

SYNTHESIZE AND CITOTOXICITY TEST OF SEVERAL COMPOUNDS OF MONO PARA-HIDROXY CHALCON

Sintesis dan Uji Sitotoksitas Beberapa Senyawa Mono Para-Hidroksi Kalkon

Indyah Sulisty Arty

Chemistry Education Department, FMIPA, Yogyakarta State University, Karangmalang Depok, Yogyakarta 55283. Indonesia

Received May 25, 2009; Accepted January 4, 2010

ABSTRACT

Five compounds of mono para-hydroxy chalcon were synthesized (TC1, TC2, TC3, TC4, and TC5) and tested their cytotoxicity against HeLa cell and Raji cell. The difference in substituent of TC1 ($R_4 = H$), TC2 ($R_4 = OCH_3$), and TC3 ($R_4 = F$), showed the difference of their citotoxicity against HeLa cell. The citotoxicity of TC1 ($LC_{50} = 16.08 \mu\text{g/mL}$) \approx TC3 ($LC_{50} = 13.37 \mu\text{g/mL}$), but the substituent difference of TC2 ($LC_{50} = 147.43 \mu\text{g/mL}$), decreasing it citotoxicity 10 times. Like wise their citotoxicity against Raji cell of TC1 ($LC_{50} = 36.44 \mu\text{g/mL}$) \approx TC3 ($LC_{50} = 30.46 \mu\text{g/mL}$), but the substituent difference of TC2 ($LC_{50} = 468.94 \mu\text{g/mL}$), decreasing it citotoxicity activity 15 times. Nevertheless the strength of citotoxicity TC4 ($LC_{50} = 98.74 \mu\text{g/mL}$) and TC5 ($LC_{50} = 110.97 \mu\text{g/mL}$) against Raji cell are stronger than the citotoxicity of two of them against HeLa cell (LC_{50} of TC4 = none, LC_{50} of TC5 = $576.53 \mu\text{g/mL}$).

Keywords: mono para-hydroxy chalcon, HeLa cell, Raji cell, citotoxicity activity

PENDAHULUAN

Saat ini banyak obat-obatan yang dikembangkan berdasarkan efek antioksidannya. Efek antioksidan tersebut dapat menghambat proses oksidatif yang menyebabkan inflamasi. Aktivitas antioksidan sebagai sistem pertahanan yang rumit akan menghambat pembentukan radikal di dalam membran sel. Pada kasus inflamasi, produksi radikal melimpah pada sistem pertahanan yang menghasilkan spesies oksigen reaktif yang memainkan peranan pada proses inflamasi. Menurut Batt [1], sejumlah besar senyawa fenolik alami memiliki struktur yang bervariasi seperti flavonoid yang menunjukkan beberapa sifat biologi termasuk efek anti inflamasi.

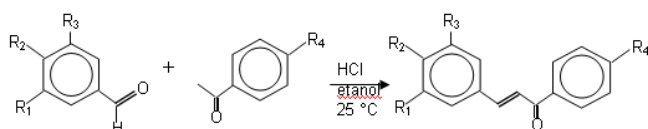
Selain itu senyawa kalkon telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologi antara lain sebagai antibakteri [2], antiviral [3], antimutagenik [4] dan antiinflamasi [5-6], beraksi sebagai bloker siklus sel [7-9], antiangiogenik [10], antitumor [10-13] sebagai penghambat tumor nekrosis faktor α [14]. Selain itu senyawa derivat kalkon memiliki aktivitas penghambatan lipidperoksidasi non enzimatis dan aktivitas penghambatan siklooksigenase [15-16]. Beberapa

senyawa tersebut memiliki satu gugus hidroksi pada posisi para, dapat disintesis dengan cara kondensasi aldol silang dalam suasana asam [16] sesuai dengan metode yang digunakan oleh Lazer [17]. Reaksi kondensasi aldol melibatkan penggabungan dua molekul yang memiliki gugus karbonil, salah satu molekul harus memiliki H alpha [18-19]. Sogawa dkk [20] mensintesis 3,4-dihidroksi kalkon dari asetofenon dan 3,4-dihidroksibenzaldehida menggunakan metode Claisen-Schmidt pada kondisi basa dengan hasil di bawah 10%. Namun demikian ketika 3-4-dihidroksibenzaldehida sebagai bis-(tetrahidro-piranil)eter dikondensasikan dengan asetofenon hasilnya meningkat sekitar 45%. Pada penelitian ini disintesis 5 senyawa mono para-hidroksi kalkon dari turunan benzaldehida dan turunan asetofenon (Tabel 1). Dengan TLC, masing-masing produk menghasilkan satu noktah dan struktur dikonfirmasi dengan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* dan *Mass Spectrometry*. Selanjutnya dilakukan uji sitotoksitas terhadap sel HeLa dan sel Raji [21-24] pada lima senyawa tersebut.

METODE PENELITIAN

Bahan

Senyawa-senyawa merek E Merck atau Sigma yang ada dalam perdagangan yaitu : asetofenon dan derivatnya, 4-metoksiasetofenon, 4-fluoroasetofenon,



Gambar 1. Sintesis senyawa mono para-hidroksikalkon

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-8170400223

4-kloroasetofenon, derivat benzaldehida yaitu 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida, dan 4-hidroksi-3,5-ditersierbutil benzaldehida. Natrium klorida p.a., asam sulfat pekat p.a., gas nitrogen, etanol kering, etanol absolut p.a., metanol, diklorometana, dan pelarut yang lain, tetrametil silan.

Cell line cancer (HeLa dan Raji), Medium Rosewell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 (GIBCO BRL), medium penumbuh mengandung growth factor 10% dan 20% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (*Sigma Chem Co. St Louis, USA*), DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) (Invitrogen), etidium bromid, RNA-se, DMSO (Dimetil sulfoksida), natrium karbonat (E. Merck), kertas saring 0,2 um, air suling, fungison, dan antibiotik penisilin dan streptomisin (*Sigma Chem. CO. St. Louis. USA*), hepes dan tripsin (*Sigma Chem. CO. St. Louis USA*). PBS (*Phosphat Buffer Saline*), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida), SDS (*sodium duodecyl sulphate*) 10% dalam HCl 0,01 N.

Alat

Satu set alat gelas di dalam lemari asam, mikroskop Mettler FP 52. Pelat TLC, Spektrometer ¹H-NMR Bruker 200 MHz. Spektrometer massa Funnigan MAT 90 dengan ionisasi EI 70 eV.

Tangki nitrogen cair, mikroskop fluoresensi, mikroskop vase kontras, penangas air, *sentrifuge*, inkubator CO₂, inkubator, ELISA (*EnzymeLinked Immunosorbent Assay*) *reader*, *hemocytometer* (New Bauer), tabung *conical* steril, *scraper*, *tissue culture flask*, *ampul*, *plate*, *laminar airflow*, pH meter, *microplate* 96 sumuran, *micropipet*, *vortex*, timbangan elektrik, pipet *ependorf* dan tip.

Prosedur Kerja

Sintesis senyawa mono para-hidroksi kalkan

Turunan benzaldehida (26,6 mmol) dan asetofenon atau turunannya (30 mmol) dilarutkan dalam etanol yang dijenuhkan dengan HCl. Tetes demi tetes HCl dimasukkan dalam campuran reaksi bersamaan dengan itu gas N₂ juga dialirkan ke dalam campuran reaksi. Pengadukan dilakukan selama 6 jam dan setiap jam di cek dengan TLC. Pengadukan dihentikan ketika noktah produk reaksi telah nampak dominan. Kemudian campuran reaksi dituangkan ke dalam air es. Campuran reaksi diaduk sampai terbentuk kristal. Setelah dibiarkan selama 3 jam campuran reaksi disaring dan kristalnya direkristalisasi menggunakan pelarut yang cocok.

Titik leleh diamati menggunakan mikroskop Mettler FP 52. Fasa bergerak pada TLC menggunakan CH₂Cl₂. Spektra ¹H NMR direkam menggunakan spektrometer Bruker 200 MHz dengan tetrametilsilan sebagai standar internal.

Uji sitotoksitas

Tahapan uji sitotoksik terhadap *cell lines* sebagai berikut: (a). menumbuhkan *cell lines* dari penyimpanan dalam nitrogen cair. Sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 15 mL, dan ditambah 10 mL media pencuci lalu dikocok. Setelah itu disentrifus 750 g selama 7 menit. Pelet diambil ditambahkan dengan media kultur, kemudian sel dimasukkan dalam flask. Semua kegiatan tersebut dilakukan secara aseptis dalam *laminar airflow cabinet*. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aliran CO₂ 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika media mulai menguning diganti dengan media baru. (b) Uji sitotoksitas senyawa hasil sintesis dengan MTT *assay*. Jika sel sudah tumbuh memenuhi flask, media pada sel HeLa diambil, dicuci dengan PBS secukupnya. Selanjutnya sel dilepas dari dinding flask (*scapper*) menggunakan 0,5 mL tripsin 0,05%. Flask dikocok perlahan sampai sel terlepas semua. Suspensi sel diinkubasi 5 menit di inkubator CO₂ pada 37 °C. Selanjutnya suspensi sel tersebut dimasukkan dalam tabung *conical* 15 mL dan ditambahkan dengan media kultur sebanyak 5 mL. Jumlah sel dihitung dengan *hemocytometer*, disuspensikan dalam media kultur sampai diperoleh kepadatan sel 2 x 10⁴. Sel Raji tidak perlu *discapper* karena tidak menempel pada dinding flask tetapi melayang dalam media.

Uji sitotoksitas dilakukan dalam plate 96 sumuran. Masing-masing diisi 100 µL suspensi media kultur dengan kepadatan sel 2 x 10⁴ kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37 °C di inkubator CO₂. Sampel dilarutkan dalam media kultur yang mengandung DMSO 0,05%, kemudian pada setiap sumuran dimasukkan 100 µL sampel dengan berbagai konsentrasi menggunakan 3 kali ulangan. Sumuran yang tersisa digunakan untuk kontrol positif yang berisi sel tanpa penambahan sampel, dan kontrol negatif hanya mengandung media kultur. Selanjutnya diinkubasi 12-24 jam pada suhu 37 °C di inkubator CO₂. Untuk sel HeLa, media diambil, kemudian masing-masing sumuran ditambahkan 110 µL media kultur yang mengandung MTT. Kultur diinkubasi 4 jam pada suhu 37 °C di inkubator CO₂. Selanjutnya ditambahkan 100 µL pelarut formazan, di gojog perlahan dengan shaker selama 5 menit. Dilanjutkan diinkubasi 12-24 jam pada suhu kamar dalam ruang gelap. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Data

Untuk uji sitotoksitas dilakukan penghitungan jumlah sel yang hidup, dibandingkan kontrol dengan memperhatikan pengaruh variasi kadar sampel terhadap kematian sel. Analisis sitotoksitas

menggunakan analisis probit dan ditentukan nilai LC₅₀ dari masing-masing senyawa terhadap masing-masing sel. Nilai LC₅₀ merupakan nilai antilog pada saat nilai probit 50. Analisis probit diperoleh dari konversi prosentase kematian ke nilai probitnya, prosentase kematian dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ Kematian Sel} = \frac{\{(abs K - abs M) - (abs P - abs M)\}}{(abs K - abs M) \times 100\%}$$

abs K = absorbansi kontrol sel

abs M = absorbansi media

abs P = absorbansi sel dengan perlakuan.

Untuk perhitungan % kematian sel Raji, karena media tidak diambil maka absorbansi perlakuan dikurangi dengan absorbansi media dan perlakuan, sehingga perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Kematian Sel} = \frac{\{(abs K - abs M) - (abs P - abs M)\}}{(abs K - abs M) \times 100\%}$$

abs MP = absorbansi media ditambah dengan perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis beberapa senyawa mono para hidroksi kalkon

Hasil identifikasi senyawa hasil sintesis terdapat pada tabel 1.

Berdasarkan perbedaan modifikasi substituen R₁, R₂, R₃ pada cincin A dari senyawa mono para-hidroksi kalkon, maka lima senyawa tersebut dapat

dikelompokkan menjadi dua, yaitu senyawa kelompok satu (Gambar 2) dan senyawa kelompok dua (Gambar 3). Senyawa kelompok satu adalah senyawa target (ST)1, ST2, ST3 yaitu senyawa dengan R₁ = OCH₃, R₂ = OH, R₃ = H dan modifikasi substituen pada R₄ berturut-turut H, OCH₃, F.

Hasil analisis data identifikasi struktur menggunakan NMR dan MS adalah sebagai berikut :

ST1: 3-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1-fenil-2-propen-1-on

Spektra NMR CDCl₃, δ (ppm) 3,95 (s, 3H, -OCH₃), 5,90 (s, 1H, -OH), 7,35 (d, 1H, J = 13 Hz, = CH), 7,75 (d, 1H, J = 13 Hz, = CH), 7,1(s, 1H, Ar 2-H). 6,95 (d, H, Ar 5'-H), 7,2 (d, H, Ar 6'-H), 7,50 (m, 3H, Ar 3'', 4'', 5''-H), 8,00 (d, 2H, Ar 2'', 6''-H).

Spektra Massa (EI, m/z), 254 (M⁺, C₁₆H₁₄O₃⁺, 100%). Massa ion molekul sesungguhnya m/z = 254,0941, terhitung untuk C₁₆H₁₄O₃ 254,0943.

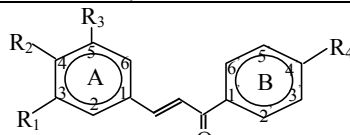
ST 2: 3-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1-(4''-metoksifenil)-2-propen-1-on

Spektra NMR CDCl₃, δ (ppm) 3,83 (s, 3H, -OCH₃), 3,93 (s, 3H, -OCH₃), 6,00 (s, 1H, -OH), 7,20 (d, 1H, J = 13 Hz, = CH_a), 7,35 (d, 1H, J = 13 Hz, = CH_b), 6,95 (d, 2H, Ar 3'', 5''-H), 8,00(d, 2H, Ar 2'', 6''-H), 7,1 (s, 1H, Ar 2'-H), 6,90 (d, 1H, Ar 5'-H), 7,2 (d, 1H, Ar 6'-H).

Spektra Massa (EI, m/z), 284 (M⁺, C₁₇H₁₆O₄⁺, 100%). Massa ion molekul sesungguhnya m/z = 284,1048, terhitung untuk C₁₇H₁₆O₄ : 284,1043.

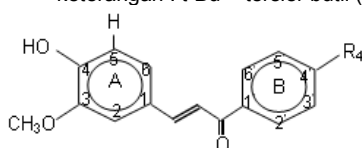
ST 3: 1-(4''-fluorofenil)-3-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-2-propen-1-on

Tabel1. Senyawa mono para-hidroksi kalkon hasil sintesis

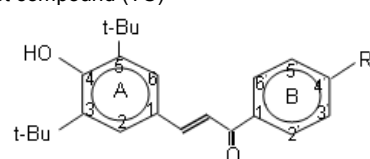


Senyawa Target (ST= TC) No	Warna	Rendemen (%)	Titik Lebur °C	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	kuning	37	85-90	CH ₃ O	OH	H	H
2	kuning	34	161-164	CH ₃ O	OH	H	CH ₃ O
3	kuning	36	94-97	CH ₃ O	OH	H	F
4	kuning	69	125-127	t-Bu	OH	t-Bu	F
5	kuning	30	123-124	t-Bu	OH	t-Bu	Cl

keterangan : t-Bu = tersier butil (CH₃)₃C; senyawa target (ST) = target compound (TC)



Gambar 2. Modifikasi substituen molekul senyawa kelompok satu (ST1, ST2, ST3)



Gambar 3. Modifikasi substituen molekul senyawa kelompok dua (ST4, ST5)

Spektra NMR CDCl₃, δ (ppm) 3,98 (s, 6H, 2-OCH₃), 5,95 (s, 1H, -OH), 7,25 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_a), 7,75 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_b), 7,35 (s, 1H, Ar 2'-H), 7,18 (d, 1H, Ar 6'-H), 6,95 (d, 1H, Ar 5'-H), 7,15 (m, 2H, Ar 3',5''-H), 8,00 (m, 2H, Ar 2'',6''-H)

Spektra Massa (EI, m/z), 272 (M⁺, C₁₆H₁₃O₃F⁺, 100%). Massa ion molekul sesungguhnya m/z = 272,0846, terhitung untuk C₁₆H₁₃O₃F : 272,0849.

Senyawa kelompok dua adalah ST4 dan ST5 dengan R₁ = R₃ = t-Bu (t-C₄H₉), R₂ = OH dan modifikasi substituen pada R₄ berturut-turut F, Cl. Hasil analisis data identifikasi struktur menggunakan NMR dan MS adalah sebagai berikut:

ST 4: 3-(3',5'-detersierbutil-4'-hidroksifenil)-1-(4''-fluorofenil)-2-propen - 1-on

Spektra NMR CDCl₃, δ (ppm) 1,5 (s, 18H, ters-C₄H₉), 5,65 (s, 1H, -OH), 7,30 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_a), 7,75 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_b), 7,47 (s, 2H, Ar 2',6''-H), 7,25 (d, 2H, Ar 3'',5''-H), 8,05 (d, 2H, Ar 2'',6''-H)

Spektra Massa (EI, m/z), 354 (M⁺, C₂₃H₂₇O₂F⁺, 79,3%). Massa ion molekul sesungguhnya m/z = 354,1988, terhitung untuk C₂₃H₂₇O₂F : 354,1995.

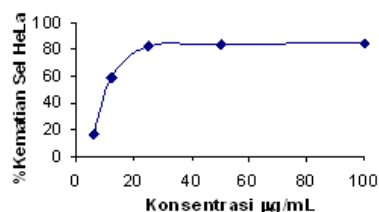
ST 5: 3-(3',5'-detersierbutil-4'-hidroksifenil)-1-(4''-klorofenil)-2-propen - 1-on

Spektra NMR CDCl₃, δ (ppm) 1,5 (s, 18H, ters-C₄H₉), 5,62 (s, 1H, -OH), 7,30 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_a), 7,78 (d, 1H, $J = 13$ Hz, = CH_b), 7,50 (s, 2H, Ar 2',6''-H), 7,48 (d, 2H, Ar 3'',5''-H), 7,98 (d, 2H, Ar 2'',6''-H).

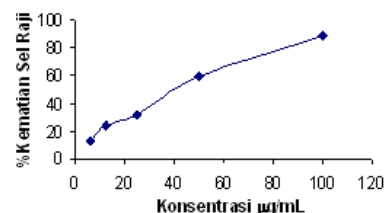
Spektra Massa (EI, m/z), 370 (M⁺, C₂₃H₂₇O₃Cl⁺, 85,37%). Massa ion molekul sesungguhnya m/z = 370,1699, terhitung untuk C₂₃H₂₇O₂Cl : 370,1700.

Uji sitotoksitas beberapa senyawa monoparahidroksi kalkan

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan senyawa ST1, ST2, ST3, ST4, dan ST5 pada sel kanker Raji dan HeLa. Pengamatan sitotoksitas dilakukan dengan metode uji MTT [3-(4,5-dimetil thiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida]. MTT diabsorpsi di dalam sel dan direduksi dengan reaksi tergantung pada mitokondria menjadi produk formazon yang dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 550 nm [21]. Dasar yang digunakan untuk menentukan nilai sitotoksitas adalah *lethal concentration* (LC₅₀). Nilai LC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan nilai kematian sel 50% hal ini menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap masing-masing sel. Nilai LC₅₀ ditentukan dengan analisis probit yang diperoleh dari konversi persenta kematian ke dalam nilai probit. Sedangkan nilai konsentrasi diubah ke dalam nilai log konsentrasi. Nilai LC₅₀ merupakan nilai anti log pada nilai probit 50. Pelarut yang digunakan pada uji sitotoksitas adalah DMSO. Penggunaan DMSO dilaporkan relatif tidak ber-



Gambar 4. Hubungan konsentrasi dengan % kematian sel HeLa pengaruh pemberian ST 3



Gambar 5. Hubungan konsentrasi dengan % kematian sel Raji pengaruh pemberian ST3

pengaruh terhadap pertumbuhan sel myeloma [24], sel Raji, dan sel HeLa [25]. Hasil uji sitotoksitas ke lima senyawa hasil sintesis tersebut di atas dapat ditunjukkan dengan grafik persen kematian sel versus konsentrasi senyawa uji. Secara umum profil grafik yang menunjukkan hubungan pengaruh konsentrasi senyawa uji dengan persen kematian sel HeLa ditunjukkan pada Gambar 4 sedangkan persen kematian terhadap sel Raji ditunjukkan pada Gambar 5.

Pengamatan kematian sel dapat dilihat dari morfologi sel akibat perlakuan senyawa. Sel yang mati akan kehilangan cairan sitoplasma karena rusaknya membran sel, sehingga pada pengamatan mikroskop akan menunjukkan warna hitam (gelap). Sebaliknya, pada sel hidup akan terlihat warna terang, karena adanya cairan sitoplasma yang bersifat meneruskan cahaya dari mikroskop. Pengamatan morfologi sel HeLa akibat pemberian ST1, ST2, ST3, ST4 dan ST5 disajikan pada Gambar 6.

Penjelasan morfologi sel HeLa pada Gambar 6 sebagai berikut: (a) Morfologi sel HeLa kontrol (Gambar 6A), bentuk sel seperti tikar melekat pada permukaan. Sel-selnya utuh berbentuk seperti bintang, jernih tampak inti di tengah-tengah sel. Morfologi sel HeLa dengan penambahan: (b) ST1 (Gambar 6B), ada degenerasi sel berupa titik-titik gelap di dalam plasma sel dan beberapa tipe sel melesut. Batas antar sel menjadi tidak jelas. Jadi ada degenerasi granular, (c) ST2 (Gambar 6C), ada degenerasi granular, beberapa sel melesut dan mengecil. Beberapa diantaranya mengelupas dari permukaan. Beberapa sel selatnya tertarik (retraksi) dan sel membulat. Batas-batas sel masih ada yang kelihatan jelas. (d) ST3 (Gambar 6D), ada degenerasi granular dan vakuolar (melemek) seperti rongga. Bentuk sel menjadi bermacam-macam karena ada retraksi atau pengerutan, ada yang

membulat, mengecil, melesut. Degenerasi yang melanjut menyebabkan sel melesut, membulat, pecah, mati dan lepas dari permukaan. (e) ST4 (Gambar 6E), tampak degenerasi granular tetapi batas antar sel masih jelas. Beberapa sel melesut dan membulat. (f) ST5 (Gambar 6F), tampak degenerasi granular, beberapa sel melesut dan membulat, sebagian besar sel masih utuh dengan batas-batas sel masih jelas.

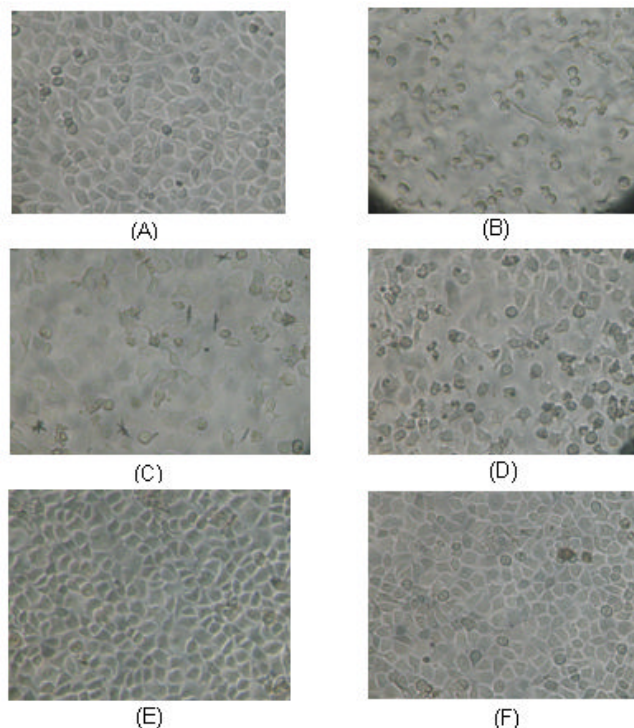
Dari data dalam Tabel 2 nampak bahwa LC_{50} kelompok 1 terhadap sel HeLa menunjukkan bahwa LC_{50} ST3 (13,37 $\mu\text{g/mL}$) < LC_{50} ST1 (16,08 $\mu\text{g/mL}$) < LC_{50} senyawa target 2 (147,43 $\mu\text{g/mL}$). Hal ini menunjukkan bahwa sitotoksitas terhadap sel HeLa ST3 > ST1 > ST2. Perbedaan substituen ST 3, ST1, ST2 terletak pada posisi para cincin B berturut-turut substituen F, H, OCH_3 dan perubahan substituen $R_4 = \text{H}$ (ST1) dengan $R_4 = \text{F}$ (ST3) tidak begitu memberikan perbedaan yang nyata, atau dapat dikatakan sitotoksitas ST1 \approx ST3. Namun demikian adanya substituen $R_4 = \text{OCH}_3$ (ST2) menurunkan sitotoksitas 10 x nya. Hal yang sama terjadi pada sitotoksitas terhadap sel Raji ST3 ($LC_{50} = 30,46 \mu\text{g/mL}$) > ST1 ($LC_{50} = 36,44 \mu\text{g/mL}$) > ST2 ($LC_{50} = 468,92 \mu\text{g/mL}$). Dapat dikatakan sitotoksitas ST1 \approx ST3, namun substituen $R_4 = \text{OCH}_3$ (ST2) menurunkan sitotoksitas sampai + 15 x nya.

Dari data dalam Tabel 2 nampak bahwa ST4 ($R_4 = \text{F}$) tidak sitotoksik terhadap sel HeLa namun ST5 ($R_4 = \text{Cl}$) sitotoksik. Sitotoksitas terhadap sel Raji ST4 ($LC_{50} = 98,74 \mu\text{g/mL}$) \approx ST5 (110,97 $\mu\text{g/mL}$).

Dari data dalam tabel 2 nampak bahwa ST4 ($R_4 = \text{F}$) tidak sitotoksik terhadap sel HeLa namun ST5 ($R_4 = \text{Cl}$) sitotoksik. Sitotoksitas terhadap sel Raji ST4 ($LC_{50} = 98,74 \mu\text{g/mL}$) \approx ST5 (110,97 $\mu\text{g/mL}$).

Secara umum sitotoksitas kelompok pertama yaitu ST1, ST2, dan ST3 terhadap sel HeLa lebih kuat 3 kalinya dibandingkan sitotoksitasnya terhadap sel Raji.

Sebaliknya pada senyawa kelompok kedua yaitu ST4 dan ST5 sitotoksitas terhadap sel Raji lebih kuat dari pada terhadap sel HeLa. Hal yang menarik adalah ST4 tidak sitotoksik terhadap sel HeLa tetapi sitotoksik terhadap sel Raji.



Gambar 6. Morfologi Sel Hela: (A) Tanpa Perlakuan, dan dengan Penambahan: (B) ST1, (C) ST2, (D) ST3, (E) ST4 dan (F) ST5, masing-masing sebesar 6,25 $\mu\text{g/mL}$

Tabel 2. Harga LC_{50} senyawa mono para-hidroksi kalkon terhadap sel HeLa dan sel Raji

Senyawa Target (ST=TC) No	R_1	R_2	R_3	R_4	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
					Sel HeLa	Sel Raji
1	CH_3O	OH	H	H	16,08	36,44
2	CH_3O	OH	H	CH_3O	147,43	468,92
3	CH_3O	OH	H	F	13,37	30,46
4	$t\text{-Bu}$	OH	$t\text{-Bu}$	F	-	98,74
5	$t\text{-Bu}$	OH	$t\text{-Bu}$	Cl	576,63	110,97

keterangan : $t\text{-Bu}$ = tersier butil (CH_3)₃C; senyawa target (ST) = target compound (TC)

KESIMPULAN

Senyawa mono para hidroksi kalkon, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, telah berhasil disintesis dan dimurnikan. Hasil uji sitotoksisitas senyawa tersebut terhadap sel Raji dan sel HeLa menunjukkan bahwa hanya ST4 yang tidak aktif terhadap sel HeLa. Sitotoksisitas ST3 ($LC_{50} = 13,37 \mu\text{g/mL}$) terhadap sel HeLa $>$ ST1 ($LC_{50} = 16,08 \mu\text{g/mL}$) $>$ ST 2 ($LC_{50} = 147,43 \mu\text{g/mL}$). Perbedaan substituen dan perubahan substituen $R_4 = \text{H}$ (ST1) dengan $R_4 = \text{F}$ (ST3) tidak begitu memberikan perbedaan yang nyata. atau dapat dikatakan sitotoksisitas ST1 ($LC_{50} = 16,08 \mu\text{g/mL}$) \approx ST3 ($LC_{50} = 13,37 \mu\text{g/mL}$). Namun demikian adanya substituen $R_4 = \text{OCH}_3$ pada senyawa target 2 ($LC_{50} = 147,43 \mu\text{g/mL}$) menurunkan sitotoksisitas ± 10 x nya. Sitotoksisitas ST3 ($LC_{50} = 30,46 \mu\text{g/mL}$) terhadap sel Raji $>$ ST1 ($LC_{50} = 36,44 \mu\text{g/mL}$) $>$ ST2 ($LC_{50} = 468,92 \mu\text{g/mL}$). Dapat dikatakan sitotoksisitas ST1 \approx ST3, namun substituen $R_4 = \text{OCH}_3$ pada ST2 ($LC_{50} = 468,92 \mu\text{g/mL}$), menurunkan sitotoksisitas terhadap sel Raji sampai ± 15 x nya. Sitotoksisitas ST4 ($LC_{50} = 98,74 \mu\text{g/mL}$) dan ST5 ($LC_{50} = 110,97 \mu\text{g/mL}$) terhadap sel Raji lebih kuat dibandingkan sitotoksisitas ST5 ($LC_{50} = 576,63 \mu\text{g/mL}$) dan ST4 yang tidak aktif terhadap sel HeLa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Rektor UNY dan Direktur Lembaga Penelitian UNY yang telah memberi dana penelitian, Dekan FMIPA UNY yang telah memberikan ijin penelitian ini untuk dilaksanakan serta kepada Dra. Retna Arianingrum, MSi yang dengan tulus ikhlas mengatur pelaksanaan penelitian ini di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Batt, D.G., 1992, *Prog. Med. Chem.*, 29, 1-63.
- Hogale, M.B., Dhore, M.P., Shelar, A.R., and Pawar, P.K., 1986, *Orient. J. Chem.*, 2, 55-57.
- Ninomiya, Y., Shimma, N., and Ishitsuka, H., 1990, *Antivir. Res.*, 13, 2, 61-74.
- Torigu, T., Arinawa, M., Itoh, S., Fujio, M., and Maruyama, H.B., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112, 833-842.
- Rao, M.N.A., Naidoo, L., and Ramanan, P.N., 1991, *Pharmazie*, 46, 7, 542-543.
- Shibata, S., Inoue, H., Iwata, S., Ma, R., Yu, L., Ueyama, H., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino H., and Iwashima, A., 1991, *Planta Med.*, 57, 221-224.
- Afzal, S, Asad, M.K, Rumana, Q.F, Ansari, Muhammad, F.N., and Syed, S.S., 2008, *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1424-1434.
- Boumendjel, A., Ronot, X., and Boutonnat, J., 2009, *Curr. Drug Targets*, 10, 4, 363-371.
- Shapiro, G.I., and Harper, J.W., 1999, *J. Clin. Investig.*, 104, 12, 1645-1653.
- Lee, Y.S., Lim, S.S., Shin, K.H., Kim, Y.S., Ohuchi, K., and Jung, S.H., 2006, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1028-1031.
- Sasayama, T., Tanaka, K., Mizukawa, K., Kawamura, A., Kondoh, T., Hosoda, K., and Kohmura, E., 2007, *J. Neu-Onc.*, 85, 123-132.
- Ye, C.L., Liu, J.W., Wei, D.Z., Lu, Y.H., and Qian, F., 2004, *Pharmacol. Res.*, 50, 505-510.
- Ye, C.L., Liu, J.W., Wei, D.Z., Lu, Y.H., and Qian, F., 2005, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 55, 447-452.
- Toshio, M, Wang, L-B., Nakamura, S., Ninomiya, K., Yokoyama, E., Matsuda, H., Muraoka, O., Wu, L-J., and Yoshikawa, M., 2009, *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 4, 361-367.
- Arty, I.S., Timmerman, H., Samhudi, M., Sastroamidjojo, Sugiyanto, and van der Goot, H., 2000, *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 449-457.
- Arty, I.S., 2007, *Proceeding of The International Symposium on the Recent Progress in Curcumin Research*, 1st ed., 197-204.
- Lazer, E.S., Wong, H.C., Wegner, C.D., Graham, A.G., and Farina P.R., 1990, *J. Med. Chem.*, 33, 1892-1898.
- Arty, I.S., and Handayani, S., 2007, *Proceeding of International Seminar*, ITB-UKM.
- Handayani, S., and Arty, I.S., 2008, *J. Phys. Sci.*, 19, 2, 61-68.
- Sogawa, S., Nihro, Y., Ueda, H., Izumi, A., Miki, T., Matsumoto, H., and Satosh, H., 1993, *J. Med. Chem.*, 36, 3904-3909.
- Castel, J.V., Jover, R., Gomes Lechon, M.J., Ponsoda, X., and Bort, R., 1997, *In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. In: In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, London, 375-410.
- Gibbs, J.B., 2000. *J. Clin. Investig.*, 105, 9-13.
- Boyer, M.J., and Tannock, I.F., 2005, *The Basic Science of Oncology; Cellular and Molecular Basis of Drug Treatment for Cancer* Mc Graw Hill Company, 4th ed., New York.
- Nurrochmad, A., 2001, *Thesis*, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta
- Muhammad Da'i, 2003, *Thesis*, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta.