

Uji Aktivitas Sitotoksik Senyawa Analog 3,4-Diklorokalkon terhadap Sel Hela secara MTT

The Cytotoxic Activity Test of 3,4-Dichlorochalcone Analog Against Hela Cell by MTT Method

NURAINI HARMASTUTI*, MUHAMMAD MUCHALAL

*Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi
Jln. Letjen Sutoyo-Mojosongo Surakarta-57127 Telp. 0271-852518
* Korespondensi: nuraini_harmastuti@yahoo.co.id*

(Diterima 20 September 2014, disetujui 22 Oktober 2014)

ABSTRAK

Kalkon telah dibuktikan mempunyai bermacam-macam aktivitas biologis, salah satu di antaranya sebagai antitumor. Penelitian ini bertujuan mensintesis senyawa analog 3,4-diklorokalkon dan meneliti efek sitotoksiknya terhadap sel HeLa. Senyawa tersebut disintesis dengan memodifikasi cincin aromatik yang diserang pada posisi β pada karbonil keton. Cincin aromatikanya berupa furanil aromatik. Sintesis senyawa analog 3,4 diklorokalkon menggunakan metode Vogel menggunakan material awal furanilbenzaldehida dan 3,4-dikloroasetofenon. Kemurnian hasil sintesis dianalisis dengan kromatografi lapis tipis, jarak lebur, dan kromatografi gas. Elusidasi struktur ditentukan dengan analisis spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, spektrometer H1-NMR, dan spektrometer massa. Senyawa lalau diamati efek sitotoksiknya terhadap sel HeLa dengan metode MTT, Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa analog 3,4 diklorokalkon telah disintesis, murni, dan strukturnya adalah furanil-3',4'-diklorokalkon sesuai yang diprediksikan dengan nilai IC₅₀ aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa sebesar 23,5 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : analog 3,4 diklorokalkon, sel HeLa, sintesis, sitotoksik.

ABSTRACT

Chalcones has been known to have many biological activities, for example as an antitumour. These research synthesized and observed the cytotoxicity effects against HeLa cells of the 3,4-dichlorochalcone analog compound. These compounds were synthesized by modifying in the aromatic ring which attached at β position to the keton carbonyl. The aromatic ring was furanylaromatic. Synthesis of 3,4-dichlorochalcone analog compound was carried out by Vogel method using starting materials of furanylbenzaldehyde and 3,4-dichloroacetophenone. These purity test of synthesized compound was analyzed using thin layer chromatography, melting range, and GC methods. Structure elucidation was determined by using physical methods, such as UV spectrophotometer, IR spectrophotometer, H1-NMR spectrometer, and MS spectrometer analysis. The compound was then observed the cytotoxicity effects against HeLa cells by MTT method. The result indicated that the 3,4-dichlorochalcone analog compound had been able to be synthesized, purified, and it had structure as a predicted compound, furanyl-3',4'-dichlorochalcone. The cytotoxic results shown that the 3,4-dichlorochalcone analog compound with the IC₅₀ value of 23,5 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords : 3,4-dichlorochalcones analog, HeLa cell, synthesis, cytotoxic.

PENDAHULUAN

Kalkon merupakan prekursor untuk sintesis sejumlah besar senyawa flavonoid yang ada di alam (Dewick 1997). Kalkon juga merupakan suatu molekul kecil enon aromatis yang merupakan analog kurkumin. Suatu molekul enon aromatis dibagi menjadi 3 bagian farmakofor utama yaitu bagian A (suatu cincin aromatis), bagian B (suatu ikatan enon), dan bagian C (suatu cincin aromatis). Dua cincin aromatis baik simetris maupun tidak simetris dapat menentukan potensi ikatan antara senyawa obat dengan reseptor, sehingga salah satu upaya modifikasi molekul enon dilakukan pada bagian A dan C untuk melihat pengaruh struktur pada aktivitasnya (Robinson *et al.* 2003).

Kalkon telah dibuktikan mempunyai bermacam-macam aktivitas biologis, salah satu di antaranya sebagai antitumor (Iwata *et al.* 1995). Penelitian mengenai hubungan struktur aktivitas senyawa turunan kalkon dan usaha-usaha memodifikasi struktur turunan kalkon yang telah dilakukan melaporkan bahwa modifikasi pada posisi 4 dari aromatis A yaitu cincin aromatis yang berposisi β terhadap gugus karbonil dapat mempengaruhi aktivitas turunan kalkon pada penghambatan proliferasi sel HeLa secara *in vitro*, dimana substitusi kloro berpotensi menghambat proliferasi sel HeLa (Utami 2007). Diketahui substitusi suatu gugus pendorong dan penarik elektron pada posisi 4' dari aromatis C yaitu cincin aromatis yang langsung terikat gugus karbonil pada turunan 2,6-diklorokalkon dapat mempengaruhi

aktivitas turunan 2,6-diklorokalkon pada penghambatan proliferasi sel endotelial (Robinson *et al.* 2003).

Berdasarkan hal tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan sintesis analog kalkon yang termodifikasi pada posisi 3' dan 4' dari aromatis C berupa substitusi atom kloro dengan aromatis A termodifikasi berupa furanil aromatik. Senyawa yang disintesis adalah furanil-3',4'-diklorokalkon. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap aktivitas senyawa analog 3,4-diklorokalkon tersebut terhadap efek sitotoksik pada sel HeLa.

Analisis diskoneksi dari Stuart Warren (Warren 1984) digunakan untuk mendesain sintesis senyawa furanil-3',4'-diklorokalkon ini menggunakan material awal yaitu furanilbenzaldehida dan 3,4-dikloroasetofenon. Reaksi sintesis senyawa furanil-3',4'-diklorokalkon melalui mekanisme reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dengan katalis basa (Carrey *and* Sunberg 1990).

Penelitian ini akan mempelajari metoda sintesis senyawa furanil-3',4'-diklorokalkon, menggunakan furanilbenzaldehida dan 3,4-dikloroasetofenon sebagai material pemula menggunakan katalis NaOH dalam pelarut etanol (Vogel 1959). Kemudian dilakukan uji kualitatif elusidasi struktur dengan analisis spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, spektrofotometer H1-NMR dan GC-MS (Pavia *et al.* 1979). Berikutnya dilakukan uji aktivitas senyawa hasil sintesis terhadap efek sitotoksik pada sel HeLa secara *in vitro* dengan metode yang terdapat pada Doyle *and* Griffiths (2000) dan Freshney (1987).

METODE PENELITIAN

Bahan

Material untuk sintesis senyawa furanil-3',4'-diklorokalkon meliputi: furanilbenzaldehida 97% (Janssen Chimica); 3,4-dikloroasetofenon 98% (E Merck) ; semua reagent yang digunakan berkualitas p.a dan berasal dari E. Merck yaitu : etanol 96%, etanol 99%, natrium hidroksida, kloroform, *n*-heksana, metanol, etil asetat, dan *plate* alumunium TLC silika gel 60 F 254. Pada uji sitotoksitas digunakan *cell line* HeLa; RPMI 1640 *powder* (GIBCO); medium penumbuh mengandung *growth factor* 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) – 0,5 % fungison – 2 % antibiotik penisilin dan streptomisin (GIBCO) dalam medium RPMI 1640; DMSO; natrium bikarbonat p.a (Sigma); aquabidest; *hepes powder* (Sigma); MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) (Sigma); larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10 % dalam HCl 0,01 N.

Alat

Alat sintesis digunakan seperangkat alat gelas laboratorium berkualitas pyrex; timbangan analitik (Mettler, AT-200); Termopan (Reichert Austria, Nr. 340 579); alat penentu titik lebur (Buchi-530); seperangkat alat KLT; Spektrofotometer UV (Milton Roy Spectronic 3000 Array); Spektrofotometer IR (FTIR-8201 PC, Shimadzu); Spektrometer H1-NMR (JEOL, JNM-MY 60); Spektrometer Massa (GC-17 AQP 5000, Shimadzu). Pada uji sitotoksitas digunakan sentrifus Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International); Inkubator CO₂ (NuairTM IR autoflow); Laminar air flow cabinet (Nuair); ELISA

reader (SLT 240 ATC); hemocytometer (Nebauer); kamera digital (Canon Power Shoot A 80, 4,0 mega pixel).

Prosedur Sintesis

Sintesis dilakukan menurut Vogel (1959): NaOH (0,550 g ; 0,014 mol) dalam 3,75 ml air dan dituangkan ke dalam bejana erlenmeyer yang dilengkapi dengan pengaduk magnet, kemudian dituang 3 ml etanol. Campuran didinginkan dengan pecahan es, selanjutnya 3,4-dikloroasetofenon (0,005 mol) dalam 1,5 ml etanol dituangkan ke dalam campuran dan segera diaduk. Furanilbenzaldehida (0,703 g ; 0,005 mol) dalam 1,5 ml etanol ditambahkan tetes demi tetes ke dalam campuran dan diaduk pada suhu 15-30°C selama 3 jam. Campuran reaksi selanjutnya didinginkan di antara temperatur 10-15°C 24 jam, selanjutnya didiamkan pada temperatur 28°C selama 1 jam. Endapan hasil reaksi disaring dan dinetralkan dengan air dingin, kemudian dicuci dengan 6 ml etanol dingin. Selanjutnya endapan hasil reaksi direkristalisasi dengan etanol untuk mendapatkan hasil yang murni. Endapan diambil dan ditentukan sifat fisiknya (jarak lebur dan warnanya), selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer inframerah (pellet KBr), spektrofotometer ultraviolet (pelarut kloroform), spektrometer ¹H-NMR (pelarut CDCl₃), dan GC-MS (pelarut kloroform).

Uji Sitotoksitas

Preparasi sel

Suspensi sel dalam medium RPMI 1640 yang ditempatkan dalam *tissue*

culture flask. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril 15 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit, sehingga dihasilkan supernatan dan pellet. Selanjutnya pellet ditambah 1 ml RPMI dengan FBS 10%. Kemudian sel dihitung menggunakan *hemocytometer*, dan diencerkan sehingga memperoleh konsentrasi sel sebesar yang diperlukan.

Uji sitotoksik

Suspensi sel sebanyak 100 μ l dengan kerapatan 3×10^4 sel/sumuran dimasukkan ke dalam mikroplate 96 sumuran berbeda. Kemudian ditambahkan sampel 100 μ l dalam medium tiap sumuran sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi kadar tertentu (100,00; 50,00; 25; 12,5) μ M/sumuran. Selanjutnya mikroplate diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, medium masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan medium PBS, kemudian ditambahkan 100 μ l medium baru dan 10 μ l MTT 5 mg/ml dalam PBS. Mikroplate diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam 100 μ l larutan SDS 10% dalam 0,01 N HCl, diinkubasi 24 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang maksimum 550 nm. Pada sumuran yang terpisah dilakukan uji kontrol positif (sel tanpa perlakuan) dan uji blanko (sel dengan perlakuan pelarut sampel) dan deret variasi jumlah sel.

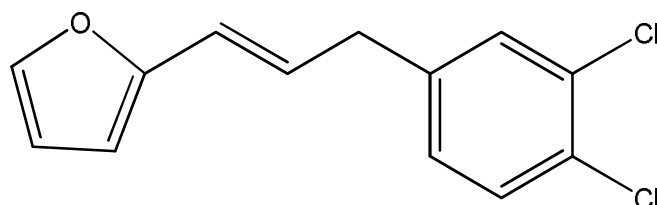
HASIL DAN PEMBAHASAN

Elusidasi struktur diperoleh data sebagai berikut: senyawa furanil-diklorokalkon-klorokalkon, 1-(3,4-diklorofenil)-3-(2-furanil)prop-2-en-1-on, C₁₃H₈O₂Cl₂. Kristal memiliki kemurnian 94,43% dengan rendemen 1,33 gram, berwarna kuning kecoklatan dengan proses rekristalisasi etanol. Jarak lebur senyawa sebesar 90,9 – 92,5°C (0,6⁰).

Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan R_f 0,72 pada fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksana : kloroform (1 : 3). Hasil kromatografi gas menunjukkan waktu retensi 16,756 menit.

Analisis spektrofotometri UV menunjukkan panjang gelombang maksimum 350 nm dan 275 nm dalam pelarut kloroform. Analisis spektrofotometri IR menghasilkan data sebagai berikut (umaksimum, cm⁻¹, KBr) = 1658,78 (C=O, str, keton); 3070,68 (=CH, str, alifatik); 3132,70 (=CH, str, aromatis); 1604,77 (C=C, str, alkena); 1512,19 (C=C, str, aromatis). Data 1H-NMR = CDCl₃, δ (ppm); 8.00-8.16 (m, 2H, Ar 2'', 6''-H); 7.35-7.73 (m, 1H, Ar 3''-H; 1H, CHB=); 2H, Ar 2', 6'-H; 4H, Ar 3', 5', 3'', 5''-H; 1H, =CHA). Analisis MS = (EI, m/z); 266; 173; 145; 121; 93.

Berdasarkan hasil elusidasi struktur di atas, maka diperoleh struktur furanil-3',4'-diklorokalkon secara umum seperti Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Struktur furanil-3',4'-diklorokalkon hasil sintesis.

Senyawa hasil sintesis dilakukan uji sitotoksitas secara *in vitro* dengan metode yang terdapat pada Doyle and Griffiths (2000) dan Freshney (1987). Berdasarkan hasil aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa diperoleh harga IC_{50} sebesar 23,5 $\mu\text{g/ml}$.

KESIMPULAN

Reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dengan katalis NaOH dalam pelarut etanol menggunakan furanilbenzaldehida dan 3,4-dikloroasetofenon sebagai material awal menghasilkan furanil-3',4'-diklorokalkon. Uji sitotoksik senyawa furanil-3',4'-diklorokalkon terhadap sel HeLa memberikan nilai IC_{50} sebesar 23,5 $\mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Carrey FA and Sunberg RI. 1990. *Advanced Organic Chemistry Part B : Reaction and Synthesis*. edisi 3. New York dan London: Plenum Press.
- Dewick PM. 1997. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons. p 136.
- Doyle A and Griffiths JB (eds). 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. Chichester: Wiley.
- Freshney RI. 1987. *Animal Cell Culture, A Practical Approach*. England: IRL Press Limited. p 183-213.
- Iwata S, Nishino T, Nagata N, Satomi Y, Nishino H, Shibata S. 1995. Antitumorigenic activities of chalcones, I. Inhibitory effects of chalcone derivatives on pi-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoyl-phorbol 13 acetate (TPA), *Biol. Pharm. Bull.* 18:1710-1713.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. 1979. *Introduction to Spectroscopy : A Guide for Students of Organic Chemistry*. London: W.B. Saunders Company.
- Robinson TP, Ehlers T, Hubbard RB, Xianhe B, Arbiser JL, Goldsmith DJ, and Bowen JP. 2003. Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: aromatic enone and dienone analogues of curcumin. *Bioorganic and medicinal Chemistry Letters*. 13: 115-117.
- Utami D. 2007. Sintesis senyawa kalkon dan turunannya serta uji antiproliferasi terhadap sel HeLa. [Disertasi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Vogel AI. 1959. *A Text Book of Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Analysis*. London: Longmans, Green and Co Ltd. P 716.
- Warren S. 1984. *Organic Synthesis: The Disconnection Approach*. New York: John Wiley & Sons.