

3,3'-Di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on: Sintesis dan Uji Sitotoksik terhadap Sel Kanker Kolon WiDr

(3,3'-Di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-one: Synthesis and Cytotoxic Assays against WiDr Colon Cancer Cells)

KAMILIA MUSTIKASARI¹, MARDI SANTOSO^{2*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Lambungmangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan.

²Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya, Jawa Timur.

Diterima 10 Desember 2012, Disetujui 29 September 2013

Abstrak: Kanker kolon merupakan salah satu penyebab kematian yang menjadi pusat perhatian di dunia, karena hingga saat ini belum ditemukan obat yang spesifik untuk pengobatannya. Oleh sebab itu, penelitian yang bertujuan untuk mensintesis senyawa yang berpotensi sebagai anti kanker baru seperti senyawa turunan 3,3'-di(indol-3-il)indolin-2-on sangat diperlukan. Sintesis dilakukan dengan mereaksikan 5,7-dibromoindol dan isatin dalam metanol dengan katalis asam menghasilkan senyawa 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on dengan rendemen 48%. 3,3'-Di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on bersifat sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr dengan IC₅₀ 6,64 µM.

Kata kunci: sintesis, indolinon, kanker kolon, WiDr.

Abstract: Colon cancer is one of the causes of death in the world of concern, because until now there has not been found specific drug for its treatment. Therefore, the study aimed to synthesize compounds that have the potential as a novel anticancer compound derivative such as 3,3'-di (indol-3-yl) indolin-2-one is required. Synthesis was done by reacting 5,7-dibromoindole and isatin in methanol with an acid catalyst to produce 3,3'-di (5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-one compound with a yield of 48%. 3,3'-di (5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-one is cytotoxic against colon cancer cell line WiDr with IC₅₀ of 6.64 µM.

Keywords: synthesis, indolinone, colon cancer, WiDr.

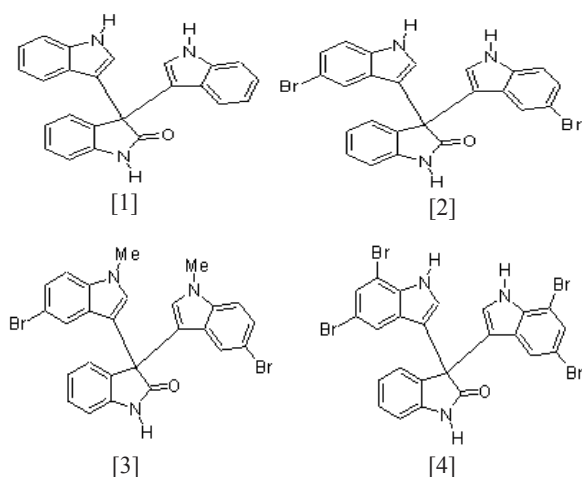
PENDAHULUAN

KANKER kolon merupakan penyebab kematian yang menempati urutan ketiga, dengan angka kejadian sekitar satu juta kasus per tahun dengan angka kematian lebih dari 500.000. Jumlah kasus tersebut diperkirakan meningkat selama dua dekade berikutnya sebagai akibat dari berkembangnya populasi, baik di negara maju maupun berkembang⁽¹⁾. Permasalahan tersebut masih belum terpecahkan, karena sampai saat ini belum ditemukan obat yang spesifik untuk menghentikan perkembangan sel kanker⁽²⁾, sehingga penelitian yang bertujuan untuk mensintesis senyawa

yang berpotensi sebagai anti kanker baru sangat diperlukan.

3,3'-Di(indol-3-il)indolin-2-on [1] (Gambar 1) dan turunannya merupakan kelompok senyawa yang memiliki potensi untuk pengobatan kanker. Indolinon [1] secara *in vitro* dapat menghambat sel kanker sarkoma rahim dengan IC₅₀ 3,51 µM, sel kanker kolon HCT15 dengan IC₅₀ 6,63 µM⁽³⁾ dan sel kanker prostat DU-145 dengan IC₅₀ 8,7 µM⁽⁴⁾. Keberadaan gugus bromo diketahui dapat meningkatkan bioaktivitas indolinon [1] sebagai contoh yaitu sitotoksitas 3,3'-di(5-bromo-indol-3-il) indolin-2-on [2] lebih tinggi dari pada indolinon [1] dalam menghambat sel kanker prostat DU-145 masing-masing dengan IC₅₀ 3,6 µM dan 8,7 µM⁽⁴⁾.

* Penulis korespondensi, Hp. 081349507786
e-mail: tsv09@chem.its.ac.id



Gambar 1. 3,3'-Di(indol-3-yl)indolin-2-on [1] dan turunannya.

Pada penelitian sebelumnya, telah berhasil disintesis 3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-yl)-5-bromoindolin-2-on [3] melalui reaksi substitusi aromatik elektrofilik 5-bromo-N-metilindol dengan 5-bromoisatin. Indolinon [3] tidak toksik terhadap sel normal (sel vero)⁽⁵⁾, tetapi sitotoksitasnya terhadap sel kanker kolon WiDr belum diungkap. Makalah ini melaporkan sintesis indolinon baru yaitu 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4] serta uji sitotoksitasnya terhadap sel kanker kolon WiDr.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan adalah 5,7-dibromoindol (97%, Aldrich), isatin (98%, Aldrich), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-(2,5-difeniltetrazolium bromida) (MTT 98%, Aldrich), asam sulfat (Merck), metanol (*p.a*), plat kromatografi lapis tipis (KLT) aluminium silica gel 60 GF₂₅₄, uap iodine, *n*-heksan (teknis), etil asetat (teknis), diklorometan (teknis) dan sel kanker kolon WiDr koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Alat. Lampu UV (panjang gelombang 254 dan 365 nm), *rotary evaporator*, kromatografi kolom *flash*, *melting point apparatus* Fisher John, spektrometer NMR Jeol JNM-ECA 500 (500 MHz), spektrometer massa Waters LCP Premier XE dan ELISA reader Bio-Rad microplate reader Benchmark serial no. 11565.

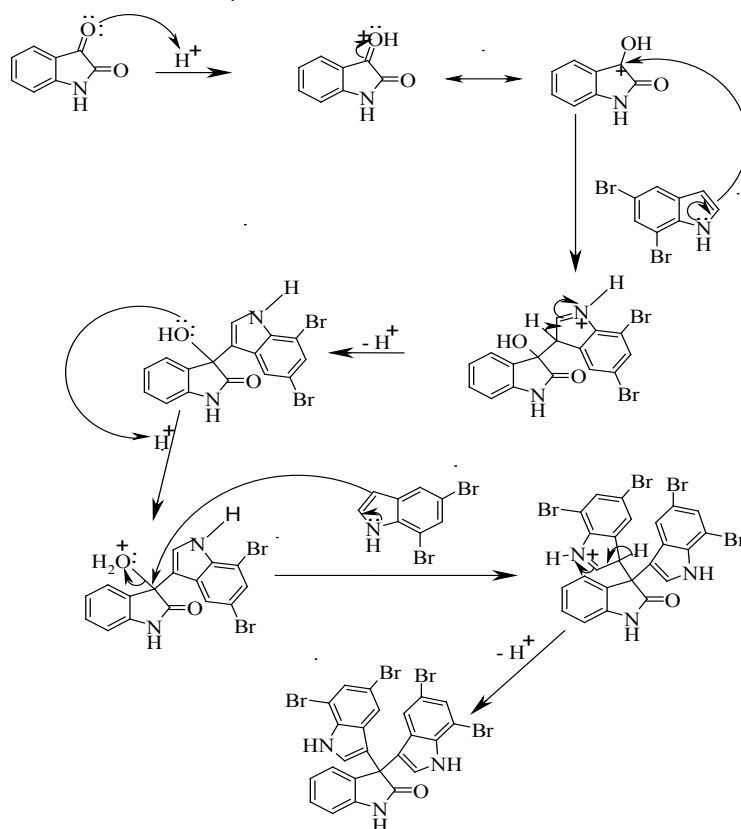
METODE. Sintesis 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4]. Sintesis 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4] dilaksanakan dengan mengadaptasi prosedur sintesis indolinon [3]⁽⁵⁾ (Gambar 2). Larutan 5,7-dibromoindol (0,050 gram; 0,18 mmol) dan isatin (0,013 gram; 0,091 mmol) dalam 15 mL metanol ditambah katalis berupa 1 tetes asam sulfat pekat, dan diaduk pada

suhu kamar selama sembilan hari. Hasil sintesis kemudian ditambah air dingin dan diekstrak tiga kali dengan 20 mL diklorometan. Fase organik selanjutnya digabung, dicuci dengan air, dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Residu yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi kolom *flash* menggunakan gradien eluen *n*-heksan:diklorometan (4:1), (3:1), dan (2:1); *n*-heksan:etil asetat (2:1) sehingga diperoleh 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4].

Uji sitotoksik senyawa [3] dan senyawa [4] terhadap sel kanker kolon WiDr. Uji sitotoksitas 3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-yl)-5-bromoindolin-2-on [3] dan 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4] terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan dengan metode MTT yang dimodifikasi⁽⁶⁾. Senyawa uji [3] dan [4] masing-masing dilarutkan dalam dimetil sulfoksida dan diencerkan dengan media RPMI sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1, 5, 10, 25, 50 dan 100 μ M. Suspensi sel kanker kolon WiDr dalam medium RPMI 1640 sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam plat 96 sumuran (per sumuran berisi $1,5 \times 10^4$ sel) dan diinkubasi selama 24 jam inkubator CO₂. Larutan senyawa uji dalam berbagai seri konsentrasi selanjutnya ditambahkan ke sel kanker kolon WiDr dan diinkubasi lebih lanjut selama 24 jam. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromida (MTT) dalam PBS (*phosphate buffer saline*) ditambahkan ke dalam tiap sumuran pada akhir inkubasi dan inkubasi dilanjutkan selama enam jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan (warna biru tua). Natrium dodesil sulfat kemudian ditambahkan dan campuran diinkubasi semalaman pada suhu kamar. Serapan tiap sumuran diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi dari larutan uji dikonversi dalam bentuk viabilitas sel (%), kemudian dibuat grafik viabilitas sel terhadap log konsentrasi sehingga didapatkan nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4]. Senyawa 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4] yang diperoleh berupa padatan kuning sebanyak 0,029 g atau dengan rendemen 48% dengan titik leleh 195-196°C. Identifikasi dengan spektrometer NMR (dalam DMSO-d₆) diperoleh spektrum ¹H NMR menunjukkan sinyal multiplet pada pergeseran kimia 6,91-7,48 ppm yang merupakan sinyal dari sepuluh proton aromatik, sinyal singlet pada pergeseran kimia 10,85 ppm merupakan sinyal proton NH unit oksindola dan sinyal singlet pada pergeseran kimia 11,60



Gambar 2. Mekanisme reaksi pembentukan indolinon [4].

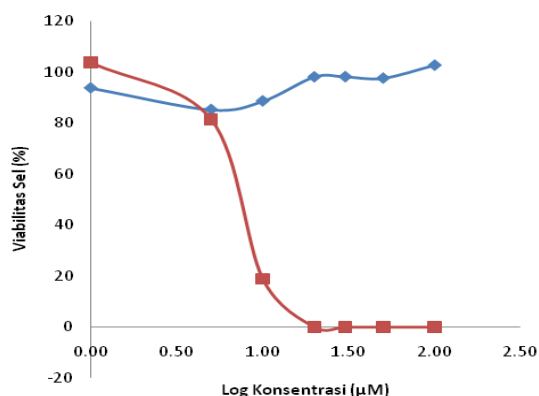
ppm merupakan sinyal dua proton NH unit indola. Identifikasi tersebut diperkuat dengan spektrum ^{13}C NMR yang menunjukkan sinyal karbon kuartener khas pada pergeseran kimia 52,15 ppm dan sinyal karbon karbonil pada pergeseran kimia 177,94 ppm. Karbon-karbon aromatik memberikan sinyal pada pergeseran kimia 105,48; 110,11; 110,94; 114,94; 122,11; 122,15; 124,95; 125,61; 127,18; 128,02; 128,69; 132,73; 134,30 dan 141,16 ppm. Spektrum massa (ESI) senyawa [4] menunjukkan massa ion molekul 683,5036 yang hampir sama dengan massa teoritis untuk $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_8\text{Br}_4$ sebesar 683,0274.

Mekanisme reaksi pembentukan 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)indolin-2-on [4] berlangsung sebagaimana terlihat pada Gambar 2. Reaksi diawali dengan protonasi atom oksigen gugus karbonil C-3 isatin oleh katalis asam sulfat sehingga karbon C-3 semakin kekurangan elektron yang selanjutnya sebagai elektrofil diserang 5,7-dibromolindol melalui reaksi substitusi aromatik elektrofilik sehingga terbentuk intermediet 3-hidroksi-3-(5,7-dibromoindol-3-yl)indolin-2-on [5]. Tahap berikutnya protonasi 3-hidroksi-3-(5,7-dibromoindol-3-yl)indolin-2-on [5] oleh asam pada gugus hidroksi dan diikuti oleh reaksi substitusi aromatik elektrofilik 5,7-dibromoindol sehingga terbentuk 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)indolin-2-on [4].

Uji sitotoksik senyawa [3] dan senyawa [4] terhadap sel kanker kolon WiDr. Uji sitotoksik 3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-yl)-5-bromoindolin-2-on [3] dan 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-yl)-indolin-2-on [4] dilakukan terhadap sel WiDr dengan didasarkan pada kemampuan enzim suksinat dehidrogenase untuk mengkonversi MTT menjadi formazan. Hasil serapan (absorbansi) dari larutan yang diuji (3 dan 4) dikonversi dalam bentuk kurva antara persen kehidupan sel (viabilitas sel) dengan log konsentrasi sehingga didapatkan nilai IC_{50} .

Hasil pengamatan menggunakan ELISA reader pada 595 nm didapatkan absorbansi formazan dan menunjukkan bahwa untuk 3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-yl)-5-bromoindolin-2-on [3] tidak menunjukkan hubungan linier antara log konsentrasi dengan efek sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, sehingga pada uji sitotoksitas tidak dapat dilakukan perhitungan nilai IC_{50} (Gambar 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa [3] tidak sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr pada konsentrasi sampai dengan 100 μM , tetapi tidak menutup kemungkinan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker lain.

Senyawa [4] sebaliknya menunjukkan hubungan yang linier antara log konsentrasi dengan efek sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, yakni



Gambar 3. Kurva viabilitas sel kanker kolon WiDr terhadap log konsentrasi (μM) larutan 3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-on [3], dan 3,3'-Di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4]. \blacklozenge = Senyawa 3; \blacksquare = Senyawa 4.

semakin tinggi log konsentrasi senyawa [4] mengakibatkan viabilitas sel kanker kolon WiDr semakin menurun. Hasil regresi linier dari kurva 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4] pada Gambar 3 diperoleh nilai IC_{50} 6,64 μM yang menunjukkan bahwa 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4] sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr. Senyawa [4] bersifat sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, berbeda dengan senyawa [3] yang mungkin disebabkan adanya empat gugus bromo yang dapat meningkatkan sitotoksitas terhadap sel kanker kolon WiDr. Hal ini sejalan dengan penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa [2] dapat menghambat pertumbuhan sel kanker prostat DU-145 dengan IC_{50} 3,6 μM , sedangkan senyawa [1] hanya 8,7 μM ⁽⁴⁾. Nilai IC_{50} 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4] yang cukup rendah memberikan peluang untuk dikaji lebih lanjut sebagai obat anti kanker.

SIMPULAN

Reaksi substitusi aromatik elektrofilik 5,7-dibromoindol dengan isatin pada kondisi asam diperoleh 3,3'-di(5,7-

dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4] berupa padatan kuning dengan rendemen 48%. 3,3'-Di(5-bromo-N-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-on [3] tidak sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr, sedangkan 3,3'-di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on [4] sitotoksik dengan IC_{50} 6,64 μM .

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ITS yang telah memberikan hibah penelitian, Ahmad Darmawan, M.Sc. dari P2K LIPI yang membantu pengukuran NMR dan Aditya Fitriyani, M.Sc., Apt. dari *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada yang telah membantu dalam uji sitotoksitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. WGO. Practice guidelines: Colorectal cancer screening. USA: World Gastroenterology Organization; 2007.
2. Astuti P, Alam G, Hartati MS, Sari D, Wahyuono S. Uji sitotoksik senyawa alkaloid dari spons *Petrosia* sp.: Potensial pengembangan sebagai antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2005.16(1):58-62.
3. Yoo M, Choi S, Choi KY, Yon GH, Chae JC, Kim D, Zylstra GJ, Kim E. Trisindoline synthesis and anticancer activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2008.376:96-99.
4. Kamal A, Srikanth YVV, Khan MNA, Shaik TB, Ashraf M. Synthesis of 3,3-diindolyl oxyindoles efficiently catalysed by FeCl_3 and their *in vitro* evaluation for anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010. 20(17):5229-31.
5. Mustikasari K, Santoso M. Sintesis 3,3'-Di(5-bromo-N-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona dan uji sitotoksitasnya terhadap sel Vero. *Jurnal Ilmiah Berkala Sains dan Terapan Kimia*. 2012.6(1):1-10.
6. Meiyanto E, Susidarti RA, Handayani S, Rahmi F. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MFC-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2008.19(1):12-19.