

## AKTIVITAS ANTI KANKER SENYAWA-SENYAWA KITOOLIGOMER

[Anti Cancer Activity of Chitooligomers]

Sri Wahyuni <sup>1)</sup>, Fransiska Zakaria <sup>2)</sup>, Arief B. Witarto <sup>3)</sup>, Dahrul Syah <sup>2)</sup>, dan Maggy.T Suhartono <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Staf Pengajar MIPA, FKIP, UNHALU

<sup>2)</sup> Staf pengajar pada Departemen Ilmu dan Teknologi pangan IPB

<sup>3)</sup> Peneliti Senior pada Pusat Bioteknologi LIPI Cibinong Bogor

Diterima 5 Maret 2006/ Disetujui 2 Juni 2006

### ABSTRACT

The chitin obtained from the crab industries can be used as a source for production of chitooligomers which has an important biological activity. The aims of this research was to evaluate anti cancer activity of the chitooligomers obtained from enzymatic hydrolysis using chitosanase from thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* MB2 isolated from Tompaso Manado. Media for producing the enzyme contained colloidal chitosan 1% and the enzyme was harvested after seven days of incubation at 55°C. The heat stable protein enzyme was coagulated with 80% saturated ammonium sulphate and purified using hydrophobic interaction chromatography with butyl sepharose gel. Enzyme of 0.005, 0.0085, 0.10 dan 0.17 IU/mg chitosan on soluble chitosan 1% substrate with 85% degree of deacylation were used to produce chitooligomers through incubation for one and three hours. The reaction products were analyzed (and fractionated) using HPLC. The effect of this samples on cancer cells was evaluated using K562 cells (chronic myelogenous leukemia) and investigated after being treated with MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). In general, hydrolysates and fractionated chitooligomers showed better anti cancer activity than the 2- Bromo deoxy uridine used as positive control at similar concentration (17 µg/ml). Both of hydrolysates and fractionated chitooligomers (trimer to hexamer) inhibited proliferation of human K562 cancer cells line in vitro about 20.57% and 15.68% respectively. The apoptosis phenomena was found on K562 cells treated with chitooligomer hydrolysate which can be examined by Hoechts staining fluorescent method. Chitooligomers hydrolysate showed anti metastatic potential, the chitooligomers were found also as potent protease inhibitor.

**Keywords :** chitooligomers, chitosan, anticancer

### PENDAHULUAN

Trend pangan fungsional semakin berkembang pesat saat ini, karena dalam pangan yang dikonsumsi sehari-hari ternyata mengandung ribuan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif merupakan komponen dalam bahan-bahan alami yang memiliki pengaruh terhadap aktivitas biologis makhluk hidup. Kehadiran senyawa bioaktif dalam bahan pangan telah terbukti secara ilmiah mempunyai efek positif terhadap kesehatan, sebagai contoh komponen *sulphoraphane*, kurkumin, likopen, dan polifenol dalam teh ditemukan menjadi komponen yang berfungsi sebagai agen *chemopreventive* (Elliot dan Ong 2002). Oleh karena itu penggunaan senyawa bioaktif sebagai pendamping konsumsi makanan atau secara fungsional terdapat dalam makanan yang dikonsumsi merupakan hal yang sangat bermanfaat. Upaya pencegahan berbagai jenis penyakit termasuk penyakit kanker secara dini melalui pangan yang sehat membuat terjadinya peningkatan konsumsi komponen bioaktif sebagai pangan fungsional dalam bentuk produk makanan yang difortifikasi dan *nutraceuticals* (Elliot dan Ong 2002).

Senyawa kitooligosakarida (oligomer kitosan) yang berasal dari limbah senyawa berkitin belakangan ini telah menarik perhatian industri karena manfaatnya untuk pangan dan medis menunjukkan nilai ekonomis yang cukup tinggi. Harga jual produk kitooligosakarida di pasar internasional saat ini telah mencapai US\$ 60.000 per ton (Sandford 2003), sehingga kajian ini dipandang sangat penting untuk usaha peningkatan nilai tambah limbah berkitin khususnya untuk produksi senyawa bioaktif oligomer kitosan yang dapat diaplikasi sebagai pangan fungsional dan *nutraceutical*.

Beberapa penelitian melaporkan potensi anti kanker senyawa kitooligosakarida yang berasal dari bahan berkitin, antara lain : Yeon et al., (2004) melaporkan bahwa heksa N-asetil chitoheksaose dan chitoheksaose memiliki pengaruh menghambat pertumbuhan sel tumor *Meth A-solid*. Semenuk et al (2001) melaporkan aktivitas kitooligomer sebagai anti tumor. Pae (2001) melaporkan terjadinya induksi granulositik pada sel *promyelocytic leukemia* (HL-60) oleh *water-soluble chitosan oligomer* (WSCO). Shen (2002) juga melaporkan kitosan larut air (WSC) secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker ASG. Aktivitas oligomer kitosan sebagai sebagai senyawa

bioaktif juga dilaporkan oleh beberapa peneliti, antara lain : Rhoades & Roller (2000), Shahidi et al., (1999), dan Meidina (2005) melaporkan oligomer kitosan dapat berfungsi sebagai anti bakteri. Goosen (1997), Dodane & Vilivalam (1998) melaporkan oligomer kitosan berat molekul rendah (8000-10.000 dalton) berperan aktif sebagai anti kolesterol. Berdasarkan data-data tersebut, maka senyawa-senyawa kitooligomer yang berasal dari limbah berkitin merupakan senyawa kitooligosakarida yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai material anti kanker.

Limbah yang mengandung kitin (kepala udang, cangkang kepiting dan lain-lain) di Indonesia pada tahun 2002 dihasilkan sekitar 112.208 ton (Anonim 2004), limbah ini belum dimanfaatkan secara baik dan berdaya guna, bahkan sebagian besar merupakan buangan yang juga turut mencemari lingkungan. Oleh karena itu perlu di proses menjadi bahan yang bermanfaat seperti kitin, kitosan dan selulase yang bermanfaat bagi manusia. Penelitian Purnamawati (1997) memberi informasi bahwa kitosan dapat dijadikan sebagai sumber serat makanan, penambahan kitosan 10.50% dalam minuman sari buah nenas dapat meningkatkan total serat minuman hingga mencapai 23.75%, hasil tersebut menunjukkan kitosan berpotensi digunakan sebagai pangan fungsional.

Kitooligosakarida dapat diproduksi secara enzimatik dari senyawa kitin dengan menggunakan enzim kitinase, kitin deasetilase dan kitosanase. Kitin deasetilase memodifikasi kitin menjadi kitosan. Kitosanase menguraikan kitosan menjadi oligomer kitosan atau kitooligomer. Proses perubahan kitin menjadi turunan oligosakarida secara kimiawi oleh asam cenderung dihindari karena proses ini tidak dapat dikontrol, menghasilkan lebih banyak monomer D-glukosamin dan lebih sedikit oligomer, padahal, yang memiliki aktivitas biologi penting adalah senyawa oligomernya (Kolodziejska et al., 2000, Curroto & Aros 1993). Hidrolisis kitosan secara enzimatik adalah cara yang lebih baik untuk mendapatkan oligomer kitosan dengan derajat polimerisasi yang lebih tinggi. Ukuran molekul produk akhir hidrolisis, yaitu senyawa oligomer kitosan sangat penting diperhatikan, karena sifat fungsional bergantung pada berat molekulnya (Suzuki 1996, Kolodziejska et al., 2000).

Berdasar latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan kajian produksi senyawa-senyawa kitooligomer yang bersifat bioaktif dengan menggunakan enzim kitosanase yang dihasilkan oleh isolat *B. licheniformis* MB2. Bakteri tersebut diketahui menghasilkan kitosanase pada pH optimum 6-7, stabil terhadap kisaran pH 4 – 6.8, tahan panas (suhu optimum 70°C) dan tahan senyawa denaturan (terutama guanidin dan urea) (Chasanah 2004). Pengkajian penelitian ini ditujukan untuk menghasilkan senyawa kitooligomer yang memiliki aktivitas biologis sebagai anti kanker dengan menggunakan aplikasi enzim kitosanase dan memahami daya anti kanker dari senyawa-senyawa kitooligomer tersebut.

## METODOLOGI

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan dengan derajat deasetilasi 85% (DD85) (Sigma C3646-25G 014K0674). Kitosan tersebut berasal dari karapas udang. Kitosan dengan derajat deasetilasi 70% (DD70), dalam bentuk terlarut (1%), merupakan produk hasil penelitian Rochima (2005). Kitosan dengan derajat deasetilasi 90% dan 100% (DD90 dan DD 100), dalam bentuk terlarut (1%) (Seikagaku Co. Tokyo, Jepang). Kitooligomer (D-glukosamin, dimer sampai heksamer) yang digunakan sebagai standar dalam analisis dan fraksinasi HPLC (Seikagaku Co. Tokyo, Jepang). Media agar untuk bakteri (Oxoid. Ltd). Medium untuk kultur sel kanker yaitu *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) (Gibco Ltd.) HEPES, *penicillin*, *streptomycin*, MTT dan *Fetal bovine serum* (FBS) (Sigma). Galur sel K562 diperoleh dari Lab kultur jaringan, FKH-IPB.

Identifikasi komponen kitooligomer dilakukan menggunakan HPLC dengan detektor UV model 440 dual lamda. Pembacaan absorbansi jumlah sel menggunakan alat *Microplate reader* Benchmark dari Bio-Rad. *Fluorochrome-bis-benzimide trihydrochloride* (Hoechst 33342) sebagai pewarna fluoresens (Biomedical Inc. Ohio). Pengamatan dan foto apoptosis menggunakan mikroskop fluoresens Nikon *Eclipse E600* (Jepang) dengan pembesaran lensa obyektif 400 kali.

### Produksi enzim kitosanase

Isolat bakteri *B. licheniformis* MB2 ditumbuhkan pada media cair yang mengandung 1% *soluble* kitosan. Biakan diinkubasi pada inkubator berpenggoyang 120 rpm suhu 55°C selama tujuh hari (Chasanah 2004). Biakan disentrifugasi pada 10 000 rpm selama 15 menit. Supernatan mengandung enzim ekstrak kasar dipisahkan dari endapannya.

### Pengukuran aktivitas kitosanase dan kadar protein

Aktivitas kitosanase diukur dengan metode *Schales* yang dimodifikasi dan glukosamin sebagai standar (Uchida dan Ohtakara 1998). Gula reduksi yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Satu unit aktivitas kitosanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang memproduksi 1 µmol gula reduksi sebagai glukosamin permenit. Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976).

### Produksi senyawa-senyawa kitooligomer dan analisis produk kitooligomer

Satu liter supernatan bebas sel diendapkan dengan amonium sulfat 80% jenuh, kemudian disentrifugasi pada 10 000 rpm selama 15 menit. Endapan dilarutkan dalam buffer fosfat 0.05 M pH 6.0. Unit enzim yang digunakan adalah 0.005, 0.0085, 0.10 dan 0.17 Unit per miligram kitosan. Reaksi hidrolisis

enzim dengan substrat dilakukan pada suhu 70 °C (suhu optimum enzim) selama 1 dan 3 jam. Reaksi enzimatik dihentikan dengan perebusan kemudian disentrifus.

Produk kitooligomer dari hasil hidrolisis enzim dianalisis dengan HPLC. Direaksikan sebanyak 1 ml campuran reaksi dengan 1 ml asetonitril, dengan volume injeksi 20 µl menggunakan kolom karbohidrat (waters), sebagai standar digunakan oligomer dengan berat molekul 2 – 10 kDa sebanyak 25 mg/ml. Sebagai bufer elusi digunakan 60% asetonitril dengan laju alir 1 ml/menit (Jeon & Kim 2000; Chasanah 2004).

### Pemeliharaan sel K562

Pemeliharaan galur sel K562 menggunakan medium DMEM/F 12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) ditambah serum janin sapi 10% dengan jumlah sel yang digunakan sebanyak  $2 \times 10^5$  sel/ml (Damayanti 2002).

### Pengujian sel K562 dalam *microplate* 96 sumur

Suspensi sel sebanyak  $1 \times 10^5$  sel/ml dimasukkan ke dalam sumur-sumur *microplate* sebanyak 100 µl tiap sumur. Kitooligomer ditambahkan dalam sumur sebanyak 20 µl, jumlah total volume dalam tiap sumur sebanyak 200 µl. Kultur diinkubasi pada inkubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, RH 90% selama 3 hari.

### Uji proliferasi sel (Kubota 2003)

Larutan garam tetrazolium (MTT) sebanyak 10 µl diberikan pada tiap sumur yang berisi sel K562, empat jam sebelum inkubasi berakhir. Sel yang hidup menghasilkan senyawa formazan berwarna biru dan tidak larut, untuk melarutkan digunakan 100 µl isopropanol tiap sumur, hasilnya dibaca dengan alat *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.

### Pengolahan data

Data absorbansi perlakuan dengan 3 kali ulangan dikonversi ke rumus

$$\text{Penghambatan proliferasi sel kanker} = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}}\right) \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas protease (U/ml)} = \frac{\text{Absorban sampel} - \text{Absorban blanko}}{\text{Absorban standar} - \text{Absorban blanko}} \times \frac{\text{Faktor pengenceran}}{\text{Waktu inkubasi}}$$

### Pengujian mekanisme anti proliferasi (Wispiyono et al., 2002).

Pengujian perubahan inti sel akibat apoptosis dilakukan dengan prinsip terikatnya DNA sel dengan *fluorochrome-bis-benzimide trihydrochloride* (Hoechst 33342). Setelah dilakukan pemberian bahan uji selama 24 jam pada kultur sel, pelet sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi selama 10 menit pada 228 x g, kemudian difiksasi pada temperatur 37°C selama 30 menit dengan larutan formalin 3.7% dalam PBS. Pelet sel kemudian dicuci dengan PBS dan diwarnai dengan *Hoechst dye* 24 µg/ml selama 12 jam pada 4°C. 20 µl suspensi sel tersebut ditempatkan pada *cover glass* kemudian diamati dan difoto menggunakan *fluorescence microscope* untuk melihat kondensasi kromatin dari sel yang mengalami apoptosis.

### Pengujian potensi senyawa kitooligomer campuran sebagai anti serin protease (Bergmeyer 1983).

Enzim tripsin terlebih dahulu diinkubasi dengan hidrolisat senyawa-senyawa kitooligomer pada berbagai konsentrasi pada suhu 37°C selama 15 menit sebelum dilakukan pengujian aktivitas protease. Hal ini dimaksudkan untuk memberi kesempatan enzim berinteraksi dengan senyawa-senyawa kitooligomer yang ditambahkan. Prosedur Bergmeyer yang dimodifikasi dilakukan untuk menguji aktivitas serin protease. Satu unit enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu menghasilkan satu µmol produk glisin. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut:

Aktivitas penghambatan protease dapat diketahui dengan membandingkan aktivitas enzim protease yang ditambahkan dan tanpa penambahan hidrolisat senyawa-senyawa kitooligomer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi senyawa-senyawa kitooligomer dan analisis produk kitooligomer

Senyawa-senyawa kitooligomer merupakan hasil hidrolisis substrat kitosan menggunakan enzim kitosanase dengan aktivitas hidrolitik tertentu. Berdasarkan pengujian kemampuan hidrolitik beberapa preparat enzim yang dihasilkan dari fermentasi kultur *Bacillus licheniformis* MB2 pada media cair yang mengandung koloidal kitosan 1%, diperoleh beberapa preparat enzim yang potensial untuk memproduksi senyawa-senyawa kitooligomer. Aktivitas beberapa preparat enzim disajikan dalam Tabel 1. Berdasarkan aktivitas tersebut, unit enzim yang digunakan untuk memproduksi senyawa-senyawa kitooligomer adalah 0.005, 0.0085, 0.10, dan 0.17 Unit per miligram kitosan. Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas preparat enzim

Reaksi	Aktivitas (U/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
FBSp	0.042	0.309	0.136
FBSp + Mn	0.030	0.326	0.092
AS 80	0.927	0.250	3.696
Enzim murni gabungan	0.052	0.033	1.573

Keterangan :

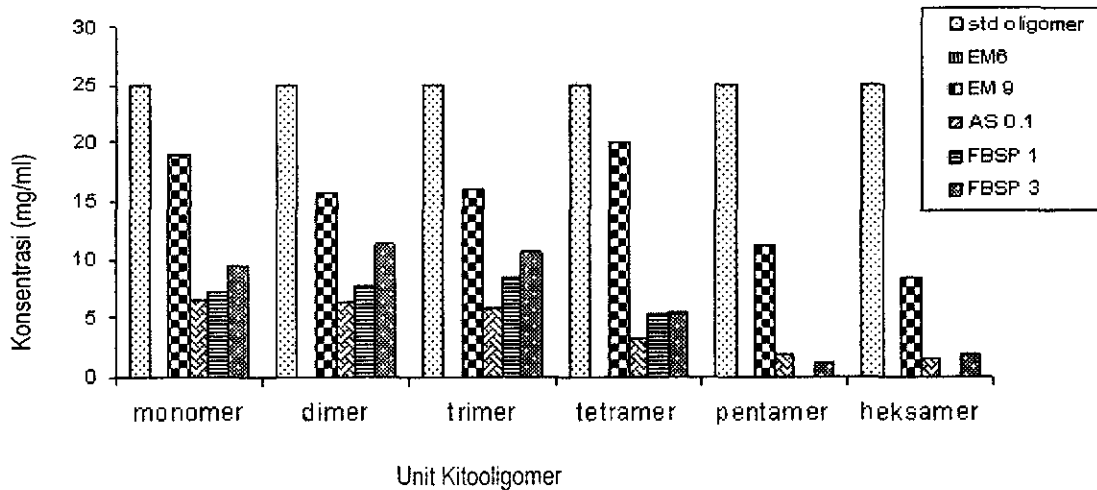
FBSp = Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C.

FBSMn = Filtrat bebas sel yang ditambah katalisator MnCl<sub>2</sub> 10 mM.

AS80 = Enzim hasil pekatan Amonium sulfat 80% dengan pengenceran 30 kali.

Enzim murni = Enzim hasil pemurnian menggunakan kolom kromatografi hidrofobik

Hasil reaksi berbagai preparat enzim dan substrat tersebut menghasilkan senyawa-senyawa kitooligomer yang berukuran mono sampai heksamer, dengan hasil jumlah unit monomer-trimer yang lebih tinggi daripada tetramer-heksamer. Hasil dapat dilihat pada Gambar 1



Keterangan :

FBS 1 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 1 jam.

FBS 3 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentras0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 3 jam.

EM 6 = Hasil reaksi enzim murni dengan konsentras 0.0085 U/mg kitosan DD90, selama 6 jam

EM 9 = Hasil reaksi enzim murni dengan konsentras 0.0085 U/mg kitosan DD 90, selama 9 jam

AS 0.1 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentras 0.10 U/mg kitosan DD85, selama 3 jam.

Std = Standar senyawa-senyawa kitooligomer dari Seikagaku, Jepang.

Gambar 1. Komposisi dan konsentrasi senyawa-senyawa kitooligomer dalam berbagai hidrolisat hasil fraksinasi HPLC

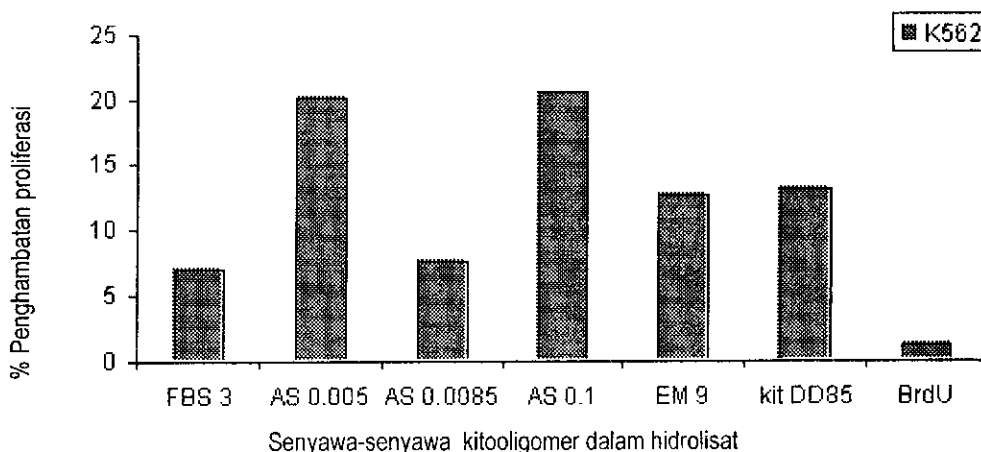
**Aktivitas anti kanker**

Pengujian aktivitas anti proliferasi sel kanker menggunakan metoda *alamar blue* atau metode MTT(3-[4,5 – dimethylthiazol – 2 - yl] - 2,5diphenyl-tetrazolium bromide) yang dilakukan pada lempeng datar 96 sumur. Pengamatan ini berdasarkan reduksi MTT oleh suksinat dehidrogenase dari mitokondria sel hidup yang menghasilkan senyawa formazon berwarna biru, senyawa ini dapat diukur intensitas warnanya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm (Kubota 2003).

Berdasarkan hasil pengujian terhadap kemampuan penghambatan proliferasi sel kanker pada galur sel K562, kitosan dan senyawa kitooligomer campuran (dalam preparat hasil reaksi enzimatik) serta senyawa kitooligomer hasil fraksinasi (trimer – heksamer) memiliki aktivitas terhadap penghambatan proses proliferasi sel kanker. Preparat standar kitooligomer murni memperlihatkan aktivitas penghambatan terbaik oleh kitooligomer dengan unit pentamer sebesar 10.86%, tetapi hasil ini lebih rendah dari preparat hasil reaksi heksamer EM 9 (hasil reaksi enzim murni dengan aktivitas 0.0085 unit per miligram kitosan pada substrat kitosan DD 90 selama 9 jam) sebesar 15.68% yang merupakan aktivitas penghambatan tertinggi terhadap sel K562. Hal ini berarti telah terjadi pengurangan jumlah sel oleh preparat heksamer EM 9 sebesar 15.68% dari jumlah sel kontrol  $1 \times 10^5$  sel/ml.

Aktivitas penghambatan proliferasi dari kontrol positif senyawa anti kanker 2-Bromo deoksi uridin memiliki nilai hanya sekitar 1.22% pada konsentrasi yang sama (17µg/ml kultur). Perbedaan aktivitas penghambatan oleh preparat heksamer EM 9 dengan kontrol positif mencapai 14.46%. Gambar 2 dan 3 memperlihatkan aktivitas penghambatan proliferasi sel K562. Gambar 4 memperlihatkan perbedaan profil sel K562 setelah mengalami inkubasi selama 3 (tiga) hari dengan bahan uji hidrolisat kitooligomer dan tanpa bahan uji (kontrol).

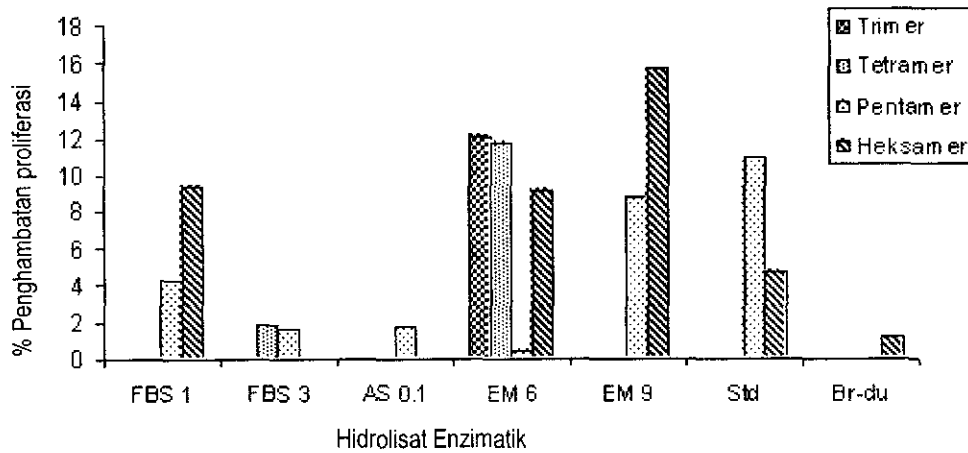
Kemampuan kitooligomer campuran dalam hidrolisat enzimatik yang memperlihatkan aktivitas penghambatan tertinggi sebesar 20.58% dimiliki oleh hidrolisat AS 0.1 (hasil reaksi enzimatik dari preparat enzim pekatan amonium sulfat 80% dengan aktivitas 0.10 unit per miligram kitosan DD85% selama tiga jam). Kitosan dengan derajat deasetilasi 85% memiliki aktivitas lebih rendah daripada hidrolisat AS 0.005 dan EM 9, yaitu sebesar 13.16%, tetapi lebih tinggi dari hidrolisat FBS 3 dan AS 0.0085. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan dengan aktivitas penghambatan oleh senyawa anti kanker 2-Bromo deoksi uridin yang digunakan sebagai kontrol positif terhadap sel K562 sebesar 1.22% pada konsentrasi yang sama (17 µg/ml kultur).



Keterangan :

- FBS 3 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 3 jam.
- EM 9 = Hasil reaksi enzim murni dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD 90, 9 jam
- AS 0.005 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.005 U/ mg kitosan DD85 3 jam.
- AS 0.0085 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85, 1 jam.
- AS 0.1 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.10 U/mg kitosan DD85, 3 jam.
- Kit D85 = Kitosan dengan derajat deasetilasi 85%
- Br-dU = 2-Bromo deoksi uridin (senyawa anti kanker komersial, Sigma)

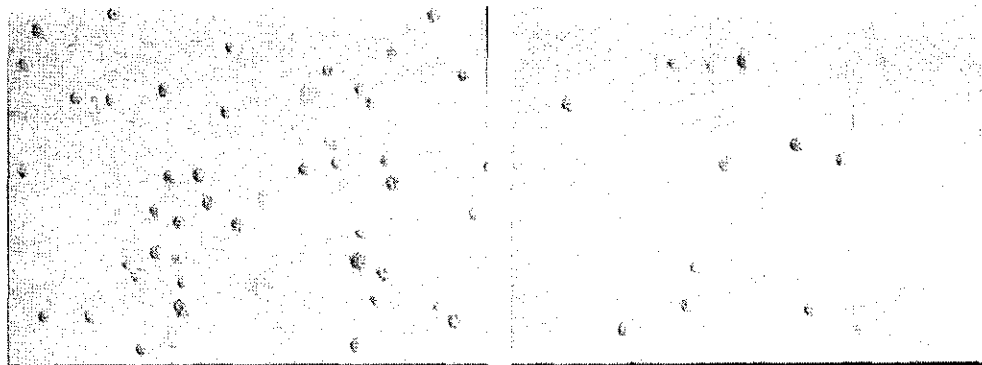
Gambar 2. Aktivitas hidrolisat kitooligomer sebagai penghambat proliferasi sel K562.



Keterangan :

- FBS 1 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 1 jam.
- FBS 3 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 3 jam.
- EM 6 = Hasil reaksi enzim murni dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD90, selama 6 jam
- EM 9 = Hasil reaksi enzim murni dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD 90, selama 9 jam
- AS 0.1 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.10 U/mg kitosan DD85, selama 3 jam.
- Std = Standar senyawa-senyawa kitooligomer dari Seikagaku, Jepang.
- Br-dU = 2-Bromo deoksi uridin (senyawa anti kanker komersial, Sigma)

Gambar 3. Aktivitas kitooligomer hasil fraksinasi sebagai penghambat proliferasi sel K562



Sel K562 tanpa bahan uji

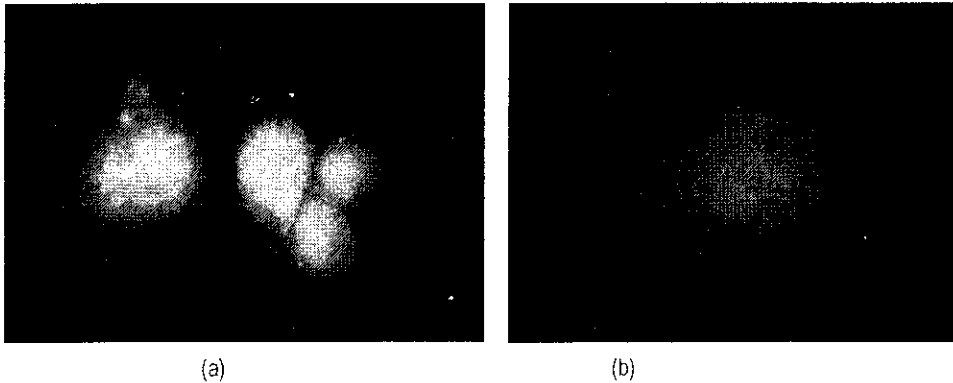
Sel K562 dengan AS 0.005

Gambar 4. Profil sel K562 hasil perbesaran lensa obyektif inverted microscope sebesar 100 kali.

### Kemampuan daya anti kanker senyawa kitooligomer

#### Kemampuan daya anti kanker senyawa kitooligomer berdasarkan uji apoptosis

Terjadinya kematian sel (apoptosis) ditandai dengan fenomena sel menjadi lisut, pemecahan selaput inti, kondensasi kromatin dan degradasi DNA (Becker 2000). Hasil pengujian apoptosis berupa fenomena kondensasi kromatin akibat pemberian kitooligomer pada kultur sel selama satu hari dideteksi dengan metode *Hoechts staining* yang ditampilkan pada Gambar 5 berikut :



Gambar 5. (a) Sel K562 dengan hidrolisat AS 0.005 (apoptosis), (b) Tanpa sampel tidak apoptosis.

Kejadian tersebut merupakan visualisasi dari struktur kromatin DNA yang tidak kompak lagi sebagai akibat meningkatnya aktivitas nuklease yang dirangsang oleh hadirnya suatu bahan asing (kitooligomer) di dalam sel. Komponen kitooligomer kemungkinan dapat mengganggu permeabilitas membran sel kanker, sehingga dapat masuk ke dalam sel dan merangsang aktivasi nuklease sel yang bekerja mendegradasi kromatin menjadi potongan-potongan DNA. Kejadian tersebut dapat divisualisasi dengan pewarna fluoresens dengan prinsip kerja zat pewarna sebagai interkalator DNA karena kemampuan *fluorochrome-bis-benzimide trihydrochloride* (Hoechst 33342) berikatan dengan DNA sel - sel kanker (Wispriono et al., 2002). Fenomena degradasi kromatin pada sel yang mengalami apoptosis membuat zat warna yang bertindak sebagai interkalator DNA dapat lebih banyak berikatan dengan basa-basa DNA dalam potongan-potongan molekul DNA, sehingga kuantitas zat pewarna lebih banyak diserap. Hasil tersebut menunjukkan fenomena yang berbeda dengan sel normal.

Berkaitan dengan hasil tersebut, beberapa mekanisme penghambatan sel kanker oleh senyawa kitooligomer telah diteliti, seperti penelitian oleh Semenuk et al., (2001) melaporkan mekanisme kitooligomer sebagai anti tumor berdasarkan

terbentuknya ikatan antara molekul kitooligomer sebagai ligan dengan reseptor sel *natural killer* (NK) yang mengakibatkan terjadinya aktivasi sel NK dalam membunuh sel kanker. Pae (2001) melaporkan bahwa perlakuan sel HL-60 dengan oligomer kitosan (WSCO) selama 6 dan 8 hari menginduksi terjadinya apoptosis. Shen (2002) melaporkan mekanisme anti kanker dari kitosan larut air dapat terjadi melalui peningkatan sistem enzim untuk apoptosis dalam siklus sel dan penghambatan protein yang berperan dalam proses metastasis.

#### Kemampuan daya anti kanker kitooligomer berdasarkan uji inhibitor protease

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, kitooligomer terbukti mampu menghambat proliferasi beberapa galur sel kanker. Untuk melengkapi data aktivitas senyawa-senyawa kitooligomer sebagai penghambat sel-sel kanker, dilakukan kajian potensi senyawa-senyawa kitooligomer sebagai anti metastasis melalui pengujian kemampuan senyawa kitooligomer berperan sebagai inhibitor protease yang dianalisis melalui model pengujian penghambatan aktivitas enzim protease tripsin komersial dari sumber pankreas sapi, yaitu suatu kelas enzim yang termasuk kelompok enzim serin protease. Penggunaan enzim protease tripsin murni sebagai model pengujian dilatarbelakangi oleh kesulitan memperoleh enzim protease ekstraseluler dari sel kanker yang diekspresikan dengan tujuan bermetastasis. Kemungkinan diperlukan suatu teknik khusus melalui model jaringan dengan teknik histokimia untuk mengisolasi enzim ini.

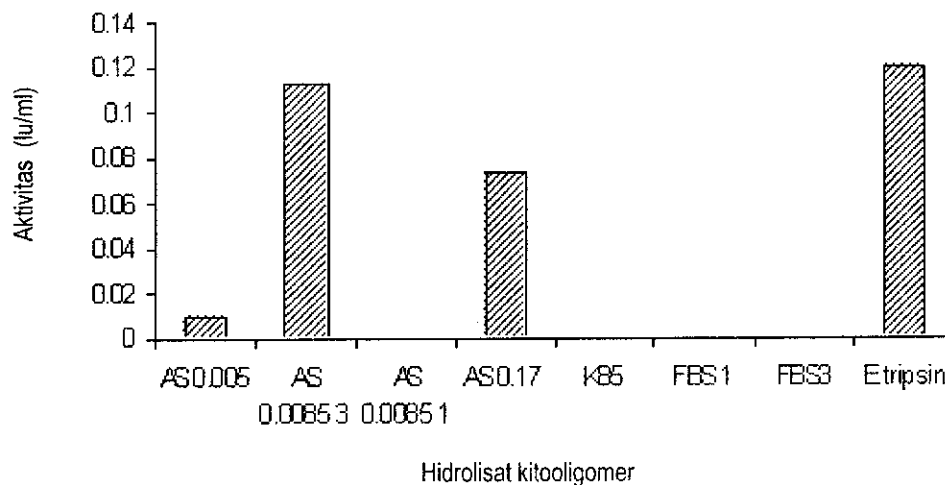
Enzim protease tripsin dipilih karena enzim ini penting bagi sel-sel kanker untuk mendegradasi ECM (*Extra Cellular matrix*), menginvasi jaringan normal, dan memasuki pembuluh darah dan saluran limfatik yang merupakan sebuah tahap kritis pada tahap metastasis kanker. Adanya pelepasan tripsin juga ditemukan dalam berbagai tumor seperti ovarian dan *colorectal*

carcinomas, dimana kemungkinan memiliki peranan pada pembentukan tumor atau proses metastasis (Dowall 2003).

Gambar 6 memperlihatkan bahwa senyawa-senyawa kitooligomer dalam hidrolisat reaksi enzimatik memiliki aktivitas sebagai inhibitor protease. Hasil perhitungan besarnya persentasi penghambatan aktivitas enzim tripsin diperlihatkan pada Gambar 7. Hasil pengujian terhadap kemampuan senyawa-senyawa kitooligomer menghambat aktivitas enzim tripsin, ternyata senyawa-senyawa kitooligomer dalam hidrolisat: AS 0.005, AS 0.0085 1, FBS 1 dan FBS 3 serta kitosan DD85% yang diinkubasi bersama enzim tripsin selama 24 jam memperlihatkan aktivitas penghambatan protease tertinggi pada substrat kolagen.

Hasil penelitian tentang aktivitas anti protease terhadap penghambatan migrasi sel kanker telah dilaporkan oleh Dowall (2003) yang memberi informasi bahwa inhibitor protease serin mampu menghalangi migrasi sel *line* yang sedang bermetastasis. DeFea

(2001) melaporkan penggunaan inhibitor tripsin dalam pengobatan kanker payudara, berdasarkan hasil penelitian bahwa *trypsin like protease* merupakan agen metastasis pada sel kanker payudara. Selanjutnya Kim et al., (2001) memperoleh data bahwa inhibitor protease serin dan sistein pada senyawa obat anti kanker menginduksi terjadinya apoptosis pada sel-sel kanker gastric (lambung). Mekanisme kerja suatu bahan anti protease terhadap penghambatan sel kanker terjadi karena adanya proses pemecahan protein yang ekspresikan oleh sel malignan pada permukaan selnya untuk menembusi matriks ekstraseluler (Wan 1999). Selanjutnya Oberst et al., (2002) juga menemukan mekanisme yang sama, bahwa jenis enzim golongan serin protease transmembran yang terdapat pada permukaan sel-sel tumor ovarian epitelial dapat dihambat oleh senyawa inhibitor protease, sehingga menghalangi migrasi sel-sel tumor ovarian epitelial.

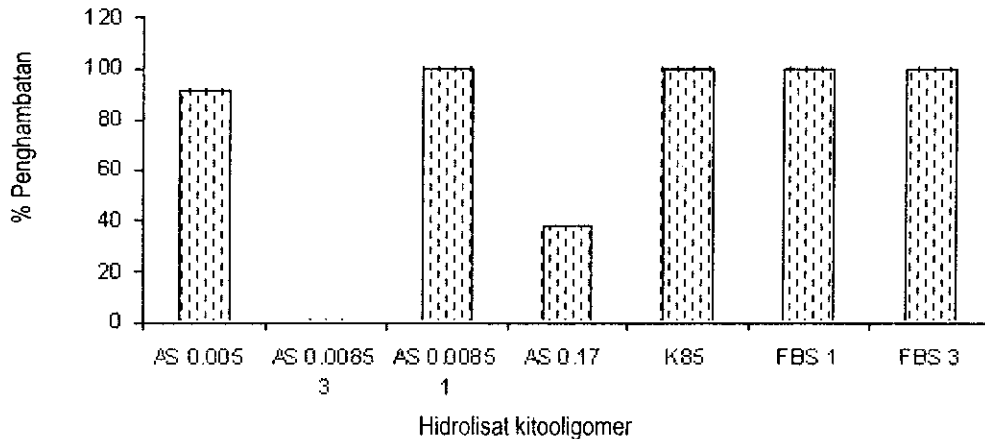


Keterangan :

- AS 0.005 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.005 U/ mg kitosan DD85 3 jam.
- AS 0.0085 1 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85, 1 jam.
- AS 0.0085 3 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85, 3 jam.
- AS 0.17 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.17 U/mg kitosan DD85, 3 jam.
- K D85 = Kitosan dengan derajat deasetilasi 85%
- FBS 1 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 1 jam.
- FBS 3 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 3 jam.

Gambar 6. Kemampuan kitooligomer dalam menghambat aktivitas enzim tripsin pada substrat kolagen (inkubasi 24 jam)





Keterangan :

- AS 0.005 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.005 U/ mg kitosan DD85 3 jam.
- AS 0.0085 1 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85, 1 jam.
- AS 0.0085 3 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85, 3 jam.
- AS 0.17 = Hasil reaksi enzim hasil pekatan amonium sulfat dengan konsentrasi 0.17 U/mg kitosan DD85, 3 jam.
- K D85 = Kitosan dengan derajat deasetilasi 85%
- FBS 1 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 1 jam.
- FBS 3 = Hasil reaksi enzim (Filtrat bebas sel yang dipanaskan selama 20 menit 60°C) dengan konsentrasi 0.0085 U/mg kitosan DD85 selama 3 jam.

Gambar 7. Aktivitas senyawa kitooligomer campuran dalam hasil reaksi enzimatik terhadap penghambatan aktivitas enzim serin protease

## KESIMPULAN

Produksi senyawa-senyawa kitooligomer menggunakan enzim kitosanase dengan konsentrasi 0.005; 0.0085; dan 0.10 unit per miligram kitosan mampu menghasilkan unit senyawa monomer sampai heksamer yang memiliki aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker K562.

Hasil pengujian proliferasi terhadap kultur sel kanker K562 memperlihatkan sampel hidrolisat senyawa kitooligomer dan senyawa kitooligomer hasil fraksinasi dalam kultur sel kanker K562 mampu menghambat proliferasi sel tersebut masing-masing sebesar 20.57% dan 15.68%.

Pemberian hidrolisat kitooligomer pada kultur sel K562 menyebabkan kematian sel kanker tersebut secara apoptosis dengan ciri terjadinya kondensasi kromatin sel.

Hasil pengujian sebagai inhibitor protease membuktikan potensi senyawa-senyawa kitooligomer sebagai anti metastasis sel kanker.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan IPB atas pembiayaan penelitian ini melalui program Research Grant Hibah Kompetisi B tahun 2004.

Dra. Hilda Suwigno; Drh. Bambang Ponco, PhD; dr. Bambang Wispriyono, PhD; Drh. Ketut Mudite, MSV; Dr. Drh. Retno Soedjono dan Dr. Drh. Ita Djuwita, M.Phil atas segala bantuan sarana dan pengetahuan teknis serta pengujian kultur sel yang sangat penting bagi penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2004. Statistik Perikanan Tangkap 2002. Direktorat Jenderal Perikanan. Jakarta.
- Becker WM, Kleinsmith LJ, Hardin J. 2000. The World of The Cell. The Benjamin/Cummings Publ. San Fransisco.
- Bergmeyer HV, Grassi. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*. VI II. Verleg Chemi. Weinheim.

- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buamah PK, Sidlen W.** 1985. Concentrations of protease and anti-protease in serum of patient with pancreatic cancer. *Clin Chem.* 31:876-877
- Chasanah E.** 2004. Characterization of thermophilic *Bacillus licheniformis* MB2 chitosanase isolated from Manado hot spring water [disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Curroto E, Aros F.** 1993. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Anal Biochem.* 211: 240-241.
- Damayanti E.** 2002. Karakteristik bekatul padi (*Oryza sativa*) awet serta aktivitas antioksidan dan penghambatan proliferasi sel kanker secara *in vitro* dari minyak dan fraksinya [disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- DeFea K.** 2001. Trypsin-like proteases as metastatic agents in breast cancer. (<http://www.ebi.ac.uk/interpro.htm>). [29 Januari 2005].
- Dodane V, Vilivalam VD.** 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. *PSTT.* 1:246-253
- Dowall MJ.** 2003. Trypsin and chymotrypsin. (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm>). [29 Januari 2005].
- Elliot R, Ong TJ.** 2002. Science, medicine, and the future. Nutritional genomics. *BMJ.* 324:1438-1442
- Fukamizo T, Brzenzinski R.** 1997. Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 : A comparative review of its Structure and function. *Biochem. Cell. Biol.* 75 : 687-696.
- Goosen MFA.** 1997. Applications of Chitin and Chitosan. Technomic. USA
- Jeon YJ, Kim SK,** 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Pol.* 41:133-141.
- Kim R, Inoue H, Tanabe K, Toge T.** 2001. Effect of inhibitors of cysteine and serine proteases in anticancer drug-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Int J Oncol.* 18:1227-32.
- Kolodziejska I, Wojtasz PA, Ogonowska G, Sikorski ZE.** 2000. Deacetylation of chitin in two-stage chemical and enzymatic process. *Bulletin of The Sea Fisheries Institute.* 2:15-24.
- Kubota T.** 2003. Cancer chemotherapy chemosensitivity testing is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stages III/IV gastric cancers without peritoneal dissemination. *Anticancer Res.* 23:583-587.
- Liang VW, Butrum RR, Wong DA.** 2003. Diet, nutrition, and cancer Prevention: The postgenomic era. *J Nutr.* 133:3830S-3836S.
- Meidina.** 2005. Aktivitas anti bakteri oligomer kitosan hasil degradasi oleh kitosanase *Bacillus licheniformis* MB-2. [tesis]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Oberst MD, Johnson MD, Dickson RB, Lin CY, Singh B, Stewart M, Williams A, al-Nafussi A, Smyth JF, Gabra H, Sellar GC.** 2002. Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 8 :1101-1107.
- Pae HO.** 2001. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leukimia Res.* 25:339-346.
- Purnamawati D** 1997. Pemanfaatan kitosan udang windu (*Penaeus monodon*) dalam minuman kaya serat makanan. [skripsi] Institut Pertanian Bogor.
- Rhoades J, Roller S.** 2000. Antimicrobial action of degraded and native chitosan against spoilage organism in laboratory media and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:80-86.
- Rochima E.** 2005. Aplikasi kitin deasetilase termostabil dari *Bacillus papandayan* K29-14. Asal kawah Kamojang Jawa Barat pada pembuatan kitosan. [tesis]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sanford PT.** 2003. World market of chitin and its derivatives. Di dalam: Varum KM, Domard A and Smidsrod O, Editors. *Advanced in Chitin Science.* Vol VI. Trondheim, Norway.
- Semenuk T, Krist P, Pavlicek J, Bezouska K, Kuzma M, Novak P, Kren V.** 2001. Syntesis of chitooligomer-based glycoconjugates and their binding to the rat Natural Killer cell activation receptor NKR-P1. *Glycoconj.* 18:817-26.
- Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ.** 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Tends in Food Sci. and Technol.* 10:37- 51.
- Shen FH ,** 2002. Elucidate the possible roles of chitosan in anti-tumorigenesis and its related pathways [tesis]. [29 Juni 2005].

- Suzuki S. 1996.** Studies of biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharide of chitin and chitosan. *Fragrance*. 15 : 61.68
- Uchida Y, Ohtakara A. 1998.** Chitosanase from *Bacillus* Species. *Method in enzymology*. 161:501-506.
- Wan XS. 1999.** Relationship between protease activity and neu oncogene expression in patients with oral leukoplakia treated with the Bowman Birk Inhibitor. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 8:601-608.
- Wispriyono B, Schmelz EM, Pelayo H, Hanada K, Separovic D. 2002.** A role for de novo sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. *Experiment. Cell Res*. 279:153-165.
- Yeon JC, Kim EJ, Piao Z, Yun YC, Shin YC. 2004.** Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and Its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. and Environ. Microbiol*. 70:4522-4531
- Yoon HG, Kim HY, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Cho HY. 2001.** Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4 : its purification, characterization, and reaction pattern. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 65:802-809.