

Synthesis, Characterization and Anti MCF-7 Proliferative Activity of Flavonol Derivatives Of 2'-Hydroxyacetophenon and 3,4,5-Dimethoxy Benzaldehyd

Sintesis, Karakterisasi, dan Uji Anti-Proliferasi Sel MCF-7 Senyawa Flavonol Turunan 2'-Hidroksiasetofenon dan 3,4,5-Dimetoksi Benzaldehyd

Muhamad Rokim^{*}, Adel Zamri, Hilwan Yuda Teruna

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau,
Pekanbaru 28293

*m.rokhim@staff.unri.ac.id

ABSTRACT

Flavonols a derivatives of 2'-hydroxyacetophenon and 3,4,5-dimethoxy benzaldehyd has been synthesized under basic condition (KOH). The structure of the compound was characterized based on the interpretation of spectroscopic data, including UV, FTIR, NMR and HRMS. Anticancer activity was evaluated using the MTS assay against MCF-7 cells, which showed that the flavonol 2'-hydroxycalone derivative was potentially active as an anticancer substance with IC_{50} values $<1000 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Key words: Flavonol; 2'-hydroxyacetophenon; 3,4,5-dimethoxy benzaldehyd; MCF-7 cells

ABSTRAK

Senyawa analog flavonol turunan 2'-hidroksiasetofenon dan 3,4,5-dimetoksi benzaldehyd telah berhasil disintesis dalam suasana basa (KOH). Struktur senyawa dikarakterisasi berdasarkan interpretasi data spektroskopi UV, FTIR, NMR dan HRMS. Uji antikanker terhadap sel MCF-7 menggunakan MTS menunjukkan bahwa senyawa flavonol turunan 2'-hidroksikalkon berpotensi/aktif sebagai antioksidan dan antikanker dengan nilai $IC_{50} < 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Kata kunci: Flavonol; 2'-hidroksiasetofenon; 3,4,5-dimetoksi benzaldehyd; Sel MCF-7.

PENDAHULUAN

Senyawa bahan alam telah menjadi sumber yang efektif sebagai senyawa bioaktif (Dias *et al.*, 2013) yang berperan untuk menginisiasi penyakit degeneratif. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdapat di alam, yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan dan dianggap sebagai senyawa yang berpotensi dalam terapi pengobatan kanker (Burmistrova *et al.*, 2014). Salah satu senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang banyak disintesis untuk dipelajari bioaktivitasnya adalah kalkon. Senyawa kalkon dan turunannya dikenal memiliki beragam aktivitas biologi. Dalam bidang sintesis, senyawa

kalkon telah banyak digunakan untuk membuat berbagai macam senyawa heterosiklik salah satunya flavonol (Britton *et al.*, 2012 & Jadhav *et al.*, 2008) yang memiliki aktivitas biologi yang menarik termasuk didalamnya sebagai antioksidan dan antikanker.

Aktivitas biologi senyawa-senyawa turunan kalkon seperti flavonol dipengaruhi oleh jenis substituenya (Jadhav *et al.*, 2008). Beberapa analog flavonol turunan kalkon dilaporkan berpotensi untuk diteliti lebih lanjut dan dikembangkan sebagai obat kanker prostat berdasarkan uji sitotoksik menggunakan *cell line* 22rv1 (kanker prostat pada manusia) dengan nilai $IC_{50} < 5 \mu M$ (Britton *et al.*, 2012).

Selain memiliki potensi sebagai antikanker, senyawa flavonol juga sangat dikenal dengan aktivitas antioksidannya. Oleh karena itu, menjadi sesuatu hal yang sangat menarik untuk melihat pengaruh berbagai jenis dan posisi substituen tersebut terhadap potensi antikanker dan antioksidan dari senyawa 2'-hidroksikalkon dan turunannya.

Variasi substituen pada cincin aromatik akan menghasilkan kalkon dan turunannya dengan struktur yang luas dan aktivitas yang beragam. Variasi struktur yang luas tersebut tidak dapat diperoleh melalui isolasi dari bahan alam, selain karena membutuhkan biaya yang lebih mahal dan waktu pengerjaan yang lebih lama. Senyawa kalkon dan turunan kalkon tersubstitusi halogen, metil, dan isopropil tidak dapat ditemukan di alam. Oleh karena itu, sintesis secara kombinatorial merupakan jalan keluar yang paling tepat bagi pemecahan masalah tersebut.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah lampu UV 254/366 nm (Camag®), penentu titik leleh *Fisher Johns* (SMP 11-Stuart®), HPLC (UFLC Prominace-Shimadzu®, detektor UV SPD 20AD), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S®), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, IR Prestige-21), spektrometer NMR (Agilent 500 MHz), HRMS (Water LCT premier XE mode positif), *microplate reader 96 well* (Berthold LB-941) dan indikator universal.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2'-hidroksiasetofenon (Aldrich), 3,4,5-dimetoksi benzaldehid, larutan KOH 3N, H₂O₂, larutan HCl 3N, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil) -2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), aquades dan berbagai pelarut organik seperti etil asetat, *n*-heksana, kloroform, metanol, etanol dan dimetilsulfoksida (DMSO).

Sintesis Senyawa Flavonol

Sintesis senyawa flavonol akan dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang telah digunakan oleh Britton *et al.* (2012). 0,5 mmol 2'-hidroksikalkon dilarutkan dalam 5 mL etanol dan ditambahkan KOH 3 N sebanyak 1 mL. Campuran kemudian didinginkan dalam mangkuk berisi es di dalam Freezer hingga suhu 0°C kemudian sebanyak 0,25 mL H₂O₂ 30% ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan diaduk selama 3 jam pada temperatur kamar. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan HCl 3N sampai terbentuk padatan. Padatan yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi atau kromatografi kolom

Uji Aktivitas Antikanker

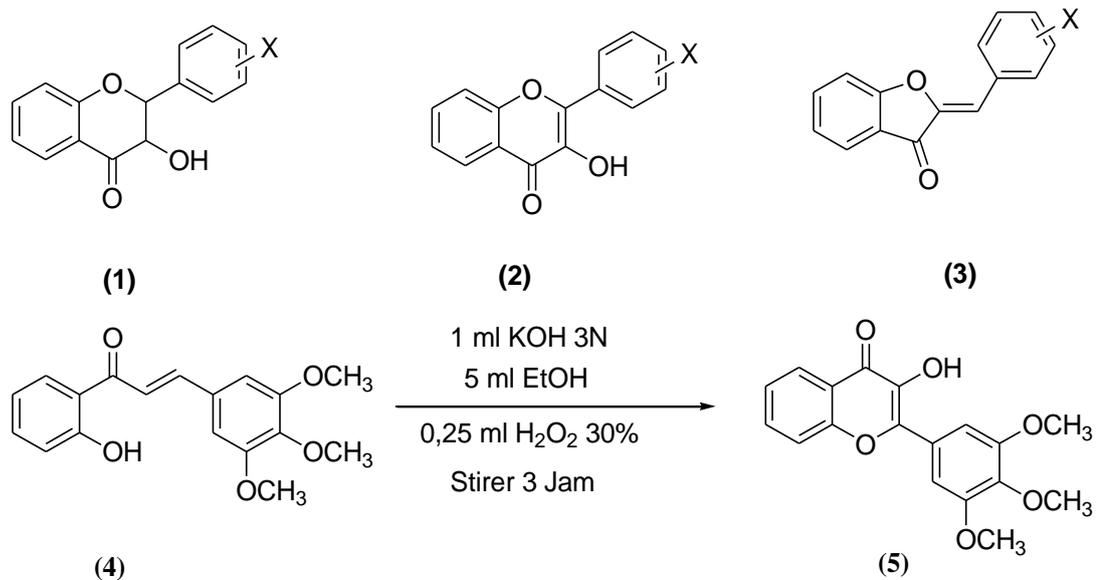
Senyawa flavonol hasil sintesis diuji aktivitas anti kankernya terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTS (3-(4,5dimetilthiazol-2-yl)-5-(3-carboksi metoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium). Sel MCF-7 yang sebelumnya disimpan dalam tangki nitrogen disubkultur pada media kultur hingga siap digunakan untuk uji. Sejumlah 1×10^4 sel dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 well plate dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37 °C selama semalam. Ekstrak uji yang sudah dilarutkan dalam co-solvent DMSO ditambahkan ke dalam sumuran dengan delapan seri konsentrasi yaitu: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 dan 7,81 µg/mL selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media dan ekstrak dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran lalu ditambahkan 100 µL media kultur dan 10µL MTS konsentrasi 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 4-6 jam dalam inkubator CO₂ 5% bersuhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTS membentuk warna ungu. Reaksi MTS dihentikan dengan reagen stopper yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01 N, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 570 dan 600 nm kemudian ditentukan selisih serapan dari kedua panjang gelombang tersebut

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis Flavonol

Analog flavonol dihasilkan melalui sintesis sebagaimana yang dilakukan oleh Rokim *et al.* (2019a) dan Rokim *et al.* (2019b). Skema reaksi pembentukan senyawa flavonol dari 2'-hidroksikalkon dapat dilihat pada Gambar 1. Reaksi diawali dengan oksidasi ikatan rangkap α,β pada molekul 2'-hidroksikalkon oleh hidrogen peroksida dalam suasana basa membentuk intermediet epoksida (*oxirane*). Bersamaan dengan itu, basa merebut hidrogen fenolik pada 2'-hidroksikalkon sehingga terbentuk ion fenoksida. Selanjutnya, ion fenoksida akan menyerang cincin *oxirane* sehingga terjadi pemutusan ikatan C-O *oxirane*. Atom oksigen *oxirane* digantikan oleh atom oksigen fenoksida melalui penyerangan

pada karbon β *oxirane* menghasilkan flavanonol (1). Flavanonol tersebut kemudian akan teroksidasi menjadi flavonol (2) oleh hidrogen peroksida. Jika penyerangan ion fenoksida terjadi pada karbon α *oxirane*, maka akan dihasilkan auron (3) (Bennet *et al.*, 1996). Proporsi produk yang dihasilkan tergantung pada struktur analog 2'-hidroksikalkon dan juga metode yang digunakan (Gormley & O'Sullivan, 1973).



Gambar Gambar 1. Skema reaksi senyawa flavonol

Senyawa flavonol yang diperoleh berupa padatan kuning. Kemurnian senyawa flavonol hasil sintesis ditentukan melalui uji KLT, uji titik leleh, dan analisis HPLC. Sifat fisik senyawa flavonol dapat dilihat pada **Tabel 1**.

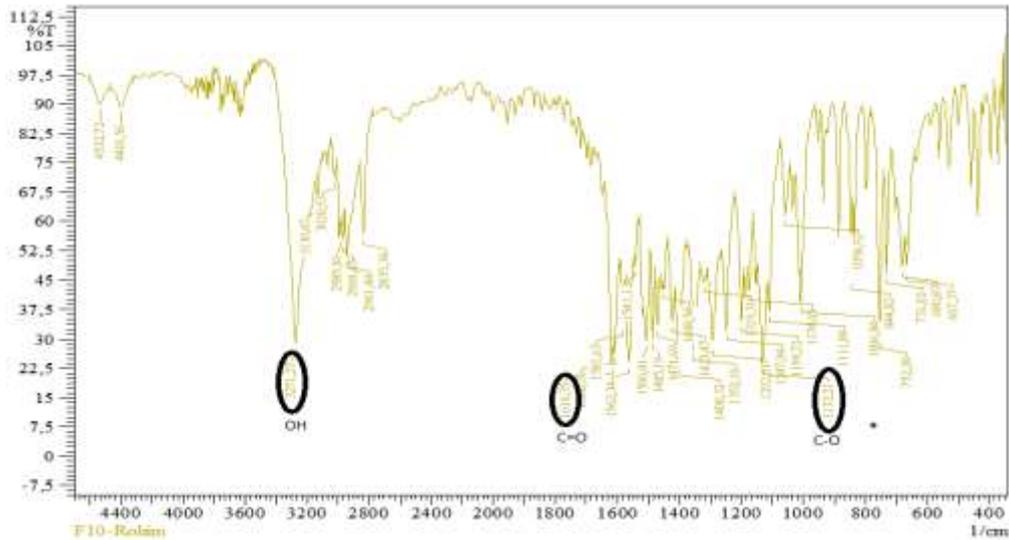
Tabel 1. Sifat fisik senyawa analog flavonol

Senyawa	Rumus Molekul	Berat Molekul	Rendemen (%)	Warna	Titik Leleh (°C)
Flavonol (5)	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329,114	59,25	Kuning	160-162

Senyawa murni yang diperoleh berupa padatan kuning dengan berat 0,0975 g (59,25 %). Titik leleh senyawa 160-162°C, hasil uji KLT menunjukkan satu noda, kromatogram HPLC menunjukkan satu puncak dengan waktu retensi 11,68 menit menandakan senyawa yang diperoleh sudah murni.

Karakterisasi Senyawa Flavonol

Spektrum UV senyawa flavonol menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 217, 240 dan 355 nm. Serapan-serapan tersebut memperlihatkan serapan-serapan khas untuk senyawa flavonol yang menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa tersebut. Spektrum FTIR senyawa flavonol dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR senyawa flavonol

Spektrum FTIR senyawa flavonol memperlihatkan serapan pada bilangan gelombang 3200-3300 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi dari ikatan O-H yang terikat pada C3 cincin kroman. Serapan pada bilangan gelombang 3010-3074 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C-H aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 1610-1645 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C=O yang terkonjugasi dengan ikatan rangkap α,β tak jenuh. Serapan pada bilangan gelombang 1562-1571 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C=C aromatik. Serapan pada bilangan gelombang 1132-1199 cm^{-1} menunjukkan vibrasi dari ikatan C-O yang mengindikasikan adanya gugus OH pada atom C3 cincin kroman.

Spektrum ^1H NMR senyawa flavonol juga menunjukkan pergeseran kimia yang khas pada daerah aromatik. Ini menunjukkan bahwa OH aril telah mengalami reaksi siklisasi membentuk cincin heterosiklik kroman. Puncak *singlet* muncul pada δ 7,08 ppm (1H) menunjukkan proton dari gugus OH yang terikat pada karbon C3 cincin heterosiklik kroman. Ini menandakan bahwa pada cincin heterosiklik kroman tersebut terdapat gugus OH yang menjadi ciri khas senyawa

flavonol. Tidak adanya signal proton pada daerah alifatik telah menunjukkan bahwa pada cincin heteroksiklik kroman tersebut terdapat ikatan rangkap.

Proton aromatik pada senyawa flavonol dapat diamati pada pergeseran kimia δ 8,26 ppm yang menunjukkan pergeseran kimia dari proton H5 dengan puncak *doublet of doublet* ($J_1 = 8.0$ Hz dan $J_2 = 1.7$ Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H5 dengan proton H6, sedangkan konstanta *coupling* sebesar 1,7 Hz merupakan *meta coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H5 dengan proton H7.

Tabel 2. Interpretasi data ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) senyawa hasil sintesis (5)

Posisi	Senyawa hasil sintesis (5)	Posisi	Senyawa hasil sintesis (5)
	δ_{H} (ppm), J (Hz)		δ_{H} (ppm), J (Hz)
1	-	1'	7,56 (s, 2H)
2	-	2'	-
3	7,08(s,1H,OH)	3'	-
4	-	4'	-
5	8,26 (dd, 1H, $J= 8; 1,7$)	5'	7,56 (s, 2H)
6	7,43 (ddd, 1H, $J=8;7;1,1$)	6'	-
7	7,72(ddd, 1H, $J=8,6;7;1,7$)		
8	7,61 (dd, 1H, $J; 8,6;1$)		
9	-		
10	-		

Pergeseran kimia δ 7,72 ppm yang menunjukkan pergeseran kimia dari proton H7 dengan puncak *doublet of doublet of doublet* ($J_1 = 8,6$ Hz, $J_2 = 7$ Hz dan $J_3=1,7$ Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8,6 Hz dan 7 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H7 dengan proton H8 dan H6, sedangkan konstanta *coupling* sebesar 1,7 Hz merupakan *meta coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H7 dengan proton H5. Pergeseran kimia δ 7,61 ppm merupakan proton H8 dengan puncak *doublet* ($J_1 = 8,6$ Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8,6 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H8 dengan proton H7. Pergeseran kimia δ 7,43 ppm yang menunjukkan pergeseran kimia dari proton H6 dengan puncak *doublet of doublet of doublet* ($J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 7$ Hz dan $J_3=1,1$ Hz). Konstanta *coupling* sebesar 8 Hz dan 7 Hz merupakan *ortho coupling*, yang menunjukkan korelasi antara proton H6 dengan proton H7 dan H5, sedangkan konstanta *coupling* sebesar 1,1 Hz merupakan *meta coupling*, menunjukkan korelasi antara proton H6 dengan proton H8.

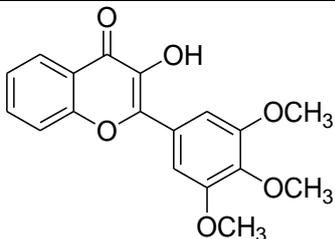
Long range connectivity juga dapat diamati pada cincin aril senyawa Flavonol. Pergeseran kimia pada δ 7,56 ppm menunjukkan pergeseran kimia dari proton H5' dan H1' dengan puncak *singlet*. Pergeseran kimia pada δ 3,98-3,95 ppm menunjukkan pergeseran kimia dari proton OCH₃ dengan puncak *singlet*. Massa molekul senyawa flavonol ditemukan pada $m/z = 329,114$ dengan rumus molekul C₁₈H₁₆O₆.

Uji Antikanker Senyawa Flavonol

Uji aktivitas antikanker flavonol (Tabel 3) terhadap MTS dilakukan dengan menggunakan alat *Microplate Reader 96 Well* pada panjang gelombang 570 dan 600 nm. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil) -2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium, *inner salt*) merupakan reagen elektron coupling dalam reaksinya sering di kombinasikan dengan PMS (*phenazine methosulfate*). Jika MTS ditambahkan kedalam kultur sel kanker yang sudah di tambahkan PMS kemudian diinkubasi maka MTS akan direduksi oleh enzim *dehydrogenase* menjadi produk formazan yang larut dalam medium kultur. Enzim *dehydrogenase* hanya terdapat pada sel hidup dengan aktivitas metabolik yang tinggi. Produk formazan, yang merupakan indikasi proses reduksi MTS, berwarna ungu dan absorbansinya dapat diukur pada λ diatas 490 nm dengan alat *multiplate reader*. Jumlah produk formazan yang terukur melalui absorbansi λ 490 nm sebanding dengan jumlah sel hidup dalam kultur (Riss *et al.*, 2004, & Huang *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil uji aktivitas antikanker menggunakan metode MTS senyawa flavonol hasil sintesis memiliki aktivitas sebagai antikanker. Hal ini dikarenakan senyawa flavonol tersebut memiliki nilai IC₅₀<1000 $\mu\text{g/mL}$ yang dikategorikan bersifat aktif sebagai antikanker terhadap Sel MCF-7 (Sel Kanker Payudara).

Aktivitas antikanker dari senyawa flavonol yang disintesis ini memiliki korelasi dengan aktivitas antioksidan, dimana hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan nilai IC₅₀<1000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 3) sehingga dikategorikan bersifat aktif sebagai antioksidan yang dapat menghambat radikal DPPH (Rokim *et al.*, 2019b). Hal tersebut sesuai dengan korelasi Aktivitas antikanker dan aktivitas antioksidan sebagaimana yang ditunjukkan oleh Mulia *et al.* (2016), bahwa pengaruh perubahan nilai pada IC₅₀ antioksidan mempengaruhi nilai IC₅₀ antikanker, begitu juga sebaliknya. Kenaikkan atau penurunan nilai IC₅₀ antioksidan berkorelasi positif dengan kenaikan/penurunan nilai IC₅₀ antikanker. Semakin tinggi nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan maka, semakin tinggi pula nilai IC₅₀ aktivitas antikanker.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan dan antikanker senyawa Flavonol hasil sintesis.

No	Senyawa	Struktur Senyawa	IC ₅₀ (µg/mL) Antikanker	IC ₅₀ (µg/mL) Antioksidan
1	Flavonol		769,6	142,01 (Rokim <i>et al.</i> , 2019b)

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa sintesis senyawa flavonol turunan 2'-hidroksiasetofenon dan 3,4,5-dimetoksi benzaldehid telah berhasil di sintesis dengan menggunakan modifikasi metode yang telah digunakan oleh Britton *et al.*, (2012). Karakterisasi menggunakan spektroskopi UV, FTIR, NMR dan HRMS menunjukkan bahwa struktur molekul senyawa hasil sintesis sesuai dengan struktur molekul target. Uji aktivitas antikanker terhadap Sel MCF-7 (Sel Kanker Payudara) dengan nilai IC₅₀ sebesar 769,6µg/mL dan antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa senyawa flavonol bersifat aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 142,01µg/mL (Rokim *et al.*, 2019b).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Riska Prasetyawati M. Farm., Apt., yang telah membantu dalam analisa spektroskopi HRMS dan hibah penelitian berbasis kompetensi tahun 2017 dengan nomor kontrak: 524/UN19.5.1.3/PP/2017

DAFTAR PUSTAKA

- Bennett, M., Burke, J.A. & O'Sullivan, W.I.** 1996. Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction. *Tetrahedron*, 52(20): 7163-7178.
- Britton, R.G., Horner-Glister, E., Pomenya, O.A., Smith, E.E., Denton, R., Jenkins, P.R., Steward, W.P., Brown, K., Gescher, A. & Sale, S.** 2012. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Flavonols as Potential Anti-Prostate Cancer Agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54: 952-958.
- Burmistrova, O., Marrero, M.T., Estevez, S., Welsch, I., Brouard, I., Quintana, J. & Estevez, F.** 2014. Synthesis and Effects on Cell Viability of Flavonols and 3-Methyl Ether Derivatives on Human Leukemia Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84: 30-41.

- Dias, T.A., Duarte, C.L., Lima, C.F., Proenca, M.F. & Pereira-Wilson, C.** 2013. Superior Anticancer Activity of Halogenated Chalcones and Flavonols Over the Natural Flavonol Quercetin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65: 500-510.
- Gormley, T.R. & O'Sullivan W.I.** 1973. Flavanoid Epoxides-XIII¹ Acid and Base Catalysed Reactions of 2'-toxyloxychalcone epoxides. Mechanism of the Algar-Flynn-Oyamada Reaction. *Tetrahedron*, 29(2): 369-373.
- Huang, K.T., Y.H. Chen, & A.M. Walker.** 2004. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *BioTechniques* 37 : 406-412
- Jadhav, S.B., Bagul, K.R., Bagul, P.R. & Gaikwad, K.V.** 2008. Synthesis of Some Novel Flavonol Derivatives and Its Antimicrobial Activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 24(2): 583-588.
- Molyneux, P.** 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journals Songklanakarin Science Technology*, 26: 212-219.
- Mulia, K., Hasan, A.E.Z & Suryani.** 2016. Total Fenolik, Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Ekstrak Etanol Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dari Pamekasan dan Karang Asem. *Current Biochemistry*, 3(2): 80 – 90.
- Riss, T.L., R.A. Moravec, A.L. Niles, H.A. Benink, T.J. Worzella, & L.Minor.** 2004. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* : 1-23.
- Rokim, M., Zamri, A., & Teruna, H.Y.** 2019a. Sintesis, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antikanker Senyawa 3',4'-Dimethoxy Flavonol. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 2(1): 1-7
- Rokim, M., Zamri, A., & Teruna, H.Y.** 2019b. Sintesis dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonol 2(3,4,5-Dimetoksifenil)-3-Hidroksi-4h-Kromen-4-On. *Journal Of Pharmacy & Science*, 2(2): 34-37.