

PENANDAAN ASAM LINOLENAT SEBAGAI MODEL ISOLAT BENALU TEH UNTUK DIAGNOSIS KANKER DENGAN RADIONUKLIDA IODIUM-131

Isti Daruwati, Eva Maria Widyasari, Nanny Kartini Oekar

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri-BATAN, Jl. Tamansari No.71 Bandung 40134
e-mail : isti@batan-bdg.go.id

ABSTRAK

PENANDAAN ASAM LINOLENAT SEBAGAI MODEL ISOLAT BENALU TEH UNTUK DIAGNOSIS KANKER DENGAN RADIONUKLIDA IODIUM-131. Penelitian terhadap fraksi aktif benalu teh telah dilaksanakan di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR)-BATAN. Fraksi aktif benalu teh ini memiliki kemampuan inhibisi sebesar 99% terhadap sel kanker. Isolat tersebut adalah senyawa octadeca-8,10,12-triyonic acid yang merupakan senyawa asam lemak tak jenuh rantai panjang dengan tiga buah ikatan rangkap tiga. Struktur fraksi aktif benalu teh tersebut mirip dengan asam linolenat yang merupakan senyawa asam lemak rantai panjang dengan tiga buah ikatan rangkap dua. Kesamaan jumlah ikatan rangkap asam linolenat dengan fraksi aktif benalu teh dijadikan sebagai dasar untuk studi awal penandaan. Lingkup penelitian diarahkan pada pencarian kondisi optimum penandaan asam linolenat dengan radionuklida iodium-131. Penandaan dilakukan dengan metode iodinasi menggunakan KIO_3 sebagai oksidator $Na^{131}I$ sehingga mampu mengadisi senyawa asam linolenat dan untuk menghentikan reaksi digunakan reduktor natrium metabisulfit. Penentuan hasil penandaan dilakukan dengan metode kromatografi kertas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penandaan yang terbaik dilakukan dengan menggunakan oksidator KIO_3 dengan kemurnian radiokimia 99,44% dalam pelarut VCO dan efisiensi penandaan sebesar 69,9 %. Stabilitas larutan memiliki kemurnian radiokimia yang tinggi hingga 10 hari penyimpanan dalam lemari es, yaitu 96,85 % dalam pelarut kloroform dan 98,33% dalam pelarut VCO.

Kata kunci : penandaan, asam linolenat, Iodium-131, isolat benalu teh.

ABSTRACT

A STUDY ON LABELLING OF LINOLENIC ACID AS A MODEL OF ISOLATED BENALU TEH FOR CANCER DIAGNOSIS WITH IODINE-131. A study on active fraction of benalu teh has been carried out at Center for Application of Isotope and Radiation Technology - BATAN. This benalu teh active fraction has inhibition capability about 99% to the cancer cell. The isolated fraction is octadeca-8,10,12-triyonic acid compound which have long chain unsaturated fatty acid compound with three triple bonds. The Benalu teh active fraction has similar structure with linolenic acid which is a long chain unsaturated fatty acid with three triple bonds. Based on this similarity, the study of labelling of linolenic acid with iodine-131 has been conducted. The research was focused on optimum conditions for labelling of linolenic acid using Iodine-131 radionuclide. Labelling with iodine-131 was conducted using KIO_3 as an oxidizing agent, which can additionated linolenic acid and sodium metabisulfit for ending the reaction. Labelling efficiency determination was conducted using paper chromatography technique. The result showed that the optimum condition achieved by using KIO_3 as an oxidizing agent that gave radiochemical purity of 99,44% in virgin coconut oil, and labelling efficiency of about 69,9%. The labelled compound has high radiochemical purity i.e 96,85% in chloroform and 98,33% virgin coconut oil that was stable until 10 days in refrigerator.

Key words : labelling, linolenic acid, Iodine-131, isolated of Benalu the

1. PENDAHULUAN

Asam linolenat merupakan asam lemak tak jenuh esensial yang memiliki 18 rantai karbon dengan 3 ikatan rangkap dua pada posisi C9, C12 dan C15. Berdasarkan posisi ikatan rangkapnya, senyawa ini dikelompokkan ke dalam golongan asam lemak Omega 3 [1]. Di dalam tubuh, asam linolenat merupakan prekursor dalam pembentukan DHA (Asam Dokosaheksaenoat) yang penting bagi tubuh, yaitu untuk mendukung tumbuh kembang otak dan proses penglihatan; menurunkan kadar kolesterol darah; serta mencegah aterosklerosis, stroke dan penyakit jantung koroner. Asam linolenat banyak ditemukan didalam sayuran, biji-bijian, susu dan ikan [1,2].

Pada tahun 2002, Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi BATAN telah melakukan penelitian terhadap zat anti kanker dari fraksi aktif benalu teh (*Scurulla artopurpurea* (BL) DANS). Benalu teh merupakan tanaman parasit yang tumbuh pada pohon teh (*Thea sinensis*). Isolasi komponen kimia dari benalu teh ditemukan 16 isolat murni. Berdasarkan hasil *bioassay* terhadap ke-16 isolat tersebut, ditemukan bahwa *octadeca-8,10,12-triionic acid* sangat aktif menghambat invasi sel kanker secara *in vitro* dengan nilai inhibisi 99% pada konsentrasi 10 μ g/mL [3].

Senyawa *octadeca-8,10,12-triionic acid* merupakan asam lemak tak jenuh rantai panjang dengan tiga buah ikatan rangkap tiga [3,4]. Baik dengan metode pengujian *in vitro* maupun *in vivo* yang dikembangkan Hitoshi Akedo, diketahui bahwa zat ini tidak membunuh sel kanker, melainkan menghambat invasi sel kanker sehingga sel tidak mengalami metastasis [5,6].

Rky Zee-Cheng dalam tulisannya mengenai penelitian anti kanker tanaman benalu dalam jurnal *Drugs of the Future* mengatakan, pasien penderita kanker yang diberi ekstrak benalu dari spesies *Viscum album* menunjukkan perbaikan pada DNA dalam limfosit dan sel kekebalan tubuh [7]. Zee-Cheng menyatakan bahwa senyawa bioaktif yang berperan sebagai antikanker adalah petida, oligisakarida, alkaloid, polifenol, dan flavanoid [7].

Ruang lingkup penelitian ini diarahkan kepada penandaan fraksi aktif benalu teh tersebut dalam rangka menunjang pelayanan kesehatan masyarakat dalam diagnosis dan terapi kanker. Sebagai penelitian awal, penandaan dilakukan dengan menggunakan senyawa asam lemak rantai panjang yang mirip dengan senyawa *octadeca-8,10,12-triionic acid*.

Senyawa tersebut adalah asam linolenat yang memiliki tiga ikatan rangkap dua. Radionuklida yang digunakan adalah Iodium-131, yang diharapkan dapat mengadisi ikatan rangkap dari asam linolenat setelah mengalami oksidasi menjadi iodomonoklorida. Penelitian sebelumnya telah dilakukan terhadap senyawa asam oleat yang ditandai dengan Iodium-131 [8,9]. Penandaan asam linolenat-¹³¹I yang optimal ditentukan dengan mencari metode penandaan yang ideal menggunakan oksidator Kalium iodat. Selanjutnya menentukan konsentrasi asam linolenat, konsentrasi oksidator, waktu dan suhu penyimpanan sehingga diperoleh kemurnian radiokimia yang tinggi.

2. TATA KERJA

2.1. Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah Na¹³¹I yang diperoleh dari PT. Batan Teknologi, Asam linolenat buatan Sigma, Natrium metabisulfat, Kalium Iodat, Kalium Iodida, Asam Klorida, Ammonium sitrat, Kloroform, VCO, air untuk injeksi buatan IPHA, kertas kromatografi Whatman 1.

Peralatan yang digunakan terdiri dari tabung reaksi, corong pisah, *vortex-mixer* (*Retcsh*), jarum suntik *disposable* (*Terumo*), pencacah gamma saluran tunggal (*Ortec*), *Delux Isotop Calibrator* (*Victoreen*), satu perangkat alat kromatografi kertas, timbangan analitis (*Metler Toledo*), pipet mikro (*ependorf*) dan alat-alat gelas lainnya.

2.2. Pembuatan larutan Iodomonoklorida

Sebanyak 2 mL larutan Kalium Iodida 1M dan 2 mL larutan kalium iodat 0,5M dimasukkan ke dalam vial. Kemudian masukkan 6 mL HCl 10 N. Ekstraksi ICl yang terbentuk dengan kloroform hingga warna merah pada fraksi kloroform hilang.

2.3. Penandaan asam linolenat dengan Na¹³¹I

Sebanyak 25 – 250 μ L asam linolenat konsentrasi 91,4 μ g/ μ L ditambah dengan kloroform hingga volume 500 μ L. Kemudian ditambahkan 100 μ L ICl (konsentrasi 0,03mmol/100 μ L), kocok. Masukkan Na¹³¹I dengan aktivitas 2-3 mCi kocok dengan vortex selama 5 menit. Dinginkan pada suhu 0 – 5 °C

selama 15 menit. Cuci larutan dengan 1 ml Natrium sulfat 0,1 M. Kemudian cuci dengan 1 mL aqua dest. Keringkan dengan Natrium sulfat anhidrat

2.4. Penentuan kemurnian radiokimia asam linolenat-¹³¹I

Kemurnian radiokimia asam linolenat-¹³¹I ditentukan dengan kromatografi kertas menggunakan kertas Whatman 1 dan eluen ammonium sitrat 0,02 M pH 9. Setelah dielusi, kertas dikeringkan dan dipotong tiap cmnya. Selanjutnya dilakukan pencacahan dengan pencacah gamma saluran tunggal. Stabilitas larutan ditentukan dengan menentukan kemurnian radiokimia selama 5 hari berturut-turut.

2.5. Penentuan efisiensi penandaan

Efisiensi penandaan ditentukan dengan membandingkan aktivitas asam linolenat-¹³¹I dengan aktivitas awal (Na¹³¹I).

2.6. Pengaruh pelarut

Pelarut ekstraksi diganti dengan kloroform dan *virgin coconut oil* (VCO)

2.7. Optimasi penandaan dengan memvariasikan jumlah asam linolenat

Dilakukan penandaan dengan memvariasikan asam linolenat konsentrasi 91,4µg/µL dengan pipet 25 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL dan 250 µL.

2.8. Optimasi penandaan dengan memvariasikan konsentrasi ICI sebagai oksidator

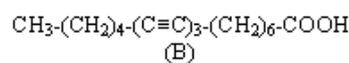
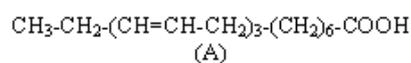
Dilakukan penandaan dengan memvariasikan ICI dengan konsentrasi 3 µmol/µL dengan pipet 25 µL, 50 µL, 100 µL dan 150 µL.

2.9. Optimasi penandaan dengan memvariasikan suhu dan waktu penyimpanan

Larutan hasil penandaan disimpan dalam temperatur kamar dan dalam lemari es kemudian ditentukan kemurnian radiokimia dalam penyimpanan pada hari ke- 0, 3, 4, 5, 6 dan 7.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

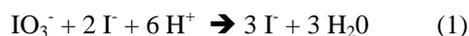
Penandaan asam linolenat dengan radionuklida Iodium-131 dilakukan sebagai studi awal dalam rangka penandaan isolat benalu teh dengan radionuklida yang sama. Pemilihan asam linolenat sebagai model isolat benalu teh didasarkan atas kemiripan struktur kedua senyawa tersebut. Baik asam linolenat maupun isolat benalu teh yaitu *octadeca-8,10,12-triynonic acid* memiliki ikatan rangkap sehingga mudah mengalami adisi oleh Iodium-131. Struktur kedua senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 1 [1,3].



Gambar 1. Struktur Kimia Asam Linolenat (A) dan *octadeca-8,10,12-triynonic acid*(B)

Untuk memperoleh kondisi optimum penandaan, terlebih dahulu dibuat larutan iodomonoklorida (ICI) menggunakan oksidator kalium iodat (KIO₃) dalam suasana asam pekat (HCl). Selanjutnya, iodomonoklorida yang terbentuk diekstraksi dengan kloroform untuk memisahkan dengan pereaksinya antara lain KIO₃ dan KI.

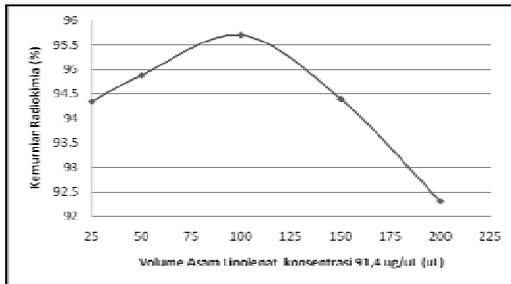
Reaksi yang terjadi seperti persamaan 1 dan 2 sebagai berikut [10]:



Asam linolenat merupakan asam lemak rantai panjang yang mudah larut dalam pelarut semi polar dan non polar sehingga pada tahap penandaan dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat non polar. Beberapa pelarut yang digunakan antara lain VCO dan kloroform. Reaksi penandaan asam linolenat dan iodomonoklorida merupakan reaksi adisi, yaitu ikatan rangkap asam linolenat diganti dengan radionuklida Iodium-131.

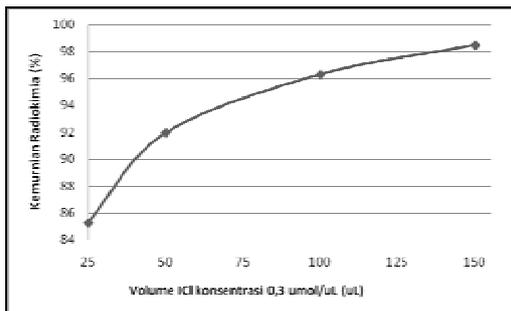
Pada tahap awal penandaan, optimasi dilakukan dengan memvariasikan volume asam linolenat. Pada Gambar 2, kemurnian radiokimia yang diperoleh di atas 90%. Kondisi optimum terjadi pada volume asam linolenat sebesar 100µL yaitu 95,7%. Pada volume asam linolenat yang lebih tinggi tampak adanya penurunan

persentase kemurnian radiokimia namun masih di atas 90%. Dari hasil penandaan ini, volume asam linolenat yang digunakan adalah volume terkecil yaitu 25 μ L karena hasil kemurnian radiokimianya sudah cukup baik dan tidak jauh berbeda dengan kemurnian radiokimia untuk volume asam linolenat 100 μ L. Selain itu, pemilihan volume terkecil juga berdasarkan keterbatasan jumlah asam linolenat dalam kegiatan penelitian ini.



Gambar 2. Optimasi penandaan asam linolenat-¹³¹I dengan variasi volume asam linolenat

Setelah diperoleh volume asam linolenat, selanjutnya dilakukan variasi volume ICI. Pada Gambar 3, terlihat bahwa variasi volume ICI 25 μ L memberikan kemurnian radiokimia sebesar 85,27%. Peningkatan volume ICI memberikan peningkatan persentase kemurnian radiokimia yang diperoleh. Kemurnian radiokimia yang tertinggi diperoleh hingga 98,48% dengan volume 150 μ L.



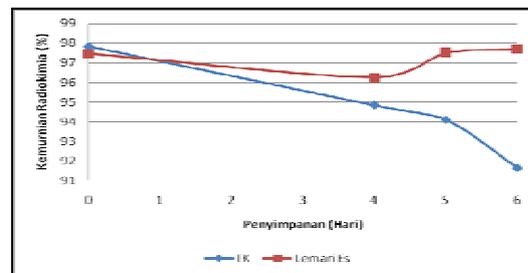
Gambar 3. Optimasi penandaan asam linolenat-¹³¹I dengan variasi volume ICI

Pada penelitian ini, hasil penandaan berupa asam linolenat-¹³¹Iodium dengan pereaksi lainnya seperti asam linolenat, Iodium-131 dan ICI dilakukan dengan metode ekstraksi. Oleh sebab itu, perlu ditentukan efisiensi penandaan dari tiap perlakuan. Seperti ditunjukkan pada Tabel 1, efisiensi penandaan yang diperoleh di

atas 56%. Rendemen yang diperoleh memang relatif rendah, karena volume yang dipisahkan juga relatif rendah yaitu dalam orde mikrogram. Peningkatan efisiensi penandaan dapat dilakukan dengan melakukan pencucian berulang sebanyak 3 kali. Ketrampilan dari peneliti yang mengerjakan tahap ini juga sangat berpengaruh terhadap efisiensi penandaan yang diperoleh.

Tabel 1. Efisiensi Penandaan

Volume ICI dengan asam konsentrasi 0,3 μ mol/ μ L	Aktivitas awal (Na ¹³¹ I) (mCi)	Aktivitas asam linolenat- ¹³¹ I (mCi)	Efisiensi penandaan (%)
25 μ L	0,966	0,675	69,9
50 μ L	1,087	0,610	56,1
100 μ L	1,500	1,017	67,8
150 μ L	1,444	0,924	64,0



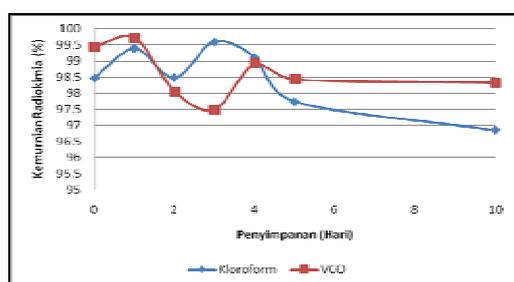
Gambar 4. Optimasi penandaan asam linolenat-¹³¹I dengan variasi suhu penyimpanan

Stabilitas senyawa bertanda yang diperoleh merupakan hal yang sangat penting dalam optimasi penandaan. Stabilitas senyawa bertanda asam linolenat-¹³¹Iodium ditentukan dengan melakukan variasi penyimpanan pada temperatur kamar dan lemari es (4°C) dalam pelarut kloroform. Pada Gambar 4, terlihat bahwa penyimpanan dalam lemari es cenderung menunjukkan hasil yang relatif lebih baik dibandingkan dalam temperatur kamar. Mula-mula senyawa bertanda asam linolenat-¹³¹Iodium memiliki kemurnian radiokimia yang cukup tinggi yaitu 97%. Namun pada penyimpanan temperatur kamar menunjukkan penurunan yang signifikan pada hari keempat sebesar 94,87% selanjutnya terus menurun hingga hari keenam sebesar 91,66%, sedangkan pada penyimpanan dalam lemari es tidak menunjukkan adanya penurunan kemurnian radiokimia yang cukup signifikan.

Pada hari keenam, kemurnian radiokimia yang diperoleh sebesar 97,70%. Walaupun pada

hari keempat tampak adanya penurunan hingga 96,25%, hal ini dianggap tidak berbeda secara signifikan.

Pada Gambar 5, ditampilkan stabilitas senyawa bertanda dalam pelarut yang berbeda. Penentuan stabilitas senyawa bertanda diamati selama 5 hari berturut-turut dan pada hari ke-10. Dua macam pelarut yang digunakan adalah kloroform dan VCO. Kondisi penandaan awal diperoleh kemurnian radiokimia dalam kloroform sebesar 98,47% dan dalam VCO sebesar 99,44%. Selama 10 hari penyimpanan, senyawa bertanda dalam pelarut VCO maupun kloroform menunjukkan stabilitas yang baik yang ditunjukkan oleh persentase kemurnian radiokimia yang cukup tinggi yaitu berturut-turut 98,33% dan 96,85%. Jika dibandingkan antara kedua pelarut tersebut, pelarut VCO lebih menguntungkan dibandingkan kloroform karena pada penyimpanan yang cukup lama dalam lemari es, kloroform cenderung lebih mudah menguap sehingga larutan harus diencerkan kembali sesaat sebelum digunakan, sedangkan dalam pelarut VCO volume larutan relatif tidak berubah sehingga lebih stabil dibandingkan kloroform.



Gambar 5. Stabilitas asam linolenat-¹³¹I dalam pelarut kloroform dan VCO

4. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum penandaan asam linolenat dengan Iodium-131 diperoleh dengan menggunakan oksidator KIO₃. Kemurnian radiokimia yang diperoleh sebesar 99,44% dalam pelarut VCO dengan efisiensi penandaan sebesar 69,9 %. Stabilitas senyawa bertanda memiliki kemurnian radiokimia yang tinggi hingga 10 penyimpanan dalam lemari es, yaitu 96,85% dalam pelarut kloroform dan 98,33% dalam pelarut VCO.

Hasil dari penelitian pendahuluan ini, selanjutnya dapat diterapkan langsung kepada fraksi aktif benalu teh sebagai fraksi aktif

antikanker pada penelitian selanjutnya.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Bapak Kustiwa yang telah banyak membantu dalam kegiatan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. **Wikipedia.** Alpha-linolenic acid (2009. April. 3). Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-linolenic_acid
2. **CONNOR, W.E.,** Importance of n-3 fatty acid in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition.* **71** (suppl) (2000)171S-5S.
3. **OHASHI, K., et al.,** Indonesian medicinal plants XXV. Cancer cell invasion inhibitory effects of chemical constituents in the parasitic plant *Scurulla artopurpurea* (Loranthaceae), *Chemical and Pharmaceutical Buletin,* **51** (3) (2003) 489-492.
4. **OHASHI, K., WINARNO. H., MUKAI, M., SHIBUYA, H.,** Preparation and cancer cell invasion inhibitory effects of C₁₆-alkynic fatty acids, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* **51** (4) (2003) 463-466.
5. **WINARNO, H.,** Senyawa antikanker dari benalu teh, *Kompas,* 30 Desember 2003, hal 10. <http://www2.kompas.com/kompas-cetak/0310/30/inspirasi/657330.htm>
6. **DURYATMO S., FITRIANI V.,** Penelitian benalu teh. <http://software-komputer.blogspot.com/2008/05/penelitian-benalu-teh.html>
7. **CHENG, R.K.-Y.Z.,** Anticancer research on Loranthaceaea plants, *Drugs of The Future,* **22** (1997) 519-530.
8. **SUNARHADIYOSO, WAYAN, R.S.,** Radioiodinasi lemak dan asam lemak dengan metode iodonoklorida, PRAB-670/Sem-64/77, Bandung.
9. **ADAM S.,** Pengaruh beberapa perubahan parameter pada sintesis asam oleat-¹³¹I (Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir, Bandung, 7-9 Februari 1994) Pusat Penelitian Teknik Nuklir, BATAN. (1994)186-189.
10. **ROTH HJ.,BLASCHKE G.,** "Analisis Farmasi". Soebito S., Ed., Gadjah Mada University Press. Yogyakarta, 1998.