Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 1, 2002, 88 – 94
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Kajian Mutagenisitas Ifosfamida dan Klorambusil

Rustini*, Sudana Atmawidjaja** dan Kosasih Satiadarma**
*Jurusan Farmasi Universitas Andalas
**Jurusan Farmasi Institut Teknologi Bandung

Diterima : 1 Agustus 2002, Disetujui : 2 September 2002

Abstract

Mutagenicity of antineoplastic alkylating of the nitrogen mustard (iphosphamide and chlorambucil) has been studied by Ames method using *Salmonella typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 and TA 102 bacteria. The test for iphosphamide and chlorambucil with the addition of rat liver homogenate on *S. typhimurium* TA 97a, TA 98, and TA 100. Results showed that the two compounds had a positive effect.

Keywords : Mutagenicity, iphosphamide, chlorambucil

Pendahuluan

Dewasa ini, kanker merupakan salah satu jenis penyakit yang banyak menyebabkan kematian. Kejadian dan jenis kanker berhubungan dengan banyak faktor antara lain jenis kelamin, usia, ras serta zat yang dapat menimbulkan kanker (karsinogen) (Katzung, 1992).

Zat yang bersifat karsinogen ini dapat dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu hidrokarbon aromatik polisiklik, amin aromatik, senyawa pengalkil dan senyawa yang berasal dari alam (Winek, 1977). Salah satu kelompok antineoplastik adalah zat pengalkil, dimana zat pengalkil ini juga dapat menimbulkan kanker sekunder. Untuk menentukan sifat karsinogen suatu senyawa kimia secara tidak langsung dapat dilakukan uji mutagenitas. Ames telah membuktikan bahwa 80 – 90 % senyawa yang bersifat karsinogen juga bersifat mutagen (Ames *et al*, 1975).

Berbagai metoda telah dilakukan untuk uji mutagenisitas senyawa kimia. Pengujian dapat dilakukan dengan hewan percobaan yang memerlukan waktu yang lama dan biaya yang mahal. Sekarang banyak digunakan uji mutagenisitas dengan bakteri, serangga atau sel mamalia. Uji ini memerlukan waktu relatif singkat dan biaya yang murah.

*Corresponding author : Telp. 62-751-71682, Fax: 62-751-73118
E-mail : farmasi-unand@telkom.net

Uji menggunakan bakteri dikenal dengan uji Ames yang menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* galur standar TA 97a, 98, 100 dan 102. Tiap galur uji ini mengandung mutasi histidin. Disamping itu juga harus mempunyai mutasi rfa, mutasi uvrB dan faktor R untuk meningkatkan kepekaan bakteri dalam mendeteksi senyawa mutagen (Elseth, 1984).

Untuk zat mutagen yang tidak aktif sebelum bioaktivasi, maka pengujian memerlukan sistem bioaktivasi yang terdiri dari fraksi mikrosoma hati tikus atau hewan lain. Aktivitas enzim mikrosoma biasanya meningkat bila hewan diinduksi dengan zat penginduksi seperti fenobarbital. Selain itu juga diperlukan penambahan kofaktor pada enzim sebelum inkubasi (Elseth, 1984; Lu, 1995).

Saat ini zat pengalkil banyak digunakan untuk mengobati kanker. Beberapa publikasi menyebutkan bahwa zat pengalkil dapat menyebabkan mutasi. Dengan demikian ada kemungkinan antineoplastik pengalkil juga dapat menyebabkan mutasi. Oleh karena itu perlu dilakukan penentuan sifat mutagen dari antineoplastik pengalkil.

Metode Penelitian

Bahan : Magnesium sulfat, asam sitrat monohidrat, kalium fosfat anhidrat, natrium amonium fosfat, agar, natrium klorida, kalium klorida, magnesium klorida, natrium dihidrogen fosfat, dinatrium hidrogen fosfat, glukosa-6-fosfat, natrium hidroksida,

glukosa, kristal violet, Nutrient Broth No. 2, Bacto Nutrient Broth, NADP, DMSO, ampisilina trihidrat, tetrasiklina, d-biotin, l-histidin, fenobarbitas, 4-nitrokuinolin-N-oksid, ifosfamid dan klorambusil, *S. typhimurium* galur standar TA 97a, 98, 100 dan 102, tikus jantan galur Wistar.

Metode :

Penanganan bakteri uji : Galur bakteri uji diterima dalam bentuk biakan yang diserapakan pada cakram kertas. Kemudian secara aseptik masing-masing cakram kertas diinokulasikan dengan cara goresan pada pelat ampisilina untuk galur TA 97a, 98 dan 100 dan untuk TA 102 pada pelat ampisilina-tetrasiklina. Semua pelat yang sudah digores diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Pelat Master)

Pembuatan biakan semalam : Biakan semalam ini dibuat setiap pengujian. Bakteri dari pelat master diinokulasikan ke dalam media nutrient broth Oxoid No. 2, kemudian diinkubasi dalam inkubator kocok selama 10 – 14 jam pada suhu 37°C. Ukur transmittannya pada panjang gelombang 650 nm.

Konfirmasi sifat genotip galur bakteri uji

Uji butuh histidin: Pada pelat agar tanpa histidin dibuat goresan biakan semalam (kontrol). Pada pelat agar yang mengandung histidin dibuat goresan biakan semalam TA 102, sedangkan pada pelat agar yang mengandung histidin-biotin digoreskan biakan semalam galur TA 97a, 98 dan 100. Pelat-pelat ini diinkubasi pada suhu 37°C 24 jam, amati ada tidaknya pertumbuhan koloni.

Uji mutasi rfa : Pada pelat agar nutrien dituangkan campuran 2 ml top agar dengan 0,1 ml biakan semalam bakteri uji. Setelah top agar memadat, letakkan cakram kertas steril ditengah top agar, kemudian pada pusat cakram diteteskan larutan kristal violet 1 mg/ml sebanyak 0,01 ml, kemudian pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 jam. Amati diameter daerah hambat disekeliling cakram kertas.

Uji mutasi uvrB : Pada pelat agar nutrien, digoreskan biakan semalam bakteri uji secara paralel. Setelah itu tutup cawan Petri dibuka, setengah bagian ditutup dengan kertas karton, bagian yang tidak ditutup disinari lampu ultra violet (15 watt) pada jarak 33 cm selama 8 detik. Kemudian cawan Petri ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12 – 24 jam. Setelah itu diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada bagian yang disinari.

Uji faktor R : Biakan semalam bakteri uji digoreskan pada pelat ampisilina, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

Uji Plasmid pAQ 1 : Uji ini khusus untuk galur TA 102. Pada pelat ampisilina/tetrasiklina digoreskan biakan semalam TA 102. Pada pelat ampisili/tetrasiklin digoreskan biakan semalam TA 102, kemudian pelat diinkubasi pada 37°C 24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

Uji reversi spontan : Ditentukan pada pelat glukosa minimal, 0,2 ml biakan semalam bakteri ditambahkan pada 2 ml top agar yang telah ditambah dengan larutan histidin-biotin, kemudian dicampur dan dituangkan pada pelat glukosa minimal. Inkubasi pada 37°C 48 jam. Setelah itu hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh (revertan).

Pembuatan homogenat hati S-9 : Tikus jantan galur Wistar, bobot ± 200 g diinduksi dengan fenobarbital dosis 75 mg/kg bobot badan setiap hari selama 5 hari berturut-turut. Setelah hari ke lima tikus dibunuh dengan cara dislokasi servikal, kemudian diambil hatinya. Homogenat dibuat dalam wadah yang didinginkan dengan air es serta menggunakan larutan KCl 0,15 M steril dan dingin. Hati segar setelah ditimbang dicuci lebih kurang 20 kali dengan larutan KCl 0,15 M steril dingin ± 1 ml/g hati. Setelah bersih, hati dipotong-potong dengan pisau steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung homogeniser steril dan ditambahkan larutan KCl 0,15 M steril dingin sebanyak 3 ml/g hati. Homogenisasi sampai semua potongan hati hancur dan didapat homogenat hati. Kemudian homogenat disentrifuga pada kecepatan 300 rpm pada suhu 4°C 20 menit. Setelah itu supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung 1 ml bertutup steril. Homogenat ini disimpan dalam *freezer*. Pembuatan ini dilakukan dalam ruang steril.

Pembuatan larutan uji : Larutan uji dibuat dengan melarutkan zat uji dalam pelarut DMSO. Larutan uji dibuat segar setiap kali pengujian.

Uji kontrol positif : Yang digunakan sebagai kontrol positif 40nitrokuinolin-N-oksid dengan konsentrasi 0,6 µg/ml, 1 µg/ml, 1,8 µg/ml, dan 2,2 µg/ml dalam pelarut DMSO. Pengujian dilakukan dengan prosedur yang sama dengan uji mutagenisitas zat uji.

Pengujian Mutagenisitas Zat uji : Ke dalam 2 ml top agar yang mengandung 10 % larutan histidin 0,1 M – biotin 0,1 mM ditambahkan 0,1 ml biakan semalam bakteri dan 0,1 ml larutan uji. Kemudian campuran ini dituangkan pada bottom agar (pelat glukosa minimal) dalam waktu kurang dari 20 detik. Pada pengujian yang menggunakan homogenat hati ditambahkan campuran homogenat hati 0,5 ml pada top agar. Setelah top agar memadat, diinkubasi pada 37°C 48 jam. Pada tiap pengujian dilakukan uji reversi spontan dan penghitungan bilangan kuman biakan semalam.

Hasil dan Pembahasan

Bakteri uji untuk penentuan sifat mutagen untuk Uji Ames harus mempunyai sifat genotip yang telah disyaratkan. Konfirmasi sifat genotip ini harus dilakukan (1) segera setelah menerima biakan (2) pada waktu pembuatan liofilisat (3) apabila revertan spontan per cawan terletak di luar rentang normal dan (4) jika kehilangan sensitivitas terhadap mutagen standar (Maron dan Ames, 1983).

Konfirmasi sifat genotip dilakukan terhadap ke empat galur bakteri uji meliputi uji butuh histidin, mutasi rfa, mutasi uvrB, faktor R dan reversi spontan. Khusus untuk galur TA 102 dilakukan juga konfirmasi plasmid paQ 1. Pada Tabel 1 terlihat bahwa pada uji butuh histidin ke empat galur tumbuh, mutasi rfa diameter hambat ± 15 cm sesuai dengan persyaratan, mutasi uvrB bagian yang disinari tidak ada pertumbuhan bakteri kecuali pada TA 102 karena TA 102 ini tidak mengalami mutasi uvrB (sebagai kontrol), faktor R ke empat galur tumbuh, plasmid paQ 1 khusus TA 102 tumbuh, reversi spontan TA 97a jumlah koloni yang tumbuh 112, TA 98 46, TA 100 148 dan TA 102 304 koloni. Hasil yang didapat ini sesuai dengan syarat yang diberikan Ames TA 97a 90 – 180, TA 98 30 – 50, TA 100 120 – 200 dan TA 102 240 –320 koloni, dari hasil ini maka kita dapat menggunakan bakteri ini dalam uji karena memenuhi persyaratan.

Selain konfirmasi sifat genotip, perlu juga dilakukan uji mutagen standar. Walaupun hasil konfirmasi sifat genotip memenuhi syarat, tetapi jika uji mutagen standar tidak memberikan hasil positif maka bakteri tersebut tidak dapat digunakan untuk pengujian. Pada penelitian ini digunakan 4-nitrokuinolin-N-oksid (NQNO). Uji NQNO dapat memastikan kepekaan galur bakteri uji untuk mengalami mutasi balik jika kontak dengan zat mutagen. Pada tabel 2 dapat dilihat *S. typhimurium* TA 97a pada rentang konsentrasi larutan 1,0 - 1,4 µg/ml memperlihatkan jumlah koloni revertan lebih atau sama dengan dua kali jumlah revertan spontan. TA 98 pada konsentrasi 1,0 µg/ml telah memberikan hasil positif, TA 100 konsentrasi 0,6 µg/ml telah memperlihatkan hasil yang positif sedangkan pada TA 102 pada konsentrasi yang diuji memberikan hasil yang berada disekitar revertan spontan, tidak ada konsentrasi yang memberikan hasil positif. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa bakteri uji ini dapat digunakan karena memberikan hasil positif terhadap tiga galur bakteri. Menurut Ames hasil uji dinyatakan positif apabila ada salah satu konsentrasi memberikan jumlah koloni dua kali dari jumlah koloni revertan spontan.

Tabel 1 : Hasil Konfirmasi Sifat Genotip *Salmonella typhimurium*

Sifat Genotip	TA 97a	TA 98	TA 100	TA 102
Uji butuh histidin	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
Mutasi rfa	16 mm	15 mm	17 mm	12 mm
Mutasi uvrB	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
Faktor R	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh	Tumbuh
Plasmid paQ 1	-	-	-	Tumbuh
Reversi spontan	112	46	148	304

Tabel 2 : Hasil Uji Mutagenisitas 4-Nitrokuinolin-N-Oksid terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102

Konsentrasi NQNO (µg/ml)	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi dengan revertan spontan			
	Galur *Salmonella typhimurium*			
	Ta 97a	TA 98	TA 100	TA 102
0.2	6	14	59	25
0.6	60	26	384	28
1.0	197	54	418	62
1.4	192	81	528	69
1.8	103	121	558	83
2.2	82	186	700	113
Revertan spotnan	153	31	134	186

Pengujian ifosfamid tanpa penambahan homogenat hati memberikan hasil negatif pada semua galur bakteri uji seperti terlihat pada tabel 3. Uji terhadap TA 97a, TA 98 dan TA 100 jumlah koloni revertan per cawan terletak dalam rentang revertan spontan dan terhadap TA 102 konsentrasi 20 µg/ml memberikan jumlah koloni revertan terbanyak tetapi ini tidak menunjukkan jumlah dua kali lebih besar dari revertan spontan. Pada tabel 4 terlihat bahwa pengujian dengan penambahan homogenat hati tikus memberikan hasil positif dengan TA 97a, TA 98 dan TA 100. Dengan TA 97a pada rentang konsentrasi 10 – 25 µg/ml memberikan jumlah revertan dua kali lebih besar dari revertan spontan dan jumlah revertan terbanyak pada konsentrasi 20 µg/ml. Uji dengan TA 98 semua konsentrasi yang diuji memberikan jumlah koloni revertan terbanyak pada konsentrasi 20 µg/ml. Pengujian dengan TA 100 revertan dua kali lebih besar dari revertan spontan dan jumlah koloni revertan terbanyak pada konsentrasi 5 µg/ml. Sedangkan pengujian terhadap TA 102 semua konsentrasi memberikan jumlah koloni revertan dalam rentang revertan spontan. Dari hasil yang didapat terlihat bahwa ifosfamid harus diaktifkan dengan enzim mikrosoma hati. Metabolisme ifosfamid menghasilkan ifosfamid mustard yang merupakan komponen aktifnya (Smith and Reynard, 1995).

Pengujian klorambusil memberikan hasil negatif terhadap semua galur bakteri uji tanpa penambahan homogenat hati seperti terlihat pada tabel 5. Semua galur bakteri uji memberikan jumlah koloni revertan dalam rentang revertan spontan. Pengujian dengan penambahan homogenat hati tikus memberikan hasil positif terhadap TA 97a, TA 98 dan TA 100 (tabel 6). Pengujian terhadap TA 97a konsentrasi 20 – 30 µg/ml memberikan jumlah koloni revertan dua kali lebih besar dari revertan spontan dengan jumlah koloni revertan terbanyak pada konsentrasi 20 µg/ml dan menurun sampai konsentrasi 30 µg/ml. Pengujian terhadap TA 98 semua konsentrasi memberikan jumlah koloni revertan dua kali lebih besar dari revertan spontan. Pada rentang konsentrasi 5 – 15 µg/ml terjadi peningkatan jumlah koloni revertan dan terbanyak pada 15 µg/ml, setelah itu menurun sampai konsentrasi 30 µg/ml. Terhadap TA 100 memberikan jumlah koloni revertan dua kali lebih besar dari revertan spontan pada konsentrasi 25 µg/ml dan 30 µg/ml. Pengujian terhadap TA 102 jumlah koloni revertan semua konsentrasi berada dalam rentang revertan spontan. Dari kedua perlakuan ini terlihat bahwa klorambusil memerlukan sistem aktivasi. Hasil metabolisme klorambusil adalah fenil asetat mustard yang berperan dalam alkilasi (Florey, 1987).

Tabel 3. Hasil Uji Mutagenisitas Ifosfamid terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102 Tanpa Penambahan Homogenat Hati

Konsentrasi Ifosfamid (µg/ml)	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi dengan revertan spontan			
	Galur *Salmonella typhimurium*			
	Ta 97a	TA 98	TA 100	TA 102
5	13	-8	49	100
10	5	2	62	118
15	3	-8	57	150
20	2	-3	47	195
25	-2	-2	52	160
30	-3	-6	57	116
Revertan spotnan	120	21	116	308
Bilangan kuman (koloni/ml)	2.0×10^9	8.0×10^9	5.0×10^9	5.0×10^9

Keterangan : Hasil negatif adalah lebih kecil dari revertan spontan

Tabel 4. Hasil Uji Mutagenisitas Ifosfamid Ditambah Homogenat Hati terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102

Konsentrasi Ifosfamid (µg/ml)	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi dengan revertan spontan			
	Galur *Salmonella typhimurium*			
	Ta 97a	TA 98	TA 100	TA 102
5	111	97	273	51
10	205	164	232	-79
15	223	170	179	-130
20	239	192	96	-115
25	188	171	84	-67
30	135	164	49	-52
Revertan spotnan	186	56	129	359
Bilangan kuman (koloni/ml)	3.0×10^9	5.0×10^9	2.1×10^9	1.7×10^9

Keterangan : Hasil negatif adalah lebih kecil dari revertan spontan

Tabel 5. Hasil Uji Mutagenisitas Klorambusil terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102 Tanpa Penambahan Homogenat Hati

Konsentrasi Klorambusil µg/ml)	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi dengan revertan spontan			
	Galur *Salmonella. typhimurium*			
	Ta 97a	TA 98	TA 100	TA 102
5	-14	-11	8	16
10	-5	-6	-14	54
15	5	-5	22	63
20	-5	-13	27	30
25	35	-6	60	56
30	23	-8	-8	102
Revertan spotnan	131	26	88	335
Bilangan kuman (koloni/ml)	5.2×10^9	1.2×10^9	7.7×10^9	2.3×10^9

Keterangan : Hasil negatif adalah lebih kecil dari revertan spontan

Tabel 6. Hasil Uji Mutagenisitas Klorambusil Ditambah Homogenat Hati terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102

Konsentrasi Klorambusil (µg/ml)	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi dengan revertan spontan			
	Galur *Salmonella typhimurium*			
	Ta 97a	TA 98	TA 100	TA 102
5	160	73	9	62
10	182	182	39	-106
15	196	584	73	-68
20	220	297	134	-77
25	202	264	156	-66
30	207	165	188	-59
Revertan spotnan	207	75	140	365
Bilangan kuman (koloni/ml)	6.0×10^{10}	3.0×10^{10}	1.1×10^{10}	7.0×10^{10}

Keterangan : Hasil negatif adalah lebih kecil dari revertan spontan

Kesimpulan

Penentuan mutagenisitas ifosfamid dan klorambusil terhadap *S. typhimurium* TA 97a, 98, 100 dan 102 tanpa penambahan homogenat hati memberikan hasil negatif. Pada pengujian dengan penambahan homogenat hati tikus ifosfamid dan klorambusil memberikan hasil positif dengan *S. typhimurium* 97a, 98 dan 100. Ifosfamid dan klorambusil merupakan senyawa mutagen yang perlu sistem aktivasi.

Daftar Pustaka

Ames, B.N., J. Mc Can and Yamasaki, E, 1975, Methods for Detection Carcinogens and Mutagens with The Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31.

Elseth, G.D. and K.D. Baumgardner, 1984, Genetics, Addison-Wesley Academic Press, Inc., New York.

Florey, K., Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. XVI, Academic Press, Inc., New York, 1987.

Katzung, B.G., 1992, Basic & Clinical Pharmacology, 5th ed., Prentice Hall Internatioanl Inc., London.

Lu, F.C., 1995, Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko, ed 2. terjemahan Nugroho, E, Universitas Indonesia Press, Jakarta.

Maron, D.M, and B.N. Ames, 1983, Revised Methods for The Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113.

Smith, S.M and Reynard A.M., Essentials of Pharmacology, W.B. Saunders Co., Tokyo, 1995.

Winek, C.L., 1977, Toxicology Annual, Vol. II, Marcel Dekker Ind., New York.