Sintesis dan Uji Sitotoksik senyawa Klorocalkon (*E*)-1-(2-klorofenil)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on

Hesti Marliza[a*]

Program Studi Farmasi, STIKes Mitra Bunda Persada, Jl. Seraya No. 1, Batam telp. (0778) 429431

** email: hesti79id@gmail.com*

ABSTRACT

Synthesis and Cytotoxic Test Chlorocalcon (E) -1- (2-chlorophenyl) -3- (4-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one Chalcone is one of the secondary metabolites of flavonoids that can be found in plants. Chalcone compounds both natural and synthetic have been known to show a variety of biological activities such as antibacterial, antifungal, anticancer cytotoxicity, anticolera, anti-inflammatory, antitumor. In the study of the synthesis of chlorochalcone compounds was carried out by the method of scouring using a NaOH catalyst. The results obtained with the composition of chlorokalcon are (E) -1- (2-chlorophenyl) -3- (4-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one requested based on melting point data, thin layer chromatography, and HPLC and the composition has been characterized by UV, IR and H-NMR spectroscopy. Cytotoxic activity was carried out using the *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) method. The results showed a high cytotoxic chloroclocation activity with an LC50 value of 3.27 μg / ml and this composition was a positive anticancer as evidenced by its cytotoxic properties against *Artemia salina Leach* larvae with LC50 values <200 μg / ml

Keywords: Synthesis, Chlorocalkon, cytotoxic

PENDAHULUAN

Senyawa turunan calkon merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang dapat ditemukan pada tumbuhan. Senyawa calkon baik alam maupun sintetik telah diketahui menunjukkan berbagai macam aktivitas biologis seperti antibakteri (Alam, 2004), antijamur, antikanker (Samoszuk *et al*, 2005), sitotoksisitas, antikolera (Windholz *et al*, 1996), antiinflamasi (Vender *et al*, 1993), antitumor (Usman *et al*, 2005), oleh karena itu, calkon banyak dijadikan sebagai model struktur senyawa target oleh para peneliti.

Keberadaan senyawa calkon di alam relatif sedikit begitu juga dengan variasi strukturnya, sehingga menyulitkan mengisolasi senyawa calkon dari tumbuhan. Berdasarkan hal tersebut, maka didapatkan suatu solusi yang dapat meminimalisir segala kekurangan dalam proses isolasi yaitu dengan mensintesis senyawa calkon tersebut di laboratorium (Alam, 2004). Metode sintesis berperan sangat besar khususnya dalam bidang kimia organik dan merupakan pendorong perkembangan industri farmasi, desinfektan, deterjen dan lain-lain. Hasilnya telah digunakan setiap hari untuk menunjang proses kehidupan (Zamri, 2007).

Struktur keton *α, β* tak jenuh pada senyawa calkon diketahui bertanggung jawab terhadap sifat bioaktivitas senyawa calkon (Lahtchev *et al*, 2008). Bioaktivitas calkon juga tergantung pada substituen yang terikat pada kedua cincin aromatik calkon, seperti gugus Cl, Br, OH, OCH_3 dan lain sebagainya (Prasad *et al,* 2006). Sebelumnya telah dilakukan sintesis dan uji bioaktivitas senyawa klorocalkon dimana gugus Cl terletak pada posisi *para*, memperlihatkan uji aktivitas sitotoksik yang bagus namun uji aktivitas antimikroba yang lemah (Ritriani, 2011;Putri, 2011). Oleh karena itu pada penelitian ini peneliti tertarik untuk mensintesis senyawa klorocalkon dengan gugus Cl pada posisi *orto* dan meneliti bagaimana aktivitas sitotoksik, antioksidan dan antimikroba senyawa tersebut, sehingga dari hasil penelitian ini nantinya peneliti dapat mengetahui pengaruh perbedaan posisi substituen terhadap sifat bioaktivitas senyawa klorocalkon

Senyawa turunan calkon dapat disintesis melalui kondensasi aldol atau lebih spesifik melalui kondensasi *Claisen-Schmidt* dari suatu keton aromatik dengan aldehid aromatik baik dalam kondisi asam ataupun basa. Namun, baru-baru ini Rateb dan Zohdi (2008) telah berhasil mensintesis senyawa calkon dengan pendekatan *Green Synthesis* melalui metoda gerus menggunakan katalis NaOH dan mendapatkan hasil dengan jumlah rendemen diatas 80%.

Penentuan aktivitas sitotoksik senyawa klorocalkon ini dilakukan dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan menggunakan larva udang laut *Artemia salina Leach*. Metoda ini dapat digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa antikanker karena hasil dari uji sitotoksiknya memiliki korelasi positif dengan aktivitas sitotoksik obat-obat antikanker (Ayo *et al,* 2007; Khrisnaraju *et al.,*2005; Pisutthanan *et al*,2004; Lellau and Liebezit, 2003; Meyer *et al*.,1982).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini *Fisher JohnMelting Point Apparatus* spektrofotometer UV-Visible, seperangkat alat HPLC,spektrofotometer inframerah (FTIR spektrometer NMR, ,*microplate reader* dan alat-alat yang digunakan untuk uji sitotoksik berupa vial uji, pipet mikro

Bahan-bahan yang digunakan untuk pengerjaan sintesis berupa 2-kloro asetofenon ,4-metoksibenzaldehid, *n*-heksana, etilasetat, metanol, aquadest dingin, NaOH, etanol, asam asetat glasial. Bahan-bahan yang digunakanuntuk uji *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) adalah kista udang *Artemia salina*Leach, metanol, dimetil sulfoksida (DMSO).

Cara Kerja

Sintesis klorocalkon (Rateb *and* Zohdi, 2009)

Calkon disintesis dengan mencampurkan2-kloro asetofenon(5 mmol), aldehid aromatik turunan metoksi (5mmol), dan NaOH (7 mmol) dan digerus dalam lumpang pada suhu ruangan selama 2-3 menit sampai campuran meleleh.Awalnya akan terbentuk sirup kental lalu akan membentuk padatan setelah 3-5menit. Penggerusan dilanjutkan terus hingga 5-10 menit lagi, dan reaksi dimonitordengan KLT. Padatan dicuci dengan air dingin untuk menghilangkan NaOH yang dibuktikan dengan menggunakan indikator universal setelah itu dicuci dengan n-heksan dan rekristalisasi dengan pelarut etil asetat dan n-heksan atau etanol.

Kemudian tentukan kemurnian dan titik lelehnya.

Uji aktivitas sitotoksik senyawa klorocalkon dan benzotiazepin dengan metoda *BrineShrimps lethality Test* (Meyer *et al.*, 1982; Harefa, 1997)

Kista udang *Artemia salina* ditetaskan dalam wadah pembiakan yang berisiair laut, dan digunakan setelah 48 jam setelah membentuk larva. Vial uji dikalibrasi sebanyak 5 ml. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 100, 10, 1µg/ml dengan pengulangan masing-masing tiga kali. Sebanyak 4 mg senyawa uji dilarutkan dalam 4 ml methanol maka didapat larutan induk ekstrak uji dengankosentrasi 1.000 mg/ml, kemudian larutan induk dengan konsentrasi 1.000 mg/mltersebut di pipet sebanyak 0,5 ml ke dalam vial uji hingga nantinya didapatkonsentrasi 100 mg/ml setelah penambahan air laut hingga 5 ml. Pembuatankonsentrasi 10 mg/ml dengan cara pengenceran larutan induk 1.000 mg/mlsebanyak 0,5 ml ditambahkan methanol hingga 5 ml maka diperoleh kosentrasiekstak uji 100 mg/ml kemudian di pipet sebanyak 0.5 ml larutan ekstrak uji tersebut ke dalam vial uji hingga nantinya didapat konsentrasi 10 mg/ml setelah penambahan air laut hingga 5 ml. Dan untuk konsentrasi 1 mg/ml dibuat dari larutan uji 10 mg/ml dengan cara yang sama.

Masing-masing vial uji dibiarkan menguap metanolnya. Larutkan kembalisenyawa uji dengan 50 ml DMSO, selanjutnya tambahkan air laut hamper mencapai batas kalibrasi. Masukkan larva udang pada masing-masing vialsebanyak 10 ekor. Tambahkan lagi air laut beberapa tetes hingga batas kalibrasi,kematian larva udang diamati setelah 24 jam. Dari data yang dihasilkan dihitungLC_{50} dengan metoda kurva menggunakan tabel probit. Sebagai pembanding, 50ml DMSO di pipet dengan pipet mikro ke dalam vial uji, tambahkan air laut hampir mencapai batas kalibrasi. Masukkan larva *Artemia salina* Leach 10 ekor.Tambahkan lagi air laut beberapa tetes hingga batas kalibrasi. Masing-masing kosentrasi dibuat 3 kali pengulangan, untuk menghitung nilai LC_{50} digunakan persamaan regresi

Persamaan regresi:

$y = a + bx$……. (1)

LC_{50} = anti log x……. (2)

Keterangan:
x : Log Konsentrasi
a :*Intercept* (garis potong)
y : Nilai Probit
b :*Slope* (kemiringan dari garis regresi linear)

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{A Kontrol} - \text{A Sampel})}{\text{A Kontrol}} \text{ x } 100\% \quad \text{..... (3)}$$

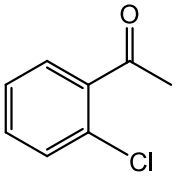
Keterangan : $A_{kontrol}$ = Absorbansi tidak mengandung sampel
A_{sampel} = Absorbansi sampel

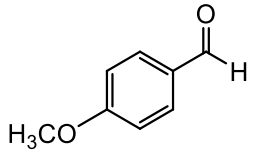
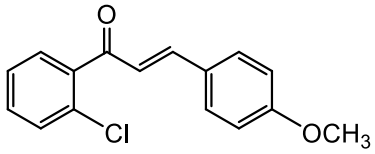
PEMBAHASAN

Sintesis klorocalkon

Tabel 1. Hasil sintesis klorocalkon turunan 2 kloroasetofenon dengan

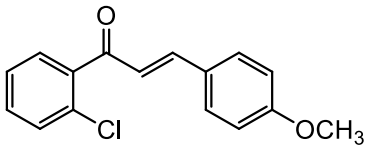
metoksibenzaldehid menggunakan metode gerus


(1)

Keton	Aldehid	Produk	m.p.^{0}C	Rf*	Yield (%)
(1)	 **2a**	 **3a**	79-81	0,63*	92,02

*Fase gerak yang digunakan *n*-heksana : etilasetat (8:2)
**Fase gerak yang digunakan *n*-heksana : etilasetat (7:3)
Rf : Waktu Retensi (menit)

Tabel.2. Hasil Uji Aktivitas Sitotoksik senyawa klorocalkon

Senyawa	Struktur	Nilai LC_{50} (sitotoksik)
3a		3,27 µg/ml

Senyawa Klorocalkon (*E*)-1-(2-klorofenil)-3-(4-metoksifenil)prop-2-en-1-on telah disintesis dari 2-kloroasetopenon dengan aldehid aromatik turunan metoksi benzaldehid dengan penambahan NaOH pada suhu kamar. Sintesis calkon dilakukan melalui penggerusan menggunakan mortal poselin tanpa pelarut maupun pemanasan. Pada awalnya akan terbentuk sirup kental lalu akan membentuk padatan yang merupakan bukti telah terbentuk senyawa calkon. Penggerusan dilanjutkan 5-10 menit sehingga proses reaksi benar-benar telah berlangsung sempurna dibuktikan dari hasil uji KLT yang memperlihatkan satu noda senyawa yang disintesis sedangkan noda senyawa awal tidak ada lagi.

Hasil penggerusan ditambahkan aquades dingin untuk menghilangkan NaOH yang dibuktikan dengan indikator universal. Endapan disaring dengan corong *Buchner* dengan bantuan vakum. Pencucian endapan dilanjutkan menggunakan *n*-heksana. Pemurnian dilakukan rekristalisasi dengan pelarut etilasetat dan *n*-heksana dan sebagian senyawa dengan etanol. Metode ini sangat sederhana, efektif, cepat (hanya 5-10 menit), rendemen yang baik, ramah lingkungan karena tanpa menggunakan pelarut yang berbahaya, tanpa pemanasan atau irradiasi *microwave* dibanding menggunakan metoda refluks. Hasil sintesis yang diperoleh

dengan rendemen tinggi (Tabel 1.), karena produk yang dihasilkan langsung murni tidak ada pengotor

. Kemurnian dari senyawa yang telah disintesis ini dapat diuji dengan KLT noda yang terlihat dibawah lampu UV hanya satu noda, jarak leleh senyawa 2^0C dan hasil dari analisis menggunakan HPLC senyawa menunjukkan bahwa hanya terdapat satu puncak dominan pada waktu retensi tertentu (Tabel 1) pada dua panjang gelombang yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa klorocalkon yang telah disintesis ini murni.

Uji aktivitas sitotoksik senyawa klorocalkon dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metoda *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT). Pemilihan metoda ini penapisan awal dalam upaya pencarian senyawa antikanker karena biaya percobaan yang murah, proses pengerjaan yang cepat, sederhana, dan tidak diperlukan kondisi yang aseptis. Selain itu, larva *Artemia salina* Leach memiliki beberapa keunggulan diantaranya mudah didapat, mudah dibiakkan dan dapat hidup pada rentangan salinitas yang tinggi.

Larva *Artemia salina* Leach diperoleh dengan menetaskan telur selama 48 jam. Larva yang telah menetas akan berenang ketempat yang terang. Hal ini akan dapat memudahkan untuk pemisahan dan pengambilan hewan ini yang telah berkembang menjadi larva.

Masing-masing senyawa yang akan diuji dibuat dalam kosentrasi 100, 10, 1 μg/ml dalam air laut. Pembuatan larutan uji menggunakan pelarut organik methanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa dan mudah menguap. Pelarut tersebut pada akhirnya nanti harus dibiarkan sampai menguap sempurna agar tidak mengganggu pada pengujian toksisitas yang dilakukan. Sebelum ditambahkan air laut kedalam vial yang digunakan sebagai wadah pengujian, terlebih dahulu ditambahkan DMSO (dimetil sulfoksida) untuk dapat membantu kelarutan senyawa uji dalam air laut sehingga senyawa dapat terdistribusi secara merata. Banyaknya DMSO yang ditambahkan adalah 50 μl, karena jika lebih dari 50 μl akan dapat menyebabkan kematian pada larva udang, sifatnya yang tidak terlalu toksik ini menjadi alasan dipilihnya DMSO untuk membantu kelarutan senyawa dalam air laut. Hasil uji aktivitas senyawa klorocalkon dapat dilihat pada Tabel 2, senyawa klorocalkon memiliki aktifitas yang tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 3,27 μg/ml

Dari hasil yang diperoleh dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* terhadap senyawa klorocalkon dinyatakan bahwa dari masing-masing senyawa ini positif berpotensi sebagai senyawa antikanker terbukti dari sifat sitotoksiknya terhadap kematian larva *Artemiasalina* Leach dengan nilai $LC_{50} < 200$ μg/mL (Anderson *et al*, 1991)

KESIMPULAN

Sintesis senyawa-senyawa klorocalkon dengan metode gerus menggunakan katalis NaOH menghasilkan senyawa dengan rendemen yang cukup tinggi 92,2 %. Uji pendahuluan aktivitas *sitotoksik* dengan metoda *Brine Shrimp LethalityTest* (BSLT) diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa senyawa klorocalkon berpotensi memiliki aktivitas sitotoksik.

DAFTAR PUSTAKA

Alam, S. 2004. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of Some Derivates of 2-phenyl-chromen-4-one. *J. Chem. Sci*. 116, 325-331.

Anderson, JE. and Mclaugnlin, JL. 1991 A blind comparison of simple bench top bioassay and human tumor cell cytotoxicity as antitumor prescreens, *Pytochem Ann*, 2, 107-111.

Ayo, R.G., Amupitan J.O and Zhao Y. 2007.Cytotoxicity and Antimicrobial Studies of 1,6,8-trihidroxy-3 methyl-antraquinone (emodion) Isolated from the Leaves of *Cassia Nigricans* Vahl.*African Journal of Biotechnology*, 6(11), 1276-1279.

Lahtchev, K.L., Batovska, D.I., Parushev, St.P., Ubiyvovk, V.M. and Sibirny, A.A. 2008. Antifungal Activity of Chalcones: A Mechanistic Study using Various Yeast Strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 43: 2220-2228.

Lellau. T. F. G. and Liebezeit. 2003.Cytotoxic and Antitumor Activities of Ethanolic Extracts of Salt Marsh Plants from the lower Saxonian*Wadden Sea*, Southern North Sea, *Pharmaceutical Biologi*,41(4), 293-300.

Meyer, B. N. R., Ferrigni, J.E., Putnam L, B., Jacobsen, D. E., Nicholas and J L. Mc, laughin. 1982. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay For Active Plant Constituens.*J. of Medical Plant Medica*, 45. 31-34.

Pisutthanan S. P., Plianbangchang N., Pisutthanan, S., Ruanruay O. and Muanrit. 2004.Brine Shimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae.*Naesuan University Journal*, 12(2), 13-13.

Prasad, Y.R., Kumar, P.R., Deepti, C.A.. and Ramana, M.V. 2006. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Chalcones of 2-Hydroxy-1-Acetonapthone and 3-Acetyl Coumarin. *E-Journal of Chemistry*. 3(13): 236-241.

Putri, S.Y. 2011. Sintesis senyawa-senyawa calkon turunan metoksi dan uji aktivitas antimikroba. Skripsi. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru

Ritriani. 2011. Sintesis senyawa calkon turunan metoksi benzaldehid dan uji aktivitas sitotoksik dengan metoda brine shrimp lethality test (BSLT).Skripsi Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru

Samoszuk, M., Tan, J and Chorn, G. 2005. The Chalcone Butein From *Rhus verniciflua* Stokes Inhibits Clonogenic Growth Of Human Breast Cancer Cells Co-Cultured With Fibroblasts. *Bio Med Central*.10.1186/1472-6882-5-5

Usman, H., Hakim, E.H., Achmad, S.A., Harlim, T., Jalaluddin, M.N., Syah, Y.M., Juliawati, L.D., Makmur, L dan Katajima, M. 2005. 2', 4'- dihidroksi-3' , 5'6'-Trimetoksi Calkon suatu Senyawa Antitumor dari Kulit Batang Tumbuhan *Cryptocarya costata* (Lauraceae). *Jurnal Matematika dan Sains*. 10. 97-100.

Vender, B., Haemers, A., and Vlieunek, A. J. 1993. In Bioactive Natural Products; Detection and Structural Determination. *Ed. Collegate, S.M and Molyneux. CRC Press*. 17, 186. 343-355.

Windholz, M., Budavari, S., Sroumtsos, L. Y, and Ferting M. N., 1996, "The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals and Drugs", 12 *New York: Merck and Co, Inc*, hal 334, 1221,129.

Zamri, A.. 2007, Buku Ajar Sintesis Organik, Pusat Pengembangan Pendidikan Universitas, Riau