

ISOLASI SENYAWA AKTIF DARI *Streptomyces* sp. GMY01 DAN UJI SITOTOKSIK PADA SEL KANKER PAYUDARA SECARA *In Vitro* DAN *In Silico*

INTISARI

Kanker payudara masih menjadi masalah kesehatan utama di dunia karena morbiditas dan mortalitasnya yang masih tinggi. Masalah utama dalam pengobatan kanker adalah terjadinya resistensi terhadap antikanker dan timbulnya efek samping yang cukup serius akibat kemoterapi. Kebutuhan akan antikanker yang sensitif dengan mekanisme kerja yang spesifik sangat diperlukan. Salah satu penghasil molekul baru antikanker yang potensial untuk dikembangkan adalah metabolit sekunder yang dihasilkan oleh aktinomisetes. Penelitian sebelumnya terkait aktinomisetes membuktikan bahwa ekstrak metanol kultur *Streptomyces* sp. GMY01 dari pantai Krakal, Gunung Kidul mempunyai aktivitas sitotoksik sangat kuat pada sel kanker payudara MCF-7 dan T47D dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,6 dan 1,3 ug/mL. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dalam rangka melakukan isolasi dan identifikasi senyawa antikanker payudara yang dihasilkan oleh isolat bakteri *Streptomyces* sp. GMY01 tersebut.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif antikanker payudara dari isolat bakteri *Streptomyces* sp. GMY01. Tahap pertama dilakukan optimasi metode fermentasi dari bakteri *Streptomyces* sp. GMY01 untuk mengetahui metode terbaik untuk fermentasi dari bakteri tersebut menggunakan analisis kemometrik. Isolat *Streptomyces* sp. GMY01 selanjutnya difermentasi kembali dalam volume yang lebih besar menggunakan metode fermentasi terpilih berdasarkan hasil analisis kemometrik untuk mendapatkan ekstrak metanol yang cukup untuk keperluan isolasi. Ekstrak metanol selanjutnya dilakukan fraksinasi dan isolasi menggunakan metode *bioassay guided isolation* untuk mendapatkan senyawa aktif antikanker payudara. Senyawa aktif selanjutnya ditentukan strukturnya menggunakan spektroskopi UV/Vis, *Fourier transform-Infrared* (FT-IR), *liquid chromatography-mass spectroscopy* (LC-MS), ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Tahap selanjutnya dilakukan pengkajian mekanisme aksi secara molekuler dari senyawa aktif hasil isolasi. Uji *in vitro* dilakukan dengan metode *flowcytometry* untuk melihat perubahan siklus sel akibat perlakuan senyawa isolat, dan metode imunositokimia untuk melihat adanya modulasi ekspresi beberapa protein target pada sel MCF-7 akibat perlakuan senyawa uji. Secara *in silico* dilakukan analisis *molecular docking* menggunakan *software Autodock Vina* antara isolat senyawa aktif terhadap beberapa protein target untuk mengkonfirmasi hasil dari uji *in vitro*.

Hasil penelitian terkait optimasi metode kultur berdasarkan analisis kemometrik diketahui bahwa metode kultur menggunakan media *Starch Nitrate Broth* (SNB), wadah *erlenmeyer* biasa dan waktu kultur selama 5 hari menunjukkan hasil dan aktivitas sitotoksik yang terbaik dibandingkan dengan metode kultur yang lain. Hasil isolasi senyawa aktif pada ekstrak metanol bakteri *Streptomyces* sp. GMY01 diketahui bahwa senyawa aktif antikanker pada ekstrak tersebut adalah berupa senyawa *mannotriose*. Isolat senyawa *mannotriose* mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 5,6 ug/ml pada sel kanker MCF-7 dan IC₅₀ sebesar 687 ug/ml pada sel

normal *Vero*. Hasil uji *flowcytometry* diketahui bahwa senyawa isolat *mannotriose* dapat menghambat siklus sel kanker MCF-7 pada fase G2/M. Hasil analisis imunositokimia diketahui bahwa isolat senyawa *mannotriose* mampu menghambat ekspresi protein Bcl-2, COX-2, *Cyclin D1*, *Cyclin E* dan mampu meningkatkan ekspresi protein p53 pada sel MCF-7. Hasil *molecular docking* diketahui bahwa senyawa isolat mempunyai afinitas ikatan yang kuat pada protein Bcl-2, COX-2, *Cyclin D1*, *Cyclin E* dan VEGF dibandingkan dengan beberapa senyawa pembanding yang lain. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa isolat *mannotriose* dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel kanker payudara MCF-7 dengan menghambat fase G2/M dan memacu terjadinya apoptosis, serta mempunyai selektivitas yang baik pada sel normal sehingga dapat menjadi kandidat senyawa antikanker potensial pada kanker payudara.

Kata kunci: *Streptomyces* sp. GMY01, isolasi senyawa, antikanker payudara, *in vitro*, *in silico*

ISOLATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM *Streptomyces* sp. GMY01 AND CYTOTOXIC ACTIVITY ON BREAST CANCER CELLS BY IN VITRO AND IN SILICO STUDY

ABSTRACT

Breast cancer is still a major health problem in the world because of its high morbidity and mortality. The main problem in cancer treatment is the occurrence of resistance to anticancer and the emergence of serious side effects due to chemotherapy. The need for sensitive anticancer with a specific mechanism of action is urgently needed. One of the potential producers of new anticancer molecules to be developed is secondary metabolites produced by actinomycetes. Previous research related to actinomycetes proved that the methanol extract of *Streptomyces* sp. GMY01 from Krakal coast, Gunung Kidul had very strong cytotoxic activity on MCF-7 and T47D breast cancer cells with IC₅₀ values of 0.6 and 1.3 µg/mL, respectively. This research is a follow-up study in order to isolate and identify breast anticancer compounds produced by isolates of *Streptomyces* sp. the GMY01.

In this study, the isolation and identification of active anticancer breast compounds from the isolates of *Streptomyces* sp. GMY01. The first step is to optimize the fermentation method of *Streptomyces* sp. GMY01 to find out the best method for fermentation of these bacteria using chemometric analysis. *Streptomyces* sp. isolates. GMY01 was then fermented again in a larger volume using the selected fermentation method based on the results of chemometric analysis to obtain sufficient methanol extract for isolation purposes. The methanol extract was then fractionated and isolated using the bioassay guided isolation method to obtain the active anticancer compound of the breast. The active compounds were then structurally determined using UV/Vis spectroscopy, Fourier transform-Infrared (FT-IR), liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS), ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The next step is to study the molecular mechanism of action of the isolated active compound. The in vitro test was carried out using the flowcytometry method to see changes in the cell cycle due to the treatment of isolate compounds, and the immunocytochemistry method to see the modulation of the expression of several target proteins in MCF-7 cells due to the treatment of the test compounds. *In silico* molecular docking analysis was performed using Autodock Vina software between isolates of active compounds against several target proteins to confirm the results of the in vitro test.

The results of the research related to the optimization of the culture method based on chemometric analysis showed that the culture method using Starch Nitrate Broth (SNB) media, standard Erlenmeyer container and culture time of 5 days showed the best results and cytotoxic activity compared to other culture methods. The results of the isolation of the active compound in the methanol extract of *Streptomyces* sp. GMY01 is known that the active anticancer compound in the extract is in the form of mannotriose compounds. The mannotriose compound isolate had an IC₅₀ value of 5.6 µg/ml in MCF-7 cancer cells and an IC₅₀ of 687 µg/ml in normal Vero cells. The results of the flowcytometry test showed that the

mannotriose isolate compound could inhibit the MCF-7 cancer cell cycle in the G2/M phase. The results of the immunocytochemical analysis showed that the mannotriose compound isolate was able to inhibit the expression of Bcl-2, COX-2, Cyclin D1, Cyclin E proteins and was able to increase the expression of p53 protein in MCF-7 cells. The results of molecular docking showed that the isolate compound had a strong binding affinity for Bcl-2, COX-2, Cyclin D1, Cyclin E and VEGF proteins compared to several other comparison compounds. The results of this study can be concluded that the compound isolated from mannotriose can inhibit the division and development of MCF-7 breast cancer cells by inhibiting the G2/M phase and promoting apoptosis, and has good selectivity in normal cells so that it can be a candidate for potential anticancer compounds in breast cancer.

Keywords: *Streptomyces* sp. GMY01, compound isolation, anticancer breast, *in vitro*, *in silico*