

# Sintesis senyawa berpotensi sebagai inhibitor angiogenesis: 2-benziliden sikloheksana-1,3-dion

## Synthesis of a potential angiogenesis inhibitor compound: 2-benzylidene cyclohexane-1,3-dione

Enade Perdana Istyastono <sup>1,\*</sup>), Nunung Yuniarti <sup>2)</sup> dan Jumina <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwohardjo, Yogyakarta

<sup>2)</sup> Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3)</sup> Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### Abstrak

Telah dilakukan sintesis senyawa enadion siklik aromatik berpotensi sebagai inhibitor angiogenesis yaitu 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion. Sintesis dilakukan menggunakan benzaldehida (50 mmol) dan sikloheksana-1,3-dion (50 mmol) sebagai *starting material* dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis. Diperoleh 252,7 mg (2,53 %) serbuk putih berbentuk jarum, tidak berbau dengan titik lebur 214,8 °C dan kemurnian 88,81 %. Kemurnian produk diuji dengan kromatografi gas, sedangkan elusidasi struktur dilakukan secara spektroskopi menggunakan spektrometer IR, <sup>1</sup>H-NMR, dan GC-MS.

Dari spektrometer IR diketahui senyawa memiliki ikatan -C=O yang terkonjugasi dengan suatu alkena atau residu fenil, gugus metilen, dan ikatan -C-H pada alkena. Spektrometer <sup>1</sup>H-NMR menunjukkan adanya senyawa yang memiliki residu metilen dengan posisi α maupun β dari gugus karbonil, serta residu benzena. Hasil GC-MS menunjukkan senyawa memiliki berat molekul 200 sma.

**Kata kunci:** Inhibitor angiogenesis, sintesis, 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion.

### Abstract

Synthesis of an aromatic cyclic enadione, 2-benzylidene-cyclohexane-1,3-dione (a potential angiogenesis inhibitor), has been done using benzaldehyde (50 mmole) and cyclohexane-1,3-dione (50 mmole) as starting materials and NaOH 1.0 N as a catalyst. Odorless and white needle-shape powder has been achieved. The powder was 252.7 mg (2.53 %) and the purity of the powder was 88.81 %. Its melting point was 214.8 °C. The purity of the product was examined by gas chromatography, while the structure elucidation was done using IR spectrometer, <sup>1</sup>H-NMR spectrometer, and GC-MS.

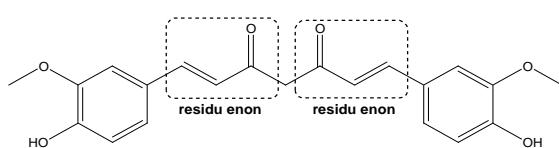
IR spectrometer showed that the compound had a -C=O bond conjugated to an alkene or a phenyl moiety, methylen groups, and alkene's -C-H bonds. <sup>1</sup>H-NMR spectrometer showed that the compound had benzene moiety and methylen moieties, which were in α and β position to a carbonyl group. GC-MS showed that the molecular weight of the compound was 200 atomic mass unit.

**Key words:** Angiogenesis inhibitor, synthesis, 2-benzylidene-cyclohexane-1,3-dione.

## Pendahuluan

Kurkumin (Gambar 1) telah dilaporkan berkhasiat sebagai inhibitor angiogenesis baik *in vitro* maupun *in vivo* (Robinson *et. al.*, 2003). Kurkumin beserta analog dan turunannya juga telah dilaporkan aktif sebagai antikanker (Huang *et. al.*, 1992; Huang *et. al.*, 1998; Dinkova-Kostova and Talalay, 1999; Ohtsu *et. al.*, 2002; Ireson *et. al.*, 2002). Pentagamavunon-1 atau PGV-1 [2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin)sikloheksana] merupakan analog kurkumin yang dilaporkan memiliki aktivitas inhibisi angiogenesis melalui penekanan ekspresi faktor angiogenesis VEGF pada sel T47D dan lebih bersifat sitotoksik dibanding kurkumin ( $IC_{50}$  19,05  $\mu M$ ) (Meiyanto *et. al.*, 2006).

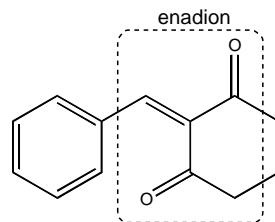
Berdasar hal tersebut di atas, Robinson *et. al.*, (2003) merancang senyawa-senyawa enon aromatik dan dienon aromatik yang merupakan analog kurkumin sebagai inhibitor angiogenesis. Senyawa-senyawa tersebut dilaporkan aktif sebagai inhibitor angiogenesis dengan penghambatan antara 87,1-98,2 % pada konsentrasi 3  $\mu g/mL$  dan antara 90,4-98,1 % pada konsentrasi 6  $\mu g/mL$ . Senyawa-senyawa dienon berupa turunan dan analog kurkumin juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai anti-inflamasi dengan mekanisme penghambatan siklookogenase (COX) dengan selektivitas pada COX-2 (Ireson *et. al.*, 2001), penangkapan radikal hidroksil dan radikal oksida nitrit (Hong *et. al.*, 2002), dan penghambatan glutation S-transferase(GST) kelas  $\mu$  (Oetari *et. al.*, 1996).



Gambar 1. Struktur kurkumin.

Senyawa enon dan dienon aromatik memiliki aktivitas sebagai inhibitor angiogenesis yang relatif tidak berbeda (Robinson *et. al.*, 2003). Berdasar hal tersebut dan dikaitkan dengan kurkumin yang merupakan senyawa dengan dua residu enon, maka secara bioisosterisme (Silverman, 1992) senyawa 2-benzilidensikloheksana-1,3-dion (Gambar 2) merupakan senyawa penuntun potensial dalam

pengembangan senyawa-senyawa turunan enadion aromatik sebagai inhibitor angiogenesis (Istyastono, 2006). Senyawa 2-benzilidensikloheksana-1,3-dion merupakan senyawa enadion siklik aromatik yang paling sederhana. Senyawa ini diduga dapat disintesis dari benzaldehid dan sikloheksana-1,3-dion melalui mekanisme reaksi kondensasi Knoevenagel. Berdasarkan hasil pencarian pada katalog *Sigma-Aldrich Co.* (<http://sigmaaldrich.com/catalog>), *ChemFinder website* (<http://chemfinder.cambridgesoft.com>), dan *Organic Syntheses website* (<http://orgsyn.org>), senyawa tersebut belum pernah disintesis sebelumnya.



Gambar 2. Struktur senyawa 2-benzilidensikloheksana-1,3-dion.

## Metodologi

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi benzaldehida p.a. dan sikloheksana-1,3-dion p.a. (*Sigma*, USA), natrium hidroksida, asam klorida, etanol p.a., aseton p.a. (*E-Merck*, Germany), dan akuades.

### Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi seperangkat alat sintesis, termopan (Reichert, Austria; Nr.340 579) spektrofotometer IR (Shimadzhu FTIR-8201 PC), spektrometer  $^1H$ -NMR ( $^1H$ -NMR JEOL-MY 60), dan kromatografi gas-spektrometer massa (GC-MS) (*Agilent Technologies* 6890-MSD 5973).

### Prosedur penelitian

Senyawa 2-benzilidensikloheksana-1,3-dion disintesis dengan metode mengikuti mekanisme kondensasi Knoevenagel. Dalam labu erlenmeyer 500 mL, sikloheksana-1,3-dion (50 mmol) dilarutkan dalam etanol 50 mL dengan bantuan pemanasan. Benzaldehida (50 mmol) ditambahkan dalam larutan sikloheksana-1,3-dion tersebut. Diberi katalis natrium hidroksida 1,0 N tetes demi tetes hingga larutan berwarna kuning. Diaduk dengan bantuan pengaduk magnetik dengan kecepatan 250 putaran

per menit pada suhu di bawah suhu kamar selama 30 menit. Setelah 30 menit ditambahkan akuades hingga volume 500 mL. Endapan yang terbentuk disaring dan kemudian direkristalisasi dengan etanol panas-akuades dingin. Serbuk hasil rekristalisasi dikeringkan dalam oven.

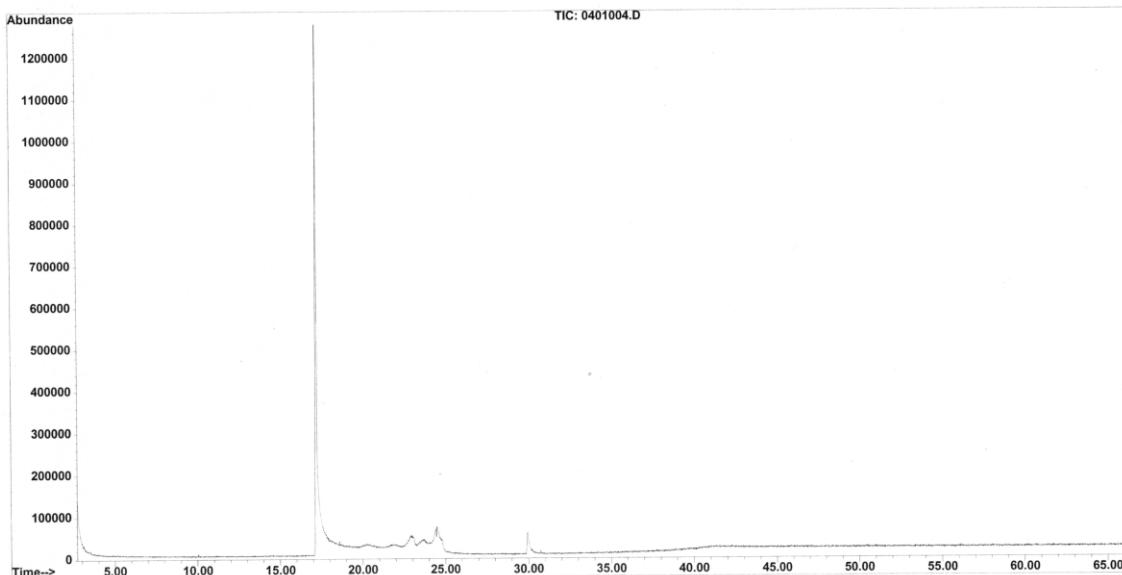
Analisis hasil sintesis dilakukan dengan beberapa metode yaitu pemeriksaan organoleptis, perhitungan rendemen, dan pemeriksaan titik lebur. Elusidasi struktur dilakukan secara spektroskopi menggunakan spektrometer IR (*Infra Red*), spektrometer <sup>1</sup>H-NMR (*Proton Nuclear Magnetic Resonance*) dan GC-MS (*Gas chromatography-Mass Spectroscopy*). GC-MS juga dilakukan untuk mengetahui kemurnian hasil sintesis. Spektroskopi IR dan <sup>1</sup>H-NMR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. GC-MS dilakukan di Laboratorium Pemeriksaan Doping dan Kesehatan Masyarakat, Laboratorium Kesehatan Daerah, DKI Jakarta.

## Hasil Dan Pembahasan

Hasil reaksi antara benzaldehida (50 mmol) dan sikloheksana-1,3-dion (50 mmol) sebagai *starting material* dengan

NaOH 1,0 N sebagai katalis berupa serbuk putih 252,7 mg berbentuk jarum, tidak berbau dengan titik lebur 214,8 °C. Kromatogram hasil kromatografi gas yang disajikan pada Gambar 3 menunjukkan adanya satu puncak dominan dengan waktu retensi 17,21 menit dengan luas area 88,81 %. Spektrum IR produk disajikan pada Gambar 4, spektrum <sup>1</sup>H-NMR disajikan pada Gambar 5, dan spektrum MS disajikan pada Gambar 6.

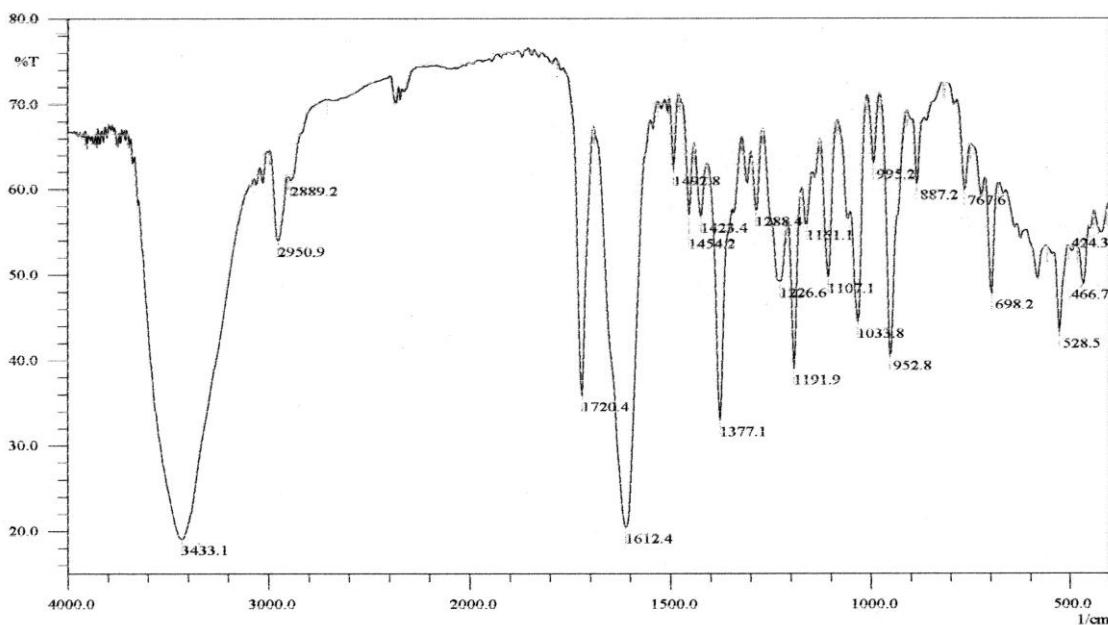
Spektrum IR senyawa hasil sintesis (Gambar 4) menunjukkan bahwa senyawa memiliki ikatan -C=O (1612,4 cm<sup>-1</sup>) yang terkonjugasi dengan suatu alkena atau residu fenil (1720,4 cm<sup>-1</sup>), gugus metilen (1454,2 cm<sup>-1</sup>), dan ikatan – C–H pada alkena (1423,4 cm<sup>-1</sup>). Puncak lebar pada 3433,1 cm<sup>-1</sup> diduga merupakan puncak akibat sampel tercemar air yang diduga diperoleh saat preparasi mengingat penggunaan pelet KBr yang bersifat hidroskopis atau dari senyawa hasil sintesis yang kurang sempurna dalam pengeringannya. Analisis ini mengacu pada metode Silverstein dan Webster (1998). Hasil analisis mengarah



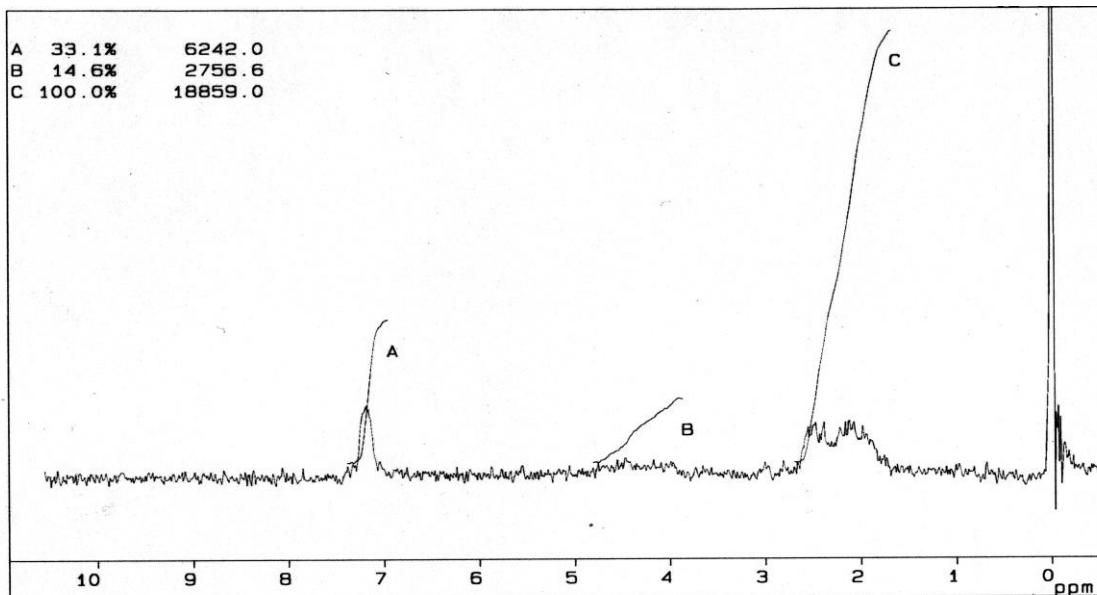
Gambar 3. Kromatogram hasil GC-MS serbuk hasil reaksi antara benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis.

Keterangan kondisi GC :

Kolom : HP Ultra 2. *Capillary Column*; panjang 17 m; tebal film 0,25 µM; *Column ID* 0,25 mm.  
Volume injektor : 1 µL  
Temperatur Oven : Diawali dari 80 °C ditingkatkan 5 °C tiap menit hingga 280 °C  
Pembawa : Gas helium dengan kecepatan alir 0,7 µL/menit



Gambar 4. Spektrum IR dalam pelet KBr serbuk hasil reaksi antara benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis.

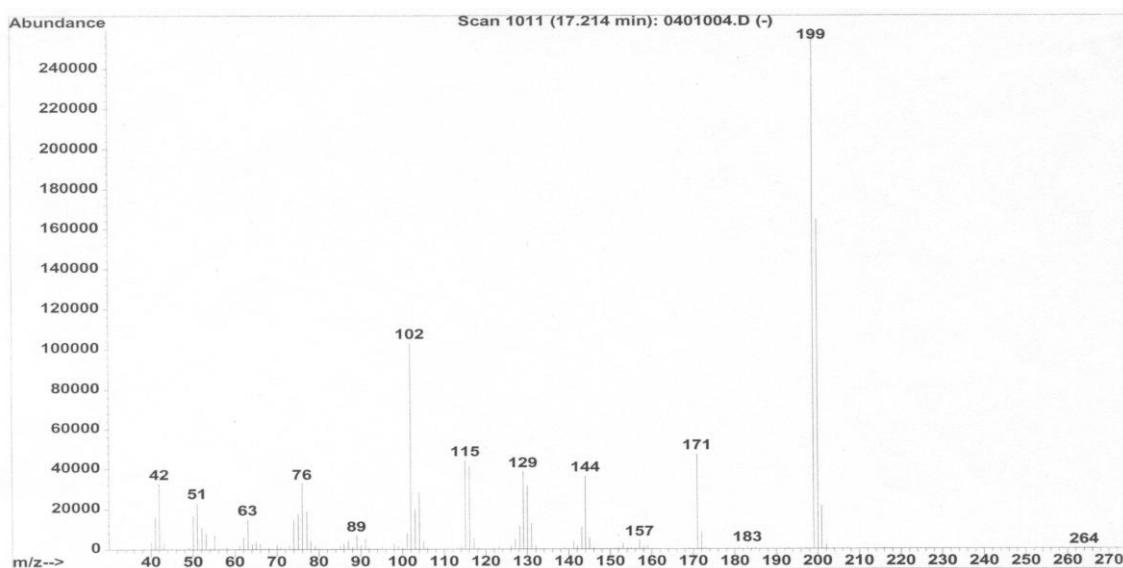


Gambar 5. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  (60 MHz) serbuk hasil reaksi antara benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis (pelarut DMSO-d<sub>6</sub>; standard internal: TMS).

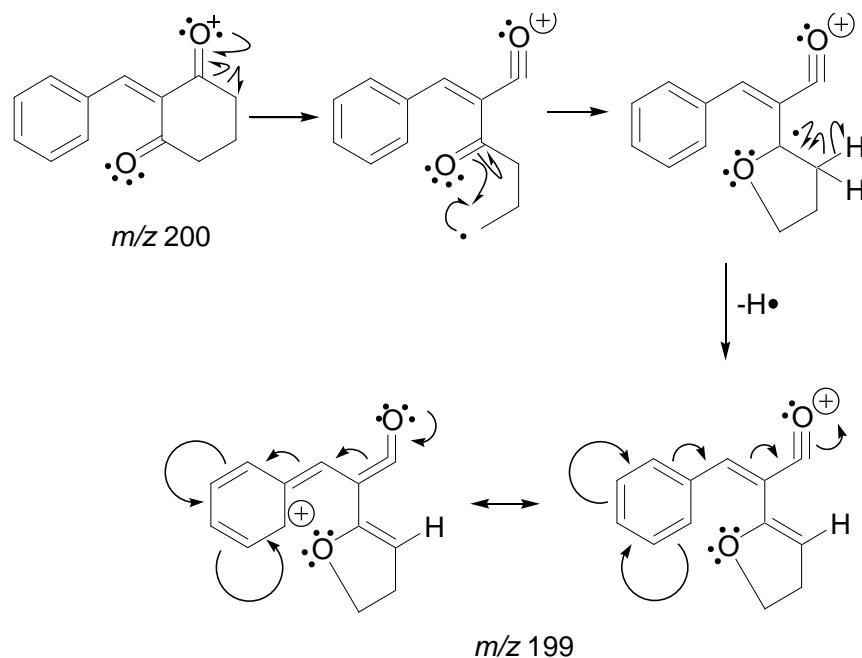
pada kesimpulan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion (Gambar 2).

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dari senyawa hasil sintesis (pelarut DMSO-d<sub>6</sub>) ditunjukkan pada Gambar 5. Berdasar spektrum tersebut tidak

dapat secara akurat dianalisis susunan proton-proton yang dimiliki senyawa hasil sintesis. Keterbatasan ini disebabkan oleh keterbatasan instrumen penelitian, dalam hal ini spektrofotometer  $^1\text{H-NMR}$  ( $^1\text{H-NMR JEOL-MY 60}$ ). Hal ini terlihat dari intensitas puncak-



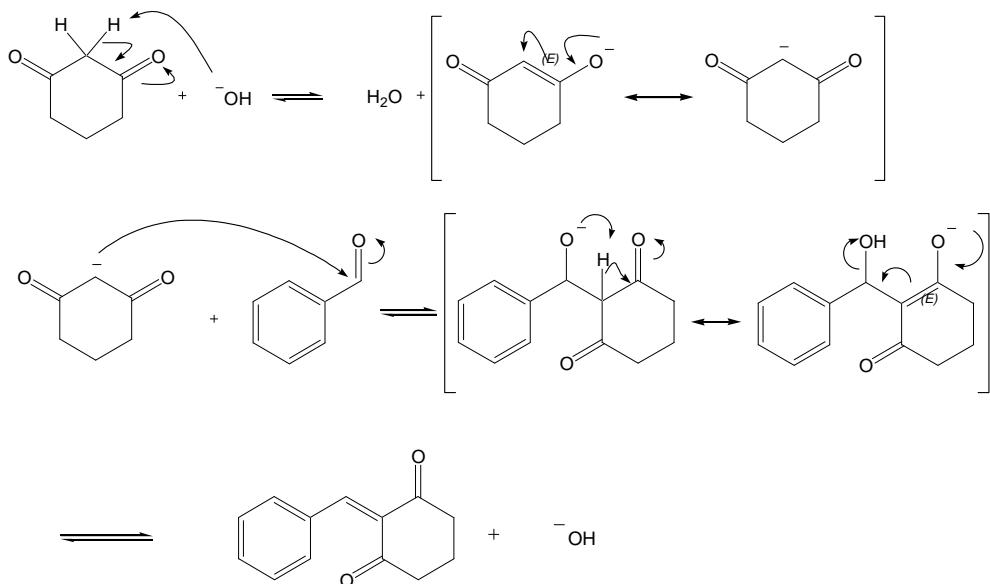
Gambar 6. Spektrum MS dengan waktu retensi 17,021 menit pada hasil GC serbuk hasil reaksi antara benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis.



Gambar 7. Usulan mekanisme fragmentasi ion molekul ( $m/z$  200) menjadi fragmen paling stabil ( $m/z$  199).

puncak yang ditunjukkan akibat dari geseran-kimiawi ( $\delta_H$ ) senyawa hasil sintesis yang sangat lemah, terutama dibandingkan puncak dari standard internal, tetrametilsilana. Meski demikian ada informasi yang diperoleh dari spektum  $^1H$ -NMR ini yaitu keberadaan proton-proton yang menunjukkan geseran-kimiawi ( $\delta_H$ ) antara 6,5-7,5 ppm, antara 3,5-4,9 ppm, dan

antara 1,5-2,7 ppm. Proton-proton yang menunjukkan geseran-kimiawi ( $\delta_H$ ) antara 6,5-7,5 ppm diduga merupakan proton-proton pada residu benziliden. Proton-proton yang menunjukkan geseran-kimiawi ( $\delta_H$ ) antara 3,5-4,9 ppm diduga merupakan proton-proton pada metilen  $\alpha$ . Proton-proton yang menunjukkan geseran-kimiawi ( $\delta_H$ ) antara 1,5-2,7 ppm diduga



Gambar 8. Usulan mekanisme reaksi sintesis 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion.

merupakan proton-proton pada residu metilen  $\beta$  yang terganggu oleh keberadaan dimetilsulfoksida (DMSO) sebagai pengotor yang diperoleh dari pelarut, dimetilsulfoksida terdeuterasi (DMSO-d6) (Silverstein and Webster, 1998). Hasil analisis ini mengarah pada kesimpulan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion (Gambar 2).

Spektrum MS senyawa yang memberikan puncak kromatogram dengan waktu retensi 17,21 menit (Gambar 3) disajikan pada Gambar 6. Dari spektrum tersebut diketahui ada sepuluh puncak yang memiliki kelimpahan relatif terhadap puncak tertinggi (*base peak*; kelimpahan = 280000) lebih dari 10 %. Puncak dengan kelimpahan relatif di bawah 10 % (kelimpahan di bawah 28000) dapat diabaikan. Puncak-puncak tersebut lebih sering berupa isotop dan *impurities* (Silverstein and Webster, 1998). Berdasarkan spektrum tersebut diketahui bahwa senyawa hasil sintesis memiliki berat molekul (BM) 200 satuan massa atom (sma). BM ini merupakan BM senyawa 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion (Gambar 2). Hal ini memperkuat dugaan bahwa senyawa hasil sintesis adalah 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion.

Mekanisme fragmentasi 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion menjadi ion dengan  $m/z$  199 (*base peak*) disajikan pada Gambar 7. Diperoleh kation yang memiliki lima ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat beresonansi. Resonansi tersebut meningkatkan stabilitas ion fragmen dengan  $m/z$  199 dibandingkan dengan ion molekul ( $m/z$  200). Hal ini semakin menegaskan bahwa senyawa hasil sintesis adalah 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion.

Dengan asumsi bahwa reaksi berjalan sempurna ke arah produk mengikuti mekanisme reaksi seperti diusulkan pada Gambar 8 maka pada reaksi antara benzaldehida (50 mmol) dan sikloheksana-1,3-dion (50 mmol) sebagai *starting material* dengan NaOH 1,0 N sebagai katalis akan diperoleh 50 mmol 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion atau sebesar 10.000 mg. Pada penelitian ini diperoleh hasil 252,7 mg 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion atau rendemen sebesar 2,53 %, sangat kecil untuk layak diproduksi. Rendemen yang kecil tersebut diduga terkait dengan produk yang relatif tidak stabil dibandingkan dengan reaktan sehingga reaksi cenderung menuju ke reaktan dibanding menuju ke produk. Perlu dikembangkan lebih lanjut proses sintesis dan katalis yang digunakan

untuk mendapatkan rendemen yang lebih baik. Terkait dengan dugaan aktivitas senyawa 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion sebagai inhibitor angiogenesis perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan dugaan itu.

### Kesimpulan

Senyawa 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion dapat disintesis dari benzaldehida dan sikloheksana-1,3-dion sebagai *starting material* serta NaOH 1,0 N sebagai katalis. Diperoleh 1,26 mmol (252,7 mg; rendemen 2,53 %) serbuk 2-benziliden-sikloheksana-1,3-dion berwarna putih berbentuk jarum, tidak berbau

dengan titik lebur 214,8 °C dan kemurnian 88,81 %.

### Ucapan Terima Kasih

Diucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Sanata Dharma yang telah membiayai penelitian dan kepada Agnes Rufina, Dominika Anny Yanuarti, Feri Dian Sanubari, Hartono, Liza Kartika, dan William Salim (Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma) yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

### Daftar Pustaka

- Dinkova-Kostova, A. T. and Talalay, P., 1999, Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes, *Carcinogenesis*, 20 (5), 911-914.
- Hong, C. H., Noh, M. S., Lee, W. Y., and Lee, S. K., 2002, Inhibitory effects of natural sesquiterpenoids isolated from the rhizomes of *Curcuma zedoaria* on prostaglandin E<sub>2</sub> and nitric oxide production, *Planta Med*, 68, 545-547.
- Huang, M. T., Wang, Z. W., Georgiadis, C. A., Laskin, J. D., and Conney, A. H., 1992, Inhibitory effect of curcumin in tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, 13 (4), 2183-2186.
- Huang, M. T., Lou, Y., Xie, J. G., Ma, W., Lu, Y., Yen, P., Zhu, B. T., Newmark, H., and Ho, C., 1998, Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[d]anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice, *Carcinogenesis*, 19 (9), 1697-1700.
- Ireson, C. R., Jones, D. J. L., Orr, S., Coughtrie, M. W. H., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., and Gescher, A. J., 2002, Metabolism of the cancer chemopreventive agent curumin in human and rat intestine, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, 105-111.
- Ireson, C. R., Orr, S., Jones, D. J. L., Verschoyle, R., Lim, C., Luo, J., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Farmer, P. B., Steward, W. P., and Gescher, A., 2001, Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production, *Cancer Research*, 61, 1058-1064.
- Istyastono, E. P., 2006, Senyawa enadion siklik aromatic sebagai antikanker, dalam Pelayanan Informasi Obat: *Peluang dan Tantangan Farmasis Dalam Prospektif Pelayanan Kesehatan* (S. Hanifah, Ed.), pp. 16-23, Prosiding Seminar Nasional Farmasi Yogyakarta 4 Maret 2006, Program Studi Farmasi, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Meiyanto, E., Melannisa, R., dan Da'I, M., 2006, PGV-1 menurunkan ekspresi faktor angiogenesis (VEGF dan COX-2) pada sel T47D terinduksi estrogen, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(1), hal. 1-6.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J. N. M., Samhoedi, R., and Vermeulen, N. P. E., 1996, Effect of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver, *Biochem. Pharmacol.*, 51, 39-45.

- Ohtsu, H., Xiao, Z., Ishida, J., Nagai, M., Wang, H., Itokawa, H., Su, C., Shih, C., Chiang, T., Chang, E., Lee, Y.F., Tsai, M., Chang, C., and Lee, K., 2002, Antitumor agent, 217, curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti prostate cancer agents, *J.Med.Chem.*, 45, 5037-5042.
- Robinson, T. P., Ehlers, T., Hubbard IV, R. B., Bai, Xianhe, Arbiser, J. L., Goldsmith, D. J., and Bowen, J.P., 2003, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Angiogenesis Inhibitors: Aromatic Enone and Dienone Analogues of Curcumin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 115-117.
- Silverman, R. B., 1992, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, New York.
- Silverstein, R. M. and Webster, F. X., 1998, *Spectrometric identification of organic compounds*, 6<sup>th</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, Canada.

---

\* Korespondensi : Enade Perdana Istiyastono, M.Si., Apt.

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma,

Paingan, Maguwohardjo, Yogyakarta

E-mail: enade.staff@usd.ac.id