

**HIDRASI IKATAN RANGKAP C₇₋₈
SENYAWA KALANON DAN UJI SITOTOKSISITASNYA
TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210**

Mochamad Chasani, Eva Vaulina, Ponco Iswanto, Yuyu Rahayu
Program Studi Kimia MIPA, Fakultas Sains dan Teknik UNSOED
E-mail: cass70_sani@yahoo.com

ABSTRACT

Calanone is anticancer compound that is isolated from species *Calophyllum*. The biological activity of calanone against leukemia cell L1210 is relatively low showed by IC₅₀ value at 59.4 µg/mL. A compound have a high biological activity if the value of IC₅₀ under 10 µg/mL. This research aimed to obtain calanone hydrate compound which has a higher activity to inhibit leukemia L1210 cancer cell growth. Calanone hydrate compound is obtained through two step reaction, first step was protonated double bond by acetic acid reagent and the second step is nucleophilic addition by water. Initial analysis for the synthesized product compound is done with thin layer chromatography (TLC) using n-hexane and ethyl acetate 2:1 (v/v) eluent. Column Chromatography and recrystallization is used to purify the synthesized product compound with n-hexane and methylene chloride 1:1 (v/v) solvent. The result analyzed by thin layer chromatography. The synthesized product give R_f at 0.4545 and yield 4.72% (w/w), forming of brownish yellow chromatic powder and melting point at 190°C-192°C. Identification structure of synthesized product compound is done with mass spectrometer. The result of mass spectrometer identification were molecular ion M⁺-18 (M⁺ 424) with fragments m/e=409, m/e=395, m/e=381, m/e=331, m/e=317, m/e=303, m/e=176, m/e=105, and m/e=77. Cytotoxicity test against leukemia cell L1210 yield the value IC₅₀ equal to 45.64 µg/mL.

Keywords: calanone hydrate, anti cancer, leukemia cell L1210

PENDAHULUAN

Kalanon merupakan senyawa turunan kumarin hasil alam yang diisolasi dari species *callophyllum*. Penelitian kalanon sebagai obat antikanker dilakukan pertama kali oleh Swee Hock Goh, *Chemistry Departemen, National University of Singapore*, pada tahun 1999 dengan daya hambat terhadap sel leukemia L1210 (IC₅₀) sebesar 59,4 µg/mL (Hanafi, 2006). Daya hambat tersebut dinilai masih terlalu rendah sebagai senyawa antikanker. Senyawa dapat dikatakan aktif sebagai antikanker jika nilai IC₅₀-nya di bawah 10 µg/mL (Made, 1998). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk modifikasi struktur molekul senyawa kalanon guna meningkatkan aktivitasnya

sebagai senyawa antikanker. Senyawa alami dengan aktivitas rendah seperti kalanon dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan memodifikasi sebagian gugus reaktifnya.

Ernawati (2004) telah berhasil mensintesis senyawa baru turunan kalanon dengan memodifikasi salah satu gugus reaktif senyawa kalanon, selain dari gugus karbonil, yaitu pada ikatan rangkap atom karbon C₇ dan C₈ menghasilkan senyawa kalanon oksida. Senyawa turunan kalanon tersebut diperoleh melalui reaksi epoksidasi senyawa kalanon dengan hidrogen peroksida menggunakan pelarut metanol.

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini akan dilakukan sintesis senyawa turunan kalanon yaitu kalanon

hidrat. Sintesis ini dilakukan melalui reaksi adisi nukleofilik oleh molekul air pada ikatan rangkap atom karbon C₇ dan C₈ dari senyawa kalanon. Senyawa hasil sintesis yang diperoleh diharapkan mempunyai aktivitas antikanker yang lebih baik karena gugus hidroksil merupakan salah satu gugus aktif penghambat pertumbuhan sel kanker maupun mikroba, disamping gugus ester dan amida (Hanafi, 1997 dalam Ridwanuloh, 2007).

Analisis pendahuluan senyawa hasil sintesis dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilanjutkan pada pemurnian hasil sintesis menggunakan kromatografi kolom silika gel dengan fasa gerak n-heksana : etil asetat. Struktur senyawa hasil sintesis diidentifikasi dengan spektrometer massa.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Kalanon (LIPI Kimia Puspitek, Serpong-Banten), asam asetat glasial, diklorometan (p.a), n-heksana, etil asetat, kloroform (p.a), aseton (p.a), plat kromatografi lapis tipis silika gel G60 F₂₅₄ (E-Merck), Na₂SO₄ anhidrat, dan Aquades. Sedangkan alat yang digunakan pada penelitian ini adalah labu alas bulat, timbangan analitik, corong pisah, erlenmeyer, beaker glass, pipet tetes, hot plate, alat ukur melting point (SMP1 Stuart Scientific), pipa kapiler, kondensor, rotari evaporator Buchii, bejana KLT, lampu UV 254 nm dan 366 nm, spektrometer massa (GCMS Shimadzu QP2010S).

Prosedur Penelitian

Sintesis Senyawa kalanon Hidrat

Sintesis senyawa kalanon hidrat dilakukan dengan mereaksikan sejumlah 424 mg (1 mmol) kalanon dalam labu alas bulat dengan 30 mL asam asetat

glasial, diaduk sampai semua padatan larut. Larutan tersebut kemudian direaksikan dengan 10 mL aquades, kemudian direfluks sambil diaduk selama 12 jam. Campuran reaksi tersebut ditambah dengan aquades, kemudian diekstraksi dengan diklorometan sebanyak tiga kali. Fraksi diklorometan yang diperoleh ditambah Na₂SO₄ anhidrat yang berfungsi untuk menarik air yang masih terdapat pada fraksi diklorometan, kemudian didekantasi. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan rotari evaporator Buchii untuk menghilangkan pelarut sampai diperoleh senyawa yang pekat, kemudian didiamkan untuk menghilangkan sisa pelarut. Selanjutnya dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 2:1 (v/v).

Pemurnian produk hasil sintesis dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut n-heksana dan diklorometan 1:1 (v/v). Kristal produk yang diperoleh diuji kemurniannya menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak n-heksana dan etil asetat 2:1 (v/v). Penampakkan noda dilakukan di bawah lampu UV pada panjang gelombang (λ) 254 nm dan 366 nm dan noda yang diperoleh dibandingkan dengan noda senyawa asal kalanon. Senyawa hasil sintesis selanjutnya diuji titik lelehnya dengan alat *melting point*. Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan metode spektroskopi menggunakan spektrometer massa (GCMS Shimadzu QP2010S).

Pemurnian Senyawa Kalanon Hidrat

Pemurnian dengan kromatografi Kolom

Pemurnian dengan kromatografi kolom dilakukan dengan mencampurkan produk hasil sintesis dengan silika gel secara merata. Kolom diisi dengan silika gel dengan dibasahi eluen. Eluen yang

digunakan adalah n-heksan : etil asetat. Fraksi-fraksi yang diperoleh ditampung dan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai Rf yang sama disatukan dalam satu tempat, kemudian dianalisis dengan KLT untuk mengetahui produk yang diharapkan.

Uji Kemurnian dengan KLT

Senyawa dilarutkan dalam pelarut diklorometan kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada lempeng silika gel GF 254 dengan fasa gerak n-heksana dan etil asetat 2:1 (v/v). Spot kromatogram diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Hostettmann, *et. al.*, 1995). Spot hasil sintesis dibandingkan dengan spot senyawa asal kalanon. Senyawa dapat dikatakan murni apabila memberikan satu spot pada beberapa eluen yang berbeda kepolarannya jika dianalisis dengan KLT (Gritter and Schwarting, 1991).

Uji Titik Leleh Senyawa Produk

Senyawa hasil sintesis diuji titik lelehnya menggunakan alat *melting point*. Sampel diambil sedikit menggunakan pipa kapiler kemudian dimasukkan ke

alat *melting point* (SMP1 Stuart Scientific). Temperatur pada saat kristal meleleh sampai semua kristal melebur dicatat sebagai jarak titik leleh. Senyawa dianggap murni jika jarak titik lelehnya sempit dengan interval antara 1°C sampai 2°C (Pasto, *et. al.*, 1991).

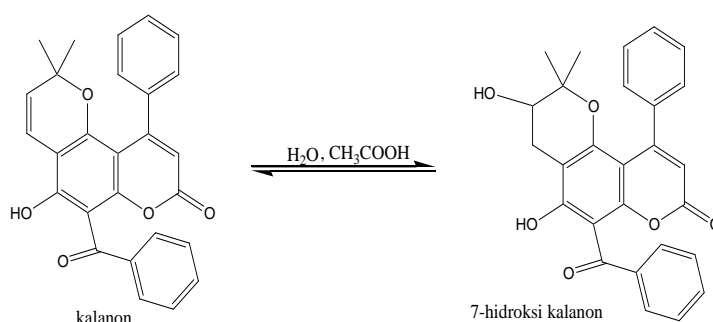
Uji Sitotoksitas terhadap Sel Leukemia L1210

Senyawa yang telah disintesis kemudian diuji sitotoksitasnya secara *in vitro* terhadap sel leukemia L1210. Uji sitotoksitas senyawa hasil sintesis terhadap sel leukemia L1210 dilakukan di Laboratorium KESDA Jakarta Utara, P3TIR BATAN.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis Senyawa Kalanon Hidrat

Sintesis yang dilakukan pada penelitian ini yaitu sintesis senyawa kalanon hidrat, suatu senyawa turunan kalanon, yang dibuat dengan memodifikasi struktur molekul senyawa kalanon melalui reaksi hidrasi, yaitu reaksi yang melibatkan molekul air, terhadap ikatan rangkap karbon 7-8. Reaksi sintesis senyawa kalanon hidrat ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi Sintesis Senyawa Kalanon Hidrat

Reaksi pembentukan kalanon hidrat berlangsung dalam dua tahap. Tahap pertama adalah protonasi ikatan rangkap C₇₋₈ senyawa kalanon karena adanya reagen asam asetat glasial membentuk suatu karbokation. Asam

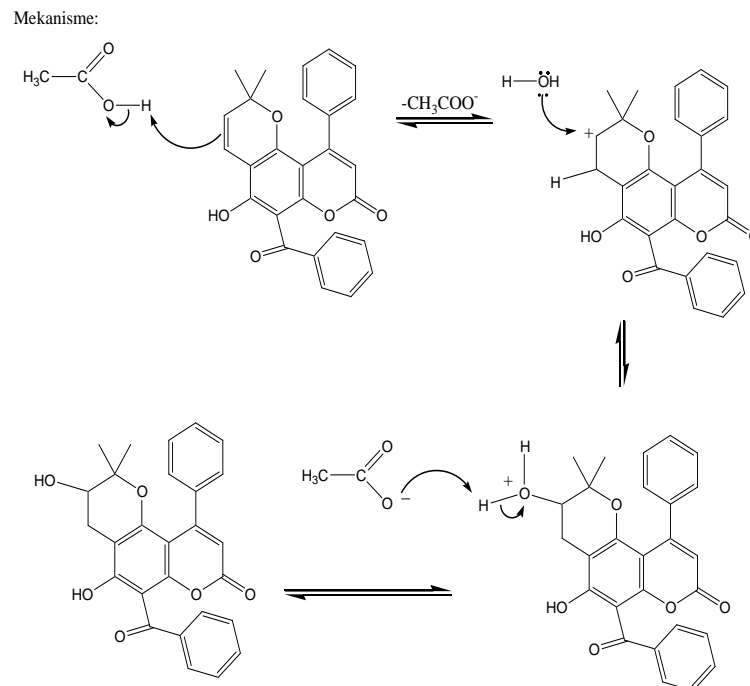
asetat glasial berfungsi sebagai pelarut dan aktivator. Asam asetat diperlukan pada reaksi ini, karena molekul air yang bersifat netral tidak cukup asam untuk memberikan proton untuk dapat mengawali reaksi.

Reagen asam asetat bersifat elektrofilik dengan melepaskan satu gugus CH₃COO sehingga terbentuk H⁺ dan CH₃COO⁻. Pada tahap ini, terjadi adisi elektrofilik oleh H⁺ (elektrofil) yang menyerang ikatan rangkap C₇₋₈ yang kaya elektron. Serangan oleh H⁺ terhadap atom C₈ menyebabkan atom karbon tetangganya (C₇) bermuatan positif. Umumnya ikatan rangkap karbon-karbon tidak diserang oleh nukleofil karena tidak memiliki atom karbon yang positif parsial untuk dapat menarik nukleofil. Namun, elektron pi yang tidak terlindungi dalam ikatan rangkap karbon-karbon akan menarik elektrofil (E⁺) seperti H⁺. Oleh karena itu, banyak reaksi alkena diawali dengan suatu serangan elektrofilik.

Langkah pertama ini (pembentukan karbokation) merupakan

langkah yang paling lambat diantara dua langkah yang ada. Karbokation yang dihasilkan bersifat sangat reaktif karena jumlah elektronnya yang hanya enam disekitar atom karbon positif, sehingga penggabungannya dengan nukleofil dilakukan dengan sangat cepat.

Tahap kedua adalah adisi nukleofilik, H₂O sebagai sumber nukleofil (HO⁻) yang kuat akan menyerang ikatan rangkap yang telah terprotonasi (Carey, 1991) untuk membentuk senyawa hidrat. Nukleofil ini akan menyumbangkan sepasang elektronnya dan reaksi ini disertai lepasnya ion H⁺ dari H₂O. Mekanisme yang mungkin pada pembentukan senyawa kаланon hidrat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme Pembentukan Senyawa Kаланon Hidrat

Pemurnian Senyawa Kаланon Hidrat

Pemurnian senyawa produk dilakukan menggunakan teknik kromatografi kolom. Kromatografi

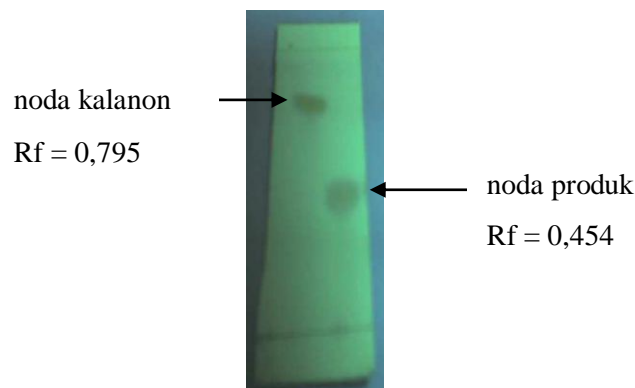
kolom dilakukan dengan eluen n-heksana dan etil asetat dengan semakin meningkatnya perbandingan kepolaran eluen. Hasil yang diperoleh yaitu

terbentuk pita yang berwarna kuning, yang selanjutnya terelusi menjadi fraksi-fraksi produk yang berwarna kuning. Fraksi-fraksi tersebut dikontrol menggunakan KLT dengan eluen yang sama yaitu n-heksana dan etil asetat 2:1 (v/v), diperoleh noda berwarna kuning pada plat KLT. Hasil uji KLT senyawa kаланon hidrat dengan pembandingan senyawa asal kаланon ditunjukkan pada Gambar 3.

Senyawa kаланon hidrat mempunyai tingkat kepolaran yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa asalnya yaitu kаланon yang ditunjukkan dengan nilai Rf produk sintesis sebesar 0,454 lebih kecil dibandingkan nilai Rf senyawa kаланon yaitu 0,795.

Bertambahnya kepolaran senyawa hasil sintesis disebabkan karena ikatan rangkap C₇₋₈ dari senyawa kаланon digantikan oleh gugus hidroksi (OH) yang mempunyai kepolaran lebih besar, sehingga mempengaruhi tingkat kepolaran secara keseluruhan.

Senyawa hasil sintesis berupa kristal berwarna kuning kecoklatan, larut baik dalam diklorometan, etil asetat, aseton dan tidak larut dalam n-heksana. Total massa produk yang diperoleh sebanyak 20 mg. Rendemen senyawa hasil sintesis sebesar 4,72%, yang dihitung dari perbandingan antara massa hasil sintesis dengan massa secara teoritis.

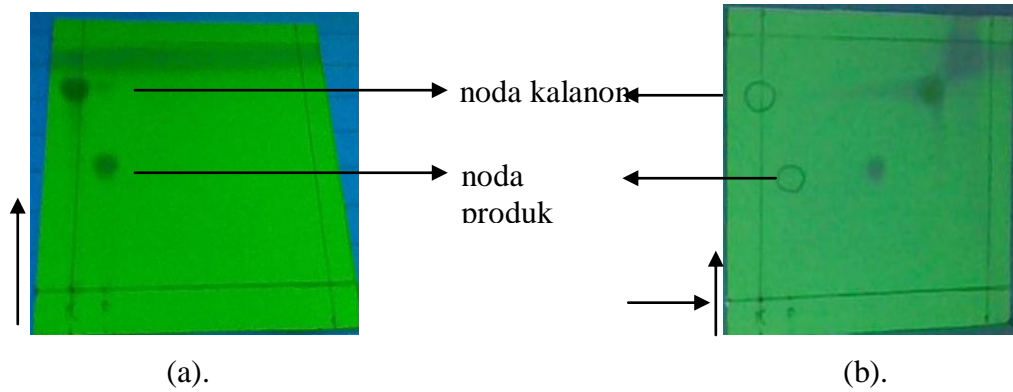


Gambar 3. Hasil Uji KLT Senyawa Kаланon Hidrat dengan Pembandingan Senyawa Kаланon dengan Eluen n-heksana : etil asetat 2:1 (v/v).

Uji Kemurnian

Uji kemurnian senyawa hasil sintesis dilakukan dengan uji titik leleh dan uji KLT dua arah. Kristal kаланon hidrat yang dihasilkan diambil sedikit menggunakan pipa kapiler kemudian diuji titik lelehnya dengan menggunakan alat *melting point*. Senyawa meleleh pada suhu 190°C-192°C, dengan jarak titik leleh sebesar 2°C.

Selanjutnya dilakukan Uji KLT dua arah untuk mengetahui apakah produk yang dihasilkan sudah benar-benar murni. KLT dua arah ini menggunakan eluen yang sama yaitu n-heksana dan etil asetat 2:1 (v/v), menghasilkan satu noda pada senyawa produk. Hasil uji KLT dua arah dengan pembandingan senyawa kаланon dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji KLT Dua Arah dengan Pembandingan Senyawa Kаланon dengan Eluen n-heksana : etil asetat 2:1 (v/v).

(a). KLT Arah Pertama

(b). KLT Arah Kedua

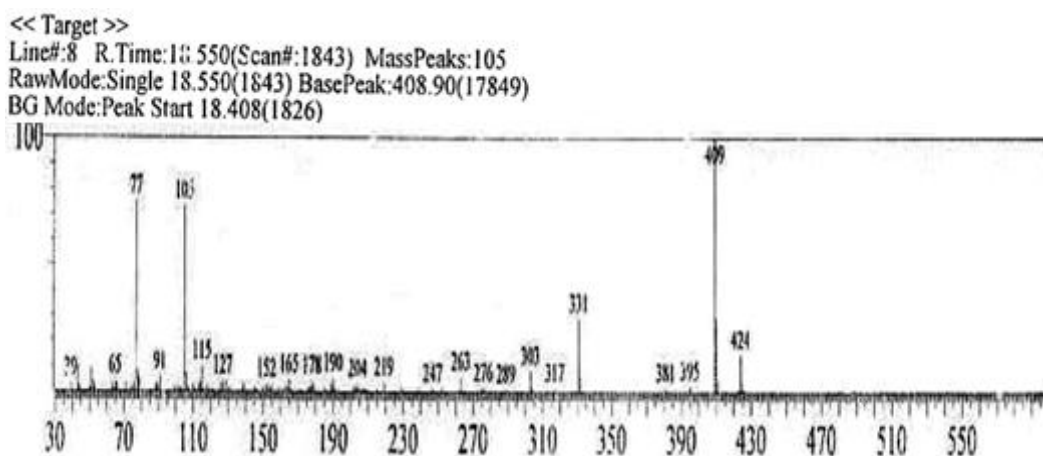
Identifikasi Struktur Senyawa

Kаланon Hidrat

Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis menggunakan spektrometer massa dilakukan untuk menentukan apakah produk sintesis merupakan senyawa yang diharapkan. Spektrum massa menyatakan massa-massa dari fragmen molekul bermuatan positif terhadap konsentrasi fragmennya. Puncak

tertinggi pada spektrum disebut puncak dasar (*base peak*). Puncak dasar umumnya dinyatakan dengan nilai 100 %, sedangkan puncak-puncak lainnya relatif terhadap puncak dasarnya (Sastrohamidjojo, 2001).

Spektrum hasil identifikasi GCMS senyawa kаланon hidrat dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektrum massa senyawa kаланon hidrat

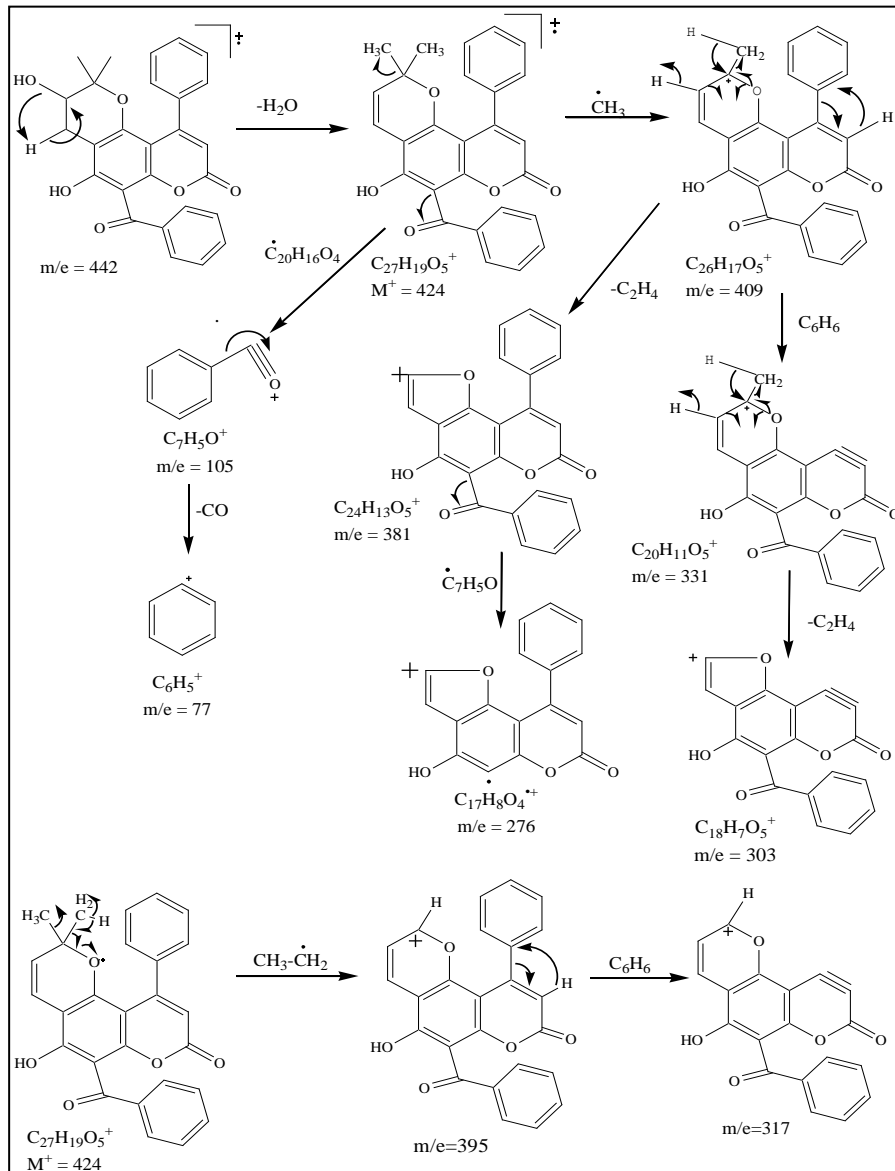
Berdasarkan strukturnya, senyawa kаланon hidrat mempunyai bobot molekul 442 sma, tetapi apabila dilihat dari spektra massanya, ion molekuler

yang menunjukkan berat molekul tersebut tidak dapat terlihat. Tidak munculnya ion molekuler M⁺ 442 pada spektrum mungkin disebabkan ion

molekuler tersebut bersifat tidak stabil sehingga waktu hidup ion molekuler tersebut pendek dan segera mengalami pemecahan membentuk fragmen-fragmen yang lebih kecil dan stabil. Selain itu, energi eksitasi yang diserap oleh ion molekuler besar sehingga dapat memutuskan satu ikatan atau lebih pada ion molekuler sehingga menghasilkan kelimpahan ion molekuler yang rendah atau sama sekali tidak ada.

Fragmen yang pertama terlihat adalah $M^+ - 18$ (m/e 424), yaitu suatu peak yang 18 satuan massa lebih kecil dari ion molekuler. Peak ini muncul karena

lepasnya molekul netral kecil yaitu H₂O (BM =18) yang dapat terlepas dengan mudah dari dalam suatu ion molekuler. Alkohol biasanya memberikan ion molekuler yang sangat lemah, tetapi kerap kali menunjukkan puncak pengganti sebagai hasil dari kehilangan molekul air ($M^+ - 18$). Fragmen lain yang muncul dari spektrum massa kаланon hidrat adalah $m/e=409$, $m/e=395$, $m/e=381$, $m/e=331$, $m/e=317$, $m/e=303$, $m/e=276$, $m/e=105$, dan $m/e=77$. Fragmen-fragmen tersebut diperkirakan mengikuti pola fragmentasi seperti ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Pola Fragmentasi dari Spektrum Massa Senyawa Kаланon Hidrat

Uji Sitotoksitas Terhadap Sel Leukemia L1210

Hasil uji sitotoksitas kаланon hidrat terhadap sel Leukemia L1210 memberikan harga IC_{50} sebesar 45,64 $\mu\text{g/mL}$, yang berarti senyawa tersebut pada konsentrasi 45,64 $\mu\text{g/mL}$ mampu menghambat pertumbuhan sel kanker leukemia L1210 sebanyak 50%.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa senyawa kаланon

hidrat memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 yang lebih besar bila dibandingkan dengan senyawa kаланon. Modifikasi yang dilakukan terhadap senyawa kаланon pada sisi aktifnya, ikatan rangkap C_{7-8} , dapat meningkatkan aktivitas antikanker senyawa kаланon terhadap sel leukemia L1210. Data lengkap hasil bioasai aktivitas senyawa kаланon hidrat dan nilai IC_{50} nya ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data aktivitas senyawa kаланon hidrat terhadap sel leukemia L1210

Dosis sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Jumlah Sel x 10^5		Sel/mL Rata-rata	Inhibisi (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
	Ulangan 1	Ulangan 2			
90	0	0	0,0	100,00	45,64
60	27	28	27,5	72,50	
30	74	75	74,5	25,25	
10	89	92	90,5	9,50	
5	99	98	98,5	1,50	
Blanko	101	99	100,0		

Sumber : Laboratorium KESDA Jakarta Utara, P3TIR BATAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh simpulan sebagai berikut :

1. Senyawa kаланon hidrat dapat disintesis dari senyawa kаланon melalui reaksi hidrasi ikatan rangkap C_{7-8} senyawa kаланon.
2. Produk hasil sintesis senyawa kаланon hidrat menghasilkan rendemen sebesar 4,72 % (b/b).
3. Senyawa kаланon hidrat memiliki daya hambat terhadap sel leukemia L1210 (IC_{50}) sebesar 45,64 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

Carey, F. A and R. J. Sunberg, 1991. *Advanced Organic Chemistry, 3rd Edition Part 3 : Reaction and*

Synthesis. Plenum Press. New York.

Ernawati, S. 2004. *Semi Sintesis Senyawa Turunan Kаланon Melalui Reaksi Epoksidasi dengan Hidrogen Peroksida dan Pemurniannya Menggunakan Metode Rekristalisasi dan Kromatografi*. Skripsi. Program Sarjana MIPA Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto (Tidak Dipublikasikan).

Hanafi, M. 2006. *Senyawa Baru sebagai Anti Kanker*. www.wilkipedia.co.id. Diakses tanggal 20 juli 2008.

Hostettmann, K., M., Hostettman, dan A. Marston. 1995. *Cara*

- Kromatografi Preparatif: Penggunaan Pada Isolasi senyawa Alami: Terjemahan kosasih Padmawinata.* ITB, Bandung.
- Made, S. 1998. Bioasai In Vitro dengan Sel Leukemia L1210, Sebuah Metode Skrining Zat Antitumor dari Bahan Alam. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia*, Jakarta.
- Ridwanuloh, A.M. 2007. Sintesis Senyawa 2-Hidroksibenzoil-metil-oktanoil-serin-ester dan 2-Hidroksibenzoil-heksanoil-metil-serin-ester serta Uji Sitotoksitasnya terhadap Sel Kanker Murine Leukemia P-388. *Skripsi*. Program Sarjana MIPA Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto (Tidak Dipublikasikan).
- Siswandono dan B. Soekardjo. 2000. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Sugiyanto, B., Sudarta, E., Meiyanto, dan A.E., Nugroho. 2003. Aktivitas Karsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol 14, No. 4, PP.132-141.
- Wibisono, L.K. 1997. Penentuan struktur Molekul Derivat kumarin dari Kulit Batang *C. biflorum* Hends dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan In Vivo Tumor kelenjas Susu Mencit C3H. *Tesis*. Magister Sains Ilmu Kimia Universitas Indonesia, Jakarta.