

Sintesis dan Uji Aktivitas Senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon Terhadap Sel Kanker T47D Secara In Vitro

Synthesis And In Vitro Activity Test of 2-Bromo-4,5-dimethoxychalcone Againsts HeLa Cancer Cell

Retno Aliyatul Fikroh¹

¹ Universitas PGRI Madiun, Indonesia

aliya@unipma.ac.id

Abstrak

Senyawa Turunan kalkon telah berhasil disintesis, diidentifikasi struktur, dan diuji aktivitasnya terhadap sel kanker HeLa. Senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon disintesis melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt antara asetofenon dan 6-bromoveratraldehida. Sintesis senyawa kalkon dilakukan dengan refluks (65°C) selama 24 jam menggunakan etanol sebagai pelarut dan NaOH sebagai katalis. Senyawa ini menghasilkan rendemen 81%. Kemurnian produk hasil sintesis ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Identifikasi struktur dilakukan dengan Spektrometer ¹H dan ¹³C-NMR. Hasil uji aktivitas secara in vitro terhadap sel kanker HeLa menunjukkan bahwa senyawa 2'-bromo-4,5-dimetoksikalkon dinyatakan tidak aktif terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC₅₀ lebih dari 100 µg/mL.

Kata kunci: kalkon; sintesis; sel kanker T47D

Abstract

Synthesis of chalcone derivated has been synthhesized, structurally determined, and the in vitro cytotoxic activityof HeLa cell was evaluated. A novel 2-bromo-4,5-dimethoxychalcone was synthesized by Claisen-Schmidt condensation of acetophenone with 6-bromoveratraldehyde. The synthesis of chalcone was carried out by reflux condition (65°C) for 24 hours using ethanol as a solvent and NaOH as a catalyst. The results showed that these coumpoun produced 81% in yield. The purity of synthesized product was determined by Thin Layer Chromatography. Structure identification was performed by FT-IR and ¹H dan ¹³C-NMR spectrometer. In vitro activity test indicated that 2-bromo-4,5-dimethoxychalcone was not active for inhibiting the growth of T47D with IC₅₀ value more than 100 µg/mL.

Keywords: chalcone; synthesis; T47D cancer cell

PENDAHULUAN

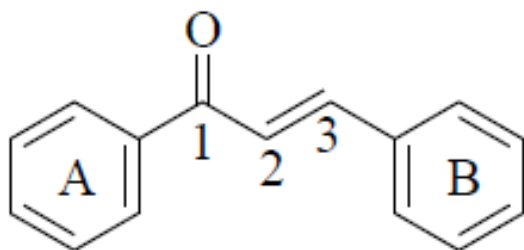
Kanker merupakan permasalahan masyarakat yang utama di Indonesia maupun di negara lain. Menurut data dari WHO diperkirakan setiap tahun sekitar 7,6 juta kematian akibat penyakit kanker dengan 70% total kematian berasal dari negara miskin dan berkembang seperti Indonesia. Prevalensi penyakit kanker di Indonesia sekitar 4,3 per 1000 penduduk. Kanker merupakan penyakit yang timbul akibat pertumbuhan sel yang

bersifat abnormal dan bersifat merusak. Penyakit kanker menjadi penyakit kedua penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskuar (Fadeyi dkk., 2008). Pengobatan kanker saat ini meliputi kemoterapi dan radioterapi. Pengobatan tersebut memiliki efek samping berupa toksisitas tinggi terhadap sel normal dan resistensni obat sehingga membatasi hasil dari pengobatan tersebut (Zhuang dkk., 2010).

Kanker dianggap salah satu penyakit yang paling sulit diatasi karena karakteristik bawaannya menunjukkan bahwa sel kanker berkembang biak secara tidak terkendali, mencegah apoptosis, menyerang dan bermetastasis.

Kalkon (1,3-difenil-2-propena-1-on) merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh tiga atom karbon dari sistem α,β -keton tak jenuh yang mengandung gugus ketoetilenal (-CO-CH=CH-) (Illango dkk., 2010). Senyawa khalkon merupakan senyawa umum yang terdapat pada tanaman yang memiliki kandungan metabolit sekunder flavonoid (Solomon dan Lee, 2012).

Sintesis kalkon dapat dilakukan melalui kondensasi Claisen-Schmidt dari keton aromatik dan aldehid menggunakan katalisator asam atau basa serta diikuti oleh reaksi dehidrasi. Katalis asam yang digunakan antara lain HCl (Jayapal dan Sreedhar, 2010) sedangkan katalis basa biasanya digunakan adalah NaOH (Choudhary dan Juyal, 2011). Adanya guus etilen keto (-CO-CH=CH=) yang reaktif menyebabkan kalkon memiliki aktivitas biologis yang bermacam-macam (Jayapal dan Sreendhar, 2010).



Gambar 1. Struktur Kalkon

Senyawa kalkon telah banyak diteliti memiliki berbagai aktivitas biologis meliputi antiinflamasi, antitumor, dan antibakteri. Telah banyak literatur yang menyarankan penggunaan kalkon dalam proses induksi apoptosis sel kanker dan berpotensi memiliki kemampuan untuk menghambat respirasi mitokondria sehingga merusak membran mitokondria (Syam, 2012).

METODE

Penelitian ini terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap sintesis yang dilakukan dengan menggunakan metode Claisen-Schmidt dan tahap kedua adalah uji aktivitas secara *in vitro* terhadap sel kanker T47D dengan menggunakan metode MTT Assay.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam sintesis adalah seperangkat alat refluks, penyaring Buchner, alat timbang elektronik (Libror EB-330, Shimadzu), alat penentu titik leleh (*Electrothermal-9100*), spektrometer resonansi magnetik inti proton dan karbon (NMR ^1H (300 MHz) dan ^{13}C (125 MHz), JEOL JNM ECA 500) menggunakan standar internal TMS dalam pelarut DMSO dan CDCl_3 . Alat yang digunakan dalam uji aktivitas antara lain mikroplat 96 *well* (IWAKI), tabung konikal, tip mikropipet biru, tip mikropipet kuning, mikropipet 2-20 μL (Nichipet EX H32014262), mikropipet 200-1000 μL (Gilson X57732D), *microplate ELISA reader* (BIO-RAD Benchmark), inkubator 5% CO_2 (NAPCO model 6200, Heraeus), hemositometer Neubauer), *Laminary Air Flow* (LABONCO Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series) dan mikroskop inverted (Olympus CKX41-1X2SL).

Bahan yang digunakan antara lain asetofenon, 6-bromovertraldehida, natrium hidroksida, asam klorida, metanol, etanol, n-heksana, etil asetat, aquades, dan plat KLT alumunium silika gel 60 F-254. Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas meliputi media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), tripsin-EDTA 0,25%, dimetilsulfoksida (DMSO), *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% (b/v), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-dipheniltetrazoliumbromid (MTT) dan *Fetal Bovine Serum* (FBS). Sel uji yang digunakan untuk uji antikanker adalah sel kanker T47D.

Prosedur Kerja

Sintesis 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Sebanyak 0,6 g (5 mmol) asetofenon direaksikan dengan 12 mL NaOH 40% (b/v) selama ± 30 menit. Campuran dimasukkan ke dalam 1,22 g (5 mmol) 6-bromovertraldehida yang telah direaksikan dengan 20 mL etanol kedalam labu leher tiga. Campuran direfluks pada suhu 68°C selama 24 jam dan proses reaksi diamati dengan KLT. Hasil refluks dituang ke dalam es akuades. Selanjutnya diasamkan dengan HCl 10% (v/v) hingga terbentuk endapan berwarna kuning. Endapan yang terbentuk disaring dan direkristalisasi dengan etanol. Karakterisasi dilakukan dengan menggunakan spektrometer IR, ^1H dan ^{13}C -NMR.

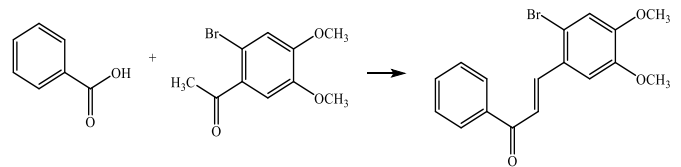
Uji Aktivitas secara In Vitro

Kultur sel T47D sejumlah 10^4 sel/well diinokulasikan ke dalam microplate 96 well plate dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 . Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO (dimetilsulfoksida). Sampel dengan konsentrasi beragam diencerkan dengan penambahan PSD (*phosporic buffer solution*) dengan pH (7,30-7,65) ditambahkan ke dalam sel dalam microplate lalu dikocok dan disimpan kembali dalam inkubator CO_2 . Setelah 48 jam, ke dalam sel ditambahkan reagen MTT dan diinkubasi selama 4 jam untuk selanjutnya ditambahkan SDS. Inkubasi sel dilanjutkan kembali selama 24 jam. Perubahan warna dari MTT kuning menjadi formazan ungu di dalam mitokondria sel yang masih hidup dapat dikuantifikasi pada panjang gelombang λ 595 nm dengan ELISA reader. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung IC_{50} dengan metode probit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

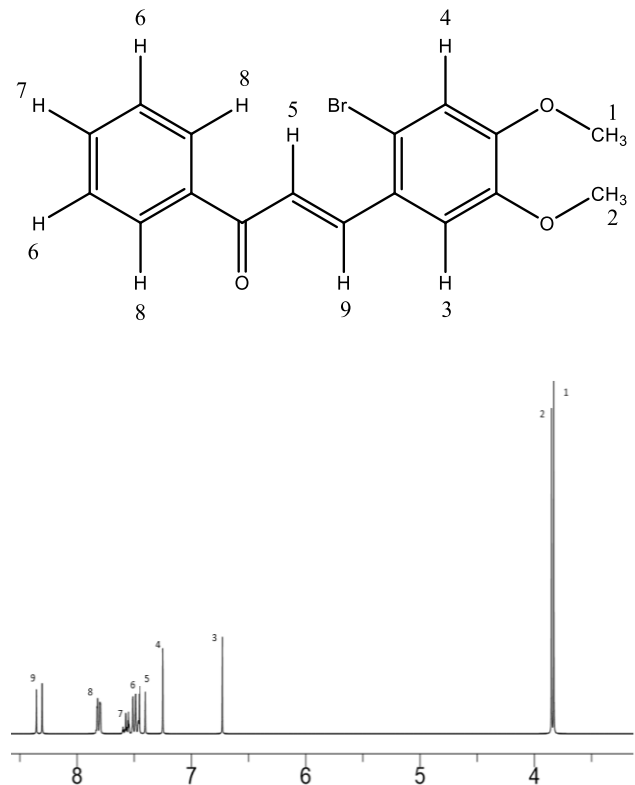
Sintesis 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon disintesis melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt antara 6-bromovertraldehida dan asetofenon. Produk yang terbentuk berupa padatan berwarna kuning, titik leleh $143\text{-}145^{\circ}\text{C}$ dan rendemen 81%.



Gambar 2 Skema reaksi senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Hasil ^1H -NMR menunjukkan bahwa senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon telah terbentuk. Senyawa ini menunjukkan ada 9 jenis proton dengan lingkungan berbeda dengan jumlah total proton sesuai dengan integrasinya yaitu 11 proton.



Gambar 3. Spektrum ^1H -NMR senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Proton 1, 2, 3, dan 4 dengan penampakan *singlet* pada δ berturut-turut sebesar 3,83; 3,85; 6,73; dan 7,25 ppm. Proton tersebut tidak terkopling karena tidak ada proton pada atom tetangga dari atom C yang diikatnya. Puncak karakteristik senyawa kalkan terlihat dengan terbentuknya puncak

H α dan H β yang ditunjukkan pada proton 5 dan 9 dengan pergeseran kimia (δ) 7,43 ppm dan 8,33 ppm dengan nilai konstan kopling (J) berturut-turut adalah 15,1 dan 15,1 Hz. Kedua nilai konstanta ini menunjukkan keberadaan alkena *trans* dari gugus α,β -karbonil tak jenuh

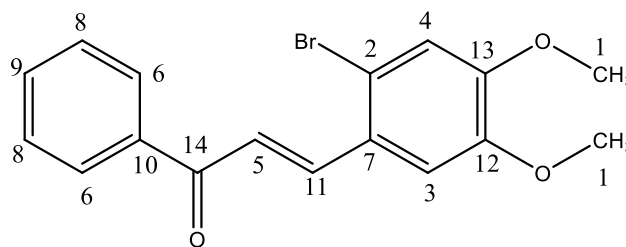
Tabel 1. Interpretasi spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

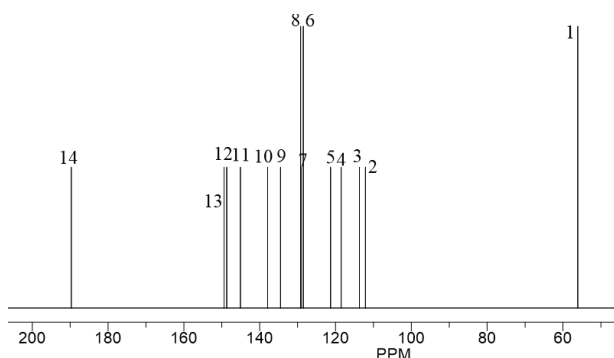
Puncak	Pergeseran kimia (δ , ppm)	Kenampakan	Tetapan kopling J (Hz)
1	3,83	<i>Singlet</i>	
2	3,85	<i>Singlet</i>	
3	6,73	<i>Singlet</i>	
4	7,25	<i>Singlet</i>	
5	7,43	<i>Doublet</i>	15,1
6	7,49	<i>Triplet</i>	7,5 dan 7,5
7	7,57	<i>Triplet</i>	7,5 dan 7,5
8	7,81	<i>Doublet</i>	7,5
9	8,33	<i>Doublet</i>	15,1

Pergeseran kimia proton H β muncul pada daerah yang lebih *downfield* dibandingkan proton H α dikarenakan adanya polarisasi ikatan rangkap C=C dalam sistem yang disebabkan oleh adanya gugus karbonil. Hal ini menyebabkan densitas elektron pada posisi α lebih besar dari pada posisi β . Senyawa kalkan yang memiliki serapan proton alkena dengan J sebesar 15 Hz menunjukkan bahwa senyawa kalkan yang terbentuk disominasi isomer *trans*.

Puncak 6 adalah sinyal dari 2 proton yang memiliki lingkungan yang sangat mirip sehingga muncul 1 puncak pada δ 7,49 ppm. Proton 6 muncul dengan kenampakan *triplet* dengan $J_{\text{orto}} = 7,5$ dan 7,5 Hz terkopling proton 7 dan 8. Proton 7 merupakan sinyal pada δ 7,57 ppm dengan kenampakan *triplet* dengan $J_{\text{orto}} = 7,5$ dan 7,5 Hz terkopling proton 6. Puncak 8 juga merupakan sinyal dari 2 proton dengan lingkungan yang sangat mirip sehingga muncul 1 puncak pada δ 7,81 ppm. proton 8 muncul dengan kenampakan *doublet* dengan $J_{\text{orto}} = 7,5$ terkopling proton 6.

Hasil $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan bahwa terdapat 14 puncak karbon dengan karbon yang sesuai dengan integrasinya yaitu 17 karbon sehingga terdapat 1 puncak yang mewakili 2 karbon. Puncak 17 merupakan puncak dari karbonil keton yang berada pada daerah *downfield* karena sangat tidak terlindungi akibat kuatnya elektronegativitas atom O yang terikat langsung.





Gambar 4 Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Karbon 13 dan 12 menjadi tidak terlindungi setelah mengikat atom dari gugus OCH_3 . Puncak 5 dan 11 yang merupakan puncak C_α dan C_β yang secara berurutan muncul pada δ 121,3 dan 145,1 ppm. puncak C_α muncul pada posisi yang lebih upfield dibandingkan dengan C_β karena kerapatan elektron ikatan rangkap sangat kuat tertarik oleh karbonil melalui resonansi ikatan konjugasi yang disebut sebagai efek mesomeri. Akibatnya awan elektron pada C_β sangat berkurang setelah bergeser menuju C_α .

Tabel 2. Interpretasi spektrum ^{13}C -NMR senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon

Puncak	Pergeseran kimia (δ , ppm)
1	56,1
2	112,1
3	113,7
4	118,5
5	121,3
6	128,5
7	129,1
8	129,2
9	134,5
10	137,9
11	145,1
12	148,7
13	149,4
14	189,7

Analisis MS menunjukkan ion molekular (M^+) 346 dan 348 yang sesuai dengan massa molar senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon. Berdasarkan analisis ^1H - dan ^{13}C -NMR dapat disimpulkan senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon telah terbentuk.

Uji Aktivitas Secara In Vitro

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas adalah metode MTT Assay. Prinsip metode MTT Assay adalah terjadinya reduksi garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida) yang

berwarna kuning oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan yang berwarna ungu serta tidak larut dalam air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) yang akan melarutkan kristal berwarna yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Pembentukan warna ungu yang terjadi setara dengan jumlah sel hidup sehingga ketika intensitas ungu semakin banyak maka jumlah sel hidup juga semakin banyak.

Perhitungan nilai IC_{50} diperoleh dari analisis hubungan persentase sel mati yang ditransformasikan ke dalam angka probit dengan konsentrasi uji yang dihitung menggunakan metode probit. Suatu senyawa uji dengan nilai IC_{50} dibawah 100 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan adanya potensi sebagai agen kompreventif (Meiyanto dkk., 1999). Menurut Cardennas dkk (2006) senyawa uji dengan nilai $IC_{50} < 10$ $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan sangat aktif, IC_{50} antara 10-20 $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan aktif dan IC_{50} antara 20-100 $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan cukup aktif. Literatur lain berdasarkan Tanamatarayat dkk. (2003) mengklasifikasikan kekuatan aktivitas sitotoksitas senyawa (IC_{50}) dalam menghambat poliferasi sel kanker menjadi tiga kategori yaitu $IC_{50} \leq 20$ $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan aktif, IC_{50} 21-100 $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan cukup aktif, dan nilai $IC_{50} > 100$ $\mu\text{g/mL}$ dikategorikan tidak aktif.

Adapun hasil uji aktivitas senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon terhadap sel kanker payudara T47D menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 583 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan nilai tersebut menunjukkan bahwa senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon bersifat tidak toksik untuk sel Kanker T47D.

Pada hasil uji senyawa 2'hidroksi-3-beomo-4,5- dimetoksi kalkon yang dilaporkan oleh Ketabforoosh dkk (2014) diketahui memiliki toksisitas terhadap sel kanker payudara sebesar 0,36 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan nilai toksisitas dimungkinkan akibat posisi substituen bromo yang berbeda. Pada penelitian ini bromo terletak pada posisi orto sementara pada penelitian Ketabforoosh terletak pada posisi meta sehingga menunjukkan penurunan sifat toksisitas yang signifikan. Dengan demikian, adanya perubahan struktur atau perubahan posisi substituen dalam senyawa kalkon berpengaruh terhadap aktivitas senyawa dalam menghambat sel kanker.

Posisi substituen yang terikat dalam senyawa kalkon memiliki pengaruh terhadap

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon dapat disintesis melalui reaksi Claisen-Schmidt antara asetofenon dan 6-bromoveratraldehida dan diperoleh rendemen sebesar 81%. Hasil uji aktivitas secara *in vitro* menunjukkan nilai IC_{50} senyawa 2-bromo-4,5-dimetoksikalkon sebesar 585 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dinyatakan bersifat tidak toksik terhadap sel kanker T47D.

SARAN

Sebelum melakukan sintesis sebaiknya dilakukan *moleculer docking* terhadap senyawa yang akan disintesis sehingga dapat menentukan secara *in silico* pengaruh penghambatan terhadap sel kanker

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih untuk Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Gadjah Mada yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Choudhary A.N, Juyal V. 2011. Synthesis of chalcone and their derivatives as antimicrobial agents. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(3): 125-128.
- Fadeyi O.O, Adamson S.T, Myles E.L, Okoro C.O. 2008. Novel Fluorinated Acridone Derivatives. Part 1: Synthesis and Evaluation As Potential Anticancer Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18(14):4172-4176.
- Ilango K, Valentina B, and Saluja G. S. 2010. Synthesis and In-vitro Anticancer Activity of Some Substituted Chalcone

- derivatives, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 1(2), 354-359.
- Jayapal M.R, Prasad K.S, Sreedhar N.Y. 2010. Synthesis and Characterization of 2,5-dihydroxy Substitued Chalcones Using SOCl₂/EtOH. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*1(4): 361-366.
- Meiyanto, E., 1999, Kurkumin sebagai Obat Antikanker: Menelusuri Mekanisme Aksi, *Maj. Farm. Indones.*, 10(4), 224-236.
- Solomon V.R, Lee G. 2012. Anti-Breast cancer Activity of Heteroaryl Chalcone Derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 66: 213.
- Syam S, Abdelwahab S.I, Al-Mamary M.A, Mohan S. 2012. Synthesis of Chalcones with Anticancer Activities. *Molecules* 17: 6179-6195.
- Tanamatarayar, P., Limtrakul, P., Chunsakaow, S., and Duangrat, C., 2003, Screening of Some Rubiaceoous Plants for Cytotoxic Activity Againts Cervix Carcinoma (KB-3-1) Cell Line, *Thai. J. Pharm. Sci.*, 27 (3-4): 167-172.
- Zhuang H, Jiang W, Cheng W, Qian K, Dong W, Cao L, et al. 2010. Down Regulation Of HSP27 Sensitizes TRAIL-Resistant Tumor Cell To TRAIL-Induced Apoptosis. *Lung Cancer* 68(1): 27-38.
- Ketabforoosh, S. H. M. E., Khaeirollahi, A, Safavi, M., Esmati, N., Ardestani, S. K., Emami, S., Firoozpour, L., Shafiee, A., and Foroumadi, A., 2014, Synthesis and Anti-Cancer Activity Evaluation of New Dimethoxylated Chalcone and Flavanone Analogs, *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.*, 347, 853- 860.

