

SINTESIS SENYAWA KALKON (E)-1-(4-KLOROFENIL)-3-P-TOLILPROP-2-EN-1-ON DAN UJI TOKSISITASNYA

Eti Meirina Brahmana

Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Universitas Pasir Pengaraian

Email : ety.birink@yahoo.com

ABSTRACT

Halogen substituted analogues compounds chalcone, (E)-1-(4-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on, was synthesized from 4-methyl benzaldehyde as aldehydes with 4-chloroacetophenone as ketones by using aldol condensation reaction. The compound resulted rendement with value of 87,51% and characterized by using UV, IR, MS, and ¹H-NMR. Toxicity tests using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) showed that those compounds have a potency as anticancer agent with LC50 value 39,8 µg/mL.

Keywords: Chalcone, halogen, toxicity tests

PENDAHULUAN

Kalkon merupakan metabolit sekunder dari golongan flavonoid yang banyak ditemukan di alam terutama pada tumbuh-tumbuhan. Sejumlah senyawa kalkon telah diselidiki dan ternyata banyak diantaranya yang memiliki aktivitas biologi seperti: antikanker (Achanta *et al.*, 2006) dan sitotoksik (Echeverria *et al.*, 2009). Kalkon yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan biasanya memiliki variasi struktur relatif terbatas. Oleh karena itu, sintesis merupakan upaya untuk mendapatkan senyawa kalkon dan turunannya dengan hasil variasi struktur sesuai dengan yang dikehendaki.

Salah satu cara untuk membuat senyawa turunan kalkon adalah melalui kondensasi aldol dari suatu keton aromatik dan aldehyd aromatik baik dalam kondisi basa maupun asam. Katalis asam yang biasa digunakan dalam reaksi kondensasi aldol antara lain HCl (Jayapal *et al.*, 2010), SOCl₂ (Jayapal *et al.*, 2011), H₂SO₄ dan zeolit (Kakati *et al.*, 2011), sedangkan katalis basa yang biasa digunakan adalah NaOH (Choudhary *et al.*, 2011) dan KOH (Tiwari *et al.*, 2010).

Senyawa kalkon yang diketahui memiliki aktivitas sitotoksik adalah senyawa kalkon yang memiliki cincin aromatik yang berupa halida asetofenon (Achanta *et al.*, 2006). Turunan kalkon (E)-3-(4-isopropilfenil)-1-(4'-metoksifenil) prop-2-en-1 on, (E)-1-(4'-metoksifenil)-3-p-toliprop-2-en-1-on, dan (E)-3-(3-bromofenil)-1-(4'-metoksifenil) prop-2-en-1-on dilaporkan berpotensi aktif sebagai antikanker (Perdana., 2012). Namun, jika ditinjau dari asal usul biogenetiknya, senyawa kalkon yang tersubstitusi halogen tidak mungkin dapat ditemukan di alam. Oleh karena itu, untuk mendapatkan kalkon tersubstitusi halogen dilakukan dengan cara sintesis.

Pada penelitian ini bahan baku aldehyd aromatik yang digunakan yaitu 4-metilbenzaldehyd dan 4'-kloroasetofenon. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang bioaktivitas turunan kalkon dengan uji toksisitas.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Sintesis senyawa analog kalkon dan uji toksisitas dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Universitas Pasir Pengaraian. Analisis produk dengan HPLC, spektrofotometer UV, dan IR dilakukan di Jurusan Kimia FMIPA UR. Analisis produk melalui spektroskopi ¹H-NMR dilakukan di ITB. Penelitian ini berlangsung selama lebih kurang enam bulan.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan destilasi, alat penentu titik leleh *Fisher Johns melting point*

apparatus (SMP 11-Stuart[®]), lampu ultraviolet 254/366 nm (Camag[®]), timbangan analitik, alat spektronik UV-Vis (Genesys 10S[®]), HPLC (UFLC Prominance-Shimadzu[®], detector SPD 20AD), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, IR Prestige-21), spektrofotometer MS Water LCT Premier XE, spektrometer NMR (AGILENT 500 MHz), oven *microwave* Samsung ME 109 F, alat-alat untuk sintesis dan uji toksisitas yang biasa digunakan di Laboratorium.

Bahan-bahan yang digunakan adalah yaitu 4-metilbenzaldehyd dan 4'-kloroasetofenon, natrium hidroksida (Merck), kalium hidroksida (Merck), asam klorida (Merck), indikator universal (Merck), plat KLT GF₂₅₄, *n*-heksan, etil asetat, metanol, etanol absolut, aquades, benur *A. Salina*, air Laut dan DMSO.

Prosedur Kerja

1. Sintesis Senyawa Kalkon

Sebanyak 5 mmol keton dan etanol absolut (5 mL) di masukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan tetes demi tetes KOH 6 N (2 mL). Campuran tersebut diaduk selama 5 menit, lalu aldehid 5 mmol dimasukkan ke dalam campuran. Campuran diiradiasi dengan menggunakan *microwave* selama 2-5 menit, dengan interval waktu 30 detik. Setelah itu, campuran dibiarkan selama 20 jam untuk memaksimalkan hasil reaksi (endapan) yang diperoleh. Sebanyak 15 mL aquades dingin ditambahkan ke dalam campuran dan pH campuran dinetralkan dengan HCl. Endapan yang terbentuk kemudian disaring dengan corong Buchner, dicuci dengan *n*-heksan dingin, dan divakum hingga kering. Tahapan reaksi diamati dengan KLT. Produk yang diperoleh diuji kemurniannya dengan uji KLT, titik leleh, dan analisis HPLC.

2. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Pembiakan benur *A. salina* dilakukan dengan mengisi air laut ke dalam suatu wadah persegi dangkal yang telah dibagi menjadi dua sisi yang akan ditutup, sedangkan sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi cahaya. Biarkan selama 48 jam agar benur tersebut menetas. Benur yang menetas akan tertarik ke sisi yang terbuka dan terkena cahaya, larva ini selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas.

Pengujian dilakukan terhadap senyawa murni kalkon dengan konsentrasi 1.000, 100 dan 10 ppm. Sebanyak 20 mg masing-masing sampel uji dilarutkan dalam 2 mL etil asetat maka akan diperoleh larutan dengan konsentrasi 10.000 ppm. Kemudian dari masing-masing larutan tersebut dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 4,5 mL etil asetat hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm setelah penambahan air laut. Kemudian dari larutan tersebut dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 4,5 mL etil asetat hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm setelah penambahan air laut dan untuk konsentrasi 10 ppm dibuat dari konsentrasi sampel uji 100 ppm dengan cara yang sama. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan 4,5 mL etil asetat, kemudian dimasukkan ke dalam vial uji dengan pengulangan masing-masing 3 kali.

Masing-masing vial uji dibiarkan pelarutnya menguap, setelah menguap, senyawa uji dilarutkan kembali dengan 50 µL DMSO, selanjutnya tambahkan air laut hampir mencapai batas kalibrasi. Masukkan larva udang pada masing-masing vial sebanyak 10 ekor. Air laut ditambahkan lagi beberapa tetes hingga batas kalibrasi, kematian larva udang diamati setelah 24 jam. Dari data yang dihasilkan dihitung LC₅₀ dengan metode kurva menggunakan tabel probit (Meyer *et al.*, 1982; Harefa., 1997).

Pada vial kontrol, 50 µL DMSO dipipet dengan pipet mikro ke dalam vial uji dan air laut ditambahkan hampir mencapai batas kalibrasi. Larva *A. salina* dimasukkan sebanyak 10 ekor. Air laut ditambahkan lagi beberapa tetes hingga batas kalibrasi (Meyer *et al.*, 1982; Harefa., 1997).

3. Analisis Data

Pengaruh pemberian senyawa kalkon terhadap larva *A. salina* dapat dilihat dengan melakukan perhitungan statistik analisis Probit. Perhitungan ini dilakukan dengan membandingkan antara larva yang mati terhadap jumlah larva keseluruhan, sehingga diperoleh persen kematian. Tabel nilai probit dapat diamati dan akan diketahui nilai probit dengan memasukkan dalam persamaan regresi, sehingga didapat nilai LC₅₀.

Persamaan Regresi :

$$Y = a + bx$$
$$LC_{50} = \text{arc log } x$$

Keterangan :

x : Log Konsentrasi

- y : Nilai Probit
a : Intercept (garis potong)
b : Slope (kemiringan dari garis regresi linear)

Hasil dan Pembahasan

Hasil sintesis diperoleh berupa kristal berwarna kuning dengan berat 1,1204 g (87,51%). Jarak leleh: 156-157°C. Hasil pengujian menggunakan KLT didapat harga Rf: 0,78 dengan sistem eluen *n*-heksana : etil asetat (9:1). Pemeriksaan kromatogram HPLC menunjukkan dua puncak t_R : 15 dan 16 menit pada panjang gelombang 211 nm dan menunjukkan satu puncak t_R : 16 menit pada panjang gelombang 320 nm. Pemeriksaan spektrum UV-Vis diperoleh λ maks pada panjang gelombang 327 nm dengan absorbansi 0,649. Pada pemeriksaan spektrum IR (KBr) terdapat vibrasi ikatan pada bilangan gelombang 812 cm^{-1} (C-Cl), 1512 cm^{-1} (C=C dari benzena), 1598 cm^{-1} (C=O dari keton), 2916 cm^{-1} (-CH₃), 3028 cm^{-1} (C-H dari benzena) dan 3487 cm^{-1} (Overtone dari C=O). Dari pemeriksaan spektrum ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) terdapat 7 sinyal yang setara dengan 13 atom H. Sinyal-sinyal tersebut pada geser kimia δ_H 8,18 ppm (d: 8,5; 1H); 7,89 ppm (d: 16; 1H); 7,80 ppm (d: 8; 1H); 7,74 ppm (d: 16; 1H); 7,64 ppm (d: 8,5; 1H); 7,29 ppm (d: 8; 1H); 2,36 ppm (s; 3H). Spektrum massa (HR-MS) *m/z*: 256,0648 dengan formula C₁₆H₁₃OCl.

Senyawa kalkon yang telah disintesis dari aldehid aromatik dengan keton aromatik menggunakan katalis KOH dengan metode iradiasi *microwave*. Sehingga proses ini sangat efisien dan cepat. Iradiasi hanya dilakukan 3-8 menit. Sintesis senyawa kalkon melalui reaksi kondensasi *aldol* yaitu suatu ikatan karbon-karbon baru yang terbentuk antara atom karbon α dari satu senyawa karbonil dan atom karbon karbonil yang lainnya. Keasaman atom hidrogen α dari senyawa karbonil memungkinkan senyawa karbonil tersebut untuk bereaksi dengan yang lainnya sehingga menghasilkan suatu produk gabungan keduanya. Reaksi ini dikatalis oleh suatu basa seperti KOH.

Uji aktivitas toksisitas dilakukan terhadap larva *A.salina* dengan menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pemilihan metode ini sebagai penapisan awal dalam upaya pencarian senyawa antikanker karena biaya percobaan yang murah, proses pengerjaan yang cepat dan sederhana. Selain itu, larva tersebut memiliki beberapa keunggulan diantaranya mudah didapat, mudah dibiakkan dan dapat hidup pada rentangan salinitas yang tinggi. Larva tersebut diperoleh dengan menetas telur selama 48 jam. Larva yang telah menetas akan berenang ke tempat yang terang. Hal ini akan dapat memudahkan untuk pemisahan dan pengambilan hewan ini yang telah menjadi larva.

Masing-masing senyawa yang akan diuji dibuat dalam konsentrasi 1000, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dalam air laut selama 24 jam pengujian. Perbedaan konsentrasi ini dimaksudkan untuk mengetahui tingkat aktivitas masing-masing senyawa terhadap kematian larva tersebut. Pembuatan larutan uji menggunakan pelarut etil asetat karena senyawa analog kalkon yang diuji larut dalam etil asetat. Pelarut tersebut dibiarkan sampai menguap sempurna agar tidak mengganggu pada pengujian toksisitas yang dilakukan. Sebelum ditambahkan air laut terlebih dahulu ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 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 tersebut. DMSO dalam pengujian ini digunakan sebagai kontrol, sifatnya yang tidak terlalu toksik menjadi alasan dipilihnya DMSO untuk membantu kelarutan senyawa dalam air laut.

Senyawa kalkon tersubstitusi halogen mempunyai aktifitas sitotoksik yang signifikan dengan nilai $LC_{50} C_1 = 39,8 \mu\text{g/mL}$. Senyawa analog kalkon yang diuji menunjukkan efek toksik terhadap kematian larva *A.salina* dan menunjukkan potensi toksisitas. Karena suatu senyawa dikatakan aktif jika $LC_{50} \leq 250 \mu\text{g/mL}$ dan maksimal 500 $\mu\text{g/mL}$ (Meyer *et al.*, 1982).

Aktivitas biologis senyawa kalkon pada penelitian ini, kemungkinan dipengaruhi adanya gugus karbonil α , β -tak jenuh dan substituen yang terikat pada cincin aromatik yang terdapat pada senyawa tersebut.

Suvitha., *et al* (2012) dan Omid., *et al* (2004) berpendapat bahwa kemungkinan senyawa kalkon dapat menginduksi kematian sel dengan mengganggu fungsi mitokondria sebagai respirasi sel. Respirasi sel merupakan proses oksidasi molekul makanan, misalnya glukosa menjadi CO₂ dan H₂O yang membentuk energi dalam bentuk ATP (Adenosin Tripospat) yang berguna dalam menunjang aktivitas sel yang memerlukan energi. Apabila terjadi kerusakan mitokondria di dalam sel, maka akan menyebabkan gangguan pada fungsi mitokondria dalam sintesis ATP sehingga sel akan mati. Kematian sel nantinya akan menyebabkan kematian larva itu sendiri.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Senyawa analog kalkon yang disintesis menggunakan katalis KOH dengan metode iradiasi *microwave* yaitu (E)-1-(4-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on memiliki rendemen 87,51%.
2. Hasil karakterisasi menggunakan spektroskopi UV-Vis, IR, ¹H NMR dan MS menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh dari hasil penelitian merupakan senyawa kalkon dengan struktur yang sesuai dengan molekul target.
3. Pada uji toksisitas senyawa (E)-1-(4-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on, berpotensi sebagai anti kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Achanta, G., Modzelewska, A., Feng, L., Khan, S.R., & Huang, P., 2006, Boronic chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome, *Molecular pharmacol*, 70. 426-433.
- 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.
- Echeverria, C., Santibanez, J.F., Tauda, O.D, Escobar, C.A., & Tagle, R.R, 2009, Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. *International journal of molecular sciences* 10: 221-231.
- Jayapal, M.R., & Sreedhar, N.Y. 2011. Synthesis and Characterization of 2,5-Dihydroxy Substituted Chalcones Using SOCl₂/EtOH. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(1): 127-129.
- Jayapal, MR, K.S. Prasad, & Sreedhar, N.Y., 2010, Synthesis and characterization of 2,5-dihydroxy substituted chalcones using SOCl₂/EtOH, *Int j pharma bio sci* 1 : 361-6.
- Kakati, D., & Sarma, J.C. 2011. Microwave Assisted Solvent Free Synthesis of 1,3-Diphenylpropanones. *Chemistry Central Journal*. 5(8): 1-5.
- Meyer, B.N.R., Ferrigni, J.E., Putnam, L.B., Jacosen, D.E., Nicholas., & McLaughin, J.L. 1982, Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*, 45, 31-34.