

SINTESIS SENYAWA ETILENDIAMIN KALANON MELALUI REAKSI ADISI GUGUS ETILENDIAMIN TERHADAP IKATAN RANGKAP C7-8 DAN UJI AKTIVITAS ANTILEUKEMIA TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210

Mochamad Chasani¹, Eva Vaulina, Y.D¹, Ponco Iswanto¹, M. Hanafi²

¹ Program Studi Kimia MIPA, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

² Puslit Kimia LIPI, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang

ABSTRACT

Calanone is a natural compound which could be isolated from tree bark of *Calophyllum biflorum* Hend and WS (0,37 % w/w, crude extract) which have been potency as antileucemia drug (IC₅₀= 59,4 ug/mL). Based on the research, the compound can be used as an anti leukemia drug if its value of IC₅₀ < 10 ug/mL. So the aim of this research are in order to get higher calanone activity by modified of double bond carbon-carbon and to obtain several compounds as well which has a higher activity than calanone of its original compound. Several compounds, several compound can be obtained by modified of double bond carbon-carbon by ethylenediamine group and antileukemia test of the new compound calanone derivatives towards L1210 leukemia cell. The result of the analysis, using thin layer chromatography with eluent methanol:dichlorometane (1:6), give R_f at 0.51 and initial melting point at range 149°C – 151°C. Infra red spectrophotometry and mass spectrometry were used to identify the synthesized product. The result showed that the mass spectra of ethylenediamine calanone give molecular ion at 449 (M⁺- H₂O, NH₃) and ions fragments at m/e 449; m/e 434; m/e 393; m/e 105, m/e 77. Infra red spectra of its compound showed new peaks at 1620 cm⁻¹ and 1063 cm⁻¹. The activity value toward leukemia cell was IC₅₀= 46,28 µg/mL and its value higher than calanone origin

Key word: Calanone, ethylenediamine calanone, in vitro, Antileukemia

PENDAHULUAN

Penyakit kanker darah (leukemia) merupakan penyakit kanker yang paling banyak dijumpai di Indonesia setelah kanker mulut rahim, kanker hati, kanker payudara, dan kanker paru-paru. Penyakit ini paling sering dijumpai pada anak-anak (Siswandono, 2006).

Kalanon adalah senyawa turunan kumarin hasil alam yang diisolasi dari spesies *Calophyllum* (0,37 % b/b ekstrak kasar) yang tumbuh di hutan tropis Kalimantan dan Malaysia yang mempunyai potensi sebagai obat antileukemia (IC₅₀ = 59,4 µg/mL) (Wibisono, 1998; Chasani, 2003). Upaya yang telah dilakukan guna

meningkatkan aktivitas farmakologi kalanon sebagai obat antileukemia diantaranya adalah dengan memodifikasi struktur molekul kalanon.

Modifikasi struktur kalanon yang telah dilakukan selama ini masih berkisar pada perubahan gugus karbonil kalanon dan belum dicoba untuk memodifikasi gugus reaktif lain guna peningkatan aktivitasnya. Telah diketahui bahwa efektifitas interaksi obat dan reseptor salah satu faktor yang menentukan adalah efektifitas interaksi antara gugus aktif obat tersebut dengan reseptor. Oleh karena itu dengan melihat fakta bahwa modifikasi gugus karbonil pada karbon nomor 11

kalanon yang telah dilakukan relatif tidak berpengaruh banyak terhadap peningkatan aktivitas kalanon sebagai obat antileukemia, maka sangat penting dilakukan modifikasi bagian lain dari struktur kalanon ini, mengingat dari aspek kelimpahan kalanon yang relatif cukup besar (0,37 % b/b) dari spesies *Calophyllum* (Wibisono, 1997) dan berpotensi sebagai obat antileukemia (59,4 ug/mL). Bagian reaktif lain dari senyawa kalanon selain gugus karbonil C11 adalah pada gugus ikatan rangkap pada C7-8.

Mengingat rendemen isolat kalanon dari spesies *Calophyllum* yang cukup besar dan berpotensi untuk dijadikan obat antileukemia, maka penting untuk dilakukan mengembangkan struktur molekul kalanon melalui modifikasi struktur molekulnya dengan memodifikasi ikatan rangkap C7-8 melalui reaksi adisi dengan gugus yang potensial meningkatkan aktivitas antileukemianya, diantaranya adalah gugus golongan amina. Sebagaimana diketahui bahwa senyawaan pengalkil diantaranya adalah senyawaan golongan amina terbukti mampu meningkatkan aktivitas penghambat leukemia, seperti pada senyawa *triptolide* yang berasal dari *Tripterigium wilfordii* Hook F (Yang, *et al.*, 1995; Siswandono dan Sukardjo, 1998).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Program penelitian tahun pertama ini dilaksanakan dari bulan Maret 2008 sampai dengan bulan Nopember 2008. Lokasi sintesis dan QSAR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Program Studi Kimia Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Analisis

struktur molekul dilakukan di Laboratorium Instrumentasi UGM, Yogyakarta. Uji aktivitas antileukemia dilakukan di Laboratorium PATIR, BATAN, Jakarta.

Materi dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk sintesis adalah: Etilendiamin, n-Heksana, etil asetat, H₂O, diklorometana, kloroform, aseton, metanol, plat KLT, silika gel G₆₀, Na-sulfat anhidrat, senyawa kalanon asal (dari Laboratorium Kimia Bahan Alam, Puslit Kimia LIPI Serpong). Alat-alat yang digunakan adalah: satu unit alat refluks; *rotaryevaporator*; plat KLT; gelas piala 250 mL, 500 mL, 1 L; erlenmeyer 250 mL, 500 mL, 1 L; spatula; batang pengaduk; satu unit alat penentu titik leleh; botol polietilen, tripleneck, penangas minyak, heating-magnetic stirrer, dan kolom kromatografi.

Prosedur

Sintesis dan uji aktivitas etilendiamin kalanon

Sampel sebanyak 106 mg dimasukkan dalam labu leher tiga, 100 mL, yang dilengkapi stirer dan pengaduk magnetik dan ditambahkan 50 mL metanol dan 10 mL etilendiamine. Campuran reaksi diaduk selama 2 jam. Setelah itu campuran reaksi diekstraksi dengan 15 mL air dan 15 mL diklorometan sebanyak tiga kali. Fraksi diklorometan selanjutnya diuapkan pelarutnya sampai tinggal 1/4 nya dan ditambahkan Na₂SO₄ anhidrat dan disaring. Selanjutnya dilakukan KLT menggunakan eluen aseton: n-heksan: etil asetat 1: 2: 1 (v/v). Produk sintesis dalam fraksi diklorometan ini dimurnikan dengan rekristalisasi

menggunakan metanol dengan sedikit diklorometan (1:4) dan proses rekristalisasi dilakukan beberapa kali. Kristal hasil diuji lagi menggunakan KLT dengan eluen yang sama seperti di atas. Produk sintesis yang telah murni ini selanjutnya dikeringkan dan ditimbang.

Langkah selanjutnya adalah dilakukan uji titik leleh, analisis struktur molekul menggunakan spektrometer FT-IR, MS dan uji aktivitas antileukemianya terhadap sel leukemia L1210.

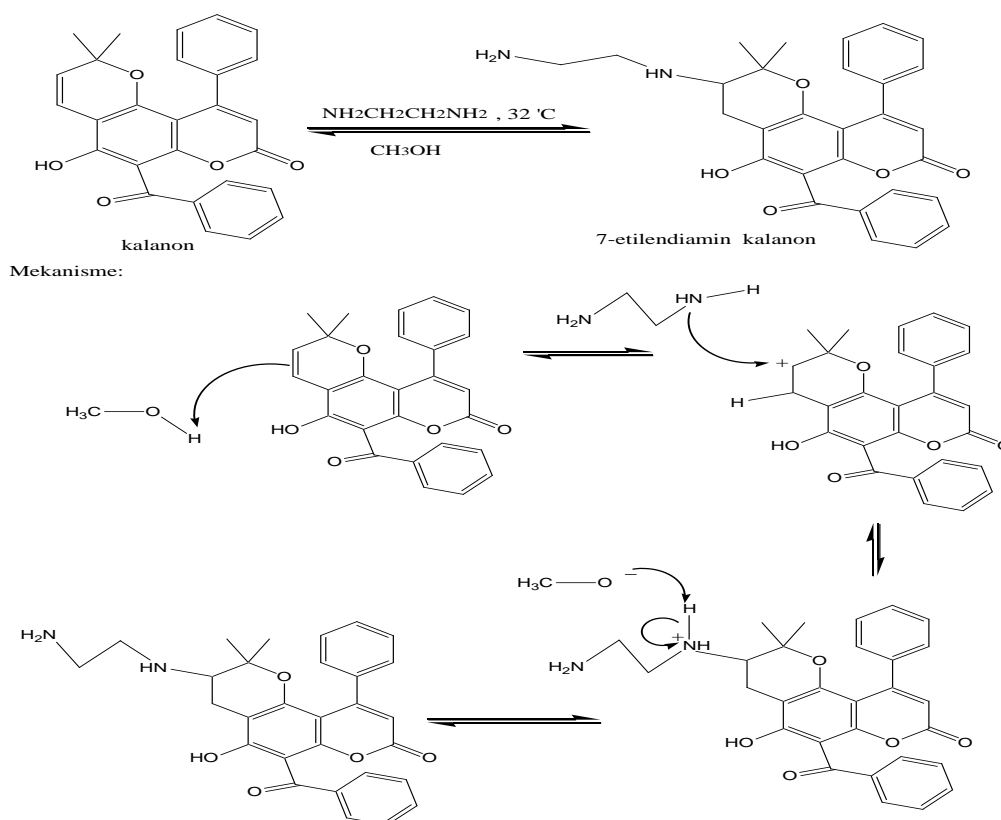
HASIL DAN PEMBAHASAN

Modifikasi atau manipulasi struktur molekul senyawa isolat produk alam yang telah diketahui aktivitas farmakologinya melalui sintesis senyawa turunannya adalah suatu langkah yang bertujuan memperoleh senyawa baru yang diharapkan

mempunyai aktivitas lebih tinggi, dibandingkan senyawa isolat asal. Langkah ini cukup efektif dan efisien guna memperoleh senyawaan obat baru dan merupakan kegiatan penelitian yang berbasis pemanfaatan produk alam.

Sintesis

Senyawa produk sintesis yang telah murni pada reaksi etilendiaminasi gugus ikatan rangkap pada C7-8 ini berupa padatan kristal kuning kemerahan dengan rendemen sebesar 23,4 % (b/b) dengan titik leleh 149 - 151°C. Nilai Rf etilendiamin kаланon produk hasil KLT menggunakan eluen metanol:diklorometan (1:6) diperoleh sebesar 0,51 yang jauh lebih kecil dibandingkan Rf kаланon standar sebesar 0,93. Hal ini menunjukkan bahwa etilendiamin kаланon produk memiliki kepolaran yang lebih besar dibandingkan senyawa kаланon asal.



Gambar 1. Mekanisme reaksi etilendiaminasi kаланon

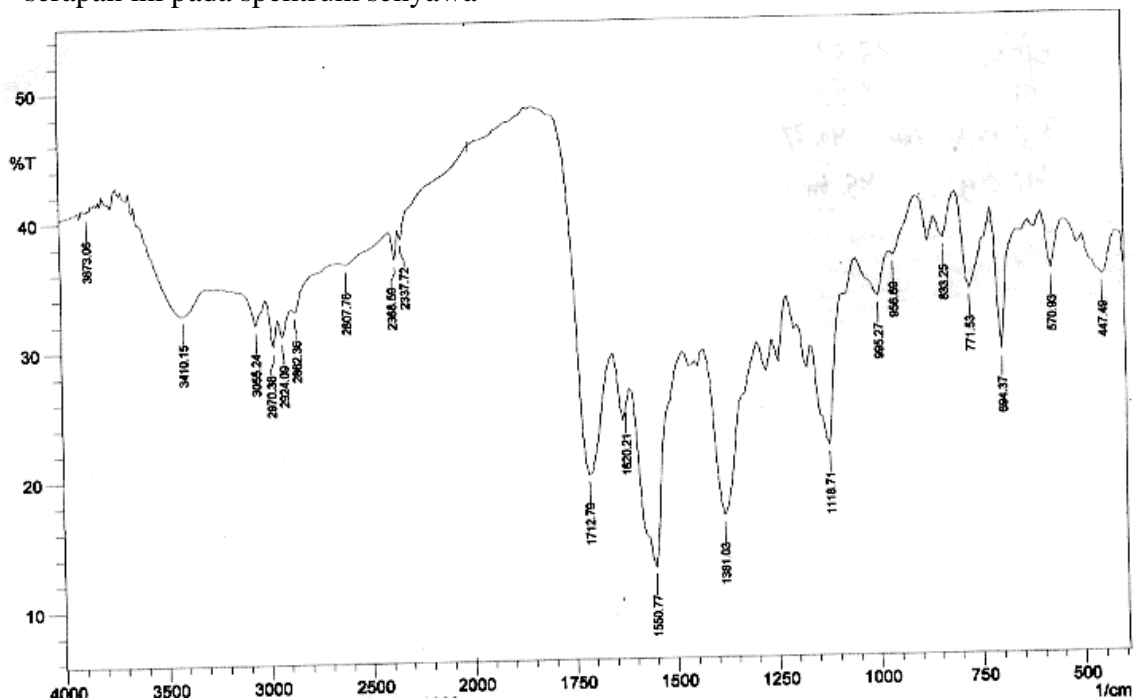
Reaksi adisi oleh gugus etilendiamin pada senyawa asal kаланon terhadap ikatan rangkap pada posisi C7 dan C8 seperti pada Gambar 1 dimulai dengan terbentuknya ion positif pada C7 kаланon akibat adisi elektrofilik ion H^+ dari metanol. Ion positif C7 yang tidak stabil ini menginduksi serangan nukleofilik dari pasangan elektron bebas gugus amin dari etilen diamin dan diikuti lepasnya H^+ dari ion gugus amin dengan bantuan anion metoksida. (CH_3O^-).

Data spektrum infra merah dan spektrometri massa

Data spektrum infra merah

Hasil analisis FT-IR terhadap senyawa etilendiamin kаланon produk menunjukkan hilangnya pita serapan pada bilangan gelombang 1790 cm^{-1} yang hal ini muncul pada senyawa kаланon. Pita serapan ini merupakan karakter dari alkena siklik yang terdapat pada ikatan C7 dan C8. Hilangnya serapan ini pada spektrum senyawa

kаланon sulfonat menunjukkan bahwa ikatan rangkap C7-8 telah mengalami reaksi adisi dan menjadi ikatan tunggal. Uluran N-H kopel kembar pada bilangan gelombang $3350 - 3450\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan daerah gugus amin primer dari spektrum ini tidak nampak. Hal ini disebabkan puncak kopel yang khas sedang dan berakibat tertutupi oleh adanya uluran O-H fenolik yang melebar dan sedang dari kаланon pada daerah sekitar $3300 - 3450\text{ cm}^{-1}$. Meskipun demikian dengan terdapatnya pita serapan pada 1620 cm^{-1} yang merupakan pita tekukan N-H (menggantung) dan pita serapan pada 1063 cm^{-1} yang merupakan pita uluran C-N, menunjukkan bahwa gugus etilen diamin telah mengadisi karbon pada C7 dari ikatan rangkap C7-8 senyawa kаланon asal. Spektrum FT-IR etilendiamin kаланon ditampilkan pada Gambar 2.

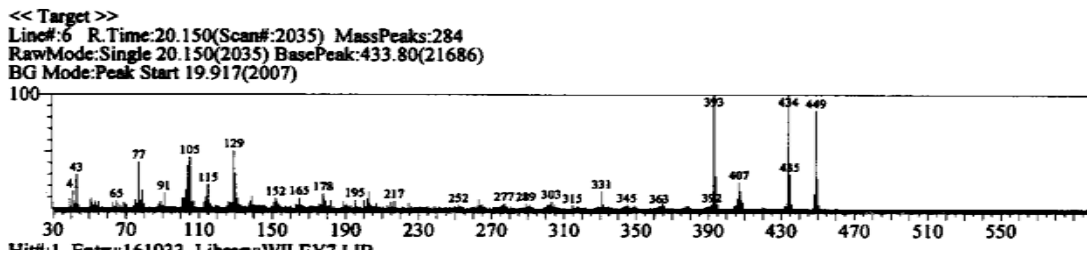


Gambar 2. Spektrum FT-IR senyawa etilendiamin kаланon

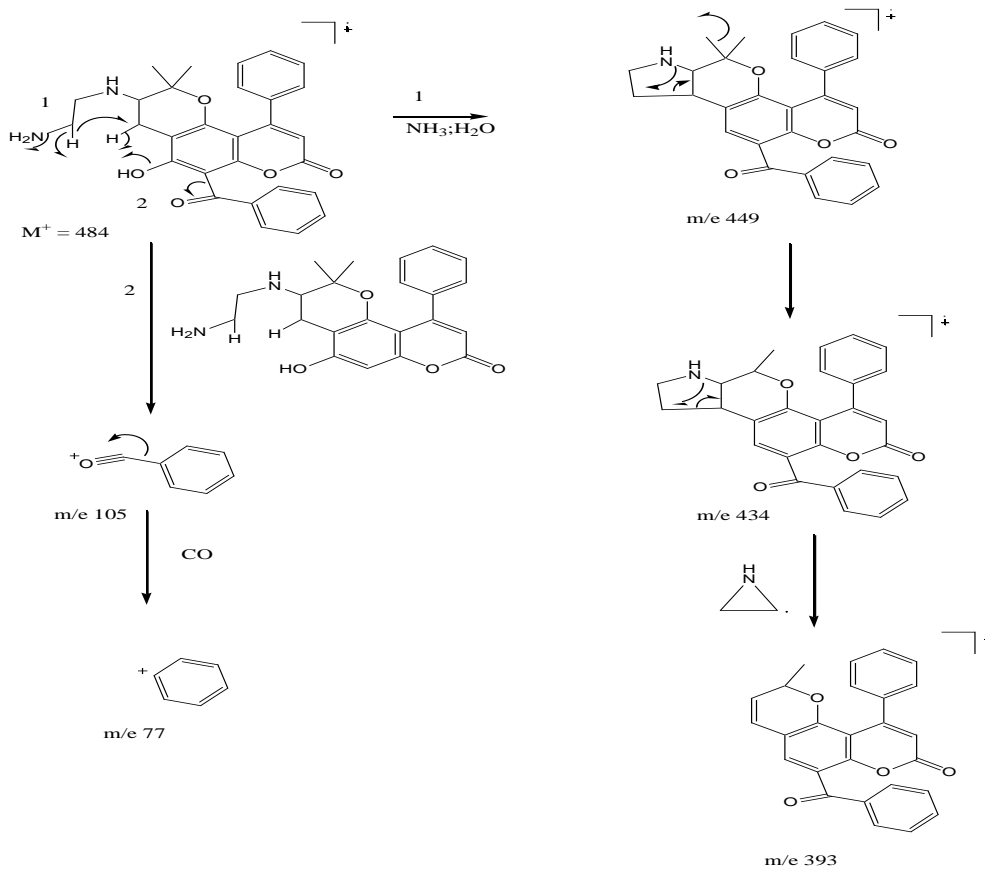
Data spektrometri massa

Hasil identifikasi MS senyawa etilendiamin kаланon muncul puncak pada m/e 449 yang merupakan puncak dari $M^+ - H_2O - NH_3$. Puncak ion molekul ($M^+ = 484$) dari spektrum MS ini tidak muncul adalah akibat lepasnya dua molekul netral kecil yakni H_2O

(BM 18) dan NH_3 (BM 17). Adapun puncak khas lain adalah m/e 449; m/e 434; m/e 393; m/e 105 dan m/e 77. Spektrum massa etilendiamin kаланon ditampilkan pada Gambar 3. Sedangkan pola fragmentasinya sebagaimana terlihat pada Gambar 4.



Gambar 2. spektrum MS senyawa etilendiamin kаланon



Gambar 3. Pola fragmentasi spektrum massa senyawa etilendiamin kаланon

Data aktivitas anti leukemia terhadap sel leukemia L1210

Uji aktivitas antikanker dari empat senyawa hasil sintesis ini dilakukan dengan uji sitotoksitas *in vitro* menggunakan sel leukemia L1210. Hasil pengamatan uji antikanker yang berupa nilai IC_{50} yang menunjukkan aktif atau tidaknya suatu sampel dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Nilai IC_{50} dalam satuan ppm (ug/mL) dari senyawa uji menunjukkan konsentrasi senyawa uji yang diperlukan untuk menghambat 50 % pertumbuhan sel kanker. Makin kecil nilai IC_{50} , makin aktif senyawa yang diujikan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dan suatu senyawa dikatakan aktif sebagai senyawa anti kanker jika nilai Nilai IC_{50} lebih kecil dari 10 ppm.

Hasil uji sitotoksitas keempat senyawa hasil sintesis yakni etilendiamin kаланon terhadap sel leukemia L1210 dan nilai Nilai IC_{50} senyawa kаланon asal ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data nilai IC_{50} senyawa turunan kаланon hasil sintesis dan standar terhadap sel leukemia L1210

No	Senyawa	Nilai IC_{50} (ug/mL)
1	Kаланon	59,4
2	Etilendiamin kаланon	39,57

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa terdapat perbedaan aktivitas antileukemia antara senyawa kаланon asal dan etilendiamin kаланon. Berbeda dengan penelitian sebelumnya yakni pada senyawa turunan kаланon hasil memodifikasi gugus karbonil pada C11, yang secara garis besar

aktivitas antikanker senyawa- senyawa turunan kаланon tersebut hampir dikatakan tidak meningkatkan aktivitas antikankernya malah semakin melemahkan aktivitasnya.

Fakta di atas menunjukkan bahwa bagian ikatan rangkap C7-8 kаланon berperan lebih besar sebagai salah satu sisi aktif kаланon dalam menghambat pertumbuhan kanker, khususnya leukemia dibandingkan dengan bagian gugus karbonil pada C11 kаланon. Di sisi lain gugus substituen yang paling berperan dalam meningkatkan aktivitas antikanker kаланon pada sisi aktif C7-8 adalah gugus golongan amina, hal ini dapat dibuktikan dengan nilai IC_{50} senyawa etilendiamin kаланon yang cukup lebih tinggi dibandingkan senyawa kаланon standar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Diperoleh senyawa baru turunan kаланon yakni etilendiamin kаланon, hasil adisi menggunakan molekul etilendiamin terhadap gugus ikatan rangkap pada C7-8 kаланon dengan nilai IC_{50} = 39,57 ug/mL
2. Modifikasi gugus ikatan rangkap C7-8 kаланon terbukti mampu meningkatkan aktivitas antileukemia kаланon, hal ini menunjukkan bahwa gugus ikatan rangkap C7-8 kаланon berperan sebagai sisi aktif kаланon dalam fungsinya sebagai obat antileukemia.
3. Gugus amin diduga adalah gugus yang potensial berperan meningkatkan interaksi obat dan reseptor pada senyawa kаланon

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Jakarta

2. Lembaga Penelitian Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto
3. Kimia LIPI, PUSPIPTEK , Serpong
4. Badan Tenaga Atom Nasional

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mondhiry, H. 1984. Calanone, A Novel Coumarin from *C. testimannii*. *Am. Journal Hematology*. 16:193-202.
- Angerer, E.; M Kager; K. Kervin C. Benefield; A Umerane; Albainy-Jenei; QS. Zhao; dan MB. Khazaeli. 1994. *Journal Cancer Res.Clin.Oncol*. 120 (suppl): S3-S10..
- Berkada, B.; H. Bouffard-Eyubaglu; dan U. Derman. 1983. Agents Actions. *Journal of Carcinogenesis*. 13(1): 50-51.
- Chasani, M. 2002. *Sintesis Senyawa Turunan Kalanon dan Uji Aktivitas Biologinya*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Indonesia, Jakarta.
- Dewi, D. K. 2001. *Esterifikasi Senyawa Kalanon serta Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap E. coli, B. subtilis, dan C. albicans*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kier, L. B., M. S. Tute, and O. W. Foye. 1989. *Principle of Medicinal Chemistry : Theoretical Aspect of Drug Design*. Lea and Febiger. Philadelphia
- Made, S. 1998. *Bioasai In Vitro dengan Sel Leukemia L1210, Sebuah Metode Skrining Zat Antitumor dari Bahan Alam*. Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia, Jakarta.
- Mc. Culloch, P dan ED George. 1988. Coumarin Derivatives Inhibition. *Br Journal Cancer*. 58: 158-162.
- Mutschler, E. 1986. *Dinamika Obat*. Terjemahan oleh Widiyanto. 1991. Penerbit ITB. Bandung.
- Sardjoko. 1993. *Rancangan Obat*. UGM Press. Yogyakarta.
- Sari, M. P. 2001. Esterifikasi Senyawa Kalanol serta Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap E. coli, B. subtilis, dan C. albicans. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Jakarta.
- Siswandono dan B. Soekardjo. 1998. *Prinsip-Prinsip Rancangan Obat*, Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Wibisono, L. K. 1997. Penentuan Struktur Molekul Derivat Kumarin dari Kulit Batang *C. biflorum* Hend & WS dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan in vivo Tumor Kelenjar Susu Mencit C3H. *Tesis*. Magister Sains Ilmu Kimia Universitas Indonesia, Jakarta.