



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS ESTRADIOL-17 β -HEMISUKSINAT BERTANDA ¹²⁵I
DAN STUDI IKATANNYA TERHADAP RESEPTOR
ESTROGEN MENGGUNAKAN METODE
*SCINTILLATION PROXIMITY ASSAY***

TESIS

**YULIANTI SUSILO
1006787155**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS ESTRADIOL-17 β -HEMISUKSINAT BERTANDA ¹²⁵I
DAN STUDI IKATANNYA TERHADAP RESEPTOR
ESTROGEN MENGGUNAKAN METODE
*SCINTILLATION PROXIMITY ASSAY***

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Farmasi**

**YULIANTI SUSILO
1006787155**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012**

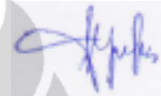
ii

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 16 Juli 2012



(Yulianti Susilo)

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Nama : Yulianti Susilo

NPM : 1006787155

Tanda Tangan :



Tanggal : 16 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Yulianti Susilo
NPM : 1006787155
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Sintesis Estradiol-17 β -hemisuksinat Bertanda ¹²⁵I dan Studi Ikatannya Terhadap Reseptor Estrogen Menggunakan Metode *Scintillation Proximity Assay*

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Arry Yanuar, M.Si, Apt (.....)

Pembimbing II : Prof. Dr. Leonardus Broto S. Kardono (.....)

Penguji I : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt (.....)

Penguji II : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt (.....)

Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 16 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT, karena hanya dengan limpah rahmat dan ridhoNya penulis menyelesaikan Tesis ini dengan judul “Sintesis Estradiol-17 β -Hemisuksinat Bertanda ¹²⁵I dan Studi Ikatannya terhadap Reseptor Estrogen menggunakan Metode *Scintillation Proximity Assay*”. Pembuatan tesis ini sebagai salah satu syarat akademik untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Tesis ini dilaksanakan di Bidang Radiofarmaka, Badan Tenaga Nuklir Nasional, Serpong pada Bulan September 2011 sampai dengan Juni 2012.

Pada kesempatan berbahagia ini, dengan segala kerendahan hati penulis ingin mengucapkan terima kasih atas bimbingan, saran, kritik, nasehat serta dukungan kepada :

1. Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si, Apt dan Bapak Prof. Dr. Leonardus Broto Sugeng Kardono selaku pembimbing yang dengan ketulusan hati selalu memberi bimbingan dan dukungan dalam pelaksanaan dan pembuatan Tesis ini.
2. Ibu Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt dan Bapak Dr. Arry Yanuar, M.Si, Apt, selaku pembimbing akademik selama masa perkuliahan.
3. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt sebagai Ketua Departemen Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia.
4. Seluruh Dosen Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia selama perkuliahan.
5. Bapak Dr. Abdul Mutalib, selaku Kepala Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR – BATAN).
6. Ibu Dra. Siti Darwati, MSc, selaku Kepala Bidang Radiofarmaka, PRR – BATAN.
7. Bapak Drs. Agus Ariyanto, selaku Kepala Kelompok Radioassay, PRR – BATAN.
8. Kementerian Negara Riset dan Teknologi yang telah memberikan beasiswa selama masa studi.

9. Keluargaku tercinta, orang tua, suami yang selalu memberi dukungan dan doa yang tiada henti serta anak-anakku yang manis yang selalu menjadi penyemangat penulis.
10. Seluruh staf Bidang Radiofarmaka yang turut berpartisipasi sehingga terlaksananya penulisan tesis.
11. Bapak/Ibu laboran dan karyawan Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia atas semua bantuan yang diberikan.
12. Serta semua pihak yang turut membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap Laporan Tesis ini dapat bermanfaat untuk pengembangan di Bidang pengobatan pada masa yang akan datang. Kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan penulis demi peningkatan kualitas tesis ini.

Depok, Juli 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yulianti Susilo
NPM : 1006787155
Program Studi : S2 Ilmu Kefarmasian
Departemen : Farmasi
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Sintesis Estradiol-17 β -Hemisuksinat Bertanda ¹²⁵I dan Studi Ikatannya terhadap Reseptor Estrogen menggunakan Metode *Scintillation Proximity Assay*.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 16 Juli 2012
Yang menyatakan



(Yulianti Susilo)

ABSTRAK

Nama : Yulianti Susilo
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Sintesis Estradiol-17 β -Hemisuksinat Bertanda ^{125}I dan Studi Ikatannya Terhadap Reseptor Estrogen Menggunakan Metode *Scintillation Proximity Assay*

Telah dilakukan penelitian untuk mendapatkan ligan yang selektif dan berikatan kuat dengan reseptor estrogen melalui pengujian afinitas ikatan senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat. Untuk meningkatkan status senyawa tersebut menjadi kandidat senyawa aktif obat kanker payudara perlu diketahui selektifitasnya terhadap reseptor estrogen dengan metode *Scintillation Proximity Assay* (SPA). Reagen primer yang diperlukan dalam metode SPA adalah radioligan dan reseptor, dan dilakukan penandaan estradiol-17 β -hemisuksinat dengan ^{125}I sebagai radioligan. Studi ikatan radioligan dilakukan terhadap reseptor estrogen menggunakan sel MCF7. Penandaan dilakukan secara tidak langsung dengan dua tahap. Pertama dilakukan aktivasi estradiol-17 β -hemisuksinat menggunakan isobutilkloroformat dan tributilamin sebagai katalis, dan penandaan histamin dengan ^{125}I menggunakan metode kloramin-T. Tahap kedua adalah konjugasi histamin bertanda ^{125}I dengan estradiol-17 β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi. Estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda ^{125}I dilakukan ekstraksi menggunakan toluen dan fase organik dimurnikan dengan sistem KLT. Rendemen pemurnian yang diperoleh sebesar 79,8% untuk ekstraksi pelarut dan 84,4% untuk sistem KLT dengan kemurnian radiokimia 97,8%. Penentuan afinitas ikatan dilakukan dengan metode SPA menggunakan sel MCF7 yang mengekspresikan reseptor estrogen, dan diperoleh Kd sebesar $7,192 \times 10^{-3}$ nM dan ikatan maksimum sebesar 336,1 nM. Afinitas ikatan estradiol-17 β -hemisuksinat yang diperoleh tinggi, ditunjukkan dengan nilai Kd yang rendah.

Kata kunci : MCF7, reseptor estrogen , SPA

xv + 74; 17 gambar; 3 tabel

Bibliografi : 27 (1971 – 2010)

ABSTRACT

Name : Yulianti Susilo
Program Study : Master of Pharmaceuticals Science
Title : Synthesis of ^{125}I Labelled Steroids Compounds and its binding affinity study to estrogen receptors using scintillation Proximity Assay (SPA) method

Research was carried out to get drugs that selective ligand and strongly bind estrogen receptors to determine the binding affinity to estradiol-17 β -hemisuccinate. To improve the status of these compounds as a candidate for breast cancer active compound, selectivity of these compounds for estrogen receptor was studied using Scintillation Proximity Assay (SPA) method. Primary reagents required in the SPA method was radioligand and receptors, then performed with ^{125}I labeling of estradiol-17 β -hemisuccinate as a radioligand. Radioligand binding studies were performed on MCF7 cell for estrogen receptor. The labeling process was performed by indirect method via two-stage reaction. First activation of estradiol-17 β -hemisuccinate using isobutylchloroformate and tributylamine as a catalyst, and labeling of histamine was carried out by ^{125}I using Chloramin-T method. The second stage was conjugation of activated estradiol-17 β -hemisuccinate with ^{125}I -histamine. The estradiol-17 β -hemisuccinate labeled with ^{125}I was extracted using toluene and organic phase was purified by TLC system. The obtained purification yield for the extraction solvent was 79.8% and for the TLC system was 84.4% with a radiochemical purity was 97.8%. Determination of binding affinity by the SPA method using MCF7 cell lines which express estrogen receptors, were K_d of 7.192×10^{-3} nM and maximum binding of 336.1 nM. Having obtained binding affinity of estradiol-17 β -hemisuccinate was obtained high, indicated by a low K_d values.

Key words : Estrogen receptor, MCF7, SPA

xv + 74; 17 picture; 3 table

Bibliography : 27 (1971 – 2010)

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| HALAMAN SAMPUL | i |
| HALAMAN JUDUL | ii |
| SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | iv |
| HALAMAN PENGESAHAN | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | viii |
| ABSTRAK | ix |
| ABSTRACT | x |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4. Ruang Lingkup Penelitian | 3 |
| 1.5. Manfaat Penelitian | 4 |
| 1.6. Hipotesis | 4 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1. Reseptor estrogen | 5 |
| 2.2. <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (MCF7) | 7 |
| 2.3. <i>Scintillation Proximity Assay</i> (SPA) | 7 |
| 2.4. Parameter Ikatan | 9 |
| 2.5. Radioisotop ¹²⁵ I | 10 |
| BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN | 13 |
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian | 13 |
| 3.2. Bahan dan Alat yang Digunakan | 13 |
| 3.2.1. Bahan | 13 |
| 3.2.2. Alat | 14 |
| 3.3. Metode Penelitian | 14 |
| 3.3.1. Penandaan dengan Cara “Dingin” | 14 |
| 3.3.1.1. Aktivasi Estradiol-17β-Hemisuksinat | 14 |
| 3.3.1.2. Penandaan Histamin dengan Natrium Iodida (NaI) | 15 |
| 3.3.1.3. Konjugasi Estradiol-17β-Hemisuksinat yang Sudah Diaktivasi dengan Histamin Bertanda Iodida (I) | 15 |
| 3.3.1.4. Pemurnian I-Estradiol-17β-Hemisuksinat- | |

| | | |
|---------------------------|--|-----------|
| | iodohistamin | 15 |
| 3.3.2. | Penandaan dengan Cara “Panas” | 16 |
| 3.3.2.1. | Aktivasi Estradiol-17 β -Hemisuksinat | 16 |
| 3.3.2.2. | Penandaan Histamin dengan ¹²⁵ I | 16 |
| 3.3.2.3. | Konjugasi Estradiol-17 β -Hemisuksinat yang Sudah Diaktivasi dengan Histamin bertanda ¹²⁵ I | 16 |
| 3.3.2.4. | Pemurnian ¹²⁵ I-Estradiol-17 β Hemisuksinat iodohistamin | 17 |
| 3.3.3. | Preparasi Sel MCF7 | 17 |
| 3.3.3.1. | <i>Thawing</i> Sel MCF7 | 17 |
| 3.3.3.2. | Kultur Sel MCF7 | 18 |
| 3.3.4. | Protokol Pengujian ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada Sel MCF7 dengan Metode SPA ... | 18 |
| 3.3.4.1. | Pemilihan Jenis dan Konsentrasi Bead SPA yang akan digunakan dalam Penentuan Afinitas Ikatan | 18 |
| 3.3.4.2. | Pengujian Afinitas Ikatan ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada Sel MCF7 dengan Metode SPA | 19 |
| BAB 4. | HASIL DAN PEMBAHASAN | 21 |
| 4.1. | Sintesis Estradiol-17 β -hemisuksinat dengan Cara “Dingin” ... | 21 |
| 4.2. | Sintesis Estradiol-17 β -hemisuksinat dengan Cara “Panas” | 26 |
| 4.3. | Studi Ikatan Senyawa Estradiol-17 β -hemisuksinat Bertanda ¹²⁵ I dengan Metode SPA | 33 |
| BAB 5. | KESIMPULAN DAN SARAN | 40 |
| 5.1. | Kesimpulan | 40 |
| 5.2. | Saran | 40 |
| DAFTAR ACUAN | | 41 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|--------------|---|----|
| Gambar 1.1. | Struktur molekul senyawa Estradiol-17 β -hemisuksinat | 2 |
| Gambar 2.1. | Skema aktivasi reseptor estrogen oleh estrogen sampai menghasilkan efek | 6 |
| Gambar 2.2. | Sel MCF7 | 7 |
| Gambar 2.3. | Konsep SPA | 8 |
| Gambar 2.4. | Kurva Rosenthal Plot | 9 |
| Gambar 2.5. | Skema reaksi aktivasi Estradiol-17 β -hemisuksinat | 11 |
| Gambar 2.6. | Skema reaksi penandaan histamin dengan ¹²⁵ I | 11 |
| Gambar 2.7. | Skema Reaksi Konjugasi Histamin bertanda ¹²⁵ I dengan Estradiol -17 β -hemisuksinat yang sudah Diaktivasi | 12 |
| Gambar 4.1. | Spektrum estradiol | 21 |
| Gambar 4.2. | Spektrum Estradiol-17 β -hemisuksinat | 22 |
| Gambar 4.3. | Spektrum histamin | 22 |
| Gambar 4.4. | Spektrum histamin-I | 23 |
| Gambar 4.5. | Spektrum ¹²⁵ I-Estradiol-17 β -Hemisuksinat-iodoHistamin | 24 |
| Gambar 4.6. | Radiokromatogram Na- ¹²⁵ I | 26 |
| Gambar 4.7. | Radiokromatogram ¹²⁵ I-Histamin | 27 |
| Gambar 4.8. | Radiokromatogram ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin sebelum pemurnian | 28 |
| Gambar 4.9. | Radiokromatogram kemurnian radiokimia Na- ¹²⁵ I dan ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin setelah pemurnian dengan pelat KLT kaca | 30 |
| Gambar 4.10. | Radiokromatogram kemurnian radiokimia Na- ¹²⁵ I dan ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin setelah pemurnian dengan pelat KLT kaca | 31 |
| Gambar 4.11. | Radiokromatogram kemurnian radiokimia ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin | 32 |
| Gambar 4.12. | Gambar sel MCF7 hasil <i>thawing</i> dan gambar sel MCF7 yang sudah menempel pada dinding flask | 33 |
| Gambar 4.13. | Gambar sel MCF7 hasil pasase dan siap digunakan untuk <i>assay</i> SPA | 33 |
| Gambar 4.14. | Optimasi jenis dan jumlah SPA <i>bead</i> | 34 |
| Gambar 4.15. | Kurva Rosenthal plot | 35 |
| Gambar 4.16. | Interaksi ligan estradiol dengan residu asam amino hasil <i>docking</i> | 37 |
| Gambar 4.17. | Interaksi ligan estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dengan residu asam amino hasil <i>docking</i> | 38 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabel 2.1 | Sifat-sifat fisika beberapa radioisotop | 10 |
| Tabel 3.1 | Tabel protokol pengujian afinitas ikatan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada sel MCF7 dengan metode SPA | 20 |
| Tabel 4.1 | Data cacahan pemurnian dengan ekstraksi..... | 28 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|--------------|---|----|
| Lampiran 1. | Skema kerja | 44 |
| Lampiran 2. | Pembuatan larutan dapar. | 46 |
| Lampiran 3. | Gambar proses sintesis Estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda cara “dingin” | 48 |
| Lampiran 4. | Karakterisasi hasil sintesis estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda cara “panas” dengan elektroforesis | 49 |
| Lampiran 5. | Alat pencacah yang digunakan untuk mencacah hasil sintesis cara “panas” | 50 |
| Lampiran 6. | Pengujian afinitas ikatan ¹²⁵ I-estradiol-17 β -hemisuksinat iodohistamin | 51 |
| Lampiran 7. | Gambar spektrum IR estradiol | 52 |
| Lampiran 8. | Gambar spektrum IR histamin | 53 |
| Lampiran 9. | Gambar Spektrum IR I-Estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin (sampel cair) | 54 |
| Lampiran 10. | Karakterisasi hasil sintesis cara “dingin” dengan H-NMR ... | 55 |
| Lampiran 11. | Karakterisasi hasil sintesis cara “dingin” dengan mass spektrofotometer | 63 |
| Lampiran 12. | Contoh perhitungan rendemen penandaan dan konsentrasi perunut (¹²⁵ I-Estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin) | 66 |
| Lampiran 13. | Data cacahan dan konsentrasi hasil pengujian SPA..... | 69 |
| Lampiran 14. | Hasil perhitungan ligan bertanda ¹²⁵ I setelah dihitung dengan program konversi..... | 70 |
| Lampiran 15. | Tampilan situs Protein Data Bank (PDB) | 71 |
| Lampiran 16. | Tampilan data file dlq hasil <i>docking</i> estradiol..... | 72 |
| Lampiran 17. | Tampilan data file dlq hasil <i>docking</i> ¹²⁵ Iestradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin | 73 |
| Lampiran 18. | Tampilan hasil <i>docking</i> ¹²⁵ Iestradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin | 74 |

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Reseptor estrogen merupakan salah satu reseptor intraseluler (*nuclear receptor*) yang memperantarai aksi hormon 17β -estradiol (estrogen) di dalam tubuh. Estrogen, ketika berikatan dengan reseptornya, bekerja meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel sistem reproduksi baik pada wanita dan pria. Estrogen juga dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL, sehingga berpotensi mengurangi risiko penyakit kardiovaskular. Estrogen juga berperan penting pada perkembangan otak, penyakit autoimun, dan metabolisme tulang. Hal yang juga penting dari estrogen adalah dapat memicu pertumbuhan, proliferasi dan metastase berbagai tipe kanker (payudara, ovarium, kolorektal, prostat, dan endometrial).

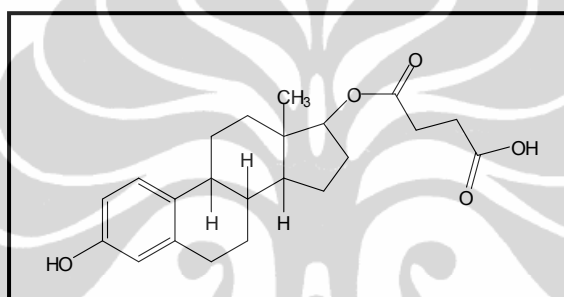
Kanker payudara merupakan keadaan malignansi dari sel-sel yang terdapat pada payudara. Kanker payudara merupakan salah satu penyebab kematian pada wanita dan lebih dari satu juta kasus ditemukan pertahunnya di berbagai belahan dunia. Mekanisme kanker payudara secara molekuler dimulai dengan adanya mutasi pada gen normal. Mutasi yang terjadi biasanya adalah mutasi titik yang antara lain dapat mengakibatkan *rearrangement* atau *delesi* (Brothers, et al, 2000).

Jika suatu reseptor estrogen (ER) berikatan dengan ligan, maka akan terjadi perubahan konformasi reseptor yang memungkinkan berikatan dengan koaktivator. Kompleks estrogen-reseptornya kemudian akan berikatan dengan estrogen reseptor element (ERE) yang terletak di dekat gen yang akan dikendalikan transkripsinya. Setelah berikatan dengan ERE, kompleks tersebut akan berikatan dengan suatu protein koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Aktivasi transkripsi gen tadi akan menghasilkan mRNA yang mengarahkan pada sintesis protein tertentu, yang kemudian mempengaruhi fungsi sel, tergantung sel targetnya (Zullies, 2006).

Obat yang dalam hal ini bertindak sebagai ligan akan mengikat reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen untuk berikatan dengan reseptornya dan biasa disebut *Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)*. Selektivitas

ini mungkin dicapai karena reseptor estrogen pada jaringan berbeda bervariasi dalam struktur kimianya sehingga memungkinkan obat kelompok SERMs berinteraksi secara selektif pada reseptor estrogen pada jaringan tertentu (Zullies, 2006).

Untuk mendapatkan ligan yang selektif dan berikatan kuat dengan reseptor estrogen perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui selektivitas senyawa yang akan digunakan sebagai ligan dengan menentukan afinitas ikatan senyawa yang dipilih. Dalam penelitian ini akan digunakan analog dari ligan yang akan mengikat reseptor estrogen dari senyawa steroid yaitu estradiol-17 β -hemisuksinat (Gambar 1.1).



Gambar 1.1. Struktur molekul senyawa Estradiol-17 β -hemisuksinat

Keberadaan gugus hidroksi pada C3 cincin aromatik estradiol-17 β -hemisuksinat mengindikasikan kemampuan untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Hal ini beralasan sebab salah satu farmakofor yang dibutuhkan untuk berikatan dengan reseptor estrogen adalah keberadaan cincin aromatik yang tersubstitusi dengan gugus hidroksi (Duax, Griffin, Weeks, & Korach, 1985). Kerangka utama estradiol-17 β -hemisuksinat diperkirakan ikut menyumbangkan afinitas terhadap reseptor- α -estrogen melalui interaksi hidrofobik dengan daerah ikatan ligan reseptor- α -estrogen (Anstead, Carlson, & Katzenellenbogen, 1997).

Untuk mengetahui afinitas ikatan senyawa yang dipilih dilakukan penentuan afinitas ikatan terhadap reseptor estrogen pada sel kanker payudara jenis MCF7. Penentuan afinitas ikatan menggunakan metode *scintillation proximity assay* (SPA). Keuntungan menggunakan metode SPA adalah tidak memerlukan tahap pemisahan atau pencucian karena formatnya homogen (Powell, Molly, & Jones, 2006), mengurangi limbah radioaktif cair dan dapat digunakan banyak tipe *bead* (Eli Lilly, 2008). Metode SPA juga dapat digunakan sebagai

Universitas Indonesia

metode skrining obat (Jeffrey et al, 2006). Faktor-faktor yang mempengaruhi dalam penentuan dengan teknik SPA adalah penggunaan pelarut (*assay buffer*), jenis ligan atau senyawa yang akan ditentukan dan jenis *bead* (Jones, 2003; Osborn, 2001)

Pada penelitian ini untuk melihat afinitas ikatan estradiol-17 β -hemisuksinat terhadap reseptor estrogen dilakukan pengujian secara *in vitro* terhadap reseptor estrogen dengan metode *Scintillation Proximity Assay* (SPA) menggunakan senyawa steroid bertanda ^{125}I . Dalam penelitian ini digunakan metode deteksi dengan teknik SPA menggunakan ligan bertanda isotop ^{125}I , karena pada penelitian yang sudah pernah dilakukan oleh : (Neto et al, 2009); (Napolitano et al, 1996); (Ahmed et al, 2007), digunakan ligan bertanda ^3H yang mempunyai waktu paruh lama (12,6 tahun). Radioisotop yang biasanya digunakan sebagai penanda dalam metode SPA untuk penentuan ikatan dengan reseptor adalah tritium (^3H) dan iodium (^{125}I). Dalam penelitian ini digunakan radioisotop ^{125}I , karena ^{125}I mudah berikatan dengan molekul organik, mempunyai waktu paruh yang cukup (60 hari), mempunyai pemancar gamma dan beta sehingga mudah dideteksi dengan alat pencacah yang sederhana, dan energinya cukup rendah (Brian, 2005).

1.2. Rumusan Masalah

Apakah estradiol-17 β -hemisuksinat yang digunakan dalam penelitian ini memiliki afinitas ikatan yang baik terhadap reseptor estrogen dan melalui penelitian SPA secara *in vitro* dapat menghasilkan senyawa yang memiliki afinitas yang baik terhadap reseptor estrogen, sehingga selanjutnya senyawa ini dapat dimanfaatkan sebagai senyawa penghambat sel kanker payudara.

1.3. Tujuan penelitian

Mendapatkan estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda ^{125}I dengan afinitas ikatan yang baik terhadap reseptor estrogen melalui pengujian secara *in vitro* menggunakan metode SPA.

1.4. Ruang lingkup

Untuk mencapai hasil sebagaimana disebut diatas, maka lingkup penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

- 1.4.1. Penelitian laboratorium pembuatan estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda ¹²⁵I.
- 1.4.2. Penelitian laboratorium penentuan afinitas ikatan estradiol-17 β -hemisuksinat secara *in vitro* terhadap reseptor estrogen dengan metode SPA.

1.5. Manfaat Penelitian

Metode SPA sebagai skrining obat dapat digunakan untuk menentukan afinitas ikatan estradiol-17 β -hemisuksinat sehingga bermanfaat untuk pengembangan pengobatan kanker payudara.

1.6. Hipotesis

Pengujian secara *in vitro* dengan metode SPA dapat digunakan untuk menentukan afinitas ikatan estradiol-17 β -hemisuksinat terhadap reseptor estrogen.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Reseptor Estrogen

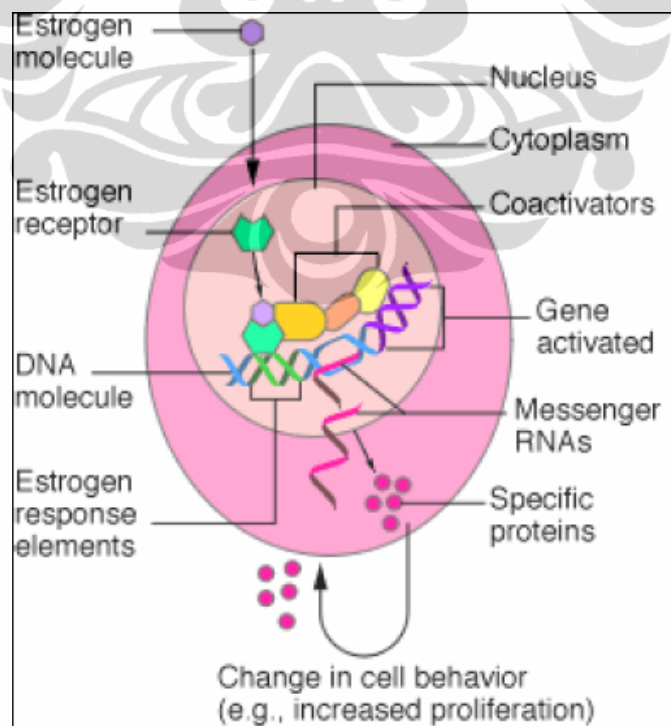
Reseptor estrogen merupakan salah satu reseptor intraseluler (*nuclear receptor*) yang memperantarai aksi hormon 17β -estradiol (estrogen) di dalam tubuh. Estrogen, ketika berikatan dengan reseptornya, bekerja meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel sistem reproduksi baik pada wanita dan pria. Estrogen juga dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL, sehingga berpotensi mengurangi risiko penyakit kardiovaskular. Estrogen juga berperan penting pada perkembangan otak, penyakit autoimun, dan metabolisme tulang. Hal yang juga penting dari estrogen adalah dapat memicu pertumbuhan, proliferasi dan metastase berbagai tipe kanker (payudara, ovarium, *colorectal*, prostat, dan endometrial) (Zullies, 2006)

Ada dua sub tipe reseptor estrogen. Sub tipe pertama, reseptor estrogen α yang klasik, pertama kali diklon tahun 1986; dan sub tipe kedua, reseptor estrogen β ditemukan paling terkini. Kedua sub tipe reseptor ini bervariasi dalam struktur, dan gen-gen pengkode mereka di dalam kromosom-kromosom yang berbeda.

Reseptor Estrogen terdiri dari 5 domain yaitu (Jacquot & Leclercq, 2009):

- *ligand binding domain* (LBD) atau disebut juga AF-2 dan AF-1 yang berhubungan dengan *growth factor*, mempunyai beberapa asam amino yang berbeda untuk mengikat ligan yang berbeda, domain ini juga banyak berikatan dengan koregulator.
- *DNA-binding domain* (DBD) yang berikatan dengan *estrogen response element* (ERE) dan memiliki dua ikatan seng yang terlibat dalam ikatan reseptor dan dimerisasi,
- Domain N-terminal, memiliki derajat variabilitas yang tinggi dan normalnya terdiri dari domain transkripsi yang dapat berinteraksi langsung dengan faktor perlengkapan transkripsional.
- Domain C-terminal, berperan pada kapasitas transaktivasi reseptor
- Hinge region, mengandung *nuclear localization sequence*.

Jika suatu reseptor estrogen berikatan dengan ligannya, maka akan terjadi perubahan konformasi reseptor yang memungkinkan berikatan dengan koaktivator. Kompleks estrogen-reseptornya kemudian akan berikatan dengan ERE yang terletak di dekat gen yang akan dikontrol transkripsinya. Setelah berikatan dengan suatu protein koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Aktivasi transkripsi gen tadi akan menghasilkan mRNA yang mengarahkan pada sintesis protein tertentu, yang kemudian mempengaruhi berbagai fungsi sel, tergantung sel targetnya. Ligan yang mengikat reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen untuk berikatan dengan reseptornya disebut *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs), suatu golongan obat yang cukup penting. Selektivitas ini mungkin dicapai karena ternyata reseptor estrogen pada jaringan berbeda bervariasi struktur kimianya, hal ini memungkinkan obat sejenis SERMs untuk berinteraksi secara selektif pada reseptor estrogen pada jaringan tertentu. Transport dan metabolisme estrogen dapat dilihat pada Gambar 2.1.

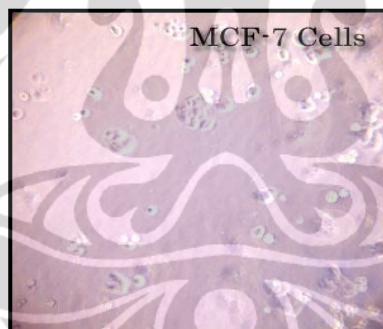


[Sumber : Gruber, et.al, 2002]

Gambar 2.1. Skema aktivasi reseptor estrogen oleh estrogen sampai menghasilkan efek

2.2. *Michigan Cancer Foundation – 7 (MCF-7)*

MCF-7 adalah sel kanker yang pertama kali diisolasi pada tahun 1970 dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasia berusia 69 tahun yang menderita kanker payudara. Sel MCF-7 berguna dalam penelitian *in vitro* untuk kanker payudara karena sel tersebut memiliki beberapa karakteristik ideal khusus pada epitel susu. Termasuk kemampuan sel MCF-7 sebagai reseptor estrogen dalam sitoplasma sel untuk mengekspresikan tumor payudara. Sel MCF-7 dapat ditumbuhkan pada tabung flask secara monolayer dengan media pertumbuhan yang sesuai dengan sel tersebut dan ditumbuhkan dalam inkubator CO₂. Gambar sel MCF-7 yang sudah ditumbuhkan dalam tabung flask dengan media pertumbuhan, dapat dilihat pada Gambar 2.2. (ATCC, 2010). Sel MCF-7 tergolong *cell line adherent* (melekat) yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α), resisten terhadap doxorubicin (Zampieri, Bianchi, Ruff, & Arbuthnot, 2002).



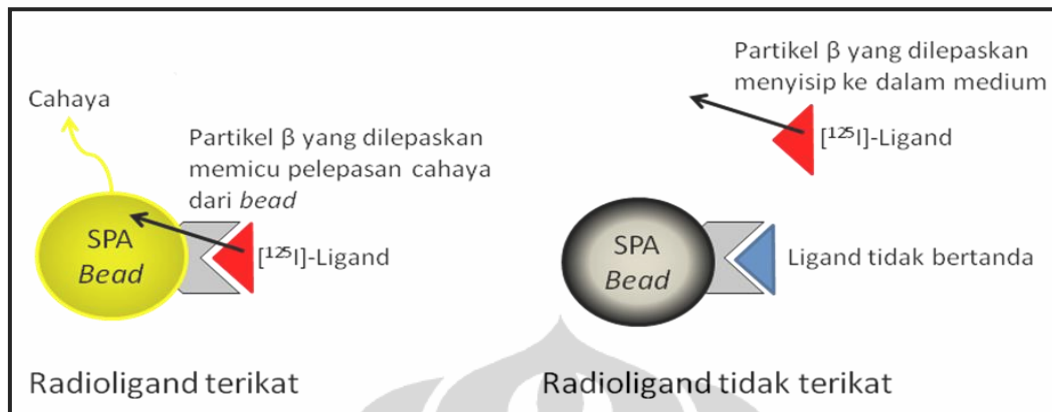
[Sumber : CCRC UGM]

Gambar 2.2. Sel MCF-7

2.3. *Scintillation Proximity Assay (SPA)*

Teknik SPA merupakan suatu teknik penentuan di mana antibodi atau molekul reseptor terikat dengan *bead* yang akan memancarkan cahaya pada saat energi dari ligan bertanda radioaktif, memicu pelepasan cahaya dari *bead* yang akan terdeteksi oleh detektor. Metode SPA tidak memerlukan tahap pemisahan atau pencucian karena formatnya homogen (Jones, 2003). Dengan demikian SPA

sangat menguntungkan untuk dipakai sebagai metode skrining obat (Osborn, 2001), gambar konsep SPA dapat dilihat pada Gambar 2.3.



[Sumber : Eli Lilly, 2008]

Gambar 2.3. Konsep SPA

Bead SPA yang digunakan dalam penentuan ikatan reseptor harus mampu menangkap reseptor untuk berinteraksi dengan *radioligand*. Selain mekanisme penangkapan reseptor, dua jenis *bead* SPA yang sudah tersedia adalah :

- *Bead* SPA plastik, terbuat dari *polyvinyltoluene* (PVT), beraksi sebagai pelarut padat *diphenylanthracene* (DPA) yang dimasukkan ke dalam *bead*
- *Bead* SPA gelas atau *Yttrium silicate* (YSi), menggunakan ion serium dalam bentuk kristal untuk proses sintilasi. Secara umum, YSI adalah sintilator lebih efisien daripada PVT, tetapi YSI *bead* SPA membutuhkan pencampuran kontinu bahkan selama *dispensing*.

Ada dua format *assay* yang digunakan dalam SPA untuk analisis interaksi reseptor-ligan, yaitu filtrasi dan pengujian dengan sintilasi (SPA). Kedua format memanfaatkan ligan bertanda radioaktif dan sumber reseptor (membran, terlarut/dimurnikan). Pemilihan metode deteksi yang akan digunakan (SPA, filtrasi, non-radioaktif) adalah langkah pertama untuk pengembangan *assay* ikatan reseptor. Dalam beberapa kasus, investigasi ke lebih dari satu format mungkin diperlukan untuk memenuhi kriteria yang diinginkan dalam ikatan reseptor sebagai berikut:

- Ikatan non spesifik rendah (NSB)
- Ikatan spesifik > 50% pada konsentrasi K_d *radioligand*

- Untuk pengujian kompetisi, konsentrasi *radioligand* harus pada atau di bawah K_d
- Reproducibel

Kualitas reagen adalah salah satu faktor yang paling penting yang terlibat dalam pengembangan *assay* dengan SPA. Reagen divalidasi agar dapat digunakan dalam jangka waktu yang panjang. Reagen primer yang diperlukan untuk penentuan ikatan reseptor

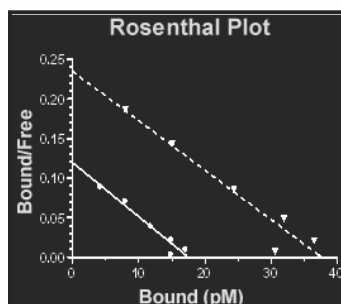
- Reseptor
- *Radioligand*

Langkah-langkah umum dalam teknik SPA:

- Senyawa uji, *radioligand*, reseptor dan *bead* SPA dimasukkan ke dalam suatu tabung atau *well* dan dikubasi selama waktu tertentu.
- Setelah inkubasi dilakukan pencacahan untuk mengetahui keradioaktifan dari senyawa uji yang sudah berikatan dengan reseptor.

2.4. Parameter ikatan

Penentuan konstanta disosiasi kesetimbangan untuk radioligand (K_d) atau konstanta disosiasi kesetimbangan senyawa tidak bertanda (K_i) dan ikatan maksimum (B_{max}) harus dilakukan setelah kondisi optimum pengujian ikatan reseptor dalam SPA. Penghitungan K_d dan B_{max} dilakukan setelah penentuan SPA dan diperoleh data-data ikatan non spesifik dan ikatan spesifik kemudian dibuat grafik Rosenthal Plot (Gambar 2.4) dan dibuat persamaan regresi liniernya. Dari persamaan regresi linier diperoleh nilai K_d dan B_{max} dimana K_d adalah $(-1/\text{slope})$ dan B_{max} adalah intersep (Eli Lilly, 2008).



[Sumber : Eli Lilly, 2008]

Gambar 2.4. Kurva rosenthal plot

2.5. Radioisotop ^{125}I

Ada beberapa radioisotop yang dapat digunakan sebagai perunut dalam prosedur *assay* SPA seperti ditunjukkan pada tabel 2.1. pada tabel tersebut diketahui data waktu paruh dan aktivitas spesifik maksimum.

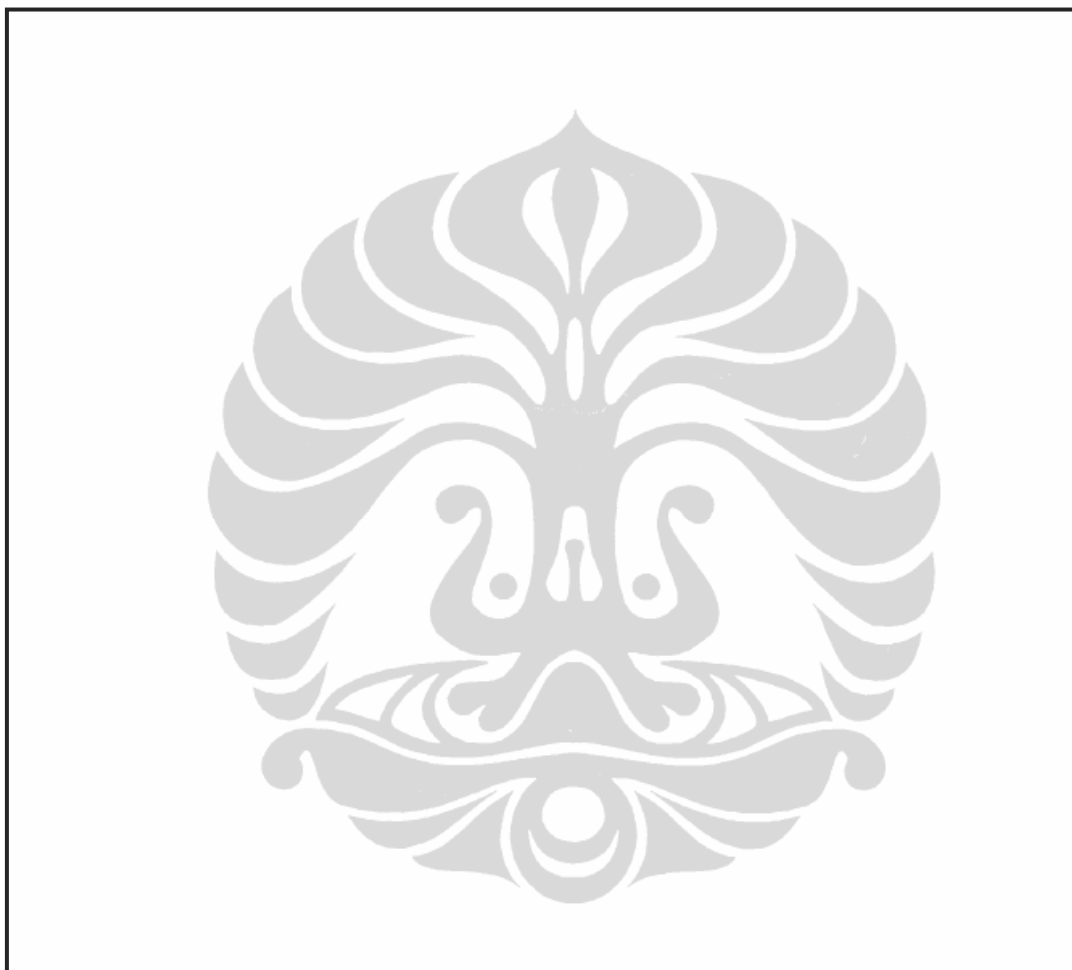
Tabel 2.1. Sifat-sifat fisika beberapa radioisotop (Brian, 2005)

| Radionuklida | Waktu paruh (T1/2) | Maksimum Aktivitas Spesifik (Ci/mmol) |
|------------------|-----------------------|--|
| ^3H | 12,6 tahun | 29,2 |
| ^{14}C | 5730,0 tahun | 0,0624 |
| ^{125}I | 60,0 hari | 2180 |
| ^{35}S | 82,7 hari | 1500 |
| ^{32}P | 14,3 hari | 9200 |

Radioisotop yang biasanya digunakan sebagai penanda dalam metode SPA untuk penentuan ikatan dengan reseptor adalah tritium (^3H) dan iodium (^{125}I). Keuntungan dalam penggunaan radioisotop ^{125}I adalah ^{125}I dapat digunakan untuk penandaan yang meliputi obat, pestisida, herbisida, pencemar lingkungan dan molekul biokimia, mudah berikatan dengan molekul organik, mempunyai waktu paruh yang cukup (60 hari), mempunyai pemancar gamma dan beta sehingga mudah dideteksi dengan alat pencacah yang sederhana, dan energinya cukup rendah (Brian, 2005).

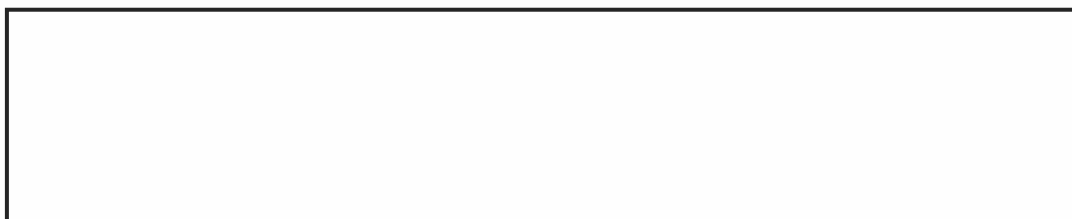
Pada dasarnya prosedur penandaan dengan iodium atau radioiodinasi dapat dilakukan dengan prosedur langsung dan tidak langsung. Pada radioiodinasi langsung, analit atau analog yang sesuai ditandai dengan menggantikan atom hidrogen dengan atom ^{125}I pada daerah cincin fenol yang sesuai. Jika tidak ada sistem cincin fenol yang sesuai pada molekul untuk memungkinkan radioiodinasi langsung maka metode radioiodinasi tidak langsung dapat digunakan (Brian, 2005). Salah satu metode radioiodinasi tidak langsung adalah menggunakan iodohistamin (metode Nars dan Hunter, 1973). Contoh skema reaksi radioiodinasi metode tidak langsung pada radioiodinasi estradiol-17 β -hemisuksinat dilakukan dengan beberapa tahap. Pertama dilakukan aktivasi senyawa estradiol-17 β -

hemisuksinat menggunakan isobutylkloroformat dan sebagai katalis digunakan tributilamin (Gambar 2.5). Selanjutnya dilakukan penandaan histamin dengan ^{125}I menggunakan metode kloramin-T (Gambar 2.6). Tahap berikutnya adalah konjugasi histamin bertanda ^{125}I dengan estradiol yang sudah diaktivasi (Gambar 2.7).



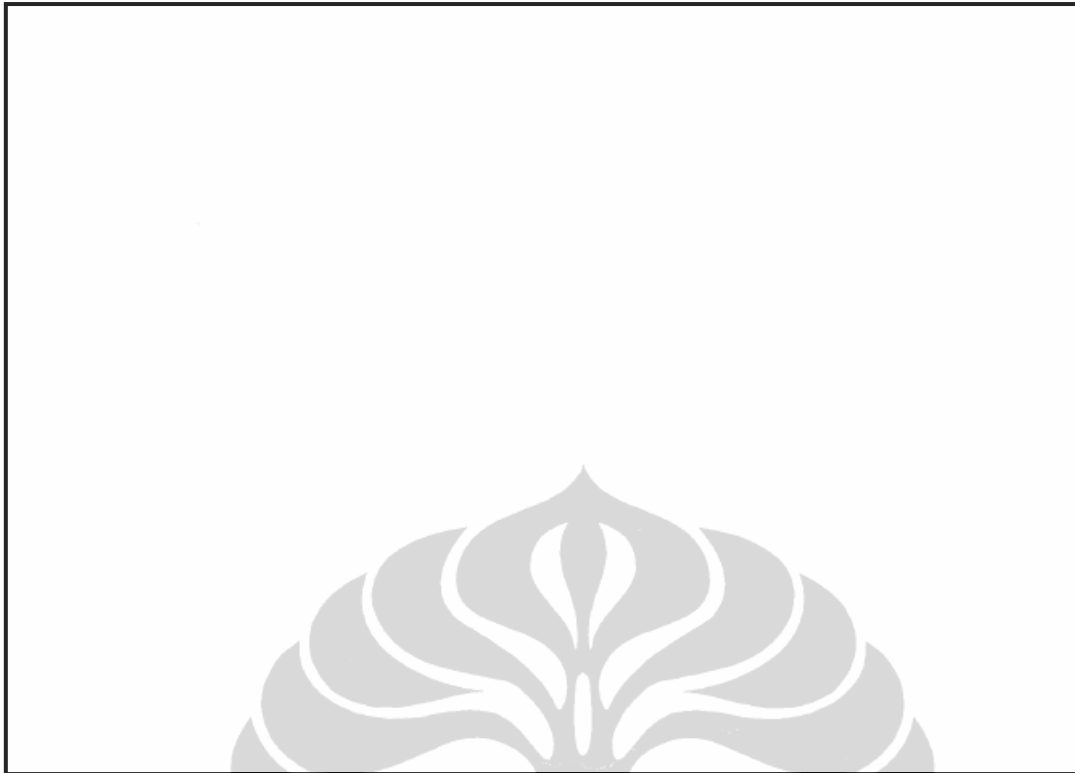
[Sumber : Thorell, J.I, 1971]

Gambar 2.5. Skema reaksi aktivasi estradiol- 17β -hemisuksinat



[Sumber : Thorell, J.I, 1971]

Gambar 2.6. Skema reaksi penandaan histamin dengan ^{125}I



[Sumber : Thorell, J.I, 1971]

Gambar 2.7. Skema reaksi konjugasi histamin bertanda ^{125}I dengan estradiol 17β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2011 sampai dengan Juni 2012, di laboratorium Radioassay, Bidang Radiofarmaka, Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Laboratorium Kimia Farmasi, Universitas Indonesia. Laboratorium Pusat Penelitian Kimia, LIPI dan Laboratorium Biotek, BPPT

3.2. Bahan dan Alat yang Digunakan

3.2.1. Bahan :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah estradiol-17 β -hemisuksinat (Sigma, Amerika Serikat), histamin (Sigma, Amerika Serikat) dioksan (Sigma, Amerika Serikat). Na-¹²⁵I hasil produksi PRR – BATAN, Indonesia. Sel MCF7 hasil pasase dari Universitas Gadjah Mada (UGM, Indonesia). Media tumbuh untuk sel MCF7 *Dulbecco Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Skotlandia), dapar fosfat salin (Gibco, Skotlandia), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Gibco, Skotlandia), penisilin streptomisin (Gibco, Skotlandia), tripsin (Gibco, Skotlandia). Kloramin-T (Merck, Jerman), natrium metabisulfat (Na₂S₂O₅) (Merck, Jerman), natrium di-hidrogen fosfat monobasik (NaH₂PO₄.H₂O) (Merck, Jerman), di-natrium hidrogen fosfat dibasik (Na₂HPO₄.2H₂O) (Merck, Jerman), toluen (Merck, Jerman), kloroform (Merck, Jerman), Etanol (Merck, Jerman), methanol (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), Natrium hidroksida (NaOH) (Merck, Jerman), natrium bikarbonat (NaHCO₃) (Merck, Jerman) , kertas pH (Merck, Jerman), pelat KLT silka gel 60 F₂₅₄ (Merck, Jerman), kertas whatman no. 1 (Merck, Jerman). Isobutilkloroformat (Fluka, Swiss), tributilamin (TCI, Jepang), SPA *bead* (Perkin Elmer, Finlandia), *microplate 96 well* (Perkin Elmer, Finlandia), flask kultur (Corning, Amerika Serikat), pipet ukur sekali buang (Corning, Amerika Serikat).

3.2.2. Alat :

Peralatan yang digunakan : Pencacah gamma model 600 T (Nucleus, Kanada), *Liquid Scintillation Counter/LSC* (Perkin Elmer,Finlandia), Inkubator CO₂ (Medline, Amerika Serikat), Mikroskop (TCI, Jepang), Haemocytometer (Merck, Jerman), FT-IR (Shimadzu, Jepang), dan FT-IR tipe TENSOR 27 (Bruker, Jerman). NMR (JEOL ECA-500, Jepang), *TLC Scanner* (Bioscan, Amerika Serikat). Alat elektroforesis tipe EC 1000 XL (Thermo Scientific, Jepang). Pipet mikro berbagai ukuran (Eppendorf, Jerman), timbangan analitik (Sartorius, Jerman), Peralatan gelas (Pyrex, Jepang), pengaduk magnetik (PMC, Jepang), mikroskop (TCI, Jepang), *Laminar Air Flow* (Labconco, Amerika Serikat), pengaduk vorteks (VWR, Amerika Serikat) *shaker* tipe unimax 1010 (Heidolph, Jerman), sentrifuge (Beckman, Jerman), LC-MS (Waters, Amerika Serikat).

3.3. Metode Penelitian

Prosedur penandaan dilakukan dengan metode tidak langsung. Metode penandaan didasarkan pada metode Nars-Hunter (Green B., 1985; Thorell, J.I., 1971). Sebelum dilakukan penandaan dengan Na-¹²⁵I radioaktif (penandaan dengan cara “panas”) terlebih dahulu dilakukan penandaan dengan NaI non radioaktif (penandaan dengan cara “dingin”) yang dikarakterisasi dengan FT-IR, MS-MS dan NMR.

3.3.1. Penandaan dengan Cara “Dingin”

3.3.1.1. Aktivasi Estradiol-17 β -Hemisuksinat

Sebanyak 1 mg estradiol-17 β -hemisuksinat dilarutkan dalam 50 μ L dioksan. Ditambahkan 10 μ L 20% tributilamin dalam dioksan, campuran kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga homogen. Ditambahkan 10 μ L 10% isobutylkloroformat dalam dioksan, campuran diaduk selama 30 menit pada 4 - 8 °C. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan 1,4 mL dioksan (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004).

3.3.1.2. Penandaan Histamin dengan Natrium-Iodida (NaI)

Sebanyak 10 μL menggunakan pipet mikro (2,2 mg/mL) histamin dalam 0,5 M dapar fosfat pH 8,0 dimasukkan ke dalam tabung iodinasi. Kemudian ditambahkan 20 μL (10 mg/mL) NaI, campuran diaduk menggunakan vorteks. Ditambahkan 10 μL (5 mg/mL) kloramin-T dalam air steril. Campuran reaksi diaduk selama 2 – 3 menit menggunakan vorteks. Sebanyak 10 μL (300 mg/mL) natrium metabisulfit dalam air steril ditambahkan untuk menghentikan reaksi (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004). Hasil penandaan dikarakterisasi dengan FT-IR.

3.3.1.3. Konjugasi Estradiol-17 β -Hemisuksinat yang sudah diaktivasi dengan Histamin bertanda Iodida (I)

Ditambahkan 100 μL (71,4 μg) estradiol-17 β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi ke dalam tabung iodinasi yang berisi larutan hasil penandaan (I-histamin). Campuran reaksi kemudian diatur pH menjadi pH = 8 dan kemudian dibiarkan untuk bereaksi selama dua jam pada 4°C (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004). Hasil konjugasi estradiol-17 β -hemisuksinat dengan I-histamin kemudian dikarakterisasi dengan FT-IR, MS dan NMR.

3.3.1.4. Pemurnian I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin

Pemurnian I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dari campuran reaksinya dilakukan dengan ekstraksi. Kedalam campuran reaksi ditambahkan 900 μL HCl 0,1 M yang diikuti dengan penambahan 1000 μL toluen. Campuran diaduk dengan vorteks, kemudian didiamkan. Fase organik yang mengandung I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dipisahkan dari fase air. Ekstraksi kedua dilakukan dengan penambahan 500 μL toluen pada fase air yang sebelumnya ditambahkan 900 μL NaOH 0,1 M dan 1000 μL natrium metabisulfit (1 mg/mL dalam dapar fosfat 0,5 M pH 7,4). Fase organik dari dua kali ekstraksi dikumpulkan, proses pemurnian dilanjutkan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pelat KLT silika 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan kloroform : etanol (9 : 1) sebagai fase gerak. Daerah I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin (R_f =

0,733) kemudian dikerok dan diekstraksi dengan 2 x 2 mL etanol (Sallam & Mehany, 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004; dan Skoog, West, Holler, & Crouch, 2002).

3.3.2. Penandaan dengan Cara “Panas”

3.3.2.1. Aktivasi Estradiol-17 β -hemisuksinat

Sebanyak 1 mg estradiol-17 β -hemisuksinat dilarutkan dalam 50 μ L dioksan. Ditambahkan 10 μ L 20% tributilamin dalam dioksan, campuran kemudian diaduk menggunakan pengaduk magnetik hingga homogen. Ditambahkan 10 μ L 10% isobutylkloroformat dalam dioksan, campuran diaduk selama 30 menit pada 4 - 8 $^{\circ}$ C. Untuk menghentikan reaksi ditambahkan 1,4 mL dioksan (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004).

3.3.2.2. Penandaan Histamin dengan 125 I

Sebanyak 10 μ L menggunakan pipet mikro (2,2 mg/mL) histamin dalam 0,5 M dapar fosfat pH 8,0 dimasukkan ke dalam tabung iodinasi. Kemudian ditambahkan 5 μ L (2 mCi) Na- 125 I, campuran diaduk menggunakan vorteks. Ditambahkan 10 μ L (5 mg/mL) kloramin-T dalam air steril. Campuran reaksi diaduk selama 2 – 3 menit menggunakan vorteks. Sebanyak 10 μ L (300 mg/mL) sodium metabisulfit dalam air steril ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Kemurnian radiokimia hasil penandaan kemudian diuji dengan elektroforesis menggunakan kertas whatman No. 1 sebagai fase diam dan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 sebagai fase gerak pada tegangan 10V/cm (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004; Rouessac & Annick, 2007).

3.3.2.3. Konjugasi estradiol-17 β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi dengan Histamin bertanda 125 I

Ditambahkan 100 μ L (71,4 μ g) estradiol-17 β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi ke dalam tabung iodinasi yang berisi larutan hasil penandaan (125 I-histamin). Campuran reaksi kemudian diatur pH menjadi pH = 8 dan kemudian

dibiarkan untuk bereaksi selama dua jam pada 4°C. Hasil konjugasi estradiol-17β-hemisuksinat dengan ¹²⁵I-histamin kemudian diuji dengan elektroforesis menggunakan kertas whatman no. 1 sebagai fase diam dan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 sebagai fase gerak pada tegangan 10V/cm. (Sallam & Mehany 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004; Rouessac & Annick, 2007).

3.3.2.4. Pemurnian ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin

Pemurnian ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin dari campuran reaksinya dilakukan dengan ekstraksi. Kedalam campuran reaksi ditambahkan 900 μL HCl 0,1 M yang diikuti dengan penambahan 1000 μL toluen. Campuran diaduk dengan vorteks, kemudian didiamkan. Fase organik yang mengandung ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin dipisahkan dari fase air. Ekstraksi kedua dilakukan dengan penambahan 500 μL toluen pada fase air yang sebelumnya ditambahkan 900 μL NaOH 0,1 M dan 1000 μL natrium metabisulfid (1 mg/mL dalam dapar fosfat 0,5 M pH 7,4). Fase organik dari dua kali ekstraksi dikumpulkan, proses pemurnian dilanjutkan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pelat KLT silika 60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan kloroform : etanol (9 : 1) sebagai fase gerak. Daerah ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin (R_f = 0,733) kemudian dikerok dan diekstraksi dengan 2 x 2 mL etanol. Kemurnian radiokimia ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin hasil pemurnian kemudian diuji dengan elektroforesis menggunakan kertas Whatman No. 1 sebagai fase diam dan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 sebagai fase gerak pada tegangan 10V/cm (Sallam & Mehany, 2009; Samuel, Karir, Kothari, Joshi, Sivaprasad, & Venkatesh, 2004; Skoog, West, Holler, & Crouch, 2002).

3.3.3. Preparasi Sel MCF7

3.3.3.1. *Thawing* Sel MCF7

Sel MCF7 dalam tabung diambil dari tabung nitrogen, diamkan sampai agak mencair. Cairan sel dalam tabung dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga yang berisi 10 mL media DMEM. Disentrifuga selama 5 menit pada 1000 rpm, supernatan dibuang dan diresuspensi dalam 5 mL media tumbuh DMEM.

Dipindahkan ke dalam tabung *flask* 25 cm² yang berisi 5 mL media tumbuh DMEM. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dan konsentrasi CO₂ 3%. Dilakukan kultur sel sampai diperoleh jumlah sel yang dibutuhkan.

3.3.3.2. Kultur Sel MCF7

Sel kanker MCF7 hasil kultur di dalam *flask* (125 cm²), media tumbuh dibuang kemudian dicuci dengan 2 x 5 mL dapar fosfat salin steril. Untuk merontokkan sel ditambahkan larutan tripsin (PTE) sebanyak 1 mL. Sel diresuspensi dengan 5 mL dapar fosfat salin steril, sambil dipipet berulang-ulang. Suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga kemudian disentrifuga dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapan diresuspensi dengan 2,8 mL dapar fosfat salin steril, dihitung jumlah sel dengan alat haemocytometer (Neto et.al, 2009 yang sudah dimodifikasi).

3.3.4. Protokol Pengujian ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin pada Sel MCF7 dengan Metode SPA

3.3.4.1. Pemilihan Jenis dan Konsentrasi *Bead* SPA yang akan Digunakan dalam Penentuan Afinitas Ikatan

Sel MCF7 dibagi ke dalam *microplate* 96 *well* dengan jumlah 500.000 sel/sumuran masing-masing 100 µL. Sebanyak 25 µL ditambahkan larutan estradiol tidak bertanda ke dalam sumuran *Non Specific Binding* (NSB). Untuk sumuran *total binding* (TB) ditambahkan 25 µl larutan dapar fosfat salin steril. Ke dalam semua sumuran ditambahkan 100 µl larutan ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin, dengan cacahan 100.000 cacahan per menit (cpm). Ditambahkan 50 µL *bead* SPA dengan variasi jenis dan konsentrasi *bead* ke dalam semua sumur. Jenis *bead* yang digunakan adalah YSi-WGA SPA *bead*, YSi-*antirabbit* SPA *bead* dan PVT-*antirabbit* SPA *bead*, dengan variasi jumlah *bead* dari 12,5 µg/µL sampai dengan 250 µg/µL. Diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil diaduk dengan *shaker*. Hasil pengujian dicacah menggunakan *liquid scintillation counter* (LSC) (Powell, Molly & Jones, 2006) .

3.3.4.2. Pengujian Afinitas Ikatan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada Sel MCF7 dengan Metode SPA

Sel MCF7 dibagi ke dalam *microplate* 96 *well* dengan jumlah 500.000 sel/sumuran masing-masing 100 μL . Sebanyak 25 μL ditambahkan larutan estradiol tidak bertanda ke dalam sumuran *Non Specific Binding* (NSB). Untuk sumuran *total binding* (TB) ditambahkan 25 μL larutan dapar fosfat salin steril. Ke dalam semua sumuran ditambahkan 100 μL larutan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin, dengan variasi cacahan larutan perunit ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin 150.000, 100.000, 50.000, 25.000, 10.000 dan 5.000 cacahan per menit (cpm). Ditambahkan 50 μL *bead* SPA (jenis dan konsentrasi larutan *bead* yang diperoleh dari cara kerja 3.3.4.1.) ke dalam semua sumuran. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil diaduk dengan *shaker*. Hasil pengujian dicacah menggunakan *liquid scintillation counter* (LSC). Setelah dicacah dengan LSC diperoleh data cacahan yang dikonversikan dengan program konversi hingga diperoleh nilai afinitas ikatan dengan menghitung konstanta disosiasi (Kd) dan ikatan maksimum (Bmax) (Neto et.al, 2009; Napolitano et al, 1996; Ahmed, 2007). Protokol pengujian afinitas ikatan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada sel MCF7 dengan metode SPA dapat dilihat pada Tabel 3.1. sedangkan gambar *microplate* 96 *well* dapat dilihat pada Lampiran 6.

Keterangan : Untuk semua pengambilan larutan yang terukur digunakan pipet mikro.

Tabel 3.1. Tabel protokol pengujian afinitas ikatan ^{125}I -estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin pada sel MCF7 dengan metode SPA

| No. sumur | Cacahan larutan ^{125}I -estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin (cacahan per menit, cpm) | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 150.000 | | 100.000 | | 50.000 | | 25.000 | | 10.000 | | 5.000 | |
| | A1- A3 NSB | A4- A5 TB | B1- B3 NSB | B4- B5 TB | C1- C3 NSB | C4- C5 TB | D1- D3 NSB | D4- D5 TB | E1- E3 NSB | E4- E5 TB | F1- F3 NSB | F4- F5 TB |
| Sel MCF7 (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| estradiol- 17β - hemisuksinat (μL) | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | |
| Dapar fosfat salin (μL) | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 | | 25 |
| ^{125}I -estradiol- 17β - hemisuksinat- iodohistamin (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Bead SPA (μL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil diaduk dengan pengaduk <i>shaker</i> | | | | | | | | | | | | |
| Cacah dengan alat <i>liquid scintillation counter</i> (LSC) | | | | | | | | | | | | |

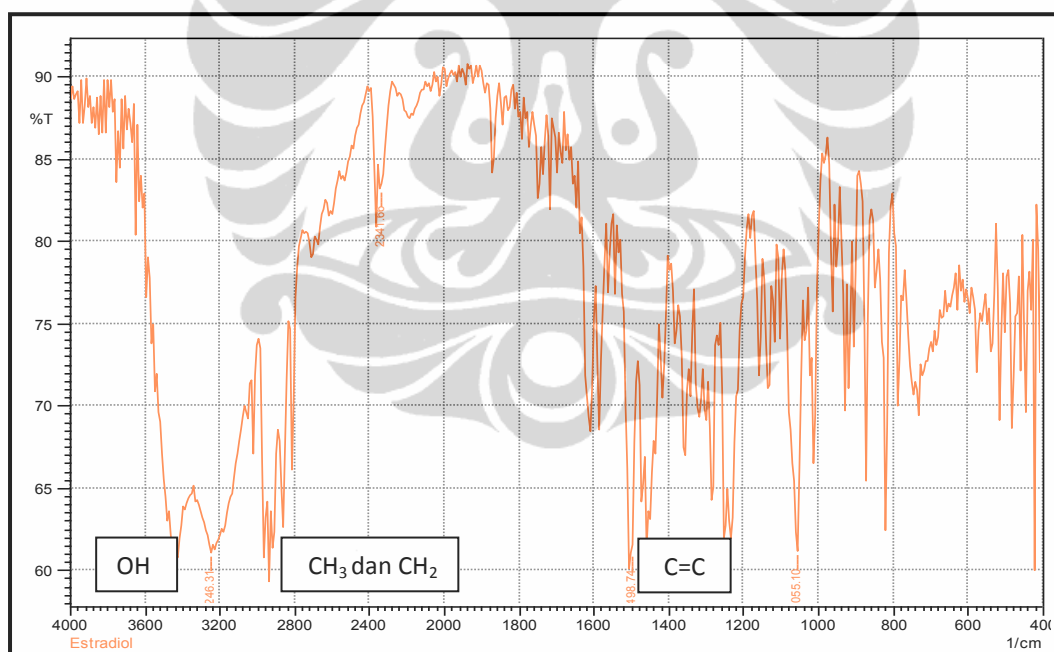
3.3.4.2. Simulasi *Docking* Estradiol dan ^{125}I -estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin dengan Reseptor Estrogen α menggunakan AutoDock Tools.

Struktur makromolekul yang akan digunakan dicari pada laman web PDB. Makromolekul dipilih yang *wild type* dan berkompleks dengan ligan estradiol- 17β . Makromolekul diunduh dalam format teks. pdb untuk diproses lebih lanjut. Ligan dipisahkan dari struktur kristal makromolekul menggunakan UCSF Chimera, kemudian dilakukan *redocking* menggunakan AutoDock Tools. Ligan ^{125}I -estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin disiapkan menggunakan Chem3D dan diubah dalam bentuk pdb, kemudian dilakukan *docking* menggunakan AutoDock Tools. Hasil *docking* dianalisis untuk mengetahui interaksi ligan dengan reseptor estrogen.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Sintesis estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda dengan cara “dingin”

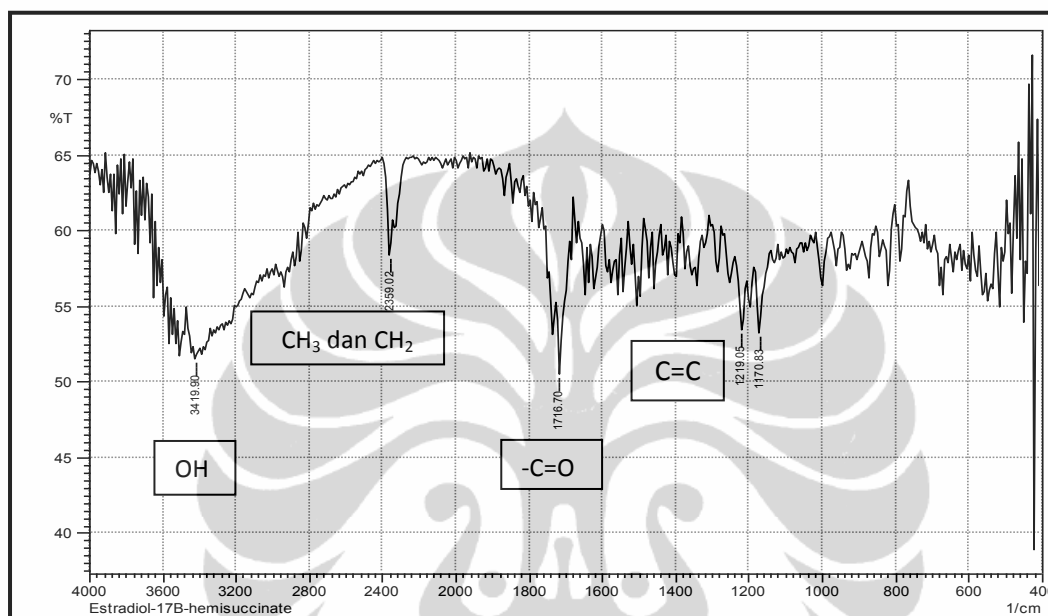
Sintesis cara “dingin” menggunakan natrium iodida (NaI) non radioaktif. Karakterisasi sintesis cara “dingin” menggunakan spektrofotometer *infra red* (IR), *nuclear magnetic resonance* (H-NMR) dan spektrofotometer massa. Spektrum IR yang digunakan untuk karakterisasi digunakan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa awal dan hasil sintesis. Spektrum estradiol ditunjukkan pada Gambar 4.1., dapat dilihat gugus fungsi yang ada adalah gugus -OH pada 3600 – 3200 cm^{-1} , gugus C ikatan rangkap pada 1644 – 1592 cm^{-1} , gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2) pada 2970 – 2850 cm^{-1} .



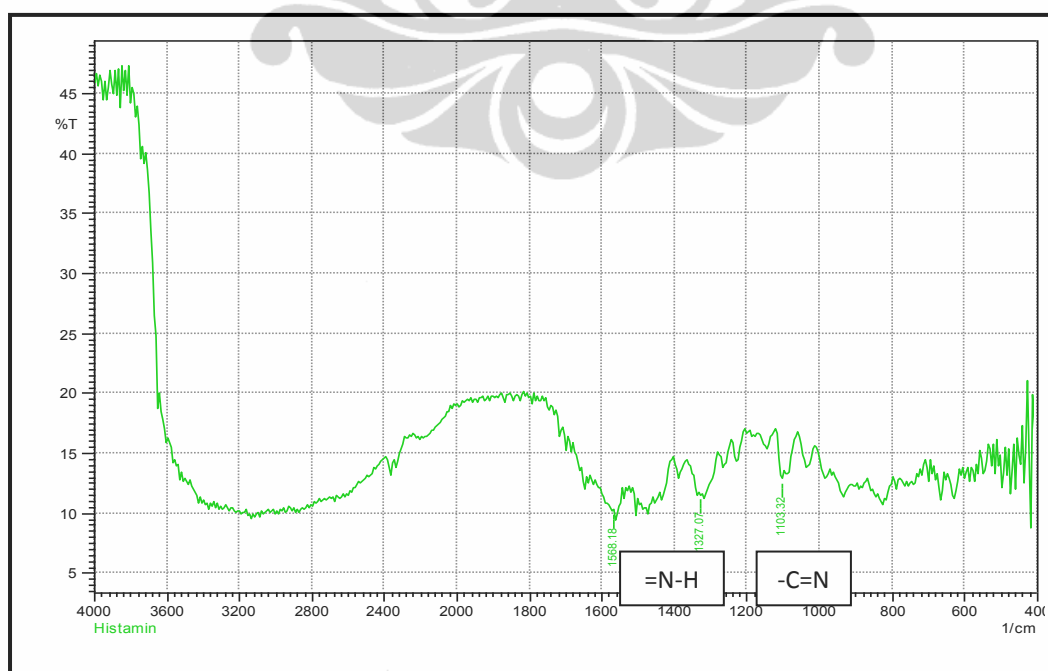
Gambar 4.1. Spektrum Estradiol

Spektrum estradiol hasil pengukuran tersebut dibandingkan dengan spektrum estradiol standar yang diperoleh dari NIST *Chemistry webbook* seperti ditunjukkan pada Lampiran 7, terlihat bahwa gugus fungsi hasil pengukuran menyerupai dengan gugus fungsi spektrum standar.

Spektrum estradiol-17 β -hemisuksinat dapat dilihat pada Gambar 4.3., menunjukkan gugus fungsi yang diperoleh dibandingkan dengan gugus fungsi estradiol terlihat adanya gugus karbonil pada 1800 – 1700 cm^{-1} , gugus –OH- dari karboksilat pada 3330 – 2500 cm^{-1} . C ikatan rangkap pada 1644 – 1592 cm^{-1} , gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2) pada 2970 – 2850 cm^{-1} .

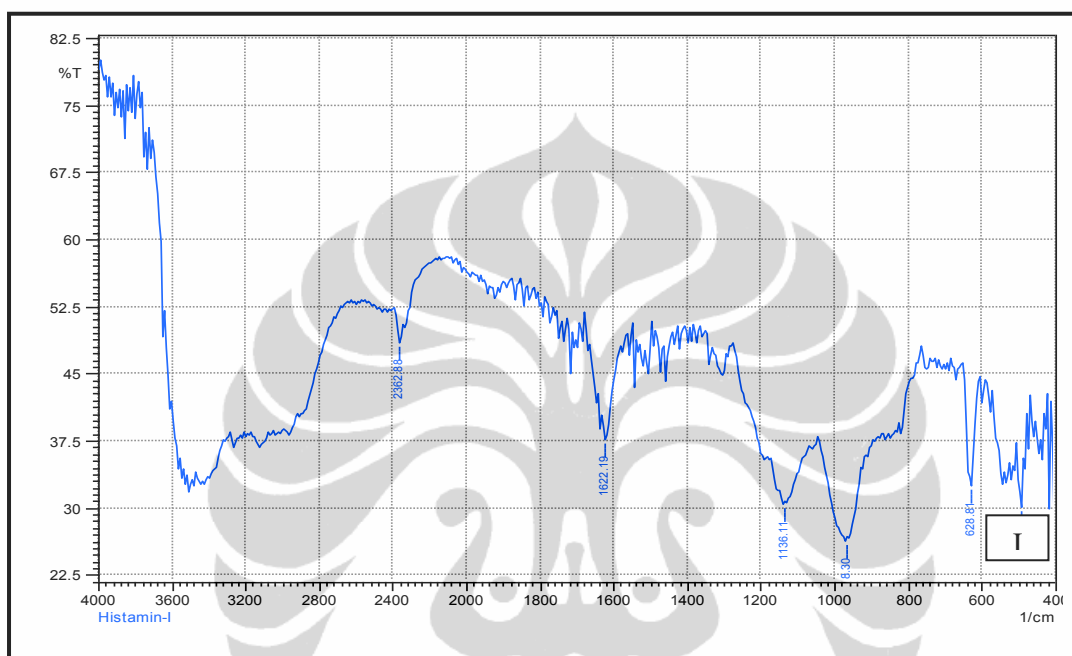


Gambar 4.2. Spektrum Estradiol-17 β -hemisuksinat



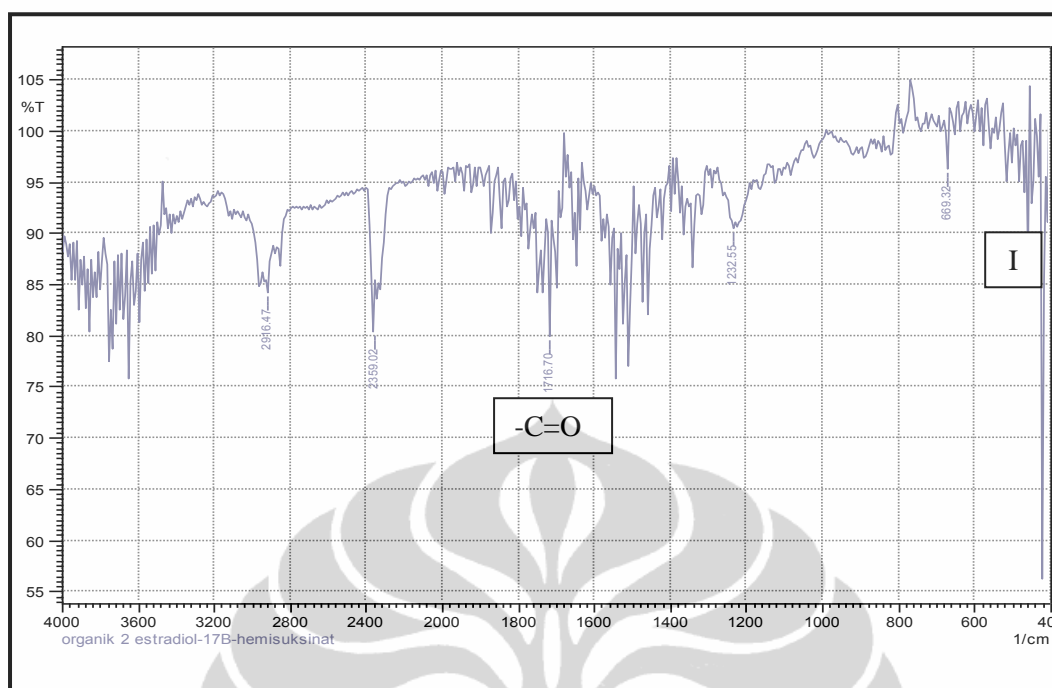
Gambar 4.3. Spektrum Histamin

Spektrum yang terlihat pada histamin (Gambar 4.3), gugus fungsi yang terlihat adalah =N-H pada $1620 - 1490 \text{ cm}^{-1}$ dan gugus $-C=N$ pada $1350 - 1000 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum histamin hasil pengukuran tersebut dibandingkan dengan spektrum histamin standar seperti ditunjukkan pada Lampiran 8, terlihat bahwa gugus fungsi hasil pengukuran menyerupai dengan gugus fungsi spektrum standar.



Gambar 4.4. Spektrum I-Histamin

Pada spektrum I-histamin pada Gambar 4.4., terlihat ada penambahan gugus iodida (I) pada $<667 \text{ cm}^{-1}$. Penambahan gugus iodida tersebut menunjukkan bahwa I-histamin sudah terbentuk, tetapi tidak dapat menunjukkan posisi keberadaan iodida yang menggantikan posisi hidrogen. Karakterisasi hasil sintesis diperkuat dengan melakukan analisis terhadap hasil sintesis menggunakan H-NMR untuk mengetahui posisi iodida dan menggunakan spektrofotometer massa untuk mengetahui berat molekul I-estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin. Karakterisasi menggunakan IR pada hasil sintesis dilakukan dengan dua perlakuan yaitu bentuk padat dan cair. Spektrum IR pada Gambar 4.5. diperoleh dari hasil sintesis bentuk padat yang diperoleh dengan cara mengeringkan menggunakan pengeringan vakum (*freeze dried*). Pengeringan dilakukan agar memudahkan dalam analisis sampel bentuk padat menggunakan IR.



Gambar 4.5. Spektrum I-Estradiol-17 β -hemisuksinat- iodohistamin

Pada spektrum I-Estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin ditunjukkan pada Gambar 4.5 sebagai hasil sintesis dengan cara “dingin” terlihat gugus fungsi yang diperoleh adalah gugus karbonil pada 1800 -1700 cm^{-1} , dan gugus iodida pada $<667 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum terlihat kurang begitu jelas kemungkinan konsentrasi yang diperoleh kecil karena sudah melalui tahap pemurnian dengan ekstraksi dan KLT kemudian dikeringkan dengan vakum. Karakterisasi menggunakan IR juga dilakukan pada hasil sintesis dalam bentuk cair, dapat dilihat pada Lampiran 9 bahwa senyawa I-Estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin sudah terbentuk dengan adanya gugus iodida yang terlihat lebih jelas dibandingkan spektrum pada Gambar 4.5.

Pada spektrum H-NMR hasil karakterisasi dari bahan baku untuk sintesis dan hasil sintesis ditunjukkan pada Lampiran 10. Terlihat dari spektrum estradiol sebagai standar, estradiol-17 β -hemisuksinat dan histamin pada pergeseran kimia 6 – 8 ppm untuk H aromatis, sedangkan pada spektrum estradiol-17 β -hemisuksinat terlihat pergeseran kimia pada 2 ppm untuk H yang terikat pada karbonil. Untuk hasil sintesisnya tidak terdeteksi karena konsentrasi yang diperoleh pada saat sintesis terlalu rendah. Ketika dicoba dilakukan sintesis dengan cara “dingin”

dengan menambahkan konsentrasi bahan baku terjadi endapan pada saat konjugasi senyawa steroid teraktivasi dengan histamin yang sudah ditandai dengan NaI non radioaktif, kemungkinan sudah melampaui batas kelarutan dari senyawa yang digunakan.

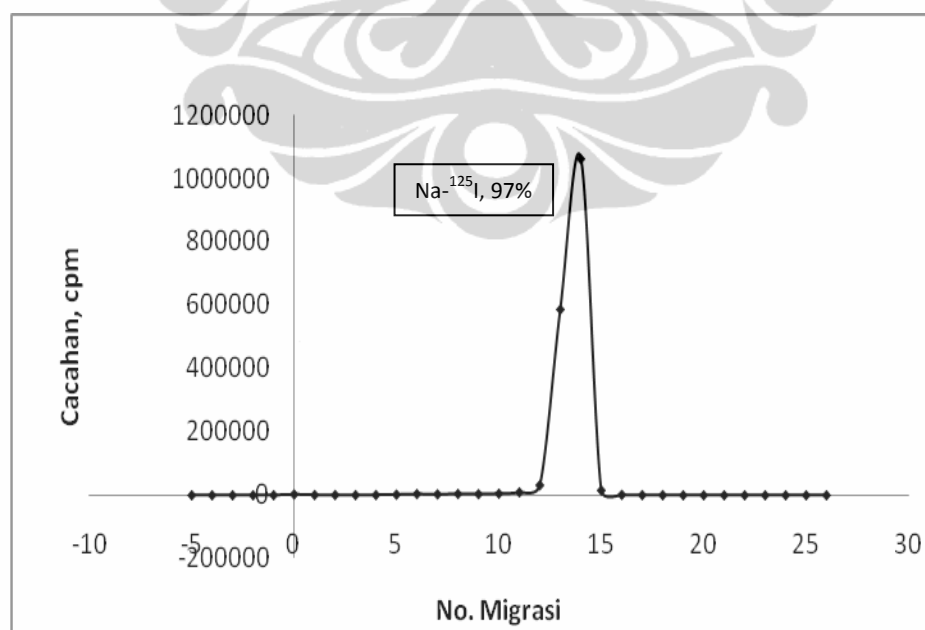
Spektrum MS dapat menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis dapat dilihat dari berat molekul senyawa. Iodida yang menggantikan atom hidrogen dapat dilihat dari berat molekulnya yang berikatan dengan senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin, dapat dilihat pada Lampiran 11. Berat molekul senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat diperoleh dari pengukuran dengan LC-MS adalah 373,2041, sedangkan berdasarkan perhitungan diperoleh 373,2015 dengan rumus molekul C₂₂H₂₉O₅. Berat molekul senyawa histamin berdasarkan pengukuran dengan LC-MS adalah 112,0892, sedangkan berdasarkan perhitungan diperoleh 112,0875 dengan rumus molekul C₅H₁₀N₃. Berat molekul senyawa hasil sintesis I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin berdasarkan pengukuran dengan LC-MS adalah 658,2915, sedangkan berdasarkan perhitungan diperoleh 658,2048 dengan rumus molekul C₂₈H₃₄N₃O₆INa.

Sintesis dengan cara “dingin” bertujuan untuk mengetahui posisi hidrogen yang digantikan dengan iodida, tetapi pada saat karakterisasi mengalami kesulitan karena pada karakterisasi dengan IR tidak dapat diketahui posisi iodida yang menggantikan hidrogen hanya dapat diketahui gugus fungsi yang diperoleh. Karakterisasi dengan H-NMR senyawa hasil sintesis (I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin) tidak terdeteksi karena konsentrasi senyawa yang dihasilkan kecil. Pengukuran dengan H-NMR diperlukan konsentrasi senyawa minimal 1 mg, sedangkan senyawa hasil sintesis cara “dingin” diperoleh kurang dari 0,5 mg. Untuk mendapatkan senyawa dengan konsentrasi yang besar dilakukan sintesis dengan meningkatkan konsentrasi senyawa awal (bahan baku), tetapi terjadi endapan pada saat dilakukan konjugasi antara estradiol-17 β -hemisuksinat yang sudah diaktivasi dengan histamin yang sudah ditandai dengan NaI non radioaktif, kemungkinan sudah melampaui batas kelarutan dari senyawa yang digunakan.

4.2. Sintesis estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda ^{125}I dengan cara “panas”

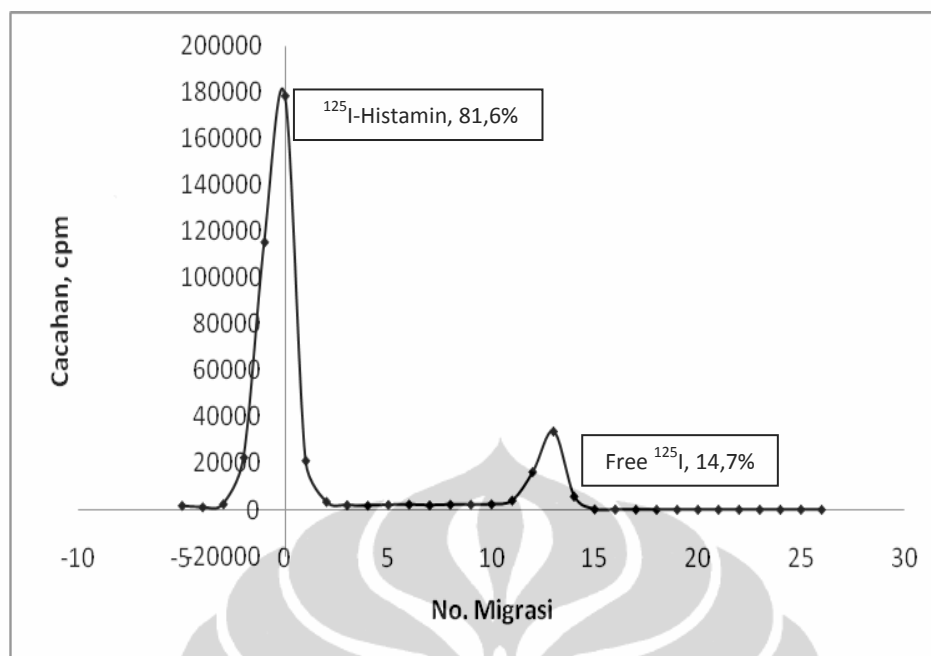
Penandaan senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat dengan cara “panas” menggunakan Na- ^{125}I dilakukan dengan memakai metode tak langsung. Evaluasi hasil penandaan dan uji kemurnian radiokimia dilakukan menggunakan elektroforesis kertas dan kromatografi lapis tipis (KLT). Penandaan diawali dengan melakukan aktivasi estradiol-17 β -hemisuksinat dan menandai histamin dengan ^{125}I . Estradiol-17 β -hemisuksinat hasil aktivasi kemudian dikonjugasikan dengan ^{125}I -Histamin. Kemurnian radiokimia dan profil radiokromatogram Na- ^{125}I yang merupakan bahan utama dalam proses penandaan ini perlu diketahui untuk memudahkan evaluasi ^{125}I -histamin dan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin.

Radiokromatogram hasil elektroforesis kertas larutan Na- ^{125}I dengan menggunakan kertas Wharman No. 1 sebagai fase diam dan dapar fosfat 0,025 M pH 7,4 sebagai fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4.6. Data atau radiokromatogram yang didapatkan menunjukkan bahwa larutan Na- ^{125}I yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kemurnian radiokimia 97%.



Keterangan : Kondisi elektroforesis : fase diam kertas whatman No. 1, fase gerak dapar fosfat 0,025 M pH 7,4, tegangan 10 Volt/cm

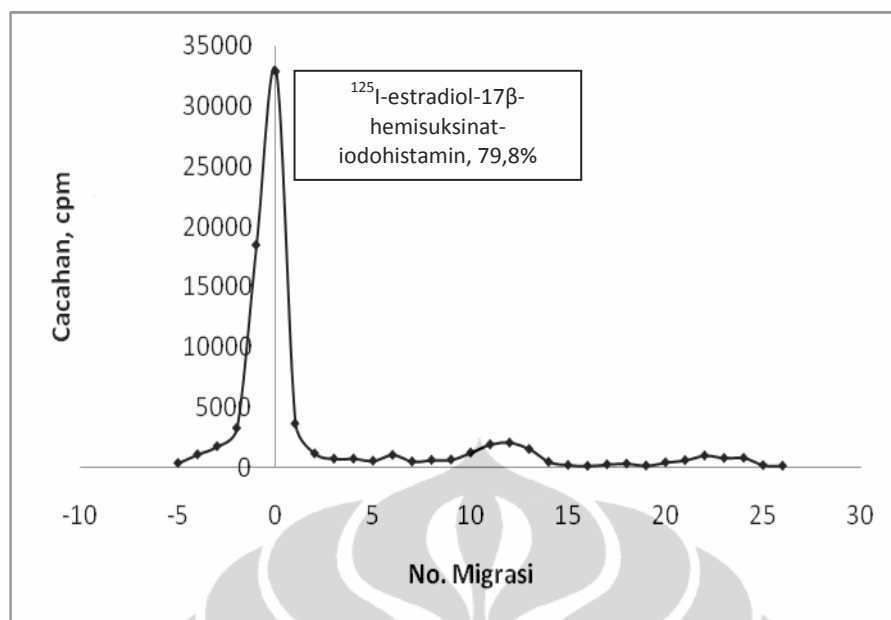
Gambar 4.6. Radiokromatogram kemurnian radiokimia Na- ^{125}I



Keterangan : Kondisi elektroforesis : fase diam kertas whatman No. 1, fase gerak dapar fosfat 0,025 M pH 7,4, tegangan 10 Volt/cm

Gambar 4.7. Radiokromatogram kemurnian radiokimia ¹²⁵I-histamin

Sementara itu radiokromatogram ¹²⁵I-histamin dapat dilihat pada Gambar 4.7. Dari radiokromatogram ini terlihat Rf pada titik penotolan karena histamin tidak bermuatan dan memberikan rendemen 81,6%. ¹²⁵I-Histamin ini selanjutnya digunakan untuk konjugasi dengan estradiol-17 β -hemisuksinat teraktivasi tanpa proses pemurnian lebih lanjut. Radiokromatogram hasil konjugasi ¹²⁵I-Histamin dengan estradiol 17 β -hemisuksinat dapat dilihat pada Gambar 4.8. Radiokromatogram campuran reaksi ¹²⁵I-histamin dengan estradiol-17 β -hemisuksinat teraktivasi ini mengindikasikan terbentuknya ¹²⁵I-estradiol-17 β -hemisuksinat-Iodohistamin (Rf = pada titik penotolan). Kemurnian radiokimia yang diperoleh sebelum dilakukan pemurnian 79,8% untuk ¹²⁵I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin



Keterangan : Kondisi elektroforesis : fase diam kertas whatman No. 1, fase gerak dapar fosfat 0,025 M pH 7,4, tegangan 10 Volt/cm

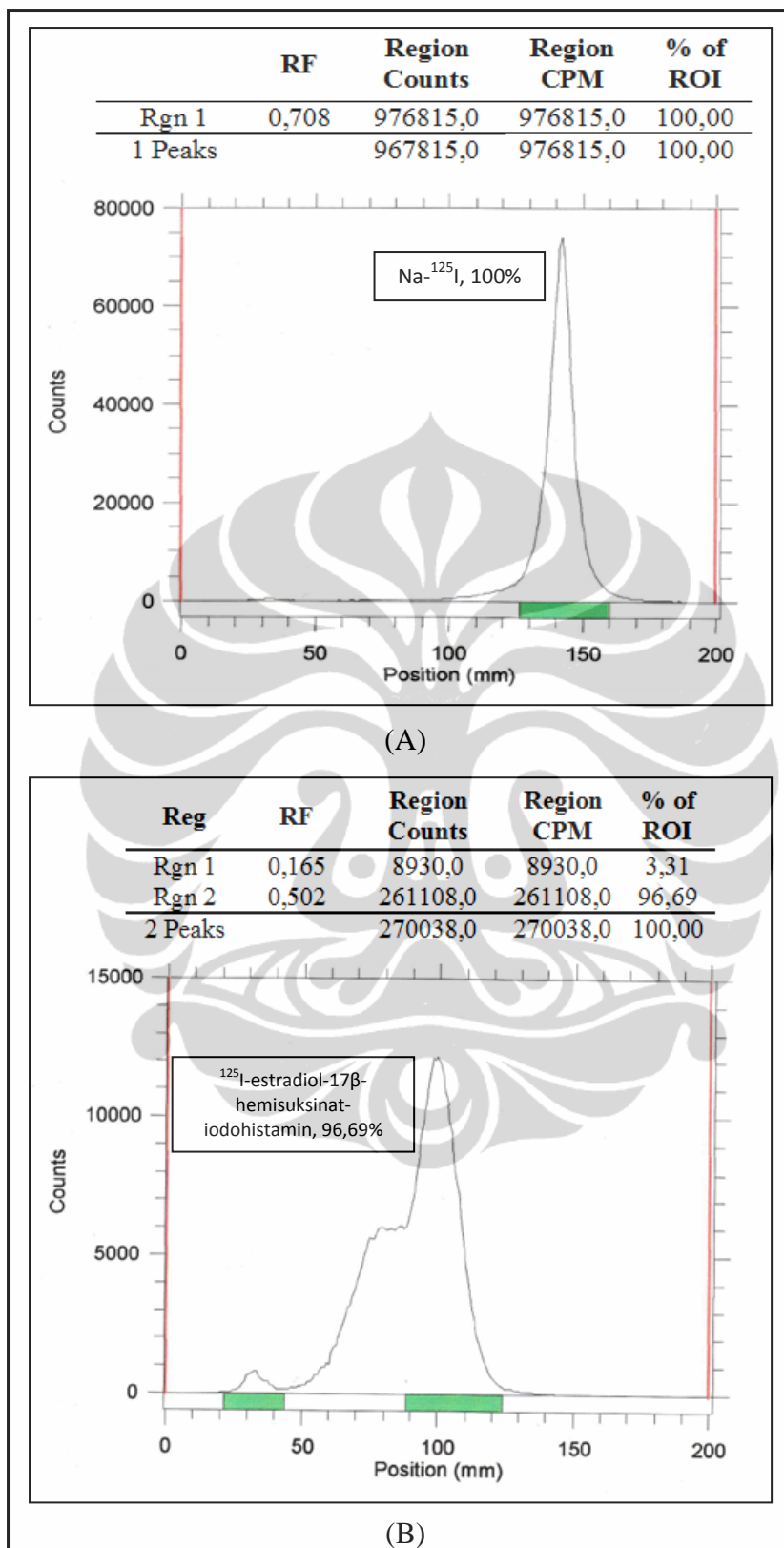
Gambar 4.8. Radiokromatogram kemurnian radiokimia ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin sebelum pemurnian

Kemurnian radiokimia sebelum dilakukan pemurnian masih rendah yaitu 79,8% oleh karena itu perlu dilakukan pemurnian. Hasil konjugasi kemudian dimurnikan dua kali dengan ekstraksi dan kromatografi lapis tipis (KLT). Pemurnian dengan ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut toluen dan diperoleh rendemen pemurnian sebesar 59,50% seperti ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Data cacahan hasil pemurnian radiokimia ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dengan ekstraksi

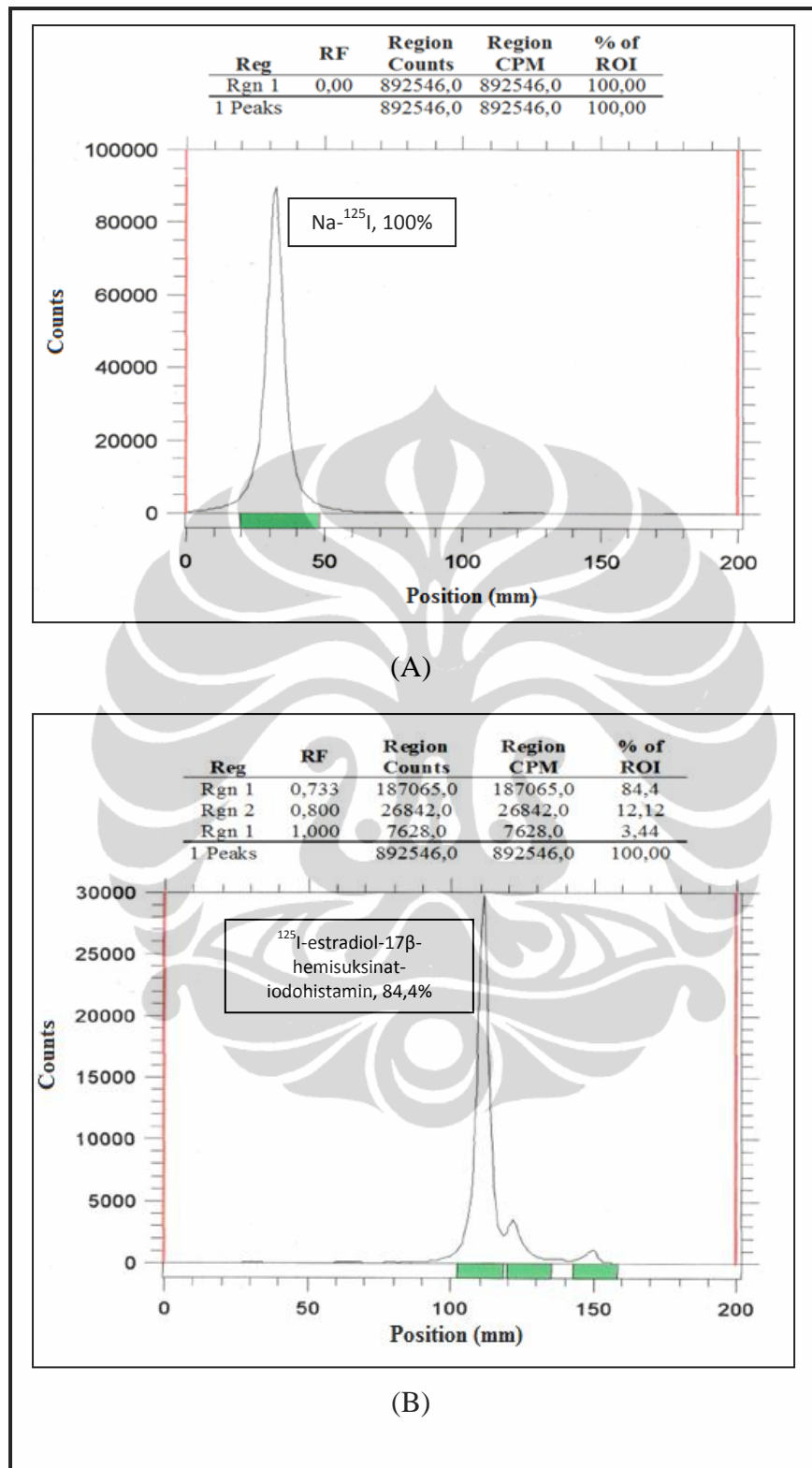
| Fase | Cacahan, cpm/mL |
|---|-----------------|
| Organik 1 | 3.692.499 |
| Organik 2 | 6.013.390 |
| Fase air | 400.206 |
| Total cacahan | 10.106.095 |
| Rendemen = Organik 2/Total cacahan x 100% | 59,50% |

Karena rendemen pemurnian dengan ekstraksi masih rendah maka dilakukan pemurnian dengan KLT. Setelah dielusi dengan fase gerak, pelat kaca dievaluasi dengan KLT *scanner* untuk mendapatkan rendemen pemurnian dan dikerok pada area puncak ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dan dilarutkan dengan etanol untuk mendapatkan larutan perunut ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin yang nantinya akan digunakan untuk pengujian SPA. Dapat ditunjukkan pada Gambar 4.9. bahwa dengan fase gerak metanol 70% Rf ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dan Na- ^{125}I tidak berbeda terlalu jauh sehingga akan menyulitkan pada saat pengerokan hasil pemurnian. Ketika digunakan fase gerak metanol 70%, ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dan Na- ^{125}I sama-sama bergerak bersama eluen karena keduanya sama-sama polar dan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin larut dalam metanol, tetapi diperoleh Rf yang berdekatan sehingga menyulitkan dalam pemisahan. Fase gerak diganti dengan campuran kloroform : etanol dengan perbandingan 9 : 1 (pelarut non polar lebih banyak). Ditunjukkan pada Gambar 4.10 (B) bahwa Rf ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin pada 0,733 dengan rendemen pemurnian yang diperoleh sebesar 84,4%. Rendemen pemurnian dapat dikuantifikasi karena dibandingkan dengan radiokromatogram Na- ^{125}I yang memberikan Rf = 0,00 yang ditunjukkan pada Gambar 4.10 (A) dengan kemurnian radiokimia sebesar 100%. Ketika digunakan eluen campuran dengan eluen non polar lebih banyak, Rf Na- ^{125}I berada pada posisi penotolan karena Na- ^{125}I lebih polar dibandingkan dengan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin. Dapat dilihat bahwa pada fase gerak polar ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dan Na- ^{125}I memberikan Rf yang berdekatan sehingga menyulitkan dalam pemisahan. Sedangkan pada fase gerak campuran dengan perbandingan lebih banyak eluen non polar diperoleh pemisahan yang lebih baik (Patnaik, 2004).



Keterangan : Kondisi KLT : fase diam silika 60F₂₅₄, fase gerak methanol 70%

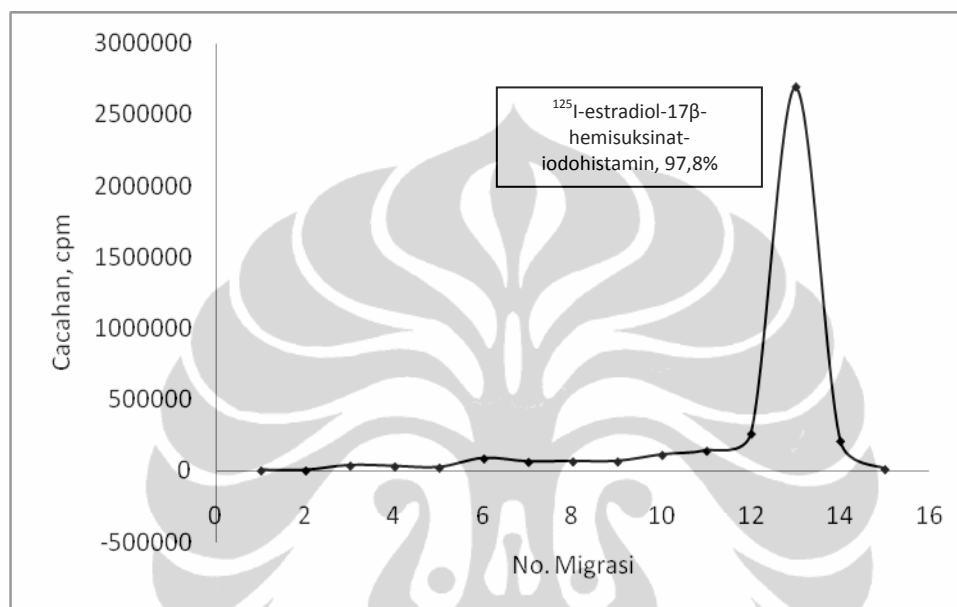
Gambar 4.9. Radiokromatogram kemurnian radiokimia (A) Na-¹²⁵I, (B) ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin



Keterangan : Kondisi KLT : fase diam silika 60F₂₅₄, fase gerak kloroform : etanol = 9 : 1

Gambar 4.10. Radiokromatogram kemurnian radiokimia (A) Na-¹²⁵I, (B) ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin

Setelah dilakukan pemurnian dengan KLT larutan perunut hasil pemurnian dievaluasi kemurnian radiokimianya dengan KLT dengan fase diam fase diam silika 60F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : etanol = 9 : 1. Ditunjukkan pada Gambar 4.11. kemurnian radiokimia larutan perunut yang diperoleh sebesar 97,8% dan dapat digunakan untuk *assay* SPA.



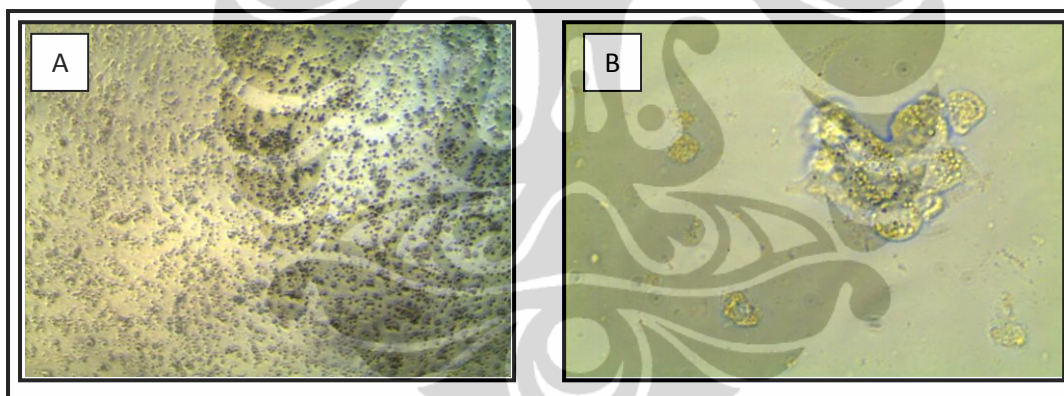
Keterangan : Kondisi KLT : fase diam silika 60F₂₅₄, fase gerak kloroform : etanol = 9 : 1

Gambar 4.11. Radiokromatogram kemurnian radiokimia ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin

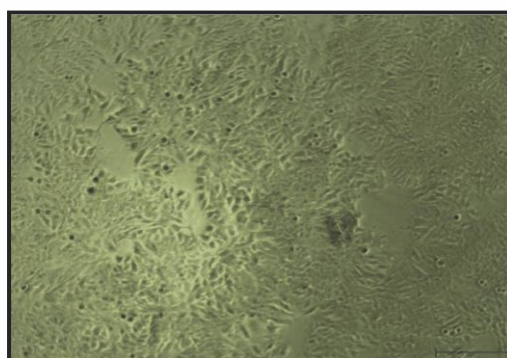
Pada sintesis cara “panas” dapat dikarakterisasi karena dengan adanya radioisotop ¹²⁵I yang memancarkan gamma sehingga dapat terdeteksi oleh detektor gamma. Keuntungan penggunaan radioisotop adalah dengan konsentrasi yang kecil sudah dapat terdeteksi oleh detektor dan dapat digunakan untuk *assay* SPA dengan kemurnian radiokimia ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin lebih besar dari 95%, tetapi pada sintesis cara “panas” ini tidak dapat mengetahui posisi hidrogen yang digantikan oleh ¹²⁵I. Kemurnian radiokimia ¹²⁵I-estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin yang diperoleh sebesar 97,8% setelah dilakukan pemurnian dua kali dengan ekstraksi dan KLT dengan rendemen pemurnian sebesar 79,8% pada sistem ekstraksi dan 84,4% pada sistem KLT.

4.3. Studi ikatan senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda ^{125}I dengan metode SPA

Senyawa hasil sintesis yang sudah dimurnikan dengan kemurnian radiokimia yang tinggi digunakan untuk pengujian SPA terhadap reseptor estrogen. Reseptor estrogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara (MCF7) yang mengekspresikan reseptor estrogen α . Gambar sel MCF7 yang digunakan dalam pengujian SPA ditunjukkan pada Gambar 4.12 dan Gambar 4.13. Setelah dilihat dengan mikroskop, pada Gambar 4.12 (A) terlihat sel MCF7 hasil *thawing* yang belum menempel pada dinding flask dan belum membelah, sedangkan pada Gambar 4.12 (B) terlihat sel MCF7 sudah mulai membelah dan menempel pada dinding flask. Pada Gambar 4.13 terlihat bahwa flask sudah penuh dengan sel yang menempel pada dinding flask dapat digunakan untuk pengujian SPA setelah dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer.

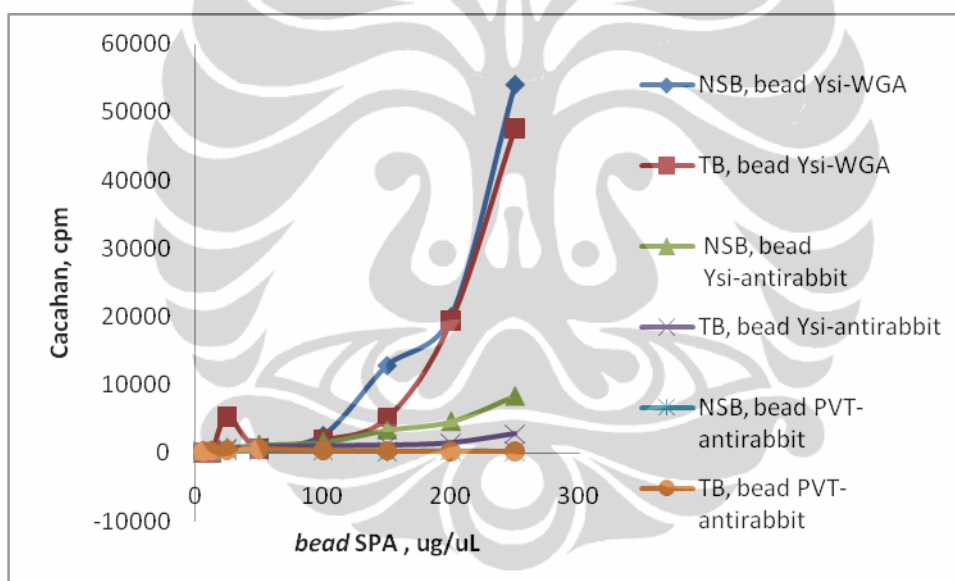


Gambar 4.12. Gambar sel MCF7 hasil *thawing* (A) Gambar sel MCF7 yang sudah menempel pada dinding flask (B)



Gambar 4.13. Gambar sel MCF7 hasil sub kultur dan siap digunakan untuk pengujian SPA

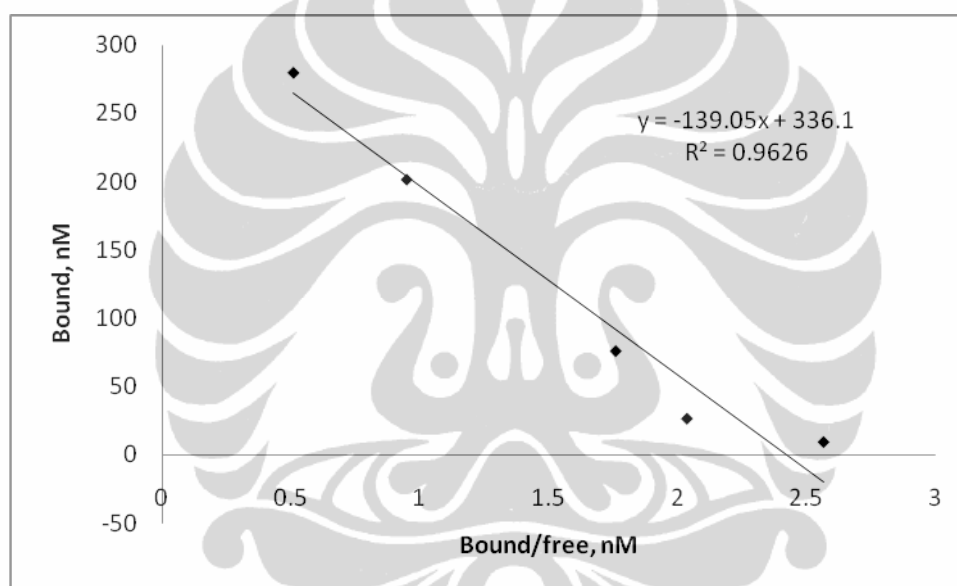
Pengujian SPA dilakukan setelah optimasi pemilihan penggunaan jumlah dan jenis *bead*. Jenis *bead* yang digunakan adalah YSi-WGA SPA *bead*, YSi-*antirabbit* SPA *bead* dan PVT-*antirabbit* SPA *bead*, dengan variasi jumlah *bead* dari 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sampai dengan 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Dapat ditunjukkan pada Gambar 4.14 bahwa *bead* yang paling optimum jumlah dan jenisnya adalah YSi-WGA SPA *bead* dengan jumlah 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Terlihat bahwa pada YSi-WGA SPA *bead* dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ memberikan nilai *total binding* (TB) lebih tinggi dibandingkan dengan nilai *non spesific binding* (NSB), sedangkan pada konsentrasi yang besar selain memberikan nilai TB yang tinggi tetapi nilai NSB juga tinggi. Untuk jenis *bead* yang lain (YSi-*antirabbit* SPA *bead* dan PVT-*antirabbit* SPA *bead*) memberikan nilai NSB dan TB yang rendah.



Gambar 4.14. Optimasi jenis dan jumlah SPA *bead*

Setelah diperoleh jenis dan jumlah *bead* yang optimum dilakukan *assay* SPA untuk mendapatkan nilai konstanta disosiasi (K_d) dan nilai ikatan maksimum (B_{max}). Data yang diperoleh dari *assay* SPA adalah data cacahan NSB, cacahan TB dan data cacahan total yang ditambahkan. Dari data cacahan kemudian dimasukkan ke dalam program konversi untuk memperoleh nilai konsentrasi TB dan NSB. Dengan pengurangan nilai konsentrasi TB dan NSB akan diperoleh nilai *specific binding* (*bound*) dan *free* (total yang ditambahkan dikurangi nilai

specific binding). Kemudian dibuat kurva Rosenthal plot dari data *bound* dan *bound* dibandingkan *free*, dari kurva tersebut diperoleh persamaan regresi $y = -139,05x + 336,1$ ditunjukkan pada Gambar 4.15 dari persamaan regresi tersebut diperoleh nilai $K_d = - (1/\text{slope}) = - (1/-139,05) = 7,192 \times 10^{-3} \text{ nM}$ dan ikatan maksimum = $B_{\text{max}} = \text{intersep} = 336,1 \text{ nM}$. Dari nilai K_d yang diperoleh sudah memenuhi persyaratan karena nilai K_d estradiol berdasar pustaka adalah $<0,003 \text{ nM}$ (Brzozowski, *et al*, (1997)). Pengujian yang dilakukan tersebut menggunakan senyawa hasil sintesis ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dengan kemurnian 97,8%.



Gambar 4.15. Kurva Rosenthal plot

Dalam penelitian ini dilakukan sintesis senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat yang ditandai dengan radioisotop ^{125}I dan diuji afinitas ikatannya terhadap reseptor estrogen menggunakan metode *scintillation proximity assay* (SPA). Diharapkan senyawa yang disintesis ini mempunyai afinitas ikatan yang baik terhadap reseptor estrogen dengan mengetahui konstanta disosiasi (K_d) dan ikatan maksimum (B_{max}) dari senyawa ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin. Jika dibandingkan dengan pustaka yang ditulis oleh Neto *et al*, yang melakukan sintesis dengan menambahkan rantai samping pada posisi C7 diperoleh $K_d = 6,14 \text{ nM}$, pada penelitian ini diperoleh nilai K_d sebesar $7,192 \times$

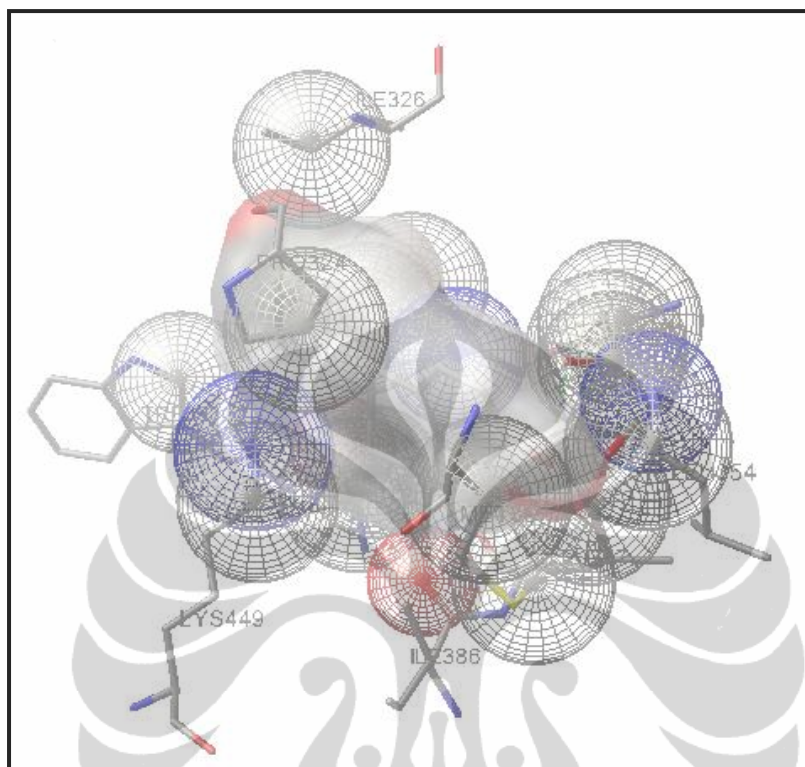
10^{-3} nM sehingga dapat dikatakan senyawa ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin mempunyai afinitas ikatan yang baik karena makin besar nilai K_d (dosis yang menimbulkan efek 50% efek maksimal) makin kecil afinitas obat terhadap reseptor. Perbedaan afinitas tersebut kemungkinan berhubungan dengan lipofilisitas ligan keseluruhan.

4.4. Analisis Hasil Simulasi *Docking* Estradiol dan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dengan Reseptor Estrogen α menggunakan AutoDock Tools.

Struktur makromolekul yang digunakan diperoleh dari laman web PDB dengan kode 1G50 dapat dilihat pada Lampiran 15. Rantai A LBD hER α yang sudah dipisahkan ligannya disiapkan sebagai makromolekul untuk *docking* dengan diberi hidrogen polar, muatan parsial, dan parameter solvasi dengan AutoDock Tools. Dengan program yang sama, estradiol *x-ray* yang dipisahkan dari rantai A LBD dan estradiol yang dimodelkan disiapkan sebagai ligan dengan diberi atom hidrogen, muatan parsial dan hidrogen non polar dihapus. Estradiol berikatan dengan reseptor estrogen melalui ikatan hidrogen dengan residu asam amino asam glutamat 353A (Glu 353A) dan histidin 524A (His524A) yang berada pada sisi aktif reseptor estrogen (Brzozowski, et al, 1997; Shiau, et al, 2002).

Untuk mengetahui interaksi-interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino kantung ikatan dilakukan *docking* terhadap estradiol. *Grid* dibentuk pada kantung ikatan estradiol (kantung ikatan steroid) dengan dimensi 50 Å x 50 Å x 50 Å sehingga dapat melingkupi seluruh residu asam amino yang berperan dalam ikatan dengan estradiol. Peta *grid* atom karbon aromatik, alifatik, peta *grid* atom oksigen dan hidrogen dihitung menggunakan paket program AutoGrid 4. Proses *docking* sebanyak 100 *run* dilakukan dengan *Lamarckian Genetic Algorithm* menggunakan paket program AutoDock 4. Jumlah *run* sebanyak 100 dipilih dengan asumsi sebagian besar konformasi ligan dalam kantung ikatan dapat teramati dalam proses *docking*. Hasil proses *docking* disimpan dalam format *file dlg*. Hasil *docking* berupa orientasi ligan, interaksi-interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino, nilai energi ikatan,

nilai K_i dari konformasi beranking paling atas. Interaksi-interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino dapat dilihat pada Gambar 4.16.

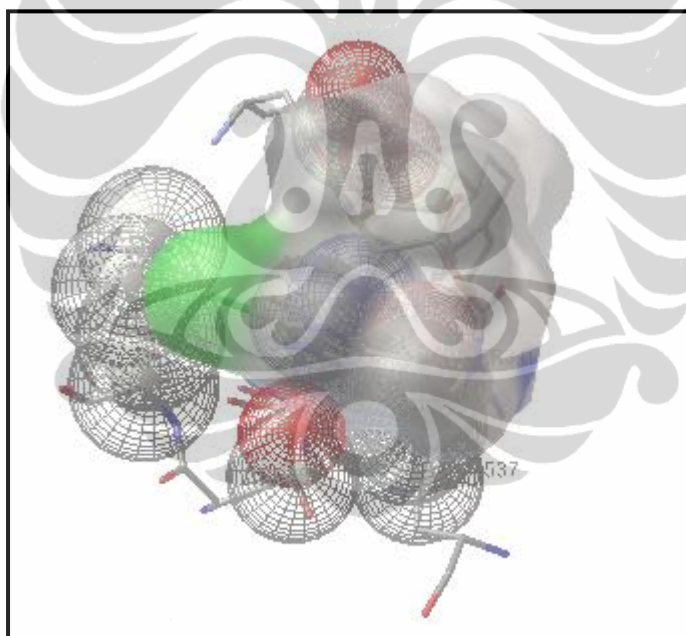


Gambar 4.16. Interaksi ligan estradiol dengan residu asam amino hasil *docking*

Hasil *docking* pada ranking teratas diperoleh pada *run* ke 59 dengan energi ikatan $-8,17$ kcal/mol dan nilai konstanta inhibisi (K_i) $1,02$ μM dapat dilihat pada Lampiran 16. Estradiol terikat pada LBD hER α (*ligand binding domain human estrogen receptor α*) melalui interaksi van der Waals dengan Leu387, Phe404, Met388, Leu428, Met421, Ile424, Leu525 pada cincin A, B, dan D, sedangkan interaksi polar yaitu ikatan hidrogen dibentuk antara hidrogen OH3 dengan oksigen karbonil Glu353 ($2,87$ Å), oksigen OH3 dengan hidrogen NH Arg394 ($2,72$ Å) dan nitrogen NH His524 ($2,71$ Å), yang keseluruhan residu tersebut diatas membentuk suatu kantung ikatan (*binding pocket*) bagi estradiol dengan volume 459 Å³ (Brzozowski, et al, 1997; Shiau, et al, 2002).

Simulasi *docking* dengan ligan lain (¹²⁵I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin) ke dalam kantung ikatan LBD ER α juga dilakukan dengan prosedur yang sama dengan estradiol. *Grid* dibentuk pada kantung ikatan estradiol

(kantong ikatan steroid) dengan dimensi 50 Å x 50 Å x 50 Å sehingga dapat melingkupi seluruh residu asam amino yang berperan dalam ikatan dengan estradiol. Peta *grid* atom karbon aromatik, alifatik, peta *grid* atom oksigen dan hidrogen dihitung menggunakan paket program *AutoGrid 4*. Proses *docking* sebanyak 100 *run* dilakukan dengan *Lamarckian Genetic Algorithm* menggunakan paket program *AutoDock 4*. Jumlah *run* sebanyak 100 dipilih dengan asumsi sebagian besar konformasi ligan dalam kantong ikatan dapat teramati dalam proses *docking*. Hasil proses *docking* disimpan dalam format *file dlg*. Hasil *docking* berupa orientasi ligan, interaksi-interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino, nilai energi ikatan, nilai *Ki* dari konformasi beranking paling atas. Interaksi-interaksi yang terjadi antara ligan dengan residu asam amino dapat dilihat pada Gambar 4.17.



Gambar 4.17. Interaksi ligan estradiol-17β-hemisuksinat-iodohistamin dengan residu asam amino hasil *docking*

Hasil *docking* pada ranking teratas diperoleh pada *run* ke 8 dengan energi ikatan +30,08 kcal/mol dapat dilihat pada Lampiran 17. Energi ikatan yang diperoleh bernilai positif ada kemungkinan terjadi ikatan tetapi hanya pada kerangka steroid, sedangkan ikatan rantai samping di permukaan reseptor tidak pada kantong ikatan seperti ditunjukkan pada Lampiran 18.

Berdasarkan hasil simulasi *docking* estradiol dan ^{125}I -estradiol- 17β -hemisuksinat-iodohistamin dalam penelitian ini, maka perlu dilakukan optimasi terhadap ligan yang akan digunakan dalam *docking* dan validasi metode agar diperoleh hasil yang akurat.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

Telah dilakukan sintesis senyawa estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda dengan cara “dingin” dan cara “panas”. Untuk sintesis cara “dingin” dikarakterisasi dengan IR, MS dan H-NMR dan cara “panas” dikarakterisasi dengan elektroforesis dan KLT. Kemurnian radiokimia sintesis cara “panas” diperoleh sebesar 97,6% setelah dilakukan pemurnian dengan KLT, dan dapat digunakan untuk assay SPA dan diperoleh afinitas yang baik dengan nilai Kd sebesar $7,192 \times 10^{-3}$ nM dan ikatan maksimum 336,1 nM. Untuk memperjelas interaksi ligan dan reseptor dilakukan simulasi *docking* estradiol dan ¹²⁵I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin. Hasil *docking* estradiol menunjukkan interaksi yang nyata antara ligan estradiol dengan residu asam amino, sedangkan untuk *docking* ¹²⁵I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin diperoleh energi ikatan bernilai positif.

5.2. SARAN

Perlu studi lebih lanjut mengenai peran rantai samping cincin D estradiol-17 β -hemisuksinat dalam aktivitas sitotoksik. Perlu dilakukan studi lebih lanjut terhadap peran kantung alternatif reseptor estrogen- α -manusia dengan optimasi ligan yang akan *didocking* dan validasi metode *docking*.

DAFTAR ACUAN

- Ahmed, N., Dubuc, C., Rousseau, J., Benard, F., & Van Lier, J. E. (2007), Synthesis, Characterization and Estrogen Receptor Binding Affinity of Flavone-, Indole-, and Furan-Estradiol Conjugates, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 17, 3212 – 3216.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E., & Katzenellenbogen J. A. (1997). The Estradiol Pharmacophore: Ligand Structure-Estrogen Receptor Binding Affinity Relationships and A Model for the Receptor Binding Site, *Steroids*, 62 : 268 – 303.
- ATCC. (2010), Cell Biology, ATCC® Number: HTB-22TM, Designations: MCF-7, <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>, Desember 23, 2010.
- Brian, L. (2005), *Radiolabelling Procedures for Radioimmunoassay, Immunoassay A Practical Guide*, Taylor & Francis e-Library, 65 – 66.
- Brothers, C.E., Quindry, J., Brittingham, K., Panton, L., Thomson, J., Appakondur, S., Breuel, K., Byrd, R., Douglas, J., Earnest, C., Mitchell, C., Olson, M., Roy, T., & Yarlagadda, C. (2000), The Andro Project Physiological and Hormonal Influences of Androstenedione Supplementation in Men 35 to 65 Years Old Participating in a High-Intensity Resistance Training Program, *Arch Intern Med*, 160 : 3093 – 3104.
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O.; Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., & Carlquist, M. (1997) Molecular Basis of Agonism and Antagonism in The Oestrogen Receptor. *Nature*, 389, 753-758.
- Cook, J. R., Graves, R., Molly, J., Jones, P., Berry, J. A., & Hughes, K.T. (2006), *Scintillation Proximity Assay (SPA) Receptor Binding Assays, Handbook of Assay Development in Drug Discovery*, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 141 – 157.
- Duax, W.L., Griffin, J.F., Weeks, C.M., & Korach, K.S. (1985), Molecular Conformation, Receptor Binding, and Hormone Action of Natural and Synthetic Estrogens and Antiestrogens. *Environ Health Persp*, 61:111 – 121.
- Eli Lilly & Company. (2008), and the National Institutes of Health Chemical Genomics Center. All Rights Reserved, *Receptor Binding Assay*, 18 – 25.

- Green, B. (1985), *Steroid Hormones : A Practical Approach*, R.E lake Departement of Biochemistry, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK, 125 – 130.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., & Huber, J.C. (2002), Mechanism of Disease, *N Engl J Med*, 346 : 340 – 352.
- Harvey, D., (2000), *Modern Analytical Chemistry*, New York: McGraw-Hill Comp, 597.
- Jacquot, Y., & Leclercq, G. (2009), *The Ligand Binding Domain of the Human Estrogen Receptor Alpha: Mapping and Functions*, In: *Estrogens: Production, Functions and Applications*, ISBN: 978-1-60741-086-7 Editor: James R. Bartos, Nova Science Publishers, Inc. 231 – 273.
- Jones, P. (2003), Scintillation Proximity Assay for Drug Metabolism and Pharmacokinetic Applications, *Life Science News* 13, Amersham Bioscience, 9 – 11.
- Napolitano, E., Fiaschi, R., Lee, W., & Hanson, R.N. (1996) Synthesis and Estrogen Receptor Binding of (17 α ,20E)- and (17 α ,20Z)-21-Phenylthio- and 21-Phenylseleno-19-Norpregna-1,3,5(10),20-Tetraene-3,17,13-Diols, *Steroids*, 61 : 384 – 389.
- Neto, C., Oliviera, M. C., Gano, L., Marques, F., Santos, I., Morais, G.R., Takumi, Y., Thiemann, T., Botelho, F., & Oliviera, C.F. (2009), Radioiodinated ligands for the estrogen receptor: Effect of different 7-cyanoalkyl chains on the binding affinity of novel iodovinyl-6-dehydroestradiols, *Applied Radiation and Isotopes*, 67 : 301 – 307.
- Osborn, J. (2001), *A review of Radioactive and Non-Radioactive-based techniques used in life science applications-Part II: High-throughput screening*, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, 6.
- Patnaik, P. (2004), *Dean's Analytical Chemistry Handbook*, Second Edition, New York: McGraw-Hill Comp, 425.
- Powell, D., Molly, J., & Jones, P. (2006), *Nuclear Receptor Scintillation Proximity Assay, Handbook of Assay Development in Drug Discovery*, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 183 – 192.
- Rouessac, F., & Annick, R., (2007), *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, Second Edition. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 63, 155.

- Sallam, Kh. M., & Mehany, N. L. (2009), Comparison Study between Direct and Indirect Labeling of Estradiol for Radioimmunoassay Purpose, *J Radioanal Nucl Chem*, 281 : 329 – 337.
- Samuel, G., Karir, T., Kothari, K., Joshi, S., Sivaprasad, N., & Venkatesh, M. (2004), *Development of Radioimmunoassay for Estimation of Progesteron in Bovine Serum*, IAEA-TECDOC-1498 : 49 – 65.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Radek, J. L., Meyers, M. J., Nettles, K. W., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., Agard, D. A., Greene, G. L. (2002), Structural Characterization of a Subtype-selective Ligand Reveals a Novel Mode of Estrogen Receptor Antagonism. *Nat. Struct. Biol.*, 9, 359-64.
- Skoog, D., West, D.M., Holler, F. J., & Crouch, S.R. (2002), *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Eight Edition, Canada: Thomson Learning, 22 : 633.
- Supratman U. (2010), *Elucidasi Struktur Senyawa Organik. Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*, Widya Padjajaran, 117, 125.
- Thorell, J.I., & Johansson, B.G., (1971), Enzymatic Iodination of Polypeptides with ^{125}I to High Specific Activity, *Biochem, Biophys, Acta*, 251, 363, 369.
- Warner, M., & Gustafsson, J., (2010), The Role of Estrogen Receptor β (ER β) in Malignant Diseases - A New Potential Target for Antiproliferative Drugs in Prevention and Treatment of Cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396 : 63 – 66.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., & Arbuthnot, P. (2002), Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer Cells, *Anticancer Res.*, 22 : 2253 – 2259.
- Zullies, I. (2006) *Pengantar Farmakologi Molekuler*, Gajah Mada University Press, 103 – 105.

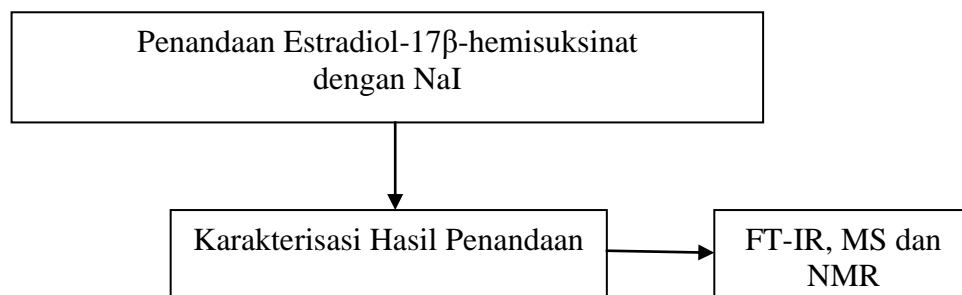
LAMPIRAN

Daftar Lampiran

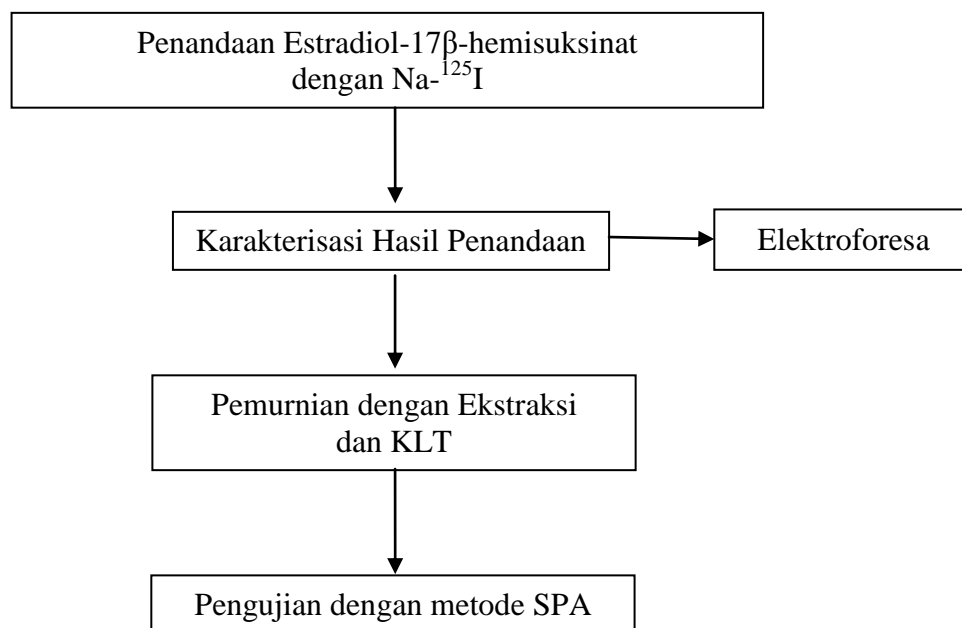
| | |
|----------------------------------|--------|
| Jenis lampiran | No |
| Lampiran skema kerja | 1 |
| Lampiran pembuatan larutan dapar | 2 |
| Lampiran gambar | 3 – 11 |
| Lampiran perhitungan | 12 |
| Lampiran tabel hasil perhitungan | 13-14 |
| Lampiran hasil <i>docking</i> | 15-18 |

Lampiran 1. Skema Kerja

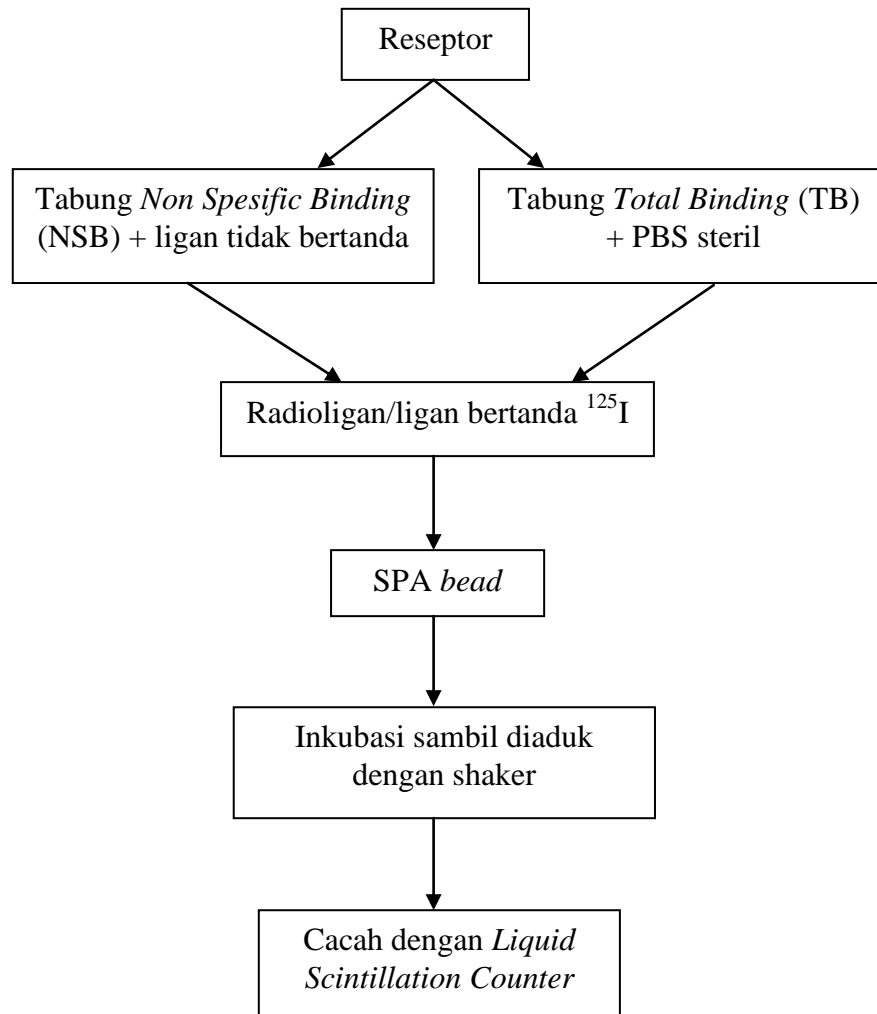
Skema Penandaan dengan cara “Dingin” (penandaan dengan NaI non radioaktif)



Skema Penandaan dengan cara “Panas”



(Lanjutan)
Skema Pengujian SPA



Lampiran 2. Pembuatan Larutan Dapar

a. Larutan Dapar Fosfat 0,5 M pH 5,8 - 8

Larutan stok dapar fosfat : A: 1 M natrium di-hidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ; B: 1 M di-natrium hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Campurkan kedua larutan dengan perbandingan volume dan encerkan dengan air sampai volume 1000 ml dalam labu takar untuk membuat pH yang diinginkan. Rouessac, (2007)

| 1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mL) | 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (mL) | pH |
|--|---|-----|
| 39,5 | 460,5 | 5,8 |
| 60,0 | 440,0 | 6,0 |
| 89,0 | 411,0 | 6,2 |
| 127,5 | 372,5 | 6,4 |
| 176,0 | 324,0 | 6,6 |
| 231,5 | 268,5 | 6,8 |
| 287,5 | 212,5 | 7,0 |
| 342,0 | 158,0 | 7,2 |
| 387,0 | 113,0 | 7,4 |
| 422,5 | 77,5 | 7,6 |
| 448,0 | 52,0 | 7,8 |
| 466,0 | 34,0 | 8,0 |

b. Larutan Dapar Fosfat 0,025 M pH 7,4

Diambil 50 mL larutan dapar fosfat 0,5 M pH 7,4 masukkan dalam labu takar 1000 mL dan encerkan dengan air sampai volume 1000 mL.

c. Larutan Dapar Fosfat Salin steril

Ditimbang 9,6 gram dapar fosfat salin (Gibco), dilarutkan dalam 1000 mL air steril, kemudian ditambahkan 0,1 gram kalsium klorida (CaCl_2), campuran diaduk sampai larut. Setelah larut disaring dengan penyaring bakteri di dalam *Laminar Air Flow* (LAF)

(Lanjutan)

d. Larutan Media (DMEM F12)

Sebanyak 1 sachet media DMEM (Gibco) dilarutkan dalam 1000 mL air steril kemudian ditambahkan 1,2 gram NaHCO_3 , campuran diaduk sampai larut. Setelah larut disaring dengan penyaring bakteri di dalam *Laminar Air Flow* (LAF)

e. Larutan asam klorida (HCl) 0,1 M

Diambil 980 μL menggunakan pipet mikro larutan HCl pekat (32%) diencerkan dengan air sampai volume 100 mL dalam labu takar 100 mL

f. Larutan sodium hidroksida (NaOH) 1 M

Ditimbang 8 gram NaOH dilarutkan dalam 150 mL air, diaduk sampai larut. Setelah larut dimasukkan ke dalam labu takar 200 mL, ditambahkan air sampai volume 200 mL.

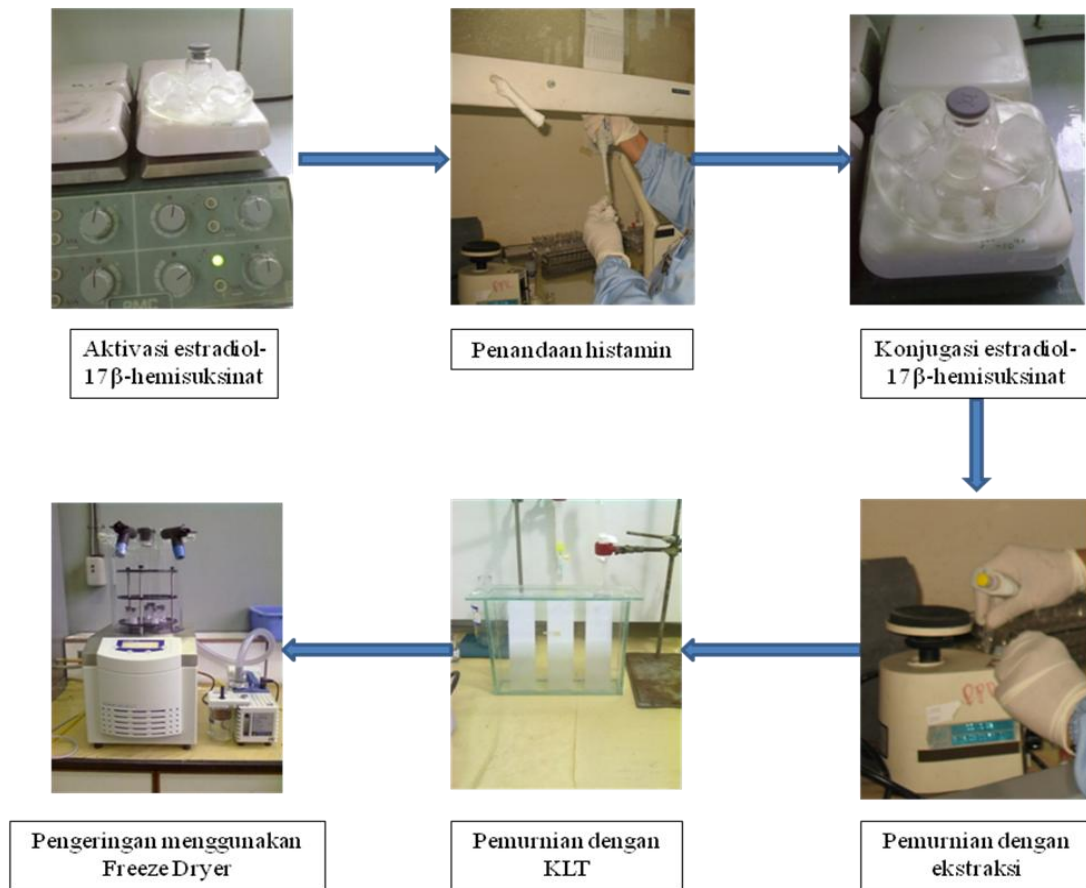
g. Larutan sodium hidroksida (NaOH) 0,2 M

Diambil 20 mL larutan NaOH 1 M dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, ditambahkan dengan air sampai volume 100 mL

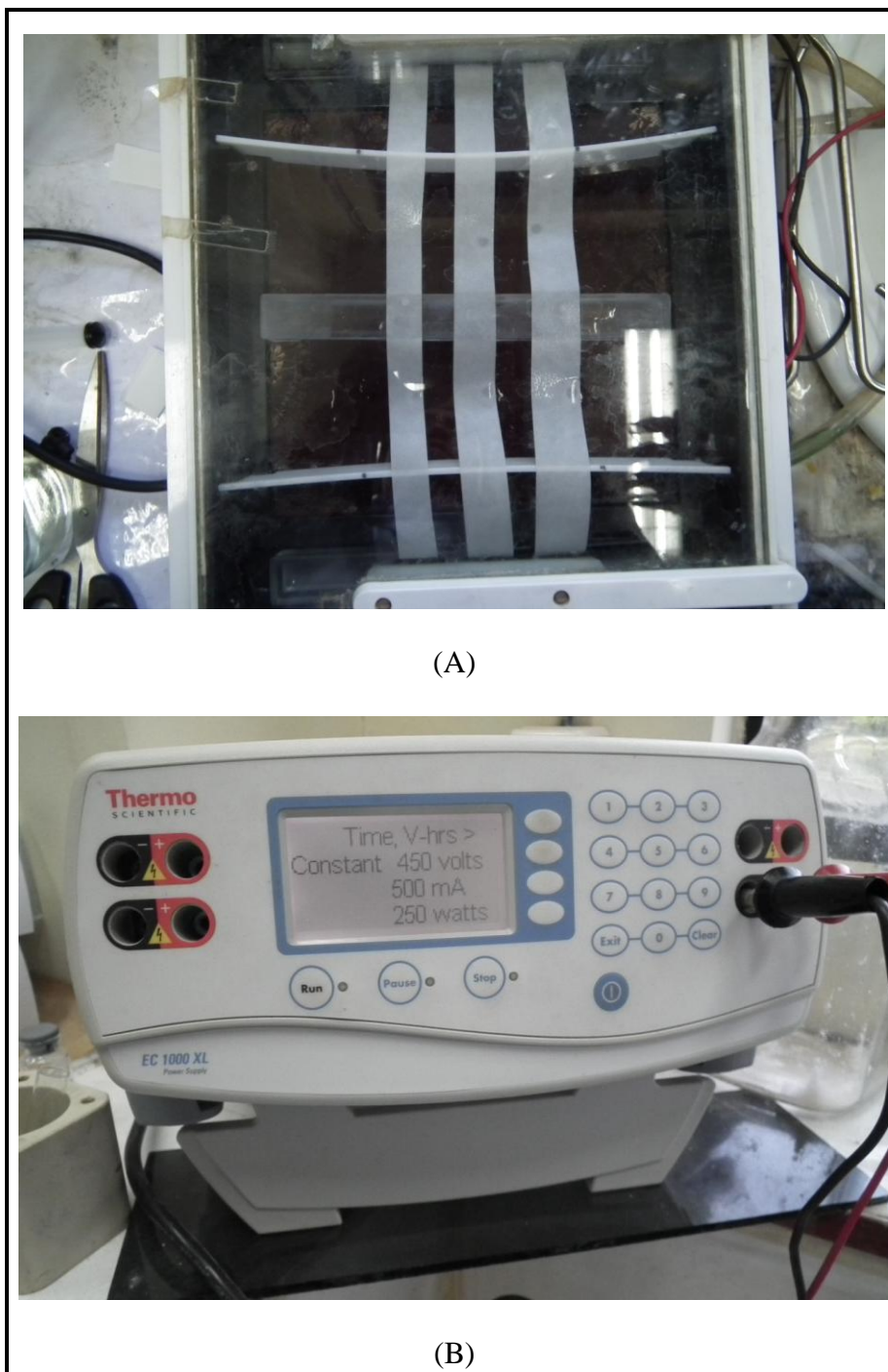
h. Larutan sodium hidroksida (NaOH) 0,1 M

Diambil 10 mL larutan NaOH 1 M dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, ditambahkan dengan air sampai volume 100 mL

Lampiran 3. Gambar proses sintesis estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda cara “dingin”



Lampiran 4. Karakterisasi hasil sintesis estradiol-17 β -hemisuksinat bertanda cara “panas” dengan elektroforesis



Keterangan : (A) *Chamber* alat elektroforesis; (B) Pengatur tegangan alat elektroforesis

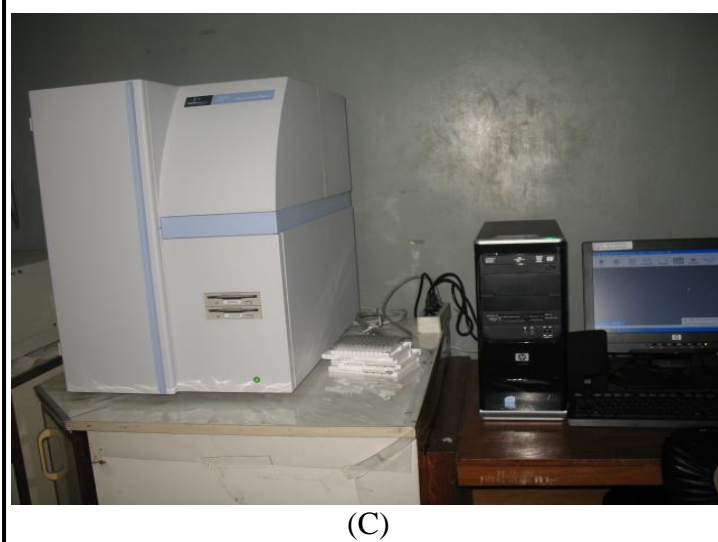
Lampiran 5. Alat pencacah yang digunakan untuk mencacah hasil sintesis cara “panas”



(A)



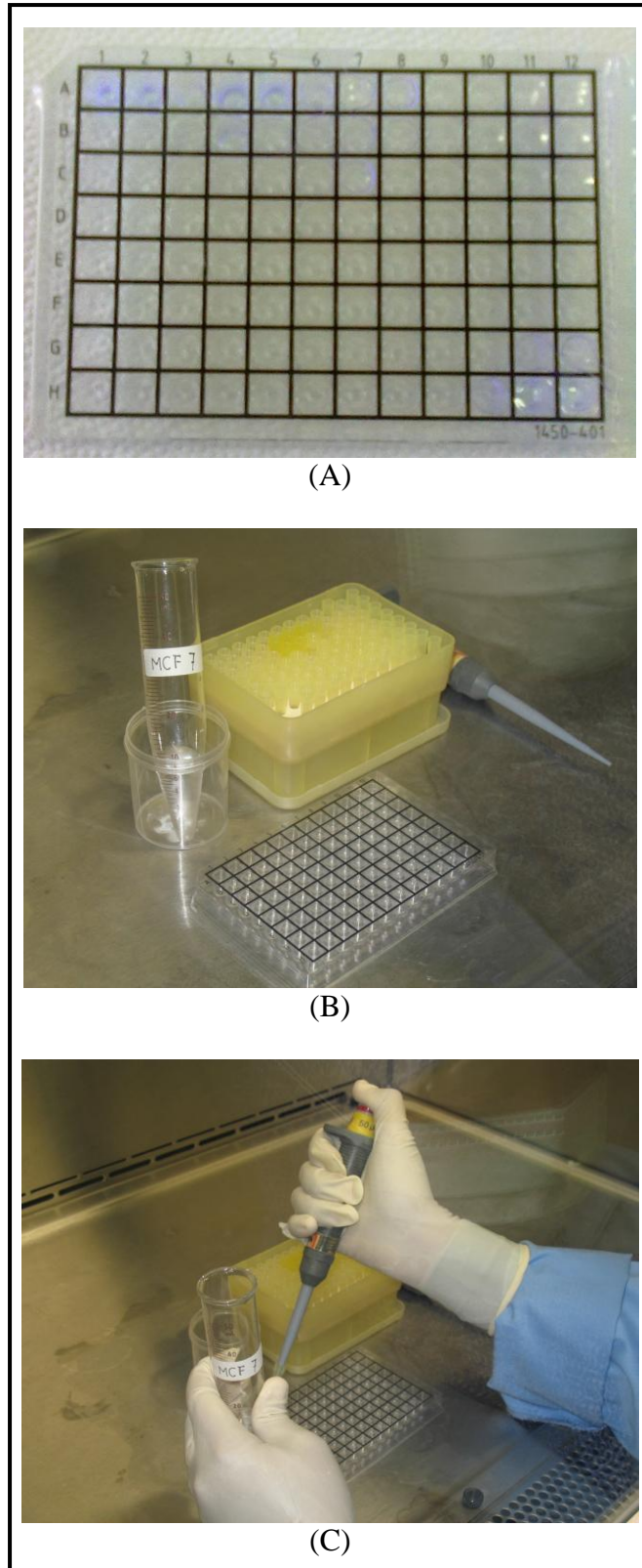
(B)



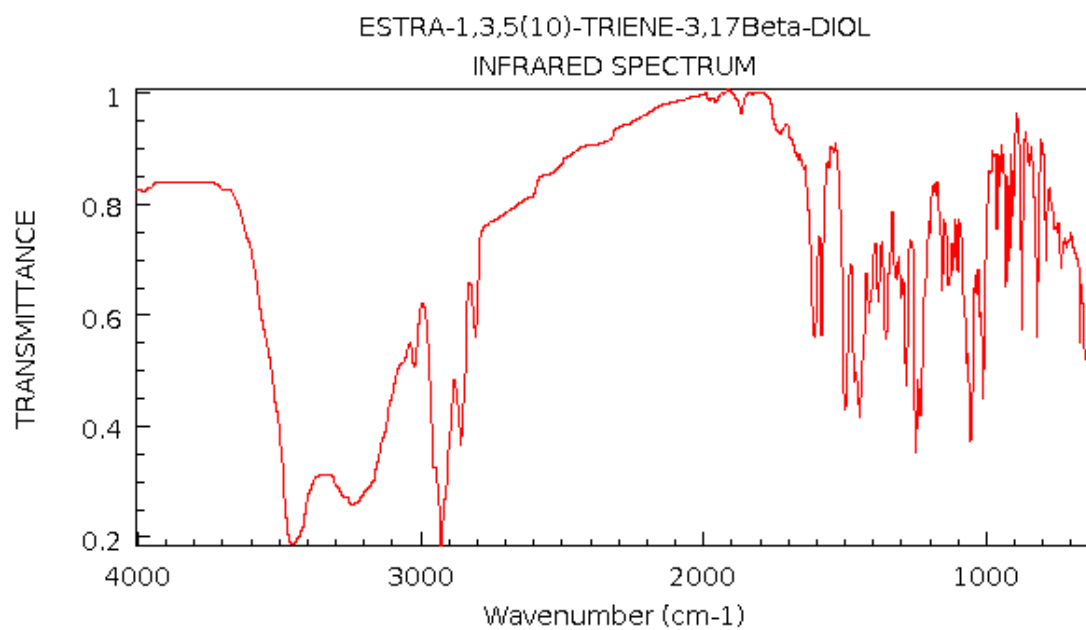
(C)

Keterangan : (A) Alat KLT Scanner, (B) alat pencacah gamma, (C) alat *Liquid Scintillation Counter* (LSC)

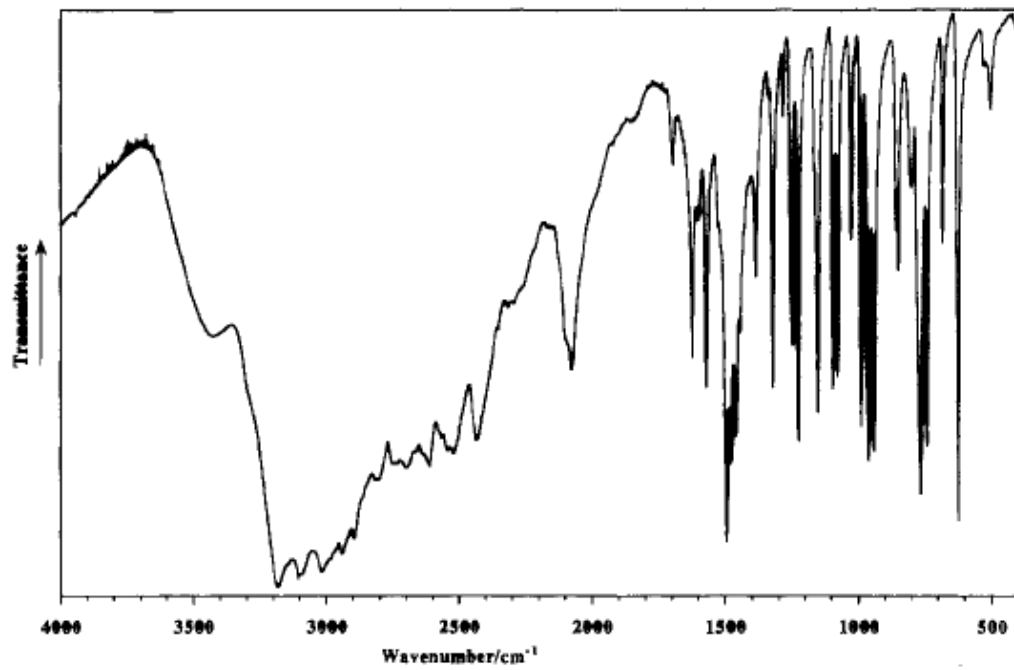
Lampiran 6. Pengujian afinitas ikatan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin



Keterangan : (A) *Microplate 96 well*, (B) Sel MCF7 yang siap digunakan untuk pengujian afinitas ikatan, (C) Proses pengujian afinitas ikatan

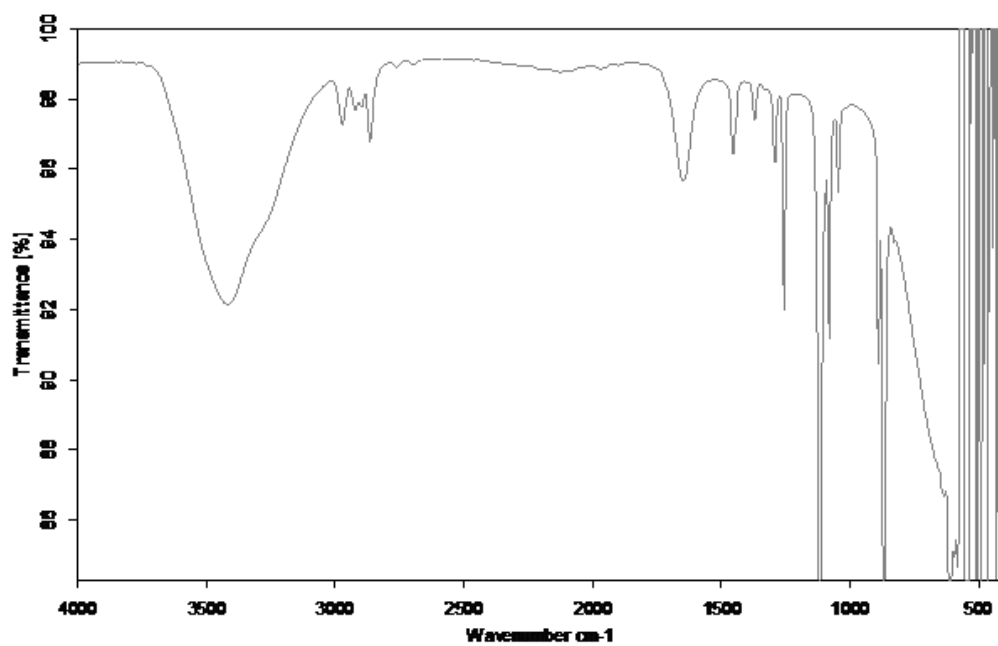
Lampiran 7. Spektrum IR estradiol standar

NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

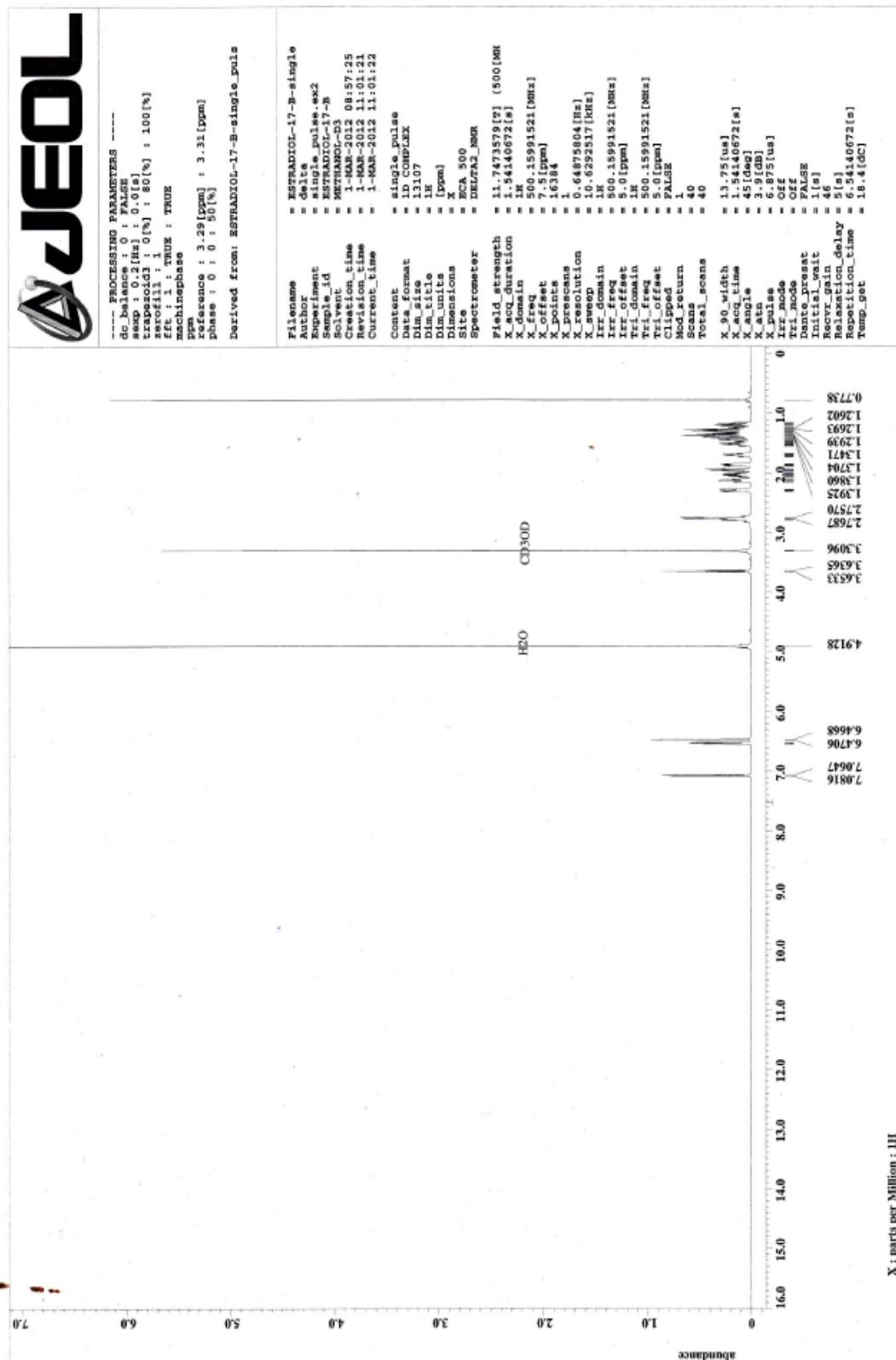
Lampiran 8. Spektrum IR histamin standar

[Sumber : J.A. Collado, 1999]

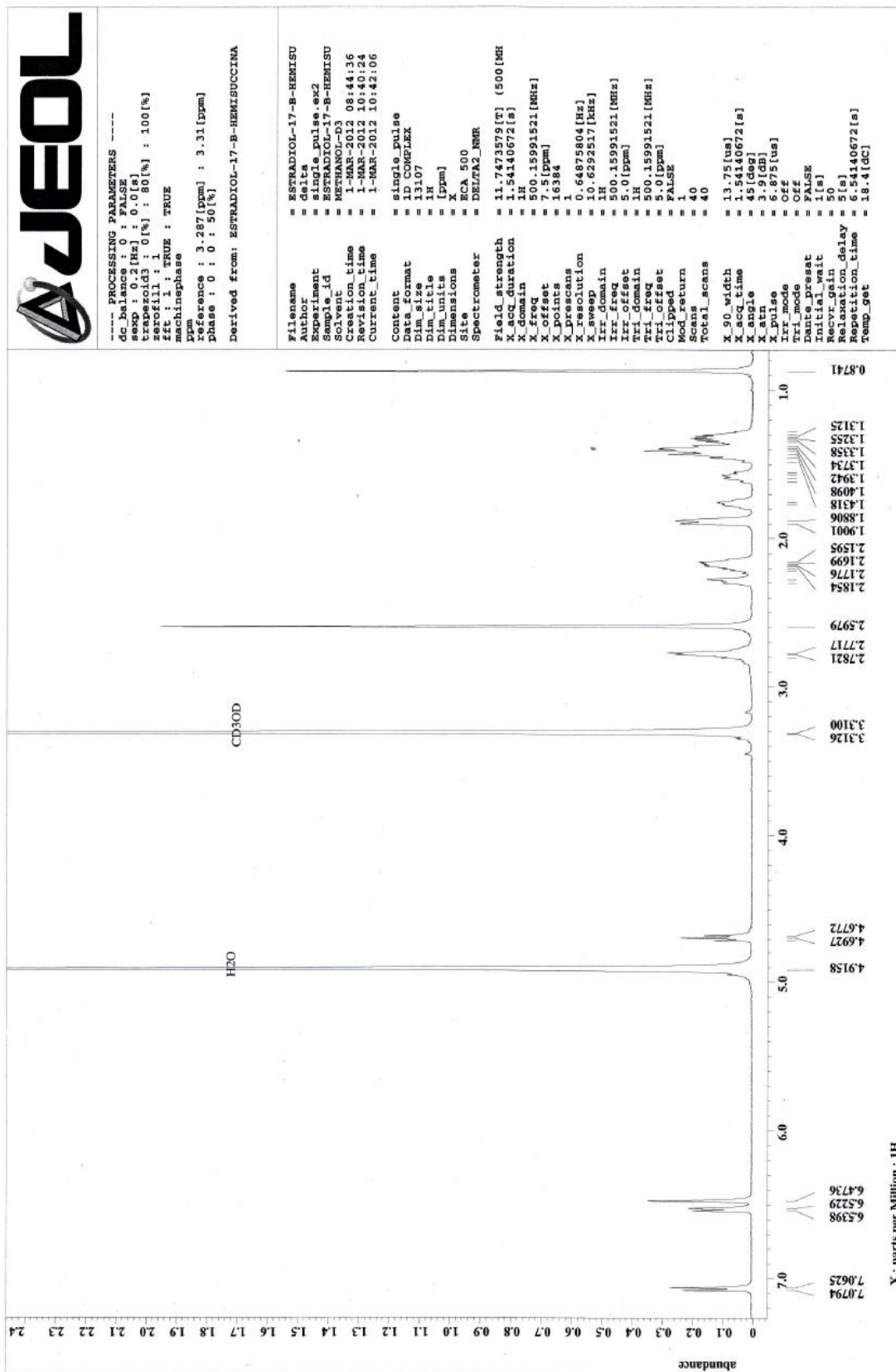
Lampiran 9. Spektrum IR I-Estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin (sampel cair)



Lampiran 10. Karakterisasi hasil penandaan cara “dingin” dengan H-NMR, Spektrum Estradiol



(Lanjutan).
Spektrum Estradiol



JEOL

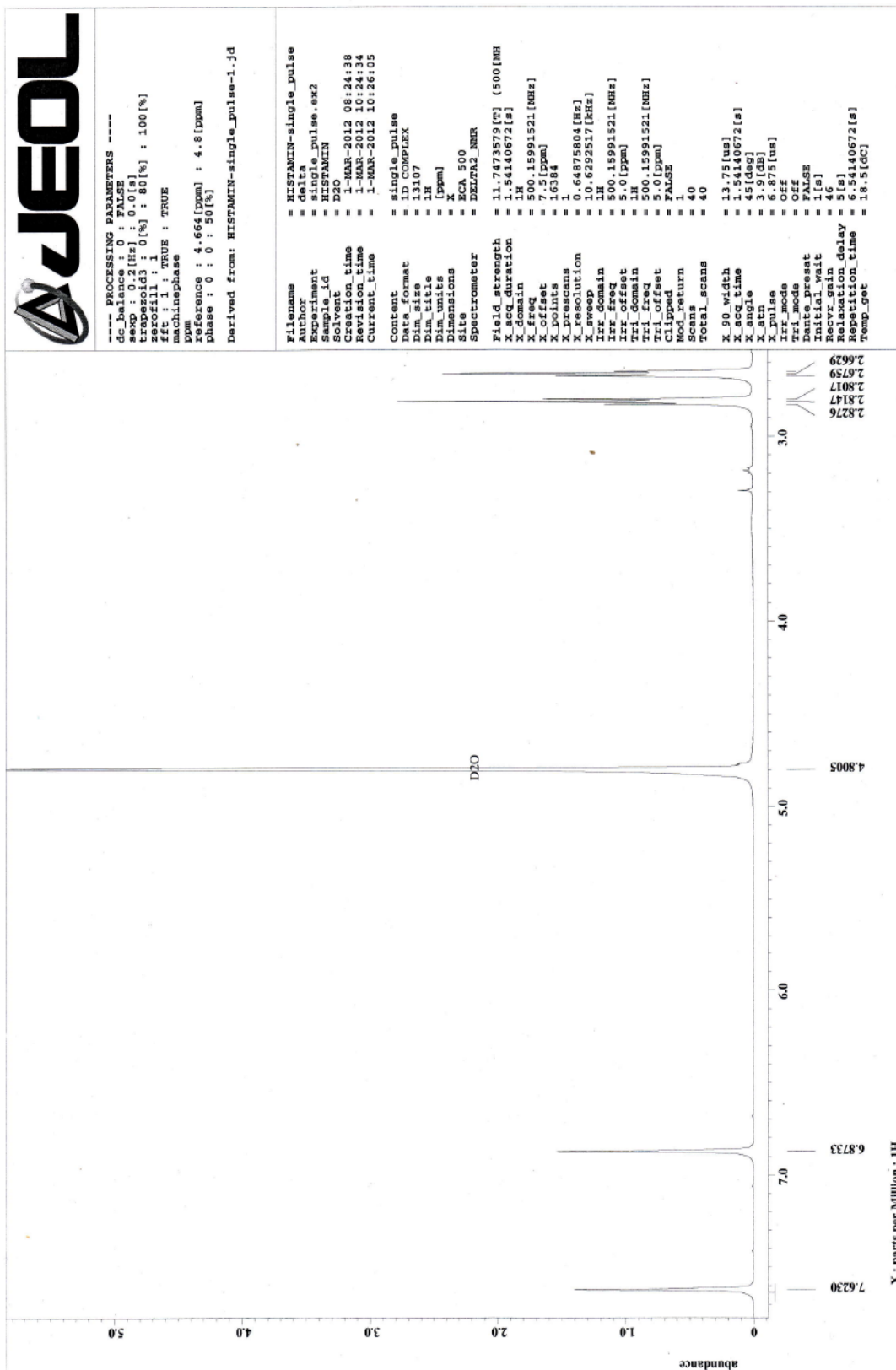
----- PROCESSING PARAMETERS -----
 dc_balance : 0 : FALSE
 exp : 0.2 [Hz] : 0.0 [s]
 f2 : 0.0 [Hz] : 0.0 [s]
 zerofill : 1 : 0 [%] : 80 [%] : 100 [%]
 fft : 1 : TRUE : TRUE
 machinephase
 ppm
 reference : 3.287 [ppm] : 3.31 [ppm]
 phase : 0 : 0 : 90 [deg]

Derived from: ESTRADIOL-17-B-HEMISUCCINA

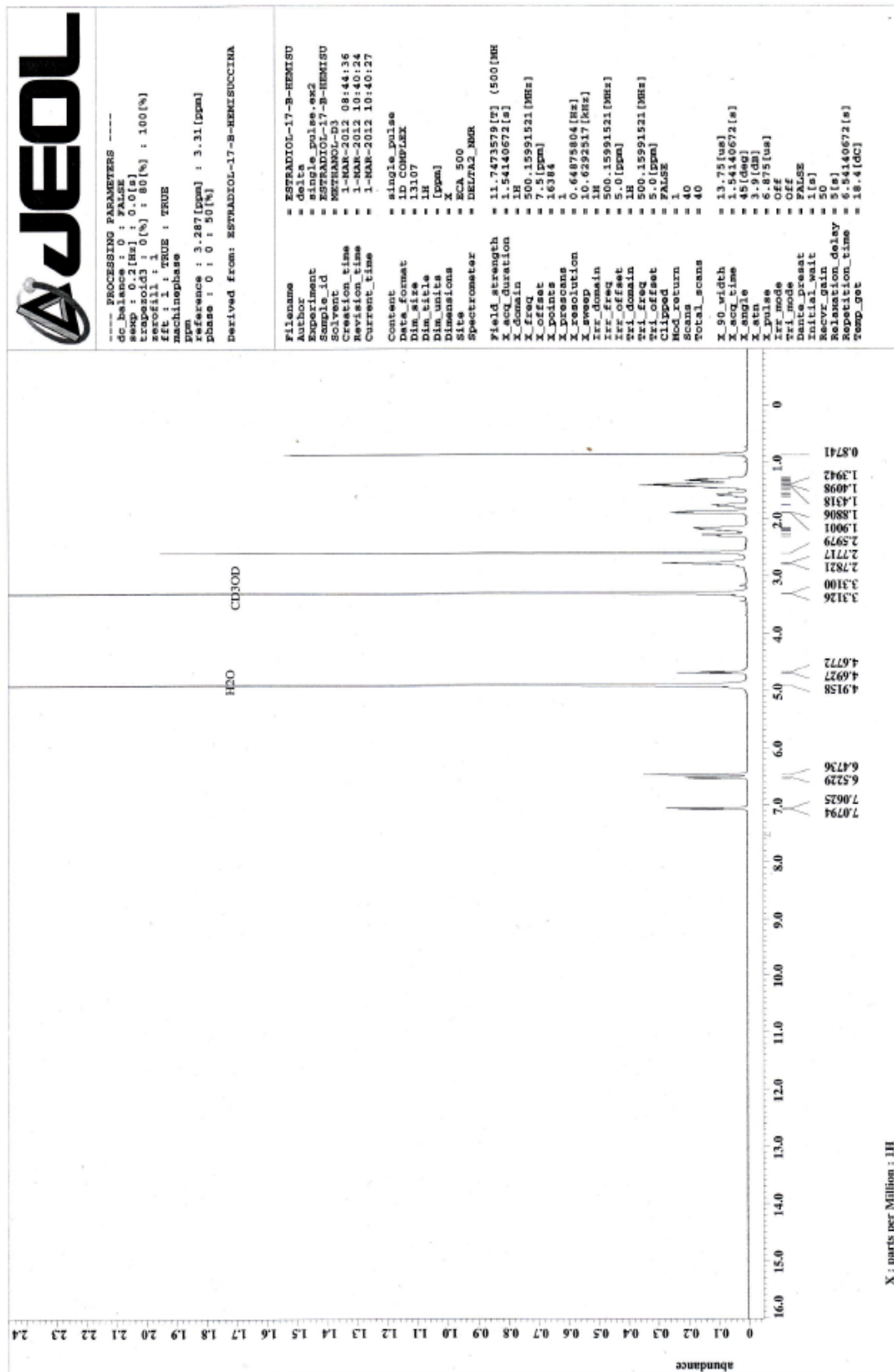
 Filename = ESTRADIOL-17-B-HEMISU
 Subdir = single pulse.exp
 Experiment = ESTRADIOL-17-B-HEMISU
 Sample_id = METHANOL-03
 Solvent = 1-MAR-2012 08:44:36
 Creation_time = 1-MAR-2012 10:40:34
 Revision_time = 1-MAR-2012 10:42:06
 Current_time
 Content = single pulse
 Data_format = ID COMPLEX
 Dim_size = 13107
 Dim_title = IN
 Dim_units = [ppm]
 Dimensions = X
 Site = ECA 500
 Spectrometer = DELTAZ_NMR

Field strength = 11.7473579 [T] (500 [MH
 X_acq_duration = 1.54140672 [s]
 X_domain = IN
 X_freq = 500.15991521 [MHz]
 X_offset = 7.5 [ppm]
 X_points = 16384
 X_resolution = 0.64875804 [Hz]
 X_sweep = 10.6292817 [kHz]
 X_swap = IN
 Irr_domain = 500.15991521 [MHz]
 Irr_freq = 5.0 [ppm]
 Irr_offset = IN
 Tri_domain = 500.15991521 [MHz]
 Tri_freq = 5.0 [ppm]
 Tri_offset = FALSE
 Clipped = FALSE
 Mod_return = 1
 Scans = 40
 Total_scans = 40
 X_90_width = 13.75 [us]
 X_acq_time = 1.54140672 [s]
 X_delay = 3.9 [us]
 X_gate = 3.9 [us]
 X_pulse = 6.875 [us]
 Irr_mode = Off
 Tri_mode = Off
 Dante_preset = FALSE
 Initial_wait = [s]
 Repeat_delay = 2 [s]
 Repetition_time = 6.54140672 [s]
 Temp_get = 18.4 [C]

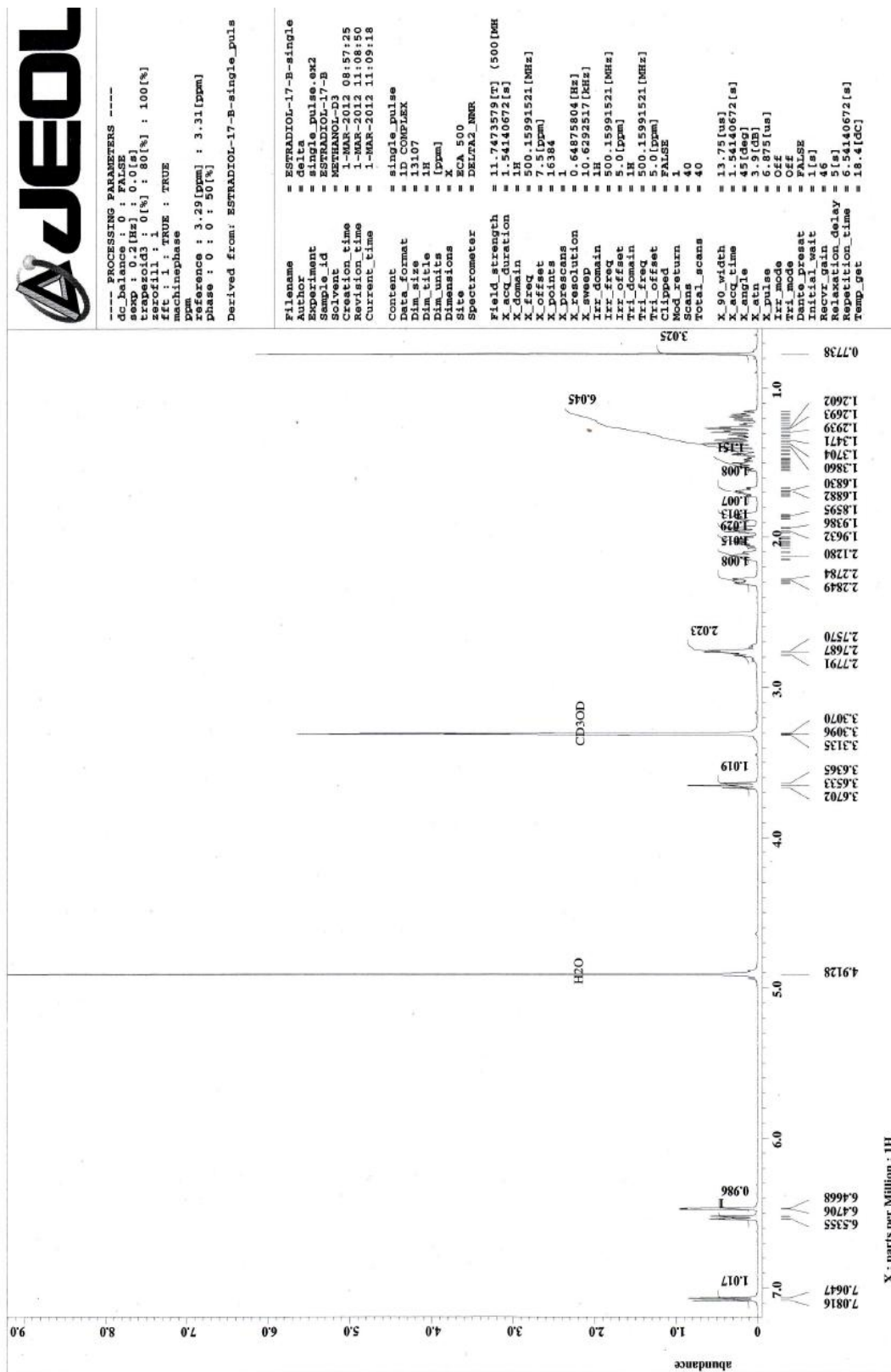
(Lanjutan).
Spektrum Histamin



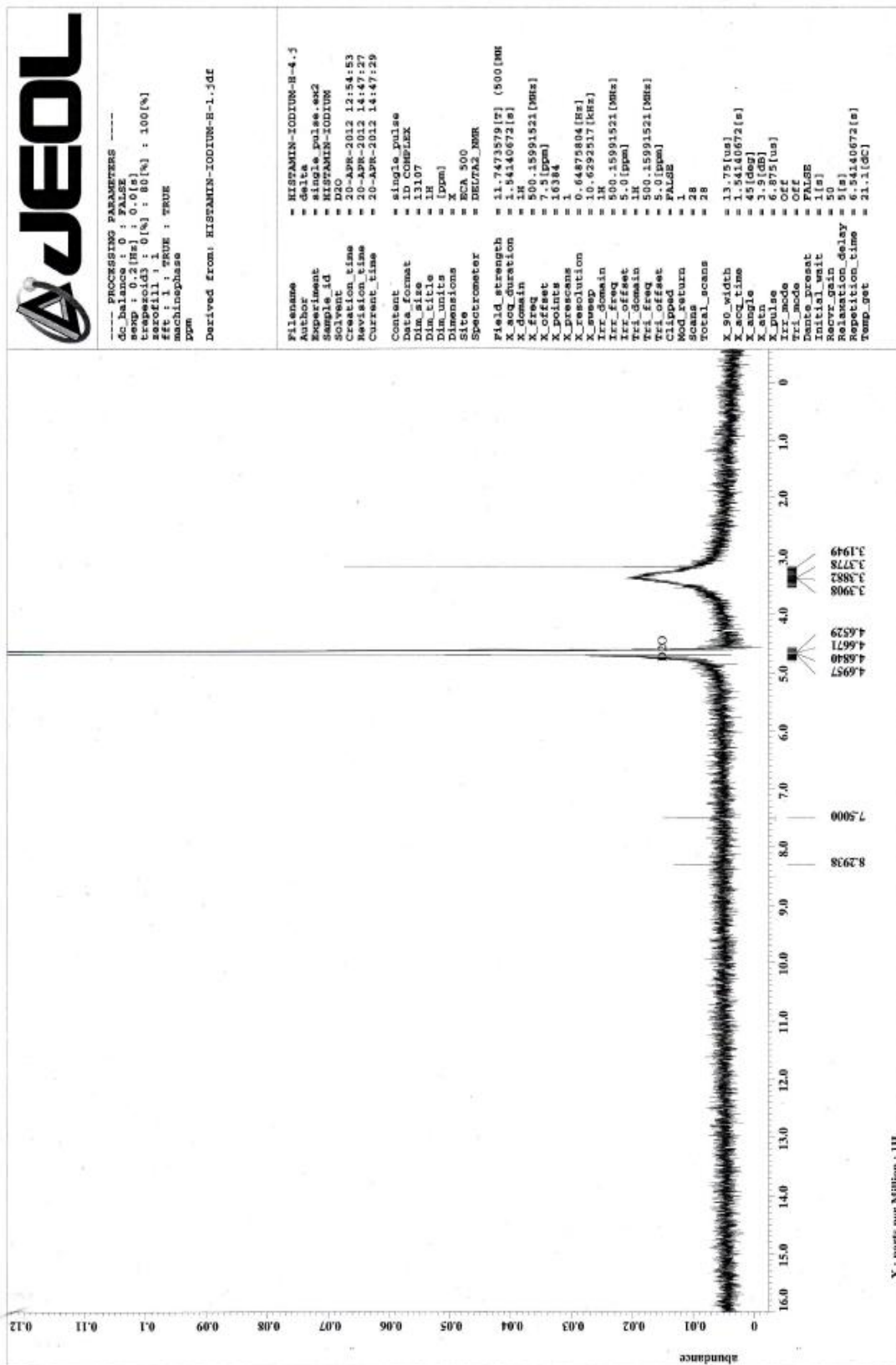
(Lanjutan).
Spektrum estradiol-17β-hemisuksinat



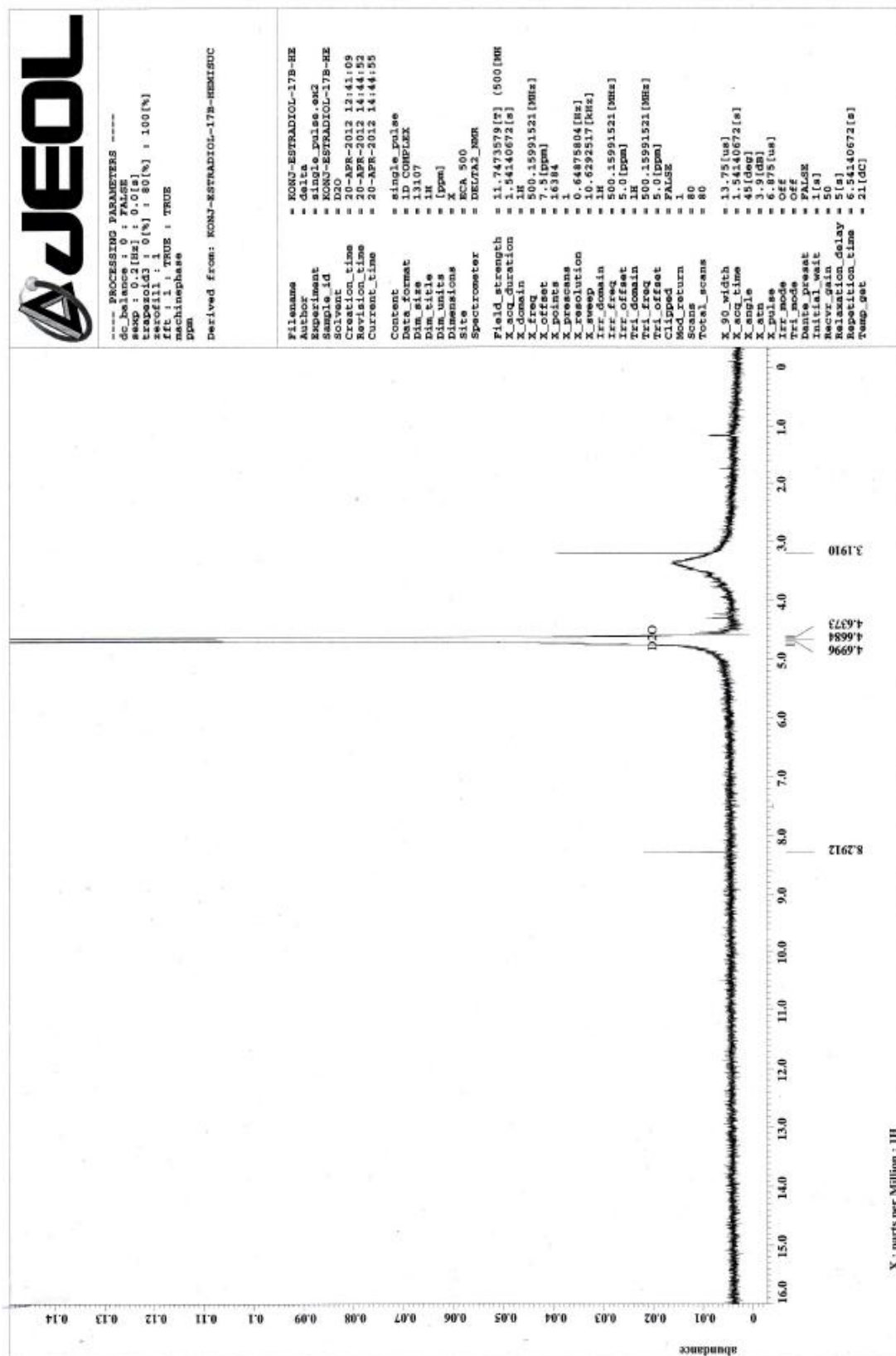
(Lanjutan).
Spektrum estradiol-17β-hemisuksinat



(Lanjutan).
Spektrum I-Histamin

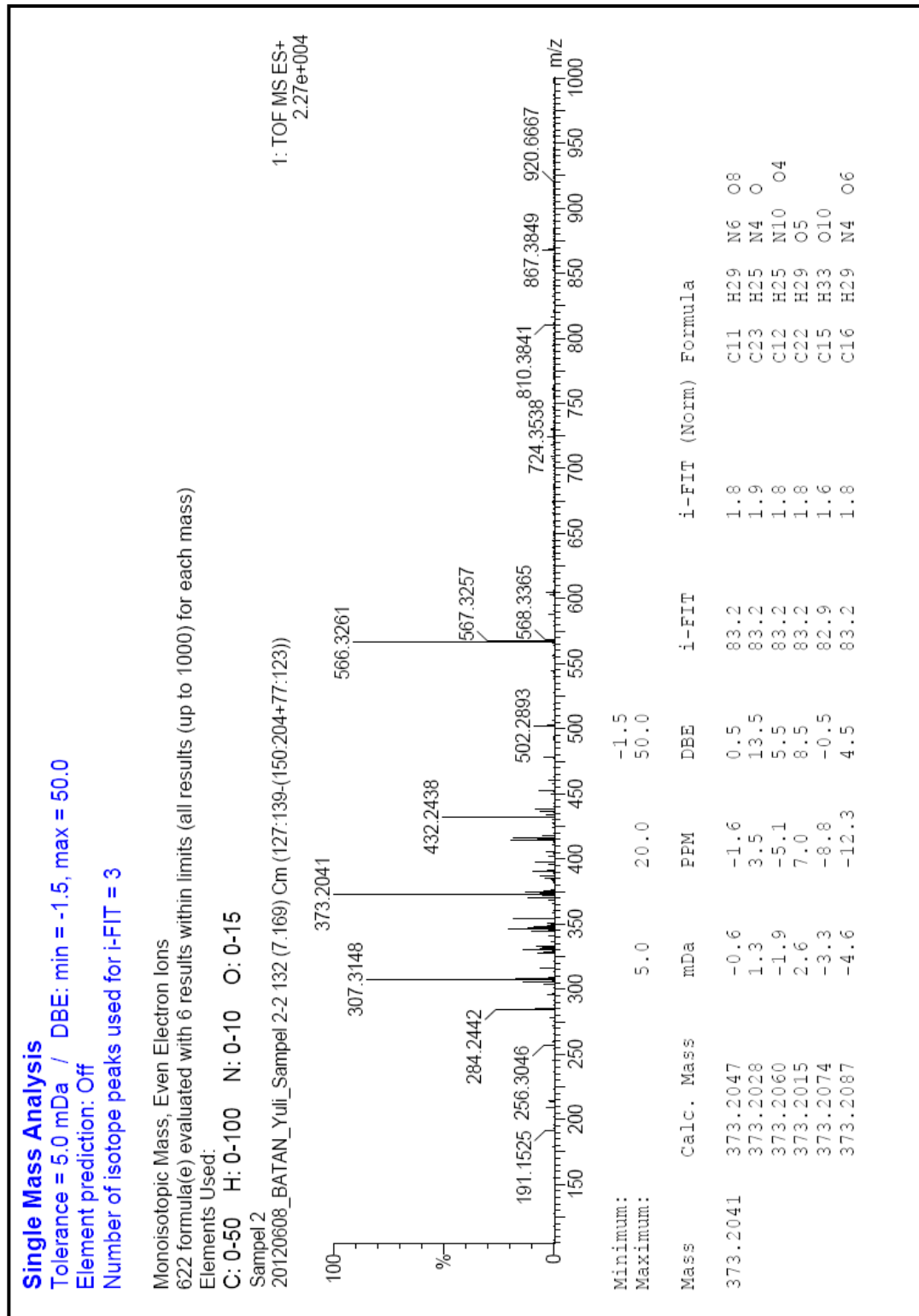


(Lanjutan).

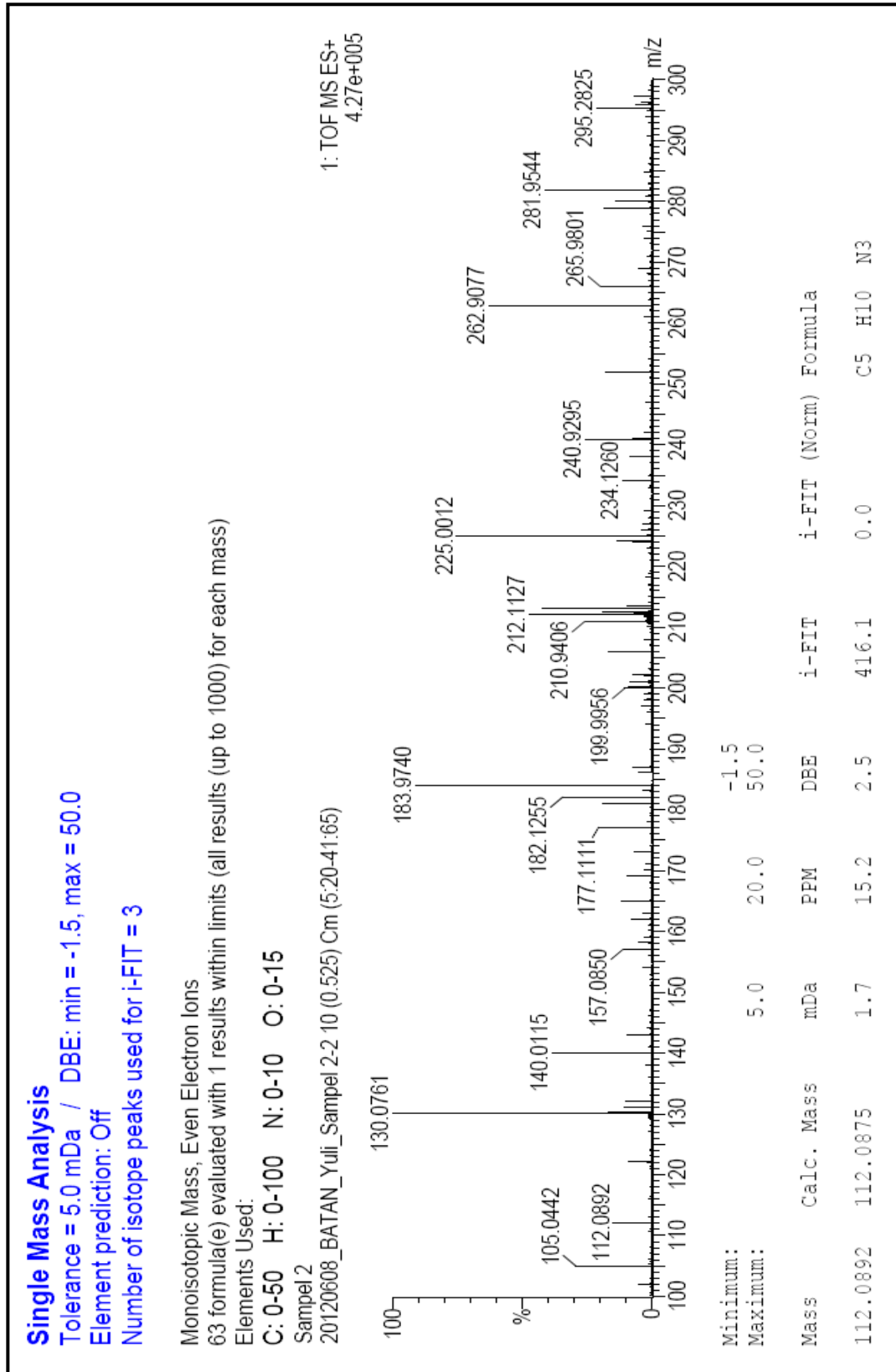
Spektrum I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin

Lampiran 11. Karakterisasi hasil sintesis cara "dingin" dengan spektrofotometer massa

Spektrum MS dengan fragmen estradiol-17 β -hemisuksinat (Mr = 372)

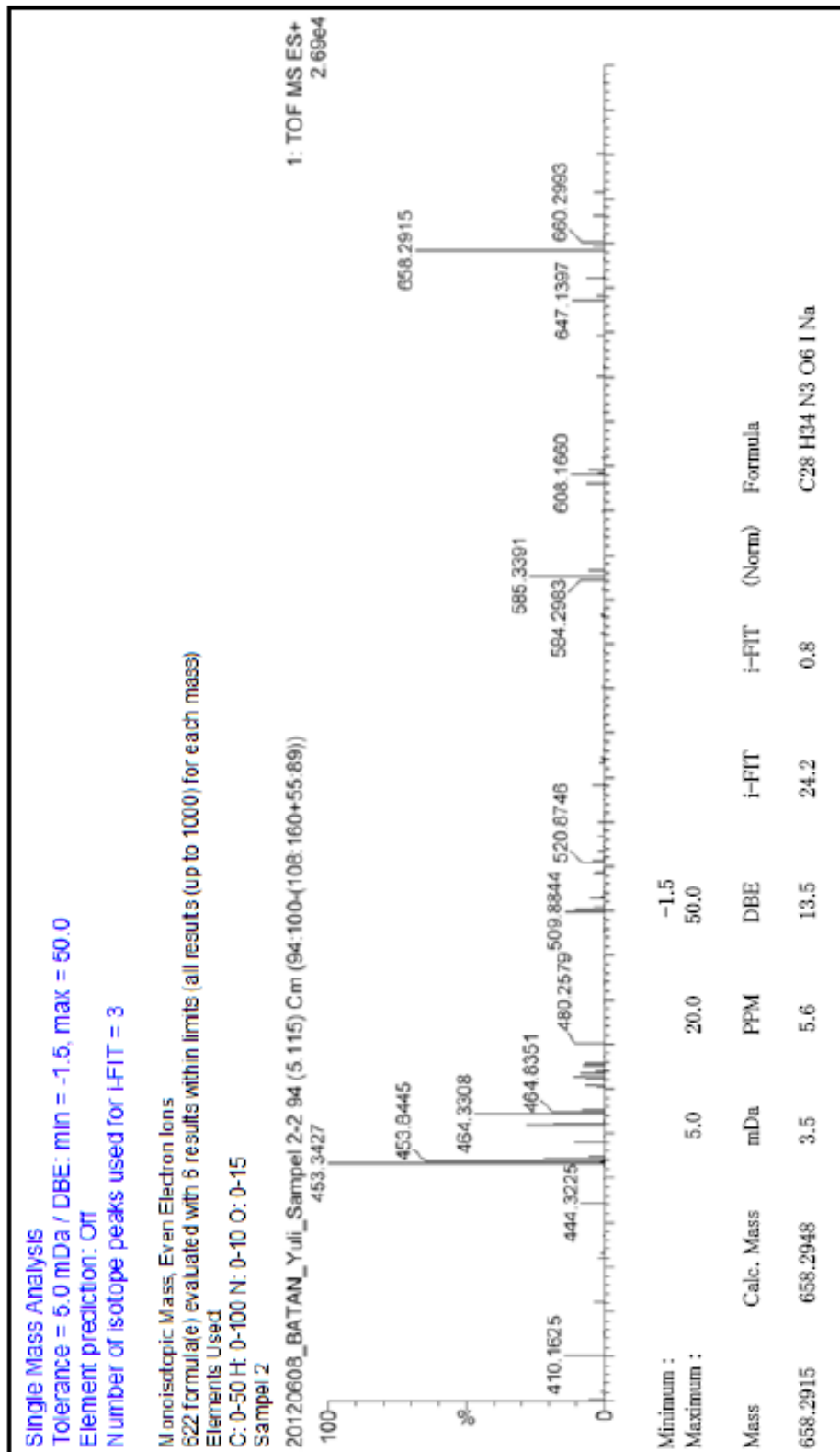


(Lanjutan)

Spektrum MS dengan fragmen histamin ($M_r = 111$)

(Lanjutan)

Spektrum MS senyawa hasil konjugasi (I-estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin) (Mr = 658)



Lampiran 12. Contoh perhitungan rendemen penandaan dan konsentrasi perunut (^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin)

Estradiol-17 β -hemisuksinat yang digunakan untuk penandaan sebanyak 1,6 mg :
Sebanyak 1600 μg Estradiol-17 β -hemisuksinat yang diaktivasi dengan isobutilkloroformat dengan volume akhir 1400 μL .

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi akhir Estradiol-17}\beta\text{-hemisuksinat} &= 1600 \mu\text{g}/1400 \mu\text{L} \\ &= 1,143 \mu\text{g}/\mu\text{L}\end{aligned}$$

Sebanyak 100 μL Estradiol-17 β -hemisuksinat teraktivasi dikongjugasikan dengan ^{125}I -histamin.

$$\begin{aligned}\text{Jumlah } ^{125}\text{I}\text{-estradiol-17}\beta\text{-hemisuksinat-iodohistamin dalam } 100 \mu\text{L} : \\ &= 1,143 \mu\text{g}/\mu\text{L} \times 100 \mu\text{L} \\ &= 114,3 \mu\text{g}\end{aligned}$$

Hasil konjugasi dimurnikan secara ekstraksi dengan toluen, dengan hasil sebagai berikut :

| Fase | Cacahan, cpm/mL |
|---|-----------------|
| Organik 1 | 3.692.499 |
| Organik 2 | 6.013.390 |
| Fase air | 400.206 |
| Total cacahan | 10.106.095 |
| Rendemen = Organik 2/Total cacahan x 100% | 59,50% |

Rendemen pemurnian yang diperoleh sebesar 59,50% dengan volume 200 μL , maka jumlah ^{125}I -sstradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin adalah :

$$\begin{aligned}&= 59,50\% \times 114,3 \mu\text{g} \\ &= 68,008 \mu\text{g}\end{aligned}$$

Sebanyak 200 μL ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin tersebut kemudian dimurnikan dengan pelat KLT kaca dan diperoleh rendemen sebesar 97,8% pada $R_f = 0,8$. Pada $R_f 0,8$ tersebut dikerok dan dilarutkan dalam 500 μL etanol.

(Lanjutan)

Jadi jumlah ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin yang diperoleh setelah pemurnian adalah = $97,8\% \times 68,008 \mu\text{g}$
 $= 66,512 \mu\text{g}$

Konsentrasi akhir ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin dengan volume 500 μL adalah = $66,512 \mu\text{g} / 500 \mu\text{L}$
 $= 0,133 \mu\text{g}/\mu\text{L}$
 $= 133 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Konsentrasi ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin (perunut) pekat adalah 133 $\text{ng}/\mu\text{L}$, untuk digunakan dalam pengujian perunut diencerkan 100 kali untuk mendapatkan cacahan $\pm 100.000 \text{ cpm}$, jadi konsentrasi perunut setelah diencerkan 100 kali adalah 1,33 $\text{ng}/\mu\text{L}$ dengan volume perunut 100 μL .

Setelah dilakukan assay diperoleh data cacahan *total binding* (TB), *non specific binding* (NSB) dan *total added*. Dengan menggunakan program konversi akan diperoleh nilai konsentrasi radioligan (ligan bertanda) yang berikatan dengan reseptor.

Contoh :

Nilai cacahan TB = 4294 cpm dengan program konversi diperoleh nilai konsentrasi TB adalah = 351.679 nM

Nilai cacahan NSB = 876 cpm dengan program konversi diperoleh nilai konsentrasi NSB adalah = 71.744 nM.

Jadi nilai *specific binding* (SP) = TB – NSB
 $= 351.679 \text{ nM} - 71.744 \text{ nM}$
 $= 279.935 \text{ nM}$

Untuk membuat kurva Rosenthal plot diperlukan data *bound* dan *free*, *bound* = SP sedangkan *free* adalah *total added* dikurangi *bound*, untuk sumbu Y adalah *bound/free*.

(Lanjutan)

$$\begin{aligned} \text{Free} &= \text{total added} - \text{bound} \\ &= 827.942 \text{ nM} - 279.935 \text{ nM} \\ &= 548.007 \text{ nM} \end{aligned}$$

(Lanjutan)

$$\begin{aligned} \text{Bound/free} &= 279.935 \text{ nM} / 548.007 \text{ nM} \\ &= 0,510823767 \text{ nM} \end{aligned}$$

Dengan cara perhitungan yang sama dilakukan terhadap semua data cacahan sehingga diperoleh data *bound* dan *bound/free* yang digunakan untuk membuat kurva Rosenthal Plot.

Dari kurva Rosenthal plot diperoleh persamaan regresi dengan persamaan :

$$y = -139,05x + 336,1$$

Dari persamaan tersebut, maka dapat dihitung konstanta disosiasi (K_d) :

$$\begin{aligned} K_d &= - (1/\text{slope}) \\ &= - (1/-139,05) \\ &= 7,192 \times 10^{-3} \text{ nM} \end{aligned}$$

Ikatan maksimum = B_{max} = intersep = 336,1 nM

Lampiran 13. Tabel data cacahan dan konsentrasi hasil pengujian SPA

| Cacahan, cpm | | | | | |
|--------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------|
| NO | Konsentrasi estradiol | <i>Total Binding</i> (TB) | <i>Non Spesific Binding</i> (NSB) | <i>Specific Binding</i> (SP) | <i>Total added</i> |
| 1 | 1 : 01 | 4294 | 876 | 3418 | 186541 |
| 2 | 1 : 02 | 3202 | 740 | 2462 | 107649 |
| 3 | 1 : 04 | 590 | 214 | 376 | 51865 |
| 4 | 1 : 08 | 220 | 66 | 154 | 24998 |
| 5 | 1 : 16 | 144 | 30 | 114 | 12978 |

Lampiran 14. Tabel Hasil perhitungan ^{125}I -estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin setelah dihitung dengan program konversi

| Konsentrasi estradiol (nM) | <i>Total Binding</i> (nM) | <i>Non specific Binding</i> (nM) | <i>Specific binding</i> (nM) | <i>Total added</i> (nM) | <i>Free</i> (nM) | <i>Specific binding</i> (nM) | <i>Bound/free</i> (nM) |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------|------------------------------|------------------------|
| 0,082 | 351,679 | 71,744 | 279,935 | 827,942 | 548,007 | 279,935 | 0,511 |
| 0,041 | 262,244 | 60,606 | 201,638 | 413,971 | 212,333 | 201,638 | 0,949 |
| 0,021 | 108,108 | 32,105 | 76,003 | 119,214 | 43,210 | 76,003 | 1,758 |
| 0,010 | 33,906 | 7,453 | 26,453 | 39,451 | 12,997 | 26,453 | 2,035 |
| 0,005 | 11,794 | 2,457 | 9,337 | 12,978 | 3,641 | 9,337 | 2,564 |

Lampiran 15. Tampilan situs Protein Data Bank (PDB)

The screenshot displays the Protein Data Bank (PDB) website interface. The browser address bar shows the URL: <http://www.pdb.org/pdb/structure/1G50>. The page header includes the PDB logo and the text: "A MEMBER OF THE RCSB PDB An Information Portal to Biological Macromolecular Structures As of Tuesday May 31, 2011 at 5 PM PDT there are 73503 Structures | PDB Statistics".

The main content area displays the entry for **1G50**, titled "CRYSTAL STRUCTURE OF A WILD TYPE HER ALPHA LBD AT 2.9 ANGSTROM RESOLUTION". The DOI is [10.2210/pdb1g50/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1g50/pdb). The primary citation is listed as "Related Citations in PDB Entry (REMARK 1)".

The molecular description section provides the following details:

- Classification:** DNA Binding Protein
- Structure Weight:** 85640.36
- Molecule:** ESTROGEN RECEPTOR
- Polymer:** 1
- Type:** polypeptide(L)
- Length:** 247
- Chains:** A, B, C

The source section indicates the polymer is from *Escherichia coli*. A 3D ribbon diagram of the protein structure is shown on the right, labeled "Biological Assembly 1". The interface includes navigation tabs for Summary, Sequence, Annotations, Seq. Similarity, 3D Similarity, Literature, Biol. & Chem., Methods, Geometry, and Links. The left sidebar contains navigation links for MyPDB, Home, Deposition, and Search.

Lampiran 16. Tampilan data file dlj hasil *docking* estradiol

FINAL LAMARCKIAN GENETIC ALGORITHM DOCKED STATE

```

State:          95.547  19.194  28.409   0.249 -0.848 -0.468 121.338  -
159.07  -71.88

DOCKED: MODEL          59
DOCKED: USER      Run = 59
DOCKED: USER      DPF = estmodel_2.dpf
DOCKED: USER
DOCKED: USER      Estimated Free Energy of Binding      =  -8.17 kcal/mol
[=(1)+(2)+(3)-(4)]
DOCKED: USER      Estimated Inhibition Constant, Ki    =   1.02 uM
(micromolar) [Temperature = 298.15 K]
DOCKED: USER
DOCKED: USER      (1) Final Intermolecular Energy      =  -8.77 kcal/mol
DOCKED: USER      vdW + Hbond + desolv Energy          =  -8.79 kcal/mol
DOCKED: USER      Electrostatic Energy                =   +0.02 kcal/mol
DOCKED: USER      (2) Final Total Internal Energy      =   +0.05 kcal/mol
DOCKED: USER      (3) Torsional Free Energy           =   +0.60 kcal/mol
DOCKED: USER      (4) Unbound System's Energy [(2)]   =   +0.05 kcal/mol
DOCKED: USER
DOCKED: USER

```

Lampiran 17. Tampilan data file dlj hasil *docking* ¹²⁵Iestradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin

FINAL LAMARCKIAN GENETIC ALGORITHM DOCKED STATE

State: 110.529 26.487 32.485 0.683 -0.024 0.730 -124.980 -
180.00 49.59 -110.61 -66.16 148.06 -93.62 -132.52 -92.42 40.90
32.20 -154.36

DOCKED: MODEL 8
DOCKED: USER Run = 8
DOCKED: USER DPF = estligan2_NEW.dpf
DOCKED: USER
DOCKED: USER Estimated Free Energy of Binding = +30.08 kcal/mol
[=(1)+(2)+(3)-(4)]
DOCKED: USER
DOCKED: USER (1) Final Intermolecular Energy = +26.80 kcal/mol
DOCKED: USER vdW + Hbond + desolv Energy = +26.88 kcal/mol
DOCKED: USER Electrostatic Energy = -0.09 kcal/mol
DOCKED: USER (2) Final Total Internal Energy = +17.41 kcal/mol
DOCKED: USER (3) Torsional Free Energy = +8.28 kcal/mol
DOCKED: USER (4) Unbound System's Energy [=(2)] = +17.41 kcal/mol
DOCKED: USER

Lampiran 18. Tampilan hasil *docking* ^{125}I estradiol-17 β -hemisuksinat-iodohistamin

