

Sintesis Fenil Sinamat dan 4-Fenilkroman-2-on dan Uji Sitotoksitas Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

(Synthesis of Phenyl Cinnamate and 4-Phenylchroman-2-one and Cytotoxicity Activity Test Against HeLa Cervical Cancer Cells)

TENI ERNAWATI^{1*}, DILA FAIRUSI²

¹Pusat Penelitian Kimia-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)
Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan, 15314.

²Jurusan Kimia, Fakultas MIPA-Universitas Indonesia (UI).

Diterima 4 Maret 2013, Disetujui 23 September 2013

Abstrak: Asam sinamat merupakan turunan dari metil sinamat, yang termasuk dalam jalur turunan asam shikimat. Asam sinamat dan analog alaminya dikenal dalam pengobatan kanker selama beberapa abad. Sintesis fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on telah dilakukan dari metil sinamat dengan menggunakan katalis asam. Senyawa metil sinamat terlebih dahulu dikonversi menjadi asam sinamat melalui reaksi hidrolisis dengan basa. Selanjutnya asam sinamat diklorinasi menggunakan tionil klorida dan fenol dan menghasilkan fenil sinamat. Reaksi esterifikasi dengan fenol menggunakan katalis asam *p*-toluen sulfonat menghasilkan senyawa 4-fenilkroman-2-on. Dari penelitian ini diperoleh rendemen hasil sintesis asam sinamat, fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on masing-masing adalah 83,6%, 14,71% dan 16,18%. Uji sitotoksitas senyawa fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on menggunakan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) diperoleh nilai LC_{50} masing-masing sebesar 223,87 dan 112,72 ppm. Hasil uji fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on terhadap sel kanker serviks HeLa (ATCC CCL2) dengan metode MTT didapatkan persentase inhibisi masing-masing adalah di atas 50%.

Kata kunci: fenil sinamat, 4-fenilkroman-2-on, BSLT, sitotoksitas, MTT, sel HeLa.

Abstract: Cinnamic acid is a derivative of methyl cinnamate; it is included in the shikimic acid pathway derivatives. Cinnamic acid and its natural analogue are known as a cancer treatment for several centuries. Synthesis of phenyl cinnamic and 4-phenylchroman-2-one derived from methyl cinnamate had been done by using acid as a catalyst. Methyl cinnamic was first converted into cinnamic acid via hydrolysis reaction with alkaline. After that, cinnamic acid was chlorinated by using thionyl chloride and phenol reagent to produce fenil-sinamat. Esterification reaction was carried out by using an acid catalyst *p*-toluen sulfonic acid and phenol resulting 4-phenylchroman-2-one. We obtained the products for the synthesis of cinnamic acid, cinnamic phenyl and 4-fenilkroman-2-on, with yields respectively of 83.6%, 14.71%, and 16.18%. Cytotoxicity test using the brine shrimp lethality test (BSLT) was conducted on both cinnamic phenyl compound and 4-phenylchroman-2-on compound. LC_{50} values obtained for both compounds respectively were 223.87 ppm and 112.72 ppm. The results of MTT cytotoxicity assay method for cervical cancer HeLa cells (ATCC CCL2) using phenyl cinnamic and 4-phenylchroman-2-on were found that the percentage of inhibition obtained is over 50%.

Keywords: phenyl cinnamate, 4-phenylchroman-2-one, BSLT, cytotoxicity, MTT, HeLa cells.

* Penulis korespondensi, Hp. 08121440039
e-mail: teni001@lipi.go.id

PENDAHULUAN

PENYAKIT kanker telah menjadi salah satu penyebab kematian utama di Indonesia. Data Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2007 menunjukkan bahwa jumlah penderita kanker di Indonesia mencapai 6% dari populasi atau kurang lebih 16 juta pasien⁽¹⁾. Saat ini kanker tidak hanya menyerang orang dewasa, tetapi juga banyak menimpa anak-anak. Menurut Data Rumah Sakit Kanker Darmas (RSKD) tahun 2012, jumlah kasus baru kanker anak mencapai lebih dari 11.000 pasien per tahun di seluruh Indonesia⁽²⁾. Data Badan Kesehatan Dunia (WHO) menyebutkan bahwa tahun 2003, setiap tahun timbul lebih dari 10 juta kasus penderita baru kanker dengan prediksi peningkatan setiap tahun kurang lebih 20%⁽³⁾. Jumlah penderita baru penyakit kanker tahun 2020 diperkirakan meningkat hampir 20 juta penderita. Pada wanita, kanker serviks menduduki peringkat ketiga dengan jumlah kasus sebesar 9,8% dan angka kematian 8,5%⁽²⁾.

Banyak upaya yang dilakukan untuk pengobatan kanker antara lain dengan menggunakan obat-obatan, baik bahan alam maupun sintetis. Alternatif pengobatan kanker lainnya adalah dengan melakukan kemoterapi, penyinaran, pembedahan dan terapi kombinasi. Akan tetapi, masing-masing cara pengobatan kanker tersebut masih memiliki kelemahan, sehingga pengobatan kanker pada umumnya sampai saat ini belum ada yang menunjukkan hasil yang memuaskan. Untuk itu, peluang untuk mencari senyawa bioaktif dari bahan alam ataupun sintesis senyawa sejenis dengan bahan alam untuk pengobatan kanker masih sangat besar.

Metil sinamat merupakan minyak atsiri yang banyak terkandung pada spesies *Alpinia malaccensis* dari famili *Zingiberaceae*, dan termasuk salah satu kelompok penting dari tanaman obat⁽³⁾. Metil sinamat telah berhasil diisolasi dari *A. malaccensis* dengan rendemen yang tinggi dan kemurnian yang baik⁽⁴⁾. Penelitian di bidang organik sintesis terhadap derivat metil sinamat juga telah berkembang. Asam sinamat merupakan turunan dari metil sinamat, yang termasuk dalam jalur turunan asam shikimat⁽⁵⁾.

Asam sinamat dan analog alaminya dikenal sebagai pengobatan kanker selama beberapa abad. Ginsenosida Rg1 dari ginseng, asam sinamat dari Xuanshen dan tanshinon IIA dari Danshen (RCT) merupakan bahan pengobatan tradisional untuk menjaga agar tetap awet muda dan menjaga keseimbangan seluruh tubuh untuk mencegah penyakit. Eksplorasi lebih jauh, RCT diberikan pada sel osteosarkoma MG-63, bentuk histologis paling umum dari kanker tulang primer, dan penurunan ekspresi nukleoplasmin dalam matriks nuklear berkaitan dengan induksi nukleoplasmin,

translokasi dari nukleolus ke nukleoplasma dan sitoplasma ditelusuri dan diamati. Penyelidikan lebih lanjut oleh Shi dkk. mengungkapkan bahwa pengaturan RCT oleh *c-myc* dan *c-fosonkogen*, P53 dan Rbgen supresor tumor, prohibitin, sebuah penekan tumor protein, dalam matriks nuklear dan berubah prohibitin dari nukleolus ke sitoplasma. Namun, peran yang tepat dari asam sinamat dalam kombinasi RCT belum terpecahkan⁽⁶⁾.

Senyawa turunan asam sinamat lainnya adalah asam kafeat, sinamida, sinamoil ester dan hidrazid sinamat. Senyawa-senyawa turunan asam sinamat tersebut, baik natural maupun sintetis, telah dilakukan pengujian antikanker. Asam sinamat dan beberapa senyawa turunannya telah diperiksa sebagai inhibitor yang baik terhadap aktivitas AKR1C3. AKR1C3 merupakan sel kanker yang terbentuk dengan adanya hormon, seperti kanker prostat, kanker payudara dan kanker endometrial. Asam sinamat merupakan inhibitor yang baik terhadap AKR1C3 ($IC_{50} = 50 \mu M$) sebagaimana asam 3,4,5-trimetoksisinamat ($IC_{50} = 50 \mu M$). Di samping itu, asam kafeat mempunyai aktivitas sitotoksik *in vitro* yang rendah melawan sel myeloid leukemia (HL-60) dan berpotensi sebagai agen kemopreventif melawan kanker kulit⁽⁷⁾. Telah dilakukan sintesis senyawa asam sinamat dengan senyawa guanilhidrazon. Hasil sintesisnya memiliki aktivitas yang tinggi untuk melawan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv yang merupakan penyebab penyakit tuberkulosis (TB)⁽⁸⁾.

Bairwa, dkk.⁽⁸⁾ dan Li, dkk.⁽⁹⁾ melaporkan sintesis asam sinamat dengan tionil klorida menghasilkan halida asam⁽⁸⁾. Halida asam ini dapat direaksikan dengan alkohol sehingga menjadi ester sinamat (sinamoil ester). Ester sinamat merupakan kelompok senyawa antikanker. Beberapa ester sinamat yang diisolasi dari propolis Belanda, benzilkafeate, fenetilkafeate dan sinamoilkafeate, memiliki potensi sebagai senyawa anti proliferasi terhadap karsinoma usus besar 26-L5 dengan nilai EC_{50} berturut-turut 0,288, 1,76 dan 0,114 $\mu g/mL$. Fenetilkafeate (*caffeic acid phenethyl ester*, CAPE) memiliki beberapa aktivitas biologi, yaitu antioksidan, antiinflamasi dan dapat menghambat pertumbuhan tumor⁽⁷⁾.

Sementara itu, salah satu metode pembuatan kumarin adalah dengan hidroarilasi asam sinamat dan fenol menggunakan asam kuat⁽⁹⁾. Senyawa turunan kumarin telah lama dikenal memiliki aktivitas biologi yang luas, seperti antiinflamasi, antioksidan, *anti-aging* dan antikanker. Eskuletin berpotensi paling baik diantara kumarin lainnya sebagai penangkap radikal pada pengujian antioksidan⁽¹⁰⁾. 7-isopenteniloksi-kumarin merupakan salah satu senyawa aktif dari *Heracleum lanatum* Michx. (*Umbelliferae*) sebagai

senyawa pencegah pembentukan tumor kulit⁽¹¹⁾. Kalanon (senyawa derivat kumarin) dari *Callophyllum* sp. mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel kanker serviks HeLa dengan IC_{50} 22,887 μ M⁽¹²⁾. Kumarin juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} 54,2 μ M⁽¹³⁾.

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan sintesis senyawa turunan metil sinamat, fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on, serta melakukan uji aktivitas inhibisi senyawa tersebut terhadap pertumbuhan sel HeLa.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan dalam penelitian ini adalah metil sinamat hasil isolasi dari lengkuas (*A. malaccensis*), natrium hidroksida (NaOH, Merck), tionil klorida ($SOCl_2$, WAKO), fenol (Merck), asam *p*-toluen sulfonat monohidrat (*p*-TSOH, Sigma), metanol, etanol, butanol, etil asetat, diklorometan, *n*-heksana, asam klorida (HCl), natrium sulfat anhidrat (Na_2SO_4), dimetil sulfoksida (DMSO), plat kromatografi lapis tipis GF₂₅₄ (Merck), air laut, larva udang (*Artemia salina*) dan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

Alat. Rotary evaporator, lampu UV, spektrofotometer UV-Vis dan spektrometer ¹H-NMR (500 MHz) dan ¹³C-NMR (125 MHz), Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) dan Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS).

METODE. Sintesis asam sinamat. Metil sinamat 5 g (31 mmol) ditambahkan dengan etanol 50 mL dan 5 M NaOH 10 mL. Campuran ini dipanaskan sampai suhu 55°C dalam penangas minyak dan distirer. Reaksi berlangsung sempurna selama 2 jam dilihat dari hasil kromatografi lapisan tipis (KLT). Hasil reaksi diuapkan kemudian diekstraksi dengan menggunakan butanol dan air suling. Hasil reaksi dinetralkan dengan penambahan HCl 1%. Ekstraksi dilakukan beberapa kali. Fasa butanol diuapkan dengan suhu 60°C dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C. Hasil reaksi hidrolisis ditimbang dan diidentifikasi dengan spektrometer ¹H NMR, ¹³C NMR serta LC-MS.

Sintesis fenil sinamat. Asam sinamat dimasukkan dalam labu bundar ditambahkan tionil klorida ($SOCl_2$). Campuran direfluks pada suhu 70-80°C dan distirer^(6,8). Setelah 2 jam, campuran reaksi ditambahkan fenol (perbandingan mol ekuivalen asam sinamat : $SOCl_2$: fenol = 1 : 2 : 1). Reaksi dilakukan sampai diperoleh bercak senyawa yang berbeda dengan bercak senyawa bahan awalnya. Hasil reaksi didinginkan kemudian diekstraksi dengan etil asetat dan air suling beberapa kali. Fasa etil asetat digabungkan dan ditambahkan natrium sulfat (Na_2SO_4) anhidrat untuk mengikat sisa air. Fasa etil asetat diuapkan kemudian dilanjutkan

dengan pemurnian menggunakan kolom kromatografi silika gel (menggunakan eluen *n*-heksana - etil asetat (10:1 v/v)). Fraksi-fraksi hasil pemisahan diidentifikasi dengan KLT dan yang memiliki nilai *R_f* yang sama digabungkan, kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator. Hasil fraksi yang telah memiliki bercak tunggal pada KLT kemudian ditimbang dan diidentifikasi dengan ¹H NMR dan ¹³C NMR.

Sintesis 4-fenilkroman-2-on. Asam sinamat ditambahkan dalam labu bundar kemudian direaksikan dengan asam *p*-TSOH dan fenol dalam labu 30 mL dengan perbandingan mol ekuivalen 1 : 1,2 : 1,2 secara berturut-turut. Campuran dipanaskan dengan penangas minyak hingga suhu 125°C dan di-stirrer selama 3 jam. Reaksi ini berlangsung tanpa menggunakan pelarut. Hasil reaksi dilarutkan dengan etil asetat kemudian pH dinetralkan dengan menggunakan NaOH 5 M untuk menetralkan asam *p*-TSOH. Hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat dan air suling beberapa kali. Fasa etil asetat digabungkan dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, kemudian fasa etil asetat diuapkan dan selanjutnya dimurnikan melalui pemisahan dengan kolom kromatografi menggunakan eluen *n*-heksana - etil asetat (10:1 v/v)⁽¹⁴⁾. Fraksi-fraksi hasil pemisahan diidentifikasi dengan KLT dan yang memiliki nilai *R_f* yang sama digabungkan, kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator. Hasil fraksi yang telah memiliki bercak tunggal pada KLT kemudian ditimbang dan diidentifikasi dengan ¹H NMR dan ¹³C NMR.

Uji toksisitas secara BSLT^(15,16). Kurang lebih 50-100 mg telur udang *Artemia salina* Leach ditetaskan di dalam wadah persegi panjang (2x10 cm) yang dilengkapi pembatas (wadah tampak seperti dua bagian: satu bagian tertutup aluminium satu bagian lagi bagian terang di bawah lampu neon) dan telah diisi air laut. Bagian yang berisi telur ditutup dengan aluminium dan dibiarkan selama 48 jam di bawah sinar lampu neon 10 Watt. Telur akan menetas dan larva-larva udang yang akan diuji diambil dengan pipet pada bagian yang terang. Senyawa murni yang akan diuji dibuat variasi konsentrasi 2000, 1000, 200 dan 20 ppm dalam air laut. Bila senyawa tidak larut, ditambahkan 10 μ L DMSO.

Larva udang yang hidup sebanyak 10-15 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 μ L air laut, ditambahkan larutan yang akan diuji masing-masing sebanyak 100 μ L, sehingga konsentrasi akhir menjadi 10, 100, 500 dan 1000 ppm. Larutan sampel yang akan diujikan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan, kemudian didiamkan selama 24 jam. Larva yang mati dan yang hidup dihitung jumlahnya. Selanjutnya

tingkat mortalitas dihitung dengan membagi jumlah larva yang mati dengan jumlah total larva. Kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas sehingga diperoleh persamaan garis regresi linier $y = ax + b$. Nilai LC_{50} diperoleh dengan memasukkan nilai $y = 50$, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50% larva, yang disebut LC_{50} .

Uji sitotoksitas dengan metode MTT^(1,17,18).

Senyawa uji dibuat larutan stok sebanyak 1000 ppm dengan dimetilsulfoksida. Larutan stok kemudian diencerkan dengan media *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) untuk uji terhadap sel HeLa (ATCC CCL₂) sehingga diperoleh variasi konsentrasi larutan uji 100, 50 dan 10 ppm. Sel HeLa ditumbuhkan dalam media DMEM dan didistribusikan ke dalam 96 *well plate* dengan jumlah 2000 sel/sumuran (100 μ L) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5%. Larutan uji dalam berbagai variasi konsentrasi masing-masing ditambahkan ke dalam sel HeLa dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Setiap senyawa uji diuji sebanyak tiga kali pengulangan.

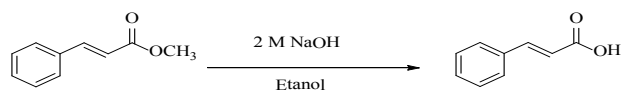
Pereaksi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il(-2,5-difenil tetrazolium bromida) (MTT) ditambahkan dalam larutan natrium hidrogen karbonat (NaHCO₃) sehingga diperoleh konsentrasi tertentu. Ke dalam tiap sumuran untuk setiap konsentrasi kemudian ditambahkan masing-masing 10 μ L larutan MTT dan diinkubasi lebih lanjut selama 4 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan. Sel yang hidup akan mengkonversikan MTT menjadi formazan yang berwarna ungu muda, sedangkan sel yang mati akan berwarna biru tua.

Formazan yang terbentuk dilarutkan dalam 10 μ L etanol 96%. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 562 nm. Persentase hambatan proliferasi dihitung berdasarkan nilai *optical density* (OD) dengan rumus: % inhibisi = $\{(\text{rerata OD kontrol} - \text{rerata OD larutan uji}) / (\text{rerata OD kontrol})\} \times 100\%$. Hasil % inhibisi kemudian dibuat grafik dengan konsentrasi atau log konsentrasi dan diperoleh persamaan garis regresi linier. Harga viabilitas sel 50% dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier yang diperoleh sehingga diperoleh nilai IC_{50} larutan uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan baku awal yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa metil sinamat hasil isolasi dari *Alpinia malaccensis*. Sintesis diawali dengan reaksi hidrolisis metil sinamat menjadi asam sinamat (Gambar 1), kemudian dilanjutkan dengan reaksi esterifikasi.

Reaksi hidrolisis metil sinamat pada penelitian

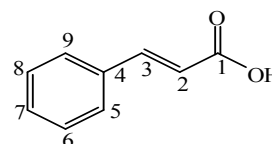


Gambar 1. Hidrolisis metil sinamat menjadi asam sinamat.

ini menggunakan katalis basa natrium hidroksida. Reaksi berlangsung sempurna setelah 2 jam dengan pengecekan KLT. Hasil reaksi diuapkan kemudian didinginkan, dilanjutkan dengan penetralan pH dengan asam klorida, kemudian partisi hasil reaksi menggunakan butanol dengan air suling. Hasil reaksi tertarik oleh butanol. Fasa butanol kemudian diuapkan dan dikeringkan. Hasil reaksi hidrolisis metil sinamat adalah senyawa berupa serbuk putih dengan rendemen sebesar 83,6 %.

Katalis basa yang digunakan dalam reaksi hidrolisis sangat berperan. Hidrolisis metil sinamat dengan basa berlangsung dalam dua tahap. Mekanisme diawali dengan penyerangan oleh gugus hidroksi (OH⁻) dari NaOH ke karbon pada gugus fungsi ester (gugus karbonil) sehingga terbentuk intermediet tetrahedral (sp³). Selanjutnya, gugus metoksi (CH₃O) akan lepas dari senyawa metil sinamat, sehingga karbon dari karbonil akan terhibridisasi kembali dari sp³ menjadi ikatan rangkap (sp²). Gugus metoksi digantikan oleh gugus hidroksi (OH⁻) yang berasal dari NaOH. Hasil sintesis asam sinamat (Gambar 2) ini diidentifikasi dengan menggunakan ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan LC-MS. Hasil identifikasi dengan ¹H-NMR dan ¹³C-NMR dapat dilihat pada Tabel 1.

Pergeseran kimia atom H dan C pada posisi 5 sama



Gambar 2. Struktur molekul asam sinamat.

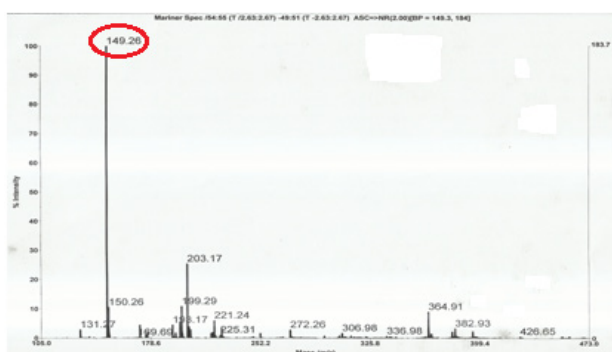
Tabel 1. Hasil analisis ¹H NMR dan ¹³C NMR produk reaksi hidrolisis.

| Posisi | δ C (ppm) | δ H (ppm) (multiplisitas, jumlah H, J dalam Hz) |
|--------|------------------|--|
| 1 | 172,9 | -- |
| 2 | 117,5 | 6,49 (1H, d, J= 16 Hz) |
| 3 | 147,3 | 7,83 (1H, d, J= 16 Hz) |
| 4 | 134,2 | -- |
| 5 | 130,9 | 7,57 (1H, dd, J= 2,0 Hz; J=5,2 Hz) |
| 6 | 129,1 | 7,42 (1H, t, J=5,2 Hz) |
| 7 | 128,6 | 7,42 (1H, t, J=5,2 Hz) |
| 8 | 129,1 | 7,42 (1H, t, J=5,2 Hz) |
| 9 | 130,9 | 7,57 (1H, dd, J= 2,0 Hz; J=5,2 Hz) |

dengan posisi 9, sinyal muncul pada δH 7,57 ppm dan δC 130,9 ppm. Nilai pergeseran kimia yang sama ini menunjukkan bahwa lingkungan kimia pada posisi tersebut adalah sama. Sementara itu, kopling konstan (J) pada pergeseran kimia 6,49 ppm (atom H no. 2) sebesar 16,0 Hz dan kopling konstan pada pergeseran kimia 7,83 ppm (atom H no. 3) juga 16,0 Hz. Nilai kopling konstan tersebut menandakan bahwa kedua atom H pada posisi *trans*, sehingga senyawa hasil hidrolisis adalah asam *trans* sinamat. Asam sinamat memiliki dua proton yang terisolir, yaitu proton yang berkonfigurasi *trans*. Spektrum proton tersebut yang ditunjukkan pada NMR berbentuk *doublet*.

Hasil analisis reaksi hidrolisis dengan LC-MS, pada kromatogram LC dengan waktu retensi 2,6 menit menunjukkan adanya ion molekul 149,26 g/mol ($M+1$)⁺ (Gambar 3). Berat molekul tersebut menunjukkan bahwa senyawa hasil hidrolisis adalah asam sinamat dengan berat molekul (M)⁺ = 148,26 g/mol.

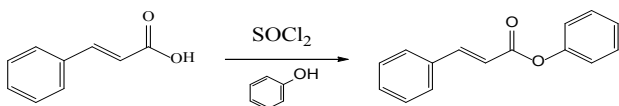
Sintesis fenil sinamat diawali dengan mereaksikan



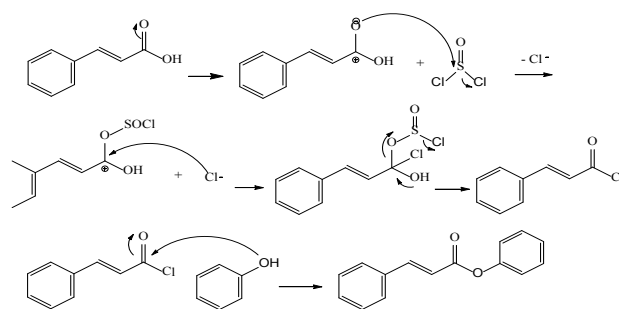
Gambar 3. Profil spektroskopi massa asam sinamat.

asam sinamat dan tionil klorida (SOCl_2). SOCl_2 berperan sebagai aktivator, sehingga reaksi antara asam sinamat dengan SOCl_2 menghasilkan halida asam, yaitu sinamoil klorida. Setelah dua jam, campuran reaksi ditambah dengan fenol. Reaksi ini berjalan secara langsung (Gambar 4) untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Hasil reaksi asam sinamat, SOCl_2 dan fenol berupa padatan putih, yaitu fenil sinamat, dengan mekanisme reaksi sebagaimana diusulkan dalam Gambar 5.

Mekanisme sintesis fenil sinamat diawali dengan gugus hidroksi pada asam sinamat digantikan oleh ion klorida dari tionil klorida. Gugus $-\text{COOH}$



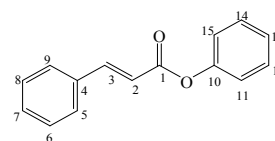
Gambar 4. Reaksi asam sinamat dengan fenol menggunakan katalis SOCl_2 .



Gambar 5. Perkiraan mekanisme reaksi sintesis fenil sinamat.

(karboksilat) menjadi gugus $-\text{COCl}$ sehingga asam sinamat menjadi sinamoil klorida. Aktivasi gugus $-\text{COOH}$ menjadi $-\text{COCl}$ dilakukan karena ion klorida merupakan gugus pergi (*leaving group*) yang baik dibandingkan dengan gugus hidroksi. Selanjutnya, sinamoil klorida bereaksi dengan fenol menjadi ester fenol atau fenil sinamat (Gambar 6). Padatan putih fenil sinamat yang diperoleh diidentifikasi dengan ^1H NMR dan ^{13}C NMR. Hasil analisis fenil sinamat dengan ^1H NMR dan ^{13}C NMR dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 2.

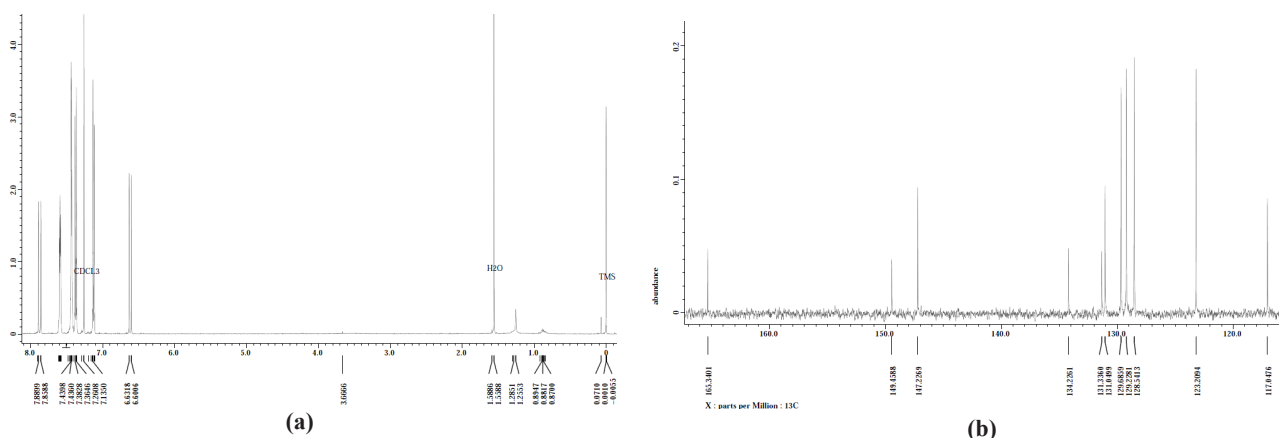
Sintesis 4-fenilkroman-2-on dalam penelitian ini



Gambar 6. Postulasi fenil sinamat.

Tabel 2. Hasil analisis ^1H NMR dan ^{13}C NMR fenil sinamat.

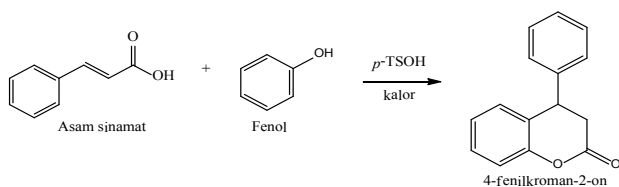
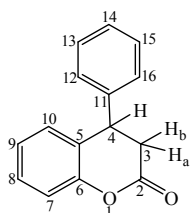
| Posisi | δC (ppm) | δH (ppm) (jumlah H, multiplisitas, J dalam Hz) |
|--------|------------------|---|
| 1 | 165,3 | ---- |
| 2 | 117,0 | 6,63 (1H, <i>d</i> , J=15,6 Hz) |
| 3 | 147,2 | 7,89 (1H, <i>d</i> , J=15,6 Hz) |
| 4 | 134,2 | ---- |
| 5 | 128,5 | 7,60 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=7,8Hz) |
| 6 | 129,2 | 7,39 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=7,8Hz) |
| 7 | 131,3 | 7,36 (1H, <i>t</i> , J=7,2 Hz) |
| 8 | 129,2 | 7,39 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=7,2 Hz) |
| 9 | 128,5 | 7,60 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=7,8Hz) |
| 10 | 149,5 | ---- |
| 11 | 123,2 | 7,14 (1H, <i>dd</i> , J=2,6 Hz; J=7,1Hz) |
| 12 | 129,7 | 7,44 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=6,5Hz) |
| 13 | 131,0 | 7,43 (1H, <i>t</i> , J=6,5 Hz) |
| 14 | 129,7 | 7,44 (1H, <i>dd</i> , J=2,0 Hz; J=6,5Hz) |
| 15 | 123,2 | 7,14 (1H, <i>dd</i> , J=2,6 Hz; J=7,1 Hz) |

Gambar 7. Spektrum ^1H NMR (a) dan ^{13}C NMR fenil sinamat (b).

menggunakan katalis asam *p*-toluensulfonat (*p*-TsOH). Katalis asam digunakan untuk mempercepat reaksi esterifikasi karena reaktan sangat sulit bereaksi sehingga membutuhkan adanya katalis⁽¹⁹⁾. Reaksi ini dilakukan pada suhu sekitar 125°C dan tidak menggunakan pelarut. Suhu yang tinggi tersebut memungkinkan bahan-bahan yang digunakan dalam reaksi meleleh sehingga memungkinkan reaksi berlangsung tanpa pelarut.

Reaksi asam sinamat dengan fenol menggunakan katalis asam *p*-TsOH menghasilkan senyawa 4-fenilkroman-2-on (Gambar 8). Mekanisme reaksi diawali dengan reaksi esterifikasi, dimana akan terjadi pembentukan ester antara asam sinamat dengan fenol, dibantu katalis asam. Setelah itu, dilanjutkan dengan siklisasi tipe Friedel-Crafts intramolekuler sehingga terbentuk turunan 4-fenilkroman-2-on (Gambar 11)⁽²⁰⁾. Siklisasi tipe Friedel-Crafts ini terjadi karena alkena menyerang proton dari asam kuat *p*-TsOH⁽²¹⁾. Senyawa hasil sintesis ini diidentifikasi dengan ^1H NMR dan ^{13}C NMR.

Tidak adanya alkena pada 4-fenilkroman-2-on

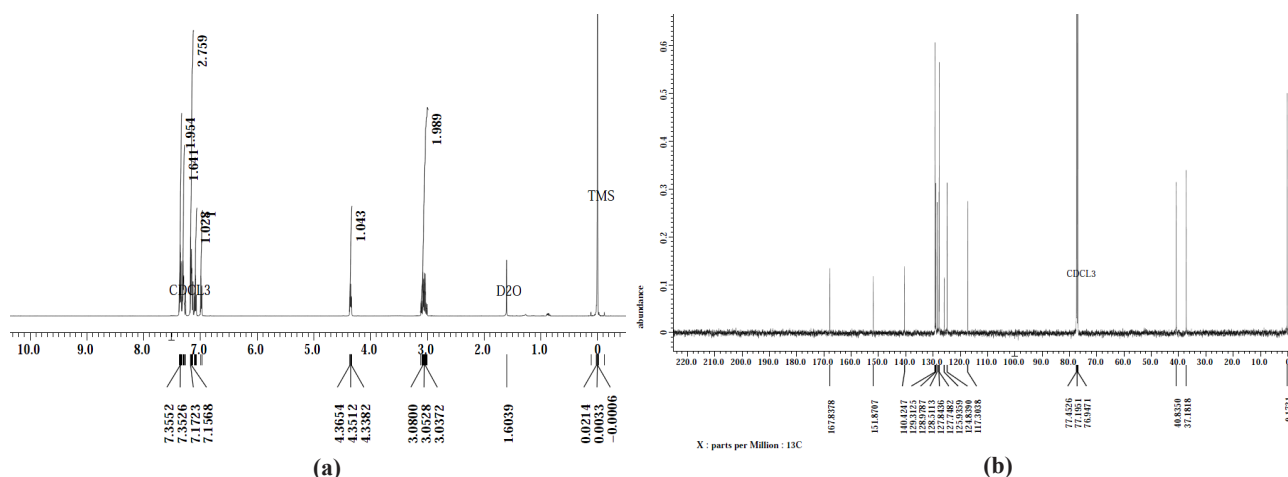
Gambar 8. Reaksi asam sinamat dengan fenol menggunakan katalis asam *p*-TsOH.

Gambar 9. Postulasi 4-fenilkroman-2-on.

Tabel 3. Hasil analisis ^1H NMR dan ^{13}C NMR 4-fenilkroman-2-on.

| Posisi | δC (ppm) | δH (ppm) (jumlah H, multiplisitas, J dalam Hz) |
|--------|------------------------|--|
| 2 | 167, 8 | -- |
| 3a | 37,2 | 3,09 (1H, <i>dd</i> , $J=7,0$ Hz; $J=10,0$ Hz) |
| 3b | 37,2 | 3,06 (1H, <i>dd</i> , $J=7,0$ Hz; $J=10,0$ Hz) |
| 4 | 40,8 | 4,37 (1H, <i>t</i> , $J=7,0$ Hz) |
| 5 | 125,9 | -- |
| 6 | 151,9 | -- |
| 7 | 117,3 | 7,15 (1H, <i>dd</i> , $J=3,3$ Hz; $J=7,8$ Hz) |
| 8 | 128,5 | 7,17 (1H, <i>t</i> , $J=7,8$ Hz) |
| 9 | 124,8 | 7,15 (1H, <i>dd</i> , $J=3,3$ Hz; $J=7,8$ Hz) |
| 10 | 129,0 | 6,99 (1H, <i>d</i> , $J=7,8$ Hz) |
| 11 | 140,4 | -- |
| 12 | 127,7 | 7,32 (1H, <i>dd</i> , $J=2,0$ Hz; $J=6,5$ Hz) |
| 13 | 129,3 | 7,37 (1H, <i>dd</i> , $J=6,5$ Hz; $J=7,0$ Hz) |
| 14 | 127,8 | 7,10 (1H, <i>t</i> , $J=7,0$ Hz) |
| 15 | 129,3 | 7,37 (1H, <i>dd</i> , $J=6,5$ Hz; $J=7,0$ Hz) |
| 16 | 127,7 | 7,32 (1H, <i>dd</i> , $J=2,0$ Hz; $J=6,5$ Hz) |

dibuktikan dengan spektrum ^1H -NMR yang berbeda pada spektrum asam sinamat. Spektrum asam sinamat terdapat alkena (olefin) pada posisi 6,49 dan 7,83 ppm. Spektrum 4-fenilkroman-2-on tidak ditemukan alkena, tetapi terdapat metin dan metilen. Posisi proton metin pada δH 4,37 ppm (H-4) lebih *downfield* dibandingkan dengan proton metilen pada δH 3,06 dan 3,09 ppm (H-3) karena posisi proton metin merupakan 2α dari dua cincin benzen dan β dari gugus karboksil ($-\text{COO}-$). Pada spektrum ^1H NMR, puncak proton metin adalah triplet. Puncak proton metin seharusnya ada empat puncak, yaitu *doublet-doublet* antara proton metin



Gambar 10. Spektrum ^1H NMR (a) dan ^{13}C NMR 4-fenilkroman-2-on (b).

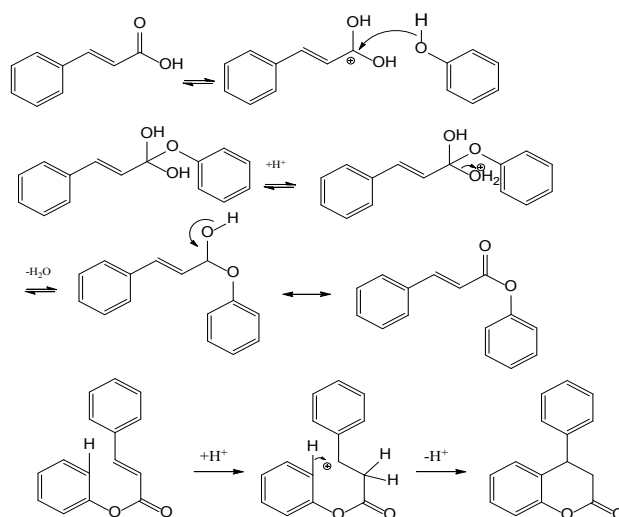
dengan dua proton metilen. Puncak *doublet-doublet* menjadi *triplet* kemungkinan dua puncak di tengahnya bergabung menjadi satu puncak karena besar kopling konstantanya sama, yaitu 7 Hz. Sementara itu, puncak proton metilen adalah multiplet yang berjumlah delapan puncak. Kedelapan puncak ini adalah bentuk *doublet-doublet* antara dua buah proton metilen dengan proton metin (*dd-dd*).

Proton pada posisi 12 memiliki pergeseran kimia yang sama dengan proton 16, yaitu pada δH 7,32 ppm. Sementara itu, proton 13 memiliki pergeseran kimia yang sama dengan proton 15 pada δH 7,37 ppm.

Dari spektrum ^{13}C NMR, terdapat sinyal karbon dari gugus ester ($-\text{COO}-$) dengan pergeseran kimia 167,8 ppm. Karbon metin ditunjukkan pada pergeseran kimia 40,84 ppm. Sinyal ini lebih *downfield* dibanding dengan karbon metilen pada δC 37,2 ppm. Pergeseran kimia 151,9 merupakan salah satu karbon kuartener dari aromatis, yaitu pada posisi 6. Sinyal ini lebih *downfield* karena karbon pada posisi tersebut berikatan dengan oksigen. Karbon lainnya pada gugus aromatik berada pada pergeseran kimia antara 120-140 ppm. Dari hasil analisis spektrum NMR, dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-fenilkroman-2-on yang diperoleh adalah 4-fenilkroman-2-on dengan rendemen 16,18% dan titik leleh 78°C .

Uji toksisitas secara BSLT. Asam sinamat dan 4-fenilkroman-2-on memiliki tingkat toksisitas yang aktif (Tabel 4). Tingkat toksisitas 4-fenilkroman-2-on bahkan lebih besar dibandingkan dengan metil sinamat dan asam sinamat. Secara kimia, tingkat toksisitas metil sinamat dan senyawa turunannya dapat dilihat dari strukturnya. Metil sinamat juga asam sinamat memiliki gugus α , β karbonil tak jenuh, yaitu sebuah bagian aktif yang sering digunakan dalam disain obat anti kanker. Tingkat toksisitas metil sinamat dan turunannya dari yang terbesar adalah 4-fenilkroman-2-on, metil sinamat, asam sinamat dan fenil sinamat.

Adanya tingkat toksisitas yang aktif pada derivat metil sinamat ini memungkinkan senyawa derivat metil sinamat untuk dianalisis lebih lanjut sebagai kandidat antikanker.



Gambar 11. Postulasi mekanisme reaksi sintesis 4-fenilkroman-2-on.

Tabel 4. Hasil pengujian toksisitas dengan metode BSLT.

| No. | Sampel | Nilai LC_{50} (ppm) | Keterangan |
|-----|--------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | Metil sinamat | 144,21 | Aktif |
| 2 | Asam sinamat | 169,82 | Aktif |
| 3 | Fenil sinamat | 223,87 | Kurang aktif |
| 4 | 4-fenilkroman-2-on | 112,72 | Aktif |

Uji sitotoksitas dengan metode MTT. Uji sitotoksitas terhadap sel kanker serviks HeLa dilakukan dengan metode MTT. Hasil pengujian pada fenil sinamat tercantum dalam Tabel 5, sedangkan hasil pengujian sitotoksitas dengan metode MTT pada 4-fenilkroman-2-on tercantum dalam Tabel 6.

Tabel 5. Hasil pengujian sitotoksitas fenil sinamat dengan metode MTT.

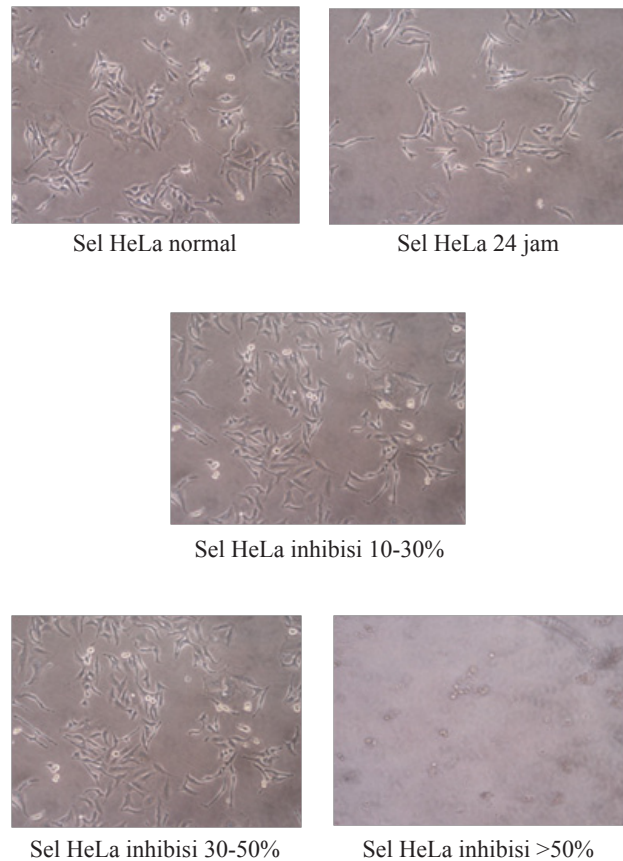
| Konsentrasi (ppm) | Ulangan | | | Rerata | % Inhibisi |
|-------------------|---------|-------|-------|--------|------------|
| | OD1 | OD2 | OD3 | | |
| 100 | 0,065 | 0,063 | 0,088 | 0,072 | 62,82 |
| 50 | 0,058 | 0,06 | 0,084 | 0,067 | 65,23 |
| 10 | 0,069 | 0,065 | 0,113 | 0,082 | 57,49 |
| Kontrol | 0,183 | 0,196 | 0,202 | 0,194 | 0,00 |

Tabel 6. Hasil pengujian sitotoksitas 4-fenilkroman-2-on dengan metode MTT.

| Konsentrasi (ppm) | Ulangan | | | Rerata | % Inhibisi |
|-------------------|---------|-------|-------|--------|------------|
| | OD1 | OD2 | OD3 | | |
| 100 | 0,098 | 0,089 | 0,094 | 0,094 | 51,64 |
| 50 | 0,114 | 0,071 | 0,085 | 0,090 | 53,53 |
| 10 | 0,081 | 0,092 | 0,076 | 0,083 | 57,14 |
| Kontrol | 0,183 | 0,196 | 0,202 | 0,194 | 0,00 |

Nilai inhibisi pertumbuhan sel HeLa seharusnya bersifat *dose dependent*, artinya semakin tinggi dosis, persentase hambatan pertumbuhan semakin besar. Persentase inhibisi fenil sinamat pada pertumbuhan sel HeLa awalnya meningkat dengan peningkatan konsentrasi, tetapi pada konsentrasi 100 ppm terjadi penurunan persentase inhibisi. Hal ini kemungkinan karena senyawa bersifat *dual effect*, yaitu senyawa yang dapat mendorong dan menghambat proliferasi sel, tergantung pada besarnya konsentrasi senyawa tersebut. Hal seperti ini pernah dilaporkan oleh Sumaryono dkk.,⁽¹⁸⁾ yaitu senyawa dari fraksi *n*-heksana dan fraksi air dari ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* terhadap sel HeLa yang bersifat *dual effect*. Hasil pengujian sitotoksitas pada 4-fenilkroman-2-on terjadi sebaliknya. Semakin besar konsentrasi, semakin kecil persentase inhibisi pada pertumbuhan sel HeLa. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis senyawa 4-fenilkroman-2-on semakin tidak berperan dalam penghambatan pertumbuhan sel HeLa.

Pengujian sitotoksitas dengan metode MTT menunjukkan bahwa persentase inhibisi fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on di atas 50%. Ini menyatakan kedua senyawa tersebut aktif dalam penghambatan pertumbuhan sel HeLa. Dari kedua tabel di atas, diketahui bahwa penghambatan terbaik pada sel HeLa terjadi dengan penambahan dosis fenil sinamat. Namun demikian, pengujian antikanker lebih lanjut perlu dilakukan terhadap fenil sinamat.

**Gambar 12. Aktivitas pertumbuhan sel HeLa normal, sel HeLa setelah 24 jam dan sel HeLa setelah inhibisi oleh fenil sinamat.**

SIMPULAN

Senyawa fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on telah dapat disintesis dengan bahan baku awal asam sinamat dan fenol menggunakan katalis asam dengan rendemen hasil 14,71% dan 16,18%. Uji BSLT pada senyawa fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on memberikan nilai LC_{50} masing-masing sebesar 223,87 dan 112,72 ppm dan uji sitotoksitas terhadap sel HeLa dengan metode MTT pada fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on menunjukkan bahwa penghambatan terhadap pertumbuhan sel HeLa paling baik terjadi pada penambahan dosis fenil sinamat sehingga senyawa fenil sinamat dan 4-fenilkroman-2-on dinilai berpotensi sebagai senyawa antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Muhammad Hanafi yang telah memberikan arahan dan saran pada tulisan ini. Penelitian ini didanai oleh Program Kompetitif LIPI (Nomor 1014/F/2011 Tahun 2011).

DAFTAR PUSTAKA

- Hariyanti, Nefranita E, Santoso M. Sintesis dan uji sitotoksitas 5-floro-3-hidroksi-3 (¹H-indol-3-il) indolin-2-on dan 3-hidroksi-5floro-1-metil-3(¹H-indol-3-il) indolin-2-on terhadap sel WiDr dan HeLa [skripsi]. Surabaya: Jurusan Kimia Institut Teknologi Surabaya; 2010.
- Parkin MD, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*. 1999. 49:33–64.
- Sinaga E. *Alpinia galanga* (L.) Willd., Lengkuas. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat UNAS (P3TO UNAS). Diambil dari URL: http://www.warintek.ristek.go.id/pangan_kesehatan/tanaman_obat/depkes/Bunglai%20laki.pdf. diakses tanggal 10 Mei 2012.
- Ernawati T, Wahyuningrum D, Minarti, Anita Y, Meilawati L, Lotulung PD. Development of raw materials for drugs by using methyl trans cinnamate isolated from galanga (*Alpinia malaccensis*) as novel approaches to drug discovery. In: *The Eijkman Institute Comes of Age: Vitamins, Genomics, dan Welfare*. Jakarta: Eijkman Institute for Molecular Biology; 2011. 146.
- Muchtaridi, Ikhsan R, Ida M. Kadar metil sinamat dari batang, daun dan rimpang tumbuhan laja gowah (*Alpinia malaccensis* (Burm f.)) dengan GC/MS [skripsi]. Bandung: Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran; 2008.
- Li QF, Shi SL, Liu QR, Tang J, Song J, Liang Y. Anticancer effects of ginsenoside Rg1, cinnamic acid and tanshinone in osteosarcoma MG-63 cells: Down regulation and cytoplasmic trafficking of nucleophosmin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008. (40):1918–29.
- Baltas MPDe, Belval FB. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents- A review. *Current Medicinal Chemistry*. 2011.18:1672–1703.
- Bairwa R, Mariam SD, *et al*. Novel molecular hybrid of cinnamic acids and guanylhydrazones as potential antitubercular agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2010.20: 1623–25.
- Li K, Lindsay NF, Jon AT. Trifluoroacetic acid mediated hydroarylation: Synthesis of dihydrocoumarins dan dihydroquinolones. *J Org Chem*. 2005.70(7):2881–83.
- Lin HC, Shin HT, Chien SC, *et al*. Structure activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*. 2008.75:1416–25.
- Baba M, Yongri J, Atsuo M, *et al*. Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXIV. Inhibitory effect of a coumarin derivative, 7-isopentenylcoumarin, against tumor-prevention. *Biol Pharm Bull*. 2002.25(2): 244–46.
- Ekowati H, Indwiani A, Mustofa. Anticancer activity of calanone on HeLa cell line. *Indo J Chem*. 2010.10(2):247–51.
- Chuang, Jing-Yuang, Yung Feng Huang, Hsu Feng Lu, *et al*. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria and caspase-3 dependent mechanism and NF-kB down-regulation. *In vivo*. 2007. 21:1003–10.
- Sudalai A, Jagdale AR. *p*-toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters*. 2007.48: 4895–98.
- Dey PM, Harborne JB. *Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity*. Vol. 6. London: Academic Press; 1991. 1–30.
- McLaughlin JL, Lingling LR, Jon EA. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 1998.32:513–24.
- Wu B, Jin-Shui Z, Yi Z, Wei-Ming S, Qiang Z. Predictive value of MTT assay as an *in vitro* chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience. *World Journal Gastroenterology*. 2008.14(19):3064–68.
- Sumaryono W, Agung E. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun *Aglaia elliptica* Blume terhadap galur sel kanker serviks (HeLa). *J Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2010.8(1):19-23.
- Patric GL. *Instant Notes Organic Chemistry*. 2nd Ed. London: BIOS Scientific Publisher; 2004.
- Hajra S, Maji B, Bar S. Samarium triflate-catalyzed halogen promoted Friedel-Craft alkylation with alkenes. *Org Lett*. 2007.15:2783–6.