SINTESIS 3,3'-DI(5-BROMO-*N*-METILINDOL-3-IL)-5-BROMOINDOLIN-2-ONA DAN UJI SITOTOKSISITASNYA TERHADAP SEL VERO

3,3'-di(5-bromo-N-methyl-3-yl)-5-bromoindolin-2-one: Synthesis and Citotoxicity

Kamilia Mustikasari[1], Mardi Santoso[2*]

[1]Mahasiswa Program Magister Kimia, FMIPA, ITS Surabaya, Indonesia
[2]Jurusan Kimia, FMIPA, ITS Surabaya, Indonesia
***Email: tsv09@chem.its.ac.id**

Abstrak

Telah berhasil disintesis senyawa trisindolina baru: 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona melalui reaksi substitusi aromatik elektrofilik 5-bromo-*N*-metilindola dengan 5-bromoisatin pada kondisi asam dengan rendemen 53% yang tidak sitotoksik terhadap sel normal (sel Vero). Metilasi 5-bromoindola menghasilkan 5-bromo-*N*-metilindola dengan rendemen 87%.

Kata kunci: **sintesis, turunan 3,3'-di(indol-3-il)indolin-2-ona, sitotoksisitas**

ABSTRACT

3,3'-di(5-bromo-N-metilindol-3-yl)-5-bromoindolin-2-one has been successfully synthesized by electrophilic aromatic substitution reaction of 5-bromo-N-methylindole with 5-bromoisatin under acidic condition afforded in 53% yield which are not cytotoxic to normal cell (vero cell) line. Methylation of 5-bromoindole gave 5-bromo-N-methylindole in 87% yield.

Key word: synthesis, 3,3'-di(indol-3-il)indolin-2-ona derivatives, citotoxicity

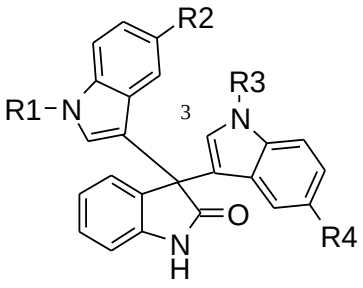
PENDAHULUAN

3,3'-Di(indol-3-il)indolin-2-ona **(1a)** merupakan antibiotik yang berhasil diisolasi dari bakteri *Vibrio sp* pada spons *Hyrtios altum* yang tumbuh di Okinawa, Jepang dan dari bakteri *Vibrio parahaemolyctus* Bio 249 yang berasal dari Laut Utara dengan rendemen masing-masing 0,3% dan 0,16%. Trisindolina **(1a)** dapat menghambat pertumbuhan *Escheria coli*, *Bacillus substilis* dan *Staplicoccus aureus* (Kobayashi *et al.*, 1994; Veluri *et al*., 2003). Trisindolina **(1a)** secara *in vitro* dapat menghambat sel kanker uterus dengan IC_{50} 3,51 µM, sel kanker kolon HCT15 dengan IC_{50} 6,63 µM (Yoo *et al*., 2008), dan sel kanker prostat DU-145 dengan IC_{50} 8,7 µM (Kamal *et al*., 2010). Keberadaan gugus *N*-metil atau bromo

diketahui dapat meningkatkan bioaktivitas trisindolina **(1a)**; sebagai contoh 3,3'-di(*N*-metilindol-3-il)indolin-2-ona **(1b)** dan 3,3'-di(5-bromo-indol-3-il)indolin-2-ona **(1c)** masing-masing menghambat sel kanker prostat DU-145 dengan IC_{50} 5,6 µM dan 3,6 µM sedangkan trisindolina **(1a)** sebesar 8,7 µM (Kamal *et al*., 2010).

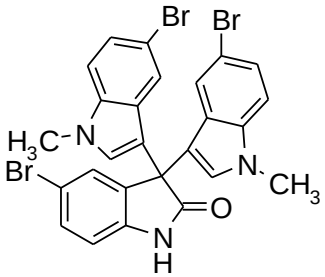
Trisindolina **(1a)** pertama kali disintesis oleh Kobayashi *et al.* (1994) dalam dua tahap dengan rendemen 47%. Trisindolina **(1a)** dan turunannya **(1b-c)** selanjutnya berhasil dalam satu tahap menggunakan variasi katalis dan kondisi reaksi menghasilkan rendemen 80-97%: asam asetat glasial pada suhu kamar (Dwiningsih, 2006), boron trifluorida pada suhu kamar (Febriana, 2006), cerium ammonium nitrat dengan gelombang ultrasonik pada suhu kamar (Wang dan Ji, 2006), asam sulfat – silika pada suhu kamar (Azizian *et al*., 2006), besi (III) klorida (Kamal *et al*., 2010); *N,N,N,N*-tetrametilguanidinium trifluoro-asetat pada suhu kamar Moghadam *et al.*, 2010), asam sulfat pada suhu kamar (Fitriah, 2010; Ja'far, 2010).

Keberhasilan metoda sintesis tersebut di atas dan adanya potensi turunan trisindolina **(1a)** untuk dikembangkan sebagai kelompok anti kanker baru merupakan peluang untuk mensintesis dan mengkaji aktifitas anti kanker 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)**. Senyawa anti kanker yang dapat dikembangkan sebagai obat kanker bersifat sitotoksik terhadap sel kanker tetapi aman terhadap sel normal. *Paper* ini bermaksud melaporkan sintesis senyawa baru 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** dan uji sitotoksisitasnya terhadap sel normal (sel Vero).

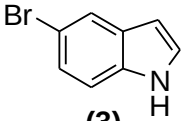


(1)

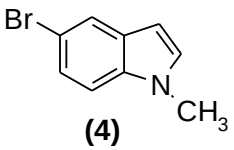
	R_1	R_2	R_3	R_4
(a)	H	H	H	H
(b)	Me	H	Me	H
(c)	H	Br	H	Br



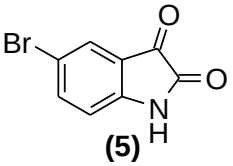
(2)



(3)



(4)



(5)

METODE PENELITIAN

Umum

5-Bromoindola **(3)** (Aldrich, B6,860-7), 5-bromoisatin **(5)** (Aldrich, 476994-5G), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il(-2,5-difeniltetra-zolium bromide) (MTT) (Aldrich, 135038), dimetil sulfat (Merck, 8030711000), asam sulfat (Merck, 100731000), natrium hidroksida (Merck, 1064981000), dimetil sulfoksida anhidrat (Merck, 8029122500) dan metanol (Merck, 1060092500) diperoleh secara komersial dan dimanfaatkan secara langsung dalam penelitian tanpa pemurnian. Monitoring reaksi dilakukan dengan kromatografi lapis tipis silica gel 60 F_{254} (Merck, 1.05554.0001) dengan penampak noda uap iodina dan lampu UV (λ 254 dan 365 nm), kromatografi cair vakum dilakukan menggunakan silica gel 60H (Merck 107736). Titik leleh diukur dengan *melting point apparatus* Fisher John. Spektra ^{1}H dan ^{13}C NMR diukur dengan spektrometer NMR Jeol Delta2 ECA 500 MHz. Spektrum massa direkam dengan spektrometer massa Water LCP Premier XE. Sel Vero untuk uji sitotoksisitas merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada. Absorbansi formazan diukur dengan ELISA *reader* Bio-Rad microplate reader Benchmark serial no. 11565.

Sintesis 5-Bromo-*N*-metilindola (4)

Sintesis 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** dilakukan dengan mengadaptasi prosedur alkilasi turunan indola (Santoso *et al*., 2009). 5-Bromoindola **(3)** (0,30 gram; 1,54 mmol) dan natrium hidroksida (0,19 gram; 4,86 mmol) dalam dimetil sulfoksida anhidrat diaduk pada suhu kamar selama 60 menit. Dimetilsulfat (0,46 ml; 4,86 mmol) kemudian ditambahkan dan campuran diaduk lebih lanjut pada suhu kamar selama 90 menit. Hasil sintesis kemudian ditambah air dingin, dan diekstrak tiga kali dengan diklorometana. Fasa organik selanjutnya digabung, dicuci dengan air, dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. 5-Bromo-*N*-metilindola **(4)** yang diperoleh dihitung rendemennya, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer NMR.

Sintesis 3,3'-Di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona (2)

Sintesis 3,3'-di(5-bromo-*N*-metil-indol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** dilaksanakan dengan mengadopsi metode sintesis turunan trisindolina (Santoso *et al.*, 2007). Larutan 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** (0,10 gram; 0,48 mmol) dan 5-bromoisatin **(5)** (0,05 gram; 0,24 mmol) dalam metanol ditambah katalis asam sulfat pekat, dan diaduk pada suhu kamar selama enam hari. Hasil sintesis kemudian ditambahkan air dingin, dan diekstrak tiga kali dengan diklorometana. Fasa organik selanjutnya digabung, dicuci dengan air, dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Residu yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi cair vakum silica gel menggunakan gradien eluen *n*-heksana:diklorometana (3:1), (2:1), (1:1), dan (1:2); diklorometana (100%); diklorometana:etil asetat (1:1) dan (1:2). 3,3'-Di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(3)** murni yang diperoleh dihitung rendemennya, diukur titik lelehnya, dan diidentifikasi dengan spektrometer NMR dan massa, serta diuji sitotoksisitasnya terhadap sel Vero.

Uji Sitotoksisitas 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona (2) terhadap Sel Vero

Uji sitotoksisitas 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** terhadap sel Vero dilakukan dengan metode 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromida (MTT) yang dimodifikasi (Mursyidah, 2010). Senyawa uji **(2)** dilarutkan dalam dimetil sulfoksida dan diencerkan dengan media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1, 5, 10, 25, 50, dan 100 µM. Suspensi sel Vero dalam medium M199 sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam plat 96 sumuran (per sumuran berisi 1,5 x 10^4 sel) dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2. Larutan senyawa uji dalam berbagai seri konsentrasi selanjutnya ditambahkan ke sel Vero dan diinkubasi lebih lanjut selama 24 jam. MTT dalam phosphate buffer saline ditambahkan ke dalam tiap sumuran pada akhir inkubasi dan inkubasi dilanjutkan selama enam jam pada suhu 37^{o}C sampai terbentuk formazan. Sel yang hidup akan mengkonversikan MTT menjadi formazan yang berwarna biru tua. Natrium dodesil sulfat kemudian ditambahkan, dan campuran diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan tiap sumuran diukur menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil serapan (absorbansi) dari larutan yang diuji dikonversi dalam

bentuk kurva antara kehidupan sel (viabilitas sel) (%) terhadap konsentrasi sehingga didapatkan nilai *inhibitory concentration*$_{50}$ (IC_{50}).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis 5-bromo-*N*-metilindola (4)

Sintesis 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama adalah mereaksikan 5-bromoindola **(3)** (0,30 gram; 1,54 mmol) dengan natrium hidroksida (0,19 gram; 4,86 mmol) dalam dimetil sulfoksida pada suhu kamar selama 60 menit sehingga terbentuk garam natrium 5-bromoindola. Tahap kedua adalah mereaksikan garam yang terbentuk dengan dimetilsulfat (0,46 ml; 4,86 mmol) pada suhu kamar selama 90 menit sehingga terbentuk 5-bromo-*N*-metilindola **(5)** melalui mekanisme reaksi S_N2. 5-Bromo-*N*-metilindola **(5)** yang dihasilkan berupa padatan kuning sebanyak 0,28 gram atau dengan rendemen 87%, dengan titik leleh 40-41^oC (39-43^0C; Sigma-Aldrich, 2012). Identifikasi dengan spektrometer NMR (dalam DMSO-d_6) diperoleh spektrum ^1H NMR yang menunjukkan sinyal singlet pada pergeseran kimia 3,78 ppm yang merupakan sinyal dari tiga proton gugus *N*-metil, dan sinyal multiplet pada pergeseran kimia 6,40–7,73 ppm merupakan sinyal dari lima proton aromatik.

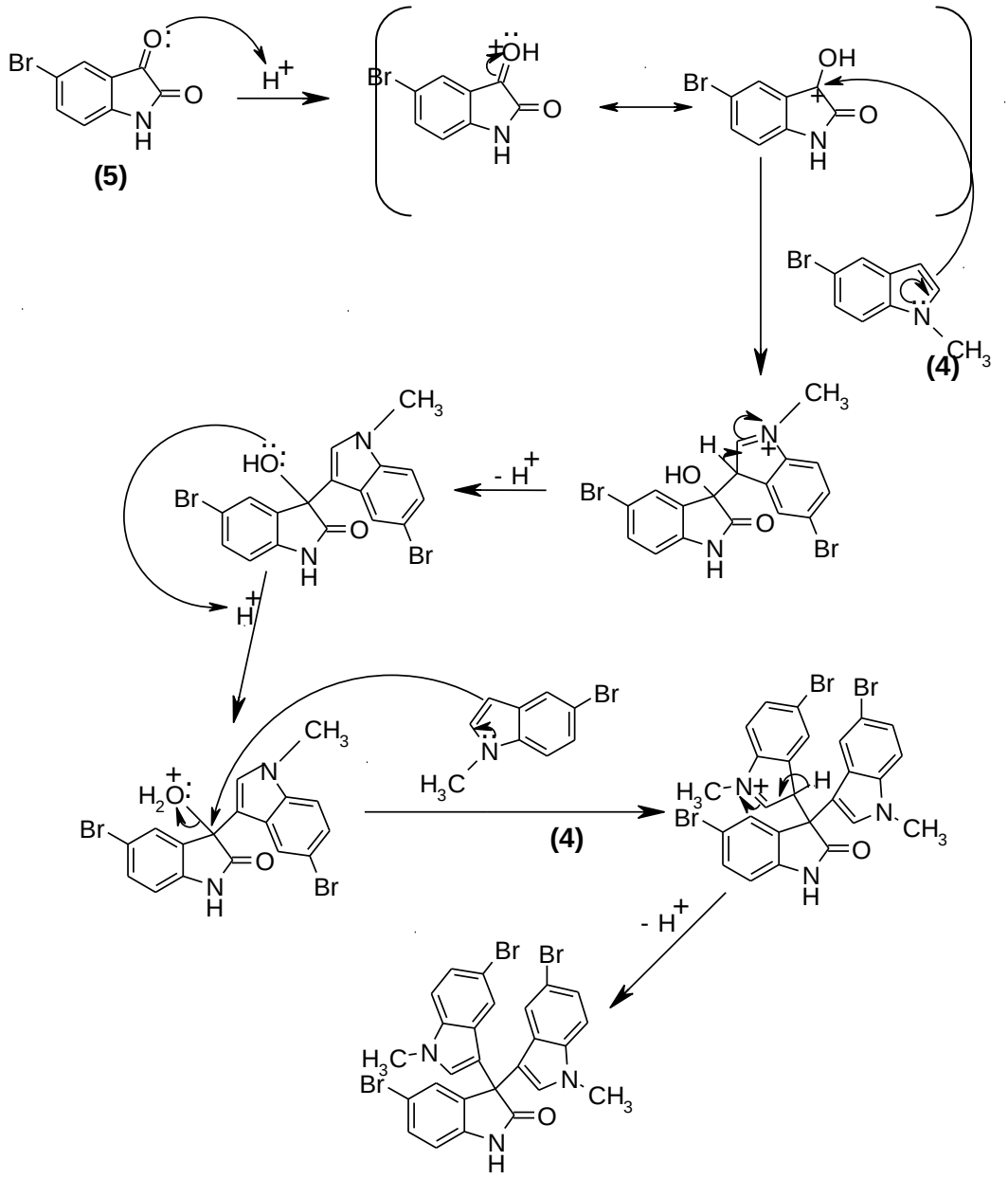
Sintesis 3,3'-Di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona (2)

Sintesis 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** dilakukan dengan mereaksikan 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** (0,10 gram; 0,48 mmol) dengan 5-bromoisatin **(5)** (0,050 gram; 0,24 mmol) dalam metanol menggunakan katalis asam sulfat pekat pada suhu kamar selama enam hari. Hasil sintesis kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* dan residu yang diperoleh dimurnikan menggunakan kromatografi cair vakum silika gel dengan gradien eluen *n*-heksana:diklorometana (3:1), (2:1), (1:1), dan (1:2); diklorometana (100%); diklorometana:etil asetat (1:1) dan (1:2) sehingga diperoleh 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** berupa kristal putih sebanyak 0,080 gram atau dengan rendemen 53%, dengan titik leleh 294-295°C. Identifikasi 5-bromoindolin-2-ona **(2)** dengan spektrometer NMR (dalam DMSO-d_6) diperoleh spektrum ^1H NMR yang menunjukkan adanya tiga sinyal. Sinyal pertama berupa singlet dengan pergeseran kimia 3,73 ppm merupakan sinyal dari enam proton kedua gugus *N*-metil, sinyal kedua berupa multiplet

pada pergeseran kimia 6,98-7,46 ppm merupakan sinyal sebelas proton aromatik, dan sinyal ketiga berupa sinyal singlet lebar pada pergeseran kimia 10,94 ppm merupakan sinyal proton NH. Spektrum ^{13}C NMR 5-bromoindolin-2-ona **(2)** (dalam DMSO-d_6) menunjukkan sinyal karbon *N*-metil pada pergeseran kimia 32,65 ppm, sinyal khas karbon kuartener C-3 dan karbon gugus karbonil berturut-turut dijumpai pada pergeseran kimia 52,20 ppm dan 177,84 ppm. Karbon-karbon aromatik memberikan sinyal pada pergeseran kimia 111,52; 111,98; 112,02; 112,36; 113,63; 122,54; 123,87; 127,19; 127,49; 130,27; 131,24; 135,76; 136,17; dan 140,49 ppm. Spektrum massa (ESI) 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** dengan jelas menunjukkan puncak-puncak pada *m/z* 626 untuk $(M+H)^+$, ^{79}Br, ^{79}Br, ^{79}Br; *m/z* 628 untuk $(M+H)^+$, ^{79}Br, ^{79}Br, ^{81}Br; *m/z* 630 untuk $(M+H)^+$, ^{79}Br, ^{81}Br, ^{81}Br; *m/z* 632 untuk $(M+H)^+$, ^{81}Br, ^{81}Br, ^{81}Br. Mekanisme reaksi pembentukan 5-bromoindolin-2-ona **(2)** disarankan diawali dengan protonasi gugus karbonil dari isatin **(5)**, dan diikuti dengan reaksi substitusi aromatik elektrofilik indola **(4)**. Intermediet yang terbentuk dalam suasana asam bereaksi lebih lanjut dengan indola **(4)** sehingga terbentuk 5-bromoindolin-2-ona **(2)** seperti terlihat pada Gambar 1.

Uji Sitotoksisitas 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona (2) terhadap Sel Normal (Sel Vero)

Uji sitotoksisitas 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** dilakukan terhadap sel Vero dengan didasarkan pada kemampuan enzim suksinat dehidrogenase untuk mengkonversi MTT menjadi formazan. Hasil serapan (absorbansi) dari larutan yang diuji dikonversi dalam bentuk kurva antara persen kehidupan sel (viabilitas sel) dengan konsentrasi sehingga didapatkan nilai *inhibitory concentration* 50 (IC_{50}). Pengamatan menggunakan ELISA *reader* pada 595 nm didapatkan absorbansi formazan. Kurva konsentrasi senyawa uji terhadap viabilitas sel Vero seperti dalam Gambar 2 menunjukkan bahwa tidak ada hubungan linier antara konsentrasi senyawa yang diuji dengan efek sitotoksik terhadap sel Vero, sehingga pada uji sitotoksisitas ini tidak dapat dilakukan perhitungan nilai IC_{50}. Hasil ini menunjukkan bahwa 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** tidak sitotoksik atau aman terhadap sel Vero.

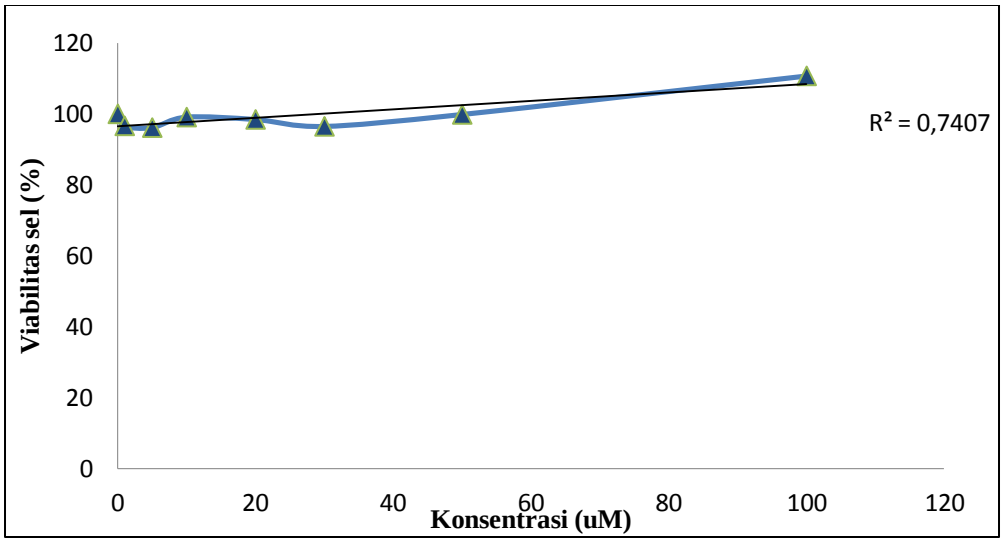


Gambar 1. Mekanisme Reaksi Pembentukan Indolin-2-ona **(2)**

(2)

Hasil ini sesuai dengan yang diharapkan, karena salah satu kriteria senyawa anti kanker yang dapat dikembangkan sebagai obat kanker adalah yang tidak toksik terhadap sel normal.

Uji sitotoksisitas 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)** terhadap sel-sel kanker tengah dilaksanakan.



Gambar 2. Kurva viabilitas sel Vero (sel normal) terhadap konsentrasi (µM) larutan 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromoindolin-2-ona **(2)**

KESIMPULAN

Metilasi 5-bromoindola **(3)** dengan natrium hidroksida dan dimetilsulfat dalam pelarut dimetil sulfoksida anhidrat diperoleh 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** berupa padatan kuning dengan rendemen 87%. Reaksi substitusi aromatik elektrofilik 5-bromo-*N*-metilindola **(4)** dengan 5-bromoisatin **(5)** pada kondisi asam diperoleh 3,3'-di(5-bromo-*N*-metilindol-3-il)-5-bromo-indolin-2-ona **(2)** berupa kristal putih dengan rendemen 53%. Indolin-2-ona **(2)** tidak bersifat sitotoksik terhadap sel normal (sel vero).

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

Astuti, P., Alam, G., Hartati, M.S., Sari, D., dan Wahyuono, S. (2005), "Uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid dari Spons *Petrosia sp*: Potensial Pengembangan sebagai Antikanker", *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 16, No. 1, hal. 58-62.

Azizian, J., Mohammadi, A.A., Karimi, N., Mohammadizadeh, M. R., dan Karimi, A.R. (2006), "Silica Sulfuric Acid a Novel and Heterogeneous Catalyst for The Synthesis of Some New Oxindole Derivatives", *Catalysis Communications,* Vol. 7, hal. 752–755

Dwiningsih, R. (2006), *Strategi Baru Sintesis Trisindolina dan Turunannya*, Skripsi S1, Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Febriana, A. (2006), *Sintesis Trisindolina dan Turunannya*, Skripsi S1, Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Fitriah, N. (2010), *Sintesis dan Sitotoksisitas 3,3'-Bis(5,6-Dimetoksiindol-3-il)5-Bromooksindola terhadap Sel Kanker Serviks HeLa*, Tesis S2, Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Ja'far, N.H. (2010), *Sintesis dan Uji Sitotoksik 3-3'-Bis(5,6-Dimetoksiindol-3-il)-5-Kloro-oksindola terhadap Sel Kanker Serviks HeLa*, Tesis S2, Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Kamal, A., Srikanth, Y.V.V., Khan, M.N.A., Shaik, T.B., dan Ashraf, M. (2010), "Synthesis of 3,3-Diindolyl Oxyindoles Efficiently Catalysed by $FeCl_3$ and Their *in vitro* Evaluation for Anticancer Activity", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 20, No. 17, hal. 5229–5231.

Kobayashi, M., S. Aoki, K. Gato, K. Matsunami, M. Korusu, I. Kitagawa. (1994), "Marine Natural Product, XXXIV. Trisindoline, a New Antibiotic Indole Trimer, Produced by Bacterium of *Vibrio Sp*.", *J.Chem. Pharm. Bull*, Vol. 42, No.12, hal. 2449-2451.

Moghadam, K. R., Kiasaraie, M.S., dan Amlashi, A.T. (2010), "Synthesis of Symmetrical and Unsymmetrical 3,3-di(indolyl)indolin-2-ones under Controlled Catalysis of Ionic Liquids", *Tetrahedron*, Vol. 66, No. 5 , hal. 2316-2321.

Mursyidah, Y. (2010), *Sintesis dan Sitotoksisitas 5-Bromo-3-Hidroksi-3-(1H-indol-3-il)indolin-2-on dan 3-Hidroksi-5-Kloro-1-Metil-3-(1H-indol-3-il)indolin-2-on Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Kanker Kolon WiDr*, Skripsi S1, Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

Santoso, M., Kusman, Febriana, A., Dwiningsih, R., Qomariyah, T., Novia, N.F., dan Fatmasari, Y. (2007). "Mild and High-yield Synthesis of 3,3'-Bis(indol-3-yl)oxindole and Derivatives". International Symposium on Catalysis and Fine Chemicals, Nanyang Technology University, Singapura, 17-21 Desember.

Santoso, M., Somphol, K., Kumar, N., dan Black, D.StC. (2009), "Synthesis of Indolocyclo-triveratrylenes", *Tetrahedron*, Vol. 65, No. 31, hal. 5977-5983.

Sigma-Aldrich diakses pada tanggal 23 Januari 2012, http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=718300%7CALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC

Veluri, R., Oka, I., Wagner-Dobler, I., dan Laatsch, H. (2003), "New Indole Alkaloids from The North Sea Bacterium *Vibrio parahaemolyticus* Bio 249", *Journal of Natural Products*, Vol. 66, No. 11, hal. 1520-1523.

Wang, S.Y., dan Ji, S.J. (2006), "Facile Synthesis of 3,3-di(heteroaryl)indolin-2-one Derivatives Catalyzed by Ceric Ammonium Nitrate (CAN) Under Ultrasound Irradiation", *Tetrahedron*, Vol. 62., No. 2, hal. 1527-1535.

Yoo, M., Choi, S., Choi, K.Y., Yon, G.H., Chae, J.C., Kim, D., Zylstra, G.J., dan Kim, E. (2008), "Trisindoline Synthesis and Anticancer Activity", *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, Vol. 376, No.6, hal. 96-99.