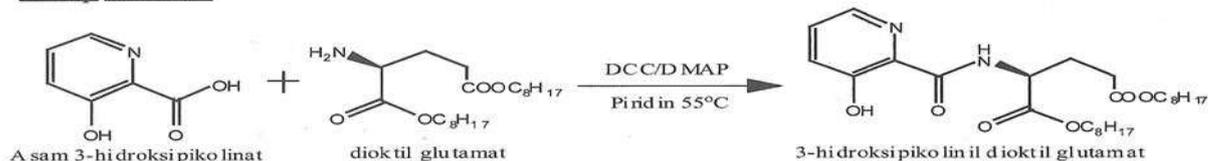
Uji aktivitas sitotoksik secara *in vitro*. Sel kanker Murine leukemia P-388 dengan pertumbuhan pada fase logaritma, dilarutkan dalam tabung kultur dengan jumlah sel sekitar 3 x 10³ sel/mL dalam media RPMI 1640. Sel diinokulasikan dalam *microplate* 96 lubang dasar rata, dikultivasi dalam inkubator CO₂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

Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Pengenceran sampel

Tahap Esterifikasi



Tahap Amidasi



Gambar 2. Sintesis analog UK-3A (PDOGE).

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.

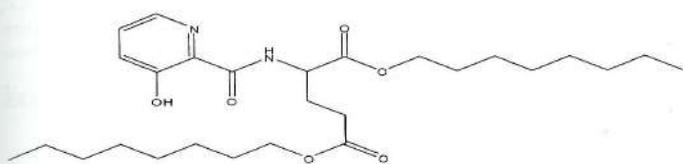
Pengukuran rapatan optis (OD) dilakukan 24 jam setelah penambahan *stop solution*. Uji sitotoksik ini dilakukan dengan tiga kali ulangan⁽⁸⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

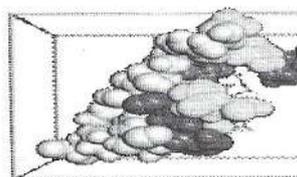
UK-3A bila dihirolisis akan menghasilkan senyawa A dan B, dan kedua senyawa tersebut menunjukkan adanya aktivitas dalam menghambat pertumbuhan sel kanker karena nilai IC₅₀ > 100 µg/mL. Cincin sembilan mempunyai peranan penting dalam menghambat

Tabel 1. Hasil perhitungan parameter QSAR UK-3A dan analognya.

Senyawa	Log P	Vol (Å ³)	Eddocking Kcal/mol
Antimycin	1.30	1421.1	-10.24
UK-3A	1.61	1319.1	-11.65
Taxol	2.25	1398.4	-10.39
PDOGE	3.32	1520.0	-13.54



Gambar 3. Struktur senyawa PDOGE.



Gambar 4. Contoh virtual molecular docking PDOGE dalam menghambat Bcl-xL (Energy = -13.54 kcal/mol).

pertumbuhan sel. Modifikasi struktur dilakukan dengan membuka cincin dilakton untuk meningkatkan aktivitasnya, dengan alasan meningkatkan lipofilisitasnya sehingga diharapkan dapat dengan mudah menembus dinding sel. Telah dilakukan kajian parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) menggunakan *software hyperchem 7.0* dan *Arguslab 4.0*. Berdasarkan data tersebut (Tabel 1), menunjukkan bahwa senyawa Hidroksipikolinil dioktil glutamat ester (PDOGE) (Gambar 3) diduga aktif, dengan semakin besarnya nilai log P dan luas permukaan. Disamping itu bila dilihat energi interaksinya dengan protein Bcl-xL (Gambar 4), maka senyawa tersebut mempunyai energi terkecil.

Sebagai pembandingan dilakukan uji parameter QSAR dari obat komersial Taxol, Antimycin A3 atau senyawa UK-3A sendiri. Berdasarkan hasil tersebut diduga bahwa senyawa PDOGE potensi sebagai antikanker. Dengan demikian, maka senyawa PDOGE disintesis dan diuji aktivitasnya.

Untuk membuat analog UK-3A, L- asam Glutamat diesterifikasi dengan oktanol menghasilkan ester (rantai terbuka cincin lakton).

Senyawa Dioktil glutamat ester (DOGE) berupa padatan putih kekuningan dengan rendemen 73%. Hasil identifikasi dengan FT-NMR menunjukkan bahwa senyawa tersebut telah terbentuk, dengan munculnya signal amina pada daerah geseran kimia (δ_H , ppm) 8.30 (1H, d).

Untuk meningkatkan aktivitas senyawa DOGE, maka dilakukan reaksi amidasi dengan 3-asam hidroksipikolinat dengan adanya aktivator dan katalisator DCC dan DMAP dalam pelarut Piridin. Hasil amidasi tersebut menghasilkan senyawa PDOGE dengan rendemen 38% (b/b), setelah melalui proses pemurnian melalui kromatografi kolom.

Hasil identifikasi dengan FT-IR menunjukkan vibrasi ulur gugus ester ditunjukkan oleh pita serapan pada $\bar{\nu}$ 1737.96 cm⁻¹ dan dikonfirmasi juga dengan spektrofotometer ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Berdasarkan hasil pengukuran spektrum ¹H-NMR, terbentuknya gugus amida (-CONH) ditunjukkan oleh puncak yang muncul pada δ_H 8.06 (1H, d) yang berinteraksi dengan gugus metin dan muncul didaerah yang relative *downfield*, sedangkan gugus hidroksil (-OH) muncul pada δ_H 11.78 (s) karena membentuk ikatan hidrogen intramolekuler dengan gugus karbonil. Terbentuknya amida tersebut juga didukung dengan data spektrum ¹³C-NMR yang muncul pada δ_C 168.9.

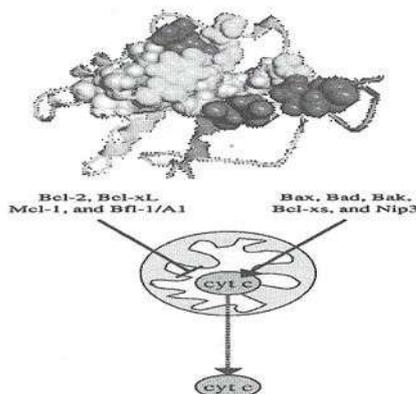
Berdasarkan hasil uji aktivitas senyawa analog UK-3A, terbukti bahwa senyawa 3-hidroksipikolinil dioktil glutamat ester (PDOGE) dengan nilai IC₅₀ 9.80 µg/mL (Tabel 2) memiliki kemampuannya dalam menghambat sel kanker P388. Hasil tersebut lebih baik dari pada aktivitas senyawa UK-3A. Hal ini menyatakan bahwa

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik terhadap pertumbuhan sel kanker P388 dan KB.

No	Senyawa	(IC ₅₀ µg/mL) P388
1	UK-3A	38.4
2	DOGE	9.8

pembukaan cincin dilakton dapat digantikan dengan memvariasikan gugus ester yang bersifat non polar yaitu rantai panjang seperti asam L- glutamat dengan oktanol yang sesuai dengan sifat permeabilitas membran.

Berdasarkan parameter hubungan struktur dan aktivitas (QSAR) dan melalui metode virtual molecular docking senyawa 3-hidroksipikolinil dioktil glutamat ester (PDOGE) dapat mengikat sisi aktif dari Bcl-xL yang lebih stabil dari UK-3A sendiri (Gambar 5). 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 timbulnya penyakit kanker.



Gambar 5. Bcl-xL (atas) menghambat kerja protein pro-apoptosis.

SIMPULAN

Modifikasi analog UK-3A menjadi Pikolinil dioktil glutamat ester (PDOGE), dapat meningkatkan lipofilitas sebagai pengganti gugus dilakton cincin sembilan pada UK-3A. Pembukaan cincin dilakton UK-3A dengan rantai panjang dalam bentuk diester dapat menginhibitor aktivitas protein Bcl-xL.

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. Erwin Adinata atas kerja samanya mendukung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Hanafi M, Shibata K, Ueki M, Taniguchi M. UK-2A, B, C, and D: a Novel Antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02 : II. Structural Elucidation. *J Antibiotics*. 1996. 49 (12): 1226-1226.
- Ueki M, Kusumoto A, Hanafi M, Shibata K., Tanaka T, Taniguchi M. UK-3A a novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. *J Antibiotic*. 1997a. 50 (7): 551-5.
- Hanafi M. Studi korelasi struktur molekul dan aktivitas biologi dari antibiotika UK-2, UK-3, turunan, dan analognya. di dalam: *Kimia dalam Pembangunan. Konferensi Nasional I. Yogyakarta; 1997a.*
- Widodo W. Sintesis senyawa analogu antibiotika UK-3 (3-hidroksipikolinil serin isobutil ester dan turunannya (skripsi). Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia; 1998.
- Putra AMJ, Hanafi M, Anita Y. UK-2A analogues: potential inhibitors of Bcl-xL. *Prosiding Internatioanl Conference on Chemical Sciences (ICCS 2007) Yogyakarta 24-26 Mei, 2007.*
- Harald W, Jeannette G, Klaus P. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005. (16): 55-76.
- Clara C, Ana MC, Montserrat B, Daniel IS, Antonio FS, Coll-Muleta, Merce DF, Alicia D, Gabriel P, and Joan G. Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Experimental Hematology*. 2006. (34): 1663-9.
- Sahidin, Euis HH, Lia DJ, Yana MS, Emilia LG, Jalifah L, Ikram M, Syamsul AA. Cytotoxic Properties of Oligostilbenoids from the tree barks of *Hopea dryobalanoides*. *J Naturforsch*. 2005. 60: 723-7.
- Patrick G. *Instant notes in medicinal chemistry*. BIOS Scientific Publisher; 2001.