

DISERTASI

HAMBATAN INISIASI KARSINOGENESIS OLEH (-)-EPIGALOKATEKIN GALAT MELALUI MEKANISME PENINGKATAN AKTIFITAS O⁶-ALKILGUANIN-DNA ALKILTRANSFERASE

**(Suatu Pendekatan Biologi Molekuler untuk Mendapatkan Senyawa
Penawar Karsinogen)**



DJOKO AGUS PURWANTO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2000**

**HAMBATAN INISIASI KARSINOGENESIS OLEH
(-)-EPIGALOKATEKIN GALAT MELALUI MEKANISME
PENINGKATAN AKTIFITAS O⁶-ALKILGUANIN-DNA
ALKILTRANSFERASE**

**(Suatu Pendekatan Biologi Molekuler untuk Mendapatkan Senyawa
Penawar Karsinogen)**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka**

Pada hari : Selasa

Tanggal : 15 Februari 2000

Pukul 10.⁰⁰ WIB

Oleh :

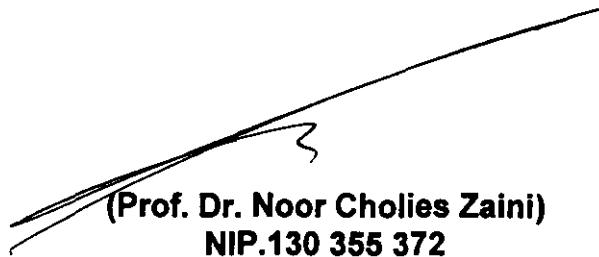
**DJOKO AGUS PURWANTO
NIM : 0994110778/D**

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui
Tanggal 30 Mei 2000

Oleh :

Promotor



(Prof. Dr. Noor Cholies Zaini)
NIP.130 355 372

Ko-promotor



(dr. Sofia Mubarika Harjana, M.Med.Sc., Ph.D.)
NIP. 130 515 563

Telah diuji pada ujian tertutup
tanggal 14 Oktober 1999

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof.Drs. Soemadi, Apt.
Anggota : Prof.Dr. Noor Cholies Zaini
Sofia Mubarika, dr., M.Med.Sc., Ph.D.
Prof. Sri Utari Purnomo, dr.
Dr.Soehartono Taat Putra, dr., MS.
Dr. M. Zainuddin, Apt.
Sismindari, Dra., Apt., S.U., Ph.D.
Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 10298/JO3/PP/1999
Tanggal 22 Oktober 1999

UCAPAN TERIMA KASIH

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT., atas rahmat dan karuniaNya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya, mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, Apt sebagai promotor yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing dan memberi dorongan baik moril maupun materiil kepada saya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.
2. dr.Sofia Mubarika Harjana, M.Med.Sc, Ph.D. yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing dan memberi dorongan baik moril maupun materiil kepada saya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.
3. Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Proyek URGE yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.
4. Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr., DTMH, Ph.D. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Doktor.
5. Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Soedijono, dr., yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor.
6. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Dr.H. Fasich, Apt dan mantan Dekan Fakultas Farmasi Universitas airlangga Dr. Purwanto, Apt.,

atas kesempatan yang diberikan kepada saya mengikuti pendidikan program Doktor.

7. Para dosen serta guru saya, yang telah mendidik dan mengajarkan ilmu pengetahuan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program Doktor.
8. Direktur Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan fasilitas Laboratorium untuk menyelesaikan disertasi saya.
9. Kepala Laboratorium Rekayasa Genetik, Pusat Antar Universitas, Institut Teknologi Bandung yang telah membantu dan membarikan fasilitas laboratorium untuk penyelesaian disertasi saya.
10. Semua pihak yang telah membantu menyelesaikan disertasi saya, terutama ibu Sukarti Moeljopawiro, Dra., M.App.Sc., Ph.D. staf peneliti Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, ibu Debbie Soefie Retnoningrum, Dra., Ph.D. wakil ketua program Pusat Penelitian Antar Universitas ITB dan bapak Anwar Nidom, Drh., M.S. staf peneliti Tropical Diseases Centre Surabaya yang telah memberi bantuan dan fasilitas penggunaan alat.

Akhir kata, semoga Allah s.w.t. membalas kebaikan bapak dan ibu sekalian dengan pahala yang berlipat ganda.

BINGKASAN

RINGKASAN

Teh memiliki kandungan polifenol flavonol yang disebut katekin (Miyagawa *et al.*, 1997). Di antara senyawa katekin yang terdapat dalam teh, (-)-epigallocatekin galat (EGCG) merupakan komponen yang terbesar (5,7 % b/b) (Wang *et al.*, 1992). EGCG dilaporkan dapat menghambat karsinogenesis, oleh benzo(a)piren (BP) dan 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA) (Huang *et al.*, 1991). Namun sejauh ini mekanisme EGCG menghambat terjadinya inisiasi karsinogenesis belum diperoleh secara pasti.

Sebagai senyawa yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat, maka mekanisme hambatan karsinogenesis EGCG perlu diteliti lebih lanjut. Beberapa peneliti memperkirakan efek hambatan karsinogenesis EGCG memiliki titik tangkap pada sistem perbaikan DNA (Shimoi *et al.*, 1986); Shi *et al.*, 1994) namun sistem perbaikan yang mana masih belum diperoleh penjelasan. Salah satu sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*) yang sangat berperan terhadap hambatan inisiasi karsinogenesis adalah O⁶-alkilguanin-DNA alkiltransferase (AGT) (Jackson *et al.*, 1997). Secara teoritis EGCG dapat meningkatkan aktivitas AGT dengan cara meningkatkan ekspresi gen AGT melalui mekanisme respon adaptif. Dari struktur kimia EGCG yang merupakan ester dari asam galat dan epigallocatekin, struktur resonansi ester terprotonkan memberikan muatan positif terhadap atom karbon karbonil dan atom oksigen karbonil (Fesenden & Fesenden, 1984) sehingga EGCG dapat berinteraksi dengan AGT seperti yang terjadi dengan ion karbanium (CH₃⁺) (Singer & Berg, 1992). Akibat interaksi ini, AGT dapat menjadi aktifator gen AGT sendiri sehingga ekspresinya meningkat (Takano *et al.*, 1988). Meningkatnya ekspresi AGT akan mempercepat proses perbaikan O⁶-metilguanin-DNA sehingga kadarnya menurun (Singer & Berg, 1992). Menurunnya kadar O⁶-metilguanin-DNA ini, akan mencegah mutasi pada proto-onkogen K-ras sehingga inisiasi karsinogenesis dapat dicegah (Lijinsky *et al.*, 1994). Untuk mendapatkan pembuktian dari masalah tersebut, maka perlu dilakukan penelitian secara eksperimental.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan kemampuan EGCG dalam meningkatkan aktifitas gen O⁶-alkilguanin-DNA alkiltransferase (AGT) sehingga mampu mencegah inisiasi karsinogenesis. Untuk membuktikan kemampuan tersebut maka dilakukan pengukuran aktifitas AGT, kadar O⁶-metilguanin DNA dan analisis hambatan terjadinya mutasi pada proto-onkogen K-ras kodon 12, 13 ekson 1 dan kodon 61 ekson 2 oleh MNU.

Percobaan dilakukan secara *in vitro* menggunakan kultur hepatosit tikus. Hasil yang dicapai pada penelitian ini adalah bahwa dalam selang waktu 12-48 jam, EGCG pada kadar 8,3 ppm hingga 66,7 ppm dapat meningkatkan aktifitas AGT dari 1,4 hingga 2,8 kali lebih besar dari kondisi konstitutif yang diukur dengan Liquid Scintillation Counter (LSC). Untuk menunjukkan bahwa telah terjadi peningkatan AGT, maka ditentukan kadar O⁶-metilguanin-DNA dengan menggunakan HPLC yang dilanjutkan dengan LSC. Pemberian EGCG 66,7 ppm mampu mencegah pembentukan O⁶-metilguanin yang diinduksi oleh MNU (48 µM) sebesar 92,6%. EGCG 33,3

ppm terbukti dapat mencegah terjadinya mutasi pada proto-onkogen *K-ras* yang diinduksi oleh MNU 48 μM . Hal ini menunjukkan kemampuan EGCG dalam menghambat inisiasi karsinogenesis

Dari penelitian ini disarankan untuk mencari dosis EGCG yang tepat, mempelajari hubungan antara struktur kimia dan aktifitas AGT, mempelajari pengaruh EGCG terhadap ekspresi gen AGT pada tingkat mRNA, dan menginformasikan kepada masyarakat tentang manfaat teh hijau untuk pencegahan kanker.

ABSTRACT

ABSTRACT

(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) is a major component of tea catechin, which was reported to inhibit cancer development induced by chemical carcinogen. However, it is still not known how does the mechanism occur. In this study, the role of EGCG on the enhancement of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) in primarily rat liver cell culture was evaluated using Liquid Scintillation Counter method. The result showed that in the range of 12-48 hour after various concentrations (8.3-66.7 ppm) of single dose EGCG treatments, the AUC (area under curve) of AGT activity was increased by 1.4- to 2.8-fold ($p < 0.01$) than the constitutive level. To confirm that the expression of AGT increased by EGCG treatment, it could be shown by the decreased of O⁶-methylguanine-DNA induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU). The evidence showed that the formation of this O⁶-methylguanine-DNA by MNU at the highest concentration (48 μ M) could be prevented 92,6 % by EGCG 66,7 ppm in the culture media. Furthermore, mutation of K-ras in codon 12th which had been proven the most frequent mutation caused by chemical carcinogen was also analyzed using PCR-SSCP method, subsequently continued by DNA sequencing. EGCG concentration of 16.6 ppm could prevent K-ras mutation induced by MNU 32 μ M. Result of these studies indicate that EGCG has substantial anti-cancer-initiating activity due to enhancing the AGT expression.

Keyword: (-)-Epigallocatechin gallate, O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, K-ras, PCR-SSCP, DNA sequencing, anti-cancer activity.