

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2013**



JUDUL PENELITIAN :

Modifikasi Struktur Etil *p*-metoksisinamat Isolat *Kaempferia galanga*
dan Uji Aktivitasnya sebagai Kemopreventif Kanker
: Penghambat Angiogenesis

Tim Peneliti :

Dr. Juni Ekowati, MSi., Apt.,
NIDN : 0006026703

Dr. Iwan Syahrial Hamid, MSi. , drh.
NIDN : 0013076801

Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS., Apt.
NIDN : 00260148002

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai Surat Keputusan Rektor
Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi

Nomor : 7673/UN3/KR/2013, tanggal 2 Mei 2013

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER, 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Modifikasi Struktur Etil *p*-metoksisinamat Isolat *Kaempferia galanga* Linn. dan Uji Aktivitasnya sebagai Kemopreventif Kanker : Penghambat Angiogenesis

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Juni Ekowati, Apt., MSi.
NIDN : 0006026703
Jabatan fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Farmasi Universitas Airlangga
Nomor HP : 081554116600
Alamat surat (email) : j_ekowati@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Iwan Syahrial Hamid, MSi.,drh.
NIDN : 0013076801
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

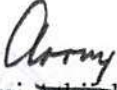
Anggota (2)
Nama Lengkap : Prof. Dr. Tutuk Budiati, Apt., MS.
NIDN : 0006026703
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : --
Alamat : --
Penanggung Jawab : --
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50.000.000,-
Biaya Keseluruhan : Rp 100.000.000,-

Surabaya, 1 Nopember 2013

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi Unair

Ketua,


Dr. Umi Atthijah, MS., Apt.
NIP. 195604071981032001


Dr. Juni Ekowati, Apt., MSi.
NIP.196706021992032002


Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Djoko Agus Purwanto, MSi., Apt.
NIP. 195908051987011001

RINGKASAN

Modifikasi Struktur Etil *p*-metoksisinamat Isolat *Kaempferia galanga* dan Uji Aktivitasnya sebagai Kemopreventif Kanker : Penghambat Angiogenesis

Juni Ekowati, Iwan Syahrial Hamid, Tutuk Budiati

Kaempferia galanga Linn. dilaporkan mengandung senyawa yang menurunkan produksi PGE2 yaitu etil *p*-metoksisinamat (EPMS). Berdasarkan struktur kimianya, EPMS merupakan golongan senyawa aril propenoat yang terdiri dari cincin aromatis, gugus olefin, gugus ester dan gugus metoksi, dimana pada gugus-gugus tersebut dapat dilakukan berbagai kemungkinan transformasi gugus fungsi. Selain itu, etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari *Kaempferia galanga* diketahui mempunyai aktivitas anti inflamasi seperti *NSAIDs*, Oleh karena itu EPMS terpilih sebagai bahan baku kemopreventif kanker yang akan dimodifikasi strukturnya sebagai anti angiogenesis.

Penelitian tahap awal, merubah diperoleh EPMS dari rimpang *K. galanga* menjadi APMS melalui reaksi hidrolisis. Identifikasi senyawa hasil hidrolisis EPMS dilakukan secara spektroskopi : UV, IR, ¹H-NMR maupun ¹³C-NMR. Hasil uji *in silico* terhadap hasil modifikasi struktur EPMS dengan reseptor tirosin kinase (pdb : 1xkk), diketahui nilai *MolDockScore* (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil)akrilamida, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-sulfamoilfenilkarbamotioil)akrilamida, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-(piridin-2-il)sulfamoil)fenil)karbamotioil)akrilamida lebih tinggi daripada EPMS. Oleh karena itu pada penelitian ini akan disintesis senyawa-senyawa tersebut.

Sintesis dilakukan dengan menggunakan iradiasi gelombang mikro menggunakan bahan awal *p*-metoksisinamoil klorida, ammonium tiosianat, dan amina aromatis (anilin, sulfanilamida, sulfadiazin). Sintesis dilakukan melalui dua tahap reaksi, yang pertama adalah reaksi substitusi nukleofilik antara *p*-metoksisinamoil klorida dengan amonium tiosianat menghasilkan *p*-metoksisinamoil isotiosianat dan dilanjutkan dengan tahap dua yaitu adisi nukleofil antara amina aromatis tersebut dengan *p*-metoksisinamoil isotiosianat. Identifikasi struktur terhadap 3 senyawa tersebut akan dilakukan secara spektroskopi UV-Vis, Infra Merah, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Persentase hasil sintesis senyawa (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil)akrilamida dengan iradiasi gelombang mikro 30P dari 400W selama 3 menit sebesar 70%.

Kondisi yang sama dilakukan pada sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-sulfamoilfenilkarbamotioil)akrilamida dan (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-(piridin-2-il)sulfamoil)fenilkarbamotioil)akrilamida, menghasilkan masing-masing = 68% dan 65%.

Berdasarkan hasil penelitian uji antiangiogenesis terhadap EPMS menunjukkan adanya potensi EPMS menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru. Pengamatan secara makroskopis menunjukkan besar hambatan angiogenesis EPMS dosis 30 μ g = 51%, dosis 60 μ g = 64%, 90 μ g = 66%. Hasil pengujian senyawa hasil modifikasi struktur EPMS sebagai antiangiogenesis pada membran korioalantois TAB juga menunjukkan adanya penurunan jumlah pembuluh darah baru dibandingkan dengan membran korioalantois TAB yang diinduksi dengan bFGF 60ng tanpa diberi perlakuan sampel. Besar hambatan tergantung dari dosis yang diberikan. Senyawa J-1 dosis 30 μ g = 53%, 60 μ g = 77%, 90 μ g = 53%, senyawa J-11 dosis 30 μ g = 53%, 60 μ g = 83%, 90 μ g = 83%, senyawa J-12 dosis 30 μ g = 65%, 60 μ g = 85%, 90 μ g = 65%. Hambatan angiogenesis celecoxib dosis 60 μ g sebagai pembanding = 83%.

Hasil penelitian uji antiangiogenesis terhadap EPMS menunjukkan adanya potensi EPMS menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru. Pengamatan secara mikroskopis menunjukkan besar hambatan angiogenesis EPMS dosis 30 μ g = 51%, dosis 60 μ g = 64%, 90 μ g = 66%. Hasil pengujian senyawa hasil modifikasi struktur EPMS sebagai antiangiogenesis pada membran korioalantois TAB juga menunjukkan adanya penurunan jumlah pembuluh darah baru dibandingkan dengan membran korioalantois TAB yang diinduksi dengan bFGF 60ng tanpa diberi perlakuan sampel. Besar hambatan tergantung dari dosis yang diberikan. Senyawa J-1 dosis 30 μ g = 62%, 60 μ g = 72%, 90 μ g = 64%, senyawa J-11 dosis 30 μ g = 67%, 60 μ g = 73%, 90 μ g = 71%, senyawa J-12 dosis 30 μ g = 63%, 60 μ g = 71%, 90 μ g = 72%. Hambatan angiogenesis celecoxib dosis 60 μ g sebagai pembanding = 77%.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut di atas, disimpulkan bahwa modifikasi struktur EPMS menjadi derivat *p*-metoksisinamoiltiurea, yaitu (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil)akrilamida, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-sulfamoilfenil-karbamoitioil) akrilamida dan (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-(piridin-2-il)sulfamoil)fenilkarbamotioil) akrilamida dapat dilakukan dengan memanfaatkan iradiasi gelombang mikro sebagai sumber panas. EPMS dan ketiga hasil modifikasinya memiliki aktifitas antiangiogenesis. Dosis

optimum J-1, J-11 dan J-12 adalah 60 μ g dan memiliki potensi hambatan yang setara dengan celecoxib 60 μ g.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Laporan Kemajuan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi BOPTN 2013 dengan judul Modifikasi Struktur Etil *p*-metoksisinamat Isolat *Kaempferia galanga* Linn. dan Uji Aktivitasnya sebagai Kemopreventif Kanker : Penghambat Angiogenesis.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dirjen Dikti yang telah membiayai penelitian ini.
2. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti penelitian ini.
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Universitas Airlangga yang telah membantu fasilitas penelitian.
4. Semua pihak yang turut serta memberikan bantuan, kritik dan saran hingga skripsi ini selesai.

Semoga Allah SWT membalas semua budi baik dan selalu melimpahkan berkat-Nya.

Penulis menyadari bahwa laporan kemajuan penelitian ini masih banyak kekurangan di dalamnya, namun penulis berharap semoga ini dapat memberikan manfaat dan tambahan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Nopember '13

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	11
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	44
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	51



DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel V.1.	Hasil Doking beberapa Derivat EPMS terhadap COX-2	22
Tabel V.2.	Hasil Doking beberapa Derivat EPMS terhadap Tirosin Kinase	26
Tabel V.3.	Karakteristik spectra UV,IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Hasil Hidrolisis EPMS	29
Tabel V.4.	Karakteristik spektra UV,IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa J-1	31
Tabel V.5.	Karakteristik spektra UV,IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa J-11	34
Tabel V.6.	Karakteristik spektra UV,IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa J-12	37
Tabel V.7.	Hasil Pengamatan Makroskopis Jumlah Pembuluh Darah Baru rata-rata dari CAM	39
Tabel V.8.	Hasil Pengamatan Mikroskopis Jumlah Pembuluh Darah Baru rata-rata dari CAM	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Komposisi Kandungan minyak essential dari Ekstrak <i>Kaempferia galanga</i>	5
Gambar 4.1. Skema Kerja Penelitian	11
Gambar 4.2. Sintesis Derivat p-metoksisinamoiltiourea dari Bahan baku Etil p-metoksisinamat	14
Gambar 4.3. Skema Rancangan Percobaan Uji Hambatan Angiogenesis	15
Gambar 5.1. Interaksi J-1 pada Reseptor COX-2	23
Gambar 5.2. Interaksi ikatan hidrogen antara Senyawa J-11 dan Reseptor COX-2	24
Gambar 5.3. Interaksi sterik antara Senyawa J-11 dan Reseptor COX-2	24
Gambar 5.4. Interaksi ikatan hidrogen dan sterik antara Senyawa J-12 dan Reseptor COX-2	25
Gambar 5.5. Histogram % hambatan pembuluh darah baru hasil pengamatan secara makroskopis (dosis 30,60,90 µg)	39
Gambar 5.6. Histogram % hambatan pembuluh darah baru hasil pengamatan secara mikroskopis (dosis 30,60,90 µg)	41
Gambar 5.7. Pembentukan Angiogenesis pada CAM yang diinduksi bFGF 60ng	41
Gambar 5.8. Pembentukan Angiogenesis pada CAM yang diinduksi bFGF 60ng diberi perlakuan senyawa uji EPMS 60µg	42
Gambar 5.9. Pembentukan Angiogenesis pada CAM yang diinduksi bFGF 60ng diberi perlakuan senyawa uji EPMS 60µg	42
Gambar 5.10. Gambaran histologis chorio alantois untuk kelompok perlakuan : A) bFGF, B) CELE, C) EPMS dan D) kelompok J-11	42
Gambar L.1.1 Spektrum ¹ H-NMR senyawa EPMS	51
Gambar L.1.2 Spektrum ¹³ C-NMR senyawa EPMS	51
Gambar L.2.1 Spektrum UV senyawa APMS	52
Gambar L.2.2 Spektrum IR senyawa APMS	52
Gambar L.2.3 Spektrum ¹ H-NMR senyawa APMS	53
Gambar L.2.4 Spektrum ¹³ C-NMR senyawa APMS	53
Gambar L.3.1 Spektrum UV senyawa J-1	54
Gambar L.3.2 Spektrum IR senyawa J-1	54
Gambar L.3.3 Spektrum ¹ H-NMR senyawa J-1	55
Gambar L.3.4 Spektrum ¹³ C-NMR senyawa J-1	55
Gambar L.4.1 Spektrum UV senyawa J-11	56
Gambar L.4.2 Spektrum IR senyawa J-11	56
Gambar L.4.3 Spektrum ¹ H-NMR senyawa J-11	57
Gambar L.4.4 Spektrum ¹³ C-NMR senyawa J-11	57
Gambar L.5.1 Spektrum UV senyawa J-12	58
Gambar L.5.2 Spektrum IR senyawa J-12	58
Gambar L.5.3 Spektrum ¹ H-NMR senyawa J-12	59
Gambar L.5.4 Spektrum ¹³ C-NMR senyawa J-12	59

BAB I. PENDAHULUAN**1.1. Latar Belakang**

Mortalitas kanker yang cenderung meningkat merupakan masalah yang penting dalam kesehatan masyarakat pada saat ini. Data WHO pada 2007 menyebutkan, sebanyak 7,6 juta jiwa meninggal pada 2005 dan 84 juta orang lainnya akan mati dalam jangka waktu 10 tahun ke depan (WHO, 2008), jika tidak ada tindakan nyata untuk menanggulangi penyakit kanker ini.

Kemopreventif adalah suatu usaha dengan menggunakan bahan-bahan alam, agen biologis, senyawa kimia sintetik yang menghambat progresi penyakit, membalik fungsi fisiologis kembali ke fungsi normal dan deteksi dini kondisi patologis tersebut (Subbaramiah & Danenberg, 2003). Hal ini sejalan dengan kebijakan dari Departemen Kesehatan Republik Indonesia mengenai pencegahan atau usaha preventif yang bisa dilakukan untuk menanggulangi penyakit, salah satunya adalah penyakit kanker.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa pertumbuhan progresif neoplasma dan metastasis kanker bergantung pada angiogenesis (Sahin, 2009). Angiogenesis merupakan upaya pemenuhan kebutuhan nutrisi dan oksigen sel kanker sehingga dapat menyebar ke jaringan di sekitarnya. Angiogenesis dipicu antara lain oleh peningkatan produksi prostaglandin PGE₂ hasil metabolisme asam arakhidonat yang dikatalisis oleh cyclooxygenase-2 (COX-2) (Kuwano T *et al.*, 2004).

Menurut Greenhough *et al.* (2009), COX-2 inhibitor melalui hambatan pembentukan PGE₂ dapat menghambat angiogenesis. Efek samping COX-2 inhibitor golongan coxib pada kardiovaskular mendorong dilakukannya sintesis senyawa baru COX-2 inhibitor yang beraktivitas sebagai kemopreventif kanker menghambat angiogenesis.

Angiogenesis merupakan step kritis progresi tumor (Klenke *et al.*, 2006), pembuluh darah baru dibutuhkan oleh tumor yang berukuran 1-2mm³ untuk mensuply kebutuhan oksigen dan makanan agar proliferasi sel dan metastase bisa terjadi. Kebanyakan target angiogenesis inhibitor adalah vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, seperti bevacizumab, dan kinase inhibitor, seperti sunitinib dan soratinib (Gotink & Verheul, 2010).

Dua masalah utama yang terjadi secara klinis pada penggunaan angiogenesis inhibitor adalah terjadinya resistensi dan progresi tumor yang meningkat. Beberapa pasien memperlihatkan fenomena tersebut pada respon awal. Masalah lain yang timbul adalah terjadinya toksisitas seperti perdarahan (*severe bleeding*), *fatigue*, hipertensi, perforasi pada GIT (Gotink & Verheul, 2010). Sintesis senyawa baru penghambat angiogenesis merupakan salah satu langkah strategis pengobatan kanker.

Menurut Aroonrerk & Kamkaen (2009) bahan aktif dari *Kaempferia galanga* Linn. dapat menghambat pembentukan PGE₂ yang dikatalisis COX-2.). Ekowati dkk. (2012) melaporkan derivat *p*-metoksisinamoiltiurea dari material awal EPMS dapat menghambat fibrosarkoma pada mencit. Menurut He *et al.*, (2012), EPMS dilaporkan memiliki aktivitas angiogenesis terhadap zebrafish, dose dependent. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi struktur EPMS isolat *Kaempferia galanga* untuk mendapatkan senyawa-senyawa yang dapat menghambat angiogenesis.

Modifikasi struktur EPMS dilakukan dengan iradiasi gelombang mikro dalam usaha pengembangan metode sintesis sebagai implementasi *green chemistry*. Uji aktivitas senyawa-senyawa hasil sintesis menghambat angiogenesis dilakukan pada membran korioalantois Telur Ayam Berembrio (TAB). Membran Korio Alantois (CAM) adalah ekstraembrionik membran yang mengatur proses respirasi untuk embrio. CAM merupakan

bagian dari embrio ayam yang mengandung *a very dense capillary network*, oleh karena itu umum digunakan sebagai model untuk penelitian angiogenesis dan antiangiogenesis in vivo (Ribatti, 2010).

Rumusan Masalah :

1. Apakah modifikasi struktur EPMS dapat dilakukan dengan iradiasi gelombang mikro?
2. Apakah hasil modifikasi struktur EPMS mempunyai aktivitas hambatan angiogenesis pada membran korioalantois TAB ?

Hipotesis Penelitian :

1. Modifikasi struktur EPMS dapat dilakukan dengan iradiasi gelombang mikro.
2. Hasil modifikasi struktur EPMS mempunyai aktivitas hambatan angiogenesis pada membran korioalantois TAB.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.)

Kencur atau *Kaempferia galanga* Linn. dengan sinonim *K. sessilis* Koenig, *K. Plantag inifolia* Salisb dan *Alpinia sessilis* Koenig, adalah terna aromatik yang tergolong kedalam famili Zingiberaceae temu-temuan). Kencur merupakan tanaman yang berasal dari Asia Timur, terutama Burma. Saat ini kencur sudah terdistribusi meluas di India, Indonesia, Cina, Nigeria, Meksiko dan negara-negara di sekitarnya (Joy *et al.*, 1998).

Di Indonesia, tanaman ini sudah berkembang di pulau Jawa dan di luar Jawa seperti Sumatera Barat, Sumatera Utara dan Kalimantan Selatan. Karakteristik utama yang dapat dijadikan sebagai pembeda kencur adalah daun dan rimpang. Berdasarkan ukuran daun dan rimpangnya, ada 2 tipe kencur, yaitu kencur berdaun lebar dengan ukuran rimpang besar dan kencur berdaun sempit dengan ukuran rimpang lebih kecil. Kencur berdaun lebar dengan bentuk bulat atau membulat, mempunyai rimpang dengan ukuran besar pula, tetapi kandungan minyak atsirinya lebih rendah daripada kencur yang berdaun kecil berbentuk jorong dengan ukuran rimpang lebih kecil (Rostiana dkk., 2005).

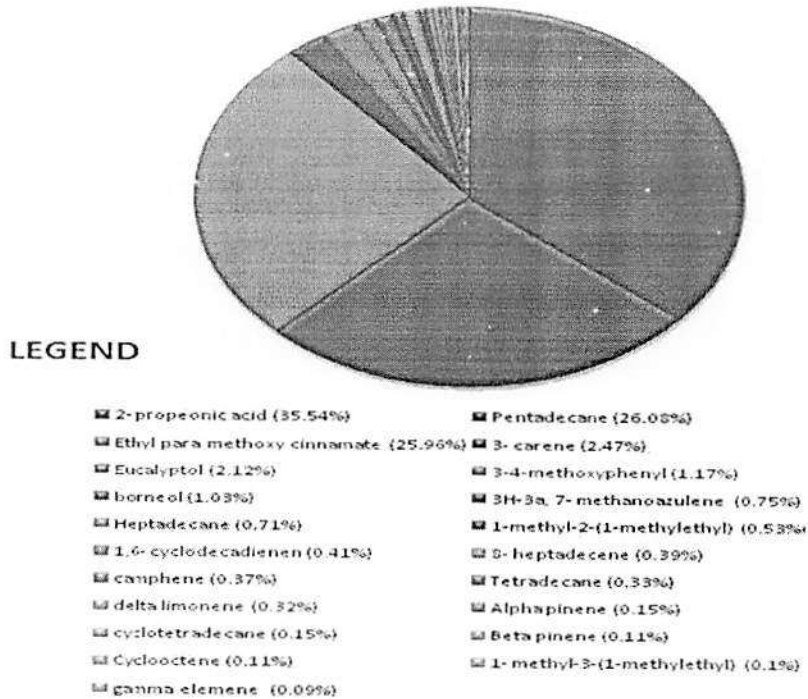
Kencur mempunyai nama dengan sistematika sebagai berikut :

- Divisi : Spermatophyta
- Subdivisi : Angiospermae
- Kelas : Monocotyledonae
- Famili : Zingiberaceae
- Genus : *Kaempferia*
- Spesies : *Kaempferia galanga*

Bau rimpang kencur (*Kaempferia rhizoma*) khas aromatik, pedas dan menghangatkan. Rimpang kencur mengandung zat pati (4,14%), mineral (13,73%), sineol, asam sinamat, EPMS (1,28-3%), borneol, kamper, asam anisat dan gom (Natta *et al.*, 2008). Bagian minyak atsiri dari rimpang kencur dilaporkan mengandung 31,77% EPMS (Tewtrakul *et al.*, 2005). Menurut Aroonrerk & Kamkaen (2009), larutan rimpang kencur dalam DMSO mempunyai aktivitas menghambat pembentukan IL-6 dan PGE2 yang

perhubungan dengan aktivitas anti inflamasi.

Kandungan kimia kencur dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Komposisi kandungan minyak essential dari ekstrak *Kaempferia galanga* (Sutthanont *et al.*, 2010).

2.2. Tinjauan tentang Etil *p*-metoksisinamat (EPMS)

Etil *p*-metoksisinamat (EPMS) merupakan senyawa golongan aril propenoat yang telah dilaporkan memiliki banyak aktivitas biologis. Beberapa peneliti telah melaporkan aktivitas biologis EPMS, antara lain sebagai tabir surya (Athicumculchai *et al.*, 2007), antibakteri (Natta *et al.*, 2008), sitotoksik (Tewtrakul *et al.*, 2005), anti fungal (Majeed & Prakash, 2006), penghambat ornitin dekarboksilase pada mencit (Vimala *et al.*, 1999) dan penghambat papiloma sel kulit mencit (Xue, 2001). Menurut Kusumawati & Yusuf (2011) melaporkan EPMS memiliki aktivitas analgesik seperti *Non Steroidal Anti Inflammatory Drug (NSAID)*, sedangkan Ekowati *et al.* (2011) melaporkan interaksi EPMS dengan enzim cyclooxygenase-2 (COX-2).

Etil *p*-metoksisinamat merupakan senyawa yang dapat diperoleh dari material awal *p*-metoksibenzaldehida, melalui reaksi 2 tahap seperti yang dilaporkan oleh Dijkstra *et al.* (1987). Reaksi tersebut terdiri dari dua tahap, tahap satu merupakan reaksi kondensasi

antara *p*-metoksibenzaldehida dengan asam malonat atau yang disebut reaksi Knoevenagel. Tahap dua merupakan reaksi esterifikasi antara asam *p*-metoksisinamat dengan etil iodida.

Disamping melalui reaksi sintesis, EPMS juga dapat diperoleh dari kencur (*Kaempferia galanga* Linn.). Kandungan EPMS pada rimpang kencur sebesar 1,3-3%, bagian minyak atsiri rimpang kencur terdapat EPMS sebesar 31,77%. Isolasi EPMS dari tanaman kencur dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain destilasi uap air, perkolasi dengan larutan etanol 70% dan ekstraksi dengan pelarut campuran etanol 96% dan petroleum eter (1:3 b/v) (Tewtrakul *et al.*, 2005; Natta *et al.*, 2008).

EPMS mengalami hidrolisis menjadi asamnya yaitu asam *p*-metoksisinamat (APMS) hidrolisis pada suasana basa (Ekowati *et al.*, 2011). Ikatan rangkap vinilik pada APMS memegang peranan penting pada uji aktivitas analgesik. Apabila ikatan rangkap vinilik pada APMS dirubah menjadi ikatan tunggal melalui reaksi hidrogenasi, maka aktivitas analgesik senyawa tersebut yang diuji dengan metode writhing test akan menurun ($ED_{50} = 101$ mg/kg bb) (Ekowati *et al.*, 2007). Perubahan gugus asam karboksilat menjadi amida aromatis, menunjukkan perubahan pada aktivitas biologis berupa sedasi pada hewan coba mencit. Hal ini diduga berhubungan dengan peningkatan lipofilisitas senyawa sehingga lebih mudah menembus membran brain barrier (Ekowati *et al.*, 2009).

2.3. Angiogenesis (Frisca *et al.*, 2011; Sahin, 2009)

Angiogenesis adalah pembentukan pembuluh darah baru yang berasal dari kapiler-kapiler yang muncul dari pembuluh darah kecil di sekitarnya. Angiogenesis merupakan suatu proses biologik kompleks yang terjadi pada masa embriogenesis dan pada berbagai keadaan fisiologik maupun patologik orang dewasa.

Pembuluh darah kapiler terdiri atas sel-sel endotel dan perisit, berisi seluruh informasi genetik pembentukan pembuluh darah dan cabang-cabangnya serta seluruh jaring-jaring kapiler tersebut. Molekul-molekul angiogenik akan memicu terjadinya kapilerisasi, tetapi ada molekul-molekul penghambat bersifat khusus yang dapat menghentikan proses angiogenesis. Sel endotel akan mengalami pergantian (*turn over*) dalam waktu bertahun-tahun pada konsisi normal, namun jika terjadi rangsangan angiogenesis, maka sel-sel endotel tersebut berproliferasi dengan cepat (5 hari) misalnya

induksi bFGF ataupun terjadinya luka. Jadi endotel merupakan komponen pokok yang penting dari kapiler-kapiler baru ini.

Proses Angiogenesis

Proses angiogenesis terdiri dari beberapa tahapan :

- a. Proses inisiasi : yaitu keluarnya protease dari sel endotel yang teraktivasi.
- b. Proses pembentukan pembuluh darah vaskular dan pembuatan ECM (*Extra Cellular Matrix*) baru, yaitu degradasi matriks ekstraseluler, migrasi dan proliferasi sel endotel.
- c. Proses maturasi / stabilisasi pembuluh darah yang terkontrol dan dimodulasi untuk memenuhi kebutuhan jaringan.

Beberapa sel pada jaringan rusak atau mengalami hipoksia akan mengeluarkan faktor angiogenik yang berdifusi ke sel-sel pada jaringan sekitarnya dan diikuti terjadinya inflamasi. Pada proses inflamasi, pembuluh darah kecil memegang peranan penting dalam proses selanjutnya, karena pembuluh darah tersebut merupakan suatu jaringan yang dilapisi sel endotel, yang akan berinteraksi dengan faktor peradangan dan angiogenik. Faktor-faktor angiogenik ini dapat menarik dan mendorong proliferasi sel endotel maupun sel radang. Sel-sel radang juga mensekresi molekul-molekul yang juga berperan sebagai stimulus angiogenik pada saat mendekati proses migrasi.

Fibroblast Growth Factor (FGF)

Fibroblast Growth Factor (FGF) merupakan pencetus angiogenik, sebuah kelompok yang terdiri dari 28 anggota dan ditemukan pada kelenjar pituitari, otak, hipotalamus, mata, kartilago, tulang, *corpus luteum*, ginjal, plasenta, makrofag, kondrosarkoma dan sel hepatoma. FGF memiliki dua struktur primer asam amino, yang merupakan suatu monomer yaitu *acid* FGF atau a- FGF (tersusun dari 140 asam amino) dan *basic* FGF atau b-FGF (tersusun dari 146 asam amino). Kedua asam amino tersebut berasal dari proses fraksinasi yang berbeda. a-FGF adalah hasil fraksinasi FGF pada kondisi pH asam, sedangkan b-FGF adalah hasil fraksinasi FGF pada kondisi basa. Homologi asam amino kedua protein cukup tinggi (53%), tetapi afinitasnya berbeda. Afinitas a-FGF dalam pengikatan terhadap reseptornya (FGFR1-4) lebih tinggi dibandingkan b-FGF.

a-FGF banyak terdapat pada otak dan retina, berperan menjaga kondisi fisiologi tubuh, seperti homeostasis tubuh, antara lain pada pertumbuhan pembuluh darah menjelang regenerasi jaringan dan penyembuhan luka. b-FGF terdapat pada membran basal, matriks ekstraseluler sub endotel pembuluh darah. b-FGF berperan dalam pembentukan tumor, memediasi proses angiogenesis, dan penyembuhan luka. Spesifitas a-FGF dan b-FGF cukup luas pada sejumlah sel target, antara lain sel endotel, sel otot polos, fibroblast, dan sel epitel. Faktor angiogenik tersebut menstimulasi proliferasi sel endotel baik secara *in vitro* (pada konsentrasi 1 sampai 10 ng/ml) maupun proses angiogenik *in vivo*.

Proses angiogenesis berlebih menimbulkan kerugian, antara lain infiltrasi kanker ke jaringan sehat, artritis rematoid, kebutaan pada penderita diabetes, psoriasis, *juvenile hemangioma* dan lain-lain. Angiogenesis berlebih terjadi ketika sel yang abnormal menghasilkan faktor angiogenik konsentrasi tinggi sehingga efek inhibitor angiogenesis secara normal menjadi terhambat.

2.4. Tinjauan Hubungan COX-2 dan Angiogenesis

Sel-sel kanker menunjukkan overekspresi COX-2 yang berakibat pada overproduksi prostanooid seperti PG, yang menyebabkan manifestasi : peningkatan proliferasi sel, hambatan apoptosis, stimulasi angiogenesis. Peristiwa stimulasi angiogenesis disebabkan produk katalisis COX-2 memacu ekspresi angiogenik faktor seperti VEGF, PDGF dan MMP sehingga mempermudah terjadinya penyebaran kanker. MMP memiliki fungsi di dalam proses digestasi dan pelarutan matriks ekstraselular dan matrik penyusun membran dalam proses metastase atau penyebaran sel kanker pada jaringan lain. Ada korelasi positif antara overekspresi COX-2 dengan overekspresi MMP pada beberapa jenis sel kanker (Baek *et al.*, 2002).

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru, yang dipicu oleh peningkatan produksi prostaglandin PGE₂ hasil metabolisme asam arakhidonat yang dikatalisis oleh *cyclooxygenase-2* (COX-2). Peningkatan produksi prostaglandin dapat menimbulkan respon inflamasi pada solid tumors, termasuk kanker payudara dan colon rectal. Prostaglandin mempengaruhi motilitas sel kanker, invasi, vascularisasi dan proses metastatik. Hal ini mendorong ekspresi proangionik faktor, seperti vascular endothelial

growth factor dan fibroblast growth factor. Oleh karena itu COX merupakan salah satu target terapeutik pada angiogenesis (Sahin, 2009).

Karakter tumor berbentuk padat, misalnya kanker payudara, yaitu *hypoxia, extra-cellular acidosis & nutrient deprivation*; dapat menimbulkan respon inflamasi karena sekresi prostaglandin pada sel tumor. Prostaglandin mempengaruhi motilitas sel kanker, invasi, vascularisasi dan proses metastatik. Pada angiogenesis sel tumor, terjadi peningkatan ekspresi COX-2 dan COX-2 inhibitor dapat melemahkan angiogenesis tersebut (Barnes & Bundred, 2005).

Vaskularisasi pada sel kanker merupakan mekanisme yang diperlukan untuk suplai darah ke semua sel, mengangkut oksigen dan nutrisi serta mengeluarkan sisa-sisa metabolisme yang diperlukan dalam menunjang pertumbuhan dan perkembangan sel kanker. Vaskularisasi dijumpai pada tumor yang berukuran lebih dari 2 milimeter kubik karena dalam proliferasi selnya kekurangan oksigen dan nutrisi untuk pertumbuhan sel kanker menjadi lebih ganas. Oleh karena itu pada perkembangan dari hipoplasia menjadi neoplasia, angiogenesis memegang peranan yang sangat penting. Angiogenesis atau neovaskularisasi juga akan mempengaruhi penyebaran sel kanker ke sel tubuh khususnya dalam memacu terjadinya metastatis (Sahin, 2009).

Wilkinson-Berka *et al.* (2003) melaporkan bahwa COX-2 inhibitor seperti rofecoxib dapat menghambat angiogenesis pada retina. Hal itu memperkuat asumsi adanya hubungan antara COX-2 dengan angiogenesis.

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan penelitian :

- 3.1.1. Memperoleh senyawa-senyawa baru derivat *p*-metoksisinamoiltiourea dari bahan baku EPMS yang memiliki aktivitas penghambat angiogenesis.
- 3.2.1. Menghasilkan publikasi ilmiah senyawa-senyawa yang berpotensi kemopreventif kanker penghambat angiogenesis dari bahan baku EPMS isolat *Kaempferia galanga* Linn.

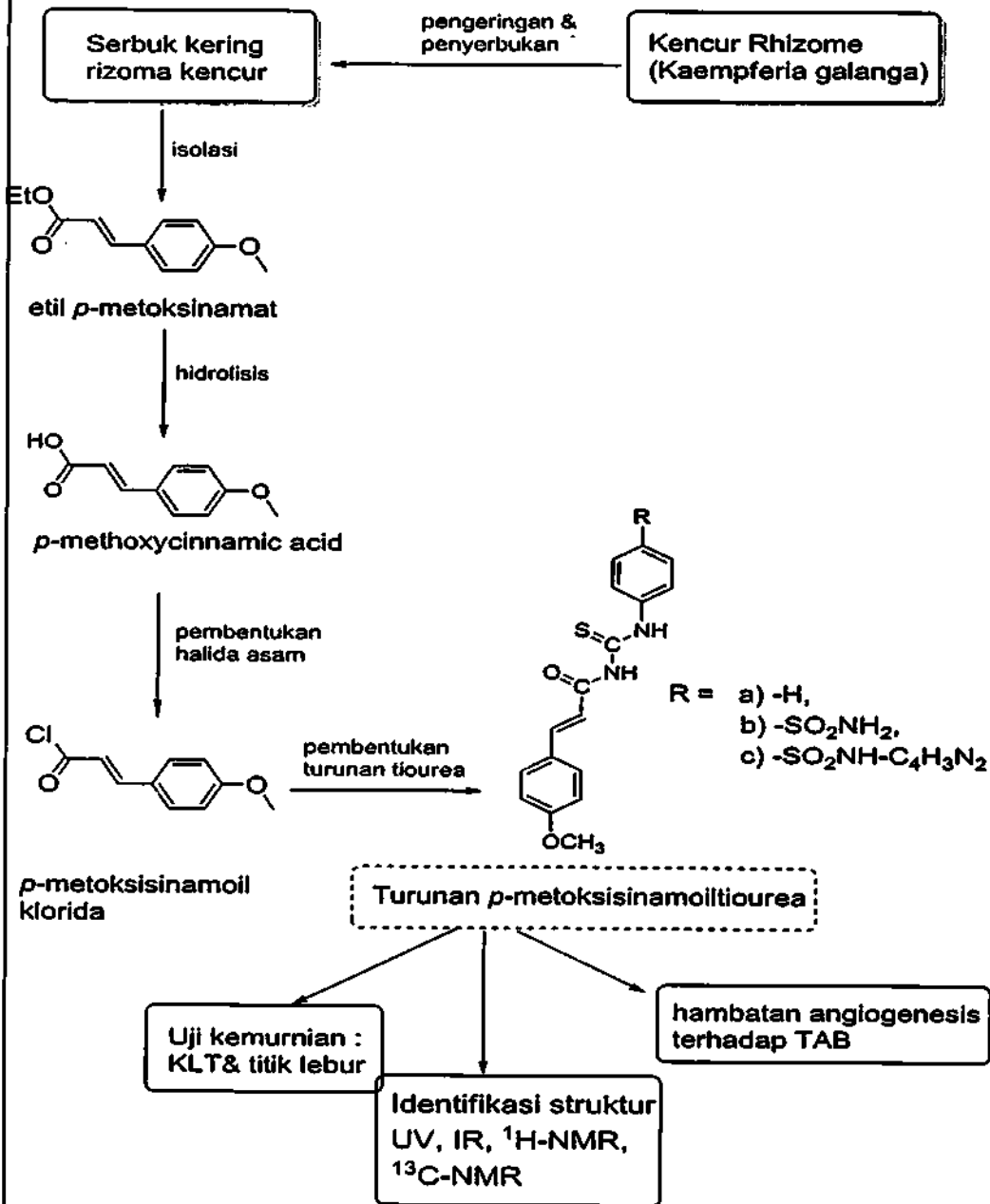
3.2. Manfaat Penelitian :

- a. Teoritik : Memberikan informasi tentang pentingnya kinerja senyawa derivat *p*-metoksisinamoiltiourea sebagai penghambat angiogenesis dalam langkah awal mengatasi pertumbuhan kanker.
- b. Metodologik : Model percobaan angiogenesis menggunakan TAB dapat dipakai sebagai model penelitian dalam menumbuhkan pembuluh darah baru dan uji berbagai senyawa aktif yang berkhasiat antiangiogenesis.
- c. Aplikatif :
 - c.1. Menghasilkan derivat etil *p*-metoksisinamat isolat *Kaempferia galanga* Linn. sebagai calon obat baru dalam pencegahan penyakit kanker dengan bahan baku lokal yang pada akhirnya menurunkan ketergantungan impor bahan baku obat kanker.
 - c.2. Meningkatkan nilai tambah *Kaempferia galanga* Linn. sebagai sumber bahan baku obat kemopreventif kanker yang lebih murah.

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan skema pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Skema Kerja Penelitian

4.2. Alat dan Bahan Sintesis Derivat *p*-metoksisinamoiltiourea dari EPMS :

4.2.1. Bahan : EPMS, tionil klorida, piridin, benzena, diklorometan, anilin, sulfanilamida, sulfadiazin, eter, silika gel, kloroform, petroleum eter, heksana, etil asetat, asam asetat glasial, metanol, etanol, DMSO, formalin, Hematoksilin, Eosin, Telur Ayam Berembrio (TAB) SPF (*Specific Pathogen Free*) berumur 9 hari sebagai bahan untuk uji antiangiogenesis, Tris HCl. TAB yang dipakai berasal dari induk ayam jenis *Hubbard* produksi PT. Wonokoyo, recombinant human bFGF dari *Nako Pure Chemical Industries Ltd. Japan* yang didapar dengan Tris-HCl pH 7,5.

4.2.2. Alat : alat gelas di laboratorium, Spektrofotometer UV-vis Shimadzu HP 8452 A, Spektrofotometer Jasco FT-IR 5300, Spektrometer NMR Hitachi R-1900, Electro-thermal Mel-Temp, Corning Hot Plate P 351, Neraca analitik Shimadzu LM-20, jarum suntik 26G/30G dan spuit 1 ml, jangka sorong, papan bedah, mikro pipet, peralatan untuk implantasi ke dalam CAM embrio ayam meliputi bor atau *mini drill*, karet penyedot (Brand), alat *canaling*, mikropipet (eppendorf), *yellow tips*, *deck glass*, *Laminar Air Flow-hood* dari Famco, lampu spiritus, dan alat gelas (Pyrex), Inkubator (Lab Line Imperial III) untuk menginkubasi TAB yang sudah diimplantasi, pinset, skalpel, dan gunting (Yamaco Stainless), mikroskop.



4.3. Tahapan Kerja Tahap I

4.3.1. Molekular doking eksperimental hasil modifikasi struktur EPMS terhadap tirosin kinase dan COX-2

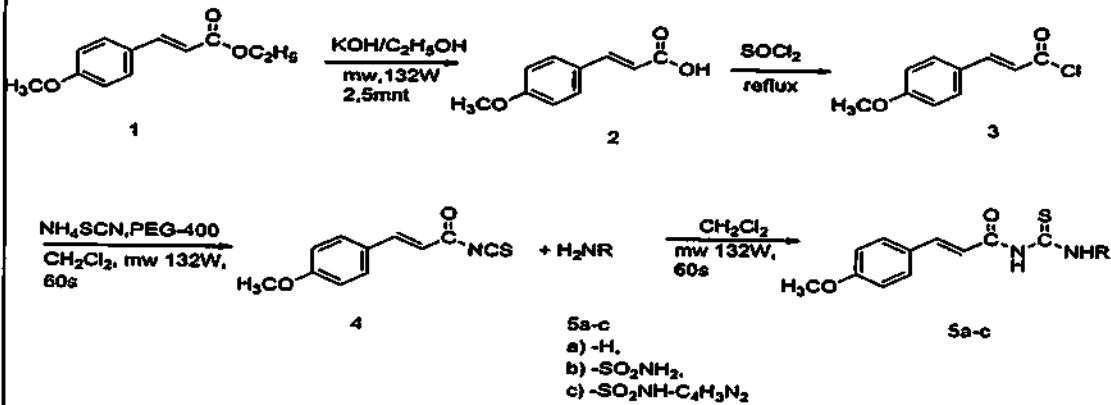
Molekular doking eksperimental dilakukan terhadap 30 turunan EPMS terhadap reseptor tirosin kinase (pdb 1XKK) dan COX-2 (pdb 1CX2), menggunakan program komputer ChemDraw Ultra v12.00/Molegro 5.5. Senyawa yang memiliki nilai MolDock Score terendah akan disintesis. Uji *in silico* terhadap reseptor COX-2 dilakukan dengan cara mengkompleks senyawa uji dengan SC58 (pdb : kode 1CX2). SC58 adalah ligan COX-2 inhibitor, yang strukturnya menyerupai celecoxib. Uji *in silico* terhadap reseptor tyrosin kinase dilakukan dengan cara mengkompleks senyawa uji dengan sunitinib (pdb : kode 1XKK).

Hasil doking terbaik bila memenuhi kriteria : memiliki energi afinitas terendah (kkal/mol) dan secara geometris, struktur senyawa uji menempati lekukan (*cavity*) yang sama dengan SC58 pada enzim COX-2; maupun dengan sunitinip pada enzim tyrosin kinase .

Cara kerja Uji *in silico*:

- a. Dibuat struktur 3D senyawa uji dengan program ChemBioUltra v 12.00, kemudian disimpan dalam bentuk sybil mol2.
- b. Diimport struktur kristal enzim COX-2 yang sudah berikatan dengan ligan tertentu, pdb : 1CX2..
- c. Dipilih ligan yang sesuai, SC-58 untuk COX-2 inhibitor (atau sunitinip untuk tyrosin kinase inhibitor).
- d. Dipilih struktur protein yang sesuai.
- e. Dicari *cavity* yang sesuai untuk ligan tersebut.
- f. Diimport senyawa uji dalam bentuk 3D, ditentukan tiga titik pada farmakofornya dan diaktifkan.
- g. Dilakukan doking pada senyawa uji tersebut.
- h. Doking terhadap tyrosin kinase dilakukan dengan cara yang sama dengan COX-2. Pdb tyrosin kinase : 1xkk; ligan : sunitinip.

4.3.2. Sintesis Derivat *p*-metoksisinamoiltiurea dari EPMS :



Gambar 4.2. Sintesis derivat *p*-metoksisinamoiltiurea dari bahan baku EPMS

4.3.2.1. Transformasi EPMS menjadi asam *p*-metoksisinamat (APMS)

Ke dalam labu Erlenmeyer dimasukkan 1g EPMS dan 5 ml larutan KOH 5% (dalam etanol 96%), dimasukkan dalam microwave dan dilakukan iradiasi gelombang mikro selama 30' diulang lima kali pada 132W (30P 440W). Labu Erlenmeyer tersebut didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan *aquadest* kedalamnya sampai kristal kalium *p*-metoksisinamat larut. Ke dalam larutan kalium *p*-metoksisinamat tersebut dimasukkan HCl pekat sampai diperoleh endapan putih pada pH 2. Endapan tersebut disaring, dicuci dan direkristalisasi dengan metanol.

4.3.2.2. Sintesis Derivat *p*-metoksisinamoiltiurea

Ke dalam asam *p*-metoksisinamat dalam benzena dan 1 tetes piridin dimasukkan 2.4 eq. tionil klorida, direflux semalam, setelah itu kelebihan tionil klorida dan pelarut dihilangkan dengan *rotary evaporation*. Penambahan benzena diulangi dan dihilangkan lagi dengan *rotary evaporation* sehingga dihasilkan padatan kuning, *p*-metoksisinamoil klorida. Padatan yang terbentuk disimpan dalam gas N₂. Ke dalam labu reaksi yang berisi 7,5 mmol *p*-metoksisinamoil klorida tersebut, dimasukkan 10 mmol ammonium tiosianat, PEG 4 tetes dan 5 ml diklorometana. Campuran tersebut diiradiasi dengan *microwave* 132W (30P 440W) selama lebih kurang 30 detik, kemudian didinginkan sampai suhu kamar. Iradiasi diulang 3 kali masing-masing 30 detik. Pada campuran tersebut kemudian dimasukkan anilin dan dilanjutkan iradiasi selama 4 x 30 detik. Ke dalam campuran tersebut selanjutnya ditambahkan berturut-turut dengan HCl 2N, diaduk dan cuci dengan *aquadest*;

larutan NaHCO_3 10% dan dicuci dengan aquadest. Endapan disaring dan dilakukan rekristalisasi campuran pelarut diklorometan-etanol (1-1). Prosedur ini digunakan untuk amina aromatis lainnya (yaitu sulfanilamida dan sulfadiazin).

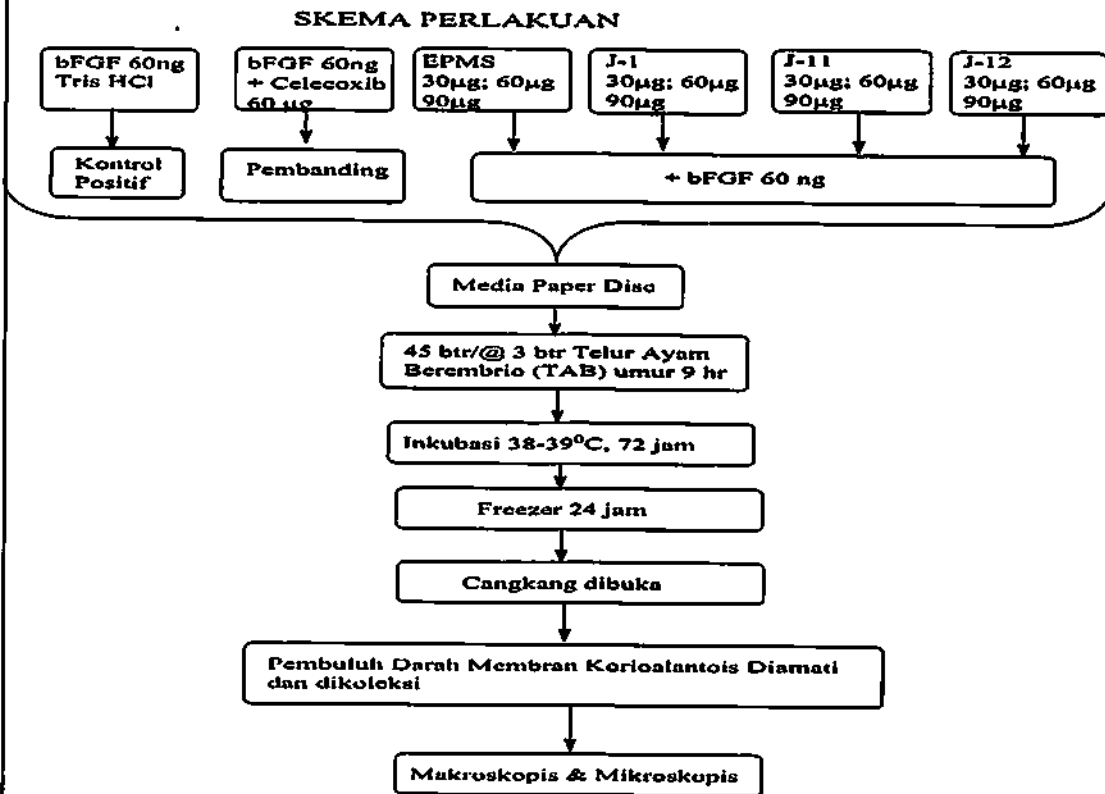
4.3.2.3. Uji Kemurnian dan Identifikasi Struktur

Uji kemurnian hasil sintesis dilakukan dengan kromatografi lapisan tipis, fase diam Silika gel GF₂₅₄ E. Merck dan penampak noda lampu UV. Penentuan titik lebur dilakukan dengan Electrothermal *melting point* apparatus. Identifikasi struktur senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan spektrofotometer ultra-violet (UV) dan infra merah (IR), spektrometer resonansi magnet inti (¹H-NMR dan ¹³C-NMR) (Pavia, 2009).

4.4. Skema Kerja Tahap II Tahun I

4.4.1. Uji Aktivitas Hambatan Angiogenesis Terhadap TAB

Uji aktivitas hambatan angiogenesis pada tahun I dilakukan terhadap Telur Ayam Berembrio (TAB) sesuai dengan skema berikut ini :



Gambar 4.3. Skema Rancangan Percobaan Uji Hambatan Angiogenesis

4.3.2. Variabel Penelitian :

Beberapa variabel penelitian yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Variabel Bebas : 4 macam senyawa uji; 3 dosis yaitu 30, 60, dan 90 μg
- b. Variabel Tergantung : Jumlah pembuluh darah pada *Chorioallantois Membrane* TAB, Gambaran makroskopis dan mikroskopik metode HE.
- c. Variabel Antara : bFGF
- d. Variabel Kendali : umur TAB, suhu dan kelembaban inkubator, bahan pelarut (DMSO), dan waktu inkubasi.

4.3.3. Prosedur Uji Hambatan Angiogenesis terhadap TAB

a. Induksi Angiogenesis dengan *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)

Induksi pertumbuhan pembuluh darah baru pada CAM dilakukan dengan pemberian faktor angiogenesis yaitu bFGF. Induktor sebanyak 25 μg diencerkan dengan menambahkan 500 μl buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 dalam keadaan dingin, sehingga diperoleh konsentrasi stok rh bFGF 50 ng/ μl . Dari stok ini diambil sebanyak 25 μl (1250ng), kemudian diencerkan dengan penambahan sebanyak 1225 μl buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 sehingga diperoleh konsentrasi rh bFGF 1 ng / μl . Dosis bFGF yang diaplikasikan pada telur adalah 60 ng, dengan volume pengambilan sebanyak 60 μl dari stok rh bFGF dengan konsentrasi 1 ng / μl .

b. Pembuatan Larutan Uji

Senyawa uji ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dalam 2,5 ml 2 % DMSO (50 μl /2,5 ml aquabidestilata steril) sehingga diperoleh stok dengan konsentrasi 0,2 mg/50 μl (200 μg /50 μl). Larutan uji disaring dengan *Millipore filter* 0,22 μm , dimasukkan dalam flakon steril dan dibuat seri dosis. Dosis yang diinokulasikan pada CAM terdiri dari tiga seri dosis yaitu 30, 60 dan 90 μg per telur (untuk dosis 90 μg diambil volume 22,5 μl ; untuk dosis 60 μg diambil volume 15 μl ; untuk dosis 30 μg diambil volume 7,5 μl). Pembuatan larutan uji ini dilakukan dalam *Laminar Air Flow-hood* secara aseptis.

c. Uji Daya Hambat terhadap Angiogenesis

Uji daya hambat terhadap angiogenesis dilakukan pada *Chorioallantois Membrane* embrio ayam yang berumur 8 hari. Beberapa persiapan pada telur ayam berembrio dilakukan terlebih dahulu sebelum larutan uji diinokulasikan pada *Chorioallantois Membrane*.

Tahap-tahap tersebut adalah :

c.1. Penyiapan Subyek Uji

Telur ayam berembrio umur 8 hari diberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat lubang segiempat (jendela) berukuran 1 cm² di atas embrio. Lokasi embrio diketahui melalui candling pada telur. Kerabang telur pada bagian kutub yang mengandung ruang udara dan kerabang di atas embrio disucihamakan dengan alkohol 70%. Pada kedua daerah tersebut kemudian dibuat lubang kecil dengan menggunakan sebuah bor kecil/ mini drill. Udara dari ruang udara diaspirasi dengan bola karet sampai *Chorioallantois Membrane* yang melekat pada membran telur lepas. Perlakuan ini dilakukan dengan posisi telur horizontal, diruang gelap dan menggunakan teropong sehingga *Chorioallantois Membrane* dan ruang udara buatan yang terbentuk di atas embrio dapat terlihat. Telur disucihamakan lagi dan dimasukkan dalam *Laminer Air Flow-hood* dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terletak dibagian atas (Salamah dkk., 2009).

c.2. Implantasi Larutan Uji ke dalam Telur

Kerabang telur berembrio dipotong dengan gergaji (mini drill) hingga membentuk lubang segiempat dengan luas 1 cm². Melalui lubang ini larutan uji diimplantasi ke dalam *Chorioallantois Membrane*.

Subyek uji yang berupa telur di bagi dalam enam kelompok sebagai berikut :

Kelompok I : Kelompok Kontrol positif, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dalam 60 µl pelarut Tris-HCl yang diimplantasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok II : Kelompok pembanding, tiga TAB dengan pemberian pelarut induktor, dan Celecoxib 60 µg (15µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois*

Membrane melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

- Kelompok III :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji EPMS sebanyak 30 μg (7,5 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok IV :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji EPMS sebanyak 60 μg (15 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok V :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji EPMS sebanyak 90 μg (22,5 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok VI :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-1 sebanyak 30 μg (7,5 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok VII :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-1 sebanyak 60 μg (15 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok VIII :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-1 sebanyak 90 μg (22,5 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.
- Kelompok IX :** Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-11 sebanyak 30 μg (7,5 μl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok X : Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-11 sebanyak 60 µg (15 µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok XI : Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-11 sebanyak 90 µg (22,5 µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok XII : Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-12 sebanyak 30 µg (7,5 µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok XIII : Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-12 sebanyak 60 µg (15 µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Kelompok XIV : Kelompok perlakuan, tiga TAB dengan pemberian induktor, yaitu bFGF sebanyak 60 ng dan senyawa uji J-12 sebanyak 90 µg (22,5 µl per telur) diinokulasikan ke dalam *Chorioallantois Membrane* melalui lubang pada ruang udara yang telah dipindahkan di atas posisi embrio.

Setelah diberi perlakuan, kemudian telur diinkubasi pada suhu 37⁰ C dan kelembaban relatif 60 % selama tiga hari atau 72 jam, telur dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi dua bagian dimulai dari cangkang yang dekat dengan rongga udara. Isi telur dikeluarkan perlahan agar membran chorioalantois tetap melekat pada cangkang telur. Setelah itu *Chorioallantois Membrane* yang melekat pada cangkang diamati secara makroskopis dan mikroskopis (Ribatti *et al.*, 2007). Skema kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.4.

e. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis

Pengamatan makroskopis dilakukan langsung setelah cangkang TAB (Telur Ayam Berembrio) dibuka dengan mengamati secara visual banyaknya pembuluh darah yang ada pada paper disc dan sekitarnya di *Chorioallantois Membrane*.

Pengamatan mikroskopis dilakukan pengawetan membran chorio alantois yang telah dilepas dari cangkangnya dengan formalin 10 %, kemudian dilakukan dengan pengecatan dengan zat warna untuk sediaan histologik HE (Hematoksilin dan Eosin). Hasilnya yang berupa preparat histologi diperiksa dengan mikroskop.

f. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis sesuai dengan bagian-bagian pokok yang dikerjakan, yaitu dengan penghitungan jumlah pembuluh darah baru secara makroskopis dan mikroskopis pada *Chorioallantois Membrane* embrio ayam. Perbedaan pengaruh pemberian senyawa uji derivat *p*-metoksisinamoiltiurea terhadap kontrol positif pemberian bFGF di analisis dengan analisis varian uji F. Hasil berbeda nyata pada uji F dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan rerata setiap kelompok perlakuan. Uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95 %.

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Angiogenesis adalah proses pembentukan darah baru yang terjadi pada embriogenesis maupun patologik orang dewasa. Pembentukan pembuluh darah baru tersebut berasal dari kapiler-kapiler yang muncul dari pembuluh darah kecil di sekitarnya. Yao *et al.* (2011) melaporkan adanya hubungan antara COX-2 dan terjadinya angiogenesis. Induksi senyawa pro-angiogenik, misalnya bFGF akan menyebabkan terjadinya inflamasi (Prisca *et al.*, 2011).

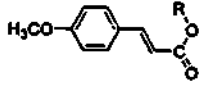
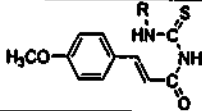
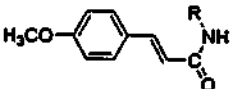
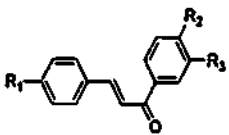
Salah satu bahan alam yang dilaporkan memiliki aktifitas antiinflamasi adalah etil *p*-metoksisinamat (EPMS) (Kusumawati & Yusuf, 2010; Suttanont *et al.*, 2010). Oleh karena itu pada penelitian ini yang digunakan sebagai bahan awal adalah etil *p*-metoksisinamat (EPMS) hasil isolasi dari rimpang kencur (Ekowati *et al.*, 2012). Spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR EPMS ditampilkan pada Lampiran 1.

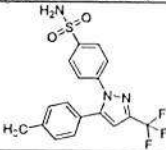
Rancangan modifikasi struktur EPMS yang diharapkan memiliki aktivitas menghambat angiogenesis melalui hambatan aktivitas COX-2, ditentukan berdasarkan hasil uji *in silico* terhadap 30 derivat EPMS berikut ini :

5.1. Hasil Uji *in silico*

Hasil uji *in silico* terhadap turunan EPMS terhadap COX-2 dan tirosin kinase adalah sebagai berikut :

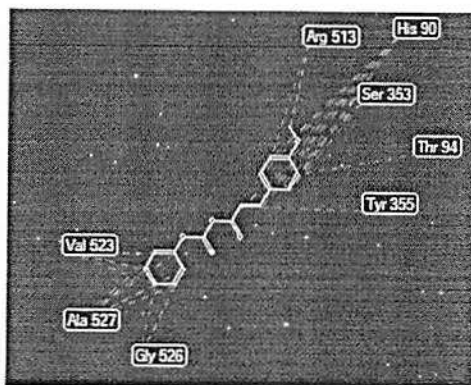
Tabel V.1. Hasil docking beberapa derivat EPMS terhadap COX-2 (pdb 1CX2) dengan program Molegro 5.5.

No	Struktur dan Nama Senyawa	MolDock Score (kcal/mol)
		COX-2 (pdb 1CX2)
		
EPMS	R = -C ₂ H ₅	-98,48
APMS	R = -H	-84,15
		
J-1	R = -C ₆ H ₅	-162,06
J-2	R = -p-CH ₃ C ₆ H ₅	-169,29
J-3	R = -H	-105,40
J-4	R = -(CH ₃) ₂	-110,10
J-5	R = -(C ₂ H ₅) ₂	-119,10
J-6	R = -p-(OCH ₃)C ₆ H ₅	-172,50
J-7	R = -p-(OH)C ₆ H ₄	-150,85
J-8	R = 2,5-(Cl) ₂ C ₆ H ₃	-138,84
J-9	R = -p-(Cl)C ₆ H ₅	-168,85
J-10	R = 3,5-(Cl) ₂ C ₆ H ₃	-149,57
J-11	R = -p-(SO ₂)((NH ₂)C ₆ H ₅)	-177,23
J-12	R = -p-(SO ₂ N ₂ C ₄ H ₉)((NH ₂)C ₆ H ₅)	-172,02
J-13	R = -p-(SO ₂ N ₂ C ₄ H ₉)((NH ₂)(C ₆ H ₅)(CH ₃))	-163,51
		
AM-1	R = -C ₆ H ₅	-136,50
AM-2	R = -p-(CH ₃)C ₆ H ₅	-144,84
AM-3	R = -H	-103,88
AM-4	R = -p-(Cl)C ₆ H ₅	-141,56
AM-5	R = -p-SO ₂ (NH ₂)C ₆ H ₅	-165,08
AM-6	R = -p-(OCH ₃)C ₆ H ₅	-146,14
AM-7	R = -p-(OH)C ₆ H ₄	-124,04
		
JK-1	R1 = -OCH ₃ , R2 = -H, R3 = -H	-104,60
JK-2	R1 = -OCH ₃ , R2 = -CH ₃ , R3 = -H	-113,26
JK-3	R1 = -OCH ₃ , R2 = -OCH ₃ , R3 = -H	-113,70
JK-4	R1 = -OCH ₃ , R2 = -Cl, R3 = -H	-109,39
JK-5	R1 = -OCH ₃ , R2 = -OH, R3 = -H	-113,64
JK-6	R1 = -OCH ₃ , R2 = -OH, R3 = -OCH ₃	-117,50
JK-7	R1 = -OH, R2 = -H, R3 = -H	-102,98

JK-8	R1 = -OH, R2 = -CH ₃ , R3 = -H	-107,59
JK-9	R1 = -OH, R2 = -OCH ₃ , R3 = -H	-116,15
JK-10	R1 = -OH, R2 = -OH, R3 = -H	-107,46
JK-11	R1 = -OH, R2 = -OH, R3 = -OCH ₃	-109,06
CELE		-169,54

Hasil uji *in silico* yang dipaparkan pada Tabel V.2. menunjukkan bahwa nilai *MolDock Score* terhadap COX-2 dari EPMS = -98,48 kkal/mol, sedangkan *MolDock Score* dari celecoxib = -169,54 kkal/mol. Nilai *MolDockScore* dari 30 senyawa hasil modifikasi struktur EPMS sebagai berikut : kelompok *p*-metoksisinamoiltiurea (J-1 – J-13) = -105,40 - -177,23 kkal/mol, kelompok *p*-metoksisinamamida (AM-1 – AM-7) = -103,79 - -123,11 kkal/mol dan kelompok fenil propenon (JK 1-11) = - 102,98 - - 117,50 kkal/mol.

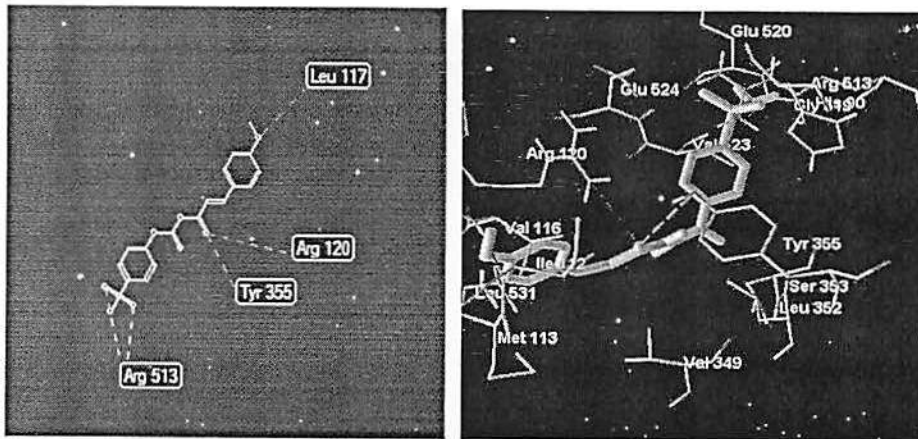
Berdasarkan data pada Tabel V.2, modifikasi struktur EPMS menjadi turunan *p*-metoksisinamoiltiurea meningkatkan afinitasnya terhadap COX-2. Beberapa contoh interaksi senyawa hasil modifikasi struktur EPMS ditunjukkan pada Gambar 5.1-5.5.



Gambar 5.1. Interaksi J-1 pada reseptor COX-2 (pdb 1CX2)

Pada Gambar 5.1., senyawa J-1 memperlihatkan interaksi sterik antara asam amino Val523, Ala527 dan Gly526 dengan cincin aromatis yang terikat pada gugus tiokarbamoil. Interaksi sterik terjadi juga pada ikatan rangkap vinilik dengan Tyr355 dan cincin aromatis

yang mengikat gugus metoksi berinteraksi sterik dengan Thr94, Ser353, Arg513. Ikatan hidrogen terjadi pada atom O gugus metoksi dengan His90.

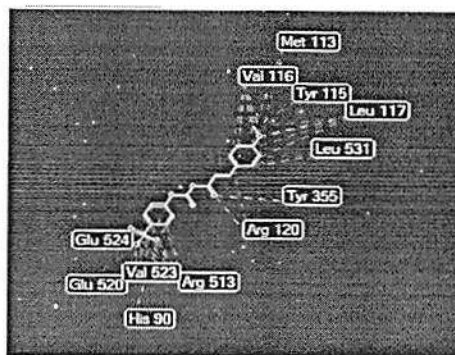


(a)

(b)

Gambar 5.2. Interaksi ikatan Hidrogen antara senyawa J-11 pada reseptor COX-2 (pdb 1CX2)

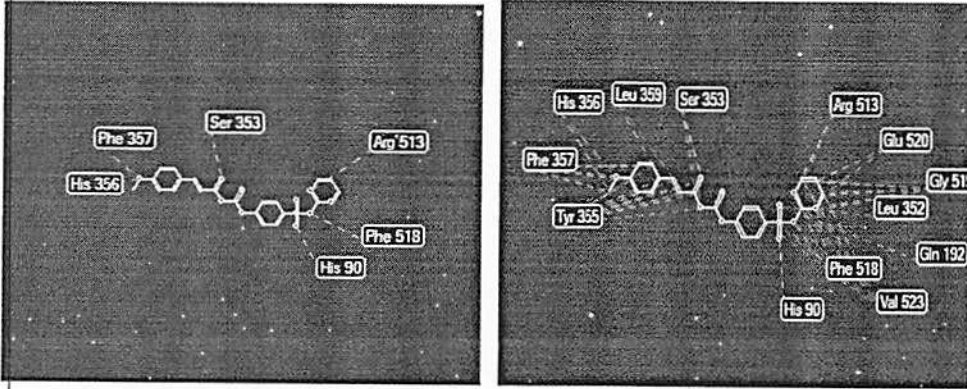
Gambar 5.2. (a) menunjukkan interaksi berupa ikatan hidrogen antara senyawa J-11 dengan Arg513 (atom O dari sulfonamido), Tyr355 dan Arg120 dengan atom O gugus karbonil, Leu117 dengan atom O gugus metoksi. Gambar 5.2. (b) menunjukkan jarak ikatan hidrogen J-11 antara atom O gugus karbonil dengan Tyr355 = 3,22Å; sedangkan dengan Arg120= 3,44Å; O gugus sulfonamida dengan Arg513= 1,26Å.



Gambar 5.3. Interaksi sterik J-11 pada reseptor COX2

Bila dibandingkan dengan EPMS dan J-1, tampak bahwa interaksi gugus fungsi antara

senyawa J-11 dengan COX-2 baik sterik (Gambar 5.3) maupun ikatan hidrogen lebih banyak (Gambar 5.2). Hal ini menyebabkan nilai *MolDock Score* J-11 lebih rendah daripada EPMS maupun J-1, karena interaksi / kompleks yang terjadi lebih stabil.



Gambar 5.4. Interaksi ikatan Hidrogen (a) dan sterik (b) antara senyawa J-12 pada reseptor COX-2 (pdb 1CX2)

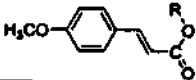
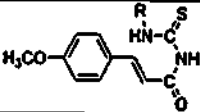
Gambar 5.4. (a) menunjukkan interaksi berupa ikatan hidrogen antara senyawa J-12 dengan Arg513 (atom N dari cincin pirimidin yang terikat pada gugus sulfonamido), Phe518 dengan atom N gugus sulfonamido, His90 dengan atom O gugus sulfonamido, Ser353 dengan atom O gugus karbonil, Phe357 dan His356 dengan atom O gugus metoksi. Gambar 5.9 Tyr355 dan Arg120 dengan atom O gugus karbonil, Leu117 dengan atom O gugus metoksi.

Saberi *et al.* (2010) menyatakan dua residu penting reseptor COX-2 yang berinteraksi dengan COX-2 inhibitor adalah Tyr355 dan Ser530, sedangkan Yuniarti *et al.* (2011) melaporkan interaksi berupa ikatan hidrogen dengan Arg513 merupakan petunjuk penting penemuan COX-2 inhibitor pada *virtual screening campaign*. Interaksi Arg513 berupa transfer muatan dengan cincin aromatis J-1, ikatan hidrogen dengan atom O gugus sulfonamido senyawa J-11, dan interaksi dengan gugus cincin pirimidil senyawa J-12

memperkuat dugaan adanya hambatan yang cukup signifikan antara senyawa hasil modifikasi struktur EPMS dengan COX-2.

Berdasarkan data pada Tabel V.2., diketahui bahwa turunan *p*-metoksisinamoil-tiourea memiliki afinitas terhadap COX-2 lebih besar dibanding derivat lainnya. Oleh karena itu turunan *p*-metoksisinamoil-tiourea selanjutnya didoking terhadap tirosin kinase (pdb : 1xkk). Menurut Lin *et al.* (2005), tirosin kinase merupakan protein yang berperan pada proses signal antar sel maupun proliferasi sel. Tirosin kinase VEGFR adalah mediator sangat penting pada angiogenesis (Gotink & Verheul, 2010). Hasil doking terhadap dipaparkan pada Tabel V.2.

Tabel V.2. Hasil doking beberapa derivat EPMS terhadap tirosin kinase dengan program Molegro 5.5.

No	Struktur dan Nama Senyawa	MolDock Score (kcal/mol)
		Tirosin kinase (pdb 1XKK)
		
EPMS	R= -C ₂ H ₅	-106,53
		
J-1	R= -C ₆ H ₅	-138,24
J-2	R= - <i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	-142,50
J-3	R= -H	-99,64
J-4	R= -(CH ₃) ₂	-92,47
J-5	R= - (C ₂ H ₅) ₂	-91,89
J-6	R= - <i>p</i> -(OCH ₃)C ₆ H ₄	-141,04
J-7	R= - <i>p</i> -(OH)C ₆ H ₄	-146,90
J-8	R= 2,5-(Cl) ₂ C ₆ H ₃	-98,50
J-9	R= - <i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄	-137,10
J-10	R= 3,5-(Cl) ₂ C ₆ H ₃	-143,19
J-11	R= - <i>p</i> -(SO ₂)((NH ₂)C ₆ H ₄)	-150,08
J-12	R= - <i>p</i> -(SO ₂ N ₂ C ₄ H ₇)((NH ₂)C ₆ H ₄)	-169,74
J-13	R= - <i>p</i> -(SO ₂ N ₂ C ₄ H ₇)((NH ₂)(C ₆ H ₄)(CH ₃))	-145,95
Sunitinip		-165,14

Berdasarkan data pada Tabel V.2., diketahui bahwa senyawa J-11 dan J-12 memiliki interaksi yang paling stabil dengan tirosin kinase. Senyawa J-12 memiliki nilai *MolDockScore* lebih rendah daripada sunitinip ligan tirosin kinase, sehingga diharapkan aktivitas J-11 maupun J-12 menghambat tirosin kinase juga cukup kuat. Menurut Roskoski (2007), sunitinip merupakan VEGF protein kinase dan angiogenesis inhibitor. Oleh karena itu sintesis senyawa J-1, J-11 dan J-12. Senyawa J-1 walaupun tidak memiliki afinitas yang paling baik terhadap tirosin kinase maupun COX-2, tetap dilakukan sintesis untuk mempelajari adanya pengaruh substituen pada cincin aromatis terhadap prosentase hasil sintesis, maupun aktivitas angiogenesis.

Tahapan sintesis senyawa J-1, J-11 dan J-12 adalah sebagai berikut :

1. Hidrolisis EPMS menjadi APMS

Tahap awal modifikasi struktur EPMS menjadi turunan *p*-metoksisinamoiltiourca dilakukan melalui reaksi hidrolisis EPMS sesuai metode pada sub bab 4.3.2.1. Hidrolisis EPMS dengan iradiasi gelombang mikro ini menghasilkan senyawa berupa kristal putih berbentuk jarum dengan prosentase hasil = 780 mg (90%), dengan titik lebur 176,1°C. Hidrolisis EPMS menjadi APMS dengan iradiasi gelombang mikro menghasilkan prosentase hasil reaksi yang lebih tinggi dan waktu yang lebih singkat daripada dengan pemanasan konvensional (Ekowati *et al.*, 2012). Pemanasan dengan iradiasi gelombang mikro melibatkan absorpsi langsung oleh gugus fungsi yang mengakibatkan terjadinya rotasi dipol dan konduktivitas ionik. Hal ini menimbulkan terjadinya energi panas yang dikeluarkan ke larutan disekitarnya (Lidstrom *et al.*, 2001; Badadhe *et al.*, 2011), sehingga lama reaksi menjadi jauh lebih singkat.

Identifikasi struktur hasil hidrolisis EPMS menjadi APMS secara spektroskopi dilakukan dengan spektrofotometer UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR sebagai berikut :

Spektrum UV APMS menunjukkan panjang gelombang maksimum APMS dalam pelarut etanol = 288 nm (Lampiran 2.1.). Perubahan gugus ester dari EPMS menjadi gugus asam karboksilat dari APMS, menyebabkan terjadinya penurunan panjang gelombang maksimum berupa pergeseran hipsokromik akibat resonansi gugus karboksilat dari APMS.

Analisis gugus fungsi APMS dilakukan dengan spektrofotometer infra merah, spektrum IR ditampilkan pada Lampiran 2. 2. Perubahan gugus ester dari EPMS menjadi asam karboksilat dari APMS tampak pada spektra IR yang dipaparkan pada Gambar 5.2, yaitu tidak tampaknya puncak pada bilangan gelombang 1707 cm^{-1} dari -C=O ester. Puncak baru pada bilangan gelombang 1686 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus -C=O dan puncak pada 1287 cm^{-1} yang menunjukkan gugus C-O dari asam karboksilat. Gugus-gugus fungsi lain yang tampak pada spektra tersebut adalah cincin aromatis maupun alkena (ikatan $\text{Csp}^2\text{-H}$) pada bilangan gelombang 2938 cm^{-1} ; gugus C=C yang terkonjugasi dengan cincin aromatis pada bilangan gelombang 1623 cm^{-1} ; gugus C=C alkena pada bilangan gelombang 1597 cm^{-1} ; gugus fungsi C-O-C eter pada bilangan gelombang 1172 dan 1028 cm^{-1} ; gugus fungsi alkena isomer *trans* pada bilangan gelombang 975 cm^{-1} & adanya hidrogen pada cincin aromatis bersubstituen posisi *para*- pada bilangan gelombang 827 cm^{-1} . Ikatan rangkap dua menyebabkan delokalisasi elektron π dan meningkatkan karakterisasi ikatan tunggal pada hibrida resonansi sehingga konstanta ikatan menurun dan menurunkan absorpsi karbonil maupun ikatan rangkap tersebut (Pavia *et al.*, 2009).

Hasil karakterisasi jenis dan jumlah proton pada hasil hidrolisis EPMS berupa spektra $^1\text{H-NMR}$ ditampilkan pada Lampiran 2.3. Spektra $^1\text{H-NMR}$ hasil hidrolisis EPMS pada Lampiran 2.3. menunjukkan adanya 10 proton yang terdiri dari proton alifatik sejumlah 3H berupa puncak singlet pada geseran kimia 3,75 ppm; proton alkena sejumlah 2H masing-masing berupa puncak doublet pada geseran kimia 6,23 dan 7,44 ppm. Tetapan

kopling masing-masing puncak = 16Hz, yang menunjukkan isomer *trans*. Spektra juga tampak 4 proton dari cincin aromatik berbentuk dua pasang puncak simetris yaitu doublet pada geseran kimia 6,92 ppm (2H, $J=8,8$ Hz) dan pada geseran kimia 7,59 ppm (2H, $J=8,8$ Hz), menunjukkan substituen cincin aromatis pada posisi *para*. Puncak singlet 1H pada geseran kimia 12,20 ppm menunjukkan proton dari -OH asam karboksilat.

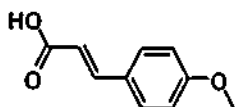
Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil hidrolisis EPMS ditampilkan pada Lampiran 2.4., menunjukkan adanya delapan sinyal dari delapan jenis karbon yang terdiri dari satu karbon alifatik pada $\delta_{\text{C}}= 55,9$ ppm; dua karbon alkena pada $\delta_{\text{C}}= 116,9$ dan 144,3 ppm; empat karbon dari cincin aromatik pada $\delta_{\text{C}}= 114,9$; 127,3; 130,5; 161,5 ppm; satu karbon dari asam karboksilat tampak pada $\delta_{\text{C}}= 168,4$ ppm. Jumlah atom karbon hasil hidrolisis EPMS = 10 karbon. Berdasarkan spektrum Gambar L.2.4. terdapat dua karbon yang memiliki pergeseran kimia yang identik, yaitu pada $\delta_{\text{C}}= 114,9$ dan 130,5 ppm.

Data spektroskopi UV, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil hidrolisis EPMS menunjukkan hasil yang identik dengan penelitian sebelumnya (Stabile & Dicks, 2004; Ekowati *et al.*, 2012) dan dirangkum pada Tabel V.3.

Tabel V.3. Karakteristik spektra UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Hasil Hidrolisis EPMS

Spektrum UV: λ maks. (nm) dalam pelarut etanol	288 (5 ppm; 0,1934)
Spektrum IR : ν (cm^{-1}) dalam pelet KBr	2938 ($\text{Csp}^2\text{-H}$); 2938-2590 (OH); 1686 (-C=O); 1597 (-C=C-); 1254 (-C-O-C- asym); 1028 (-C-O-C sym); 1172 (-C-O-); 827 (cincin aromatis tersubstitusi pada posisi <i>para</i>)
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (400Hz; DMSO- d_6 ; TMS) : δ (ppm)	3,75 (3H,s); 6,34 (1H,d, $J=16\text{Hz}$); 7,44 (1H,d, $J=16\text{Hz}$); 7,59 (2H, d, $J = 8,8\text{Hz}$); 6,92 (2H,d, $J = 8,8\text{Hz}$); 12,20 (1H,s)
Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (400Hz; DMSO- d_6 ; TMS) δ (ppm)	55,8 (C7); 114,9 (C2/C6); 116,9 (C9); 127,3 (C4); 144,3 (C8); 161,5 (C1); 168,3 ppm (C10)

Analisis data hasil penelitian pada Gambar L.2.1-L.2.4. menunjukkan bahwa senyawa hasil hidrolisis EPMS adalah asam *p*-metoksisinamat (APMS) yang memiliki struktur sebagai berikut :



Nama Trivial : Asam *p*-metoksisinamat (APMS)
 Nama IUPAC : Asam (*E*)-3-(4-metoksifenil)akrilat

5.4. Sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil) akrilamida (J-1)

Modifikasi struktur EPMS sesuai metode pada sub bab 4.3.2.2. merupakan reaksi adisi *p*-metoksisinamoilklorida dengan amonium tiosianat, diikuti reaksi substitusi nukleofilik dengan anilin sebagai nukleofil, menghasilkan senyawa J-1, yang berupa kristal kuning, prosentase hasil sebesar 70%, dengan titik lebur 199,7°C.

Spektrum UV-vis senyawa J-1 (Gambar L.3.1.) menunjukkan dua puncak dengan panjang gelombang maksimum 332 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke geseran batokromik apabila dibandingkan dengan APMS, diduga disebabkan bertambahnya gugus kromofor berupa inti aromatis yang terkonyugasi dengan auksokrom berupa gugus karbamotioil.

Karakterisasi gugus fungsi senyawa J-1 disajikan pada Gambar L.3.2. menunjukkan adanya gugus N-H dari amida sekunder pada bilangan gelombang 3502 cm⁻¹ dan gugus N-H amina sekunder pada 3222 cm⁻¹. Adanya gugus alkil (ikatan -Csp³-H) terkonfirmasi pada bilangan gelombang 2843 cm⁻¹, ikatan C=O dari amida pada 1671 cm⁻¹, ikatan -C=C- dari alkena simetris pada 1624 cm⁻¹, ikatan -C-O-C-*asym.* gugus eter pada 1244 dan ikatan -C-O-C-*sym.* pada 1029 cm⁻¹; ikatan -C-O- eter pada 1149 cm⁻¹, ikatan C=S dari gugus tiokarbonil pada 1537 cm⁻¹, dan inti aromatis tersubstitusi *para* pada 826 cm⁻¹.

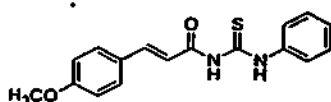
Karakterisasi jumlah, jenis dan posisi proton pada senyawa J-1 dipaparkan pada Gambar L.3.3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa J-1 (Gambar L.3.3.) menunjukkan $\delta_{\text{H}} = 3,81$ ppm (3H,s) dari gugus metoksi; proton dari inti aromatis pada $\delta_{\text{H}} = 6,99$ dan $7,56$ ppm (masing-masing 2H,d, $J = 10,5\text{Hz}$); $7,40$ ppm (2H,t, $J = 10,0$ & $9,5\text{Hz}$); $7,22$ ppm (1H,t, $J = 7,6$ & $7,2\text{Hz}$) dan $7,65$ ppm (2H,d, $J = 6,0$ & $10,0$ Hz). Proton alkena pada $\delta_{\text{H}} = 6,89$ & $7,69$ ppm; tetapan kopling (J) = 16 Hz, berarti isomer *trans* pada alkena tersebut. Adanya puncak pada $\delta_{\text{H}} = 12,78$ ppm (1H,s) dari gugus N-HC=O, gugus N-HC=S pada $\delta_{\text{H}} = 11,48$ ppm (1H,s). Banyaknya jumlah proton dan posisinya pada Gambar L.3.3. menunjukkan kesesuaian dengan jumlah dan posisi atom H pada senyawa J-1, yaitu adanya 16 proton yang terdiri dari tiga proton metoksi (s), dua proton alkena (d) posisi *trans*, sembilan proton dari inti aromatis, satu proton -NH amida dan satu proton dari -NH karbamotiil.

Identifikasi jumlah dan jenis karbon pada senyawa J-1 sebagai spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dipaparkan pada Gambar L.3.4. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ J-1 menunjukkan geseran kimia karbon (δ_{C}) = $55,9$ ppm dari karbon gugus $-\text{OCH}_3$; $145,1$ dan $117,5$ ppm dari karbon alkena; $115,2$ (C2/C6) ; $126,8$; $124,6$ (C2'/C6'); $129,2$ (C3'/C5'); $127,2$; $130,7$ (C3/C5); $138,4$; $145,1$ dan $162,0$ ppm dari dua cincin aromatis; $167,2$ ppm dari karbon amida; $179,5$ ppm dari karbon tiokarbonil. Dari Gambar 5.18., diketahui adanya 13 sinyal dari 17 karbon pada senyawa J-1, yang terdiri dari satu karbon metoksi, 12 karbon dari dua macam inti aromatis, dua karbon dari alkena, satu karbon dari karbonil amida, satu karbon dari tiourea. Jumlah karbon dan posisinya pada Gambar L.3.4. menunjukkan kesesuaian dengan jumlah dan posisi karbon pada senyawa hasil sintesis J-1.

Tabel V.4. Karakteristik spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa J-1

Spektrum UV: λ maks. (nm) dalam pelarut etanol	332 (4,7ppm; 0,7091)
Spektrum IR : ν (cm ⁻¹) dalam pelet KBr	3031 (-C=C- aromatis); 3502 (-N-H, amida 2°); 3222 (-N-H, amina 2°); 1671(-C=O); 1591 (-C=C- alkena); 1244 (-C-O-C asym eter); 1029 (-C-O-C sym eter); 1149 (-C-O-); 826 (cincin aromatis tersubstitusi posisi <i>para</i>)
Spektrum ¹ H-NMR (400Hz; CDCl ₃ ; TMS) : δ (ppm)	7,69 (1H,d, J=16Hz); 6,89 (1H,d, J=16Hz); 7,52 (2H,d, J=8,8Hz); 6,99 (2H,d, J=10,5Hz); 7,56 (2H,d, J=10,5Hz); 7,40 (2H,t,dd, J=10,0 & 9,5Hz); 7,65 (2H,d, J=6,0 & 10,0 Hz); 11,48 (1H,s); 12,78 (1H,s)
Spektrum ¹³ C-NMR (400Hz; DMSO-d ₆ ; TMS) δ (ppm)	115,2 (C2/C6); 127,2 (C4); 130,7 (C3/C5); 162,0 (C1); 55,9 (-O-CH ₃); 117,5 (-C=C-C); 145,1 (Ar-C=C-) 167,2 (-C=O); 179,5 (-C=S); 126,8 (C1'); 124,6 (C2'/C6'); 129,2 (C3'/C5'); 138,4 (C4')

Uji kemurnian dan interpretasi data spektroskopi pada Tabel V.4 dan Gambar L.3.1-L.3.4. ini mendukung hipotesis penelitian dapat dilakukan transformasi gugus fungsi EPMS menjadi turunan *p*-metoksisinamoiltiurea, yaitu J-1 dengan rumus struktur berikut :



Nama Trivial : (*N*-(fenil)-*N'*-(*p*-metoksisinamoil)tiurea.

Nama IUPAC : (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil)akrilamida

5.4. Sintesis (*E*)-3(4-metoksifenil)-*N*-((4-sulfamoilfenil)karbamotioil)akrilamida (J-11)

Sintesis J-11 dengan iradiasi gelombang mikro 30P 400W selama 4 menit (30'x4) memberikan hasil sebanyak 68% berupa kristal jarum warna kuning dengan titik lebur 222,7 °C. Struktur senyawa J-11 dikonfirmasi dengan spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Spektra UV senyawa J-11 dengan pelarut etanol menunjukkan panjang gelombang maksimum 334 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke geseran batokromik dibandingkan dengan EPMS diduga disebabkan bertambahnya gugus kromofor berupa inti aromatis maupun aoksokrom berupa gugus karbamotioil dan gugus -NH.

Karakterisasi spektrum UV senyawa J-11 pada Gambar L.5.17. menunjukkan adanya dua puncak dengan panjang gelombang maksimum 336,5 nm.

Identifikasi gugus fungsi senyawa J-11 disajikan sebagai spektrum IR yang dipaparkan pada Gambar L.4.1., menunjukkan adanya dua puncak pada bilangan gelombang 3415 dan 3271 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus N-H dari amida primer. Puncak pada bilangan gelombang 3415 cm^{-1} juga menimbulkan dugaan terdapatnya amida sekunder, sedangkan puncak pada bilangan gelombang 3271 cm^{-1} juga diduga terdapat amina sekunder pada senyawa J-11. Informasi adanya gugus C=O dari amida tampak pada puncak 1672 cm^{-1} , gugus eter (-C-O-C-) 1162 cm^{-1} , gugus C=S dari tiokarbonil pada 1514 cm^{-1} , gugus S=O pada 1337 cm^{-1} dan inti aromatis tersubstitusi *para* pada 830 cm^{-1} .

Berdasarkan Gambar L.4.2., diketahui bahwa pada struktur senyawa hasil sintesis J-11 terdapat gugus fungsi amida primer, amina sekunder, tiokarbonil, sulfonamido, eter, inti aromatis dan alkena. Pembuktian gugus-gugus fungsi tersebut diperkuat dengan mengetahui jumlah dan jenis proton serta macam karbon pada senyawa J-11 melalui data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

Informasi jumlah, identifikasi jenis dan posisi proton pada senyawa J-11 dipaparkan pada Gambar L.4.3., menunjukkan adanya pergeseran kimia (δ_{H}) pada 3,78 ppm (3H,s) dari gugus metoksi; delapan proton pada geseran kimia (δ_{H}) = 7,00 (2H,d, $J=8,8$ Hz); 7,56 (2H,d, $J=8,4$ Hz); 7,79 (2H,d, $J=8,8$ Hz) dan 7,86 ppm (2H,d, $J=8,4$ Hz) dari dua cincin benzena, dua proton pada $\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm (1H,d) dan 6,88 ppm (1H, d) dari gugus CH=CH (alkena). Tetapan kopling alkena (J)= 16 Hz; menandakan isomer *trans* pada alkena tersebut. Puncak pada $\delta_{\text{H}} = 11,58$ ppm (1H,s) menunjukkan proton gugus -C(S)-NH-,

sedangkan gugus $-C(O)NH-$ pada $\delta_H = 12,88$ ppm(1H,s). Puncak pada $\delta_H = 7,35$ ppm (2H,s) menunjukkan adanya proton gugus $-S(O_2)-NH_2$. Data analisis ini mendukung data spektrum UV (Gambar L.4.1) dan spektrum IR (Gambar L.4.2).

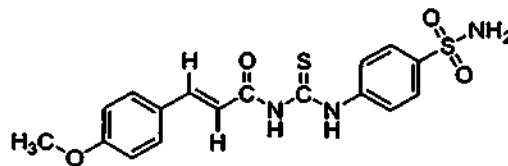
Karakterisasi jumlah dan jenis karbon senyawa J-11 sebagai spektrum ^{13}C -NMR dipaparkan pada Gambar L.4.4., menunjukkan adanya 13 sinyal karbon pada senyawa J-11, yang terdiri dari satu karbon metoksi pada geseran kimia (δ_C) = 55,6 ppm; $\delta_C = 114,9$ (C2/C6); 124,4 (C2'/C6'); 126,5 (C4); 126,8 (C3'/C5'); 130,4 (C3/C5); 141,0 (C1'); 141,5 (C4') dan 161,8 ppm (C1) dari delapan jenis karbon pada dua macam inti aromatis; $\delta_C = 145,1$ (C8) dan 117,0 ppm (C9) dari dua karbon alkena; $\delta_C = 166,9$ ppm (C10) dari satu karbon dari karbonil ; $\delta_C = 179,5$ ppm (C11) dari satu karbon tiokarbonil pada senyawa J-11. Jumlah jenis karbon yaitu 13 sinyal untuk 17 karbon dan posisinya pada Gambar L.4.4. menunjukkan kesesuaian dengan jumlah dan posisi atom C pada senyawa J-11. Data ini mendukung spektrum UV pada Gambar L.4.1, spektrum IR pada Gambar L.4.2. dan spektrum 1H -NMR pada Gambar L.4.3.

Karakteristik spektra UV, IR, 1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa J-11 dirangkum pada Tabel V.5.

Tabel V.5. Karakteristik spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa J-11

Spektrum UV: λ maks. (nm) dalam pelarut etanol	336 (5,0ppm; 0,1579)
Spektrum IR : ν (cm ⁻¹) dalam pelet KBr	3415 (-N-H, amida 2 ^o); 3271 (-N-H, amina 2 ^o); 2964 (-Csp ² -H); 1672(-C=O); 1598 (-C=C- alkena); 1514 (-C=S); 1337 (-S=O); 1162 (-C-O-C); 830 (cincin aromatis ter-substitusi posisi <i>para</i>)
Spektrum ¹ H-NMR (400Hz) : δ (ppm) dalam pelarut CDCl ₃	3,78 (3H,s); 7,70 (1H,d, <i>J</i> =16,0Hz); 6,88 (1H,d, <i>J</i> = 16,0Hz); 7,00 (2H,d, <i>J</i> =8,8Hz); 7,56 (2H,d, <i>J</i> = 8,4Hz) ;7,79 (2H,d, <i>J</i> =8,8Hz); 7,86 (2H,d, <i>J</i> =8,4Hz); 11,58 (1H,s); 12,88 (1H,s); 7,35 (2H, s)
Spektrum ¹³ C-NMR (400Hz) δ (ppm) dalam pelarut CDCl ₃	115,3 (C2/C6); 126,8 (C4); 130,7(C3/C5); 162,1 (C1); 55,9 (-O-CH ₃); 117,4 (-C=C-C); 145,3 (Ar-C=C-); 167,2 (-C=O); 179,8 (-C=S); 141,3(C1'); 124,6 (C2'/C6'); 126,8 (C3'/C5'); 141,7 (C4')

Data-data pada Tabel V.5. mendukung kesimpulan bahwa adanya senyawa tunggal yaitu *N*-(*p*-sulfonamidofenil)-*N'*-(*p*-metoksisinamoil)tiourea (J-11). Hal ini sekaligus juga membuktikan hipotesis penelitian bahwa modifikasi struktur EPMS dengan iradiasi gelombang mikro dapat menghasilkan senyawa turunan *p*-metoksisinamoil tiourea, yaitu J-11 dengan rumus molekul sebagai berikut :



Nama Trivial : *N*-(*p*-sulfonamidofenil)-*N'*-(*p*-metoksisinamoil)tiourea.
 Nama IUPAC : (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-sulfamoilfenilkarbamotioil)akrilamida

5.5. Sintesis (*E*)-3(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-pirimidin-2il)sulfamoilfenil)karbamotioil)-akrilamida (J-12)

Sintesis J-12 dengan iradiasi gelombang mikro sesuai metode 4.3.2.2. memberikan hasil sebanyak 65%, berupa kristal warna kuning dengan titik lebur 233°C. Struktur senyawa J-12 dikonfirmasi dengan spektroskopi UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Spektra UV senyawa J-12 dengan pelarut etanol menunjukkan tiga puncak, dengan panjang gelombang maksimum 338 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke geseran batokromik dibandingkan dengan EPMS diduga karena bertambahnya gugus kromofor berupa inti aromatis maupun aoksokrom berupa gugus karbamotioil dan (*N*-pirimidin-2il)sulfamoilfenil).

Identifikasi gugus fungsi senyawa J-12 disajikan sebagai spektrum IR yang dipaparkan pada Gambar L.5.2, dan dibandingkan dengan literatur (Pavia *et al.*, 2009). Spektrum IR tersebut menunjukkan adanya gugus-gugus fungsi pada senyawa J-12 dikonfirmasi pada spektrum IR (Gambar 5.21), yaitu puncak pada bilangan gelombang 3424, 3355 dan 3288 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus N-H dari amida sekunder. Informasi adanya gugus C=O dari amida tampak pada puncak 1678 cm^{-1} , gugus eter (-C-O-C-) 1255 cm^{-1} , gugus C=S dari karbamotioil pada 1582 cm^{-1} , gugus S=O pada 1330 cm^{-1} dan 1145 cm^{-1} . dan inti aromatis tersubstitusi *para* pada 943 dan 822 cm^{-1} . Berdasarkan Gambar L.5.2., diketahui bahwa pada struktur senyawa hasil sintesis J-12 terdapat gugus fungsi amida sekunder, karbamotioil, sulfonamido, eter, inti aromatis dan alkena.

Pembuktian gugus-gugus fungsi tersebut diperkuat dengan mengetahui jumlah dan jenis proton serta macam karbon pada senyawa J-12 melalui data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Informasi jumlah, identifikasi jenis dan posisi proton pada senyawa J-12 dipaparkan pada Gambar L.5.3., menunjukkan adanya pergeseran kimia (δ_{H}) pada 3,83 ppm (3H,s) dari gugus metoksi; delapan proton pada geseran kimia (δ_{H}) = 7,03 (2H,d, $J=4,4$ Hz); 7,69 (2H,d, $J=9,0$ Hz); 6,89 (2H,d, $J=9,0$ Hz) dan 7,96 ppm (2H,d, $J=4,4$ Hz) dari dua cincin benzena, dua proton pada δ_{H} = 7,69 ppm (1H,d) dan 6,86 ppm (1H, d) dari gugus CH=CH (alkena); 8,43-8,48 ppm (3H, m). Tetapan kopling alkena (J)= 15,8 Hz;

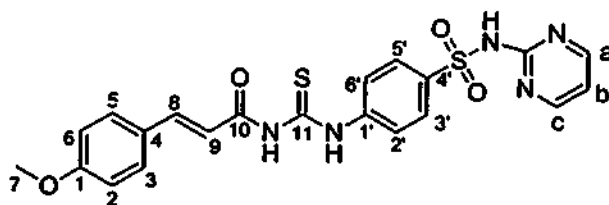
menandakan isomer *trans* pada alkena tersebut. Puncak pada $\delta_H = 11,59$ ppm (1H,s) menunjukkan proton gugus -C(S)-NH-, sedangkan gugus -C(O)NH- pada $\delta_H = 12,94$ ppm(1H,s). Puncak pada $\delta_H = 6,99$ ppm (1H,s) menunjukkan adanya proton gugus -(SO₂)-NH-pirimidil. Data analisis ini mendukung data spektrum UV (Gambar L.5.1.) dan spektrum IR (Gambar L.5.2).

Karakterisasi jumlah dan jenis karbon senyawa J-11 sebagai spektrum ¹³C-NMR dipaparkan pada Gambar L.5.3. menunjukkan adanya 16 sinyal karbon pada senyawa J-12, yang terdiri dari satu karbon metoksi pada geseran kimia (δ_C) = 55,9 ppm; $\delta_C = 115,2$ (C2/C6); 124,1 (C2'/C6'); 127,1 (C4); 128,8 (C3'/C5'); 130,4 (C3/C5); 142,2 (C1') ; 137,7 (C4') dan 162,1 ppm (C1) dari delapan jenis karbon pada dua macam inti aromatis; $\delta_C = 145,1$ (C8) dan 117,0 ppm (C9) dari dua karbon alkena; $\delta_C = 158,8$; 157,4 dan 112,6 ppm dari tiga jenis karbon pada cincin pirimidil; $\delta_C = 167,2$ ppm (C10) dari satu karbon dari karbonil ; $\delta_C = 179,6$ ppm (C11) dari satu karbon karbamotioil pada senyawa J-12. Jumlah jenis karbon yaitu 16 sinyal untuk 20 karbon dan posisinya pada Gambar 5.23 menunjukkan kesesuaian dengan jumlah dan posisi atom C pada senyawa J-12. Data ini mendukung spektrum UV pada Gambar L.5.1, spektrum IR pada Gambar L.5.2. dan spektrum ¹H-NMR pada Gambar L.5.3. Karakteristik spektra UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR senyawa J-12 dirangkum pada Tabel V.6.

Tabel V.6. Karakteristik spektra UV, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ J-12

Spektrum UV: λ maks. (nm) dalam pelarut etanol	338 (5,0ppm; 0,19048)
Spektrum IR : ν (cm^{-1}) dalam pelet KBr	3424 dan 3355 (-N-H, amida 2 ^o); 3288 (-N-H, amida 1 ^o); 3030 (-Csp ² -H); 1678(-C=O, amida); 1582 (-C=C- alkena); 1512 (-C=S); 1330 (-S=O); 1145 (-C-O-C); 821 (cincin aromatis ter-substitusi posisi <i>para</i>)
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (400Hz) : δ (ppm) dalam pelarut CDCl_3	3,81 (3H,s); 7,69 (1H,d, $J=15,8\text{Hz}$); 6,86 (1H,d, $J=15,8\text{Hz}$); 7,03 (2H,d, $J=8,8\text{Hz}$); 7,55 (2H,d, $J=8,8\text{Hz}$); 7,82 (2H,d, $J=2,0\text{Hz}$); 7,38 (2H,d, $J=2,0\text{Hz}$); 11,62 (1H,s); 12,91 (1H,s)
Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (400Hz) δ (ppm) dalam pelarut CDCl_3	115,2 (C2/C6); 127,1 (C4); 130,4 (C3/C5); 162,1 (C1''); 55,5 (-O-CH ₃); 117,0 (-C=C-C); 145,4 (Ar-C=C-); 167,2(-C=O); 179,6 (-C=S); 142,2 (C1'); 124,1 (C2'/C6'); 128,8 (C3'/C5'); 137,6 (C4'); 158,8; 157,4 dan 112,6 dari cincin pirimidil

Data-data pada Tabel V.6. mendukung kesimpulan bahwa adanya senyawa tunggal yaitu *N*-(*p*-sulfonamidofenil)-*N'*-(*p*-metoksisinamoil)tiourea (J-12). Hal ini sekaligus juga membuktikan hipotesis penelitian bahwa modifikasi struktur EPMS dengan iradiasi gelombang mikro dapat menghasilkan senyawa turunan *p*-metoksisinamoiltiourea, yaitu J-12 dengan rumus molekul sebagai berikut :



Nama Trivial : *N*-(*p*-sulfonamidofenil)-*N'*-(*p*-metoksisinamoil)tiourea.

Nama IUPAC : (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-pirimidin-2il)sulfamoilfenil)karbamotioil)-akrilamida

Penambahan substituen gugus sulfonamido dan sulfonamidopirimidil pada amina aromatis yang berfungsi sebagai nukleofil, menurunkan kereaktifan amina aromatis sehingga terjadi penurunan prosentase hasil sintesis : J1 > J11 > J12.

Metode sintesis senyawa J-1, J-11 maupun J-12 berbeda dengan metode sintesis

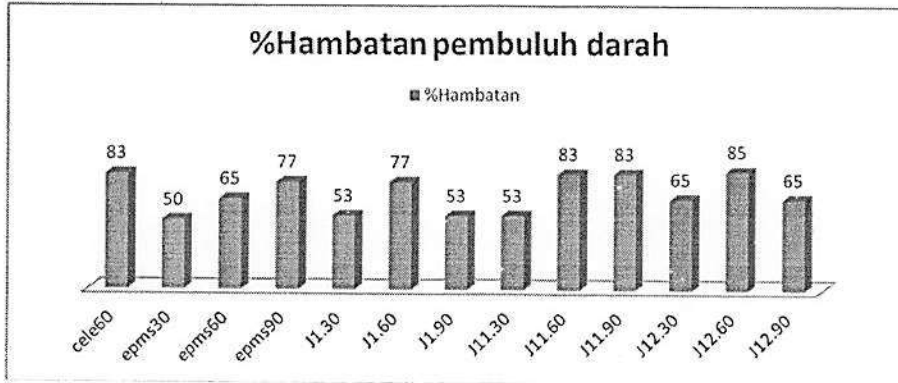
turunan urea yang pernah dilaporkan oleh Amornraksa (2009); Arslan, *et al.* (2004), Katritzky, *et al.* (2004); Xiao, *et al.* (2009); Xu, *et al.* (2003) dan Budiati, *et al.* (2010).

5.7. Uji Hambatan Angiogenesis pada Membran Korioalantois TAB

Membran korio alantois adalah membran pada telur ayam yang terbentuk setelah inkubasi hari ke 4, merupakan hasil fusi dari korion dan alantois (Ribatti, 2007). Uji hambatan angiogenesis dilakukan pada membran korioalantois TAB karena membran korioalantois merupakan tempat terjadinya vaskularisasi yang sangat tinggi dan mudah diamati (Ribatti *et al.*, 2010; Blacher *et al.*, 2005) sejalan dengan proses pertumbuhan embrio ayam. Hasil pengamatan makroskopis terhadap pembuluh darah baru yang diinduksi oleh bFGF dan diamati ditampilkan pada Tabel V.7. dan Gambar 5.5.

Tabel V.7. Hasil Pengamatan Makroskopis Jumlah Pembuluh Darah baru rata-rata pada CAM

Sampel	Rata-rata pembuluh darah baru	% Hambatan
bFGF	6	0
Celecoxib 60	1	83
EPMS 30	3	50
EPMS 60	2	65
EPMS 90	1	77
J-1 30	2	53
J-1 60	1	77
J-1 90	2	53
J-11 30	2	53
J-11 60	1	83
J-11 90	1	83
J-12 30	2	65
J-12 60	1	83
J-12 90	2	65



Gambar 5.5. Histogram % hambatan pembuluh darah baru hasil pengamatan secara makroskopis (dosis 30,60,90 μg)

Berdasarkan data pada Tabel V.7. diketahui bahwa EPMS dan hasil modifikasinya pada dosis 30-90 μg dapat menghambat pembentukan pembuluh darah baru pada membran CAM pada TAB bila dibandingkan dengan CAM yang diinduksi bFGF tanpa diberi perlakuan apapun (kontrol positif).

Pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah celecoxib dosis 60 μg , yang memberikan hambatan pertumbuhan pembuluh darah baru pada CAM sebesar 83%. Celecoxib merupakan COX-2 inhibitor (Dannenbergh & Subbaramiah, 2003), yang telah dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan kanker prostat, *gastric*, paru maupun payudara (Kenkle *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2011). Hambatan pada COX-2 merupakan langkah strategis pada penghambatan pertumbuhan kanker maupun metastasis, dimana dengan menghambat COX-2, sintesis PGE₂, VEGF dan ekspresi mRNA MMP2 terhambat sehingga pertumbuhan tumor maupun angiogenesis akan terganggu (Wang *et al.*, 2008; Grosch *et al.*, 2006).

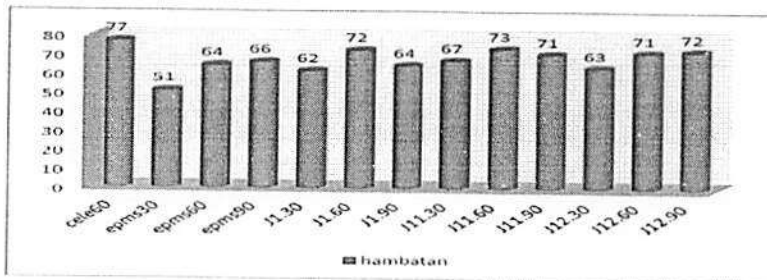
EPMS sebagai material awal penelitian ini memberikan hambatan pertumbuhan 53-77%, semakin tinggi dosis EPMS yang diujikan (30-90 μg) hambatan semakin besar. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilaporkan He *et al.*, (2012). Menurut He *et al.* (2012), EPMS merupakan angiogenesis inhibitor *dose dependent* yang sangat kuat pada uji dengan zebrafish embryo. Hasil uji *semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction* memperkuat dugaan EPMS menimbulkan efek *multiple molecular targets related* angiogenesis. Adanya interaksi EPMS dengan COX-2 pada uji *in silico* (Ekowati *et al.*, 2012), memperkuat dugaan hambatan EPMS terhadap angiogenesis juga melalui hambatan COX-2.

Senyawa hasil modifikasi struktur J-1, J-11 dan J-12 pada dosis 30-90µg juga dapat menghambat angiogenesis. Pada dosis 30 µg, senyawa-senyawa hasil modifikasi struktur EPMS menunjukkan hambatan yang lebih besar daripada EPMS. Mekanisme hambatan senyawa-senyawa tersebut belum jelas, tetapi berdasarkan hasil uji *in silico* terhadap COX-2 maupun tirosin kinase, diduga bahwa interaksi senyawa-senyawa hasil modifikasi struktur tersebut lebih stabil berinteraksi dengan COX-2 maupun tirosin kinase, sehingga aktivitas hambatan lebih besar.

Selain menganalisis jumlah pembuluh darah baru secara makroskopi, juga dilakukan pengamatan secara mikroskopis pada sediaan CAM yang dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan HE. Jumlah pembuluh darah rata-rata hasil pengamatan secara mikroskopis disajikan pada Tabel V.8. dan Gambar 5.6.

Tabel V.6. Jumlah Pembuluh Darah Rata-rata Hasil Pengamatan Mikroskopis Uji Angiogenesis pada CAM

Sampel	Hasil Pengamatan	Sampel	Hasil Pengamatan
bFGF1	112	J-11 30	37
EPMS 30	55	J-11 60	30
EPMS 60	40	J-11 90	33
EPMS 90	38	J-12 30	41
J-1.30	43	J-12 60	32
J-1 60	31	J-12 90	31
J-1.90	40	Cele 60	26

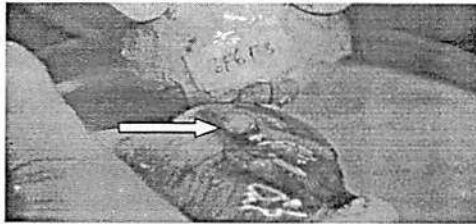


Gambar 5.6. Histogram hambatan angiogenesis senyawa EPMS dan hasil modifikasi strukturnya pada pengamatan mikroskopis

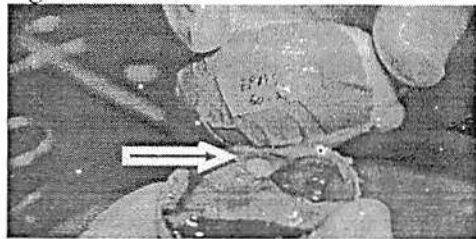
Berdasarkan pada Tabel V.8 dan Gambar 5.6. yang dianalisis dengan one way anova ($\alpha=0,05$), diketahui bahwa semua senyawa uji : EPMS, J-1, J-11, J-12 dosis 30,60,90µg

memberikan efek hambatan angiogenesis yang bermakna. Senyawa hasil modifikasi struktur EPMS : J-1, J-11 dan J-12 dosis 60 μ g memiliki aktivitas hambatan tidak berbeda makna dengan celecoxib dosis 60 μ g.

Hasil pengamatan angiogenesis CAM secara makroskopis ditampilkan pada Gambar 5.7. dan 5.8. di bawah :

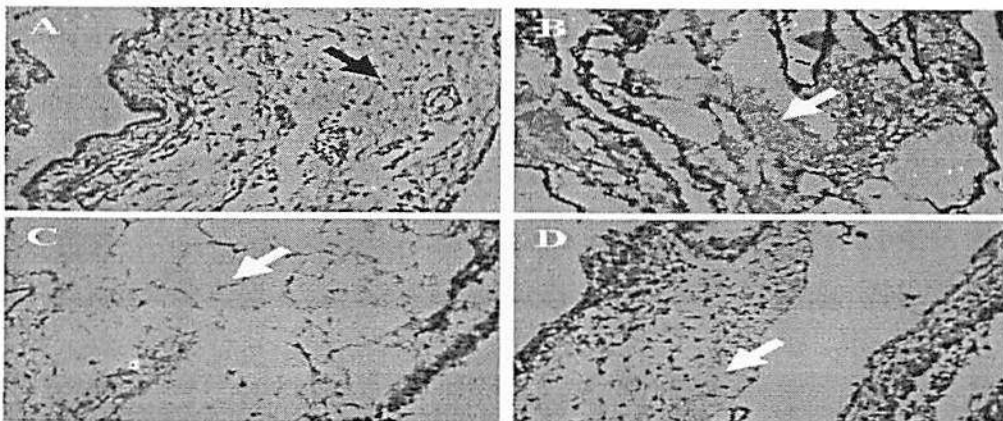


Gambar 5.7. Pembentukan Angiogenesis pada membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF60ng



Gambar 5.8. Pembentukan Angiogenesis pada membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF60ng diberi perlakuan EPMS 60 μ g.

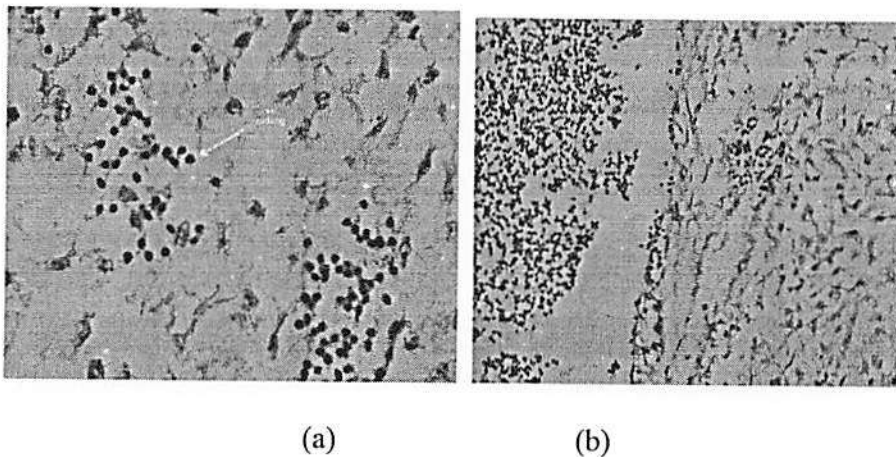
Hasil pengamatan angiogenesis secara mikroskopis ditampilkan pada Gambar 5.9.



Gambar 5. 9. Gambaran histologis chorio alantois untuk kelompok perlakuan : A) bFGF, B) CELE, C) EPMS dan D) kelompok J-11 (pewarnaan HE; Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

Gambar 5.9. slide A, B, C dan D diatas masing-masing menunjukkan gambaran histologis korio alantois untuk kelompok perlakuan bFGF, CELE, EPMS dan kelompok J-11. Nampak jelas bahwa sel-sel endotel penyusun pembuluh kapiler (panah) pada jaringan mesenchymal korio alantois pada kelompok perlakuan bFGF masih sangat baik, dibandingkan kelompok perlakuan lainnya yang sebagian besar telah lisis (panah putih). Hal ini memperkuat hasil pengamatan makroskopis yang telah dilakukan dan memperkuat dugaan senyawa uji menghambat / merusak sel-sel endotel penyusun pembuluh kapiler.

Induksi bFGF pada CAM pada tahap awal juga menyebabkan terjadinya inflamasi, hal ini terbukti pada gambaran histologi Gambar 5.10, yang menunjukkan sel radang pada CAM. Mondalek, *et al* (2010) melaporkan adanya hubungan hambatan ekspresi COX-2 pada CAM dengan hambatan angiogenesis. Fakta ini memperkuat dugaan bahwa COX-2 inhibitor dapat digunakan untuk menghambat tahap awal angiogenesis.



Gambar 5.10. Sel radang pada CAM akibat induksi bFGF 60ng , (a) perbesaran 100x, (b) perbesaran 40x

BAB VI. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh pada penelitian ini, yaitu adanya kemampuan derivat *p*-metoksisinamoiltiurea (J-1, J-11, J-12) menghambat angiogenesis berdasarkan pengamatan makroskopis maupun mikroskopis, tetapi mekanisme hambatan belum jelas. Hasil pengamatan mikroskopis tampak bahwa terjadi perubahan sel endotel yang sangat mempengaruhi kapilerisasi. Pengamatan mikroskopis juga menunjukkan penurunan jumlah sel radang yang menerangkan hambatan inflamasi dari senyawa uji. Hal ini memperkuat dugaan adanya efek hambatan senyawa uji terhadap COX-2 yang juga berperan pada inflamasi dan vaskularisasi.

Oleh karena itu disusun tahapan selanjutnya penelitian tahun II adalah uji aktivitas hambatan ekspresi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan COX-2 pada CAM dari hasil modifikasi struktur EPMS. Rencana tahapan selanjutnya dari penelitian ini akan dikerjakan pada tahun ke II, secara skematis dipaparkan pada Gambar 6.1.

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan pada penelitian ini adalah :

1. Modifikasi struktur EPMS menjadi derivat *p*-metoksisinamoiltiourea dapat dilakukan dengan iradiasi gelombang mikro selama 3 menit pada kekuatan 132W menghasilkan senyawa prosentase hasil sebesar :
 - a. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(fenilkarbamotioil)akrilamida = 70%.
 - b. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-sulfamoilfenilkarbamotioil)akrilamida = 68%.
 - c. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-((4-(*N*-pirimidin-2il)sulfamoilfenil)karbamotioil)akrilamida = 65%.Adanya gugus sulfonamido- dan sulfonamidopirimidil- menurunkan kereaktifan amina aromatis sebagai nukleofil sehingga prosentase hasil juga menurun.
2. Derivat *p*-metoksisinamoiltiourea mempunyai aktivitas hambatan angiogenesis pada membran korioalantois TAB yang diinduksi bFGF, dengan besar hambatan tergantung dari dosis yang diberikan. Dosis optimum J-1, J-11 dan J-12 adalah 60µg dan memiliki potensi hambatan yang setara dengan celecoxib 60µg.

Saran pada penelitian ini adalah dilakukan penelitian lanjutan uji aktivitas hambatan ekspresi VEGF dan COX-2 pada CAM untuk mengetahui mekanisme hambatan angiogenesis derivat *p*-metoksisinamoiltiourea.

DAFTAR PUSTAKA

- Amornraksa, K., 2009. Facile synthesis of *N*-aroylurea analogs as potential antioxidants. *Eur.*, Vol.31 no.4, p. 510-18.
- Arslan, H., Florke, U., Kulcu, N., 2004. The crystal and molecular structure of 1-(2-chlorobenzoyl)-3-*p*-tolyl-thiourea. *Turk J Chem*, Vol. 28, 673-78.
- Athikomkulchai S, Vaymhasuwan P, Tun-vichien S, Piyapong S, Malaipuang S, Ruangrungs. 2007. The Development of sunscreen Product from *Kaempferia galanga*. *J. Health Res.* 21(4), pp. 253-256.
- Aroonrerk N & Kamkaen N. 2009. Anti-inflammatory Activity of *Quercus Infectoria*, *Glycyrrhiza Uralensis*, *Kaempferia galanga* and *Coptis Chinensis*, The Main Components of Thai Herbal Remedies for Aphthous Ulcer. *J Health Res* 23 (1) : 17-22.
- Budiati T, Suzana, Surdijati. 2010. Sintesis, Uji Aktivitas Analgesik dan Antiinflamasi Senyawa Benzoiltiourea tersubstitusi. *Majalah Farmasi Indonesia* 21 (1). pp. 68-76.
- Blacher, S., Devy, L., Hlushchuk, R., Larger, E., Lamande, N., Burri, P., Corvol, P., Djonov, V., Foidart, J and Noel, A. 2005. Quantification of Angiogenesis in The Chicken Chorio Allantoic Membrane (CAM). *Image Anal Stereol* 24, pp:169-180.
- Dannenberg Aj & SUBbaramiah K. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia : Rationale and promise. *Cancer cell.* 4, pp.431-436.
- Ekowati J., Suzana, Dyah NW, Susilowaty MI, Poerwono H, Rudyanto M, Astika GN, Syahrani A, Siswono H, Budiati T, 2007. Novel Analgesic Compounds from *p*-hydroxycinnamic acid. **First Collaborative Joint Seminar USM-Unair, Penang, Malaysia.**
- Ekowati J., Dyah NW, Poerwono H., Siswandono, Budiati T., Sasaki S., Yamauchi T., Higashiyama K., 2009. Structure Modification of *p*-methoxycinnamic acid Isolated from *Kaempferia galanga* to Improve its antinociceptive activity. **Second Collaborative Joint Seminar USM-Unair, Surabaya, Indonesia.**
- Ekowati J., Sukardiman, Siswandono, Sasaki S., Higashiyama K., Budiati T. 2010. Docking Study and Structure Modification of Ethyl *p*-methoxycinnamate Isolated

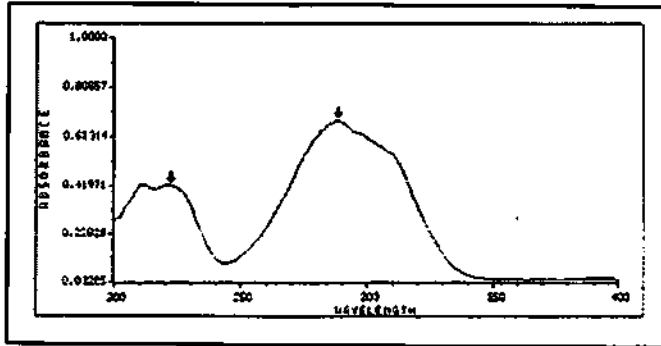
from *K. galanga* to Enhance Its Selectivity on COX-2. **International Conference on Medicinal Plants**. Surabaya, 21-22 Juli 2010.

- Ekowati J., Bimo A. Tejo, Sukardiman, Siswando, Sasaki S., Higashiyama K., Budiati T. 2012. Synthesis of Thiourea Derivatives of Ethyl p-methoxycinnamate Isolated from *K. galanga* and Their Chemopreventive Activity Against Fibrosarcoma in Mice. **IJPPS**.
- Frisca, Caroline T. Sardjono, Ferry Sandra. **ANGIOGENESIS: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis**. JKM 8 (2), pp. 174-187
- Greehough, A., Smart, HJM., Moore AE., Roberts HR., Williams AC., Paraskeva C., Kaidi A. 2009. Review The COX-2/PGE₂ Pathway : key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis** 30, pp. 377-386.
- Gotink, K.J. & Verheul, H.M.W. 2010. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? **Angiogenesis**.13, pp.1-14.
- Joy, P., Thomas, J., Mathew, S., Skaria, BP. 1998. **Zingiberaceous Medicinal and Aromatic Plants**. Aromatics and Medicinal Plants Research Station. Odakkali, Asamannor PO. Kerala India.
- Katritzky A., Kirichenko, N., Rogovoy, B.V., Kister, J., Tao, H. 2004. Synthesis of mono- and *N,N*-disubstituted thioureas and *N*-acylthioureas. **British Library Direct**, Vol.11, pp.1799-805.
- Koki AT. & Masferrer JM. 2002. Celecoxib: A Specific COX-2 Inhibitor With Anti-cancer Properties. **Cancer Control**. 9 (2) (Supplement), pp. 28-35.
- Klenke, FM., Gebhard, M.M., Ewerbeck, V., Abollahi, A., Hubert, P.E., and Sckell, A. The selective COX-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors : An intravital microscopy study in mice. 2008. **BMC Cancer** 6 :9 doi:10.1186/1471-2407-6-9
- Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, Ono M. 2004. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. **The FASEB Journal**. pp. 300-310.
- Kusumawati, I & Yusuf H. 2011. Phospholipid Complex as a carrier of *Kaempferia galanga* Rhizoma extract to improve its analgesic activity. **IJPPS** 3 (Suppl.1) : 44-46.

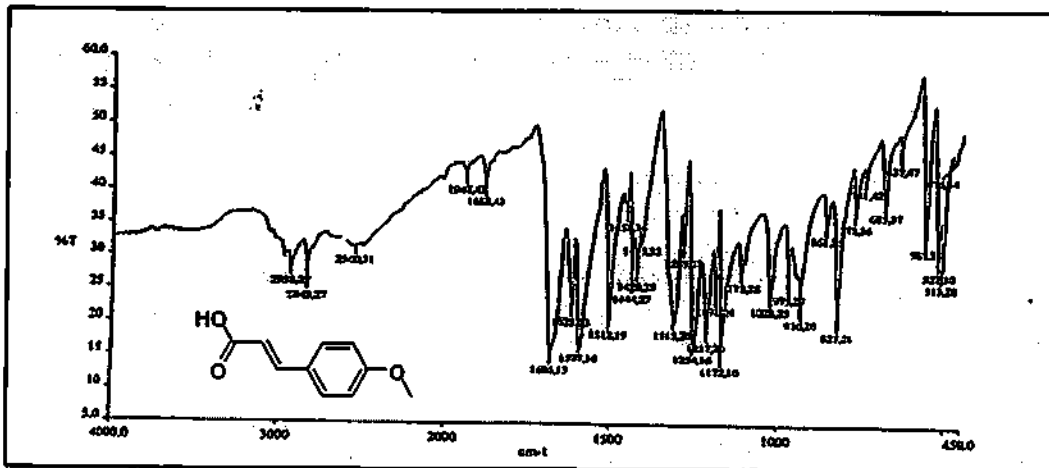
- Lin, X., Ayrapetov, M.K., and Sun, G. 2005. Characterization of the interactions between the active site of a protein tyrosine kinase and a divalent metal activator. **BMC Biochemistry** 6, pp : 1-8.
- Mc Murry, 2008. **Organic Chemistry**. 5th Ed., Wadsworth Inc., Belmont. California.
- Mondalek, F. G., Ponnurangam, S.Govind, J.,Houchen, C., Anant, S., Pantazis, P., and Ramanujam, R.P. 2010. Inhibition of angiogenesis- and inflammation-inducing factors in human colon cancer cells *in vitro* and *in ovo* by free and nanoparticle-encapsulated redox dye, DCPIP. **Journal of Nanobiotechnology** 8, pp : 1-17.
- Natta L, Orapin K, Kritikka N, Pantip B. 2008. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. **Intern. Food Rewatch J.** 15 (3), pp : 1-10.
- Favia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. 2009. **Introduction to Spectroscopy** 4th Ed. Brooks/Cole Cengage Learning, Washington.
- Rao & Reddy, 2004. NSAIDs and Chemoprevention. **Current Cancer Drug Targets**. 4, pp : 29-42.
- Rigas, B & Kashfi K. 2005. Cancer prevention: a new era beyond cyclooxygenase-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** : 1-8.
- Roskoski, R. Jr. 2007. Sunitip : A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. **BBRC** 356 : 323-328 .
- Ribatti, D. 2010. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as an *In Vivo* Assay to Study Antiangiogenesis. **Pharmaceuticals** 3 : 482-513.
- Rostiana Oti, Rosita SM, Mono R, Taryono. 2005. Budidaya Tanaman Kencur. **Sirkuler** 11 : 1-11.
- Saberi MR, Hadizadeh F, Imenshahidi M, Shakeri H, Ziaee ST, Ghafuri MA, Sakhtianchi R, Badiyan Z, Hajian S. 2010. Synthesis and Effects of 4,5-Diaryl-2-(2-alkylthio-5-imidazolyl) Imidazoles as Selective Cyclooxygenase Inhibitors. **Iranian J. of Basic Med. Sci.** 13 (4) : 225-231
- Sahin E. 2009. Cyclooxygenase-1 in Cancer and Angigenesis. **Angtology** 60 : 242-253.
- Sae-wong, C., Ridditid, W., Reanmongkol, W., Wongnawa, M., 2008. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* and its possible mechanisms in experimental animals. **Thai J Pharmacol** 30 : 26-34.

- Salamah, N., Sugiyanto, Hartati, M.S., Hayati, F., Jumariyanto, P. 2009. Isolasi dan Identifikasi eurycomanone akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) serta uji anti angiogenik. *Majalah Farmasi Indonesia*, 20 (3), hal. 118-126.
- Subbaramiah K and Dannenberg AJ. 2003. Cyclooxygenase 2 : A molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in Pharmacological Sci.* 24 : 96-102.
- Sutthanont, N., Choochote, W., Tuetun, B., Junkum, A., Jitpakdi, A., Chaithong, U., Riyong, D, Pitasawat, B. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant- derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and -resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Vector Ecol.*, 35 : 106-115.
- Tewtrakul S., Yuenyongsawad S., Kummee S., and Atsawajaruwan L. 2005. Chemical component and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarinn J.Sci.Technol.* 27 (Suppl.2) : Thai herbs. : 504-507.
- Vimala S, Norhanom AW, Yadav M. 1999. Anti-tumor promoter activity in Malaysian ginger rhizoma used in traditional medicine. *Br. J. Cancer.* 80(1-2) : 110-116.
- Wang, L., Chen, W., Xie, X., He, Y, Bai, X. 2008. Celecoxib Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis In An Orthotopic Implantation Tumor Model of Human Cancer. *Exp Oncol* 30 (1) , pp : 42-51.
- WHO, 2008. *The Impact of Cancer in Your Country.* <http://www.WHO.Int/info base/report>. 28 Desember 2008.
- Xiao, L., Liu, C., Li, Y., 2009. Ultrasound Promoted of Bis(substituted pyrazol-4-ylcarbonyl)-Substituted Thioureas. *Molecules* 14, pp.1423-1428.
- Xu, X., Qian, X., Li, Z., Huang, Q., Chen, G., 2003. Synthesis & Insecticidal Activity of New Substituted *N*-aryl-*N'*-benzoylthiourea Compounds. *J. Fluorine Chemistry.* 121, pp : 51-54.
- Yao, L., Liu, F., Hong, L., Sun, L., Liang, S., Wu, K and Fan, D. 2011. The function and mechanism of COX-2 in angiogenesis off gastric cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 3300:13 doi:10.1186/1756-9966-30-13.
- Yuniarti, N., Ikawati, Z., Istyastono, EP. 2011. The Importance of ARG513 as hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitor in a virtual screening campaign. *Bioinformatics* 6(4) : 164-166.

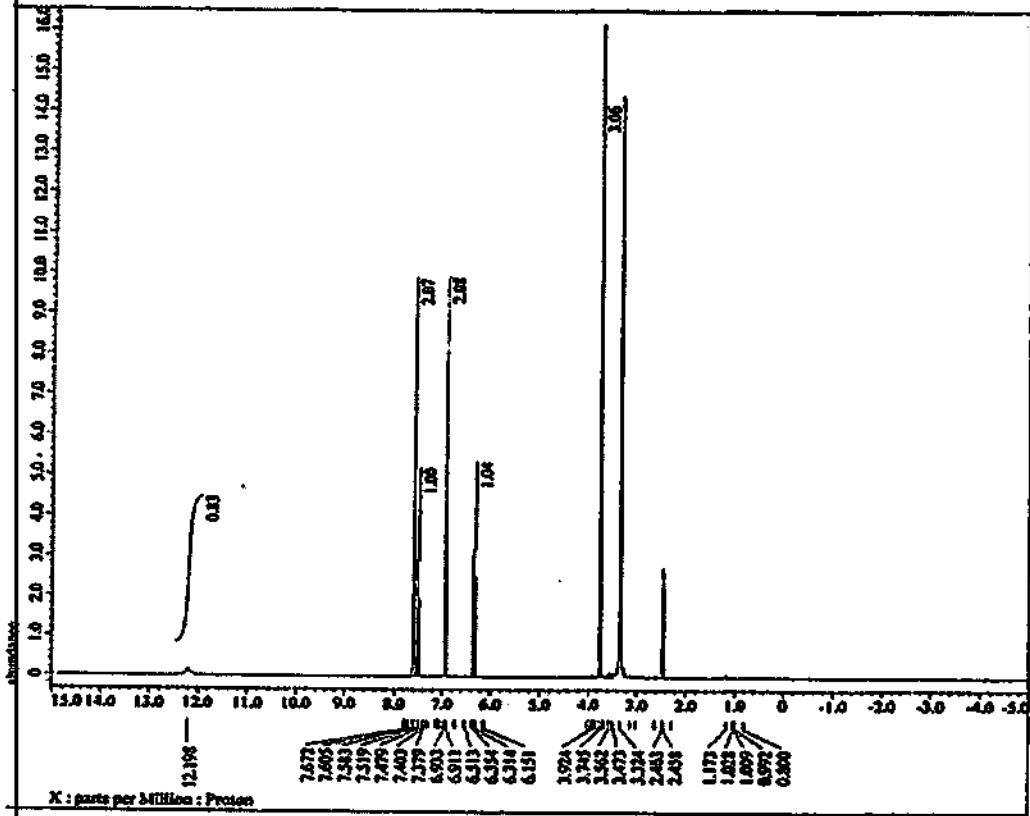
Lampiran 2 Spektra UV, IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ APMS



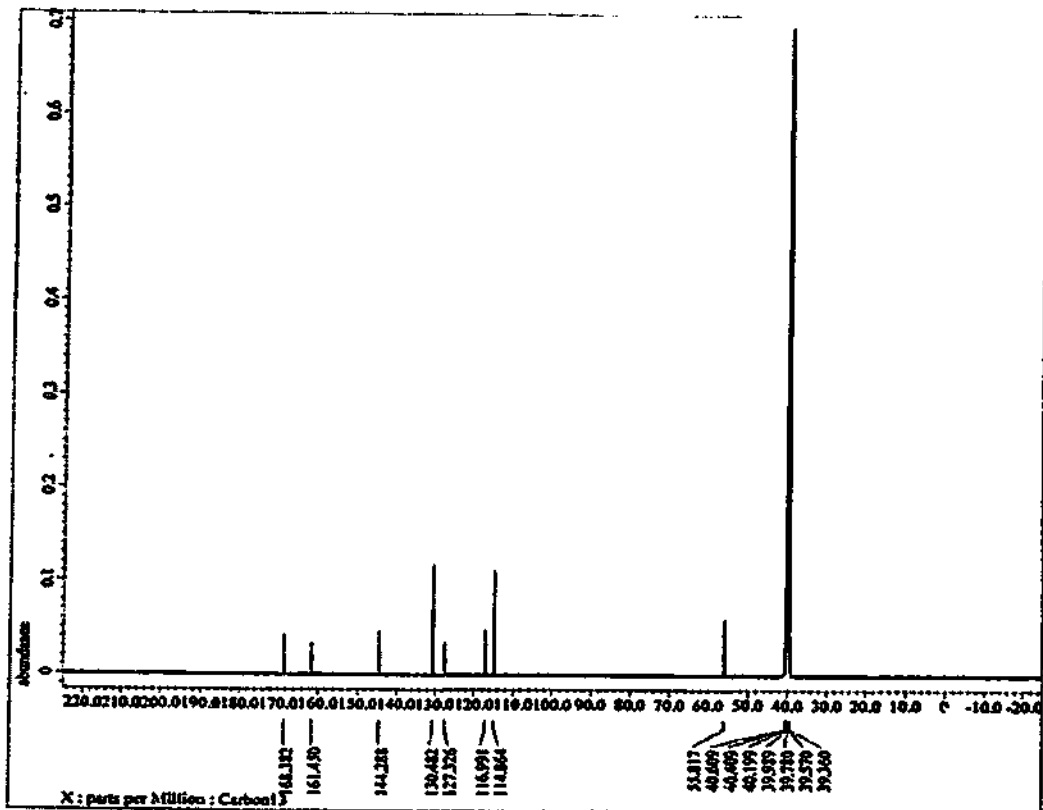
Gambar L 2.1. Spektrum UV hasil hidrolisis EPMS pelarut etanol



Gambar L.2.2. Spektrum FTIR senyawa hasil hidrolisis EPMS (Pellet : KBr)



Gambar L.2.3. Spektrum ^1H -NMR senyawa APMS (Pelarut : DMSO-d₆).



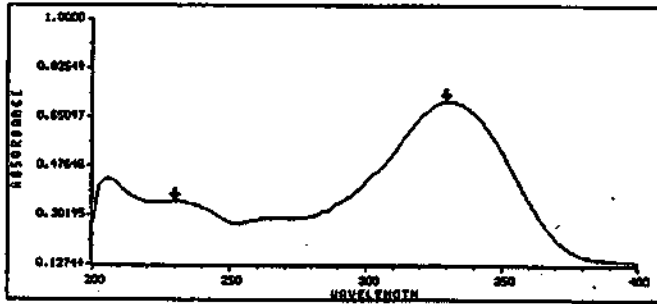
Gambar L.2.4. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa APMS (Pelarut : DMSO-d₆).

Lampiran 3 Spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR J-1

Karakterisasi senyawa J-1 secara spektroskopi dipaparkan berikut ini :

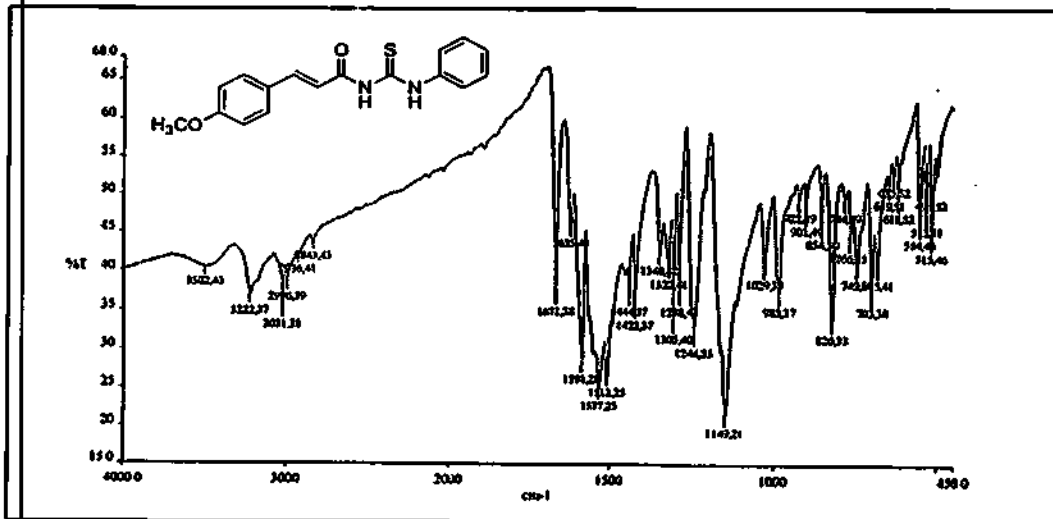
a. Spektrum UV senyawa J-1

Spektrum UV senyawa J-1 disajikan pada Gambar 5.13.



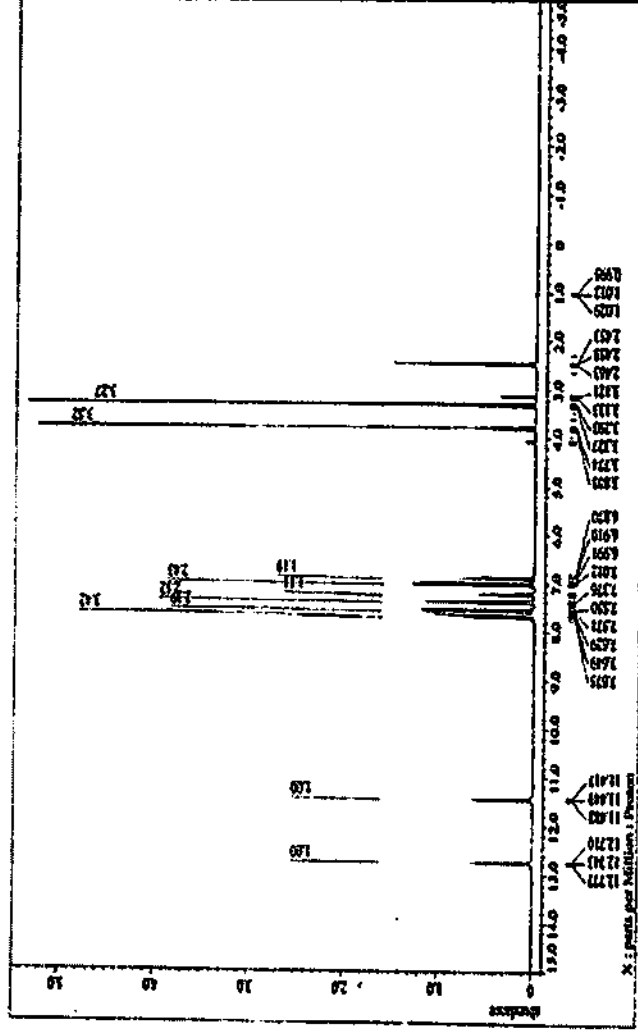
Gambar L.3.1. Spektrum UV J-1 dengan pelarut etanol

b. Spektrum IR senyawa J-1



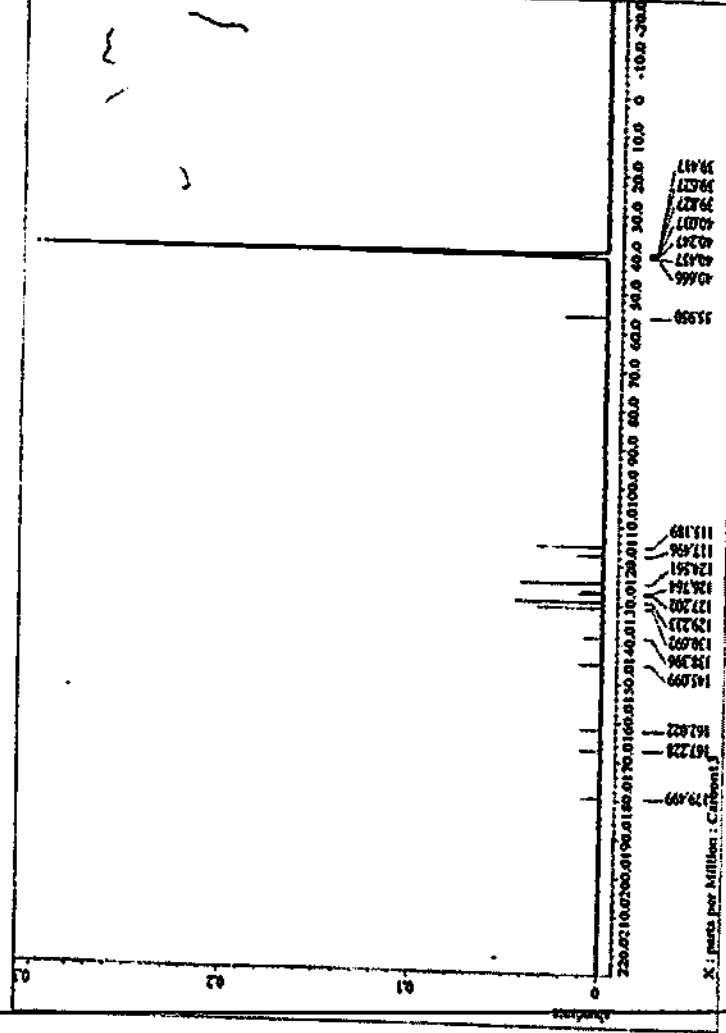
Gambar L.3.2. Spektrum IR J-1 dalam pellet KBr

c. Spektrum ¹H-NMR senyawa J-1



Gambar L.3.3. Spektrum ¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃; TMS) senyawa J-1

d. Spektrum ¹³C-NMR senyawa J-1



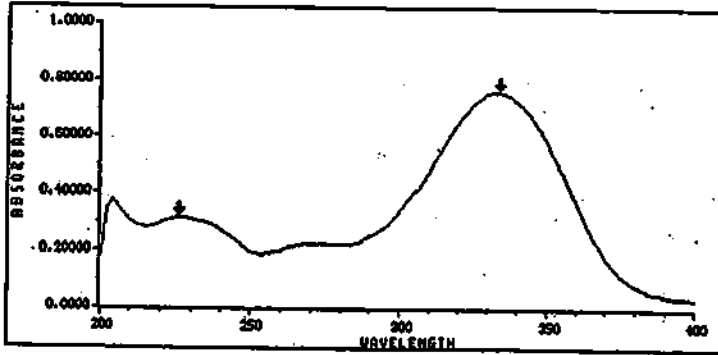
Gambar L.3.4. Spektrum ¹³C-NMR (400 MHz; DMSO-d₆; TMS) senyawa J-1

Lampiran 4
 Spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR J-11

Karakterisasi senyawa J-1 secara spektroskopi dipaparkan berikut ini :

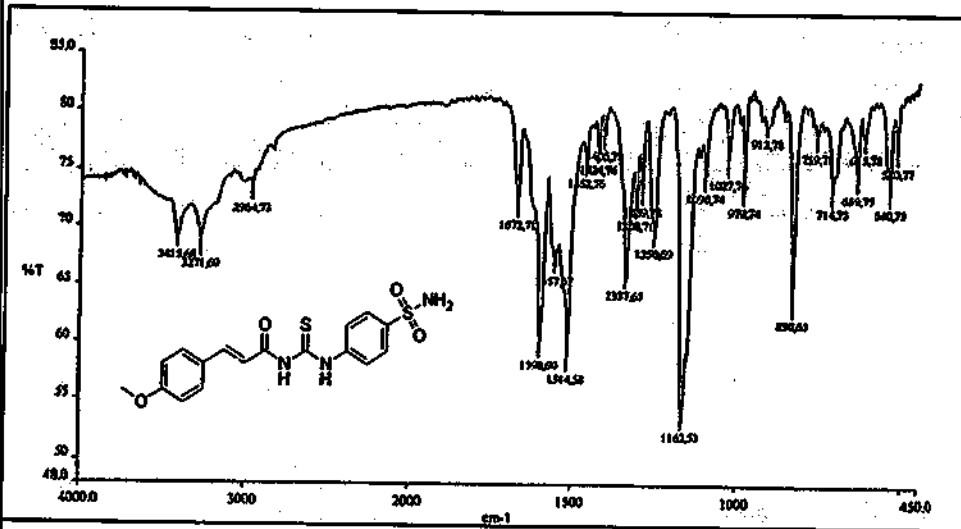
a. Spektrum UV J-11

Spektrum UV senyawa J-11 disajikan pada Gambar L.4.1.



Gambar L.4.1. Spektrum UV J-11 dengan pelarut etanol

a. Spektrum IR J-11



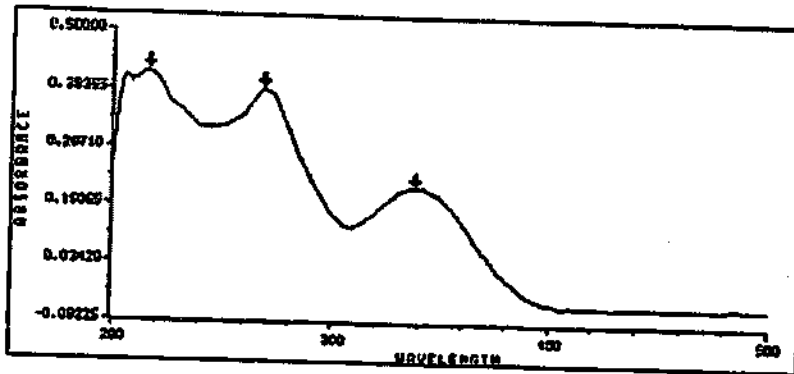
Gambar L.4.2. Spektrum IR J-11 dalam pellet KBr

Lampiran 5
Spektra UV, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR J-12

Karakterisasi senyawa J-12 secara spektroskopi dipaparkan berikut ini :

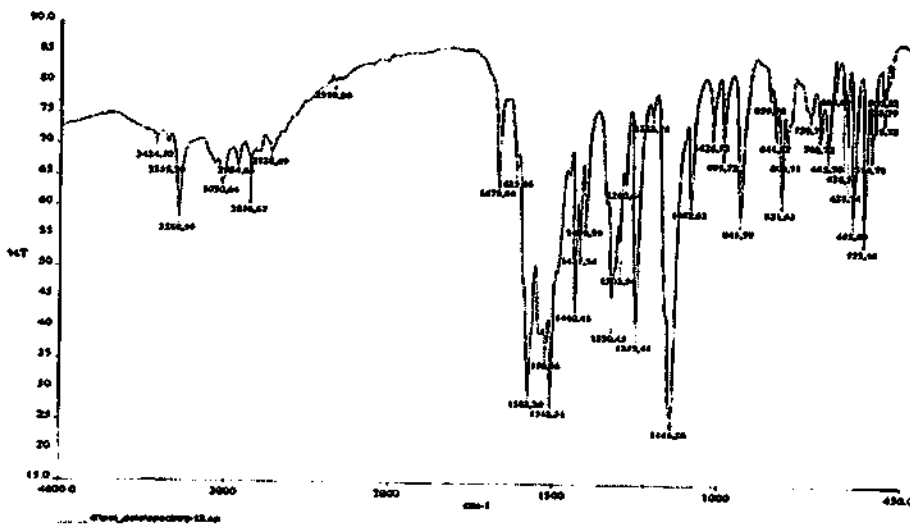
a. Spektrum UV J-12

Spektrum UV senyawa J-12 disajikan pada Gambar L.5.1.



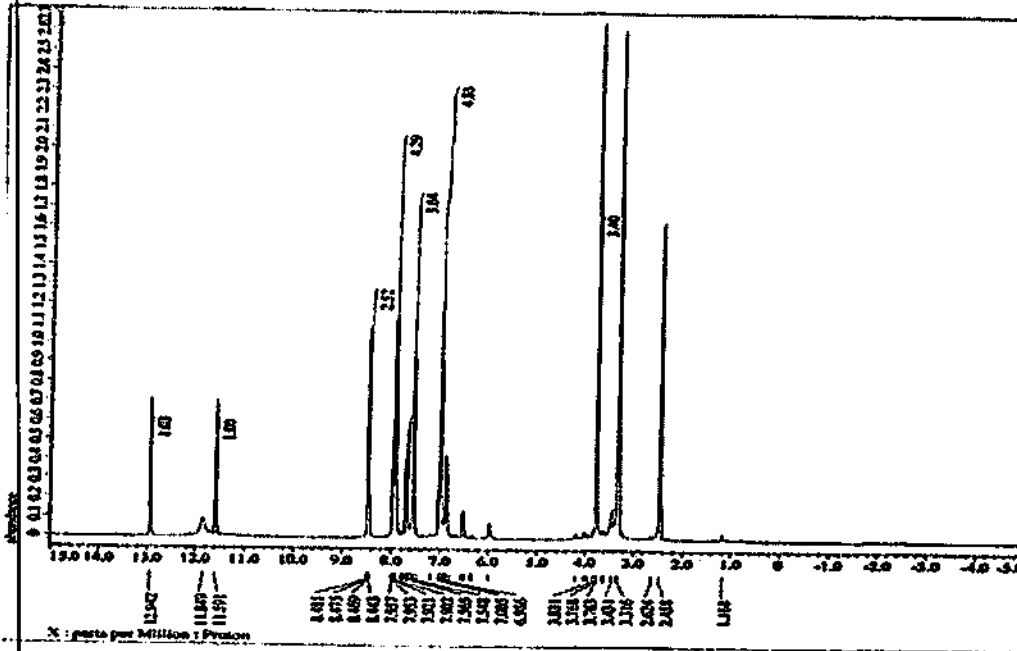
Gambar L.5.1. Spektrum UV J-12 dengan pelarut etanol

b. Spektrum IR Senyawa J-12



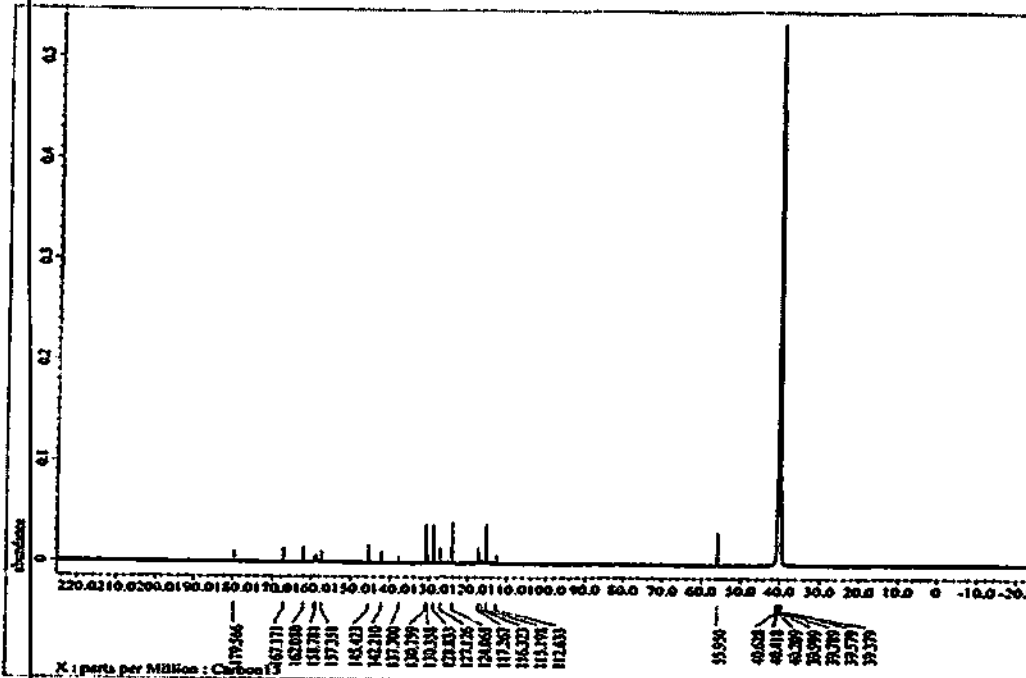
Gambar L.5.2. Spektrum IR J-12 dalam pellet KBr

c. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa J-12



Gambar L.5.3. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; DMSO-d₆; TMS) senyawa J-12.

d. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa J-12



Gambar L.5.4. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz; DMSO-d₆; TMS) senyawa J-12.

Lampiran 6 UJI STATISTIK CAM

Descriptive Statistics

Dependent Variable: pembuluhdarah

kelompok	Mean	Std. Deviation	N
bfgf	109,33	6,384	9
cate60	26,22	6,760	9
epms30	45,44	7,683	9
epms60	40,22	5,403	9
epms90	38,00	5,172	9
J-1.30	42,78	8,318	9
J-1.60	31,22	4,711	9
J-1.90	39,89	6,791	9
J-11.30	36,78	8,497	9
J-11.60	30,44	6,425	9
J-11.90	33,11	6,547	9
J-12.30	41,11	6,051	9
J-12.60	29,78	5,869	9
J-12.90	31,11	3,060	9
Total	41,10	20,687	126

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: pembuluhdarah

F	df1	df2	Sig.
1,050	13	112	,410

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + kelompok

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: pembuluhdarah

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	48890,325 ^a	13	3760,794	91,461	,000
Intercept	212873,341	1	212873,341	5177,001	,000
kelompok	48890,325	13	3760,794	91,461	,000
Error	4605,333	112	41,119		
Total	266369,000	126			
Corrected Total	53495,659	125			

a. R Squared = ,914 (Adjusted R Squared = ,904)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: pembuluhdarah

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
bfgf	cele60	83,111 [*]	3,023	,000	77,122	89,100
	epms30	63,889 [*]	3,023	,000	57,900	69,878
	epms60	69,111 [*]	3,023	,000	63,122	75,100
	epms90	71,333 [*]	3,023	,000	65,344	77,323
	J-1.30	66,556 [*]	3,023	,000	60,566	72,545
	J-1.60	78,111 [*]	3,023	,000	72,122	84,100
	J-1.90	69,444 [*]	3,023	,000	63,455	75,434
	J-11.30	72,556 [*]	3,023	,000	66,566	78,545
	J-11.60	78,889 [*]	3,023	,000	72,900	84,878
	J-11.90	76,222 [*]	3,023	,000	70,233	82,212
	J-12.30	68,222 [*]	3,023	,000	62,233	74,212
	J-12.60	79,556 [*]	3,023	,000	73,566	85,545
	J-12.90	78,222 [*]	3,023	,000	72,233	84,212
cele60	bfgf	-83,111 [*]	3,023	,000	-89,100	-77,122
	epms30	-19,222 [*]	3,023	,000	-25,212	-13,233
	epms60	-14,000 [*]	3,023	,003	-19,989	-8,011
	epms90	-11,778 [*]	3,023	,000	-17,767	-5,788
	J-1.30	-16,556 [*]	3,023	,000	-22,545	-10,566
	J-1.60	-5,000	3,023	,101	-10,989	,989
	J-1.90	-13,667 [*]	3,023	,000	-19,656	-7,677
	J-11.30	-10,556 [*]	3,023	,001	-16,545	-4,566
	J-11.60	-4,222	3,023	,165	-10,212	1,767
	J-11.90	-6,889 [*]	3,023	,025	-12,878	-,900

	J-12.30	-14,889	3,023	,000	-20,878	-8,900
	J-12.60	-3,556	3,023	,242	-9,545	2,434
	J-12.90	-4,889	3,023	,109	-10,878	1,100
	bfgf	-63,889	3,023	,000	-69,878	-57,900
	cele60	19,222	3,023	,000	13,233	25,212
	epms60	5,222	3,023	,087	-,767	11,212
	epms90	7,444	3,023	,015	1,455	13,434
epms30	J-1.30	2,667	3,023	,380	-3,323	8,656
	J-1.60	14,222	3,023	,000	8,233	20,212
	J-1.90	5,556	3,023	,069	-,434	11,545
	J-11.30	8,667	3,023	,005	2,677	14,656
	J-11.60	15,000	3,023	,000	9,011	20,989
	J-11.90	12,333	3,023	,000	6,344	18,323
	J-12.30	4,333	3,023	,154	-1,656	10,323
	J-12.60	15,667	3,023	,000	9,677	21,656
	J-12.90	14,333	3,023	,000	8,344	20,323
	bfgf	-69,111	3,023	,000	-75,100	-63,122
	cele60	14,000	3,023	,000	8,011	19,989
	epms30	-5,222	3,023	,087	-11,212	,767
epms60	epms90	2,222	3,023	,464	-3,767	8,212
	J-1.30	-2,556	3,023	,400	-8,545	3,434
	J-1.60	9,000	3,023	,004	3,011	14,989
	J-1.90	,333	3,023	,912	-5,656	6,323
	J-11.30	3,444	3,023	,257	-2,545	9,434
	J-11.60	9,778	3,023	,002	3,788	15,767
	J-11.90	7,111	3,023	,020	1,122	13,100
	J-12.30	-,889	3,023	,769	-6,878	5,100
	J-12.60	10,444	3,023	,001	4,455	16,434
	J-12.90	9,111	3,023	,003	3,122	15,100
	bfgf	-71,333	3,023	,000	-77,323	-65,344
	cele60	11,778	3,023	,000	5,788	17,767
epms90	epms30	-7,444	3,023	,015	-13,434	-1,455
	epms60	-2,222	3,023	,464	-8,212	3,767
	J-1.30	-4,778	3,023	,117	-10,767	1,212
	J-1.60	6,778	3,023	,027	,788	12,767
	J-1.90	-1,889	3,023	,533	-7,878	4,100
	J-11.30	1,222	3,023	,687	-4,767	7,212
	J-11.60	7,556	3,023	,014	1,566	13,545
	J-11.90	4,889	3,023	,109	-1,100	10,878
	J-12.30	-3,111	3,023	,306	-9,100	2,878
	J-12.60	8,222	3,023	,008	2,233	14,212
	J-12.90	6,889	3,023	,025	,900	12,878
	J-1.30	bfgf	-66,556	3,023	,000	-72,545

	cele60	16,556 [*]	3,023	,000	10,566	22,545
	epms30	-2,667	3,023	,380	-8,656	3,323
	epms60	2,556	3,023	,400	-3,434	8,545
	epms90	4,778	3,023	,117	-1,212	10,767
	J-1.60	11,556 [*]	3,023	,000	5,566	17,545
	J-1.90	2,889	3,023	,341	-3,100	8,878
	J-11.30	6,000 [*]	3,023	,050	,011	11,989
	J-11.60	12,333 [*]	3,023	,000	6,344	18,323
	J-11.90	9,667 [*]	3,023	,002	3,677	15,656
	J-12.30	1,667	3,023	,582	-4,323	7,656
	J-12.60	13,000 [*]	3,023	,000	7,011	18,989
	J-12.90	11,667 [*]	3,023	,000	5,677	17,656
	bfgf	-78,111 [*]	3,023	,000	-84,100	-72,122
	cele60	5,000	3,023	,101	-,989	10,989
	epms30	-14,222 [*]	3,023	,000	-20,212	-8,233
	epms60	-9,000 [*]	3,023	,004	-14,989	-3,011
	epms90	-6,778 [*]	3,023	,027	-12,767	-,788
J-1.60	J-1.30	-11,556 [*]	3,023	,000	-17,545	-5,566
	J-1.90	-8,667 [*]	3,023	,005	-14,656	-2,677
	J-11.30	-5,556	3,023	,069	-11,545	,434
	J-11.60	,778	3,023	,797	-5,212	6,767
	J-11.90	-1,889	3,023	,533	-7,878	4,100
	J-12.30	-9,889 [*]	3,023	,001	-15,878	-3,900
	J-12.60	1,444	3,023	,634	-4,545	7,434
	J-12.90	,111	3,023	,971	-5,878	6,100
	bfgf	-69,444 [*]	3,023	,000	-75,434	-63,455
	cele60	13,667 [*]	3,023	,000	7,677	19,656
	epms30	-5,556	3,023	,069	-11,545	,434
	epms60	-,333	3,023	,912	-6,323	5,656
	epms90	1,889	3,023	,533	-4,100	7,878
J-1.90	J-1.30	-2,889	3,023	,341	-8,878	3,100
	J-1.60	8,667 [*]	3,023	,005	2,677	14,656
	J-11.30	3,111	3,023	,306	-2,878	9,100
	J-11.60	9,444 [*]	3,023	,002	3,455	15,434
	J-11.90	6,778 [*]	3,023	,027	,788	12,767
	J-12.30	-1,222	3,023	,687	-7,212	4,767
	J-12.60	10,111 [*]	3,023	,001	4,122	16,100
	J-12.90	8,778 [*]	3,023	,004	2,788	14,767
	bfgf	-72,556 [*]	3,023	,000	-78,545	-66,566
J-11.30	cele60	10,556 [*]	3,023	,001	4,566	16,545
	epms30	-8,667 [*]	3,023	,005	-14,656	-2,677
	epms60	-3,444	3,023	,257	-9,434	2,545
	epms90	-1,222	3,023	,687	-7,212	4,767

	J-1.30	-6,000	3,023	,050	-11,989	-,011
	J-1.60	5,556	3,023	,069	-,434	11,545
	J-1.90	-3,111	3,023	,306	-9,100	2,878
	J-11.60	6,333	3,023	,038	,344	12,323
	J-11.90	3,667	3,023	,228	-2,323	9,656
	J-12.30	-4,333	3,023	,154	-10,323	1,656
	J-12.60	7,000	3,023	,022	1,011	12,989
	J-12.90	5,667	3,023	,063	-,323	11,656
	bfgf	-78,889	3,023	,000	-84,878	-72,900
	cele60	4,222	3,023	,165	-1,767	10,212
	epms30	-15,000	3,023	,000	-20,989	-9,011
	epms60	-9,778	3,023	,002	-15,767	-3,788
	epms90	-7,556	3,023	,014	-13,545	-1,566
J-11.60	J-1.30	-12,333	3,023	,000	-18,323	-6,344
	J-1.60	-,778	3,023	,797	-6,767	5,212
	J-1.90	-9,444	3,023	,002	-15,434	-3,455
	J-11.30	-6,333	3,023	,038	-12,323	-,344
	J-11.90	-2,667	3,023	,380	-8,656	3,323
	J-12.30	-10,667	3,023	,001	-16,656	-4,677
	J-12.60	,667	3,023	,826	-5,323	6,656
	J-12.90	-,667	3,023	,826	-6,656	5,323
	bfgf	-76,222	3,023	,000	-82,212	-70,233
	cele60	6,889	3,023	,025	,900	12,878
	epms30	-12,333	3,023	,000	-18,323	-6,344
	epms60	-7,111	3,023	,020	-13,100	-1,122
epms90	-4,889	3,023	,109	-10,878	1,100	
J-11.90	J-1.30	-9,667	3,023	,002	-15,656	-3,677
	J-1.60	1,889	3,023	,533	-4,100	7,878
	J-1.90	-6,778	3,023	,027	-12,767	-,788
	J-11.30	-3,667	3,023	,228	-9,656	2,323
	J-11.60	2,667	3,023	,380	-3,323	8,656
	J-12.30	-8,000	3,023	,009	-13,989	-2,011
	J-12.60	3,333	3,023	,273	-2,656	9,323
	J-12.90	2,000	3,023	,510	-3,989	7,989
	bfgf	-68,222	3,023	,000	-74,212	-62,233
	cele60	14,889	3,023	,000	8,900	20,878
	epms30	-4,333	3,023	,154	-10,323	1,656
	epms60	,889	3,023	,769	-5,100	6,878
J-12.30	epms90	3,111	3,023	,306	-2,878	9,100
	J-1.30	-1,667	3,023	,582	-7,656	4,323
	J-1.60	9,889	3,023	,001	3,900	15,878
	J-1.90	1,222	3,023	,687	-4,767	7,212
	J-11.30	4,333	3,023	,154	-1,656	10,323

	J-11.60	10,667 [*]	3,023	,001	4,677	16,656
	J-11.90	8,000 [*]	3,023	,009	2,011	13,989
	J-12.60	11,333 [*]	3,023	,000	5,344	17,323
	J-12.90	10,000 [*]	3,023	,001	4,011	15,989
	bfgf	-79,556 [*]	3,023	,000	-85,545	-73,566
	cele60	3,556	3,023	,242	-2,434	9,545
	epms30	-15,667 [*]	3,023	,000	-21,656	-9,677
	epms60	-10,444 [*]	3,023	,001	-16,434	-4,455
	epms90	-8,222 [*]	3,023	,008	-14,212	-2,233
J-12.60	J-1.30	-13,000 [*]	3,023	,000	-18,989	-7,011
	J-1.60	-1,444	3,023	,634	-7,434	4,545
	J-1.90	-10,111 [*]	3,023	,001	-16,100	-4,122
	J-11.30	-7,000 [*]	3,023	,022	-12,989	-1,011
	J-11.60	-,667	3,023	,826	-6,656	5,323
	J-11.90	-3,333	3,023	,273	-9,323	2,656
	J-12.30	-11,333 [*]	3,023	,000	-17,323	-5,344
	J-12.90	-1,333	3,023	,660	-7,323	4,656
	bfgf	-78,222 [*]	3,023	,000	-84,212	-72,233
	cele60	4,889	3,023	,109	-1,100	10,878
	epms30	-14,333 [*]	3,023	,000	-20,323	-8,344
	epms60	-9,111 [*]	3,023	,003	-15,100	-3,122
epms90	-6,889 [*]	3,023	,025	-12,878	-,900	
J-12.90	J-1.30	-11,667 [*]	3,023	,000	-17,656	-5,677
	J-1.60	-,111	3,023	,971	-6,100	5,878
	J-1.90	-8,778 [*]	3,023	,004	-14,767	-2,788
	J-11.30	-5,667	3,023	,063	-11,656	,323
	J-11.60	,667	3,023	,826	-5,323	6,656
	J-11.90	-2,000	3,023	,510	-7,989	3,989
	J-12.30	-10,000 [*]	3,023	,001	-15,989	-4,011
	J-12.60	1,333	3,023	,660	-4,656	7,323

Based on estimated marginal means

^{*}. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Univariate Tests

Dependent Variable: pembuluhdarah

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	48890,325	13	3760,794	91,461	,000
Error	4605,333	112	41,119		

The F tests the effect of kelompok. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: pembuluhdarah

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	bfgf	cele60	83,11 [*]	3,023	,000	77,12	89,10
		epms30	63,89 [*]	3,023	,000	57,90	69,88
		epms60	69,11 [*]	3,023	,000	63,12	75,10
		epms90	71,33 [*]	3,023	,000	65,34	77,32
		J-1.30	66,56 [*]	3,023	,000	60,57	72,54
		J-1.60	78,11 [*]	3,023	,000	72,12	84,10
		J-1.90	69,44 [*]	3,023	,000	63,46	75,43
		J-11.30	72,56 [*]	3,023	,000	66,57	78,54
		J-11.60	78,89 [*]	3,023	,000	72,90	84,88
		J-11.90	76,22 [*]	3,023	,000	70,23	82,21
		J-12.30	68,22 [*]	3,023	,000	62,23	74,21
		J-12.60	79,56 [*]	3,023	,000	73,57	85,54
		J-12.90	78,22 [*]	3,023	,000	72,23	84,21
LSD	cele60	bfgf	-83,11 [*]	3,023	,000	-89,10	-77,12
		epms30	-19,22 [*]	3,023	,000	-25,21	-13,23
		epms60	-14,00 [*]	3,023	,000	-19,99	-8,01
		epms90	-11,78 [*]	3,023	,000	-17,77	-5,79
		J-1.30	-16,56 [*]	3,023	,000	-22,54	-10,57
		J-1.60	-5,00	3,023	,101	-10,99	,99
		J-1.90	-13,67 [*]	3,023	,000	-19,66	-7,68
		J-11.30	-10,56 [*]	3,023	,001	-16,54	-4,57
		J-11.60	-4,22	3,023	,165	-10,21	1,77
		J-11.90	-6,89 [*]	3,023	,025	-12,88	-,90
		J-12.30	-14,89 [*]	3,023	,000	-20,88	-8,90

	J-12.60	-3,56	3,023	,242	-9,54	2,43
	J-12.90	-4,89	3,023	,109	-10,88	1,10
	bfgf	-63,89	3,023	,000	-69,88	-57,90
	cele60	19,22	3,023	,000	13,23	25,21
	epms60	5,22	3,023	,087	-,77	11,21
	epms90	7,44	3,023	,015	1,46	13,43
	J-1.30	2,67	3,023	,380	-3,32	8,66
	J-1.60	14,22	3,023	,000	8,23	20,21
epms30	J-1.90	5,56	3,023	,069	-,43	11,54
	J-11.30	8,67	3,023	,005	2,68	14,66
	J-11.60	15,00	3,023	,000	9,01	20,99
	J-11.90	12,33	3,023	,000	6,34	18,32
	J-12.30	4,33	3,023	,154	-1,66	10,32
	J-12.60	15,67	3,023	,000	9,68	21,66
	J-12.90	14,33	3,023	,000	8,34	20,32
	bfgf	-69,11	3,023	,000	-75,10	-63,12
	cele60	14,00	3,023	,000	8,01	19,99
	epms30	-5,22	3,023	,087	-11,21	,77
	epms90	2,22	3,023	,464	-3,77	8,21
	J-1.30	-2,56	3,023	,400	-8,54	3,43
	J-1.60	9,00	3,023	,004	3,01	14,99
epms60	J-1.90	,33	3,023	,912	-5,66	6,32
	J-11.30	3,44	3,023	,257	-2,54	9,43
	J-11.60	9,78	3,023	,002	3,79	15,77
	J-11.90	7,11	3,023	,020	1,12	13,10
	J-12.30	-,89	3,023	,769	-6,88	5,10
	J-12.60	10,44	3,023	,001	4,46	16,43
	J-12.90	9,11	3,023	,003	3,12	15,10
	bfgf	-71,33	3,023	,000	-77,32	-65,34
	cele60	11,78	3,023	,000	5,79	17,77
	epms30	-7,44	3,023	,015	-13,43	-1,46
	epms60	-2,22	3,023	,464	-8,21	3,77
	J-1.30	-4,78	3,023	,117	-10,77	1,21
epms90	J-1.60	6,78	3,023	,027	,79	12,77
	J-1.90	-1,89	3,023	,533	-7,88	4,10
	J-11.30	1,22	3,023	,687	-4,77	7,21
	J-11.60	7,56	3,023	,014	1,57	13,54
	J-11.90	4,89	3,023	,109	-1,10	10,88

	J-12.30	-3,11	3,023	,306	-9,10	2,88
	J-12.60	8,22	3,023	,008	2,23	14,21
	J-12.90	6,89	3,023	,025	,90	12,88
	bfgf	-66,56	3,023	,000	-72,54	-60,57
	cele60	16,56	3,023	,000	10,57	22,54
	epms30	-2,67	3,023	,380	-8,66	3,32
	epms60	2,56	3,023	,400	-3,43	8,54
	epms90	4,78	3,023	,117	-1,21	10,77
	J-1.60	11,56	3,023	,000	5,57	17,54
J-1.30	J-1.90	2,89	3,023	,341	-3,10	8,88
	J-11.30	6,00	3,023	,050	,01	11,99
	J-11.60	12,33	3,023	,000	6,34	18,32
	J-11.90	9,67	3,023	,002	3,68	15,66
	J-12.30	1,67	3,023	,582	-4,32	7,66
	J-12.60	13,00	3,023	,000	7,01	18,99
	J-12.90	11,67	3,023	,000	5,68	17,66
	bfgf	-78,11	3,023	,000	-84,10	-72,12
	cele60	5,00	3,023	,101	-,99	10,99
	epms30	-14,22	3,023	,000	-20,21	-8,23
	epms60	-9,00	3,023	,004	-14,99	-3,01
	epms90	-6,78	3,023	,027	-12,77	-,79
	J-1.30	-11,56	3,023	,000	-17,54	-5,57
J-1.60	J-1.90	-8,67	3,023	,005	-14,66	-2,68
	J-11.30	-5,56	3,023	,069	-11,54	,43
	J-11.60	,78	3,023	,797	-5,21	6,77
	J-11.90	-1,89	3,023	,533	-7,88	4,10
	J-12.30	-9,89	3,023	,001	-15,88	-3,90
	J-12.60	1,44	3,023	,634	-4,54	7,43
	J-12.90	,11	3,023	,971	-5,88	6,10
	bfgf	-69,44	3,023	,000	-75,43	-63,46
	cele60	13,67	3,023	,000	7,68	19,66
	epms30	-5,56	3,023	,069	-11,54	,43
	epms60	-,33	3,023	,912	-6,32	5,66
J-1.90	epms90	1,89	3,023	,533	-4,10	7,88
	J-1.30	-2,89	3,023	,341	-8,88	3,10
	J-1.60	8,67	3,023	,005	2,68	14,66
	J-11.30	3,11	3,023	,306	-2,88	9,10
	J-11.60	9,44	3,023	,002	3,46	15,43

	J-11.90	6,78	3,023	,027	,79	12,77
	J-12.30	-1,22	3,023	,687	-7,21	4,77
	J-12.60	10,11	3,023	,001	4,12	16,10
	J-12.90	8,78	3,023	,004	2,79	14,77
	bfgf	-72,56	3,023	,000	-78,54	-66,57
	cele60	10,56	3,023	,001	4,57	16,54
	epms30	-8,67	3,023	,005	-14,66	-2,68
	epms60	-3,44	3,023	,257	-9,43	2,54
	epms90	-1,22	3,023	,687	-7,21	4,77
J-11.30	J-1.30	-6,00	3,023	,050	-11,99	-,01
	J-1.60	5,56	3,023	,069	-,43	11,54
	J-1.90	-3,11	3,023	,306	-9,10	2,88
	J-11.60	6,33	3,023	,038	,34	12,32
	J-11.90	3,67	3,023	,228	-2,32	9,66
	J-12.30	-4,33	3,023	,154	-10,32	1,66
	J-12.60	7,00	3,023	,022	1,01	12,99
	J-12.90	5,67	3,023	,063	-,32	11,66
	bfgf	-78,89	3,023	,000	-84,88	-72,90
	cele60	4,22	3,023	,165	-1,77	10,21
J-11.60	epms30	-15,00	3,023	,000	-20,99	-9,01
	epms60	-9,78	3,023	,002	-15,77	-3,79
	epms90	-7,56	3,023	,014	-13,54	-1,57
	J-1.30	-12,33	3,023	,000	-18,32	-6,34
	J-1.60	-,78	3,023	,797	-6,77	5,21
	J-1.90	-9,44	3,023	,002	-15,43	-3,46
	J-11.30	-6,33	3,023	,038	-12,32	-,34
	J-11.90	-2,67	3,023	,380	-8,66	3,32
	J-12.30	-10,67	3,023	,001	-16,66	-4,68
	J-12.60	,67	3,023	,826	-5,32	6,66
J-11.90	J-12.90	-,67	3,023	,826	-6,66	5,32
	bfgf	-76,22	3,023	,000	-82,21	-70,23
	cele60	6,89	3,023	,025	,90	12,88
	epms30	-12,33	3,023	,000	-18,32	-6,34
	epms60	-7,11	3,023	,020	-13,10	-1,12
	epms90	-4,89	3,023	,109	-10,88	1,10
	J-1.30	-9,67	3,023	,002	-15,66	-3,68
	J-1.60	1,89	3,023	,533	-4,10	7,88
	J-1.90	-6,78	3,023	,027	-12,77	-,79

	J-11.30	-3,67	3,023	,228	-9,66	2,32
	J-11.60	2,67	3,023	,380	-3,32	8,66
	J-12.30	-8,00	3,023	,009	-13,99	-2,01
	J-12.60	3,33	3,023	,273	-2,66	9,32
	J-12.90	2,00	3,023	,510	-3,99	7,99
	bfgf	-68,22	3,023	,000	-74,21	-62,23
	cele60	14,89	3,023	,000	8,90	20,88
	epms30	-4,33	3,023	,154	-10,32	1,66
	epms60	,89	3,023	,769	-5,10	6,88
	epms90	3,11	3,023	,306	-2,88	9,10
	J-1.30	-1,67	3,023	,582	-7,66	4,32
J-12.30	J-1.60	9,89	3,023	,001	3,90	15,88
	J-1.90	1,22	3,023	,687	-4,77	7,21
	J-11.30	4,33	3,023	,154	-1,66	10,32
	J-11.60	10,67	3,023	,001	4,68	16,66
	J-11.90	8,00	3,023	,009	2,01	13,99
	J-12.60	11,33	3,023	,000	5,34	17,32
	J-12.90	10,00	3,023	,001	4,01	15,99
	bfgf	-79,56	3,023	,000	-85,54	-73,57
	cele60	3,56	3,023	,242	-2,43	9,54
	epms30	-15,67	3,023	,000	-21,66	-9,68
	epms60	-10,44	3,023	,001	-16,43	-4,46
	epms90	-8,22	3,023	,008	-14,21	-2,23
	J-1.30	-13,00	3,023	,000	-18,99	-7,01
J-12.60	J-1.60	-1,44	3,023	,634	-7,43	4,54
	J-1.90	-10,11	3,023	,001	-16,10	-4,12
	J-11.30	-7,00	3,023	,022	-12,99	-1,01
	J-11.60	-,67	3,023	,826	-6,66	5,32
	J-11.90	-3,33	3,023	,273	-9,32	2,66
	J-12.30	-11,33	3,023	,000	-17,32	-5,34
	J-12.90	-1,33	3,023	,660	-7,32	4,66
	bfgf	-78,22	3,023	,000	-84,21	-72,23
	cele60	4,89	3,023	,109	-1,10	10,88
	epms30	-14,33	3,023	,000	-20,32	-8,34
J-12.90	epms60	-9,11	3,023	,003	-15,10	-3,12
	epms90	-6,89	3,023	,025	-12,88	-,90
	J-1.30	-11,67	3,023	,000	-17,66	-5,68
	J-1.60	-,11	3,023	,971	-6,10	5,88

J-1.90	-8,78 [*]	3,023	,004	-14,77	-2,79
J-11.30	-5,67	3,023	,063	-11,66	,32
J-11.60	,67	3,023	,826	-5,32	6,66
J-11.90	-2,00	3,023	,510	-7,99	3,99
J-12.30	-10,00 [*]	3,023	,001	-15,99	-4,01
J-12.60	1,33	3,023	,660	-4,66	7,32

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 41,119.

. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

		pembuluhdarah							
	kelompok	N	Subset						
			1	2	3	4	5	6	7
Duncan ^{ab}	cele60	9	26,22						
	J-12.60	9	29,78	29,78					
	J-11.60	9	30,44	30,44	30,44				
	J-12.90	9	31,11	31,11	31,11				
	J-1.60	9	31,22	31,22	31,22				
	J-11.90	9		33,11	33,11	33,11			
	J-11.30	9			36,78	36,78	36,78		
	epms90	9				38,00	38,00		
	J-1.90	9					39,89	39,89	
	epms60	9					40,22	40,22	
	J-12.30	9					41,11	41,11	
	J-1.30	9					42,78	42,78	
	epms30	9						45,44	
	bfgf	9							109,33
		Sig.		,145	,335	,063	,130	,085	,105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 41,119.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000.

b. Alpha = ,05.

Lampiran 7

CURRICULUM VITAE

A. IDENTITAS DIRI

1.1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Juni Ekowati, Apt., MSi.
1.2	Jabatan Fungsional	Pembina
1.3	Jabatan Struktural	-
1.4	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	196706021992032002
1.5	NIDN	0006026703
1.6	Tempat dan Tanggal Lahir	Bojonegoro, 2 Juni 1967
1.7	Alamat Rumah	Jl. Supiyandi 11 Surabaya 60121
1.8	Nomor Telepon/Faks.	(031)3810302
1.9	Nomor HP	081554116600
1.10	Alamat Kantor	Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286
1.11	Nomor Telepon/Faks	(031)5033710
1.12	Alamat e-mail	j_ekowati@yahoo.com
1.13.	Lulusan yang telah dihasilkan	S1 = 30 orang S2 = 0 S3 = 0
Mata Kuliah yg diampu		1. Kimia Organik I 2. Kimia Organik II 3. Kimia Sintesis 4. Kimia Dasar

B. RIWAYAT PENDIDIKAN

2.1 Program:	S-1	S-2	S-3
2.2 Nama PT	Universitas Airlangga	Universitas Airlangga	Universitas Airlangga
2.3 Bidang Ilmu	Farmasi	Farmasi	MIPA
2.4 Tahun Masuk	1985	1994	2008
2.5. Tahun Lulus	1990	1997	2012
2.6 Judul Skripsi/ Tesis/Disertasi	Penerapan Metode Kromatografi Cair dengan Penurunan Tekanan pada Pemisahan Asam Asetil Salisilat dari Campurannya dengan Asam Salisilat	Sintesis Bahan Penukar Kation dari \square -selulosa jerami padi	Sintesis Derivat <i>p</i> -metoksisinamoiltioureia dari Etil <i>p</i> -metoksisinamat Isolat <i>Kaempferia galanga</i> dalam Usaha Meningkatkan Aktivitas Kemopreventif Kanker : Penghambat COX-2.
2.7. Nama Pembimbing/ Promotor	1. Prof. Dr. G.N. Astika, Apt. 2. Drs. Heru Wibowo, MS., Apt.	1. Prof. Dr. G.N. Astika, Apt. 2. Prof. Dr. Amiruddin Prawita, Apt.	1. Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS., Apt. 2. Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt. 3. Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt.

I IDENTITAS DIRI

1.1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., MSi.
1.2	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
1.3	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	196807131993031009
1.4	NIDN	00-1307-6801
1.5	Tempat dan Tanggal Lahir	Makasar, 13 Juli 1968
1.6	Alamat Rumah	Jl. Ahmad Yani 68-70 Pusvetma no.31 Surabaya
1.7	Nomor Telepon/Faks	(031) 8284849
1.8	Nomor HP	08123534485
1.9	Alamat Kantor	Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo Kampus C Unair 60115
1.10	Nomor Telepon/Faks	(031)5992785
1.11	Alamat e-mail	Kelana dawley68@yahoo.com
1.12	Lulusan yang dihasilkan	S1=40 orang, S2=2 orang, S3=0
1.13	Mata Kuliah yg diampu	2.Farmakologi 2.Farmakoterapi dan Toksikologi 3.Metodologi Penelitian Terpadu I 4.Dasar-dasar Farmakologi

II RIWAYAT PENDIDIKAN

2.1 Program:	S-1	S-2	S-3
2.2 Nama PT	Universitas Airlangga	Universitas Airlangga	Universitas Airlangga
2.3 Bidang Ilmu	Kedokteran Hewan	Imunologi	Sain Veteriner
2.4 Tahun Masuk	1986	1998	2005
2.5. Tahun Lulus	1991	2000	2010
2.6 Judul Skripsi/ Tesis/Disertasi	Gambaran Histologi sel Paneth dan Tunika muskularis Mukosa Usus Halus Ayam setelah diberi <i>Eichornia crassipess</i>	Karakterisasi Varian Antigenik Trypanosoma evansi yang diisolasi dari Mencit Fase Akut dan Fase Kronik	Efek Ekstrak <i>Gynura procumbens</i> pada Karsinogenesis Kelenjar Mamae Tikus yang Diinduksi Dimethylbenz(a)antrasen : Kajian Enzimatik dan Genetik
2.7. Nama Pembimbing/ Promotor	1.Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS. 2.Chairul Anwar, drh., MS.	3. Prof. Dr. Yoes Priyatna D. dr. MSc. 4. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.	1.Prof. Dr. Sugiyanto, MSc., Apt. 2.Prof. Edy Meiyanto, PhD., Apt. 3. Dr. Sitarina Widyarini, drh., MP..

A. IDENTITAS DIRI

1.1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Prof. Dr. Tutuk Budiati, Apt., MS. L/P
1.2	Jabatan Fungsional	Guru Besar
1.3	NIP/NIK/No. Identitas lainnya	194801261976032001
1.4	NIDN	00260148002
1.5	Tempat dan Tanggal Lahir	Malang, 26 Januari 1948
1.6	Alamat Rumah	Jl. Mulyosari Utara IX/5 Surabaya
1.7	Nomor Telepon/Faks	031-5921480
1.8	Nomor HP	08123001180
1.9	Alamat Kantor	Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286
1.10	Nomor Telepon/Faks	031-5033710 / 031-5020514
1.11	Alamat e-mail	tutukbudiati@yahoo.com
1.12	Lulusan yang dihasilkan	S1= 100 Orang, S2 = - orang, S3 = 2 orang
1.13.	Mata Kuliah yg diampu	1.Kimia Organik I 2.Kimia Organik II 3.Kimia Organik Fisik 4.Sintesis Organik 5.Spektroskopi