



Pengaruh Rasio Doksorubisin: Apoferritin terhadap Kapasitas dan Efisiensi Enkapsulasi Doksorubisin dalam Apoferritin

Novita Wiwoho^{1*}, Maria Christina P.¹, Mujamilah², dan Grace Tj. Sulungbudi²

¹Sekolah Tinggi Teknologi Nuklir-BATAN, Babarsari, Yogyakarta

²Pusat Sains dan Teknologi Bahan Maju-BATAN, Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan

*Alamat korespondensi: novitawiwoho.317@gmail.com

Submisi: 9 Mei 2017; Penerimaan: 28 Juni 2017

ABSTRACT

Doxorubicin is a chemotherapy drug which is very toxic and causes many side effects. To reduce side effects, doxorubicin can be encapsulated by apoferritin into apoferritin-doxorubicin (Apo-Dox) system. In this research, various mass of doxorubicin i.e. 0.17 mg (S1), 0.26 mg (S2), 0.35 mg (S3), and 0.52 mg (S4) were encapsulated with 21.50 mg apoferritin. Encapsulation process was carried out by lowering pH medium for apoferritin dis-assembly, doxorubicin addition and dialysis for gradual and controlled pH-increase of medium to support re-assembly of apoferritin and doxorubicin encapsulation. End-result samples were then centrifuged and washed to separate the unreacted doxorubicin and apoferritin's subunits. Doxorubicin encapsulation efficiency was determined using microplate reader spectrophotometry. The highest encapsulation capacity was 3.87 µg dox/mg apo for S4 samples. Increasing the weight of doxorubicin gives more significant effect on increasing the reactive weight of apoferritin, which reached 93.73% (S4 sample). Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) analysis confirm that apoferritin is in the Apo-Dox sample.

Keywords: Encapsulation, Doxorubicin, Apoferritin Protein, Apo-Dox

ABSTRAK

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi yang sangat beracun dan menimbulkan berbagai efek samping. Salah satu upaya untuk mengurangi efek samping tersebut, doksorubisin dapat dibungkus menggunakan protein apoferritin menjadi Apoferritin-Doksorubisin (Apo-Dox). Dalam penelitian ini, doksorubisin dengan berat 0.17 mg (S1); 0.26 mg (S2); 0.35 mg (S3); dan 0.52 mg (S4) dienkapsulasi apoferritin dengan berat 21.50 mg. Proses enkapsulasi dilakukan dengan mengubah pH larutan melalui penambahan glisin asetat, basa tris, dan dialisis dalam tris asetat. Larutan di-*centrifuge* lalu dicuci untuk menghilangkan doksorubisin dan sub-unit apoferritin yang tidak bereaksi. Konsentrasi

doksorubisin yang terenkapsulasi dalam apoferritin (μg dox/mg apo) ditentukan menggunakan *microplate reader spectrophotometry*. Konsentrasi cenderung mencapai optimum mulai sampel S2 dan hanya sedikit meningkat untuk sampel S3 dan S4 dengan nilai maksimum kapasitas enkapsulasi pada S4 sebesar $3.87 \mu\text{g}$ dox/mg apo. Peningkatan jumlah doksorubisin akan meningkatkan jumlah apoferritin yang bereaksi, dan diperoleh nilai efisiensi reaksi apoferritin tertinggi 93,73% pada sampel S4. Hasil uji menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) membuktikan bahwa apoferritin berada pada sampel Apo-Dox.

Kata kunci: Enkapsulasi, Doksorubisin, Protein Apoferritin, Apo-Dox

1. Pendahuluan

Kanker merupakan penyebab kematian yang menduduki urutan teratas di dunia. Sel kanker merupakan sel yang mudah beradaptasi dan cenderung tahan terhadap pengobatan yang diberikan. Teknik pengobatan kanker yang biasa diberikan adalah kombinasi antara pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi. Ketiga teknik pengobatan tersebut terus dikembangkan.

Doksorubisin merupakan obat kemoterapi golongan antrasiklin yang efektif melawan replika DNA pada sel kanker. Doksorubisin digunakan untuk berbagai tipe kanker karena memiliki spektrum aksi yang beragam. Namun obat kemoterapi ini bersifat sangat beracun baik bagi sel kanker maupun sel normal. Sifat racun yang ditimbulkan yaitu menimbulkan banyak efek samping. Efek samping yang paling umum adalah mual hebat, muntah, stomatitis (inflamasi pada mulut), gangguan gastrointestinal, gangguan neurologis (halusinasi, *vertigo*, pusing), kebotakan, kegagalan sumsum tulang, dan kardi toksisitas yang terakumulasi. Kardi toksisitas yang terinduksi melalui dosis yang terakumulasi menyebabkan kegagalan organ-organ vital seperti jantung, hati, ginjal, dan secara tidak langsung akan mempengaruhi otak melalui *Tumour Necrosis Factor- α* (TNF- α) (Carvalho dkk., 2009).

Salah satu cara untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan tersebut, doksorubisin perlu dienkapsulasi atau pengkapsulan. Enkapsulasi mula-mula dilakukan menggunakan polimer, liposom, *hydrogel*, dan *microsphere biodegradable*. Namun, material tersebut memiliki kekurangan masing-masing, misalnya

enkapsulasi doksorubisin dalam liposom tidak dapat bertahan lama dan bersifat tidak stabil (Mohan dan Rapoport, 2011; Tacar dkk., 2012).

Apoferritin merupakan protein berongga yang dapat digunakan sebagai pembungkus doksorubisin (Dostálová dkk., 2013). Apoferritin merupakan protein ferritin kosong. Protein ferritin pada umumnya berada di dalam darah dan berfungsi sebagai pengatur ketersediaan zat besi dengan cara menyimpan dan melepas zat besi. Struktur apoferritin tersusun atas 24 subunit yang membentuk bola dengan diameter 12 nm (~450 kDa). Rongga apoferritin berdiameter 8 nm. Struktur apoferritin yang berongga ini kemudian dapat difungsikan sebagai sangkar (*cage*) pembawa obat (*drug delivery*) (Heger dkk., 2014). Dalam penelitian ini obat yang dibawa adalah doksorubisin.

2. Metode Penelitian

2.1 Bahan dan Peralatan

Apoferritin (berasal dari limpa kuda atau *equine spleen*, Sigma Aldrich A-3641), Doxorubicin HCl (Sanbe) dan *deionized water* produksi Millipore® Simplicity® dengan resistivitas $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. Bahan kimia yang digunakan dengan tingkat kemurnian *pro analysis* (p.a.), yaitu glisin, asam asetat, basa tris, tris asetat.

Peralatan yang digunakan adalah *Microplate reader spectrophotometer* (BioTek, Eon); *Particle Size Analyzer* (Malvern, Zetasizer Nano ZS); dan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (BioRad, Tetra cell Mini-Protean), *Transmission Electron Microscope* (TEM), JEOL, JEM-1400.

2.2 Cara Penelitian

Sebanyak 0.78 mL (21.5 mg) apoferritin dicampur dengan 8 mL glisin asetat 0.01 M pH 2.5 menggunakan pompa peristaltik dengan kecepatan 0.1 mL/menit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Kemudian larutan tersebut ditambah dengan 0.4 mL doksorubisin dengan variasi konsentrasi akhir 0.75 mM (S1); 1.13 mM (S2); 1.50 mM (S3); dan 2.25 mM (S4). Untuk menutup kapsul apoferritin, larutan tersebut ditambah dengan basa tris 2M hingga pH 4 (0.8 mL). Setelah penambahan basa tris, larutan menjadi keruh. Selanjutnya larutan dengan pH 4 tersebut didialisis semalaman dalam 1.5 liter tris asetat 0.02 M pH 7.4.

Setelah dialisis, larutan diputar 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit menggunakan *centrifuge* sehingga endapan terpisah dari larutan. Larutan disimpan sebagai *supernatant* dan endapan dicuci menggunakan *centrifugal filter* 100 kDa dengan kecepatan putaran 3000 rpm selama 12 menit. Pencucian dilakukan sebanyak 4 kali menggunakan larutan tris asetat 0.02 M pH 7.4. Hasil akhir merupakan sampel Apo-Dox sebanyak 4 mL.

Konsentrasi sampel ditentukan menggunakan *microplate reader spectrophotometry*. Untuk mengukur konsentrasi apoferritin, digunakan pewarna *coomassie blue* dan diukur pada panjang gelombang 595 nm. Doksorubisin berwarna jingga, diukur pada panjang gelombang 480 nm. Pengukuran konsentrasi apoferritin dalam sampel Apo-Dox dilakukan dengan membuat kurva standar protein dengan y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi. Protein yang digunakan sebagai standar adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA). Persamaan kurva standar untuk apoferritin menggunakan Persamaan (1) dan persamaan kurva standar untuk doksorubisin menggunakan Persamaan (2):

$$y = 0.0014x + 0.0015 \quad (1)$$

dengan $R^2=0.9990$

$$y = 0.0151x - 0.0209 \quad (2)$$

dengan $R^2=0.9980$

Distribusi ukuran partikel sampel dikarakterisasi menggunakan *Particle Size*

Analyzer (PSA). Data yang didapat merupakan ukuran hidrodinamik partikel serta distribusi ukuran partikel dalam sampel. Prinsip kerjanya adalah mengukur hamburan cahaya dengan memanfaatkan gerak *Brown* dalam larutan sampel. Sumber laser yang digunakan mempunyai panjang gelombang 633 nm dengan sudut detektor 173°.

Berdasarkan data penentuan jumlah apoferritin dan doksorubisin di awal pencampuran dan dalam sampel Apo-Dox, dapat dihitung persentase (%) *recovery* apoferritin; persentase (%) enkapsulasi doksorubisin; serta persentase (%) efisiensi pemuatan, menggunakan persamaan (3), (4), dan (5). *Recovery* apoferritin menyatakan banyaknya apoferritin yang dapat diperoleh kembali setelah sampel diproses, sehingga digunakan rumus jumlah apoferritin yang tersisa setelah proses (Apo_{fin}) dibandingkan dengan apoferritin yang mula-mula ditambahkan (Apo_{in}). Enkapsulasi Dox didapat dengan membandingkan jumlah doksorubisin setelah proses (Dox_{fin}) dengan jumlah doksorubisin yang ditambahkan mula-mula (Dox_{in}). Efisiensi pemuatan menyatakan banyaknya doksorubisin yang dapat diperoleh kembali setelah diproses.

$$\% \text{ Rec. Apoferritin} = \frac{Apo_{fin}}{Apo_{in}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ Enkapsulasi Doxo} = \frac{Doxo_{fin}}{Doxo_{in}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Efisiensi Pemuatan} = \frac{Doxo_{fin}}{Apo_{fin}} \times 100 \quad (5)$$

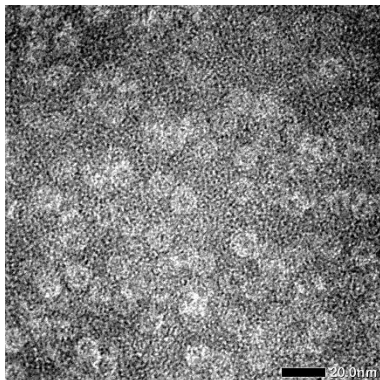
Keberadaan apoferritin dalam sampel, diverifikasi menggunakan *sodium deodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Sampel didenaturasi pada suhu 90°C selama 5 menit. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 250 volt selama 25 menit. Pita elektroforegram yang dihasilkan dibandingkan dengan standar.

3. Hasil dan Pembahasan

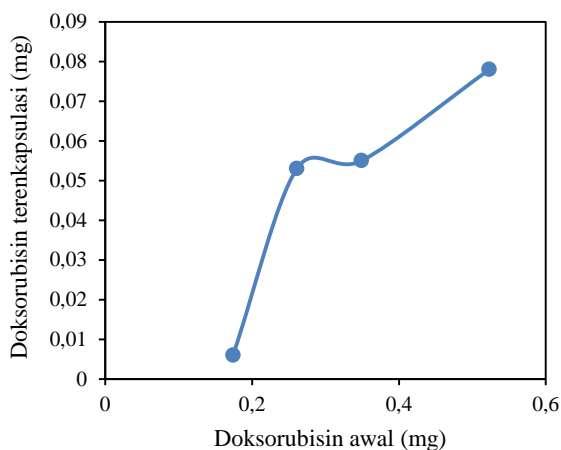
Apoferritin dapat menjadi pelapis/kapsul yang baik untuk doksorubisin karena bersifat *biodegradable*, tidak beracun, *bioavailable*, berukuran nano (sehingga jangkauan kerjanya luas), dan memiliki rongga yang mudah dimodifikasi. Kemampuan apoferritin sebagai

sangkar atau wadah untuk dimasukkan obat terkonfirmasi dari hasil TEM yang disajikan pada Gambar 1.

Self-dissassembly dan *self-assembly* apoferritin dikontrol berdasarkan pH (Ganta dkk., 2008) menggunakan larutan glisin asetat dan basa tris karena kedua larutan tersebut memiliki persentase *recovery* protein paling besar (Kilic dkk., 2012). Pada pH 4 merupakan awal penggabungan antar subunit apoferritin (Tmejova., 2013). Untuk menstabilkan ikatan antar subunit, pH larutan dibuat 7.4 melalui proses dialisis. pH ini merupakan pH darah dan pH alami ferritin. Proses pencucian dengan filter dilakukan agar doksorubisin dan subunit apoferritin yang tidak berikatan dapat terpisah dari Apo-Dox.



Gambar 1. Apoferritin.

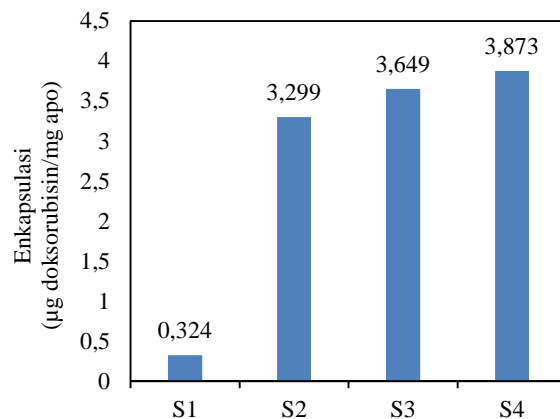


Gambar 2. Hubungan jumlah doksorubisin awal terhadap jumlah doksorubisin yang terenkapsulasi

Kandungan doksorubisin yang diberikan dan yang terenkapsulasi dalam sampel Apo-Dox dapat dilihat pada Gambar 2. Makin banyak

jumlah doksorubisin yang ditambahkan, makin banyak jumlah doksorubisin yang terenkapsulasi. Kenaikan jumlah doksorubisin yang ditambahkan menyebabkan makin banyak jumlah apoferritin yang bereaksi.

Gambar 3 menunjukkan jumlah pemuatan doksorubisin per mg apoferritin pada sampel S2, S3 dan S4. Meskipun tampak semakin meningkat namun tidak terdapat peningkatan yang signifikan. Dengan jumlah pemuatan yang hampir sama, sampel S4 memberikan hasil yang terbaik.



Gambar 3. Grafik pemuatan doksorubisin per mg apoferritin (drug loading)

Jumlah pemuatan pada penelitian ini jauh lebih sedikit daripada yang diperoleh pada penelitian Kilic dkk. (2012), yaitu 3,33 µg doksorubisin per mg apoferritin pada sampel S2 dibandingkan 28 µg doksorubisin per mg apoferritin. Hal ini disebabkan waktu inkubasi yang kurang lama pada saat pH 4, akibatnya banyaknya doksorubisin yang terlepas pada saat dialisis untuk menaikkan pH ke 7.4. Hasil perhitungan % *Recovery* apoferritin, % enkapsulasi doksorubisin dan % efisiensi pemuatan dicantumkan dalam Tabel 1.

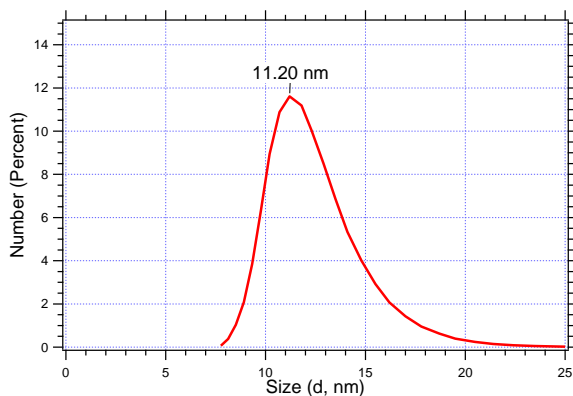
Tabel 1. Hasil perhitungan % recovery apoferritin, % enkapsulasi doksorubisin dan % efisiensi pemuatan

Sampel	% Recovery apo	% Enkapsulasi Dox	% Efisiensi pemuatan
1	86.10	3.31	0.03
2	74.63	20.34	0.33
3	70.15	15.81	0.36
4	93.73	14.83	0.39

Berdasarkan studi awal enkapsulasi ini terlihat bahwa efisiensi pemuatan sampel bertambah seiring meningkatnya kandungan doksorubisin dalam sampel. Persentase *recovery* apoferritin tertinggi diperoleh dari sampel 4, sedangkan persentase enkapsulasi doksorubisin tertinggi diperoleh dari sampel 2.

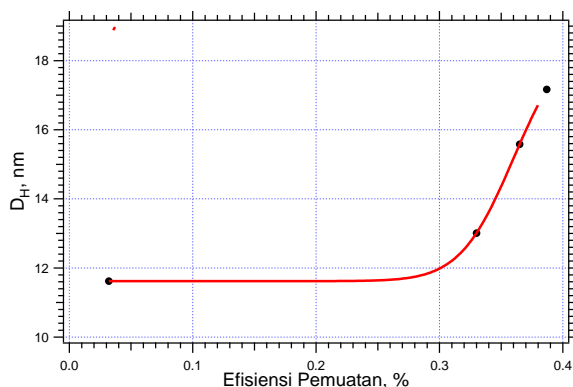
3.1. Ukuran Partikel Apo-Dox pada Sampel

Gambar 4 menunjukkan distribusi ukuran partikel apoferritin murni.



Gambar 4. Distribusi ukuran partikel apoferritin murni

Apoferitin murni mempunyai ukuran partikel rata-rata 11.20 nm. Sampel 1 dengan efisiensi pemuatan 0.03% mempunyai ukuran partikel yang hampir sama dengan ukuran apoferitin murni. Semakin besar efisiensi pemuatan, semakin banyak jumlah doksorubisin di dalam apoferritin. Ukuran partikel juga menjadi semakin membesar. Kecenderungan ini dapat dilihat pada Gambar 5.



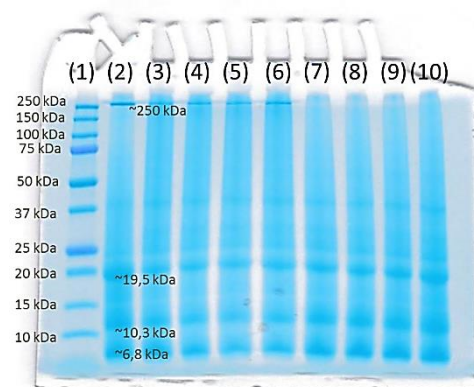
Gambar 5. Grafik Efisiensi Pemuatan (%) terhadap Ukuran partikel (nm).

3.2. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Gambar 6 menunjukkan elektroforegram *marker*, apoferritin dan masing-masing sampel Apo-Dox. Terdapat dua perlakuan terhadap sampel Apo-Dox. Perlakuan pertama adalah denaturasi sekunder saja (perlakuan pada sampel di kolom 2 sampai 6 pada Gambar 6). Perlakuan kedua adalah denaturasi primer dan sekunder (perlakuan pada sampel di kolom 7 sampai 10 pada Gambar 6). Kolom pertama diisi dengan *marker* yang merupakan standar untuk membuat kurva. Kurva standar dibuat dari log berat molekul versus jarak migrasi. Kurva standar yang diperoleh mempunyai persamaan (6) :

$$y = 1.482x + 2.295 \quad (6)$$

Melalui Gambar 6 diketahui bahwa sampel tanpa denaturasi primer (kolom 2 sampai 6) memiliki berat molekul lebih dari 250 kDa namun tidak dapat terbaca pada elektroforegram karena keterbatasan gel. Apoferritin dan Apo-Dox yang terdenaturasi terlihat pada pita berat molekul 19.5 kDa sampai 21.9 kDa. Berat molekul sampel Apo-Dox kolom 2 hingga kolom 4 terlihat sedikit lebih besar. Hal ini membuktikan bahwa kapsul apoferritin benar-benar mengandung doksorubisin dan menjadi lebih berat. Semakin banyak doksorubisin dalam apoferritin, semakin besar berat molekulnya.



Gambar 6. Elektroforegram sampel: *Marker* (1), Apoferritin (2), Apo-Dox 1 (3), Apo-Dox 2 (4), Apo-Dox 3 (5), Apo-Dox 4 (6), Apo-Dox 1 (7), Apo-Dox 2 (8), Apo-Dox 3 (9), dan Apo-Dox 4 (10)

Elektroforegram pada Gambar 6 membuktikan bahwa subunit L mendominasi

pada *equine spleen*. Ferritin pada mamalia memiliki dua jenis subunit, yaitu L (ringan) dan H (berat). Subunit H memiliki berat sekitar 21 kDa dan banyak terdapat pada jantung dengan fungsi untuk detoksifikasi zat besi. Sedangkan subunit L dengan berat sekitar 19 kDa banyak terdapat pada hati (Crichton dkk., 1973; Massover, 1993). Meskipun dalam perbandingan jumlah yang berbeda, penyimpanan pada apoferritin membutuhkan kontribusi dari kedua jenis subunit (Crichton, R., 2009).

4. Kesimpulan

Doksorubisin dapat dikapsulkan dalam apoferritin. Jumlah doksorubisin di dalam sampel awal berbanding lurus dengan jumlah doksorubisin dalam sampel akhir. Efisiensi pemuatan Apo-Dox semakin tinggi dan ukuran partikelnya semakin besar bila doksorubisin yang ditambahkan diperbanyak. Persentase *recovery* apoferritin yang terbesar terdapat pada sampel S4, yaitu sampel dengan penambahan doksorubisin terbanyak. Persentase enkapsulasi doksorubisin tertinggi diperoleh dari sampel S2 dan tidak dipengaruhi oleh meningkatnya doksorubisin pada sampel. Pengujian menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) membuktikan bahwa terdapat subunit L dari apoferritin pada larutan sampel.

5. Ucapan Terimakasih

Penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan penelitian PSTBM-BATAN dan dibiayai dari dana DIPA PSTBM – BATAN Tahun Anggaran 2016.

6. Daftar Pustaka

- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P., 2009,. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267–3285.
- Crichton, R., 2009, *Iron Metabolism-From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences* (Third Edition), John Wiley and Sons, Ltd., Singapore
- Crichton, R. R., Millar, J. a, Cumming, R. L., & Bryce, C. F. (1973). The organ-specificity of ferritin in human and horse liver and spleen. *The Biochemical Journal*, 131(1), 51–9.
- Dostálová, S., Konečná, R., Blažková, I., Vaculovičová, M., Kopel, P., Křížková, S., Kizek, R., 2013, Apoferritin as A Targeted Drug Delivery System, 908–912.
- Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., & Amiji, M., 2008, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 126(3), 187–204.
- Heger, Z., Skalickova, S., Zitka, O., Adam, V., & Kizek, R., 2014, Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine* (London, England), 9(14), 2233–45
- Kilic, M. A., Ozlu, E., & Calis, S., 2012, A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: Apoferritin-doxorubicin complex, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(3), 508–514.
- Massover, W. H., 1993, Ultrastructure of ferritin and apoferritin: A review. *Micron*, 24(4), 389–437.
- Mohan, P., & Rapoport, N., 2011, Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking, 4(164), 1959–1973
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R., 2012, Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157–170.
- Tmejova, K., Hynek, D., Kopel, P., Dostalova, S., Smerkova, K., Stanisavljevic, M., Adam, V., 2013, Electrochemical behaviour of doxorubicin encapsulated in apoferritin, *International Journal of Electrochemical Science*, 8(12), 12658–12671.

