

## Sintesis dan uji sitotoksitas senyawa LR-2 pada sel kanker payudara T47D

### Synthesis and cytotoxicity test of LR-2 on breast cancer cell line T47D

Ritmaleni\*), Dina Anitasari, Sinta susanti, Rumiayati dan Sismindari  
Fakultas Farmasi UGM

#### Abstrak

Senyawa LR-2 adalah senyawa analog dari monastrol (suatu obat kanker) yang berhasil disintesis menggunakan reaksi Biginelli dan merupakan satu dari seri senyawa LR yang berhasil disintesis di Fakultas Farmasi UGM. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mensintesis senyawa LR-2 dan mempelajari daya sitotoksik senyawa LR-2 terhadap sel kanker payudara T47D. Sintesis dilakukan dengan mereaksikan benzaldehid, 2-indanon dan tiourea secara bersamaan dalam satu wadah dengan dikatalis oleh HCl selama 6 jam. Senyawa LR-2 diuji sitotoksitasnya pada kultur sel kanker payudara T47D dan jumlah sel yang bertahan hidup ditetapkan dengan menggunakan metode kolorimetrik MTT dan harga LC<sub>50</sub> dicari menggunakan analisis probit secara manual dengan metode Miller dan Tainter. Hasil sintesis diisolasi dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif dan menghasilkan 54 % LR-2. Elusidasi struktur dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi UV-Vis, H-NMR, IR dan GC-MS. Senyawa tersebut mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan LC<sub>50</sub> 159 µM.

**Kata kunci** : LR-2, benzaldehid, indanon, tiourea, T47D

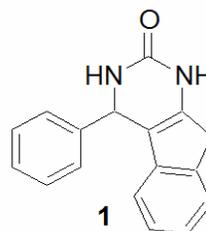
#### Abstract

LR-2 is a compound analog of monastrol, an anticancer agent, which has been succesfully synthesised through the application of Biginelli reaction and one of LR compound series that synthesised in Faculty of Farmacy, Universitas Gadjah Mada. This reserach was aimed to synthesied the LR-2 compound and to investigate the cytotoxicity of LR-2 on breast cancer cell line. The reaction was carried out by using the one pot reaction method. In this reaction benzaldehyde, 2-indanone and thiourea were reacted together for 6 hours in acid catalyst. The cytotoxicity test was carried by using breast cancer cell line the MTT assay method and the LC<sub>50</sub> was ditermined by using the probit analysis with Miller and Tainter method. The product was isolated by using preparative TLC in 54 % yield. The structure was elucidated by spectroscopy methods (UV-Vis, H-NMR, IR and GC-MS).The LC<sub>50</sub> is 159 µM.

**Keywords** : LR-2, benzaldehyde, 2-indanone, thiourea, T47D

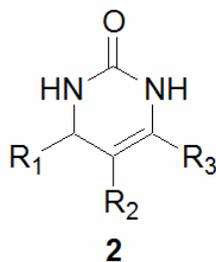
#### Pendahuluan

Senyawa LR-1 **1** telah berhasil disintesis oleh Ritmaleni dan Nurcahyani pada tahun 2006. LR adalah singkatan dari Leni Ritmaleni dan 1 adalah nomor urut dari deret senyawa LR yang disintesis di grup penelitian LR. Senyawa LR-1 **1** mempunyai kerangka utama 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-on **2**. (Ritmaleni dan Nurcahyani, 2006)



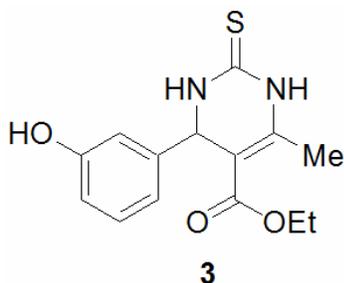
Gambar 1. Struktur LR-1 **1**.

Sintesis 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **2** dan turunannya yang mempunyai kerangka dihidropirimidin (DHPM) **2** tersebut dilakukan menggunakan metode reaksi Biginelli. Metode ini merupakan salah satu contoh reaksi multi komponen (MCRs) yang penting pada Kimia Organik dan Kimia Medisinal. Hal ini disebabkan karena beberapa alasan yaitu beragamnya produk yang dihasilkan dan laju reaksi yang lebih cepat dibandingkan sintesis dengan beberapa tahapan reaksi, sehingga merupakan metode yang lebih efisien dalam proses penemuan obat baru. (Kappe, 1993; Weber, 2002)



Gambar 2. Struktur 3,4-dihidropirimidin-2-(1*H*)-on (DHPM).

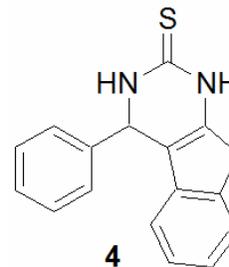
Bose *et al.*, (2005) mengembangkan metode yang lebih sederhana, efisien dan lebih murah dalam sintesis 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-on **2** dengan menggunakan benziltriethylamonium klorida sebagai katalis pada kondisi bebas pelarut. Metode ini dipakai sebagai protokol dalam sintesis monastrol **3** (Gambar 3), suatu inhibitor mitosis kinesin Eg5, yang mempunyai aktivitas biologis sebagai antikanker.



Gambar 3. Struktur Monastrol .

Senyawa LR-2 **4** adalah salah satu dari seri senyawa LR yang berhasil diisntesis di Fakultas Farmasi UGM. Seperti dijelaskan di

atas bahwa LR adalah singkatan dari Leni Ritmaleni dan angka 2 menyatakan urutan dari nomor seri senyawa LR. Nama kimia dari LR-2 **4** adalah 4-fenil-3,4-dihidro-indeno[2',1']pirimidin-2(1*H*)-tion.



Gambar 4. Struktur senyawa LR-2 **4**.

Di Indonesia, sepuluh dari seratus ribu wanita menderita kanker payudara dan merupakan penyakit kanker urutan kedua yang sering ditemukan setelah kanker leher rahim. (Sutjipto, 2003) Sumaryati Suroso (2007), Ketua III Pimpinan Pusat Yayasan Kanker Indonesia (YKI), juga mengatakan bahwa 27% dari seluruh penyakit kanker di Indonesia adalah kanker leher rahim. Diperkirakan pula bahwa sekitar 8.000 wanita di Indonesia meninggal akibat penyakit kanker payudara setiap tahun.

Penelitian ini bertujuan mensintesis senyawa baru agen antikanker yang lebih baik dari monastrol dan senyawa ini diberi nama LR-2 (4-Fenil-3,4-dihidro-indeno[2',1']pirimidin-2(1*H*)-tion) **4**. Senyawa LR-2 **4** merupakan analog dari senyawa monastrol yang diketahui mempunyai aktivitas biologi sebagai antikanker. Perbedaan kedua senyawa ini terletak pada cincin indeno yang terikat pada LR-2 **4** sedangkan monastrol memiliki gugus ester. Dengan adanya modifikasi pada bagian yang tersebut diatas dari senyawa monastrol menjadi senyawa LR-2 **4**, penelitian ini bertujuan untuk memepelajari daya sitotoksik dari senyawa LR-2 **4** pada sel kanker payudara T47D.

## Metodologi

### Sintesis LR-2

#### Bahan dan alat

Benzaldehid, tiourea, etanol, eter, kloroform, dan asam klorida. Semua bahan di atas buatan E-Merck dan berkualitas *pro analysis* (p.a). 2-indanon (Sigma-Aldrich), anisaldehyd, aseton, aquadest dan MgSO<sub>4</sub>.

Labu alas bulat 50 mL, kondensor, *syringe*, *stirrer bar*, *magnetic bar*, termometer, *hot plate*, erlenmeyer berbagai ukuran, *beker glass*, labu ukur, pipet, pipet volume, pro-pipet, mikropipet, *yellow tip*, corong pisah, lempeng kromatografi lapis tipis silika gel 60 GF<sub>254</sub> (E-Merck), lempeng KLT preparatif, lampu uv, termopan (Buchi Melting Point B-540), spektrofotometer IR (Shimadzu FTIR-8201 PC dan FT-IR Thermo Nicolet AVATAR 360), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10 dan MILTON ROY SPECTRONIC 3000), spektrometer <sup>1</sup>H-NMR (<sup>1</sup>H-NMR, 60 MHz JEOL-MY60), dan spektrometer massa (GC-MS Shimadzu QP-5000).

### Jalannya Penelitian

Ke dalam labu alas bulat 50 mL dimasukkan 2-indanon (1,513 mmol; 200,0 mg), benzaldehid (1,513 mmol; 0,15 mL) dan tiourea (1,513 mmol; 115,2 mg) dalam pelarut etanol (3 mL) serta katalis asam klorida pekat (3 tetes). Campuran reaksi direfluks selama 6 jam sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 1000 rpm. Hasil reaksi di ekstraksi dengan kloroform sebanyak tiga kali dengan volume 10 mL, 5 mL, dan 3 mL serta dikeringkan dengan MgSO<sub>4</sub> dan disaring dengan buchner. Sejumlah serbuk hasil sintesis dilarutkan dalam kloroform dan ditotolkan pada lempeng KLT preparatif dalam bentuk garis, kemudian dielusi dengan fase gerak eter : kloroform (1 : 100). Hasil elusi dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Pita yang dikehendaki dikerok dan diekstraksi dengan kloroform. Kemudian pelarut diuapkan hingga kering. Hasil sintesis berupa serbuk berwarna merah bata dengan rendemen LR 2 7 sebesar 54% (227,4 mg),  $R_f = 0,59$  (Et<sub>2</sub>O : CHCl<sub>3</sub> = 1:100) dan t.l. 197,5-198,2 °C. UV-Vis,  $\lambda_{maks} = 332$  nm; GC,  $t_r = 16,382$  menit; EI-MS,  $m/z$  278 (100) 245, 218, 115 201 (100); IR ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 1188,1 cm<sup>-1</sup> (C=S) 3193,9 cm<sup>-1</sup>(N-H) 1026,1 cm<sup>-1</sup>(C-N) 1666,4 cm<sup>-1</sup> (C=C); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7,5 (H, 9x H aromatik); 4,8 (2H, 2x (-NH-)); 1,8 (2H, 1x (-CH<sub>2</sub>)); 1H, 1x (-CH-)).

### Uji Sitotoksitas Senyawa LR-2 pada Sel Kanker Payudara T47D

#### Bahan dan alat

Senyawa 4-fenil-3,4-dihidro-indeno[2',1'] pirimidin-2(1H)-tion (LR-2), kultur sel kanker payudara T47D dari LPPT UGM, Media kultur sel kanker T47D dari LPPT UGM, Media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Gibco), Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) 1% (v/v) (Gibco) dan Fungison (Amphoterasin B) 0,5% (v/v) (Gibco). Media pencuci sel yaitu larutan *Rosewell Park*

*Memorial Institute* (RPMI) dalam aquabidest yang ditambahkan NaHCO<sub>3</sub> dan Hepes. Selain itu, sebagai medium pencuci dapat digunakan pula larutan *Phosphat Buffered Saline* (PBS), MTT 5 mg/mL dalam PBS, Reagen *stopper* natrium dodesil sulfat 10% dalam HCl 0,01 N.

Alat-alat gelas, mikropipet, autoclave, inkubator 37 °C, inkubator 5% CO<sub>2</sub> (Heraeus), sentrifuge dingin (Sigma), lampu ultraviolet, *laminar air flow cabinet*, mikroskop inverted, mikroskop fluoresensi, *tissue culture flask*, tabung conical, mikroplate 96 sumuran, *haemocytometer*, *cell counter*, ELISA reader, *blue tip*, *yellow tip*, timbangan analitik, mesin vortex, spatula.

### Jalannya Penelitian

#### Pembuatan Larutan Uji

Produk hasil sintesis dibuat stok dengan kadar 6500  $\mu$ M menggunakan DMSO 2,5%. Selanjutnya dibuat satu seri kadar dari larutan stok dalam media kultur. Pembuatan larutan uji dilakukan di dalam LAF secara aseptis.

#### Preparasi Sel Kanker Payudara T47D

Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37 °C, kemudian ampul disemprot etanol 70 %. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung *conical* steril yang berisi medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifuge 3000 rpm selama 5 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, *pellet* ditambah 1 mL medium penumbuh yang mengandung 10% FBS, disuspensikan perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (3-4 buah), diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37 °C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

#### Panen Sel T47D

Setelah jumlah sel cukup, medium dibuang dan sel dicuci koloninya dengan cara ditambah larutan *Phosphat Buffered Salin* (PBS) dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut. Sel ditambah larutan tripsin 0,05% sebanyak 1 mL, namun agar merata ditambah larutan PBS 3 mL, diamkan selama sekitar 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung *conical* steril dan ditambah PBS sampai volume 10 mL dan disentrifuge 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan medium yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah sejumlah medium kultur sehingga memperoleh konsentrasi sel sebesar  $1,5 \times 10^4$  sel /100  $\mu$ L.

### Uji Sitotoksitas Menggunakan Metode MTT

Suspensi sel kanker payudara 100  $\mu$ L dengan kepadatan  $1,5 \times 10^4$  sel / 100  $\mu$ L didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran pada 96 well-plates yang berisi RPMI 1640 dan diinkubasi semalam. Kemudian ditambahkan dengan satu seri kadar larutan hasil sintesis dan kontrol negatif. Dilakukan pula perlakuan terhadap DMSO sebagai kontrol pelarut. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37 °C, masing-masing sumuran ditambahkan 10  $\mu$ L MTT 5 mg/mL dalam PBS. Kemudian diinkubasi lagi minimal selama 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu.

Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambahkan reagen *stopper* yaitu larutan SDS 10% dalam asam klorida 0,01 N sebanyak 100  $\mu$ L pada tiap sumuran. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm

### Analisis Hasil

Dari data hasil uji sitotoksitas berupa konsentrasi sampel uji, jumlah sel hidup kontrol, dan jumlah sel hidup sampel. Persentase sel mati kemudian diubah menjadi probit sel mati melalui analisis probit secara manual dengan metode Miller dan Tainter, yaitu dengan menggunakan tabel transformasi probit. Kemudian dibuat kurva log konsentrasi sampel versus probit sel mati. Selanjutnya dengan mentransformasikan persentase kematian sel sebesar 50 % menjadi nilai probit dan mensubstitusikannya ke dalam persamaan garis regresi kurva, maka harga LC<sub>50</sub> sampel uji dapat ditentukan.

### Hasil dan Pembahasan

Senyawa 4-fenil-3,4-dihidroindeno[2',1']pirimidin-2(1H)-tion (LR-2) **7** dapat disintesis mengikuti reaksi Biginelli yaitu dengan mereaksikan benzaldehid **7**, 2-indanon **5** dan tiourea **6** dalam pelarut etanol serta asam klorida sebagai katalis (Skema 1).

Sintesis LR-2 **4** dilakukan dengan reflus pada suhu 80 °C untuk meningkatkan kecepatan reaksi. Kenaikan suhu reaksi akan meningkatkan energi molekul untuk saling bertumbukan. Maka jumlah molekul yang memiliki energi yang cukup untuk melangsungkan reaksi juga semakin banyak sehingga peluang terjadinya reaksi semakin besar dan cepat. Selama reflus, campuran reaksi distirer agar frekuensi tumbukan

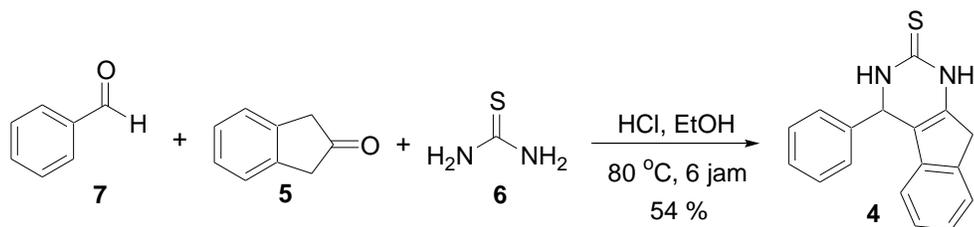
antarmolekul bertambah sehingga energi kinetik molekul meningkat dan kecepatan reaksi juga akan meningkat.

Refluks dilakukan selama enam jam dan selama waktu tersebut terjadi perubahan warna campuran reaksi dari kuning muda sampai coklat kemerahan. Pengamatan kinetika reaksi dilakukan dengan pengambilan sampel campuran reaksi pada setiap jam-nya dan ditotolkan pada plat KLT. Perbandingan yang digunakan adalah benzaldehid **7** dan 2-indanon **5**. Kemudian masing-masing totolan di elusi dengan fase gerak eter : kloroform (1:100). Setelah didinginkan pada suhu kamar, terbentuk endapan berwarna coklat tua kemerahan.

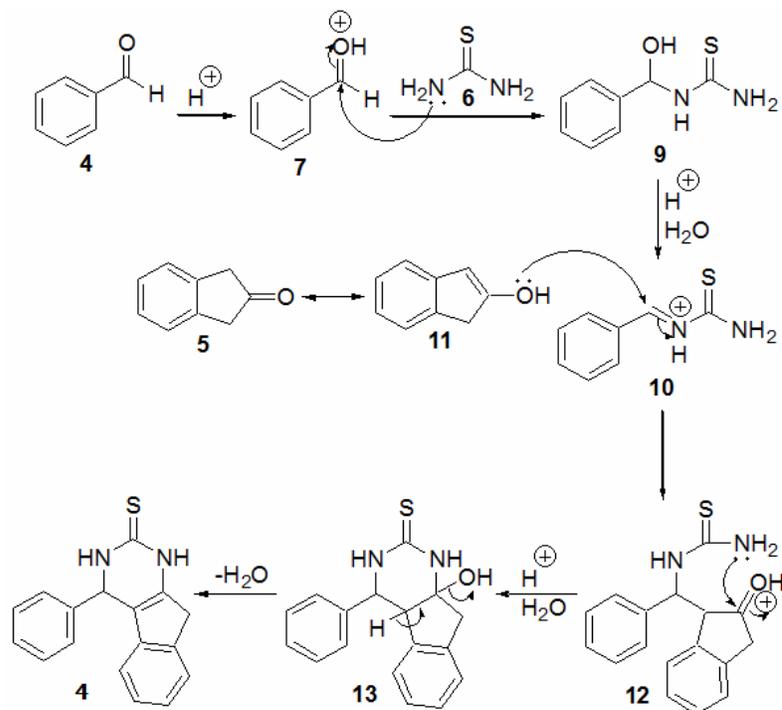
Sintesis senyawa LR-2 **4** dimulai dari reaksi kondensasi antara benzaldehid **7** dan tiourea **6** membentuk intermediet ion iminium **10**. Hal ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Kappe tentang mekanisme reaksi Biginelli, yang menggambarkan dengan jelas pembentukan ion *N-acyliminium* **10** sebagai intermediet kunci dalam konjugasi yang dikatalisis asam dari benzaldehid **7** dan tiourea **6**.

Berdasarkan Gambar 2, mekanisme reaksi pembentukan senyawa LR-2 **4** dapat diterangkan bahwa dengan adanya katalis asam akan memprotonasi atom oksigen pada gugus karbonil benzaldehid **7** yang selanjutnya akan mengaktifasi penyerangan pasangan elektron bebas dari atom nitrogen tiourea **6** ke arah atom karbon pada gugus karbonil benzaldehid **7** yang bersifat elektrofil membentuk intermediet ion iminium. Sedangkan 2-indanon **5** juga akan mengalami protonasi pada gugus karbonilnya dan dengan adanya abstraksi proton  $\alpha$  oleh karena peristiwa resonansi, akan terbentuk enol yang akan menyerang ion iminium. Penyerangan ion iminium oleh bentuk enol 2-indanon menghasilkan ureida rantai terbuka **12** yang selanjutnya mengalami siklisasi dengan melepaskan air membentuk produk dihidropirimidin (LR-2) **4**.

Senyawa hasil sintesis yang terbentuk sebanyak 493,5 mg masih berupa *crude product*, dimana dengan KLT masih menunjukkan jumlah bercak lebih dari satu yaitu lima buah bercak (Gambar 5). Harga R<sub>f</sub> masing-masing bercak dapat dilihat pada Tabel I.



Skema 1. Reaksi sintesis senyawa LR-2

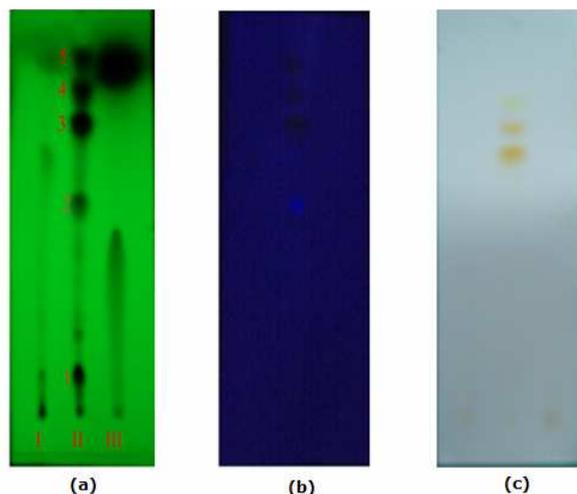


Skema 2. Mekanisme reaksi pembentukan senyawa LR-2 4.

Hasil pengamatan dari kelima spot menunjukkan bahwa setiap spot memiliki karakteristik tersendiri jika dilihat pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm. Hal ini ditentukan oleh kemungkinan struktur masing-masing senyawa. Berdasarkan hasil elusidasi struktur, senyawa target yang dikehendaki dalam sintesis ini yaitu 4-fenil-3,4-dihidro-indeno[2',1']pirimidin-2(1H)-tion 4 adalah senyawa dengan harga  $R_f$  0,59. Senyawa LR-2 4 mengalami pamadaman pada UV 254 nm dan berpendar ungu pada UV 366 nm terkait dengan adanya sistem kromofor dan auksokrom serta sifat keplanaran pada struktur molekulnya.

Sedangkan senyawa pada spot dengan  $R_f$  0,10 kemungkinan adalah produk antara yang terbentuk sebelum senyawa LR-2 4 mengalami dehidrasi. Adanya sistem kromofor serta sifat keplanarannya, menjadikan senyawa pada spot  $R_f$  0,10 juga mengalami pamadaman pada UV 254 nm dan berpendar ungu pada UV 366 nm. Namun dengan masih adanya air pada struktur molekulnya, menjadikan senyawa tersebut bersifat lebih polar dibandingkan senyawa LR-2 4 sehingga memiliki harga  $R_f$  lebih rendah.

Sedangkan spot dengan  $R_f$  0,72; 0,80 dan 0,88 diperkirakan berasal dari produk samping yang memiliki sistem kromofor yang lebih panjang dibandingkan senyawa LR-2 4



Gambar 5. Profil KLT senyawa hasil sintesis LR-2 pada fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak eter : kloroform (1:100)

Keterangan : (a) Profil KLT pada sinar UV 254 nm, (b) Profil KLT pada sinar UV 366 nm, (c) Profil KLT pada sinar tampak

I. 2-indanon, II. Campuran reaksi, III. Benzaldehid

Bercak 1 :  $R_f = 0,10$ ; bercak 2 :  $R_f = 0,59$ ; bercak 3 :  $R_f = 0,72$ ; bercak 4 :  $R_f = 0,80$ ; bercak 5 :  $R_f = 0,88$

Tabel I. Harga  $R_f$  senyawa hasil sintesis

No	$R_f$	Hasil pengamatan		
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,10	-	Pemadaman	Ungu
2	0,59	-	Pemadaman	Ungu
3	0,72	Orange tua	Pemadaman	-
4	0,80	Orange	Pemadaman	-
5	0,88	Kuning	Pemadaman	-

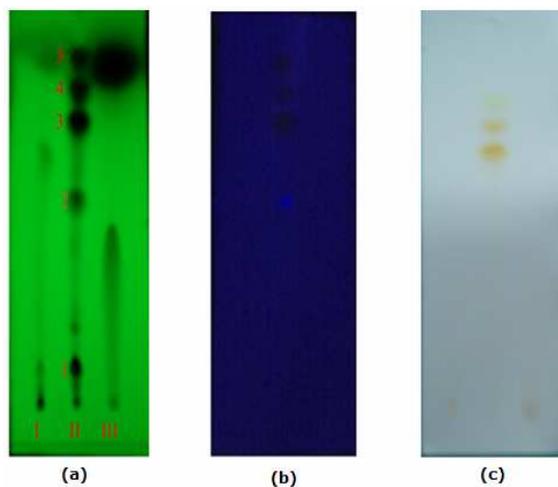
namun tidak memiliki struktur yang planar sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat terlihat pada sinar tampak namun tidak berpendar pada sinar UV 366 nm. Untuk memastikan struktur masing-masing senyawa tersebut diperlukan pemeriksaan lebih lanjut secara elucidasi struktur.

#### Perhitungan rendemen

Perhitungan rendemen dilakukan dengan kromatografi preparatif kuantitatif. Serbuk senyawa target hasil sintesis ditentukan rendemennya dalam bentuk persentase yaitu

bobot senyawa hasil sintesis dibagi bobot senyawa hasil teoritis dikalikan 100 %. Rendemen senyawa LR-2 **4** sebesar 54 %.

Hasil ini cukup baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya tentang sintesis 4-fenil-3,4-tetrahidro-indeno[2,1]pirimidin-2-on (LR-1) **1** yang hanya memberikan rendemen sebesar 15 % (Ritmaleni and Nurcahyani, 2006). Pada penelitian tersebut metode sintesis dan *starting material* yang digunakan hampir sama dengan sintesis LR-2 **4**. Perbedaan dalam sintesis senyawa LR-1 **1** dengan LR-2 **4** hanya terletak pada penggunaan urea sebagai salah



Gambar 5. Profil KLT senyawa hasil sintesis LR-2 pada fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak eter : kloroform (1:100)

Keterangan : (a) Profil KLT pada sinar UV 254 nm, (b) Profil KLT pada sinar UV 366 nm, (c) Profil KLT pada sinar tampak  
 I. 2-indanon, II. Campuran reaksi, III. Benzaldehid  
 Bercak 1:  $R_f = 0,10$ ; bercak 2 :  $R_f = 0,59$ ; bercak 3 :  $R_f = 0,72$ ; bercak 4 :  $R_f = 0,80$ ; bercak 5 :  $R_f = 0,88$

Tabel I. Harga  $R_f$  senyawa hasil sintesis

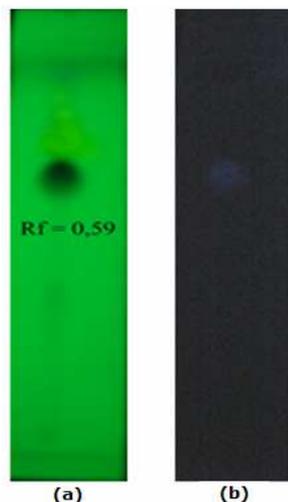
No	Rf	Hasil pengamatan		
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,10	-	Pemadaman	Ungu
2	0,59	-	Pemadaman	Ungu
3	0,72	Orange tua	Pemadaman	-
4	0,80	Orange	Pemadaman	-
5	0,88	Kuning	Pemadaman	-

satu *starting material*-nya. Sedangkan pada sintesis LR-2 **4**, urea tersebut diganti dengan tiourea **6**.

Rendemen yang lebih rendah pada sintesis LR-1 **1** kemungkinan terkait dengan penggunaan urea yang memiliki sifat nukleofilitas lebih rendah dibandingkan tiourea **6**. Hal ini disebabkan adanya gugus karbonil yang bertindak sebagai gugus penarik elektron (EWG) pada struktur molekul urea sehingga mengurangi kemudahan atom nitrogen pada gugus amin urea dalam mendonorkan

elektronnya. Sedangkan pada tiourea **6**, gugus karbonil tersebut digantikan oleh gugus tion dimana elektronegativitas antara atom karbon dengan sulfur hampir sama sehingga tidak terlalu berpengaruh pada sifat nukleofilitasnya.

Urea dan tiourea **6** bersifat nukleofil pada tahap pembentukan intermediet ion iminium dimana pasangan elektron bebas dari atom nitrogen tiourea **6** akan menyerang ke arah atom karbon pada gugus karbonil benzaldehid **7** yang bersifat elektrofil akibat protonasi atom oksigen.



Gambar 6. Profil KLT senyawa LR-2 4 yang telah murni pada fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak eter : kloroform (1:100)  
Keterangan : (a) Profil KLT pada sinar UV 254 nm, (b) Profil KLT pada sinar UV 366 nm

#### Uji Kemurnian

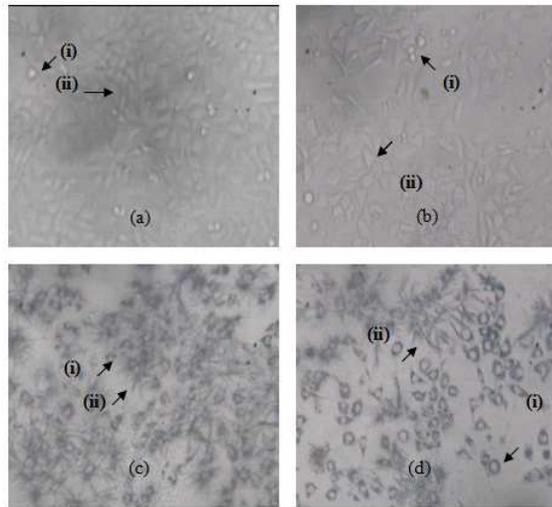
Uji kemurnian hasil sintesis dilakukan dengan pemeriksaan kromatografi lapis tipis dan titik lebur. Sebelumnya dilakukan pemisahan *crude product* secara kromatografi preparatif. Sistem kromatografi yang digunakan adalah fase normal yaitu dengan menggunakan fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak eter : kloroform (1:100). Pada sistem kromatografi normal, senyawa yang bersifat polar akan tertahan lebih lama pada fase diam dan memiliki harga R<sub>f</sub> yang kecil. Senyawa LR-2 4 cenderung bersifat nonpolar sehingga interaksi dengan fase diam lebih cepat. Hasil uji secara KLT diketahui bahwa hanya terdapat satu buah bercak yaitu pada R<sub>f</sub> 0,59 maka dapat dikatakan bahwa senyawa LR-2 4 telah murni. Hal tersebut juga diperkuat dengan data kromatogram pada GC-MS yang hanya memperlihatkan satu buah peak pada waktu retensi 16,382 menit (Gambar 6).

Hasil uji titik lebur senyawa LR-2 4 adalah 197,5-198,2 °C. Suatu senyawa dikatakan murni jika memiliki jarak lebur 1-2 °C. Sehingga berdasarkan hasil pengujian titik lebur dapat disimpulkan bahwa senyawa LR-2 4 telah murni karena memiliki rentang titik lebur yang sempit.

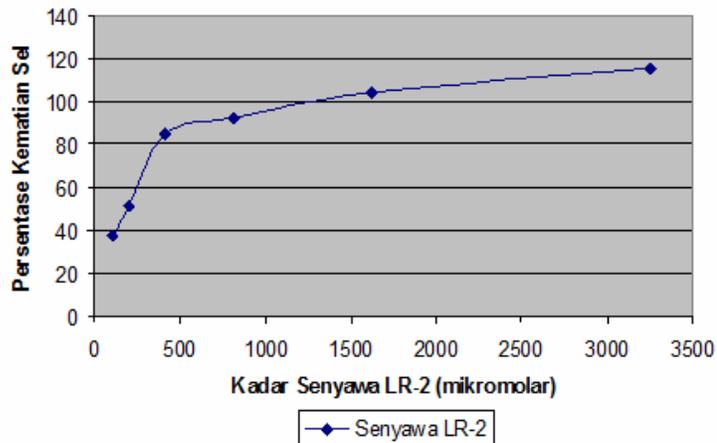
Uji sitotoksitas senyawa LR-2 4 terhadap sel T47D bertujuan untuk mengetahui

efek sitotoksitasnya terhadap sel kanker. Parameter yang digunakan untuk mengevaluasi potensi ketoksikan senyawa LR-2 4 terhadap sel T47D adalah LC<sub>50</sub>. Dalam penelitian ini, untuk menentukan jumlah sel yang hidup digunakan metode MTT. Banyaknya garam formazan yang terbentuk menggambarkan banyaknya sel yang hidup karena garam formazan terbentuk hanya oleh enzim mitokondria yang berkaitan dengan proses pernapasan sel. Sehingga sel yang mati tidak ikut dihitung karena tidak terjadi proses pernapasan.

Gambaran morfologi sel T47D perlakuan dengan 101 µM senyawa LR-2 4 tersaji pada Gambar 7. Sebelum perlakuan dengan metode MTT (Gambar 7.b), sel T47D yang masih hidup terlihat seperti bentuk daun memanjang yang bergerombol serta melekat pada dasar sumuran. Sedangkan sel T47D yang mati akan berbentuk bulatan-bulatan tidak beraturan serta mengapung pada media. Setelah perlakuan dengan metode MTT (Gambar 7.d), akan terlihat kristal formazan yang menunjukkan sel T47D yang masih hidup. Jika dibandingkan dengan kontrol (Gambar 7.a dan 7.c), jumlah sel T47D yang masih hidup mulai berkurang. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik dari senyawa LR-2 4.



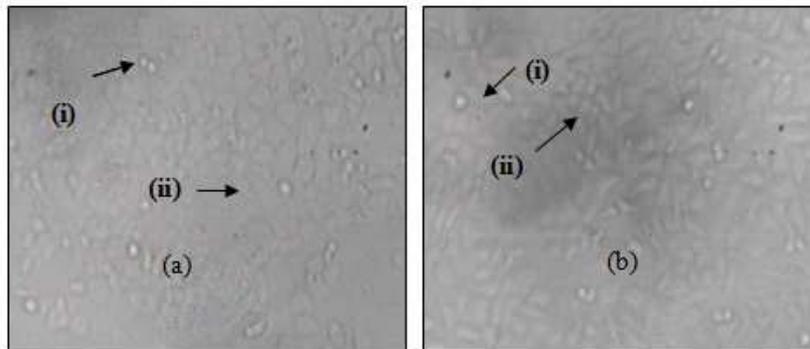
Gambar 7. Fotomikroskopik sel T47D dengan metode MTT pembesaran 100x  
 Keterangan : (a) Sel T47D kontrol sebelum MTT, (b) Sel T47D dengan senyawa LR-2 4 101 µM sebelum MTT, (c) Sel T47D kontrol sesudah MTT, (d) Sel T47D dengan senyawa LR-2 101 µM sesudah MTT (i) Sel T47D yang mati, (ii) Sel T47D yang hidup



Gambar 8. Kurva hubungan kadar vs persen kematian sel hasil uji sitotoksik LR-2 pada sel T47D dengan metode MTT.

Harga persentase kematian sel T47D akibat pemberian senyawa LR-2 4 dapat dibuat kurva hubungan antara kadar senyawa LR-2 dengan persentase kematian sel T47D (Gambar 8). Dari kurva pada Gambar 8 menunjukkan adanya kecenderungan kenaikan persentase kematian sel dengan kenaikan kadar senyawa LR-2 4. Pada kadar senyawa LR-2 4 terendah terjadi kematian sel sebesar 37,04%.

Sedangkan pada kadar senyawa LR-2 4 tertinggi terjadi kematian sel sebesar 115,19%. Harga persen kematian pada konsentrasi 1625 dan 3250 µM lebih dari 100%. Hal ini kemungkinan disebabkan karena sampel LR-2 4 juga menyerap sinar *visible* pada  $\lambda$  550 nm. Pada konsentrasi tersebut, sampel yang berwarna kuning samar belum cukup terencerkan oleh pelarut dan media yang digunakan sehingga



Gambar 9. Fotomikroskopik sel T47D pembesaran 100x

Keterangan :

(a). Sel T47D pada konsentrasi DMSO 1,25 % v/v, (b) Sel T47D tanpa pemberian DMSO (kontrol)

(i) Sel T47D yang mati, (ii) Sel T47D yang hidup

menyebabkan kesalahan pembacaan absorbansi oleh ELISA reader. Sedangkan pada konsentrasi lebih rendah, jumlah sampel LR-2 4 lebih sedikit sehingga warna sampel cukup terencerkan oleh media serta pelarut yang digunakan dan tidak menyebabkan kesalahan pembacaan absorbansi.

Kemudian dari data tersebut ditentukan harga  $LC_{50}$  dengan menggunakan analisis probit. Analisis probit merupakan salah satu analisis regresi untuk mengetahui hubungan konsentrasi-respon (persentase kematian sel) agar diperoleh persamaan garis lurus sehingga dapat digunakan untuk menentukan harga  $LC_{50}$  dengan lebih akurat (Nurrochmad, 2001). Harga  $LC_{50}$  menunjukkan kadar yang diperlukan untuk memberikan kematian sel sebesar 50%.

Analisis probit dilakukan dengan cara mencari linearitas antara log kadar senyawa LR-2 4 dengan persentase kematian sel T47D yang telah dikonversi ke dalam bentuk probit. Probit pada kematian sel 50% adalah 5 sehingga dengan memasukkan nilai 5 pada persamaan regresi linear diperoleh antilog kadar yang merupakan kadar LR-2 4 yang menyebabkan kematian sel T47D sebesar 50% ( $LC_{50}$ ).

Pada analisis probit hanya digunakan 4 seri kadar yaitu 101  $\mu$ M, 203  $\mu$ M, 406  $\mu$ M, dan 812  $\mu$ M karena pada kadar 1625 dan 3250  $\mu$ M memiliki persentase kematian 100% sehingga tidak memiliki harga probit. Persamaan garis

probit yang diperoleh adalah  $Y = 2,0731 X + 0,4333$  dengan  $r = 0,978$ . Hasil analisis probit menunjukkan bahwa senyawa LR-2 4 memiliki harga  $LC_{50}$  sebesar 159  $\mu$ M.

Senyawa LR-2 4 memiliki kelarutan yang terbatas dalam air sehingga digunakan DMSO (dimetil sulfoksida) sebagai pelarut karena kelarutan LR-2 4 dalam DMSO cukup tinggi yaitu 72,28 mg/mL. Pada penelitian ini digunakan DMSO dengan konsentrasi tertinggi 1,25% v/v. Meskipun konsentrasi DMSO cukup rendah, namun perlu dibuktikan apakah DMSO masih berpengaruh terhadap sel T47D. Hal tersebut untuk meyakinkan bahwa adanya efek sitotoksik senyawa LR-2 4, benar-benar disebabkan oleh senyawa LR-2 4 dan tidak dipengaruhi oleh DMSO sebagai pelarut.

Secara fotomikroskopik sel T47D pada konsentrasi DMSO 1,25% v/v (Gambar 9.a), terlihat adanya beberapa sel yang mati. Adanya sel yang mati tersebut disebabkan karena proses normal, misalnya kepadatan sel yang terlalu rapat dan berkurangnya kandungan nutrisi dalam medium. Sebagai perbandingan, disertakan pula fotomikroskopik kultur sel T47D tanpa pemberian DMSO yaitu dalam media RPMI (kontrol) (Gambar 9.b).

Agar lebih meyakinkan hasil fotomikroskopik (Gambar 9), maka perlu dilakukan pengujian secara kuantitatif. Penetapan banyaknya sel T47D yang mati

akibat DMSO dilakukan dengan menginkubasi sel T47D dengan DMSO pada seri konsentrasi yang sama dengan seri konsentrasi DMSO yang digunakan untuk melarutkan sampel pada uji sitotoksitas. Kemudian banyaknya sel yang hidup ditetapkan dengan metode MTT. Pada konsentrasi DMSO terendah yaitu pada kadar 0,04% v/v terjadi kematian sel T47D sebesar 1,75%. Sedangkan pada konsentrasi DMSO tertinggi 1,25% v/v terjadi kematian sel yang cukup besar yaitu 27,68%. Dari hasil uji statistik *Independent-samples T-test* diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara persentase kematian sel akibat DMSO dan senyawa LR-2 **4** karena memiliki harga signifikansi 0,00 ( $< 0,05$ ). Sehingga adanya efek sitotoksik benar-benar disebabkan karena perlakuan dengan sampel senyawa LR-2 **4** dan bukan karena DMSO sebagai pelarut.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Maliga dan Mitchison, diketahui bahwa harga  $IC_{50}$  monastrol pada *BS-C-1 green monkey kidney cells* adalah  $5,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ . Dalam penelitiannya, Maliga dan Mitchison menggambarkan dengan jelas pengaruh modifikasi struktur molekul monastrol dengan aktivitasnya sebagai agen antikanker. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa modifikasi pada  $R_4$  yaitu gugus OH pada fenil akan menghilangkan aktivitas monastrol. Hal ini terkait dengan perannya sebagai donor ikatan hidrogen. Kemudian adanya penggantian atom sulfur oleh atom oksigen pada posisi 2 juga akan menghilangkan aktivitas monastrol yang diperkirakan akibat hilangnya sisi hidrofobik

senyawa untuk berinteraksi dengan Eg5 (Maliga and Mitchison, 2006).

Pada penelitian ini diperoleh harga  $LC_{50}$  senyawa LR-2 **4** terhadap sel T47D sebesar 159  $\mu\text{M}$ . Maliga dan Mitchison membagi potensi dari masing-masing derivat monastrol kedalam tiga kelompok, dimana untuk komponen senyawa dengan harga  $IC_{50}$  antara 50-200  $\mu\text{M}$  termasuk dalam kelompok dengan aktivitas yang lemah (Maliga and Mitchison, 2006) karena menurut Teng *et al.*, (2005), harga  $LC_{50}$  suatu agen yang dianggap memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker yaitu  $LC_{50} < 50 \mu\text{M}$ .

Mekanisme kematian sel kanker payudara T47D pada uji sitotoksitas senyawa LR-2 **4** belum diketahui secara pasti. Apakah memiliki aktivitas seperti monastrol sebagai inhibitor Eg5 atau melalui jalur penghambatan pertumbuhan sel kanker yang lain. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui interaksi senyawa LR-2 **4** dengan protein kinesin Eg5 agar dapat ditentukan mekanisme aksinya.

## Kesimpulan

Senyawa LR 2 **4** berhasil disintesis dengan menggunakan reaksi Biginelli dengan rendemen sebesar 54 %. Senyawa 4-fenil-3,4-dihidro-indeno[2',1']pirimidin-2(1H)-tion (LR-2) **4** bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan harga  $LC_{50} = 159,51 \mu\text{M}$ .

## Daftar Pustaka

- Bose, D.S., M. Sudharshan & S.W. Chavhan, 2005, New protocol for Biginelli reaction-a practical synthesis of Monastrol, *Arxivoc*, 3, 228.<http://www.sinarharapan.co.id /iptek/kesehatan/ 2003/042/kes1.html>
- Kappe, C.O., 1993, 100 Years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis, *Tetrahedron*, 49, 6937.
- Maliga, Z. and Mitchison, T. J., 2006, Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol, *BMC Chemical Biology*, 6, 1472-6769.
- Nurrochmad, A., 2001, Sintesis Kurkumin, Bisdemetoksi Kurkumin, Bisdemetoksidehidroksi Kurkumin, dan Pentagamavunon-0 serta Uji Ketoksikannya terhadap Sel Myeloma, dan Sel Mononuklear Normal secara In Vitro, *Tesis*, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Ritmaleni & Nurcahyani, W., 2006, Sintesis 4-fenil-3,4-tetrahidro-indeno[2,1]pirimidin-2-on (LR-1), *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(3), 149.

- Suroso, S., 2007, Kanker Mulut Rahim Rengut 8.000 Wanita Indonesia per Tahun, diakses 18 juni 2008, <http://www.antara.co.id/arc/2007/9/20/kanker-mulut-rahim-rengut-8000-wanita-indonesia-per-tahun/>
- Sutjipto, 2003, Kanker Payudara Bukan Akhir Segalanya, diakses 18 Juni 2008
- Teng, W. Y., Yu, L. H., Chien, C. S., Ray, L. H., Ren, S. C. and Chien, C. C., 2005, Cytotoxic Acridone Alkaloids from the Stem Bark of Citrus Maxima, *Journal of The Chinese Chemical Society*, 52, 1253.
- Weber, L., 2002, Multicomponent Biginelli's synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones promoted by SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, *Drug. Disc. Today*, 7, 143.

---

\*) koresponden : Ritmaleni  
Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM  
Email : ritmaleni@ymail.com