

Sintesis dan Uji Sitotoksik 3,3'-Bis(5,6-Dimetoksiindol-3-il)-5-Klorooksindola terhadap Sel Kanker Serviks Hela

Nurul Huda Ja'far^{1*},Mardi Santoso²

Program Magister Kimia,FMIPA,ITS Surabaya,Indonesia^{1*}

jabir12@yahoo.com

Dosen Kimia,FMIPA,ITS Surabaya,Indonesia²

Abstrak

Kanker leher rahim (serviks) merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di negara berkembang. 3,3'-Bis(indol-3-il)ooksindola diketahui memiliki bioaktivitas sitotoksik pada sel kanker HCT15 dari *Colorectal adenocarcinoma* dan sel MES-SA dari *Uterine sarcoma*. Penelitian yang akan dilaksanakan bermaksud mensintesis 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola dari 3,4-dimetoksibenzaldehida melalui empat tahap. Tahap pertama adalah transformasi 3,4-dimetoksibenzaldehida menjadi 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena yang pada tahap kedua dinitrasi untuk menghasilkan 3,4-dimetoksi-2, β -dinitrostirena. Reduksi siklisasi pada tahap ketiga untuk menghasilkan 5,6-dimetoksiindola, dan pada tahap keempat reaksi 5,6-dimetoksiindola dengan 5-kloroisatin dikaji untuk menghasilkan 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola. Transformasi 3,4-dimetoksi-benzaldehida menjadi 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena dilakukan melalui reaksi Henry dengan rendemen 82%, dan nitrasi pada 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena menghasilkan 3,4-dimetoksi-2, β -dinitrostirena dengan rendemen 92%. Reduksi siklisasi 3,4-dimetoksi-2, β -dinitrostirena menghasilkan 5,6-dimetoksiindola dengan rendemen 14%, dan reaksi 5,6-dimetoksiindola dengan 5-kloroisatin menggunakan katalis asam menghasilkan 3,3'-bis(5,6-dimetoksi-3-il)-5-klorooksindola dengan rendemen 36%. Uji sitotoksik 3,3'-Bis(5,6-dimetoksi-3-il)-5-klorooksindola secara *in vitro* menunjukkan sitotoksitas pada sel kanker serviks Hela dengan IC₅₀ sebesar 112 μ M.

Katakunci: sitotoksik, 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola, sintesis

1. Pendahuluan

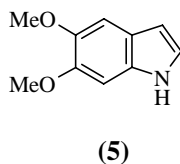
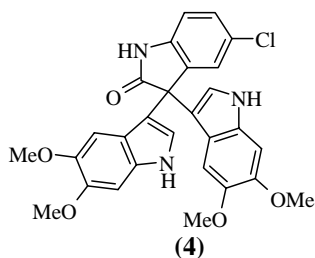
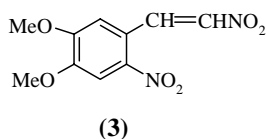
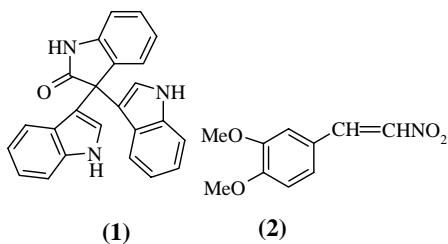
Survei kesehatan nasional tahun 2001 dan sistem informasi rumah sakit tahun 2006 menunjukkan bahwa kanker merupakan penyebab kematian kelima di Indonesia (Kresnawan, 2009). Kanker leher rahim (serviks) merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di negara berkembang. Data *Globocan* (2002) mencatat terdapat 40.000 kasus baru kanker serviks dengan angka kematian sekitar 22.000 pada perempuan di Asia Tenggara. Indonesia menempati peringkat pertama dengan 15.050 kasus baru, dan angka kematian 7.566 jiwa dalam setahun (Setiawan, 2010). Berbagai senyawa telah dikembangkan melawan kanker, akan tetapi tak satupun dari jenis senyawa-senyawa tersebut yang memuaskan dengan tanpa disertai efek samping yang merugikan (Astuti *et al.*, 2005).

3,3'-Bis(indol-3-il)ooksindola (**1**) secara *in vitro* sangat efektif menghambat pertumbuhan sel kanker pada sel HCT15 dari *Colorectal adenocarcinoma* dan sel MES-SA dari *Uterine sarcoma* (Yoo *et al.*, 2008). 3,3'-Bis(indol-3-il)ooksindola (**1**) telah disintesis dari oksindola dan indola dalam dua tahap oleh Kobayashi dan kawan-kawan (1994) dengan rendemen 47%, selanjutnya dapat disintesis dalam satu tahap dari reaksi indola dengan isatin dalam asam asetat glasial dengan rendemen 93% (Dwiningsih, 2006) dan reaksi dalam metanol

dengan katalis boron trifluorida menghasilkan rendemen 97% (Febriana, 2006).

Indola telah disintesis dari 3,4-dibenziloksibenzaldehida dalam tiga tahap dengan rendemen 58%. Tahap pertama merupakan reaksi Henry 3,4-dibenziloksibenzaldehida dengan nitrometana dalam asam asetat menghasilkan 3,4-dibenziloksi- β -nitrostirena. Nitrasi 3,4-dibenziloksi- β -nitrostirena dalam asam asetat glasial pada tahap kedua dihasilkan 4,5-dibenziloksi-2, β -dinitrostirena. Tahap ketiga adalah reduksi siklisasi 4,5-dibenziloksi-2, β -dinitrostirena menggunakan serbuk besi dalam asam asetat dihasilkan 5,6-dibenziloksiindola (Mee *et al.*, 2004). 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**3**) telah disintesis dari 3,4-dimetoksibenzaldehida dalam dua tahap. Tahap pertama merupakan reaksi Henry 3,4-dimetoksibenzaldehida dengan nitrometana dalam asam asetat menghasilkan 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena (**2**) dengan rendemen 66% dilanjutkan nitrasi 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena (**2**) dalam asam asetat glasial pada tahap kedua menghasilkan 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**3**) dengan rendemen 63% (Supurnama, 2010). Transformasi lebih lanjut 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**3**) Sangat dimungkinkan diperoleh senyawa-senyawa baru dengan bioaktivitas bervariasi. Transformasi 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**3**) menjadi turunan trisindolina berupa 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-

il)-5-klorooksindola berpotensi diperoleh anti kanker baru. Makalah ini bermaksud melaporkan sintesis dan uji sitotoksik 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (4) terhadap sel kanker serviks HeLa.



2. Metode Penelitian

2.1 Sintesis 3, 4-Dimetoksi-β-nitrostirena (2)

Larutan 3,4-dimetoksi-benzaldehida (16) (2,50 gram; 0,015 mol), nitrometana (4,9 mL; 0,090 mol), ammonium asetat (1,95 gram; 0,025 mol) dalam asam asetat (20 mL; 0,350 mol) direfluks pada suhu 100°C selama 120 menit. Hasil reaksi didinginkan sehingga mencapai suhu kamar, dan ditambahkan air dingin. Endapan yang terbentuk disaring, dicuci dengan air, dan dilarutkan dalam diklorometana (90 mL). Larutan selanjutnya dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, diuapkan dengan *rotary evaporator*, dan residu yang diperoleh dimurnikan dengan rekristalisasi menggunakan etanol. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer NMR.

2.2 Sintesis 4, 5-Dimetoksi-2, β-dinitrostirena (3)

Asam nitrat (2,9 mL; 0,045 mol) ditambahkan tetes demi tetes pada larutan 3,4-dimetoksi-β-nitrostirena (15) (2,09 gram; 0,010 mol) dalam asam asetat glasial (38,5 ml; 0,673 mol) pada

suhu 40°C. Campuran kemudian diaduk pada suhu kamar selama 240 menit, campuran ditambah air dingin. Endapan yang terbentuk disaring, dicuci dengan air, dan dilarutkan dalam diklorometana (90 mL). Larutan yang diperoleh dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, diuapkan dengan *rotary evaporator*, dan residu yang diperoleh dimurnikan dengan rekristalisasi menggunakan etanol. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer NMR.

2.3 Sintesis 5,6-Dimetoksiindola (5)

Campuran serbuk besi (4,00 gram; 0,071 mol) dan 4,5-dimetoksi-2,β-dinitrostirena (14) (1,05 gram; 0,004 mol) dalam asam asetat glasial, direfluks pada temperatur 120 °C selama 60 menit. Campuran kemudian didinginkan sehingga mencapai suhu kamar, disaring, dan residu dicuci dengan sedikit etanol. Filtrat selanjutnya dibasakan dengan larutan natrium hidroksida, disaring, dan diekstrak dengan diklorometana (5x20 mL). Ekstrak yang diperoleh dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Residu yang dihasilkan dimurnikan dengan kromatografi kolom vakum menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (2:1) dan dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis preparatif menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (2:1). Hasil sintesis yang telah murni, ditimbang, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer massa dan NMR.

2.4 Sintesis 3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (4)

Larutan 5,6-dimetoksiindola (12) (0,12 gram; 0,68 mmol) dan 5-kloroisatin (13) (0,061 gram; 0,34 mmol) dalam metanol ditambahkan katalis asam sulfat pekat. Larutan selanjutnya diaduk pada suhu kamar selama 150 menit. Hasil Reaksi selanjutnya ditambah air dingin, dan endapan yang terbentuk disaring, dicuci dengan air dingin, dan dilarutkan dalam diklorometana (90 mL). Larutan yang diperoleh dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, diuapkan dengan *rotary evaporator*, dan residu yang diperoleh dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Hasil sintesis yang telah murni ditimbang, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer NMR dan massa.

2.5 Uji Sitotoksisitas 3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (4) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

Uji sitotoksik 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (11) terhadap sel kanker dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker dengan metode MTT. Senyawa uji dilarutkan dalam dimetil sulfoksida dan diencerkan dengan *Dulbecco's Modified Eagle Media* sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM dan 200 μM. Sel kanker serviks HeLa didistribusikan ke dalam 96 well plate dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Larutan senyawa uji dalam berbagai seri konsentrasi selanjutnya

ditambahkan ke sel kanker serviks HeLa dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, tiap sumuran ditambah 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (**29**) dalam *phosphate buffer saline*. Inkubasi dilanjutkan selama 6 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan (**30**). Sel yang hidup akan mengkonversikan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (**29**) menjadi formazan (**30**) yang berwarna biru tua. Reaksi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (**29**) dihentikan dengan reagen natrium dodesil sulfat, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan dalam prosentase kehidupan (viabilitas sel) dan dibuat kurva antara viabilitas sel (%) terhadap konsentrasi serta viabilitas sel (%) terhadap log konsentrasi.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Sintesis 3,4-Dimetoksi-β-nitrostirena (2)

Sintesis 3,4-dimetoksi-β-nitrostirena (**2**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 3,4-dibenziloksi-β-nitrostirena dari 3,4-dibenziloksi-benzaldehida yang dilaporkan Mee *et al.* (2004). Larutan 3,4-dimetoksi-benzaldehida 2,50 gram (0,015 mol), nitrometana 4,9 mL (0,090 mol), amonium asetat 1,95 gram (0,025 mol) dalam asam asetat 20 mL (0,350 mol) menghasilkan padatan kuning (2,58 gram; 82%), titik leleh 137-139 °C. Spektrum ¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,93 dan 3,94 (s, 6H), 6,86-7,26 (m, 3H), 7,51 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), dan 7,97 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H).

3.2. Sintesis 4,5-Dimetoksi-2,β-dinitrostirena (3)

Sintesis 3,4-dimetoksi-2,β-dinitrostirena (**3**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 3,4-dibenziloksi-2,β-dinitrostirena dari 3,4-dibenziloksi-β-nitrostirena yang dilaporkan Mee *et al.* (2004). Asam nitrat 2,9 mL (0,045 mol) ditambahkan tetes demi tetes pada larutan 3,4-dimetoksi-β-nitrostirena (**2**) 2,09 gram (0,010 mol) dalam asam asetat glasial 38,5 ml (0,673 mol) sehingga menghasilkan padatan kuning kecoklatan (2,35 gram; 92 %), titik leleh 164-166°C. Spektrum ¹H-NMR (CDCl₃): δ 4,01 dan 4,03 (s, 6H); 6,91 dan 7,74 (s, 2H); 7,41 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H); 8,61 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H).

3.3. Sintesis 5,6-Dimetoksiindola (5)

Sintesis 5,6-dimetoksiindola (**5**) dilakukan dengan mengadaptasi prosedur sintesis 5,6-dibenziloksiindola dari 4,5-dibenziloksi-2,β-dinitrostirena yang dilaporkan Mee *et al.* (2004). serbuk besi 4,00 gram (0,071 mol) direaksikan dengan 4,5-dimetoksi-2,β-dinitrostirena (**3**) 1,05 gram (0,004 mol) dalam asam asetat glasial 50,0 mL (0,88 mol) menghasilkan padatan putih (0,100 gram; 14%), titik leleh 132-134 °C. Spektrum ¹H-NMR (CDCl₃): δ 3,88 dan 3,91 (s, 6H); 6,41-7,09 (m, 4H); 8,05 (s, 1H). Spektrum

Massa (EI): *m/e* 177 (M+1, 92%), 162 (M, 44), 134 (24), 119 (30), 104 (12), 91 (10).

3.4 Sitotoksisitas 3,3'-Bis(5,6-dimetoksi-indol-3-il)-5-klorooksindola (4)

Reaksi 5,6-dimetoksiindola (**12**) (0,12 gram; 0,68 mmol) dan 5-kloroisatin (**13**) (0,061 gram; 0,34 mmol) dalam metanol dengan katalis satu tetes asam sulfat pekat diperoleh 3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**11**). Berupa padatan coklat (61,9 miligram; 36%), titik leleh 193-195 °C. Spektrum ¹H-NMR (DMSO): δ 3,48 dan 3,74 (s, 12H); 3,48 dan 3,74 (s, 2H); 10,74 (s, 1H); 6,65 dan 6,90 (s, 4H); 6,75 (d, 2H); 7,02 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,30 (dd, *J* = 8,1 Hz, 1H); 7,13 (d, 1H). spektrum ¹³C-NMR (DMSO): δ 52,82 (C3); 55,64 dan 55,94 (C_{CH₃O}); 178,49 (CO); 95,24; 103,53; 110,93; 113,18; 118,36; 122,79; 124,71; 125,38; 127,73; 131,49; 136,70; 140,41; 143,63; dan 146,46 (14C Ar). Spektrum DEPT : δ 55,65 dan 55,94 (2C_{CH₃O}); 95,24; 103,51; 110,95; 122,81; 124,73; dan 127,77 (6C_{Ar}). Spektrum Massa (HR-MS) : *m/z* 518,1473 ([M+H]⁺), 341,0689 (M).

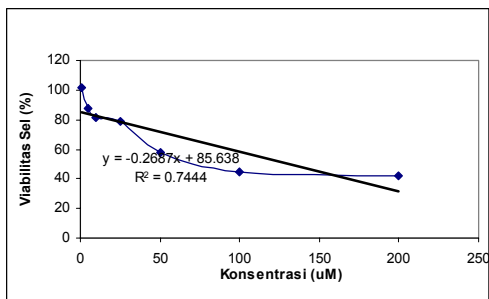
3.5 Uji Sitotoksisitas 3,3'-Bis(5,6-dimetoksi-indol-3-il)-5-klorooksindola (4) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

Uji sitotoksik 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**4**) dilakukan pada sel HeLa yaitu sel epitel kanker leher rahim dengan metode kolorimetrik yang berdasarkan pada kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria untuk mengkonversi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida. Hasil serapan (absorbansi) dari larutan yang di uji dikonversi dalam bentuk kurva antara persen kehidupan sel (viabilitas sel) dengan logaritma konsentrasi sehingga didapatkan nilai *inhibitory concentration 50* (IC₅₀).

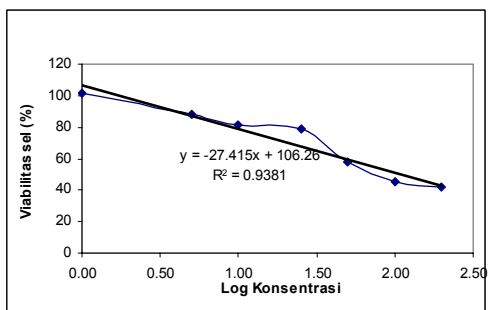
Hasil pengamatan pada perlakuan sampel terhadap morfologi sel HeLa setelah diinkubasi selama 24 jam menggunakan *inverted microscope* dengan perbesaran 400x tampak bahwa pada konsentrasi sampel 1 μM sampai 25 μM sel tidak mengalami perubahan morfologi, perubahan mulai nampak pada konsentrasi 50 μM yang ditandai adanya sel berbentuk bulat.

Pengamatan menggunakan kolorimeter didapatkan absorbansi formazan. Kurva konsentrasi terhadap viabilitas sel senyawa uji seperti dalam Gambar 1.1 menginformasikan bahwa semakin besar konsentrasi senyawa uji mengakibatkan persen pertumbuhan sel HeLa menurun. Demikian pula dengan kurva antara log konsentrasi terhadap viabilitas sel menunjukkan kurva semakin menurun seiring dengan meningkatnya nilai log konsentrasi sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 1.2. Hasil regresi linear dari kurva tersebut (Gambar 1.3) didapatkan persamaan $y = -27,415x + 106,26$. Dari persamaan ini diperoleh nilai IC₅₀ senyawa 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**4**) sebesar 112 μM.

Dengan demikian turunan trisindolina (**1**) berupa 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**4**) sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan IC_{50} sebesar 112 μ M.



Gambar 4.25. Kurva Viabilitas sel HeLa versus konsentrasi (μ M) pada perlakuan dengan larutan 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**4**)



Gambar 4.26. Kurva Viabilitas sel HeLa versus log konsentrasi pada perlakuan dengan larutan 3,3'-bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**4**)

4. Kesimpulan

3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**11**) telah berhasil disintesis dari 3,4-dimetoksibenzaldehida (**16**) dalam empat tahap reaksi. Reaksi Henry 3,4-dimetoksibenzaldehida (**16**) pada tahap pertama diperoleh 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena (**15**) dengan rendemen 82%. Nitrasasi 3,4-dimetoksi- β -nitrostirena (**15**) pada tahap kedua diperoleh 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**14**) dengan rendemen 92%.

Reduksi siklisasi 4,5-dimetoksi-2, β -dinitrostirena (**14**) pada tahap ketiga diperoleh 5,6-dimetoksiindola (**12**) dengan rendemen 14%. Reaksi substitusi elektrofilik 5,6-dimetoksiindola (**12**) dengan 5-kloroisatin (**13**) diperoleh 3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**11**) dengan rendemen 36%. 3,3'-Bis(5,6-dimetoksiindol-3-il)-5-klorooksindola (**11**) sitotoksik pada sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 112 μ M.

5. Penghargaan

Ucapan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu jalannya penelitian dan penulisan sehingga makalah ini dapat terselesaikan, terkhusus buat Bapak prof. Mardi Santoso, Ph.D yang telah meluangkan waktunya dan dengan sabar membimbing penelitian ini.

6. Pustaka

- Astuti, P., Alam, G., Hartati, M.S., Sari, D., Wahyuono, S. (2005), "Uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid dari Spons *Petrisia sp.* Potensial Pengembangan Sebagai Antikanker", *Majalah Farmasi Indonesia.*, vol. 16, hal 58-62.
- Dwiningsih, R. (2006), *Strategi Baru Sintesis Trisindolina dan Turunannya*, Skripsi, Jurusan Kimia ITS, Surabaya.
- Febriana, A. (2006), *Sintesis Trisindolina dan Turunannya*, Skripsi, Jurusan Kimia ITS, Surabaya.
- Kresnawan, T (2009), "Mengatur Makanan untuk Pencegahan dan Terapi Kanker Payudara", Instalasi Gizi RSCM, Jakarta.
- Setiawan, A. (2010), *Kanker Serviks penyebab utama kematian*, Seminar Fight for Cervical Cancer, Kompas, Jakarta, 7 Mei.
- Yoo, M., Choi, S., Choi, K.Y., Yon, G.H., Chae, J.C., Kim, D., Zylstra, G.J., Kim, E. (2008), "Trisindoline Synthesis and Anticancer Activity", *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, vol 376., hal. 96-99.