

SIFAT TOKSISITAS SENYAWA TURUNAN CALKON (E)-1-(NAFTALEN-1-IL)-3-(NAFTALEN)PROP-2-1-ON

Rahmiwati Hilma, Jasril, Hilwan Yuda Teruna, Hasmalina Nasution

Program studi kimia Universitas Muhammadiyah Riau
Jurusan Kimia FMIPA, Universitas riau
Email: hilma75@yahoo.com

ABSTRAK

Calkon merupakan salah satu metabolit sekunder golongan flavonoid yang dapat ditemukan pada tumbuh-tumbuhan dan dikenal mempunyai berbagai macam aktivitas diantaranya adalah sebagai antimikroba, anti kanker, sitotoksitas, anti kolera, anti inflamasi dan anti tumor. Pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas terhadap senyawa calkon (E)-1-(naftalen-1-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on (C) yang telah murni menggunakan metoda *Brine Shrimps lethality Test* (BSLT) dan Uji Anti kanker menggunakan metoda MTT terhadap sel kanker murine leukemia P-388. Dari hasil penelitian didapat nilai $LC_{50} = 0,3256 \mu\text{g/mL}$ untuk aktivitas toksisitas, dan nilai $LD_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ untuk aktivitas sitotoksik. yang menunjukkan bahwa senyawa calkon yang dihasilkan menunjukkan sifat toksisitas dan sitotoksik yang sedang. Ini dikarenakan senyawa calkon (C) yang disintesis tidak mempunyai gugus substituen yang bisa mendorong pergerakan elektronnya. Selain pengaruh dari gugus substituen, tingkat toksisitas dan sitotoksik senyawa calkon juga dipengaruhi adanya halangan sterik.

Kata kunci: calkon, *Brine Shrimps lethality Test*, toksisitas

1. PENDAHULUAN

Kanker adalah salah satu penyebab utama kematian dinegara berkembang, termasuk di Indonesia. Kanker merupakan segolongan penyakit yang ditandai dengan suatu pergeseran pada mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel. Pembelahan sel yang tidak terkendali tersebut mempunyai kemampuan untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (*invasi*) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (*metastasis*) (Katzung, 1995). Jumlah korban kanker terus meningkat dari tahun ke tahun dan belum ditemukan cara yang efektif untuk pengobatannya (Sajuthi, 2001). Pengobatan kanker secara medis yang selama ini dilakukan adalah melalui pembedahan (operasi), penyinaran (radiasi) dan terapi kimia (kemoterapi). Salah satu yang menjadi

perhatian adalah kemoterapi, yaitu penggunaan bahan-bahan bioaktif dari hasil sintesis atau isolasi bahan alam.

Calkon merupakan salah satu senyawa alam yang mempunyai aktivitas biologis beragam, salah satunya adalah sebagai antikanker (Achanta *et al.*, 2006; Modzelewska *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2004; Shibata, 1994; Yamamoto *et al.*, 1991; Satomi, 1993). Beberapa derivat senyawa calkon dikaji aktivitas sitotoksiknya dengan menggunakan tiga *tumor cell lines*, yaitu B16 (*Murine Melanoma*), HCT116 (*Human Colon Cancer Cells*) and A431 (*Human Epidermoid Carcinoma*) (Nam *et al.*, 2004). Selain itu, calkon alami dan sintesis menunjukkan efek antiproliferatif yang kuat terhadap sel kanker ovarian (de Vincenzo *et al.*, 1995) dan *gastric cancer HGC-27 cells* (Shibata, 1994). Hidroksil calkon dan isoliquiritigenin menunjukkan potensi

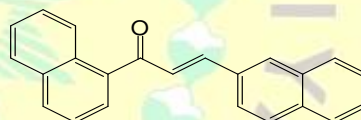
menginhibisi karsinogenesis kulit secara *in vivo* (Yamamoto *et al.*, 1991; Satomi, 1993).

Senyawa calcon ini dapat diperoleh dengan cara isolasi dari tumbuhan, namun untuk memperolehnya, terdapat beberapa kelemahan antara lain jumlahnya di alam yang terbatas dan persentasenya dalam tumbuhan juga kecil sekitar 3-5%, variasi strukturnya relatif sedikit, serta membutuhkan biaya yang cukup mahal dan waktu yang cukup lama untuk mengisolasinya. Bertolak dari hal tersebut, maka didapatkan suatu solusi yang dapat meminimalisir segala kekurangan dalam proses isolasi itu yaitu dengan cara sintesis kimia. Karena sintesis merupakan upaya terbaik untuk menyiapkan senyawa calcon dan turunannya dengan jumlah dan variasi struktur sesuai dengan yang dikehendaki

Hal ini merupakan salah satu pendorong bagi kami untuk mengembangkan atau merekayasa molekul calcon baik untuk mempelajari sifat fisiko-kimianya atau untuk kepentingan terapeutik. Salah satu metoda sintesis untuk membuat senyawa turunan calcon adalah melalui kondensasi Aldol dari suatu keton aromatik dan aldehid aromatik baik dalam kondisi basa maupun asam. Metoda ini dikenal ramah lingkungan (*Green Chemistry*) karena menggunakan bahan kimia berbahaya yang relatif kecil. Disamping itu, daya tarik lain dari metoda ini adalah bisa dilakukan dengan pendekatan kimia kombinatorial. Melalui kombinasi dari berbagai variasi dua reaktan akan menghasilkan calcon dengan struktur yang sangat beragam dan sesuai dengan yang diinginkan. Semakin banyak kombinasi reaksi ini maka semakin beragam pula struktur calcon dan turunannya yang dihasilkan sehingga pada akhirnya akan menghasilkan bermacam-macam sifat bioaktivitas yang potensial.

Dewasa ini, penemuan penelitian berupa senyawa bioaktif dapat dikembangkan menjadi senyawa medisinal unggulan yang bernilai ekonomi tinggi. Penelitian ini sangat penting mengingat di negara maju alur pikir teknologi kesehatan saat ini tidak lagi menggunakan senyawa kimia umum, namun pencarian senyawa kimia alami tunggal atau senyawa murni menjadi prioritas.

Pada penelitian terdahulu telah disintesis senyawa turunan calcon (*E*)-1-(naftalen-2-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on (C), yang disintesis dari 1-acetyl naftalene dengan 2-naftalaldehid secara kondensasi Claisent Smith. Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas toksisitas senyawa calcon yang telah disintesis dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Selanjutnya untuk menentukan aktivitas antikanker diuji secara *in vitro* dengan menggunakan sel kanker murine leukemia P-388.



Senyawa (*E*)-1-(naftalen-2-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on (Senyawa (C))

2. METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah: NaOH, HCl, kloroform (CHCl₃), asam klorida (HCl) 2N dan pekat, etanol (CH₃CH₂OH), metanol (CH₃OH), natrium hidroksida (KOH) 1 N, air suling (H₂O), nipagin (C₉H₁₀O₃) dan indikator pH universal, Bahan-bahan yang digunakan untuk uji *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) adalah kista udang *Artemia salina* Leach, air laut, metanol, dimetilsulfoksida (DMSO).

Alat-alat yang digunakan adalah: spatula, oven, kulkas, neraca analitik, Magnetic stirer, overhead stirer, dan pH meter, oven, plat KLT GF₂₅₄, alat pengukur

titik leleh Fisher Johnes, termometer, lampu UV model UVL-56, seperangkat alat HPLC Shimadzu UFLC Prominence, spektroskopi UV-Visible, spektroskopi NMR Bruker Avance DRX-500 dengan medan magnet 500 MHz untuk proton di ITB, FTIR Shimadzu Prestige-21, Alat-alat yang digunakan untuk uji *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) berupa seperangkat alat pembiakan telur udang *Artemia salina* Leach (wadah gelap, aerasi, lampu dengan intensitas cahaya rendah), vial, pipet mikro, timbangan analitik, pipet tetes, kaca pembesar, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Prosedur Kerja

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Senyawa calkon (*E*)-1-(naftalen-1-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on, dengan sifat fisik berupa kristal kuning pucat, titik leleh 88°C – 90°C, ditemukan pada spektrum massa $C_{23}H_{17}O$ $[M+H]^+$: 309, 1276 m/z, selisih massa: 0,0003

Uji aktivitas biologi utama senyawa calkon dengan metoda *Brine Shrimps lethality Test* (Meyer *et al.*, 1982; Harefa, 1997)

Kista udang *Artemia salina* ditetaskan dalam wadah pembiakan yang berisi air laut, dan digunakan setelah 48 jam setelah membentuk larva. Vial uji dikalibrasi sebanyak 5 ml. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 100, 10, 1 µg/ml dengan pengulangan masing-masing tiga kali. Sebanyak 4 mg senyawa uji dilarutkan dalam 4 ml methanol maka didapat larutan induk ekstrak uji dengan konsentrasi 1.000 µg/ml, kemudian larutan induk dengan konsentrasi 1.000 µg/ml tersebut di pipet sebanyak 0,5 ml ke dalam vial uji hingga nantinya didapat konsentrasi 100 µg/ml setelah penambahan air laut hingga 5 ml. Pembuatan konsentrasi 10 µg/ml dengan cara pengenceran larutan induk 1.000 µg/ml sebanyak 0,5 ml

ditambahkan methanol hingga 5 ml maka diperoleh konsentrasi ekstrak uji 100 µg/ml kemudian di pipet sebanyak 0.5 ml larutan ekstrak uji tersebut ke dalam vial uji hingga nantinya didapat konsentrasi 10 µg/ml setelah penambahan air laut hingga 5 ml. Dan untuk konsentrasi 1 µg/ml dibuat dari larutan uji 10 µg/ml dengan cara yang sama.

Masing-masing vial uji dibiarkan menguap metanolnya. Larutkan kembali senyawa uji dengan 50 µl DMSO, selanjutnya tambahkan air laut hampir mencapai batas kalibrasi. Masukkan larva udang pada masing-masing vial sebanyak 10 ekor. Tambahkan lagi air laut beberapa tetes hingga batas kalibrasi, kematian larva udang diamati setelah 24 jam. Dari data yang dihasilkan dihitung LC50 dengan metoda kurva menggunakan tabel probit. Sebagai pembanding, 50 µl 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 konsentrasi dibuat 3 kali pengulangan.

Uji sitotoksik dengan metoda MTT (*Microculture Tetrazolium Assay*)

Uji sitotoksik ini dikerjakan berdasarkan metoda yang dijelaskan oleh Alley *et al.* (1988). Sel kanker murine leukemia P-388, dibiakan dalam 96-well plates dengan densitas sel sebenarnya kira-kira 3 x 10⁴ sel/cm³. Setelah 24 jam diinkubasi dan tumbuh, ditambahkan konsentrasi sample. Senyawa yang ditambahkan pertama-tama dilarutkan dalam DMSO pada konsentrasi yang dibutuhkan. Selanjutnya 6 konsentrasi yang digunakan, disiapkan dengan menggunakan PBS (larutan buffer forfor, pH 7,30-7,65). Lubang kontrol diisi hanya dengan DMSO. Uji ini dihentikan setelah 48 jam inkubasi dengan penambahan pereaksi MTT (3-(4,5-dimetil-tiazon-2,il)-2,5-difenil

tetrazolium bromide; atau thiazol blue) kemudian inkubasi dilanjutkan selama 4 jam.

Selanjutnya ditambahkan larutan penghenti MTT yang mengandung SDS (Sodium Dedosil Sulfat) kemudian inkubasi dilanjutkan selama 24 jam. Densitas optik dibaca dengan menggunakan suatu *microplate reader* pada 550 nm. Nilai IC50 didapat dengan memplotkan grafik hubungan persentase sel hidup dibandingkan terhadap kontrol (%), kontrol tersebut hanya dipengaruhi oleh PBS dan DMSO terhadap konsentrasi senyawa yang diujikan (μM). Nilai IC50 adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% pertumbuhan. Setiap uji dan analisis dikerjakan triplo dan hasilnya dirata-ratakan (Sahidin, 2006).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

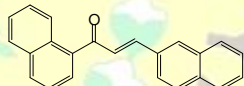
Uji Toksisitas dan Sitotoksik Senyawa Calkon (*E*)-1-(naftalen-1-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on (C)

Uji aktivitas toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Meyer *et al* (1982) yang diujikan pada larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Metode ini dipilih karena memiliki beberapa keuntungan, seperti pelaksanaannya sederhana, waktu relatif cepat, tidak memerlukan peralatan khusus, menggunakan sedikit sampel, serta tidak memerlukan serum hewan seperti pada metode sitotoksik lainnya (Indiastuti dkk, 2008).

Senyawa analog calkon (C) diuji pada berbagai konsentrasi dalam waktu 24 jam pengujian. Perbedaan konsentrasi ini dimaksudkan untuk mengetahui tingkat aktivitas masing-masing senyawa terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach. Pembuatan larutan uji menggunakan pelarut

organik kloroform karena pelarut ini dapat melarutkan calkon C 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 terlebih dahulu ditambahkan DMSO (dimetil sulfoksida) untuk dapat membantu kelarutan senyawa uji dalam air laut sehingga senyawa dapat terdistribusi secara merata. DMSO dalam pengujian ini digunakan sebagai kontrol, sifatnya yang tidak terlalu toksik menjadi alasan dipilihnya DMSO untuk membantu kelarutan senyawa dalam air laut. Hasil Uji toksisitas terlihat pada table 1.

Tabel 1. Hasil uji toksisitas senyawa calkon (*E*)-1-(naftalen-1-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on

Nama senyawa	Struktur Senyawa	Nilai LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
C1		0,3256

Hasil uji toksisitas dari tiga senyawa analog calkon pada konsentrasi 1000, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ terhadap larva *Artemia salina* Leach yang dianalisis dengan metode analisis probit menunjukkan efek positif terhadap kematian larva. Senyawa C1 pada konsentrasi 1000, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan efek kematian larva *Artemia salina* Leach diatas 65 %. Hal ini, senyawa C1 dapat dikatakan memiliki tingkat toksik yang sedang pada konsentrasi 1000, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$, dengan tingkat potensi toksisitas dengan nilai LC₅₀ = 0,3256 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil uji sitotoksik dengan metoda MTT (*Microculture Tetrazolium Assay*) menggunakan sel Kanker Murine Leukimia P-388 terlihat dari gambar 2 dibawah ini.

Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam
Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha 10, Bandung 40132

Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap
Sel Murine Leukemia P388
[ex HSRRB Lot Number : 113098 seed (JCRB0017)]

Tanggal penerimaan : _____

Tanggal pengerjaan : 13 Mei 2013

Nama sampel : 1Ma-C1

Nilai IC₅₀ : > 100 µg/ml

Analisis : Suzanty, et al.

Pengetola,
Dr. Lia D. Juliawaty

Gambar 1. Hasil uji Sitotoksik senyawa calkon calkon (*E*)-1-(naftalen-1-il)-3-(naftalen)prop-2-1-on

Aktivitas biologis suatu senyawa calkon selain dipengaruhi adanya gugus α,β -tak jenuh juga dipengaruhi oleh substituen pada cincin aromatik. Pada senyawa calkon (C1) tidak mempunyai gugus substituent yang bisa mendorong pergerakan elektronnya. Selain pengaruh dari gugus substituen, tingkat toksisitas juga dipengaruhi adanya halangan sterik. Halangan sterik pada senyawa calkon (C) lebih besar karena besarnya gugus dari senyawa calkon C tersebut.

Berdasarkan data dari uji toksisitas dan sitotoksik senyawa calkon C menunjukkan hasil bioaktivitas yang sedang.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa calkon C1 memiliki aktivitas toksisitas yang sedang dengan nilai LC₅₀ sebesar 0,329 µg/mL dan nilai LD₅₀ >100 µg/mL

Untuk penelitian ke depan terhadap senyawa calkon dan turunannya sebaiknya

menggunakan senyawa awal yang digunakan bahan dasar mempunyai gugus substituen yang bisa mendorong elektron, sehingga senyawa hasil sintesis yang dihasilkan diharapkan akan mempunyai aktivitas biologis yang baik.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Achanta, G.; Modzelewska, A.; Feng, L.; Khan, SR. and Huang, P. (2006). "Boronic-Chalcone Derivative Exhibits Potent Anticancer Activity through Inhibition of the Proteasome". *Molecular Pharmacol*, 70, 426-433
- Choi, D.H and Cha, Y.K. (2002 a). "Optical anisotropy of polyimide and polymethacrylate containing photocrosslinkable chalcone group in the side chain under irradiation of a linearly polarized UV light". *Bull. Korean Chem. Soc*, 23, 469-476
- Choi, D.H and Cha, Y.K. (2002 b). "Photo-alignment of low-molecular mass nematic liquid crystal on photochemically bifungsional chalcone-epoxy film by irradiation of a linearly polarized UV light". *Bull. Korean Chem. Soc*, 23, 587-592.
- Dey, P.M., and Harborne, J.B. (1991). *Method in Plant Biochemistry*, Vol. 6, Academic Press, San Diego, 2-55.
- Hayashi, A.; Gillen, A.; C. Loot, J.R (2000). "Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in balb-c mice. *Alternative Medicine Review*. 6, 546-552.
- Harefa, F., 1997, *Pembudidayaan Artemia Salina untuk Pakan Udang dan Ikan*, Penerbit wadaya, Jakarta.
- Jawet, M. and Adelberg. (1995). *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi XX,

- Terjemahan Edi Nugroho dan Maulany, R.F EGC, Jakarta, 608-614.
- Lee, Y.S.; Lim, S.S.; Shin, K.H.; Kim, Y.S.; Ohuchi, K. and Jung, S.H. (2006). "Anti-angiogenic and Anti-tumor Activities of 2'-Hydroxy-4-methoxychalcone". *Biol. Pharm. Bull.* 29. 1028-1031
- Kim, Y.H.; Kim, J.; Park, H. and Kim, H.P. (2007). "Anti-inflammatory Activity of the Synthetic Chalcone Derivatives: Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase-Catalyzed Nitric Oxide Production from Lipopolysaccharide-Treated RAW 264.7 Cells". *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1450—1455
- Krishnaraju, A.V, Tayi V.N Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, H.S Tsay, G.V. Subbaraju, 2005, "Assesment of Bioactivity of Indian Medicinal Plant Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay", *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3(2), 125- 134.
- Kobkeatthawin, T., Chantrapromma, S., Saewanb, N., dan Func H.K., 2011. (E)-1-(4-Aminophenyl)-3-(naphthalen-2-yl)prop-2-en-1-one. *J. Acta Cryst.* 67, 1204–1205
- Palleros, D.R. (2004). "Solvent free synthesis of chalcones". *J. Chem. Ed.* 81, 1345-1347.
- Prasad, Y.R.; Kumar, P.R.; Deepti, C.A.; Ramana, M.V. (2006). "Synthesis and antimicrobial activity of some novel chalcones of 2-hydroxy-1-acetonaphthone and 3-acetyl coumarin". *E-Journal of Chemistry*, 3, 236-241.
- Tsukiyama, R.I.; Katsura, H.; Tokuriki, N.; Kobayashi, M. (2002). "Antibacterial Activity of Licochalcone A against Spore-Forming Bacteria". *J. American Society for Microbiology.* 45. 1226-1230
- Yun, J.; Kweon, M.; Kwon, H.; Hwang, J. and Mukhtar, H. (2006). "Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145". *Carcinogenesis.* 27, 1454–1464.
- Zamri, A., Eryanti, Y., Jasril. 2007. "Sintesis dan aktivitas antimikroba 3 analog calkon.