

SINTESIS PROGESTERON-11 α -HEMISUKSINAT-TME

Ratnawati Kukul, Daniel Santoso, Ai Sutarsih, Natalia Adventini
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

SINTESIS PROGESTERON-11 α -HEMISUKSINAT-TME. Penentuan progesteron dalam plasma banyak dilakukan di bidang kedokteran dan bidang peternakan. Mengingat teknik RIA telah banyak digunakan dalam bidang reproduksi/endokrinologi, maka tujuan penelitian ini adalah membuat progesteron bertanda ^{125}I perlu dilakukan beberapa tahap percobaan yaitu mengkonjugasikan gugus tirosina pada senyawa progesteron-11 α -hemisuksinat, dan kemudian iodinasi dilakukan pada hasil sintesis. Pembentukan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dilakukan dengan mereaksikan gugus karboksil pada progesteron-11 α -hemisuksinat dengan gugus amina dari tirosin metil ester dalam larutan dioksan, dan didapat kristal putih progesteron-11 α -hemisuksinat-TME. Hasil sintesis kemudian diuji kemurniannya dengan kromatografi lapisan tipis, dan diperoleh satu noda dengan Rf 0,71 yang sesuai dengan data pada pustaka [1]. Untuk membuktikan bahwa hasil sintesis tersebut adalah progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dilakukan uji Lowry, dan uji Millon's yang menentukan adanya gugus tirosina serta penentuan spektrometri infra merah. Dari kedua uji tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil sintesis mengandung gugus tirosina, dan hasil analisis spektrum IR menunjukkan bahwa senyawa mengandung suatu gugus amida dan gugus fenol. Akhirnya dari seluruh analisis dapat disimpulkan bahwa hasil sintesis yang terjadi adalah progesteron-11 α -hemisuksinat-TME.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF PROGESTERONE-11 α -HEMISUCCINATE-TME. Progesterone in plasma is widely determined for medical and veterinary purpose. As radioimmunoassay has become a common analytical tool used in endocrinology, in the present study an attempt was made to prepare ^{125}I -labeled progesterone which is an essential component of the technique. The labeling of Progesterone with ^{125}I proceeded through a number of steps, i.e. coupling of a tyrosine group to progesterone-11 α -hemisuccinate followed by iodination of the tyrosine conjugate. The tyrosine methylester conjugate was synthesized through the reaction of the carboxyl group in progesterone-11 α -hemisuccinate with the amine group of the tyrosine methyl ester dissolved in dioxane. White crystals of progesterone-11 α -hemisuccinate-TME were obtained. Purity testing by TLC yielded a single spot having an Rf value of 0,71 conforming to published data. The identity of the conjugate was confirmed for the presence of the tyrosine group by Lowry and Millon's tests and by infra red spectrophotometry. The infra red spectrum also showed the presence of an amide group and a phenolic group, which together with the results of the test above confirmed the formation of progesterone-11 α -hemisuccinate-TME.

PENDAHULUAN.

Progesteron adalah hormon kelamin wanita yang dihasilkan terutama oleh corpus luteum, placenta, dan adrenal cortex. Penentuan progesteron dalam plasma sangat diperlukan terutama untuk mengevaluasi gangguan haid, infertilitas, dan untuk menilai fungsi placenta selama kehamilan bila terjadi kelainan. Di bidang peternakan penentuan progesteron digunakan sebagai salah satu cara uji kehamilan, dan menentukan saat yang tepat bila inseminasi harus dilakukan agar kehamilan dapat terjadi.

Mengingat bahwa teknik RIA telah banyak digunakan dalam bidang reproduksi/endokrinologi, maka tujuan penelitian ini adalah memper-

siapkan pereaksi-pereaksi yang dibutuhkan untuk penentuan RIA diantaranya progesteron bertanda ^{125}I .

Hormon progesteron merupakan molekul antigen yang tidak dapat langsung ditandai dengan ^{125}I , maka perlu dibuat jembatan antara progesteron dengan suatu zat lain yang dapat diiodinasi. Reaksi penggabungan ini dapat dimungkinkan bila senyawa yang akan dikonjugasikan mengandung gugus karboksil atau amino yang reaktif (1,2). Senyawa progesteron termasuk jenis senyawa yang tidak mengandung gugus tersebut, tetapi mengandung gugus hidroksil yang dapat dibuat derivat hemisuksinat, yang memungkinkan terjadinya reaksi

penggabungan dengan residu sejenis tirosina misalnya TME (Tirosin Metil Ester). Iodinasi kemudian dilakukan pada hasil reaksi penggabungan.

Pada penelitian ini sintesis progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dilakukan dengan mereaksikan gugus karboksil dari progesteron-11 α -hemisuksinat dengan gugus amino dari tirosina metil ester dalam larutan dioksan. Hasil sintesis dianalisis dengan spektrometri infra merah. Untuk menentukan adanya gugus tirosina dilakukan uji Lowry dan uji Millon's (3). Kemurnian hasil sintesis diuji dengan kromatografi lapis tipis.

BAHAN DAN PERALATAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah: progesteron-11 α -hemisuksinat dari Sigma, tributilamin, isobutilkloro format, tirosina metil ester produksi Fluka. Dioksan, benzen, metanol, HCl, NaOH, NaHCO₃, Na Tartrat, CuSO₄ 5H₂O, pereaksi Folin Ciocalteu, dan pelat TLC kiesel gel 60 F 254 produksi Merck.

Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah: satu set perangkat alat destilasi, alat sentrifuga kecepatan tinggi (20.000 rpm) IECB-22 International Equipment Company, lampu UV Gelman Instrument Company model 51438, dan alat spektrofotometer infra merah Shimadzu IR-420.

TATA KERJA

Pembuatan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME

130 mg progesteron-11 α -hemisuksinat dilarutkan dalam 5 ml dioksan yang bebas air. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 75 ml tributilamin, campuran didinginkan pada 11°C, kemudian ditambahkan 40 ml isobutilkloroformat dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya ke dalam campuran reaksi tersebut ditambahkan sedikit demi sedikit larutan tirosina metil ester hidroklorida sambil diaduk (69 mg tirosina metil ester hidroklorida dilarutkan dalam 20 ml campuran dioksan, akuades dengan perbandingan 1 : 1). Campuran reaksi diaduk dengan *stirer* selama 4 jam pada suhu 4°C dan pH diatur dengan menambahkan NaOH 1 M hingga diperoleh pH 7-8. Campuran reaksi kemudian dituangkan ke dalam air es dan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME akan mengendap. Endapan disentrifuga pada 14.000 rpm, dicuci beberapa kali, mula-mula dengan 30 ml akuades, 30 ml HCl 1M, 40 ml NaHCO₃ 1M,

dan terakhir dengan 40 ml akuades. Hasil reaksi kemudian dikeringkan dalam desikator ham-pa yang diberi pengering silika gel.

Analisis dan uji kemurnian hasil sintesis progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dengan kromatografi lapis tipis.

Kemurnian hasil sintesis diuji dengan kromatografi lapis tipis (TLC). Sebagai pelat TLC digunakan kiesel gel 60 F 254 dengan ukuran 3 x 10 cm dan dielusi dengan campuran pelarut benzen, aseton, metanol (5 : 5 : 2). Untuk mendeteksi digunakan lampu UV dan uap iodium. Pengujian hasil sintesis dilakukan dengan membandingkan nilai Rf pada progesteron-11 α hemisuksinat-TME dengan nilai Rf dari tirosina metil ester, dan progesteron-11 α -hemisuksinat.

Analisis hasil sintesis dengan spektrofotometer infra merah

Pengujian dilakukan dengan teknik lempeng KBr. 700 mg cuplikan yang akan dianalisis digerus halus dan dicampur homogen dengan 1 mg serbuk KBr kering. Campuran ini kemudian ditekan dengan alat penekan hidrolik pada tekanan 10.000 - 15.000 pon/inci, sehingga terbentuk suatu lempeng bulat KBr yang tipis dan transparan (tembus cahaya). Lempeng KBr ini kemudian dipasang dalam sel dan ditempatkan dalam jalan berkas sinar cuplikan untuk dibuat spektrumnya.

Pengujian dilakukan berturut-turut pada progesteron-11 α -hemisuksinat, tirosina metil ester hidroklorida, dan hasil sintesis progesteron-11 α -hemisuksinat-TME untuk dibandingkan hasil spektrumnya.

Untuk menguji adanya gugus tirosina dalam hasil sintesis dilakukan uji Lowry dan uji Millon's.

Uji Lowry:

0,5 mg senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam 200 ml NaOH 1 N. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 1 ml pereaksi A (yang terdiri dari 50 ml larutan 2% Na CO dalam 0,1 N NaOH dan 1 ml 0,5% CuSO₄ 5 H₂O dalam 1% Na, K tartrat), dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,1 ml pereaksi Folin Ciocalteu dan dikocok.

Uji Millon's:

Ke dalam tabung reaksi dilarutkan 0,5 mg senyawa hasil sintesis dengan 200 ml NaOH 1 N, kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi Millon's.

HASIL DAN PEMBAHASAN

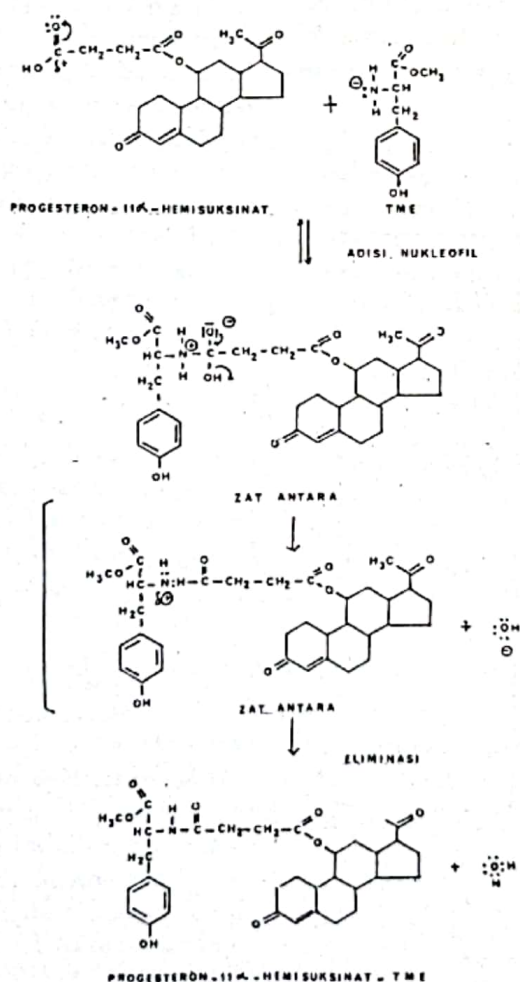
Mekanisme reaksi antara progesteron-11 α -hemisuksinat dengan tirosina metil ester merupakan hasil dari dua tahap reaksi yaitu: adisi nukleofilik kepada gugus karboksil disusul dengan eliminasi molekul air (5). Hasil reaksi ini adalah asil nukleofilik, yang berarti substitusi pada suatu karbon asil (R-CO-). Senyawa tirosina metil ester mengandung pasangan elektron yang tak terbagi dalam orbital terisi pada nitrogen dari gugus amina yang memungkinkan

senyawa ini berfungsi sebagai nukleofil yang akan bereaksi dengan jembatan hemisuksinat dari senyawa progesteron.

Mekanisme reaksi pembentukan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil sintesis diperoleh kristal berwarna putih dengan rendemen 43%.

Hasil sintesis kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis dan dibandingkan dengan pereaksinya.



Gambar 1. Mekanisme reaksi pembentukan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME

Hasil analisis dibawah lampu UV pada panjang gelombang 375 nm menampakkan noda progesteron-11 α -hemisuksinat dan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dengan Rf masing-masing 0,58 dan 0,71, sedang noda untuk senyawa TME tidak terdeteksi. Selanjutnya dicoba pula dideteksi dengan uap I₂ yang memberikan noda untuk senyawa TME dengan Rf 0,39 dan progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dengan Rf 0,71 sedang noda untuk senyawa progesteron-11 α -hemisuksinat tidak terdeteksi sebab senyawa tersebut tak mengandung ikatan rangkap yang memungkinkan untuk bereaksi dengan I₂.

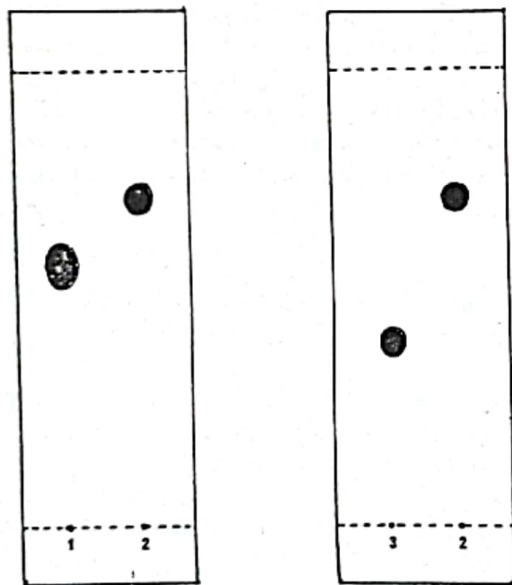
Dari hasil analisis dengan kromatografi lapis tipis, terlihat bahwa hasil sintesis hanya memberikan satu noda dengan Rf 0,71 dan sesuai dengan data pustaka (Rf 0,72) (1). Noda dengan Rf 0,39 dan 0,58 masing-masing untuk senyawa TME dan progesteron-11 α -hemisuksinat tidak terlihat pada senyawa hasil sinte-

sis. Ini memberikan petunjuk bahwa senyawa hasil sintesis cukup murni.

Hasil analisis dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 2.

Untuk menguji kebenaran hasil sintesis tersebut, dilakukan analisis dengan spektrofotometer infra merah. Dari spektrum infra merah diperoleh resapan pada 3125 - 3570 cm yang ditimbulkan oleh vibrasi ulur N-H (daerah ini sama dengan daerah dimana OH menyerap). Daerah 1640 cm yang merupakan pita amida I, hasil tumpang suh (overlap) vibrasi ulur C=O dan vibrasi tekuk N-H, 1425 cm yang ditimbulkan oleh vibrasi ulur C-N dari gugus C-N-H, 909cm N-H *wagging*, 3045 cm vibrasi ulur C-H untuk senyawa aromatik, 1223 cm vibrasi ulur C-O, 1605, 1505, 1495 cm⁻¹ vibrasi ulur C-C, 1359 cm⁻¹ vibrasi tekuk O-H (4).

Dari hasil analisis spektrum infra merah dapat disimpulkan bahwa senyawa mengandung suatu gugus amida dan fenol yang sesuai dengan senyawa progesteron-11 α -hemisuksinat-TME.

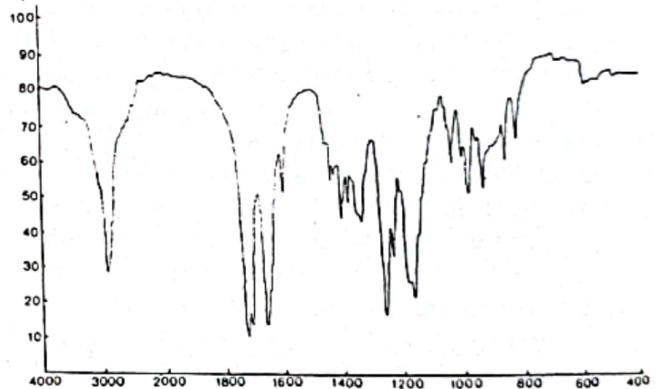


A. Hasil deteksi lampu UV

A. Hasil deteksi uap iodium

1. Progesteron-11 α -hemisuksinat dengan Rf 0,57
2. Progesteron-11 α -hemisuksinat-TME dengan Rf 0,71
3. Tiroein metil ester hidroklorida dengan Rf 0,39

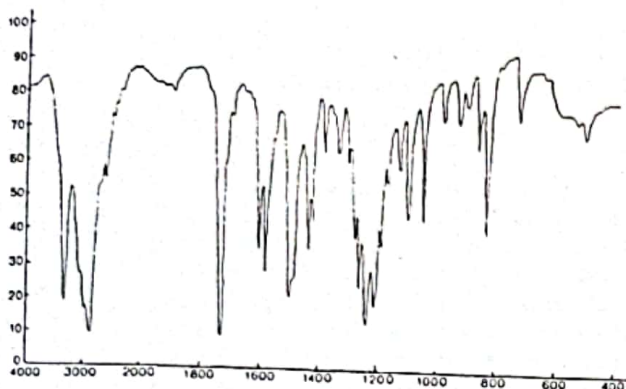
Gambar 2. Hasil penentuan dengan kromatografi lapisan tipis



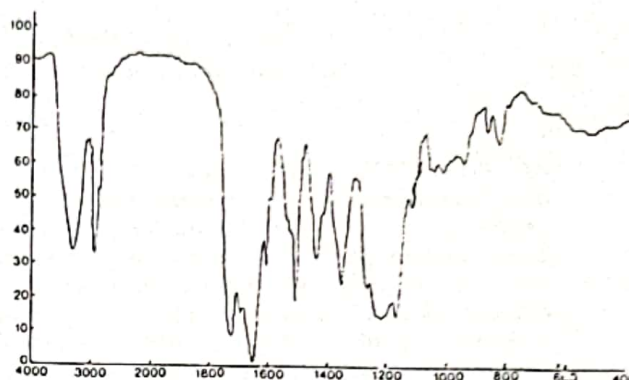
Gambar 3A. Spektrum IR senyawa progesteron-11 α -hemisuksinat

Hasil analisis spektrum infra merah untuk senyawa hasil sintesis dan pereaksi yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3 (A,B,C).

Untuk membuktikan adanya gugus tirosina dilakukan uji Lowry dan uji Millon's (3). Dengan pereaksi Lowry memberikan hasil positif dengan warna biru keungu-unguan yang disebabkan oleh warna hasil reaksi Biuret disamping warna yang disebabkan oleh reduksi fosfomolibdat-fosfo-wolframat oleh gugus tirosina yang ada dalam senyawa tersebut. Hasil pengujian dengan pereaksi Millon's memberikan hasil positif yaitu warna merah yang karakteristik karena adanya gugus hidroksi phenil,



Gambar 3B. Spektrum IR senyawa tirosin metil ester hidroklorida



Gambar 3C. Spektrum IR senyawa progesteron-11 α -hemisukinat-TME

dan reaksi ini positif hanya bila senyawa mengandung protein dengan gugus tirosina. Uji yang sama dilakukan pula untuk senyawa progesteron-11 α -hemisukinat, yang memberikan hasil negatif, baik dengan pereaksi Lowry ataupun Millon's. Dari kedua uji tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil sintesis mengandung gugus tirosina.

KESIMPULAN

Reaksi progesteron-11 α -hemisukinat dengan tirosina metil ester hidroklorida dalam dioksan menghasilkan kristal putih dengan rendemen 43%. Analisis dengan kromatografi la-

pisan tipis menunjukkan bahwa hasil sintesis cukup murni dengan Rf 0,71. Hasil identifikasi spektrum IR memberikan petunjuk bahwa senyawa mengandung gugus amida dan fenol. Pengujian dengan pereaksi Millon's dan Lowry membuktikan bahwa senyawa mengandung protein dengan gugus tirosina. Akhirnya dari seluruh hasil analisis dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah progesteron-11 α -hemisukinat-TME. Hasil sintesis ini diharapkan akan sangat berguna bagi pembuatan progesteron bertanda ^{125}I .

DAFTAR PUSTAKA

1. Thorell, J.I. and Larson, S.M., Methodology and Clinical Application, Radioimmunoassay and Related Techniques, The C.V. Mosby Company (1978) 265-266.
2. Anonim, Laboratory training manual on radioimmunoassay in animal reproduction, Technical Report Series No 223, IAEA, Vienna (1984) 91, 157-159.
3. Benjamin Harrow, Laboratory Manual of Biochemistry, Fifth Edition, Saunders Company, 21-22.
4. Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morrill, T.C, Spectrometric Identification of Organic Compounds", Fourth Edition, John Wiley & Sons (1981) 95-129.
5. Edwin, S.G, Mechanism and Structure Organic Chemistry, Holt, Rinehart and Winston, Inc. (1964) 327-330.