

Kertas Asli/Original Article

Kesan Sitotoksik Sebatian Difenilstanum (IV) Alkilfenilditiokarbamat terhadap Sel Eritroleukemia, K562
(Cytotoxic Effect of Diphenyltin (IV) Alkylphenyldithiocarbamate Compounds on Erythroleukemia Cell, K562)

NORMAH AWANG, SITI MUSSLIAH SHAHIDI, ASMAH HAMID & NURUL FARAHANA KAMALUDIN

ABSTRAK

Kesan sitotoksik sebatian organostanum (IV) terhadap pelbagai sel kanser telah dikaji oleh para saintis di seluruh dunia. Dalam kajian ini, dua sebatian baru organostanum (IV) iaitu difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat (DFEF) dan difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat (DFBF) telah diuji kesan sitotoksiknya terhadap sel eritroleukemia, K562. Sel eritroleukemia, K562 merupakan sel sasaran manakala, sel hepar Chang dan sel fibroblas V79 pula digunakan untuk menilai kesan kedua-dua sebatian ini terhadap sel bukan kanser. Kesan sitotoksik sebatian DFEF dan DFBF diuji menggunakan ujian asai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) dengan masa pendedahan 24 jam, 48 jam dan 72 jam pada kepekatan sebatian yang berbeza. Pemerhatian terhadap perubahan morfologi juga dilakukan menggunakan nilai IC_{50} yang diperolehi pada masa pendedahan seperti ujian asai MTT. Ujian sitotoksik telah menunjukkan sebatian DFEF dan DFBF adalah sangat toksik terhadap sel K562 dengan nilai IC_{50} kurang daripada 10 μM untuk ketiga-tiga masa pendedahan. Indeks pemilihan juga membuktikan bahawa kedua-dua sebatian memberikan kesan sitotoksik secara memilih terhadap sel K562 pada masa 48 jam dan 72 jam, tetapi pada masa 24 jam, sebatian ini bertindak secara tidak memilih terhadap sel K562 dan sel bukan kanser. Perubahan morfologi yang diperhatikan adalah menyerupai ciri-ciri apoptosis seperti pengecutan sel dan pembentukan jasad apoptotik dan juga nekrosis seperti sel lisis. Kesimpulannya, sebatian difenilstanum (IV) alkilfenilditiokarbamat berpotensi untuk dibangunkan sebagai agen antileukemia tetapi mekanisma khusus tindakan sebatian ini terhadap sel K562 perlu dikaji pada masa akan datang untuk menjelaskan potensi sebatian ini sebagai dadah antikanser yang baru.

Kata kunci: Difenilstanum (IV), sitotoksik, ditiokarbamat, apoptosis

ABSTRACT

Cytotoxicity of organotin (IV) compounds towards various types of cancerous cells have been extensively studied by researchers worldwide. In this study, two new organotin (IV) compounds; diphenyltin (IV) ethylphenyldithiocarbamate (DFEF) and diphenyltin (IV) butylphenyldithiocarbamate (DFBF) were used to evaluate their cytotoxic effect against erythroleukemia cells, K562. K562 cell was used as target cell whereas Chang liver and V79 fibroblast cells were used to evaluate the effects of both compounds on non-cancerous cells. The cytotoxic effects of both compounds were assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at 24, 48 and 72 hours using different concentrations. Observations on the morphological changes were carried out with IC_{50} value for times of exposure similar to the MTT assay test. The cytotoxicity test showed that, DFEF and DFBF compounds were very toxic toward K562 cells with the IC_{50} values obtained less than 10 μM at all times of exposure. The selectivity index have proven that both compounds exhibited selective cytotoxic effect against K562 cells at 48 and 72 hours, meanwhile at 24 hours, these compounds showed general toxicity towards K562 and non-cancerous cells. We found that both compounds were toxic to non-cancerous cells, Chang liver and V79 cells where the IC_{50} values were less than 5 μM . Both compounds also showed selectivity to target cell at 48 and 72 hours of exposure. However for 24 hours, these compounds showed general toxicity and non-selective cytotoxic effect towards K562 cells and non-cancerous cells. The morphological changes match with characteristic of apoptosis such as cell shrinkage and formation of apoptotic bodies, also necrosis such as lysis of cells. In conclusion, diphenyltin (IV) alkylphenyldithiocarbamate showed great potential to be a good anti-leukemic agent. However, its specific mechanism of action in K562 cells should be further studied to elucidate its potential as a new anticancer drug.

Keywords: Diphenyltin (IV), cytotoxic, dithiocarbamate, apoptosis

PENGENALAN

Sebatian organostanum telah dikaji dengan meluas kerana penggunaannya dalam pelbagai bidang (Pellerito et al. 2006). Contohnya, sebatian ini telah diuji secara meluas sebagai agen kemoterapi bagi merawat kanser (Shahzadi et al. 2005). Kebelakangan ini, penggunaan sebatian organostanum sangat mendapat perhatian, antaranya ia telah digunakan dalam bidang perkapalan, industri plastik, dan juga sebagai pestisid (De Carvalho & Santelli 2010).

Sebatian organostanum (IV) dicirikan dengan kehadiran sekurang-kurangnya satu ikatan kovalen C-Sn yang mengandungi pusat tetravalen dan boleh dikelaskan sebagai mono-, di-, tri- dan tetraorganostanum (IV) berdasarkan bilangan kumpulan alkil atau aril yang terikat kepada logam pusat stanum. Sebatian organostanum (IV) telah menunjukkan aktiviti biologi yang baik yang mana sebatian ini didapati sangat toksik walaupun pada kepekatan yang rendah (Pellerito et al. 2006). Selain itu, sifat organostanum (IV) juga dikaji secara meluas semenjak beberapa dekad yang lalu dalam usaha untuk mengaplikasikannya sebagai agen antivirus, antikanser, antibakteria, agen anti karat dan bahan pengawet kayu (Affan et al. 2009). Sebatian stanum bukan organik dianggap tidak toksik dan kesan toksikologi sebatian organostanum ini adalah kompleks (Hoch 2001). Sebatian dialkilstanum didapati menunjukkan aktiviti anti-tumor yang lebih baik berbanding terbitan yang lain (Mahmoud Mohamed. 2001).

Ditiokarbamat merupakan sebatian tak organik yang terikat kepada ion logam. Sebatian ini boleh bertindak sebagai bahan antioksidan, perencat atau pencetus apoptosis serta perencat enzim dalam model in-vitro (Johnson et al. 2003). Selain itu, ia juga mempunyai kapasiti pengkelatan yang baik serta mudah disintesis. Ia juga digunakan secara meluas dalam bidang pertanian sebagai insektisid dan fungisid serta turut digunakan sebagai pestisid. Untuk penggunaan sebagai fungisid, ditiokarbamat merupakan kumpulan utama yang telah digunakan untuk mengawal kira-kira 400 patogen tanaman dan telah didaftarkan di kebanyakan negara (Awang et al. 2010). Kini, ditiokarbamat turut diuji sebagai agen fitotoksik, antidot untuk mencegah kesan agen fitotoksik, agen antimikrob dan juga agen antikanser (Awang et al. 2010).

Contohnya, pirrolidin ditiokarbamat dengan ion logam boleh bertindak sebagai perencat proteosom yang menyebabkan apoptosis terhadap sel kanser dan ianya telah dibangunkan sebagai agen anti kanser (Oh et al. 2010). Selain itu, kompleks ditiokarbamat dengan fomula am $[M(S_2CNET_2)(L)]NO_3$ ($M = Pd$ atau Pt ; $L = 2,2$ -bipiridil atau $1,10$ -fenantrolin) telah disintesis dan juga telah diuji aktiviti antikansernya (Islami-Moghaddam et al. 2009).

Kajian oleh Awang et al. (2011) menunjukkan sebatian dibutilstanum (IV) dan trifenilstanum (IV) ditiokarbamat telah memberikan kesan sitotoksik yang baik terhadap pelbagai sel kanser yang diuji. Selain itu, sebatian organostanum (IV) ditiokarbamat ini juga telah menunjukkan potensi untuk dibangunkan sebagai

agen kemoterapi yang baru kerana memberikan aktiviti antiproliferatif dalam ujian in vivo (Awang et al. 2011).

Untuk meneruskan pencarian sebatian baru yang mempunyai potensi untuk dibangunkan sebagai agen anti leukemia, dua sebatian baru organostanum (IV) ditiokarbamat telah disintesis untuk menilai kesan sitotoksik terhadap sel leukemia manusia iaitu sel eritroleukemia K562.

KAEDAH

SEBATIAN KAJIAN

Dua sebatian organostanum (IV) iaitu difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat (sebatian I) dan difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat (sebatian II) telah disintesis di Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, UKM Bangi, Selangor, Malaysia.

KULTUR SEL DAN REAGEN

Sel K562, sel hepar Chang dan sel V79 telah dibeli dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dan dikulturkan di Makmal Bioserasi dan Toksikologi, Fakulti Sains Kesihatan, UKM Kuala Lumpur. Sel K562 dikultur dalam media *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) dengan L-glutamin, natrium bikarbonat ($NaHCO_3$), 1% penicilin/streptomycin dan 10% *Foetal Bovine Serum* (FBS) (GIBCO, USA). Sementara itu, sel hepar Chang pula dikultur dalam media *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) dengan L-glutamin, natrium bikarbonat ($NaHCO_3$), 1% penicilin/streptomycin dan 10% *Foetal Bovine Serum* (FBS) (GIBCO, USA). Manakala *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dengan L-glutamin, natrium bikarbonat ($NaHCO_3$), 1% penicilin/streptomycin dan 10% *Foetal Bovine Serum* (FBS) (GIBCO, USA) pula digunakan untuk mengkultur sel V79. Semua sel dikultur dalam keadaan berkelembapan rendah iaitu pada suhu $37^\circ C$ dengan 5% bekalan karbon dioksida (CO_2).

PENILAIAN KESAN SITOTOKSIK MENGGUNAKAN UJIAN ASAI MTT:

Viabiliti sel K562, hepar Chang dan V79 ditentukan dengan menggunakan ujian asai 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) asai. Kaedah ujian dijalankan seperti yang dinyatakan oleh Mosmann (1983). Kedua-dua sebatian organostanum (IV) dilarutkan dalam larutan dimetil sulfoksida (DMSO), dan pencairan dilakukan dalam media kultur sebelum digunakan untuk merawat ketiga-tiga sel. Peratus maksimum DMSO dalam setiap telaga adalah 0.1%. Semua sel dirawat menggunakan kedua-dua sebatian, manakala doxorubicin digunakan sebagai kawalan positif. Kesemua sel dirawat menggunakan tujuh kepekatan yang berbeza iaitu 0.156, 0.313, 0.625, 1.250, 2.500, 5.000 dan 10.000 μM pada tiga masa rawatan iaitu 24, 48 dan 72 jam. Sel dikultur di

dalam piring kultur 96 telaga yang steril (Nunc, Denmark) pada kepekatan 1×10^6 sel mL^{-1} bagi sel K562 dan 5×10^4 sel mL^{-1} bagi sel hepar Chang dan V79. Piring kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan $5\% \text{CO}_2$. Dalam sel yang aktif metabolit, MTT akan diturunkan oleh enzim *succinate dehydrogenase* dalam mitokondria untuk membentuk kristal formazan ungu yang tidak larut. Kemudian kristal yang terbentuk dilarutkan dan ketumpatan optik (OD) diukur menggunakan spektrofotometer. Oleh itu, sel yang telah dirawat menggunakan sebatian kajian ditambah dengan $20 \mu\text{L}$, 5mg mL^{-1} MTT dalam 0.1 M larutan penimbil fosfat (PBS) pada pH 7.3. Kemudian piring kultur diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C dengan 5% bekalan CO_2 . Setelah itu, sebanyak $180 \mu\text{L}$ media dikeluarkan daripada setiap telaga dan ditambah semula dengan DMSO pada isipadu yang sama untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Kemudian, piring kultur diletakkan di atas *orbital shaker* selama 3 ke 5 minit untuk memastikan semua kristal yang terbentuk dilarutkan dengan sempurna dan bacaan OD diukur pada panjang gelombang 570 nm menggunakan pembaca mikroplat ELISA (Labsystem Multiscan Multisof, Finland). Sebanyak 4 replikat dilakukan bagi setiap kepekatan sebatian dengan 3 kali ulangan eksperimen pada masa yang berbeza. Nilai IC_{50} dikira untuk setiap sebatian dan digunakan sebagai parameter untuk membandingkan sitotoksik relatif setiap sebatian kajian. Nilai IC_{50} ditakrifkan sebagai kepekatan yang diperlukan untuk merencat 50% pertumbuhan sel berbanding kawalan negatif (Yoshida et al. 2007). Seterusnya, nilai IC_{50} ini digunakan dalam ujian kedua.

PEMERHATIAN PERUBAHAN MORFOLOGI

Sel K562, hepar Chang dan V79 dirawat menggunakan nilai IC_{50} yang diperolehi daripada ujian asai MTT pada tiga masa pendedahan iaitu 24, 48 dan 72 jam. Kesemua sel dikultur dalam piring kultur 6 telaga pada kepekatan 1×10^6 sel mL^{-1} untuk sel K562 dan 5×10^4 sel mL^{-1} untuk sel hepar Chang dan V79. Kemudian piring kultur diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% bekalan CO_2 sehingga mencapai masa pendedahan yang diperlukan. Perubahan morfologi sel diperhatikan di bawah mikroskop cahaya *inverted* pada pembesaran $\times 20$ dan gambar diambil.

ANALISIS STATISTIK

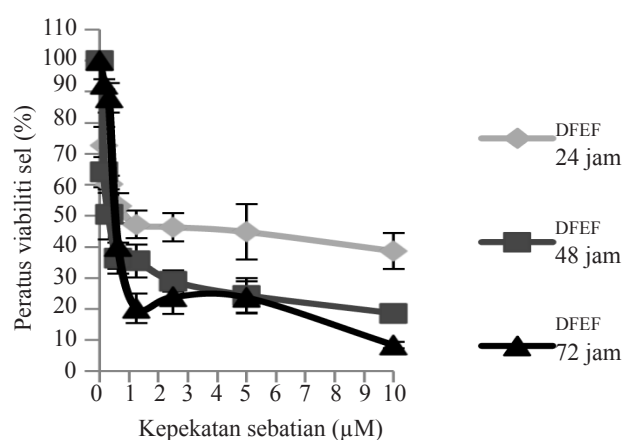
Penilaian statistik untuk peratus viabiliti sel dengan kepekatan sebatian bagi sebatian DFEF dan DFBF yang digunakan untuk merawat sel dihitung menggunakan SPSS versi 17.0 dengan ujian t tidak bersandar dan anggaran $p < 0.05$ adalah signifikan.

HASIL

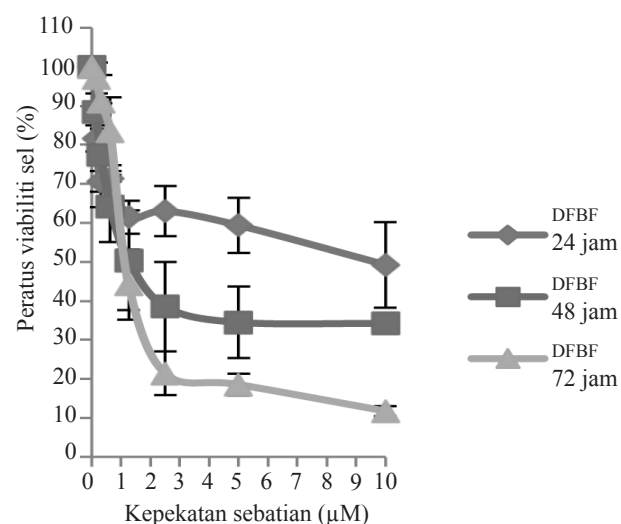
KESAN SITOTOKSIK SEBATIAN I DAN SEBATIAN II MENGGUNAKAN UJIAN ASAI MTT

Rajah 1 dan 2 menunjukkan graf peratus viabiliti sel K562 setelah dirawat dengan sebatian DFEF dan sebatian DFBF

dengan masa rawatan 24, 48 dan 72 jam. Berdasarkan graf tersebut didapati kedua-dua sebatian mampu menyebabkan kematian 50% sel bagi ketiga-tiga masa rawatan di antara julat kepekatan $0-3 \mu\text{M}$ dengan memberikan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} untuk masa rawatan 24, 48 dan 72 jam bagi sebatian DFEF adalah 0.80 , 0.30 dan $0.50 \mu\text{M}$, manakala bagi sebatian DFBF pula adalah 9.40 , 1.2 dan $1.01 \mu\text{M}$ masing-masing. Kadar penurunan peratus viabiliti sel menjadi mendatar antara julat kepekatan $3-10 \mu\text{M}$. Analisis statistik menggunakan ujian t tidak bersandar menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) bagi penurunan peratus viabiliti sel antara sebatian DFEF dan sebatian DFBF untuk ketiga-tiga masa rawatan.



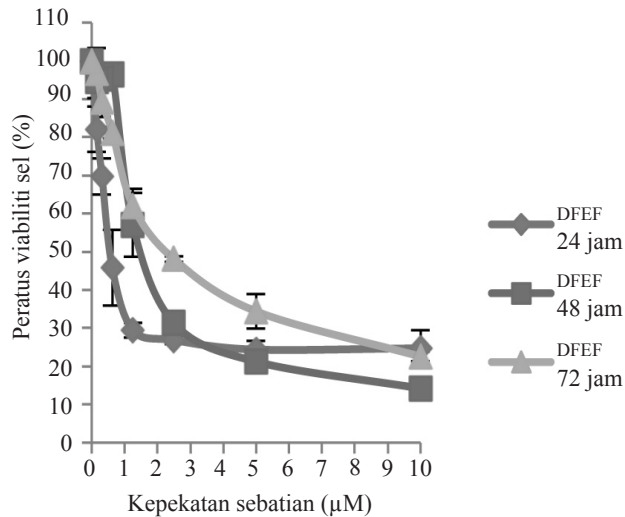
RAJAH 1. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat, DFEF terhadap sel K562 pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n = 3$)



RAJAH 2. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat, DFBF terhadap sel K562 pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n = 3$)

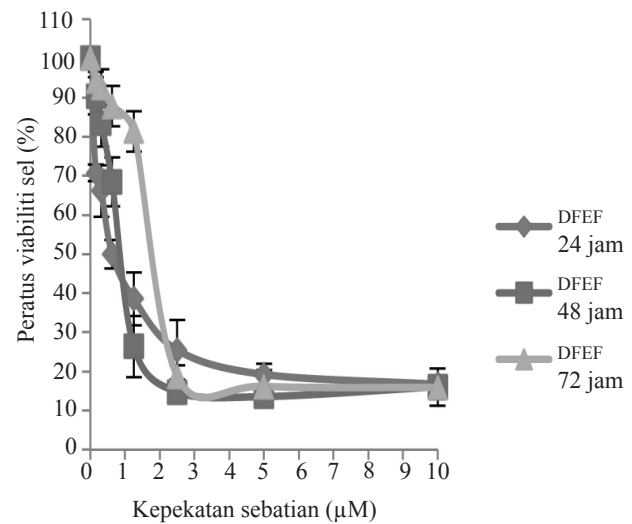
Rajah 3 dan 4 pula menunjukkan graf peratus viabiliti sel hepar Chang untuk masa rawatan 24, 48 dan 72 jam setelah dirawat dengan sebatian DFEF dan sebatian DFBF. Berdasarkan graf didapati bagi sebatian DFEF, peratus

viabiliti sel berlaku antara julat kepekatan 0-3 μM , tetapi bagi sebatian DFBBF peratus penurunan viabiliti sel berlaku antara julat 0-5 μM . Selepas julat ini peratus penurunan viabiliti sel menjadi statik. Berdasarkan graf, nilai IC_{50} yang diperolehi adalah kurang daripada 5 μM untuk kedua-dua sebatian bagi ketiga-tiga masa rawatan. Analisis statistik menggunakan ujian t tidak bersandar menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) bagi peratus penurunan viabiliti sel hepar Chang antara sebatian DFEF dan sebatian DFBBF untuk masa rawatan 24, 48 dan 72 jam.

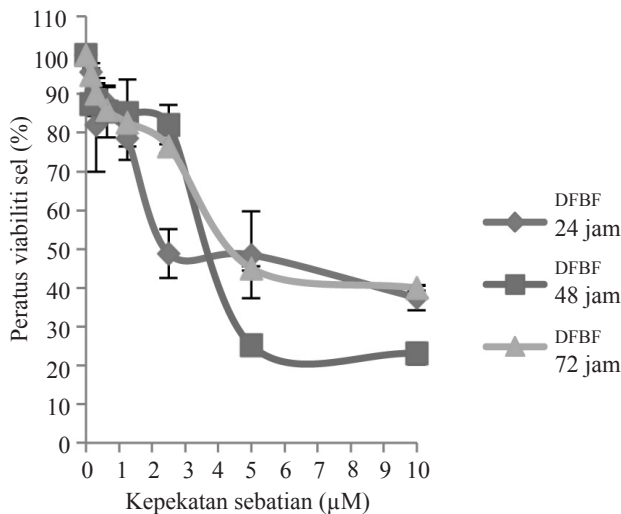


RAJAH 3. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat, DFEF terhadap sel hepar Chang pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n = 3$)

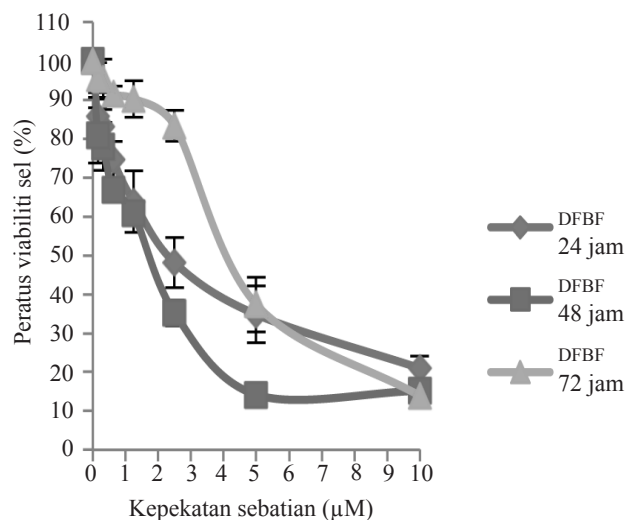
berlaku antara julat 0-3 μM bagi sebatian DFEF, dan 0-5 μM bagi sebatian DFBBF. Peratus penurunan viabiliti selepas julat tersebut menunjukkan keadaan mendatar. Berdasarkan graf tersebut juga didapati kedua-dua sebatian mampu menyebabkan kematian 50% sel dengan memberikan nilai IC_{50} kurang daripada 5 μM untuk kedua-dua sebatian bagi ketiga-tiga masa rawatan. Analisis menggunakan ujian t tidak bersandar menunjukkan bahawa tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) bagi penurunan peratus viabiliti sel untuk kedua-dua sebatian itu.



RAJAH 5. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat, DFEF terhadap sel V79 pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n = 3$)



RAJAH 4. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat, DFBBF terhadap sel hepar Chang pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n = 3$)



RAJAH 6. Kesan sitotoksik sebatian difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat, DFBBF terhadap sel V79 pada masa rawatan 24, 48 dan 72 jam menggunakan ujian asai MTT (purata \pm SEM, $n=3$)

Manakala Rajah 5 dan 6 pula adalah graf peratus penurunan viabiliti sel V79 setelah dirawat menggunakan sebatian DFEF dan sebatian DFBBF untuk masa rawatan 24, 48 dan 72 jam. Didapati peratus penurunan viabiliti sel

Jadual 1 menunjukkan nilai IC_{50} bagi ketiga-tiga sel untuk masa rawatan yang berbeza bagi sebatian DFEF dan sebatian DFBB. Indeks pemilihan yang dipamerkan dalam Jadual 2 menunjukkan pada masa rawatan 24 jam, nilai indeks pemilihan sel K562 terhadap sel hepar Chang dan V79 adalah di bawah 2 iaitu masing-masing 0.63 dan 0.75 untuk sebatian DFEF, serta 0.26 dan 0.23 untuk sebatian DFBB. Namun begitu, pada masa rawatan 48 jam nilai indeks pemilihan sel K562 terhadap sel hepar Chang dan V79 adalah di atas 2 bagi sebatian DFEF dengan masing-masing mempunyai nilai indeks pemilihan ialah 4.67 dan 2.67. Manakala bagi sebatian DFBB nilai indeks pemilihan sel K562 terhadap sel hepar Chang adalah di atas 2, tetapi terhadap sel V79 adalah di bawah 2 dengan mempunyai nilai indeks pemilihan masing-masing adalah 3.00 dan 1.42. Pada masa 72 jam pula nilai indeks pemilihan sel K562 terhadap sel hepar Chang dan V79 menunjukkan nilai di atas 2 dengan masing-masing mempunyai nilai 4.40 dan 3.60 bagi sebatian DFEF serta 4.26 dan 3.96 bagi sebatian DFBB. Berdasarkan nilai indeks pemilihan ini dapat diperhatikan bahawa kedua-dua sebatian menunjukkan ciri-ciri membunuh secara memilih pada masa rawatan 48 dan 72 jam.

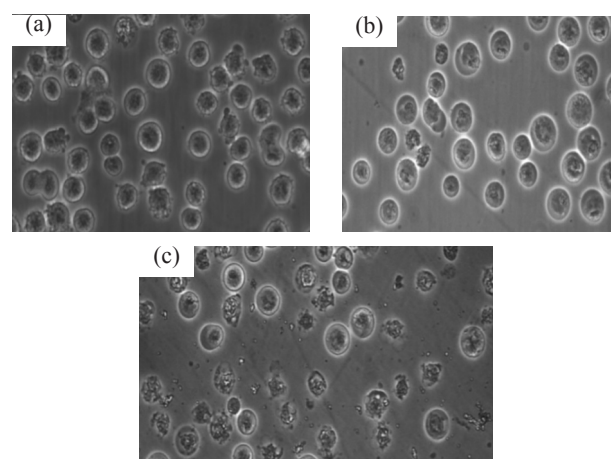
JADUAL 1. Nilai IC_{50} sebatian DFEF dan DFBB bagi sel eritroleukemia K562, sel hepar Chang manusia dan sel fibroblas paru paru tikus belanda V79

Sel	Masa rawatan (jam)	Nilai IC_{50} (μ M)	
		Sebatian I	Sebatian II
K562	24	0.80	9.40
	48	0.30	1.2
	72	0.50	1.01
Hepar Chang	24	0.50	2.40
	48	1.40	3.60
	72	2.20	4.30
V79	24	0.60	2.20
	48	0.80	1.70
	72	1.80	4.00

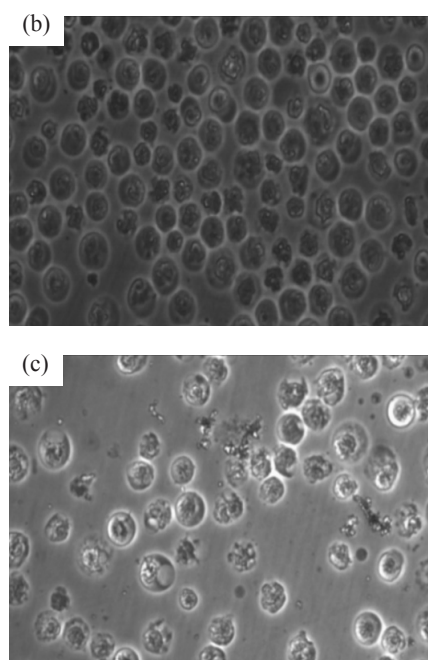
JADUAL 2. Indeks pemilihan antara sel K562 dengan sel hepar Chang dan V79

	Sebatian I			Sebatian II		
	24 jam	48 jam	72 jam	24 jam	48 jam	72 jam
Indeks pemilihan sel K562 dengan sel hepar Chang	0.63	4.67	4.40	0.26	3.00	4.26
Indeks pemilihan sel K562 dengan sel V79	0.75	2.67	3.60	0.23	1.42	3.96

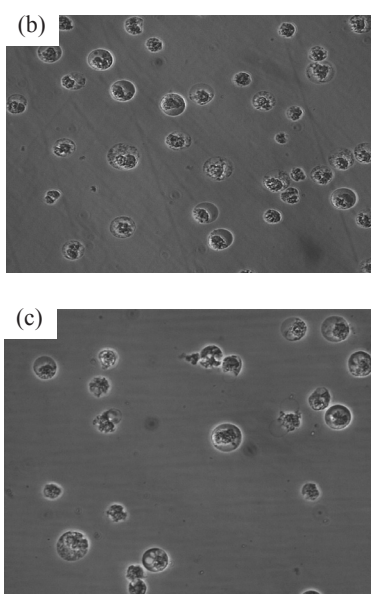
Rajah 7,8 dan 9 merupakan gambar sel K562 setelah dirawat menggunakan nilai IC_{50} sebatian DFEF, DFBB dan sel tanpa rawatan (kawalan negatif). Perubahan morfologi sel K562 yang dapat diperhatikan selepas sel dirawat dengan nilai IC_{50} dan masa rawatan 24, 48 dan 72 jam adalah seperti pengecutan sel, pembengkakan sel, pengecutan nukleus sel, pembentukan jasad apoptotik dan sel lisis. Hasil kajian mendapati semakin lama sel dirawat dengan sebatian DFEF dan DFBB, semakin ketara perubahan morfologi sel tersebut.



RAJAH 7. Morfologi sel K562 selepas dirawat dengan nilai IC_{50} pada masa rawatan 24 jam (pembesaran x 20), (a) kawalan negatif, (b) dirawat dengan sebatian I (c) dirawat dengan sebatian II



RAJAH 8. Morfologi sel K562 selepas dirawat dengan nilai IC_{50} pada masa rawatan 48 jam (pembesaran x 20), (b) dirawat dengan sebatian I (c) dirawat dengan sebatian II



RAJAH 9. Morfologi sel K562 selepas dirawat dengan nilai IC_{50} pada masa rawatan 72 jam (pembesaran x 20), (b) dirawat dengan sebatian I (c) dirawat dengan sebatian II

PERBINCANGAN

Berdasarkan hasil yang diperolehi dalam kajian ini, kedua-dua sebatian difenilstanum (IV) alkilfenilditiokarbamat yang diuji berupaya menurunkan peratus viabiliti sel pada kepekatan dan masa rawatan yang berbeza. Ini dibuktikan oleh kajian yang dijalankan oleh Chikahisa et al. (1998) menunjukkan bahawa sebatian trifenilstanum adalah bergantung kepada kepekatan sebatian dan masa rawatan yang diberikan. Tempoh inkubasi bagi kajian ketoksikan sebatian organostanum (IV) dalam pengkulturan sel adalah antara 24 ke 48 jam yang kebiasaannya dipilih pada keadaan di mana sel telah bertindak balas secara maksimum (Pellerito et al. 2006). Selain itu, hasil ujian ini juga menunjukkan bahawa sebatian DFEF dan DFBF adalah toksik terhadap sel K562, berdasarkan nilai IC_{50} . Ini bertepatan dengan kajian yang dilakukan oleh Pellerito et al. (2006), mendapati bahawa kebanyakan sebatian organostanum (IV) adalah sangat toksik, walaupun pada kepekatan yang sangat rendah.

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperolehi menunjukkan sebatian DFEF memberikan nilai IC_{50} yang rendah iaitu dalam julat 0.30-0.80 μM bagi masa rawatan 24, 48 dan 72 jam terhadap sel K562. Menurut How et al. (2008), sebatian DFEF dikategorikan sebagai sangat toksik kerana mempunyai nilai IC_{50} kurang daripada 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ($< 7.51 \mu\text{M}$). Manakala bagi sebatian DFBF pula, untuk masa rawatan 24 jam sebatian ini dikategorikan sebagai sederhana toksik kerana nilai IC_{50} nya adalah 9.40 μM , iaitu diantara julat $5.0 \leq 10.0 \mu\text{g/mL}$ ($6.93 \mu\text{M} \leq 13.86 \mu\text{M}$), tetapi pada masa 48 jam dan 72 jam, sebatian ini adalah sangat toksik terhadap sel K562, kerana nilai IC_{50} adalah kurang daripada 5 $\mu\text{g/mL}$ ($< 6.93 \mu\text{M}$). Kajian yang dilakukan sebelum ini menunjukkan sebatian difenilstanum (IV), iaitu bis (8-quinolino) difenilstanum (IV) menunjukkan kesan

sitotoksik yang lebih kuat berbanding cisplatin pada tujuh jenis sel kanser manusia iaitu sel A498, EVSA-T, H226, IGROV, M19, MCF-7 dan WiDr dengan nilai perencatan dos median (ID_{50}) adalah antara 103-314 ng/mL (Basu Baul et al. 2006).

Bagi sel hepar Chang dan V79, nilai IC_{50} sebatian DFEF dan sebatian DFBF yang diperolehi bagi ketiga-tiga masa rawatan adalah kurang daripada 5 μM . Oleh itu, sebatian DFEF dan DFBF adalah sangat toksik terhadap sel hepar Chang berdasarkan nilai IC_{50} yang diperolehi, iaitu kurang daripada 5 $\mu\text{g/mL}$ ($< 7.51 \mu\text{M}$) bagi ketiga-tiga masa rawatan (How et al. 2008). Kajian yang dilakukan oleh Awang et al. (2011), menunjukkan bahawa sebatian organostanum (IV) benzilisopropilditiokarbamat turut memberikan kesan sitotoksik terhadap sel hepar Chang.

Dapat diperhatikan bahawa kedua-dua sebatian pada kepekatan tertinggi iaitu 10 μM tidak mampu untuk menyebabkan kematian sel 100%. Mengikut William et al. (1994), pada sesetengah tisu yang mengalami pembahagian normal dan juga tumor, terdapat satu peringkat populasi sel hidup dengan tidak berproliferasi, di mana sel akan meninggalkan kitaran hidupnya secara sementara. Peringkat ini dikenali sebagai fasa rehat atau dipanggil G_0 . Pada fasa ini, sel yang tidak membahagi selalunya akan hidup semasa rawatan kemoterapi dijalankan dan pada sel kanser ia akan bergenerasi semula selepas rawatan.

Kemungkinan sel yang tidak mati pada kepekatan rawatan ini berada pada fasa rehat iaitu G_0 . Selain itu, kesan sitotoksik sebatian DFEF dan sebatian DFBF yang diuji pada fasa ini juga tidak berkesan sepenuhnya jika mekanisme tindakan sebatian adalah secara spesifik pada kitar sel atau kepekatan rawatan yang digunakan tidak mencukupi untuk menyebabkan kematian sel 100%. Namun begitu, koresistans sel terhadap tindakan sitotoksiti kedua-dua sebatian boleh dijadikan kemungkinan, mengapa sel tidak mati sepenuhnya. Selain itu, sifat kedua-dua sebatian yang menunjukkan aktiviti sitostatik juga kemungkinan penyumbang kepada penyebab kematian tidak berlaku sepenuhnya pada kepekatan 10 μM . Sitostatik didefinisikan sebagai merencat pertumbuhan sel dengan menghalang pembahagian sel.

Oleh itu, berdasarkan nilai IC_{50} yang diperolehi daripada ujian asai MTT, didapati sebatian DFEF adalah lebih toksik terhadap sel K562, sel hepar Chang dan sel V79 berbanding sebatian DFBF. Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh perbezaan panjang rantai kumpulan alkil yang terikat pada ligan ditiokarbamat. Sebatian DFEF mempunyai 2 bilangan karbon yang terikat pada ligan ditiokarbamatnya, manakala sebatian DFBF pula mempunyai 4 bilangan karbon.

Badisa et al. (2009) menggunakan indeks pemilihan bagi menilai kebolehan kesan sitotoksik secara memilih sebatian yang diuji pada sel bukan kanser dan sel sasaran. Menurut Badisa et al. (2009), semakin tinggi nilai indeks pemilihan, semakin tinggi kebolehan memilih bagi sesuatu sebatian. Berdasarkan pengiraan indeks pemilihan yang telah dilakukan, didapati nilai indeks pemilihan sel K562 dengan sel hepar Chang dan sel V79 bagi sebatian DFEF

dan sebatian DFBF untuk masa rawatan 24 jam adalah <2 μM . Menurut Badisa et al. (2009), nilai indeks pemilihan <2 μM menunjukkan toksisiti umum sesuatu sebatian. Oleh itu pada masa 24 jam, sebatian DFEF dan sebatian DFBF menunjukkan kesan toksisiti umum dan kesan sitotoksik secara tidak memilih terhadap sel eritroleukemia K562 dan kedua-dua sel bukan kanser iaitu sel hepar Chang dan V79. Manakala pada masa rawatan 48 jam dan 72 jam pula, nilai indeks pemilihan adalah > 2 bagi sebatian DFEF. Ini menunjukkan pada masa rawatan berikut sebatian I menunjukkan kesan toksisiti umum dan kesan sitotoksik secara memilih terhadap sel K562 berbanding sel hepar Chang dan V79. Namun begitu, bagi sebatian DFBF pula, pada masa 48 jam nilai indeks pemilihan adalah > 2 , bagi sel hepar Chang tetapi < 2 bagi sel V79. Ini menunjukkan bahawa sebatian DFBF menunjukkan ciri-ciri memilih terhadap sel hepar Chang tetapi tidak bagi sel V79 untuk masa rawatan 48 jam. Bagi masa 72 jam pula, nilai indeks pemilihan sebatian II terhadap sel K562 dengan sel hepar Chang dan V79 menunjukkan nilai melebihi 2, oleh itu, sebatian II mempunyai ciri-ciri memilih terhadap sel K562 berbanding sel hepar Chang dan V79.

Berdasarkan ujian morfologi yang telah dilakukan, didapati morfologi sel K562 berubah selepas 24 jam masa rawatan bagi kedua-dua sebatian termasuk kawalan positif iaitu doxorubicin. Antara perubahan yang dapat dilihat ialah pengecutan sel, kondensasi nukleus dan pembentukan jasad apoptotik. Apoptosis dikenali sebagai jenis kematian yang diprogramkan dengan ciri-ciri seperti kondensasi nuklear kromatin, pengecutan sel, pembenjolan membran plasma dan pembentukan jasad apoptotik (Pellerito et al. 2006). Oleh itu, pada masa 24 jam, kemungkinan mod kematian sel K562 bagi kedua-dua sebatian ialah secara apoptosis. Ini dibuktikan oleh kajian yang dilakukan oleh Costa et al. (2006), sebatian diorganostanum (IV) dan triorganostanum (IV) yang dirawat ke atas sel A375 menunjukkan ciri-ciri apoptosis.

Manakala, apabila masa rawatan meningkat iaitu 48 dan 72 jam, perubahan morfologi sel yang dapat dilihat ialah pembengkakkan sel dan sel lisis. Menurut Pellerito et al. (2006), nekrosis adalah kematian sel secara tidak sengaja yang disebabkan oleh agen toksik. Nekrosis adalah berbeza dengan apoptosis dari segi morfologi dan biokimianya. Ciri-ciri sel yang mengalami nekrosis ialah pembengkakkan dan pemecahan sel serta pembebasan bahan sitoplasmik ke kawasan luar sel. Oleh itu, kemungkinan selepas masa rawatan 48 dan 72 jam sel mengalami kematian secara nekrosis berdasarkan morfologi yang telah diperhatikan. Apabila masa rawatan meningkat, corak kematian yang ditunjukkan berubah dari apoptosis kepada nekrosis. Menurut Bollo et al. (2006), pada kepekatan yang rendah sebatian organostanum merangsang fenomena awal dan akhir apoptosis pada sel timosit tikus, tetapi pada kepekatan tinggi, sel terdorong untuk mengalami nekrosis berbanding apoptosis. Ini membuktikan bahawa jenis kematian sel adalah bergantung kepada masa pendedahan dan kepekatan sebatian yang digunakan.

Perubahan morfologi sel ini juga turut berlaku ke atas sel bukan sasaran iaitu sel hepar Chang dan V79. Pada kedua-dua sel ini, perubahan yang sangat ketara yang dapat dilihat ialah sel telah kehilangan morfologi asal selepas 24 jam dirawat menggunakan sebatian I dan sebatian II. Sel kelihatan bulat dan terapung di dalam media. Ini menunjukkan sel tersebut telah mati dan mod kematian sel tersebut tidak dapat dikenalpasti. Oleh itu, kajian lanjutan untuk mengenalpasti kematian sel ini perlu dilakukan menggunakan kaedah pewarnaan akridin jingga dan propidium iodida. Selain itu, kaedah ujian sitometri aliran dengan Annexin V-FITC juga boleh dilakukan. Perubahan morfologi ini mengesahkan hasil ujian asai MTT bahawa kedua-dua sebatian ini mampu menyebabkan kematian sel apabila dirawat terhadap sel-sel yang diuji.

KESIMPULAN

Berdasarkan kajian yang telah dijalankan, data yang diperolehi dari ujian asai MTT menunjukkan bahawa sebatian difenilstanum (IV) etilfenilditiokarbamat dan difenilstanum (IV) butilfenilditiokarbamat mampu menurunkan peratus viabiliti sel bagi ketiga-tiga sel yang diuji. Selain itu, kesan sitotoksik yang poten juga dapat dilihat hasil daripada tindakan sebatian ini terhadap sel eritroleukemia K562, sel hepar Chang dan V79 bagi ketiga-tiga masa rawatan (24, 48 dan 72 jam). Pemerhatian morfologi yang dapat diperhatikan pada tempoh masa yang berbeza adalah menyamai ciri-ciri morfologi kedua-dua corak kematian iaitu apoptosis dan nekrosis.

PENGHARGAAN

Ucapan jutaan terima kasih kepada Kementerian Pengajian Tinggi di atas geran yang berkod UKM-NN-06-FRGS0091-2010 bagi membolehkan kajian ini dilakukan. Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) kerana telah menyediakan pelbagai kemudahan bagi melancarkan kajian ini. Seterusnya ucapan terima kasih juga kepada semua kakitangan makmal yang terlibat secara langsung sepanjang kajian ini dilakukan terutamanya kakitangan Makmal Bioserasi dan Toksikologi, Fakulti Sains Kesihatan, UKM Kuala Lumpur.

RUJUKAN

- Affan, M.A., Foo, I.P.P., Fasihuddin, B.A., Sim, E.U.H. & Hapipah, M.A. 2009. Synthesis, Structural Characterization and Toxicity Studies of Novel organotin(IV) Complexes derived from Benzoylacetone isonicotinylhydrazone (H2BAS): X-ray crystal structure of $[\text{Me}_2\text{Sn}(\text{BAS})]$. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 13(1): 73-85.
- Awang, N., Akmal, N.S., Baba, I., Rajab, N.F., Hamid, A., Yamin, B.M., & Halim, A.A. 2010. Synthesis and characterization of organotin (IV) *N*-Methyl-*N*-

- Isopropildithiocarbamate compounds: X-ray Crystal structure of $(\text{CH}_3)_2\text{Sn}[\text{S}_2\text{CN}(\text{CH}_3)(i\text{-C}_3\text{H}_7)]_2$. *World applied Sciences Journal* 9(7): 804-810.
- Awang, N., Kamaludin, N.F. & Ghazali, A.R. 2011. Cytotoxic Effect of Organotin(IV) Benzylisopropylthiocarbamate Compounds on Chang Liver Cell and Hepatocarcinoma HepG2 Cell. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 14(15): 768-774.
- Badisa, R.B., Darling-Reed, S.F., Joseph, P., Cooperwood, J.S., Latinwo, L.M. & Goodman, C.B. 2009. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Research* 29: 2993-2996.
- Basu Baul, T.S., Mizar, A., Lyčka, A., Rivarola, E., Jiráko, R., Holčáček, M., de Vos, D. & Englert, U. 2006. Diphenyltin (IV) complexes of the 5-[(E)-2-(aryl)-1-diazenyl]quinolin-8-olates: Synthesis and multinuclear NMR, ^{119}Sn Mössbauer, electrospray ionization MS, X-ray characterization and assessment of in vitro cytotoxicity. *Journal of Organometallic Chemistry* 691: 3416-3425.
- Bollo, E., Guglielmino, R., Sant, S., Pregel, P., Riondata, F., Miniscalco, B., Cornaglia, E., Nebbia, C. & Dacsto, M. 2006. Biochemical, ultrastructural and molecular characterization of the triphenyltin acetate (TPTA)- induced apoptosis in primary cultures of mouse thymocytes. *Cell Biology and Toxicology* 22(4): 275-284.
- Chikahisa, L., Oyama, Y., Iguchi, Y., Okazaki, E., Miyoshi, N., Satoh, M. & Yamada, Y. 1998. Effects of Triphenyltin on growth and viability of K562 leukemia cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6: 209-215.
- Costa, M.A., Pellerito, L., Izzo, V., Fiore, T., Pellerito, C., Melis, M., Musmeci, M.T. & Barbeiri, G. 2006. Diorganotin (IV) and triorganotin (IV) complexes of meso-tetra (4-sulfonatophenyl)porphine induce apoptosis in A375 human melanoma cells. *Cancer Letters* 238: 284-294.
- De Carvalho, R. & Sentelli, R.E. 2010. The Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. *Talanta* 82: 9-24.
- Hoch, M. 2001. Organotin compounds in the environment – an overview. *Applied Geochemistry* 6: 719-643.
- How, F.N.F., Crouse, K.A.M., Tahir, M.I., Tarafder, M.T.H. & Cowley, A.R. 2008. Synthesis, characterization and biological studies of S-Benzyl-B-N-(Benzoyl) Dithiocarbamate and its metal complexes. *Polyhedron* 27: 3325-3329.
- Islami-Moghaddam, M., Mansouri-Torshizi, H., Divsalar, A. & Saboury, A.A. 2009. Synthesis, characterization, cytotoxic and DNA binding studies of diimine platinum (II) and palladium (II) complexes of short hydrocarbon chain ethyldithiocarbamate ligand. *Journal of the Iranian Chemical Society* 6(3): 552-569.
- Johnson, D.J., Amarnath, V., Amarnath, K., Valentine, H. & Valentine, W.M. 2003. Characterizing the influence of structure and route of exposure on the disposition of dithiocarbamates using toluene-3,4-dithiol analysis of blood and urinary carbon disulfide metabolites. *Toxicological Sciences* 76: 65-74.
- Mahmoud Mohamed Ahmed Mohamed & Mohamed Mohamed Shoukry. 2001. Interaction of diphenyltin (IV) dichloride with selected bioligands. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49(3): 253-257
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Oh, D.H., Jun Soo Bang, Hyun Mi Choi, Hyung In Yang, Myung Chul Yoo & Kyoung Soo Kim. 2010. Fetal bovine serum requirement for pyrrolidine dithiocarbamate – induced apoptotic cell death of MCF-7 breast tumor cells. *European Journal of Pharmacology* 649: 135-139.
- Pellerito, C., Nagy, L., Pellerito, L. & Szorcsik, A. 2006. Biological activity studies on organotin(IV) $^{n+}$ complexes and parent compounds. *Journal of Organometallic Chemistry* 69(1): 1733-1747.
- Shahzadi, S., Shahid, K., Ali, S., Mazhar, M. & Khan K.M. 2005. Organotin (IV) Derivatives as Biocides: An Investigation of Structure by IR, Solution NMR, Elektron Impact MS and Assessment of Structure Correlation with Biocidal Activity. *Journal of the Iranian Chemical Society* 2(4): 277-288.
- William, B.P., Raymond, W.R., William, D.E. & Jonathan, M. 1994. *The Anticancer Drug*. 2nd Ed. United States.
- Yoshida, M., Matsui, Y., Ikarashi, Y., Usui, T., Osada, H. & Wakasugi, H. 2007. Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine – and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Research* 27: 729-736.

Normah Awang
Siti Musslihah Shahidi
Program Kesihatan Persekitaran dan Keselamatan Industri
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan
Fakulti Sains Kesihatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Asmah Hamid
Nurul Farahana Kamaludin
Program Sains Bioperubatan
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Malaysia

Pengarang untuk dihubungi: Normah Awang
Alamat emel: awang_normah@yahoo.com
Tel: 603-26878136 Fax: 603-26878137

Diterima: Jun 2012
Diterima untuk penerbitan: Disember 2012