

DESAIN DAN SINTESIS SENYAWA ACES (ANALOG CURCUMIN SERIES) DENGAN METODE SOLID PHASE REACTION SEBAGAI SENYAWA ANTIKANKER POTEN DENGAN MEKANISME MENGHAMBAT PROTEIN *NF-κB*

Monica Sabrina Widiapranolo, Eva Mayangsari, Venny Valeria

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma Yogyakarta
Email: msw.acinom@gmail.com

ABSTRACT

Analog of curcumin in forms of enone and dienone aromatic is known for their activity as an NF-κB inhibitor. In this study, will be synthesized 2-(4'-N, N-dimethylamino benzilidene) cyclohexane-1,3-dione as an analog that predicted has an activity as an NF-κB inhibitor. It was a non-experimental descriptive non-analytical research which conducted based on the crossed aldol condensation reaction by reacting 3 mmole p-N,N-dimethylamino benzaldehyde and 6 mmole cyclohexane-1,3-dione with hydrochloric acid as the catalyst using solid phase reaction method. This research applied qualitative and quantitative tests. The qualitative tests consisted of organoleptic, solubility, melting point, TLC (with silica gel F₂₅₄ as stationary phase and ethyl acetate: chloroform (1:5) as mobile phase), and structure elucidation with infrared spectroscopy, mass spectroscopy, and ¹H-NMR. Quantitative test involved the calculation of the yield. Based on computational analysis, 2-(4'-N,N-dimethylamino benzilidene) cyclohexane-1,3-dione showed a better interaction with NF-κB protein with PLANTSPLP score was -69,7895. The outcome of the reaction were yellow colored powder and no odor. The yield values were 80.933%; 78.326%; and 77.229%. Its soluble in ethyl acetate and chloroform. TLC test shown the existence of new chemical substance. Liquid chromatography showed 100% purity. The melting point range were 233,7-234,6°C. The results of structure elucidation by ¹H-NMR, infrared and mass spectroscopy tests indicated the compound was 2-(4-(dimetilamino)benzilidena)-4-(3-oksosiklohex-1-enil) sikloheksana-1,3-dion.

Keywords: 2-(4'-N, N-dimethylamino benzilidene) cyclohexane-1,3-dione, crossed aldol condensation, solid phase reaction, green chemistry

1. PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia, terutama di negara berkembang. World Health Organization (WHO) melaporkan sekitar 7,6 juta (13%) orang meninggal akibat kanker pada tahun 2008. Apabila tidak dilakukan penanganan lebih lanjut terhadap penyakit ini, WHO memperkirakan bahwa kematian akibat kanker akan terus meningkat hingga 13,1 juta orang

pada tahun 2030^{[1][2]}. Kanker yang merupakan akibat dari adanya abnormalitas pembelahan (proliferasi) sel yang dapat menginvasi jaringan lain dan menyebar ke organ lainnya, bahkan dapat menimbulkan kematian. Pada sel tumor, proliferasi yang sangat cepat disebabkan oleh adanya ekspresi berlebih dari protein *NF-κB*^{[2][4]}.

Obat-obat kanker yang masih digunakan hingga saat ini seperti taxol^[5], bersifat tidak selektif terhadap sel kanker sehingga perlu disintesis

senyawa antikanker yang selektif terhadap protein *NF-κB*^[2].

Senyawa analog kurkumin (*Analog Curcumin Series / ACES*) dalam bentuk enona diketahui dapat menghambat ekspresi protein *NF-κB*^[8]. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan didesain dan disintesis senyawa analog kurkumin yang dapat menghambat ekspresi protein *NF-κB*. Desain dilakukan dengan mempertahankan sisi aromatis, gugus enona, dan menghilangkan bagian metilen aktif dari kurkumin^[7].

Sintesis senyawa 2-(4'-N,N-dimetil aminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion ini dilakukan berdasarkan reaksi kondensasi aldol silang dengan menggunakan metode *solid phase reaction*^[6]. Metode ini seringkali disebut sebagai aplikasi dari "*Green Chemistry*", dimana pengerjaan suatu reaksi kimia dilakukan dengan menggunakan pelarut dalam jumlah yang sedikit, sehingga jumlah bahan berbahaya atau limbah yang dihasilkan dapat diminimalisir. Dengan menggunakan metode *solid phase reaction* pada sintesis senyawa 2-(4'-N,N-dimetil aminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion memberikan beberapa keuntungan yaitu: pengerjaan proses sintesis yang lebih mudah dan sederhana, rendemen yang besar, reaksi samping dapat diminimalisir dan ramah lingkungan^[6].

2. METODE

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Merck dan Sigma Aldrich. Semua bahan yang digunakan telah diketahui secara pasti kemurniannya. Alat uji titik lebur yang digunakan yaitu MP 70 Mettler Toledo. Kromatografi cair-spektra massa dari Hitachi L 6200. Spektrometer IR dari Shimadzu Prestige-21. ¹H-NMR dari Delta 2 NMR.

Validasi Dasar Protokol PLANTS

Preparasi ligan OWA dilakukan dengan menggunakan MarvinSketch pada pH 7,4. Hasil tersebut kemudian disimpan sebagai ligand_2D.mrv. Dari file ligand_2D.mrv, kemudian dilakukan pencarian berbagai konformasi representatif dari ligan tersebut menggunakan modul "*Conformers search*" (*Calculation > Conformation > Conformers* | Klik "Ok"). Hasil tersebut kemudian disimpan sebagai ligan dengan tipe file .mol2.

Preparasi protein *NF-κB* (4G3G.pdb) dilakukan dengan menggunakan YASARA. Pada file pdb yang diperoleh, hanya rantai A yang digunakan (molekul air dihilangkan). Dari tahap tersebut, kemudian atom hidrogen ditambahkan ke dalam sistem (*Edit > Add > hydrogen to: all*). Ligan asli yang terdapat di dalam struktur kristal dihapus sehingga hanya diperoleh protein saja yang menyediakan ruang (*pocket*) untuk proses *docking*. Hasil tersebut kemudian disimpan sebagai protein dengan tipe file .mol2.

Hasil preparasi ligan dan protein kemudian di-*docking* menggunakan PLANTS dengan konfigurasi (*plantsconfig*) yang telah dimodifikasi sebelumnya (*default plantsconfig* yang diperoleh dari *website* PLANTS, http://www.tcd.uni-konstanz.de/plants_download/download/simple_dock.zip). Dalam *plantsconfig* tersebut, parameter *binding site definition* diubah menjadi 0,1 Å dari koordinat awal dimana OWA berinteraksi dengan protein *NF-κB*. Pose hasil *docking* yang memberikan skor tertinggi kemudian diperkirakan sebagai perkiraan posisi asli ligan pada struktur protein *NF-κB*. Dari pose tersebut, kemudian dilakukan perhitungan RMSD menggunakan YASARA.

Docking Senyawa Uji terhadap Protein *NF-κB*

Protokol yang valid tersebut digunakan untuk melakukan *docking* kurkumin dan turunannya yang terdiri dari demetoksi kurkumin dan bisdemetoksi kurkumin, serta senyawa yang akan disintesis terhadap protein *NF-κB*. Dari hasil *docking* tersebut, diperoleh skor $PLANTS_{PLP}$ yang kemudian dibandingkan satu sama lainnya untuk mengetahui aktivitas dari masing-masing senyawa uji secara *in silico*.

Sintesis Senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion

Sintesis senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion menggunakan *starting material* (bahan baku) berupa *p*-N,N-dimetilamino benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion. Kristal *p*-N,N-dimetilamino benzaldehida ditimbang sebanyak 0,447 g (3 mmol) dan sikloheksana-1,3-dion sebanyak 0,672 g (6 mmol) dengan alas kertas menggunakan neraca analitik. Masing-masing senyawa tersebut dicampur homogen menggunakan mortir dan stamper, kemudian ke dalam campuran tersebut ditambahkan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Campuran tersebut kemudian digerus selama 5 menit.

Natrium bikarbonat 10% sebanyak 25 mL ditambahkan ke dalam campuran. Padatan yang terbentuk disaring menggunakan corong Buchner dan sisa-sisa yang tertinggal pada dinding mortir dikerok hingga bersih.

Mortir dan stamper kemudian dibilas lagi menggunakan natrium bikarbonat 10% dan sisa bilasan tersebut disaring. Padatan yang diperoleh dicuci lagi dengan natrium bikarbonat 10%

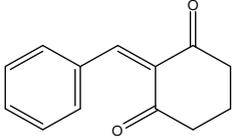
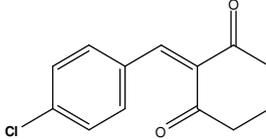
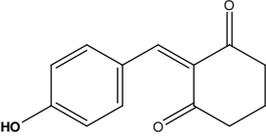
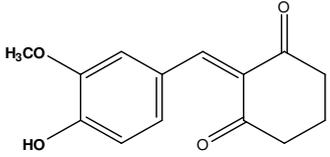
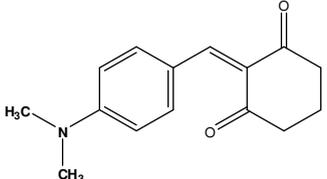
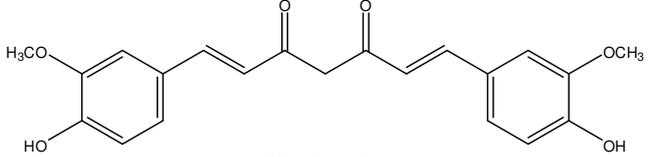
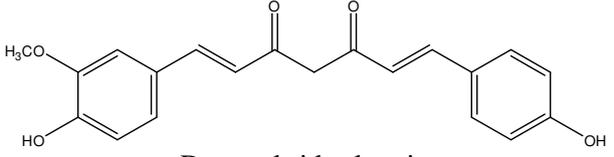
untuk menghilangkan sisa katalis HCl yang digunakan.

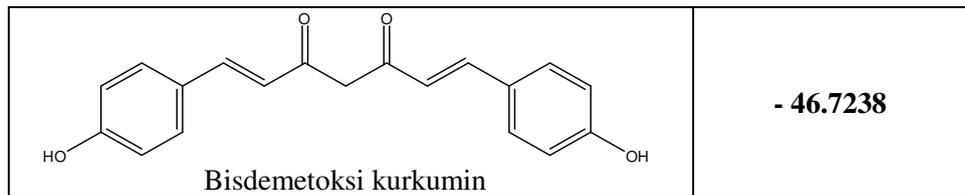
Padatan tersebut kemudian direkristalisasi menggunakan etanol 96% panas sebanyak 60 mL dalam gelas beker dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga seluruh padatan larut dalam etanol. Setelah dingin, larutan tersebut di diamkan dalam kulkas selama 1 hari. Proses rekristalisasi dilakukan sebanyak 2 kali. Serbuk yang diperoleh dikeringkan dalam desikator selama 1 hari. Setelah kering, serbuk ditimbang dan dihitung rendemennya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN Desain Senyawa Inhibitor *NF-κB*

Dengan menggunakan program PLANTS dapat diprediksi besarnya aktivitas senyawa ACES sebagai inhibitor protein NF-κB (4G3G). Besarnya aktivitas ini dapat dilihat dari besarnya nilai $PLANTS_{plp}$ (Silverman, 1992), di mana semakin besar nilai $PLANTS_{plp}$, maka diharapkan senyawa tersebut makin poten sebagai inhibitor protein NF-κB. Berdasarkan hasil perhitungan (Tabel 1) menunjukkan bahwa senyawa 2-(4'-N,N-dimetilamino benzilidena)sikloheksana-1,3-dion (ACES 4) mempunyai nilai $PLANTS_{plp}$ sebesar -69.7895, di mana nilai $PLANTS_{plp}$ senyawa tersebut jauh lebih besar dibanding dengan nilai $PLANTS_{plp}$ kurkumin yang telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai inhibitor protein NF-κB yaitu sebesar -21,4551^[8]. Oleh karena itu senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion diharapkan mempunyai aktivitas inhibitor protein *NF-κB* yang poten dan lebih baik dari kurkumin sehingga layak untuk disintesis.

Tabel 1. Nilai PLANTS_{PLP} Hasil Perhitungan dengan Program PLANTS

Struktur Senyawa	PLANTS _{PLP}
 <p>2-benzilidena sikloheksana-1,3-dion^[3]</p>	-64.3477
 <p>2-(4'-klorobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion (ACES-1)</p>	-62.3241
 <p>2-(4'-hidroksibenzilidena) sikloheksana-1,3-dion (ACES-2)</p>	-63.6856
 <p>2-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidena) sikloheksana-1,3-dion (ACES-3)</p>	-60.8375
 <p>2-(4'-N,N-dimetil aminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion (ACES-4)</p>	-69.7895
 <p>Kurkumin</p>	-21.4551
 <p>Demetoksi kurkumin</p>	- 35.4851



Sintesis Senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion

Sintesis senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena) sikloheksana-1,3-dion didasarkan pada reaksi kondensasi aldol silang dimana adanya suatu senyawa karbonil yang mempunyai hidrogen alfa, yakni sikloheksana-1,3-dion akan bertindak sebagai nukleofil dan suatu senyawa karbonil lainnya yang tidak mempunyai hidrogen alfa, yakni *p*-

N,N-dimetilamino benzaldehida akan bertindak sebagai elektrofil dengan bantuan katalis asam (HCl).

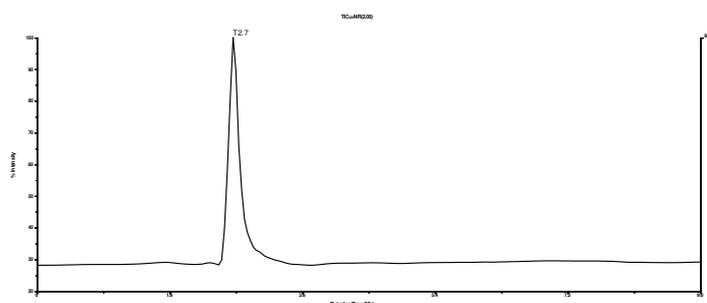
Sintesis diawali dengan proses pembentukan enol dari sikloheksana-1,3-dion. Proses pembentukan enol dari sikloheksana-1,3-dion diawali dengan menambahkan katalis HCl yang akan mengalami ionisasi menjadi ion H⁺ dan Cl⁻. Enol yang terbentuk kemudian akan menyerang *p*-N,N-dimetilamino benzaldehida.

Tabel 2. Hasil organoleptis senyawa hasil sintesis dan *starting material*

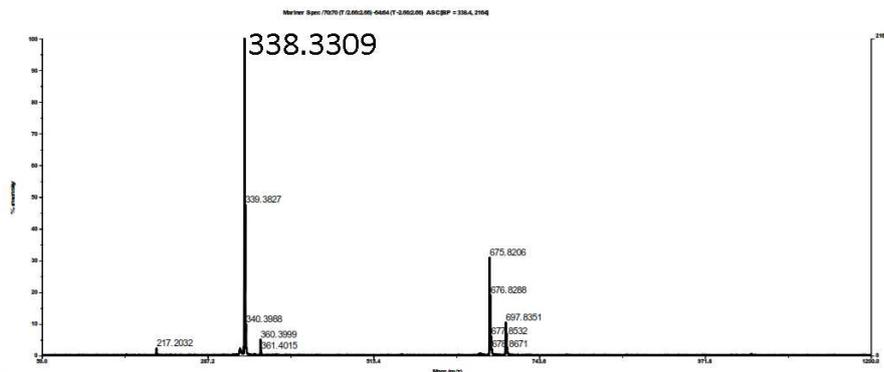
Pengamatan	Sikloheksana-1,3-dion	<i>p</i> -N,N-dimetilamino benzaldehida	Senyawa hasil sintesis
Bentuk			
Warna	Putih kekuningan	Putih	Kuning
Bau	Khas	Tidak berbau	Tidak berbau

Dari hasil pengamatan organoleptis (Tabel 2), maka dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan senyawa yang berbeda dari *starting material* yang digunakan. Hal ini terlihat dari adanya perbedaan warna dan bau yang dimiliki oleh ketiganya.

Dari hasil analisis kromatografi cair, didapatkan kromatogram (Gambar 1) dengan satu buah *peak* yang menunjukkan kemurnian senyawa hasil sintesis sebesar 100%. Hasil spektra massa (Gambar 2), terlihat bahwa senyawa yang dihasilkan memiliki berat molekul sebesar 337,3309.



Gambar 1. Kromatogram LC senyawa hasil sintesis



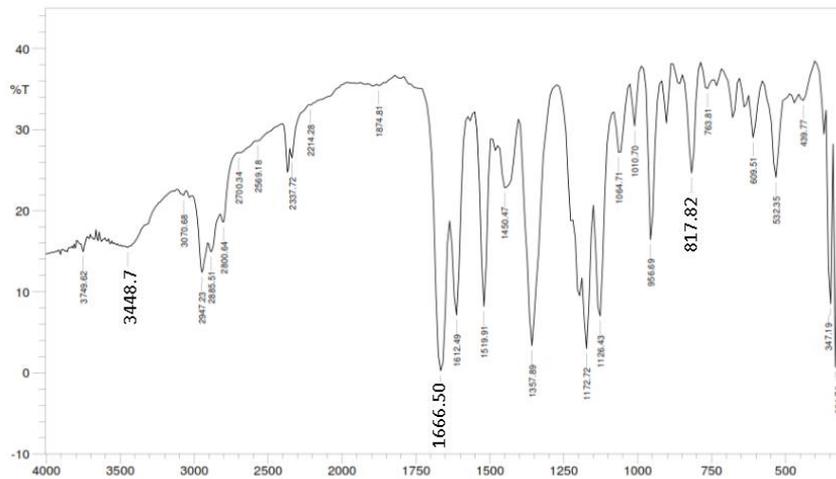
Gambar 2. Spektra massa dari senyawa hasil sintesis

Spektra infra merah senyawa hasil sintesis memperlihatkan profil pita serapan yang berbeda dengan *starting material* (Tabel 3) sehingga dapat

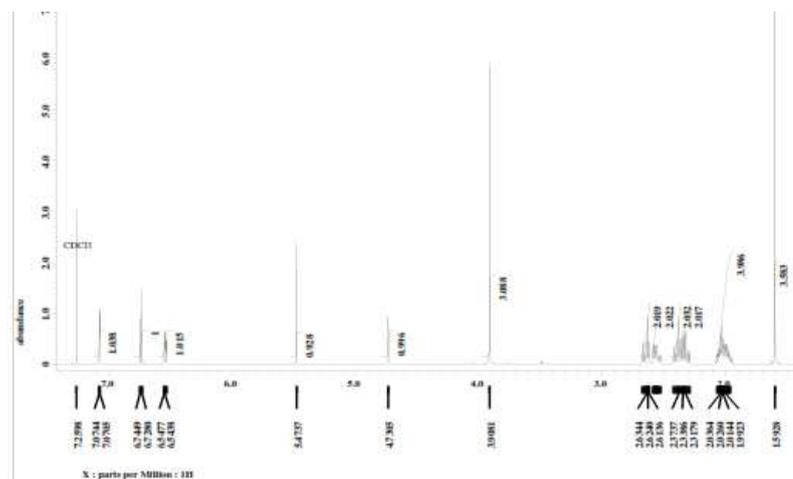
disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan senyawa yang berbeda dari *starting materialnya* (Gambar 3).

Tabel 3. Perbedaan hasil interpretasi spektra inframerah senyawa hasil sintesis dengan *starting material*

Gugus Fungsi	Senyawa hasil sintesis	Sikloheksana-1,3-dion	<i>p</i> -N,N-dimetilamino benzaldehida
C=O Gugus karbonil	1666,50 cm ⁻¹	1566,20 cm ⁻¹	1666,50 cm ⁻¹
C=C Alkena alifatis	817,82 cm ⁻¹	tidak ada	tidak ada
C-H aldehyd	tidak ada	tidak ada	2800,64 cm ⁻¹ dan 282715,77 cm ⁻¹
-NH Gugus amina	3448,72 cm ⁻¹	tidak ada	1165,00 cm ⁻¹

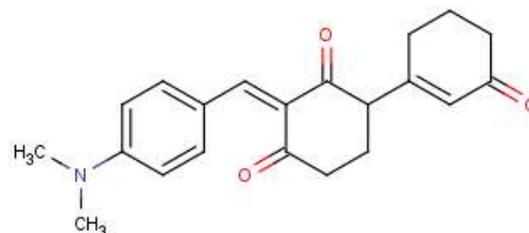


Gambar 3. Spektrogram infra merah senyawa hasil sintesis



Gambar 4. Hasil ¹H-NMR senyawa yang disintesis

Setelah dilakukan analisis menggunakan spektra massa, spektrofotometri infra merah, dan ¹H-NMR, maka dapat disimpulkan senyawa hasil sintesis yang terbentuk adalah senyawa 2-(4-(dimetilamino)benzilidena)-4-(3-oksosikloheks-1-enil) sikloheksana-1,3-dion.



Gambar 5. Struktur senyawa 2-(4-(dimetilamino)benzilidena)-4-(3-oksosiklohex-1-enil) sikloheksana-1,3-dion

Senyawa 2-(4-(dimetilamino)benzilidena)-4-(3-oksosiklohex-1-enil)sikloheksana-1,3-dion dapat terbentuk karena adanya kondensasi aldol internal dari sikloheksana-1,3-dion. Masih terdapatnya atom H α pada sikloheksana-1,3-dion menyebabkan sikloheksana-1,3-dion masih bisa membentuk ion enolat yang bermuatan negatif sehingga dapat menyerang senyawa lain yang lebih positif.

Berdasarkan perhitungan stoikiometri yang dilakukan terhadap rendemen hasil sintesis, diketahui bahwa jumlah senyawa yang dihasilkan dari tiga kali replikasi masing-masing sebanyak 0,590 g; 0,571 g; dan 0,563 g dengan rendemen masing-masing sebesar 80,933%; 78,326%; dan 77,229%. Hasil perhitungan yang ada menunjukkan bahwa rendemen hasil sintesis yang diperoleh kurang dari 100%. Rendemen hasil sintesis yang diperoleh kurang dari 100% disebabkan *starting material* yang ditambahkan belum habis bereaksi, saat proses pencucian untuk menghilangkan pengotor, terdapat serbuk senyawa hasil sintesis yang tercuci pada saat proses pencucian, dan pada saat rekristalisasi masih terdapat senyawa hasil sintesis yang terlarut dalam etanol.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka disimpulkan bahwa senyawa 2-(4'-N,N-dimetilaminobenzilidena)sikloheksana-1,3-dion tidak dapat terbentuk dari hasil sintesis antara sikloheksana-1,3-dion dan *p*-N,N-dimetilamino benzaldehida dengan katalis basa, namun dengan menggunakan katalis asam dapat terbentuk senyawa 2-(4-(dimetilamino)benzilidena)-4-(3-oksosikloheks-1-enil)sikloheksana-1,3-dion dengan hasil kemurnian berdasarkan LC-MS sebesar 100% dan rata-rata rendemen sebesar 78,829%.

5. REFERENSI

- [1] WHO. 2013. *Cancer: Fact Sheets*. Available from: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
- [2] Hanahan D and Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144 (5):646-74.
- [3] Istyastono EP, Yuniarti N, dan Jumina. 2009. Sintesis Senyawa Berpotensi sebagai Inhibitor Angiogenesis: 2-benzilidenasikloheksana-1,3-dion. *Majalah Farmasi Indonesia*. 20: 1-8.
- [4] Lee CH, Jeon YT, Kim SH, and Song YS. 2007. *NF-kB* as a potential molecular target for cancer therapy. *BioFactors*. 29: 19-35.
- [5] Lee KW, Bode AM, Dong Z. 2011. Molecular Targets of Phytochemicals For Cancer Prevention. *Nature Reviews Cancer*, 11: 211-218.
- [6] Palleros DR. 2004. Solvent-Free Synthesis of Chalcones. *J. Chem. Educ.* 81 (9): 1345-1347.
- [7] Robinson, TP, Ehlers T, Hubbard RB, Bai X, Arbiser JL, Goldsmith DJ, Bowen JP. 2003. Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: aromatic enone and dienone analogues of curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 115-117.
- [8] Weber WM, Hunsaker LA, Roybal CN, Marjon EVB, Abcouwer SF, Royer RE, Deck LM and Jagt DLV. 2006. Activation of *NF-kB* is inhibited by curcumin and related enones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 2450-2461.