

Hubungan struktur dan aktivitas sitotoksik turunan kurkumin terhadap sel Myeloma

Structure and cytotoxic activity relationship of curcumin derivatives on Myeloma cells

Supardjan, AM¹⁾ dan Muhammad Da'i²⁾

¹⁾ Universitas Gadjah Mada

²⁾ Universitas Muhammadiyah Surakarta

Abstrak

Kurkumin merupakan senyawa dengan aktivitas biologis berspektrum luas antara lain sebagai antikanker. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan hubungan antara struktur dengan aktivitas sitotoksik kurkumin dan turunannya terhadap sel Myeloma. Turunan alkil kurkumin telah disintesis dan diuji aktivitasnya terhadap sel Myeloma dengan metode *direct counting* menggunakan *tryphan blue*. Nilai IC₅₀ kurkumin, 4-metil, 4-etil, 4-propil, 4-isopropil, 4-benzil, 4-fenil dan 4-parametilfenil kurkumin, berturut-turut adalah 8,78; 3,45; 2,93; 2,18; 4,20; 3,87; >100; >100 µM. Aktivitas turunan kurkumin diduga berkaitan dengan stabilisasi struktur β diketo dan sebaran muatan parsial positif turunan kurkumin.

Kata kunci: Kurkumin, sel myeloma, turunan kurkumin

Abstract

Curcumin is a compound having broad spectrum of biological activities for example as anti-cancer. The aim of this research is to evaluate the relationship of structure and the cytotoxicity effect of curcumin and its derivatives on myeloma cell line. Some alkyl curcumin derivatives have been synthesized and evaluated for the activity on myeloma cell lines with direct counting method. The IC₅₀ values for curcumin, 4-methyl, 4-ethyl, 4-propyl, 4-isopropyl, 4-benzyl, 4-phenyl dan 4-paramethylphenyl curcumin are 8.78, 3.45, 2.93, 2.18, 4.20, 3.87, >100, >100 µM respectively. Its seem that the activity of the curcumin derivatives is corelated to the stabilization of β diketone moiety and positive partial charge of those compound.

Key words: Curcumin, myeloma cells, Curcumin derivatives

Pendahuluan

Kurkumin (1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion, merupakan senyawa hasil isolasi dari tanaman *Curcuma sp* dan telah berhasil dikembangkan sintesisnya oleh Pabon (1964). Kurkumin telah diketahui memiliki aktivitas biologis dengan spektrum yang luas. Aktivitas antioksidan ditentukan oleh gugus hidroksi aromatik terminal, gugus β diketon dan ikatan rangkap telah dibuktikan berperan pada aktivitas antikanker dan anti-mutagenik kurkumin (Majeed *et al.*, 1995). Kurkumin memiliki aktivitas penghambat siklooksigenase (COX) sebesar 79% (van der

Goot, 1997), dan diduga bersifat COX-2 selektif, berdasarkan sifat tidak toksik pada gastrointestinal meskipun pada dosis tinggi (Kawamori, *et al.*, 1999). Aktivitas penghambat COX-2 memungkinkan pengembangan kurkumin sebagai zat antikanker yang bersifat anti-proliferaif dan memacu apoptosis (Meiyanto, 1999).

Kurkumin telah dibuktikan memiliki kemampuan memacu apoptosis dan menekan proliferasi pada sel Myeloma melalui penekanan ekspresi NF-κB, yang merupakan faktor transkripsi Bcl-2 dan Bcl-xL yang bersifat antiapoptosis. Kurkumin memacu apoptosis

pada sel Myeloma melalui jalur aktivasi *caspase* 7 dan 9. NF- κ B juga merupakan faktor transkripsi cyclin D1, sehingga dengan penekanan level ekspresi NF- κ B dapat menghambat pertumbuhan dan memacu apoptosis sel Myeloma (Bharti, *et al.*, 2003).

Substitusi kurkumin pada karbon no 4 dengan substituen pendorong elektron (gugus alkil) dan substituen penarik elektron (gugus fenil dan fenil tersubstitusi), mempengaruhi stabilitas tautomer kurkumin. Substituen pendorong elektron meningkatkan stabilitas tautomer β diketo, sedangkan substituen penarik elektron meningkatkan stabilitas keto enol kurkumin (Istyastono *et al.*, 2003). Hal ini dimungkinkan berpengaruh terhadap aktivitas kurkumin dikaitkan dengan keberadaan ikatan rangkap dan gugus karbonil kurkumin, yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antikanker kurkumin (Majeed *et al.*, 1995). Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh stabilitas tautomer β diketo dan keto enol kurkumin terhadap aktivitas sitotoksik kurkumin dan turunannya.

Metodologi

Bahan

Kurkumin dan turunan kurkumin disintesis dengan menggunakan metoda Pabon (1964). Turunan kurkumin disintesis menggunakan 2,4 pentanadion tersubstitusi pada C-3 (Supardjan, 1999). Sel myeloma ditumbuhkan dalam medium RPMI 1640 (GIBCO BRL) yang ditambahkan natrium karbonat (E. Merck) dan hepes (Sigma Chem. CO.). Medium mengandung *growth factor* 10% dan 20% *Fetal Bovine Serum*/FBS (Sigma Chem. CO.).

Alat

Mikroskop fase kontras (Olympus), laminar Air flow (Nuair), inkubator CO₂ (Nuair™ IR *autoflow*)

Jalannya Penelitian

Sel Myeloma diambil dari tangki nitrogen dan dibiakkan dengan menggunakan medium penumbuh mengandung FBS 20%. Setelah sel tumbuh baik, dipelihara dengan medium penumbuh mengandung FBS 10% dipelihara dalam CO₂ *Jaceted Inkubator*. Setelah sel mencukupi sel dipanen untuk uji. Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan mikroplate 96 sumuran (Nunclon), dengan jumlah sel 2×10^4 sel persumuran dengan perlakuan sampel kurkumin dan

turunannya yang telah disterilisasi. Sel ditumbuhkan dalam media kultur RPMI 1640 mengandung FBS 10% dengan pH 7,2. Seri konsentrasi perlakuan sampel 125,00; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95 dan 0,98 μ M diambil dari stok larutan sampel dalam DMSO dengan kadar 50.000 μ M, semua pengerjaan dilakukan secara aseptis di laminar *air flow*. Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam suhu 37°C. Pengamatan sel hidup dan mati menggunakan pewarna *tryphan blue*. Sel hidup berwarna terang, sel mati berwarna gelap karena menyerap *tryphan blue* (Snell and Mullock, 1987) Pengamatan dilakukan dengan mikroskop fase kontras.

Analisis data

Potensi aktivitas sitotoksik ditentukan dengan nilai IC₅₀ melalui analisis probit. Angka probit merupakan konversi % sel hidup.

$$\% \text{ sel hidup} = (A-B)/A \times 100\%$$

A: Jumlah sel hidup pada kontrol

B: Jumlah sel hidup pada perlakuan sampel

Hasil dan Pembahasan

Uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan sel digunakan untuk mendeteksi potensi antineoplastik dari suatu senyawa (Freshney, 1986). Semakin kecil nilai IC₅₀, menunjukkan potensi senyawa tersebut semakin kuat. Hasil pengamatan prosentase kematian sel Myeloma (Tabel I), menunjukkan adanya korelasi antara jumlah sel yang mati dengan kenaikan kadar sampel kecuali pada senyawa fenil kurkumin dan *para* metilfenil kurkumin. Konversi prosentase nilai kematian menjadi nilai probit diperoleh nilai IC₅₀ (Tabel II).

Hubungan kualitatif struktur dan aktivitas sitotoksik senyawa uji menunjukkan adanya pengaruh sifat sterik, lipofilitas dan pendorong elektron substituen terhadap aktivitasnya (Tabel II). Hasil uji menunjukkan aktivitas turunan kurkumin dengan substituen bersifat pendorong elektron (I+) memiliki aktivitas lebih baik dibanding kurkumin dengan substituen bersifat menarik elektron (I-). Gugus dengan sifat pendorong elektron semakin besar (dari metil sampai propil) menunjukkan aktivitas semakin besar pula. Meningkatnya hambatan sterik terbukti menurunkan aktivitas turunan kurkumin (isopropil dan benzil). Gugus dengan sifat penarik elektron terbukti menurunkan aktivitas kurkumin.

Tabel I. Prosentase kematian sel Myeloma pengaruh perlakuan senyawa uji (hasil merupakan rata-rata 3 kali pengamatan).

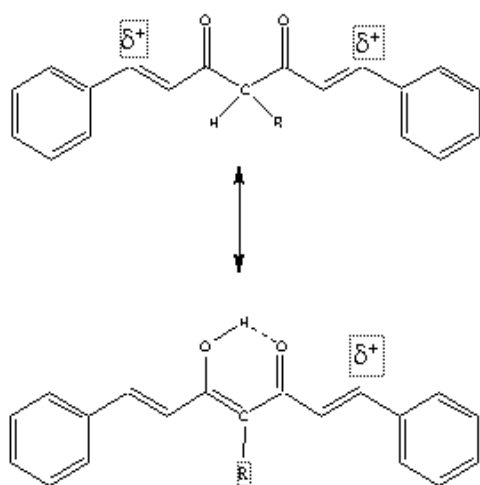
C μM	Log C	% Kematian setelah pemberian Senyawa							
		1	2	3	4	5	6	7	8
125,00	2,097	64,20	90,52	92,42	90,52	90,52	79,15	26,71	19,75
62,50	1,796	61,45	88,63	89,89	80,41	89,26	70,93	23,54	26,07
31,25	1,485	62,09	83,88	88,00	72,83	77,88	60,19	21,01	21,01
15,63	1,194	55,45	58,29	79,14	69,67	58,93	55,78	22,91	19,12
7,61	0,893	52,61	59,59	64,62	57,03	53,55	50,08	18,45	15,95
3,91	0,592	48,82	58,29	44,39	55,77	47,87	54,50	15,95	15,95
1,95	0,291	38,70	43,88	41,87	54,50	38,39	48,82	17,22	15,34
0,98	-0,011	29,86	30,50	37,44	43,13	35,64	39,97	10,90	12,16

Keterangan: 1 (kurkumin); 2 (4-metilkurkumin); 3 (4-etilkurkumin); 4 (4-propilkurkumin), 5 (4-isopropilkurkumin); 6 (4-benzilkurkumin), 7 (4-fenilkurkumin), 8 (4-parametilfenilkurkumin)

Tabel II. Nilai IC_{50} hasil uji sitotoksitas kurkumin dan turunannya terhadap sel Myeloma

Derivat kurkumin	Nilai IC_{50} (μM)	Sifat Substituen		
		S	P	I
Kurkumin	8,78	0	0	0
4-metilkurkumin	3,45	+	+	+
4-etilkurkumin	2,93	++	++	++
4-propilkurkumin	2,18	+++	+++	+++
4-isopropilkurkumin	4,20	++++	++++	++++
4-benzilkurkumin	3,87	+++++	+++++	+/-
4-fenilkurkin	>100	+++++	+++++	-
4-para metilfenilkurkumin	>100	+++++	+++++	-

Keterangan: S (sterik), P (lipofilitas), I (induksi elektron), +/- (peningkatan / berkurangnya nilai, relatif terhadap atom H dari kurkumin pada C-4, H dianggap 0),



Gambar 1. Struktur tautomeri keto enol dan sebaran muatan parsial positif kurkumin dan turunan kurkumin.

Keterangan: R (Substituen gugus metil, etil, propil, isopropil, fenil dan parametil fenil)

Substituen pendorong dan penarik elektron berpengaruh pada stabilisasi tautomeri keto-enol kurkumin dan turunannya (Supardjan, 1999; Istiyastono *et al.*, 2003). Gugus dengan sifat pendorong elektron cenderung menstabilkan tautomer keto, sedangkan gugus penarik elektron cenderung menstabilkan tautomer bentuk enol. Bentuk tautomeri tersebut berpengaruh terhadap sebaran muatan positif struktur kurkumin dan turunannya (Gambar 1). Semakin bertambah sebaran muatan positif, menunjukkan aktivitas yang semakin meningkat. Stabilisasi struktur keto bertanggung jawab terhadap peningkatan aktivitas turunan kurkumin.

Gugus α,β tak jenuh diketon kurkumin merupakan gugus yang bertanggung jawab terhadap penekanan aktivitas *nuclear factor* κB NF- κB (Moos *et al.*, 2004). NF- κB merupakan faktor transkripsi yang diperlukan untuk ekspresi gen-gen yang terlibat pada proses

proliferasi, invasi sel, metastasis, angiogenesis dan dapat pula menekan proses apoptosis pada berbagai sel tumor (Aggarwal *et al.*, 2003). Kurkumin terbukti menurunkan ekspresi protein yang ditranskrip oleh NF- κ B antara lain Bcl2, Bcl-xL (antiapoptosis) dan Cyclin D1 sehingga menghambat proliferasi sel kanker dan memacu terjadinya apoptosis (Bharti *et al.*, 2003). Kemampuan kurkumin menghambat NF- κ B dan I κ B α telah dibuktikan pula oleh Singh dan Aggarawal (1995), Brennan dan O'Neill (1998). (Moos *et al.*, 2004) juga menyatakan bahwa sifat elektrofil gugus suatu senyawa bertanggung jawab terhadap aktivitas perusakan konformasi p53 sehingga dapat menghambat apoptosis dan *cell cycle arrest*. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut peran stabilisasi gugus

α,β tak jenuh kurkumin yang meningkatkan sifat elektrofil kurkumin (Gambar 1) terhadap aktivitas antikanker protein.

Kesimpulan

Gugus pendorong elektron pada C-4 kurkumin menaikkan aktivitas turunan kurkumin melalui stabilisasi struktur β diketo dan sebaran muatan parsial positif struktur turunan kurkumin.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada: Eva Kotijah, Muhammad Sururudin, Dwi Haryani dan Irma yang membantu terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Aggarawal, BB., Kumar, A. Aggarawal, MS., and Shishodia, S., 2003, Curcumin derived from Turmeric (*Curcuma longa*): A Spice for All Seasons, *Phytochemical in cancer chemoprevention*, **8**(28), 1-9
- Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., and Aggarawal, B.B., 2003, Curcumin (diferloymethane) down-regulates the constitutive action of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis, *Blood*, **101**(3), 1053-1062.
- Brennan, P. and O'Neill, Luke A.J., 1998, Inhibition of Nuclear Factor B by Direct Modification in Whole Cells—Mechanism of Action of Nordihydroguaiaritic Acid, Curcumin and Thiol Modifiers, **55**(7), 965-973
- Freshney, R.I., 1986, *Culture of Animal cell a Practical Approach*, 2nd ed., 71-73, IRL Press Ltd., Oxford.
- Istiyastono, E.P., Supardjan, A.M., dan Pramono, H.D., 2003, Tautomeri Keto-Enol Kurkumin dan Beberapa Turunan Kurkumin Tersubstitusi Pada C-4, Suatu Kajian Pendekatan Kimia Komputasi, *Majalah Farmasi Indonesia* **14**(3):107-133
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Kakey, R.B., Rao, C.V., and Reddy, B.S., 1999, Chemopreventive Effect of Curcumin, a Naturally Occuring Anti-Inflammatory Prevent, during the Promotion/Progression Stages of Colon Cancer, *CancerRes.*, **59**, 567-601.
- Majeed, M., Badmaev, V., Shirakumar U., and Rajendran, R., 1995, *Curcuminoids antioxidant phytonutrients*, 3-80, NutriScience Publisher Inc., Piscataway, New Jersey.
- Meiyanto, E., 1999, Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya, *Majalah Farmasi Indonesia*, **10**(4), 224-236.
- Moos, P.J., Edes, K., Mullally, J.E., and Fitzpatrick, FA., 2004, Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells, *Carcinogenesis*, **25**(9), 1611-1617
- Pabon, H.J.J., 1964, A Synthesis of curcumin and related compounds, *Recl. Trav. Chem.*, **23**, 379-386.
- Supardjan, A.M., 1999, Synthesis And Anti-Inflammatory Activity of Some 4-Substituted Curcumin Derivatives, *Disertation*, Gadjah Mada University
- Snell, K., and Mullock, B., 1987, *Biochemical Toxicology a Practical Approach*, IRL Press Oxford, 57-59

Supardjan, AM.

- van der Goot H, 1997, The chemistry and qualitative structure-activity relationships of curcumin, *in Recent Development in Curcumin Pharmacology*, Proceedings of The International Symposium on Curcumin Pharmacology (ISCP), August 29-31, 1995, edited by Suwijyo Pramono, Aditya Media, Yogyakarta Indonesia.
- Singh, S. and Aggarwal, BB., 1995, Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Bio. Chem.*, **270**, 24995-25000