

BIDANG KESEHATAN

**Laporan  
Hasil Penelitian Hibah Bersaing  
Tahun Anggaran 2011**



**Molekular Docking Eksperimental Dan Uji Aktivitas Hambatan Ekspresi  
COX-2 Pada Kanker Payudara Dari Derivat Etil *p*-metoksisinamat Hasil  
Isolasi *Kaempferia galanga* Linn.**

**Nama Peneliti :**

**Dra. Juni Ekowati, MSi., Apt.  
Dr. Imam Susilo, dr., Sp. PA (K)  
Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt.  
Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS., Apt.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor  
Tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian Kepada Masyarakat Mono  
Tahun dan Pengabdian Kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga  
Tahun Anggaran 2011 Nomor : 844/H3/KR/2011, Tanggal 20 April 2011**

**Universitas Airlangga  
2011**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Molekular Docking Eksperimental Dan Uji Aktivitas Hambatan Ekspresi COX-2 Pada Kanker Payudara Dari Derivat Etil *p*-metoksisinamat Hasil Isolasi *Kaempferia galanga* Linn.
  
2. Ketua Peneliti
  - a. Nama Lengkap : Dra. Juni Ekowati, Apt., MSi
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 196706021992032002
  - d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala/ Gol. IVa
  - e. Jabatan Struktural : -
  - f. Bidang Keahlian : Kimia Organik
  - g. Fakultas / Jurusan / Puslit : Fakultas Farmasi/Kimia Farmasi
  - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

### Tim Peneliti

No	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS, Apt	Kimia Organik	Fak. Farmasi / Kimia Farmasi	Universitas Airlangga
2.	Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt	Biologi molekuler / anti kanker	Fak. Farmasi / Farmakognosi Bahan Alam	Universitas Airlangga
3	Dr. dr. Imam Susilo, Sp. PA	Patologi Molekuler	Fak. Kedokteran / Patologi Anatomi	Universitas Airlangga

### 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp. 99.709.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun I : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, 19 Oktober '11  
Ketua Peneliti,

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

Mengetahui  
Dekan / Pusat Penelitian,

Dr. Hj. Umi Athijah, MS., Apt.  
NIP. 195604071981032001

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

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

**I. Identitas Penelitian**

1. Judul Usulan : Molekular Docking Eksperimental Dan Uji Aktivitas Hambatan Ekspresi COX-2 Pada Kanker Payudara Dari Derivat Etil *p*-metoksisinamat Hasil Isolasi *Kaempferia galanga* Linn.
2. Ketua Peneliti
- a). Nama Lengkap : Dra. Juni Ekowati, Msi
- b). Bidang Keahlian : Kimia Organik
- c). Jabatan Struktural -
- d). Jabatan Fungsional : Lektor Kepala / Pembina/ Gol. IVa
- e). Unit Kerja : Departemen Kimia Farmasi FFUA
- f). Alamat Surat : Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga  
Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286
- g). Telp/Fax : Telp.(031)5033710; Fax. (031)5020514
- h). E-mail : j\_ekowati@yahoo.com

**3. Anggota Peneliti****Tim Peneliti**

No	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS, Apt	Kimia Organik	Fak.Farmasi / Kimia Farmasi	Universitas Airlangga
2.	Prof. Dr. Sukardiman, MS., Apt	Biologi molekuler	Fak.Farmasi /Farmakognosi Bahan Alam	Universitas Airlangga
3	Dr. dr. Imam Susilo, Sp. PA	Patologi Molekuler	Fak. Kedokteran / Patologi Anatomi	Universitas Airlangga

**4. Objek penelitian :**

- Etil *p*-metoksisinamat sebagai material awal sintesis derivat *p*-metoksisinamoil tiourea
- sel kanker MCF-7

**Segi / Aspek penelitian :**

Penelitian ini merupakan penelitian yang berkesinambungan, yang meliputi :

- a. Isolasi Etil *p*-metoksisinamat dari rimpang *Kaempferia galanga* Linn.
- b. Sintesis Derivat *p*-metoksisinamoil Tiourea dengan material awal Etil *p*-metoksisinamat

- c. Uji kemurnian senyawa-senyawa hasil sintesis
- d. Identifikasi struktur senyawa-senyawa hasil sintesis
- e. Uji aktivitas antikanker in vitro senyawa-senyawa hasil sintesis
- f. Uji aktivitas hambatan COX-2 senyawa-senyawa hasil sintesis pada sel kanker MCF-7 secara in vitro
- g. Analisis Hasil

#### 5. Masa Pelaksanaan Penelitian :

Masa pelaksanaan penelitian dimulai pada 20 April 2011 – 31 Oktober 2011 yang dibagi menjadi beberapa tahap sebagai berikut :

Tahap I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolasi etil <i>p</i>-metoksisinamat dari <i>Kaempferia galanga</i> Linn.</li> <li>- Docking Study</li> <li>- Sintesis derivat <i>p</i>-metoksisinamoil tiourea dari material awal etil <i>p</i>-metoksisinamat</li> <li>- Pemisahan dan Pemurnian Senyawa hasil sintesis</li> <li>- Uji kemurnian (metode kromatografi lapis tipis dan titik lebur)</li> <li>- Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis : UV, IR, HNMR</li> </ul>
Tahap II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uji sitotoksik pada sel MCF7</li> <li>- Uji Antiproliferasi pada sel MCF7</li> <li>- Uji Hambatan COX-2 pada sel MCF7</li> <li>- Analisis Hasil</li> </ul>

#### 7. Lokasi penelitian :

- Laboratorium Sintesis Farmasi, Fakultas Farmasi Univ. Airlangga, Surabaya
- Laboratorium Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi Univ. Airlangga, Surabaya
- Laboratorium Dasar Bersama, Univ. Airlangga, Surabaya

#### 8. Hasil yang ditargetkan (Temuan baru/paket teknologi/hasil lain), beri penjelasan

- 8.1. Didapatkan beberapa senyawa baru dari derivat *p*-metoksisinamoil tiourea yang mempunyai aktivitas sebagai penghambat COX-2.
- 8.2. Didapatkan beberapa senyawa baru dari derivat *p*-metoksisinamoil tiourea yang mempunyai aktivitas sebagai kemopreventif kanker yang mempunyai efek samping minimal berdasarkan *mechanism-based therapy*.
- 8.3. Menghasilkan publikasi ilmiah terkait dengan potensi dari derivat *p*-metoksisinamoil

tiourea dalam penghambat ekspresi COX-2 pada kanker payudara.

9. Instansi lain yang terlibat : Laboratorium Parasitologi, UGM

10. Keterangan lain yang dianggap perlu : -

## RINGKASAN

Proses penemuan senyawa obat baru membutuhkan biaya yang sangat mahal dan waktu yang relatif lama dapat dipersingkat waktunya dengan teknologi, *Computer Aided Drug Design* (CADD). Teknologi ini dapat digunakan untuk design senyawa baru secara *in silico* dan evaluasi potensi resiko keamanan obat. Pada penelitian ini akan digunakan pendekatan *Structure Base Design* dalam mensintesis derivat etil *p*-metoksisinamat (EPMS) hasil isolasi *Kaempferia galanga* sebagai penghambat pertumbuhan kanker payudara, melalui hambatan *cyclooxygenase-2* (COX-2).

Prediksi interaksi antara protein-ligan dikenal dengan istilah *docking*. Dari *docking* antara protein-ligan COX-2 yang dilaporkan oleh beberapa peneliti, diketahui adanya 4 poin farmakofor COX-2, yaitu satu akseptor ikatan hidrogen, satu gugus hidrofobik dan dua gugus aromatik. Oleh karena itu pada penelitian ini, EPMS akan dimodifikasi strukturnya sebagai senyawa penghambat COX-2, dengan menambahkan satu inti aromatis dan gugus hidrofobik.

Untuk menentukan modifikasi struktur, molekular *docking* eksperimental derivat EPMS akan dilakukan pada bentuk amida (yaitu dan tiourea menggunakan program Mollegro. Dari hasil modifikasi struktur EPMS itu selanjutnya diuji aktivitasnya sebagai penghambat COX-2 pada kanker payudara MCF-7.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui derivat EPMS (amida dan tiourea) yang memiliki interaksi paling baik terhadap enzim COX-2, mendapatkan derivat EPMS yang memiliki interaksi paling baik terhadap COX-2 dan membuktikan derivat EPMS yang memiliki interaksi terhadap enzim COX-2 dapat menghambat ekspresi COX-2 pada sel kanker payudara, MCF-7.

Manfaat penelitian ini adalah memperpendek jalur mendapatkan senyawa obat yang menghambat COX-2, sebagai penelitian pendahuluan untuk mendapatkan senyawa-senyawa penghambat pertumbuhan kanker payudara dan meningkatkan nilai tambah kencur sebagai material awal senyawa penghambat kanker payudara.

Metode penelitian yang dilakukan adalah modifikasi struktur EPMS berdasarkan molekular *docking* eksperimental terhadap enzim COX-2 dengan software Mollegro Virtual Docker. Tahapan sintesis adalah hidrolisis EPMS, pembentukan asil halida dan derivat *p*-metoksisinamoiltiourea. Struktur senyawa ditentukan secara spektroskopi UV, IR dan <sup>1</sup>HNMR. Uji aktivitas sitotoksik sel kanker payudara dengan MTT assay, ekspresi COX-2 dengan imunositokimia assay.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa derivat tiourea EPMS memiliki interaksi lebih baik daripada amidanya. Oleh karena itu modifikasi struktur EPMS diarahkan menjadi bentuk tioureanya.

Hasil pengujian sitotoksik dengan MTT assay, menunjukkan bahwa aktivitas hambatan pertumbuhan sel MCF-7 tertinggi dari sampel EPMS dan derivat tioureanya adalah pada konsentrasi 500 µg/ml. Oleh karena itu uji *doubling time* dilakukan pada konsentrasi tersebut, pada lama waktu 24, 48 dan 72 jam. Hasil uji *doubling time* menunjukkan aktivitas antiproliferasi dari sampel uji. Untuk mengetahui apakah aktivitas anti proliferasi tersebut melalui hambatan ekspresi COX-2 terhadap MCF-7. Hasil uji tersebut menunjukkan sel MCF-7 tidak mengekspresikan COX-2. Oleh karena itu, uji hambatan COX-2 dari sampel uji tidak dapat dibuktikan dengan sel MCF-7 karena pada sel tersebut tidak terdapat gen COX-2. Tetapi dari uji tersebut diketahui gambaran sel MCF-7 yang diberi perlakuan derivat tiourea dari EPMS mengalami piknosis dan

karyoreksis yang menandakan terjadinya kematian sel MCF-7 akibat perlakuan dengan senyawa uji.

Oleh karena itu disarankan melakukan penelitian aktivitas hambatan COX-2 pada sel kanker payudara yang lain, yaitu T47D dan melakukan uji aktivitas in vivo.

## SUMMARY

The process of discovery of new drug compounds which require very expensive cost and a relatively long time can be shortened by the technology Computer Aided Drug Design (CADD). This technology can be used to design new compounds *in silico* and evaluation of potential drug safety risks. This research will use the Base Structure Design approach in synthesizing derivatives of ethyl *p*-methoxycinnamate (EPMS) isolation form *Kaempferia galanga* as growth inhibitors of breast cancer, through barriers (COX-2).

Prediction of protein-ligand interactions known as docking. The protein-ligand docking between COX-2 were reported by several researchers, there are known four points pharmacofor of COX-2, ie one hydrogen bond acceptor, one hydrophobic group and two aromatic groups. Therefore in this study, EPMS will be modified that structure as COX-2 inhibitor, by adding an aromatic moiety and a hydrophobic group. To determine the structural modifications to be performed, molecular docking EPMS experimental derivatives will be done in the form of an amide (ie Mollegro and thiourea using the program. From the results of EPMS structural modifications were further tested its activity as an inhibitor of COX-2 in breast cancer MCF-7.

The purposes of this study were to determine EPMS derivatives ie. amides ((*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-phenylacrilamide, (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(4-methylphenyl)acrylamide, (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)acrylamide) and thiourea( (*E*)-*N*-(phenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methylphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methoxyphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrilamide which have the best interaction of the enzyme COX-2 and to prove the EPMS derivatives that have interactions of the enzyme COX-2 can inhibit the expression COX-2 in breast cancer cells, ie. MCF-7.

The benefits of this research is to shorten the path to get drug compounds that inhibit COX-2, as preliminary studies for compounds inhibiting the growth of breast cancer and increase the added value kencur inhibitory compounds as starting materials of breast cancer.

The synthesis method were conducted on the basis of molecular docking experimental of EPMS and its derivatives to an binding site of COX-2 with software Mollegro Virtual Docker. Stages of the synthesis were the hydrolysis of EPMS, the formation of acyl halides and *p*-methoxycinnamoylthiourea derivatives. The structure of compounds determined by UV, IR and <sup>1</sup>HNMR spectroscopy. Test the cytotoxic and antiproliferation activity of breast cancer cells by MTT assay and the inhibition the expression of COX-2 with immunocytochemistry assay.

The results show that thiourea derivatives of EPMS have better interaction than its amide. Therefore, structural modifications are directed to form its thiourea. The results of cytotoxic test with MTT assay, showed that the activity of cell growth inhibition of MCF-7 and the highest activity of the thiourea derivatives of EPMS is at concentration 500 µg / ml. Therefore doubling time trials conducted at these concentrations, the length of time 24, 48 and 72 hours. The test results showed activity antiproliferasi doubling time of the derivatives. To determine whether the anti-proliferative activity through the expression of COX-2 barriers against MCF-7. The test results showed MCF-7 cells do not express COX-2. Therefore, resistance testing COX-2 of the test sample can not be proven with MCF-7 cells because the cells are not found COX-2 gene. But the results showed that the MCF-7 cells treated thiourea derivatives of



EPMS have pyknocis and karyorekcis which indicate the occurrence of MCF-7 cell death due to treatment with test compound. It is therefore advisable to study the activity of COX-2 resistance in another breast cancer cells, namely T47D and to test the activity in vivo.

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian docking terhadap celecoxib, etil *p*-metoksisinamat (EPMS), 3 senyawa amida ((*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-fenilakrilamida, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenil)akrilamida, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenil)akrilamida) dan 3 senyawa tiourea ((*E*)-*N*-(fenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida) dengan program Mollegro. Dari uji tersebut diketahui bahwa senyawa tiourea mempunyai score lebih rendah daripada amida yang artinya, tiourea dapat berinteraksi dengan COX-2 lebih baik daripada amida. Berdasarkan analisis retrosintesis, diketahui jalur sintesis senyawa tiourea dari EPMS adalah reaksi adisi dan substitusi nukleofilik terhadap asil halidanya. Penentuan struktur hasil sintesis yang dilakukan dengan spektrometer IR dan <sup>1</sup>H-NMR menunjukkan hasil telah terbentuknya senyawa-senyawa tiourea dari EPMS.

Hasil pengujian sitotoksik dengan MTT assay, menunjukkan bahwa aktivitas hambatan pertumbuhan sel MCF-7 tertinggi dari sampel EPMS dan ((*E*)-*N*-(fenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida) adalah pada konsentrasi 500 µg/ml. Oleh karena itu uji doubling time dilakukan pada konsentrasi tersebut pada lama waktu 24, 48 dan 72 jam. Hasil uji doubling time menunjukkan aktivitas antiproliferasi dari sampel uji. Hasil uji immunositokimia terhadap COX-2 menunjukkan hasil sel MCF-7 tidak mengekspresikan COX-2. Oleh karena itu, uji hambatan COX-2 dari sampel uji tidak dapat dibuktikan dengan sel MCF-7 karena pada sel tersebut tidak terdapat gen COX-2. Tetapi dari uji tersebut diketahui sel MCF-7 yang diberi perlakuan derivat tiourea dari EPMS mengalami piknosis dan karyoreksis yang menggambarkan kemampuan derivat tiourea dari EPMS dapat menghambat sel MCF-7.

## ABSTRACT

Molecular docking studies on celecoxib, ethyl p-methoxycinnamate (EPMS), 3 amide compounds (i.e. (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-phenylacrylamide, (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(4-methylphenyl)acrylamide, (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)acrylamide) and 3 thiourea compounds (i.e. (*E*)-*N*-(phenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methylphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methoxyphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide) with Mollegro program have been performed. Of the test is known that thiourea compounds have lower scores than the mean amide, thiourea may interact with COX-2 is better than amides. Based on the analysis retrosynthesis, synthesis of thiourea compounds known synthesis pathway of EPMS is a nucleophilic substitution and addition reactions of acyl halidanya. Determination of the structure of the synthesis is done with an IR spectrometer and H-NMR shows the result has been the formation of thiourea compounds of EPMS.

The results of cytotoxic test with MTT assay, showed that the highest activity of (*E*)-*N*-(phenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methylphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide, (*E*)-*N*-(4-methoxyphenylcarbamothioyl)-3-(4-methoxyphenyl)acrylamide) on cell growth inhibition of MCF-7 was at a concentration 500 µg / ml. Therefore doubling time trials conducted at that concentration, for 24, 48 and 72 h. The test results showed activity antiproliferasi doubling time of all the test sample for 48 & 72 h. Immunositokimia test results on the COX-2 shows the results of MCF-7 cells do not express COX-2. Therefore, resistance testing COX-2 of the test sample can not be proven with MCF-7 cells because the cells are not found COX-2 gene. But the test showed karyorekcis and piknocis experience that on MCF-7 cells treated with thiourea derivatives of EPMS and that illustrates the ability of EPMS thiourea derivatives can inhibit MCF-7 cells.

## PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Laporan Penelitian Project Grant dengan judul Molekular Docking Eksperimental Dan Uji Aktivitas Hambatan Ekspresi COX-2 Pada Kanker Payudara Dari Derivat Etil *p*-metoksisinamat Hasil Isolasi *Kaempferia galanga* Linn. selesai sesuai dengan waktunya.

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

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti penelitian ini.
2. Ketua Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan segenap staf dosen pengajar dan karyawan yang telah memberikan bantuan dan fasilitas yang diperlukan.
3. Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS. sebagai konsultan Molekular Docking Eksperimental.
4. Segenap laboran *Multipurpose Laboratory I* dan *Multipurpose Laboratory II* yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
5. 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 penelitian ini masih banyak kekurangan di dalamnya, namun penulis berharap semoga ini dapat memberikan manfaat dan tambahan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Oktober'11

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	ii
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	vi
ABSTRAK (Bhs. Inggris dan Indonesia).....	x
PRAKATA.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I.....	10
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	11
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	31
SINOPSIS PENELITIAN TAHUN II.....	37

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel V.1. Hasil Docking Celecoxib, EPMS dan beberapa derivatnya terhadap COX-2	17
Tabel V.2. Interpretasi data spektrum IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -fenilakrilami-da	21
Tabel V.3. Interpretasi data spektrum IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metilfenil)akrilamida	23
Tabel V.4. Interpretasi data spektrum IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metilfenil)akrilamida	25
Tabel V.5. Pengamatan Hasil Uji Sitotoksik MCF-7	27

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Skema Enzim COX-2	4
Gambar 2.2. Struktur kristal COX-1 dan COX-2	6
Gambar 2.3. Sel MCF-7	7
Gambar 2.4. Rimpang kencur	8
Gambar 5.1. COX-2	16
Gambar 5.2. Active site COX-2	16
Gambar 5.3. Interaksi hidrofobik ligan SC58-residu COX-2	17
Gambar 5.4. Docking EPMS	18
Gambar 5.5. Docking 1AT	18
Gambar 5.6. Spektra UV APMS dalam pelarut etanol	19
Gambar 5.7. Spektra IR APMS dalam pembawa KBr	19
Gambar 5.8. Spektra <sup>1</sup> H-NMR APMS	20
Gambar 5.10. Spektra IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-fenilkarbamotioil)akrilamida (1AT) dalam pembawa KBr	20
Gambar 5.11. Spektra <sup>1</sup> H-NMR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-fenilkarbamotioil)-akrilamida (1AT)	21
Gambar 5.12. Spektra IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metilfenilkarbamotioil)akrilamida (2AT) dalam pembawa KBr	22
Gambar 5.13. Spektra <sup>1</sup> H-NMR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metilfenilkarbamotioil)akrilamida (2AT)	22
Gambar 5.14. Spektra IR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida (6AT) dalam pembawa KBr	23
Gambar 5.15. Spektra <sup>1</sup> H-NMR ( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida (6AT)	23
Gambar 5.17. Histogram jumlah sel per waktu	25
Gambar 5.19. Sel MCF7 setelah pengecatan dengan COX-2	26
Gambar 5.20. Sel MCF7 dengan perlakuan EPMS dan pengecatan dengan COX-2	26
Gambar 5.21. Sel MCF7 dengan perlakuan 1AT dan pengecatan dengan COX-2	27

Gambar 5.22. Sel MCF7 dengan perlakuan 2AT dan pengecatan dengan COX-2 27

Gambar 5.23. Sel MCF7 dengan perlakuan 6AT dan pengecatan dengan COX-2 27



## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. Instrumen Penelitian.....
2. Personalia Penelitian.....
3. Publikasi.....

## BABI PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Proses penemuan senyawa obat baru membutuhkan biaya yang sangat mahal dan waktu yang relatif lama. Proses yang dimulai dari identifikasi senyawa penuntun sampai klinikal trial membutuhkan waktu lebih dari 14 tahun. Perkembangan teknologi *Computer Aided Drug Design* (CADD) sangat bermanfaat dalam pengembangan obat. Teknologi ini dapat digunakan untuk design senyawa baru secara *in silico* dan evaluasi potensi resiko keamanan obat. Ada 2 macam pendekatan CADD, yaitu *Structure Base Design* dan *Ligand Base Design*. Pada penelitian ini akan digunakan pendekatan *Structure Base Design* dalam mensintesis derivat etil *p*-metoksisinamat (EPMS) hasil isolasi *Kaempferia galanga* sebagai penghambat pertumbuhan kanker payudara, melalui hambatan *cyclooxygenase-2* (COX-2).

Penderita kanker payudara setiap tahunnya menurut The American Cancer Society (2008) sekitar 178.000 wanita Amerika dan 2.000 pria Amerika. Penyakit ini merupakan penyebab utama kematian wanita berusia 40-55 tahun, serta penyebab terbesar kedua kematian wanita setelah kanker paru. Obat anti kanker yang selektif membunuh sel kanker saja tanpa mempengaruhi jaringan normal sampai saat ini belum ditemukan.

Oleh karena itu, para peneliti mengalihkan perhatian pada usaha penghambatan pertumbuhan sel kanker dengan induksi apoptosis atau mencegah angiogenesis (Finetti F *et al.*, 2008; Kuwano T *et al.*, 2004). Angiogenesis dipicu oleh peningkatan produksi prostaglandin PGE<sub>2</sub> yang dikatalisis oleh COX-2. Induksi proses apoptosis dan hambatan angiogenesis dengan cara menghambat produksi COX-2 diperlukan untuk pencegahan metastasis kanker (Koomstra, 2006).

Dalam usaha merancang senyawa penghambat pertumbuhan kanker melalui hambatan COX-2, maka dilakukan rancangan obat berbasis struktur tiga dimensi dari target obat. Prediksi struktur tiga dimensi dari kompleks antara protein target dan kandidat obat memegang peranan penting dalam CADD. Prediksi interaksi antara protein-ligan dikenal dengan istilah *docking* (Kartasmita *et al.*, 2009; Rollinger *et al.*, 2004; Sondhi *et al.*, 2008). Docking antara protein-ligan COX-2 sudah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti.

Menurut Michaux *et al.*, (2006) topologi *binding site* pada COX-2, adalah adanya 4 poin farmakofor COX-2, yaitu satu akseptor ikatan hidrogen, satu gugus hidrofobik dan dua gugus aromatik. Menurut Chopra *et al.*, (2008), model farmakofor COX-2 inhibitor terdiri dari satu akseptor hidrogen, satu donor hidrogen, satu gugus aromatis dan satu gugus hidrofobik alifatik.

Farmakofor adalah gugus fungsi yang mempunyai posisi tertentu pada suatu molekul obat yang berinteraksi pada enzim atau reseptor, yang dipengaruhi oleh sifat sterik dan elektronik gugus fungsi tersebut. Interaksi farmakofor dengan asam amino pada reseptor atau enzim tertentu dipelajari dengan molekular docking eksperimen (Muege & Oloff, 2006; Rajakrishnan *et al.*, 2008).

Vimala *et al.*, (1999) dan Xue Y *et al.*, (2002) melaporkan etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari *Kaempferia galanga* sebagai penghambat tumor yang diinduksi Epstein-Barr virus (EBV). Menurut Tewtrakul *et al* (2005), volatil oil *Kaempferia galanga* yang mengandung 31,77% EPMS mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap *Artemia salina* ( $EC_{50} = 26,84$  ppm). EPMS juga mempunyai aktivitas antiinflamasi yang berhubungan dengan COX-2 (Sulaiman *et al.*, 2007). Oleh karena itu pada penelitian ini, EPMS akan digunakan sebagai bahan awal dan akan dimodifikasi strukturnya sebagai senyawa penghambat COX-2.

Pada penelitian ini molekular docking eksperimental derivat EPMS akan dilakukan pada bentuk amida dan tiourea menggunakan program Mollegro. Beberapa turunan amida mempunyai aktivitas antiinflamasi lebih baik daripada asamnya. Budiati (*et al.*, 2010) juga melaporkan aktivitas beberapa senyawa tiourea sebagai analgesik antiin-flamasi yang berhubungan dengan COX-2. Hasil docking study dengan COX-2 akan mengarahkan modifikasi struktur yang akan dilakukan. Hasil modifikasi struktur EPMS itu selanjutnya diuji aktivitasnya sebagai penghambat COX-2 pada kanker payudara MCF-7.

#### **Rumusan Masalah :**

1. Derivat EPMS manakah yang mempunyai moldock score paling rendah terhadap COX-2 antara bentuk amida dan tiourea?
2. Bagaimanakah metode untuk sintesis derivat EPMS yang mempunyai moldock score

paling rendah terhadap COX-2?

3. Apakah derivat EPMS yang memiliki interaksi terbaik dengan COX-2 berdasarkan hasil docking study juga menghambat ekspresi COX-2 pada sel kanker MCF-7?

**Hipotesis Penelitian :**

1. Bentuk tiourea EPMS memiliki MolDockScore lebih rendah daripada bentuk amidanya.
2. Derivat EPMS dapat dirubah menjadi tiourea dengan reaksi adisi dan substitusi nukleofilik pada bentuk asil halidanya.
3. Hasil docking study COX-2 derivat EPMS berhubungan dengan aktivitas hambatan ekspresi COX-2 pada sel kanker MCF-7

**Tujuan Penelitian :**

1. Mengetahui derivat EPMS yang memiliki interaksi paling baik terhadap enzim COX-2
2. Mendapatkan derivat EPMS yang memiliki interaksi paling baik terhadap COX-2
3. Membuktikan derivat EPMS yang memiliki interaksi terhadap enzim COX-2 dapat menghambat ekspresi COX-2 pada sel kanker payudara, MCF-7

**Manfaat Penelitian :**

1. Memperpendek jalur mendapatkan senyawa obat yang menghambat COX-2.
2. Sebagai penelitian pendahuluan untuk mendapatkan senyawa-senyawa penghambat pertumbuhan kanker payudara.
3. Meningkatkan nilai tambah kencur sebagai material awal senyawa penghambat kanker payudara.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

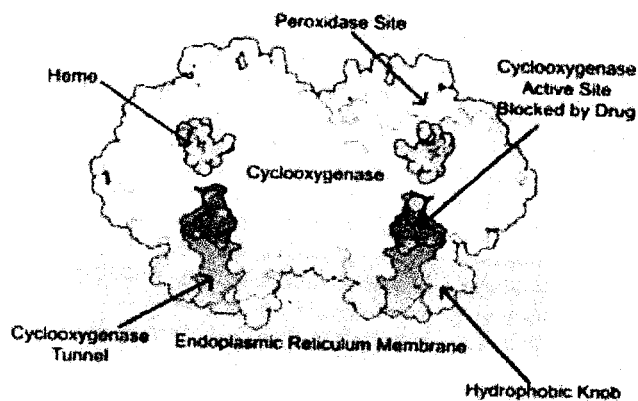
#### 2.1. Docking Eksperimen

Sebagian besar obat merupakan molekul kecil yang dirancang untuk mengikat, berinteraksi, dan memodulasi aktivitas reseptor biologis tertentu. Reseptor merupakan protein yang mengikat dan berinteraksi dengan molekul lain untuk melakukan berbagai fungsi yang diperlukan untuk pemeliharaan kehidupan. Target reseptor perlu diketahui untuk merancang ligan agar sesuai dengan sisi aktif dari target reseptor. Faktor-faktor yang perlu dipertimbangkan antara lain sifat sterik, elektrostatis, dan hidrofobik. Farmakofor harus dapat berinteraksi dengan reseptor agar terjadi efek yang diinginkan dan mekanisme biokimia dari target reseptor harus dipertimbangkan. Interaksi farmakofor dengan reseptor dipelajari dengan docking eksperimen (Hinchliffe, 2008).

Tujuan docking :

- Menempatkan ligan (molekul kecil=obat) ke sisi aktif reseptor sehingga diperoleh interaksi optimal dengan reseptor.
- Mengevaluasi interaksi ligan-reseptor dan mengestimasi afinitas ikatan tersebut.

Pada docking eksperimen, setelah bagian sisi aktif ditandai dan mekanisme aksi dari reseptor sasaran diketahui, langkah berikutnya adalah merancang ligan yang cocok. Kombinasi optimal dari atom dan kelompok-kelompok fungsional ligan digunakan berinteraksi dengan reseptor. Desain ligan novel ini dibatasi oleh ketersediaan bahan dan fasilitas untuk mensintesisnya. Contohnya pada reseptor COX-2 pada gambar 2.1.



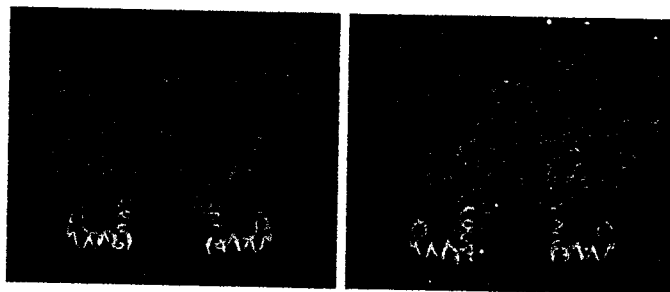
Gambar 2.1. Enzim COX-2 (Goodsell, 2000).

Enzim adalah bagian reseptor-menyerupai protein yang mengkatalisis reaksi biokimia dalam tubuh makhluk hidup. Contohnya, enzim COX-2 yang mengkatalisis asam arakhidonat menjadi prostaglandin. Enzim ini memiliki spesifisitas terhadap target molekul dengan cara membentuk ikatan dengan lingkungan molekul yang sesuai. Enzim dianalogikan sebagai molekul kunci, yang berisi lubang kunci disebut sisi aktif dari enzim dengan ukuran dan bentuk yang sangat spesifik dan konsisten. Lubang kunci molekul tersebut memungkinkan interaksi hanya dengan target molekul yang tepat. Reseptor, yang ditentukan oleh DNA kita, merupakan protein yang dapat membentuk dan mempertahankan ukuran dan bentuk dari sisi aktif. Selain faktor sterik dan elektronik, faktor lain yang mempengaruhi kemampuan ligan mengikat reseptor adalah interaksi hidrofobik. Apabila ligan dan reseptor berinteraksi, harus ada kekuatan pendorong yang memaksa ligan untuk meninggalkan air dan mengikat reseptor. Bagian hidrofobik dari ligan dan reseptor dapat membatasi mengikat target yang tidak tepat. Beberapa program komputer yang digunakan dalam docking eksperimental adalah GOLD, FlexX, AutoDock dan Mollegro (Oda *et al.*, 2007).

## 2.2. Tinjauan tentang *Cyclooxygenase* (COX-1 dan COX-2)

*Cyclooxygenase* adalah hemeprotein terikat membran yang mengkatalisir oksidasi asam arakhidonat menjadi prostaglandin G<sub>2</sub> dan mereduksinya menjadi prostaglandin H<sub>2</sub>. Transformasi prostaglandin H<sub>2</sub> akan membentuk banyak macam prostaglandin dan tromboksan termasuk prostaglandin yang diperlukan untuk menimbulkan fungsi yang benar dari beberapa sistem dan organ, misalnya proteksi mukosa lambung, fungsi renal, homeostasisvaskular (prostaglandin I<sub>2</sub> atau prostacyclin), kontraksi otot polos, kelahiran dan agregasi platelet (Simmon *et al.*, 2004).

Terdapat dua isoform *cyclooxygenase*, yaitu COX-1 dan COX-2 yang berbeda pada satu macam asam amino residunya.



Gbr. 2.2. Struktur kristal COX-1 dari ovin (kiri) dan COX-2 dari murine (kanan) mengandung 4 domain (Simmon *et al.*, 2004).

Dari Gambar 2.2., diketahui ada 4 domain pada siklooksigenase (COX-1 & COX-2) yaitu : yellow membran binding domain, green catalytic site domain, blue dimerisasi domain dan red heme domain (Simmons *et al.*, 2004).

### 2.3. Kanker payudara

Kanker adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Payudara secara umum terdiri dari dua tipe jaringan : jaringan glandular (kelenjar) dan jaringan stromal (penopang). Jaringan kelenjar mencakup kelenjar susu (lobules) dan saluran susu (*the milk passage, milk duct*). Jaringan penopang meliputi jaringan lemak dan jaringan serat konektif. Payudara juga dibentuk oleh *jaringan lymphatic*, sebuah jaringan yang berisi sistem kekebalan yang bertugas mengeluarkan cairan dan kotoran selular. Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) juga didefinisikan sebagai suatu penyakit neoplasma yang ganas yang berasal dari *parenchyma*. Penyakit ini oleh World Health Organization (WHO) dalam *International Classification of Diseases (ICD)* diberi kode nomor 17 (WHO, 2007).

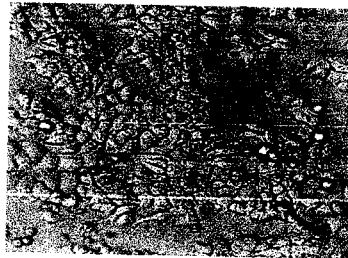
**Jenis-jenis sel kanker payudara :** (CCRC UGM, 2011)

Terdapat beberapa jenis sel kanker yang dapat terkultur pada kanker payudara, yaitu sel MCF-7, sel T-47D, sel MDA-MB-231, sel MB-MDA-468, sel BT-20 dan sel BT-549.

#### 1. MCF-7 :

Sel MCF-7 merupakan sel yang positif terhadap estrogen receptor (ER) dan secara in

*in vitro* digunakan sebagai model kanker payudara untuk mempelajari pengaruh estrogen pada kanker payudara. Sel ini juga positif terhadap *cytokeratin* dan negatif terhadap desmin, endothelin, GFAP, neurofilament, vimentin. Sel MCF-7 juga digunakan sebagai model untuk mempelajari apoptosis pada kanker yang metastatis.



Gambar 2.3. Sel MCF7

Sel MCF7 diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1%. Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (mis. doxorubicin), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2, dan tidak mengekspresikan caspase-3. Sel MCF-7 tergolong yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ).

## 2. Sel T47D (CCRC UGM, 2010)

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Sel ini sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Morfologi sel T47D seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO<sub>2</sub> inkubator 5% dan suhu 37°C.

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Mis-sense mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi cell cycle. Sel T47D meru-



pakan sel kanker payudara ER/PR-positif. Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya. Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin.

### 2.3. Tinjauan tentang Tanaman Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.)

Tanaman kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) merupakan tanaman suku Zingiberaceae dengan ciri-ciri seperti terlihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Rimpang kencur

Pada Gambar 2.4 rimpang kencur kering yang berwarna coklat pada bagian luar dan putih pada bagian dalam.

Rimpang kencur (*Kaempferia rhizoma*) memiliki bau khas aromatik, pedas dan menghangatkan. Kandungan rimpang kencur adalah zat pati (4,14%), mineral (13,73%), sineola, asam sinamat, etil *p*-metoksisinamat (1,28-3%), borneol, kamper, asam anisat dan gom (Natta *et al.*, 2008). Volatil oil dari rimpang kencur dilaporkan mengandung 33,77% etil *p*-metoksisinamat (Tewtrakul *et al.*, 2005).

### 2.4. Tinjauan tentang Etil *p*-metoksisinamat (EPMS)

Etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari *Kaempferia galanga* Linn. (kencur) berpeluang untuk dikembangkan sebagai *lead compounds* COX-2 inhibitor baru. Hal ini disebabkan tanaman kencur ini secara tradisional telah digunakan sebagai jamu "pegal linu" untuk mengatasi pegal, radang dan tidak menyebabkan gangguan pada lambung. Salah satu bagian yang banyak digunakan sebagai bahan obat tradisional adalah bagian rimpangnya (Athikomkulchai, *et al.*, 2007) dan daunnya (Sulaiman, *et al.*, 2008).

Analisis GC/MS kencur menunjukkan adanya golongan monoterpen (3-carena), oksigenasi monoterpen (eukaliptol, isobomeol) dan derivat cinamat (etil sinamat dan etil *p*-metoksisinamat) (Tewtrakul *et al.*, 2005; Athikomkulchai *et al.*, 2007). Cara isolasi

yang paling optimal untuk memperoleh etil *p*-metoksisinamat adalah dengan cara perkolasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarut (Natta *et al.*, 2008).

Pada penelitian dengan sel hepatosit tikus, EPMS mengalami hidrolisis menjadi asamnya yaitu asam *p*-metoksisinamat (APMS) (Sadono & Hasmono, 2001). Ekowati *et al.*, (2004) telah membuktikan reaksi hidrolisis EPMS menjadi APMS dengan pereaksi KOH dalam etanol selama 2 jam, kemudian diasamkan dengan larutan HCl yang direflux diperoleh hasil 80%.

◦

### **BAB III**

## **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian :**

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. Mengetahui nilai MolDock score beberapa derivat EPMS dengan program Mollegro.
- b. Mensintesis derivat EPMS yang mempunyai afinitas tinggi terhadap COX-2 berdasarkan nilai MolDock Score.
- c. Membuktikan aktivitas hambatan COX-2 derivat EPMS pada sel MCF7.

#### **3.2. Manfaat Penelitian :**

Manfaat Penelitian ini adalah :

- a. Memperoleh senyawa-senyawa baru derivat EPMS yang mempunyai aktivitas menghambat kanker payudara.
- b. Meningkatkan nilai ekonomis kencur sebagai sumber metabolik sekunder yang beraktivitas kemopreventif kanker.
- d. Meningkatkan kemandirian bangsa dalam penyediaan bahan baku senyawa yang berpotensi sebagai kemopreventif kanker.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Docking Study

Docking study dilakukan dengan seperangkat komputer, program Mollegro Virtual Docker 2010 pada struktur 3D senyawa uji program ChemDraw 11.0. (pdb 1CX2). Ligan yg digunakan adalah SC558. Hasil MolDock Score masing-masing senyawa uji dibandingkan untuk memprediksi senyawa yang mempunyai afinitas tertinggi terhadap enzim COX-2.

4.1.1. Langkah kerja *docking study* sebagai berikut :

- a. Dibuat struktur 3D senyawa uji dengan program ChemBioUltra 11.00, kemudian disimpan dalam bentuk mol2.
- b. Diimport struktur kristal enzim COX-2 yang sudah berikatan dengan ligan tertentu, 1cx2.
- c. Dipilih ligan yang sesuai, SC58 (struktur mirip celecoxib).
- 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. Ditentukan tiga titik pada ligan tersebut dan diaktifkan.
- h. Dilakukan docking pada senyawa uji tersebut.

#### 4.2. Alat dan Bahan :

- 4.2.1. Bahan** : EPMS, tionil klorida, piridin, THF, anilin, *p*-anisidin, *p*-toluidin, kloroform, petroleum eter, benzena, heksana, etil asetat, asam asetat glasial, metanol, etanol, PE, diklorometana.
- 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, Electrothermal Mel-Temp, Neraca analitik Shimadzu LM-20

### 4.3.1. Modifikasi Struktur etil *p*-metoksisinamat (EPMS)

#### 4.3.1.1. Sintesis derivat EPMS

Ke dalam labu alas bulat dimasukkan 200mg EPMS, dan dilarutkan dalam 3 ml etanol 95%, selanjutnya ditambahkan larutan KOH//etanol 5% sebanyak 25 ml. Campuran di refluks pada suhu  $80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam, didinginkan sampai terbentuk kristal putih, kemudian disaring, dicuci dengan 10 ml air suling dan ditambah HCl sampai terbentuk endapan putih, yaitu asam *p*-metoksisinamat. Ke dalam campuran asam *p*-metoksisinamat dalam benzena dan 1 tetes piridin dimasukkan 2.4 eq. tionil klorida, dan direflux semalam. Setelah itu kelebihan tionil klorida dan pelarut dihilangkan dengan *rotary evaporation* sampai dihasilkan padatan kuning. Selanjutnya padatan ini direaksikan dengan 7,5 mmol amonium tiosianat, ditambahkan 4 tetes PEG 400 dan 12,5 ml diklorometana, selanjutnya direaksikan dalam microwave 70W selama 1 menit. Setelah itu ke dalam campuran ditambahkan 5 mmol amina aromatis (anilin, *p*-metoksi anilina dan *p*-metil anilin) dan dimasukkan dalam microwave 70W selama 3 menit. Setelah itu ke dalam campuran tersebut ditambahkan berturut-turut 100 ml HCl 3N, 100 ml larutan  $\text{NaHCO}_3$  5% dan aquadest. Endapan disaring dan dilakukan rekristalisasi, dengan pelarut etanol 70%.

Uji kemurnian senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan KLT, dengan fase diam lempeng aluminium Silika gel GF<sub>254</sub> E. Merck & penampak noda lampu UV. Penentuan titik lebur dilakukan dengan Electrothermal melting point apparatus.

### 4.4. Identifikasi Struktur Derivat EPMS

Identifikasi struktur senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan spektrofotometer ultra-violet (UV) dan infra merah (IR), spektrometer resonansi magnetik inti (<sup>1</sup>H-NMR).

### 4.5. UJI AKTIVITAS SENYAWA HASIL SINTESIS

#### 4.5.1. Bahan dan Alat Penelitian

##### a. Bahan

- Bahan untuk preparasi larutan uji: DMSO (DMSO 99,5% pro GC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).
- Subjek uji yang digunakan adalah sel MCF-7 koleksi Lab. Parasitologi FK UGM

- Kultur sel ditumbuhkan dalam media penumbuh *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung *foetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v) (FBS *qualified*, Gibco, Invitrogen<sup>TM</sup> USA), dan antibiotika penisilin-streptomisin 1 % (v/v) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, 14072, USA). Sel dipanen dari *culture dish/flask* menggunakan tripsin-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen, Canada). Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian apabila tidak dikatakan lain berarti berderajat proanalisis.
- Uji sitotoksisitas dilakukan dengan metode MTT. Larutan induk MTT ( 3-(4,5-dimetil tiazol- 2-il (-2,5- difenil tetrazolium bromida) 5mg/ml dibuat dengan melarutkan MTT (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dalam *phosphate buffer saline* (PBS). Pereaksi kerja dibuat dengan mengencerkan pereaksi stok 10 kali dengan medium DMEM.
- Pereaksi *stopper*. adalah natrium dodesil sulfat (SDS, Merck-Schuchardt, Dr.Th.Schuchardt & Co, D-85662 Hobenbrunn, Gernmay) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt, Germany).

#### b. Alat

Alat yang diperlukan untuk kerja *in vitro* antara lain: *autoclave* (Hirayama HV-25 020585175, Hirayama Manufacturing Co., Jepang), *Labconco purifier class II biosafety cabinet* (Delta Series, Labconco Corporation, Missouri, USA), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm<sup>2</sup>, Germany), *cell counter*, penangas air (Memmert D06805), mikropipet (Pipetman<sup>R</sup> neo Gilson, France), *ELISA reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark serial no. 11565*, Jepang), mikroskop cahaya (Nikon YS 100, Japan), sentrifus (Sorvall, MC 12 V 9700869), dan vortex (Maxi Mix II, Thermolyne type 37600 mixer, Iowa, USA). Selain alat-alat di atas, alat habis pakai yang digunakan dalam kerja *in vitro* antara lain: *tissue culture flask* (25cm<sup>2</sup> Canted Neck, Nunc), *tissue culture dish* diameter 10 cm (Iwaki), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), *yellow tip* dan *blue tip* (Brand), *96-well plate* (Nunc) dan *microplate* (96 well, Iwaki).

#### 4.5.2. Jalan Penelitian

##### 1. Pembuatan larutan uji

Senyawa uji dibuat stok dengan cara melarutkan 5 mg sampel dengan 100  $\mu$ l DMSO, kemudian diencerkan dengan media DMEM hingga diperoleh seri konsentrasi larutan uji. Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 0,5 ppm, 5 ppm, 50 ppm, dan 500 ppm

##### 2. Propagasi dan panen sel MCF-7

Semua alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian segera dicairkan dalam penangas air 37°C. Ampul disemprot dengan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical tube* steril yang berisi media. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 650 rpm selama 3 menit, kemudian supernatan yang dihasilkan dibuang. Media yang baru ditambahkan pada endapan sel dan disuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa buah *tissue culture flask* atau *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5%. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur, selanjutnya sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci PBS dua kali. Sel ditambah tripsin-EDTA 0,25% untuk melepas sel dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* atau *flask* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish* atau *flask*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *hemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan. Suspensi sel ditambah sejumlah medium hingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 5 x 10<sup>3</sup> sel/ml, sel siap untuk penelitian.

##### 3. Pengelompokan subjek uji

Dalam hal ini, sel sebagai subjek uji dikelompokkan menjadi:

a. Kelompok perlakuan: sel + media kultur + larutan uji

b. Kelompok kontrol sel: sel + media kultur

Selain itu, dibuat juga kontrol media yang berisi media kultur dan kontrol larutan uji yang berisi media kultur ditambah larutan uji tanpa sel.

4. Uji sitotoksisitas larutan uji dengan metode MTT

Sel MCF-7 didistribusikan ke dalam *96 well plate* kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Selanjutnya, ditambahkan larutan uji dalam berbagai seri konsentrasi dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, tiap sumuran ditambah MTT dalam PBS. Inkubasi dilanjutkan selama 6 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan. Sel yang hidup akan mengkonversikan MTT menjadi formazan yang berwarna biru tua. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen *stopper* (Sodium dodesil sulfat), lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan dalam prosentase kehidupan. Metode MTT ini dilakukan menurut Mossman (1983) dengan modifikasi *reagen stopper*. Inkubasi dilanjutkan selama 48 dan 72 jam.

5. Uji hambatan COX-2 pada sel MCF7

Sel MCF-7 didistribusikan ke dalam 24 well-plate yang sebelumnya telah dipasang cover slip ke dalam sumuran. Kemudian sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> sampai kondisi sel mencapai 80% konfluen. Setelah itu dibuat dibuat sampel konsentrasi 500 ppm dan kontrol sel tanpa perlakuan. Plate diambil dari inkubator dan dicuci dengan PBS. Sampel dimasukkan ke dalam 2 sumuran masing-masing sebanyak 1 ml dan 3 sumuran untuk kontrol sel hanya ditambahkan 1 ml media tanpa sampel. Setelah itu sampel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 15 jam. Setelah 15 jam sampel dikeluarkan dari inkubator, dicuci dengan PBS dan difiksasi dengan metanol. Cover slip diambil dengan pinset lalu dilakukan pengecatan untuk deteksi ekspresi COX-2 (Ardiani, dkk., 2008).



## BAB V

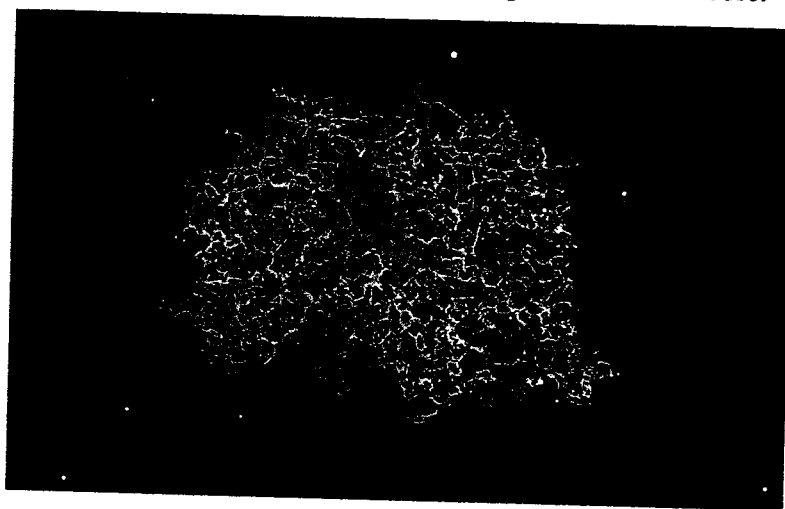
### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Docking Study

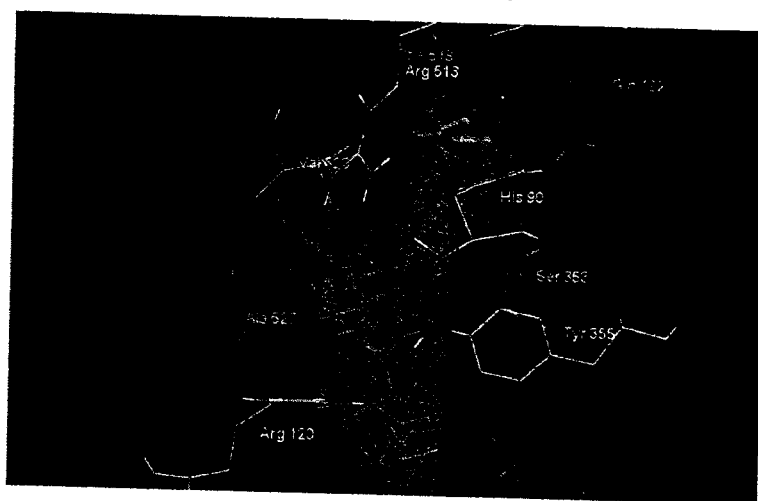
Docking study dilakukan menggunakan Mollegro Virtual Docker dengan struktur 3D senyawa uji pada katalitik site enzim COX-2 (pdb code: 1cx2, ligand SC558).

Tujuan dilakukan docking adalah :

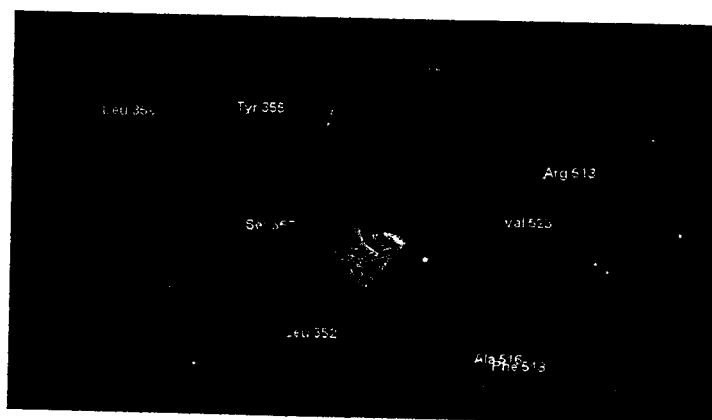
- 1) Karakterisasi tempat ikatan dengan suatu tampilan interaksi ligan pada tempat ikatan tersebut.
- 2) Orientasi ligand pada tempat ikatan : *cavity search & energy search*.
- 3) Mengevaluasi kekuatan interaksi senyawa uji dengan MollDock Score.



Gambar 5.1. Enzim COX-2



Gambar 5.2. Active site COX-2

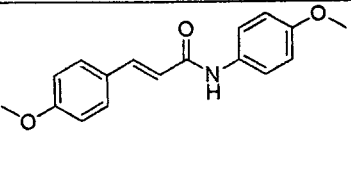
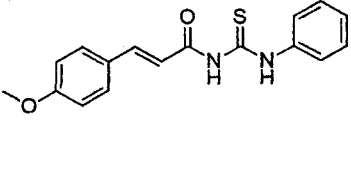
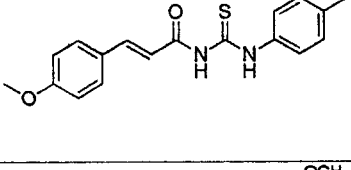
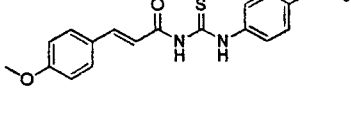


Gambar 5.3. Interaksi hidrofobik ligan SC58-residu COX-2

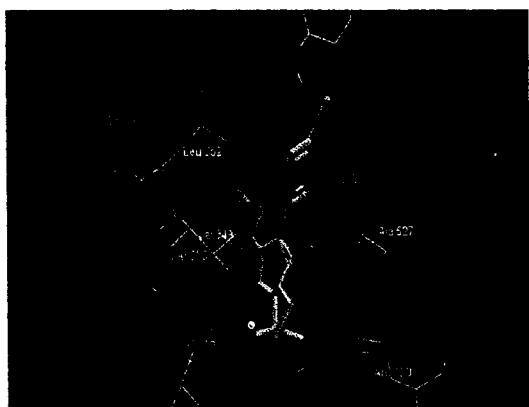
Hasil docking dapat dilihat pada Tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil Docking Celecoxib, EPMS, beberapa derivatnya terhadap COX-2 (pdb : 1cx2)

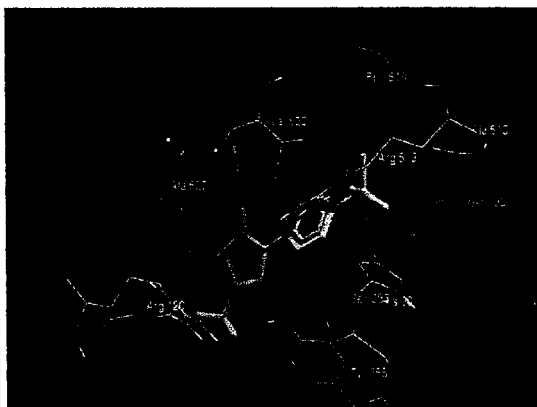
No	Nama Senyawa	Struktur	MolDock Score COX-2
1	Celecoxib		-160,535
2	EPMS		-95,633
3	(E)-3-(4-metoksifenil)-N-fenil akrilamida		-112,787
4	(E)-3-(4-metoksifenil)-N-(4-metil-fenil)akrilamida		-113,881

5	( <i>E</i> )-3-(4-metoksifenil)- <i>N</i> -(4-metoksifenil)akrilamida		-123,109
6	( <i>E</i> )- <i>N</i> -(fenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida		-141,426
7	( <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-metilfenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida		-147,175
8	( <i>E</i> )- <i>N</i> -(4-metoksifenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida		-153,824

Dari data Table 5.1 tampak bahwa senyawa golongan tiourea lebih stabil berinteraksi dengan COX-2 dibanding bentuk amida dari EPMS. Senyawa (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida memiliki ikatan paling stabil dengan enzim COX-2 dibandingkan dengan EPMS dan senyawa derivat lainnya. Hal itu ditunjukkan dari harga MolDock Score paling rendah diantara senyawa-senyawa yang diujikan. Jika ditinjau dari strukturnya, (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida memiliki struktur yang lebih meruah, hal itu diduga mempengaruhi interaksinya dengan asam amino pada aktif site COX-2.



Gambar 5.4. Docking EPMS



Gambar 5.5. Docking 1AT

Berdasarkan data pada Tabel 5.1. modifikasi struktur EPMS akan dilakukan menjadi turunan tiourea.

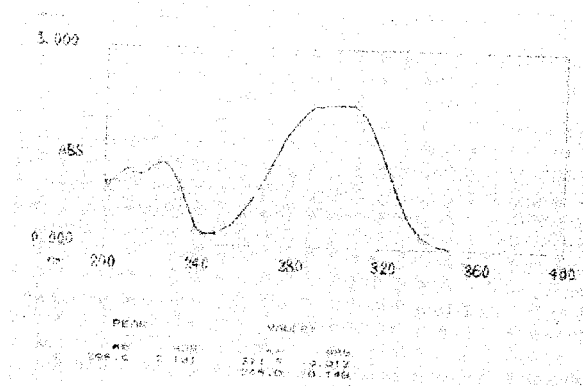
**5.2. Modifikasi Struktur EPMS menjadi derivat tiourea**

**5.2.1. Sintesis APMS dari EPMS**

Hidrolisis EPMS sesuai metode 4.3.1.1: dari 208,7 g EPMS diperoleh 150,0 g APMS.

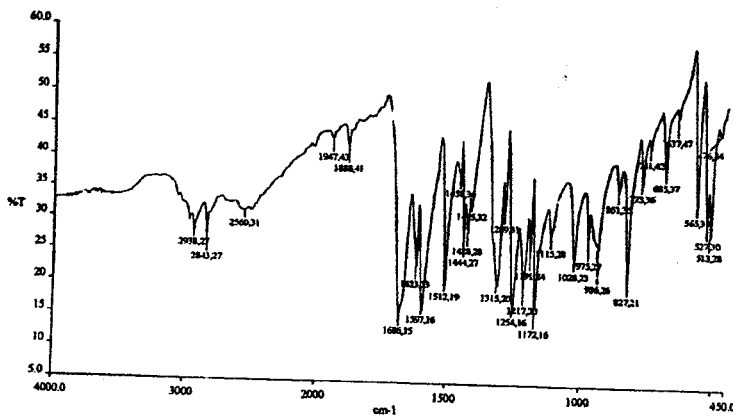
Identifikasi APMS : bentuk kristal jarum, tidak berwarna, tidak berbau dan menyebabkan lidah terasa tebal. Jarak lebur isolat tersebut 169-170°C.

Berdasarkan hasil identifikasi struktur secara spektroskopi diperoleh data sebagai berikut :



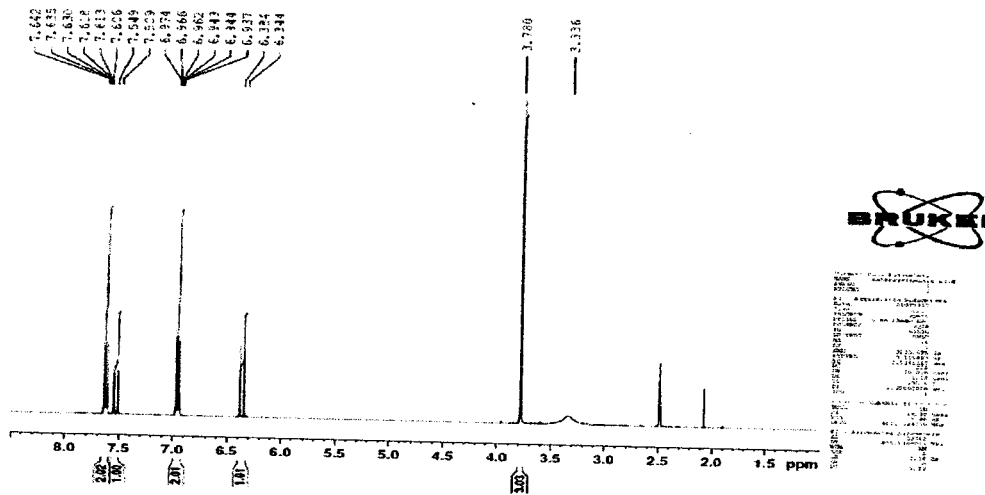
Gambar 5.6. Spektra UV APMS dalam pelarut etanol

Dari gambar 5.6. diketahui panjang gelombang maksimum APMS dalam pelarut etanol = 288 nm.



APMS.pk

Gambar 5.7. Spektra IR APMS dalam pembawa KBr

Gambar 5.8. Spektra  $^1\text{H-NMR}$  APMS

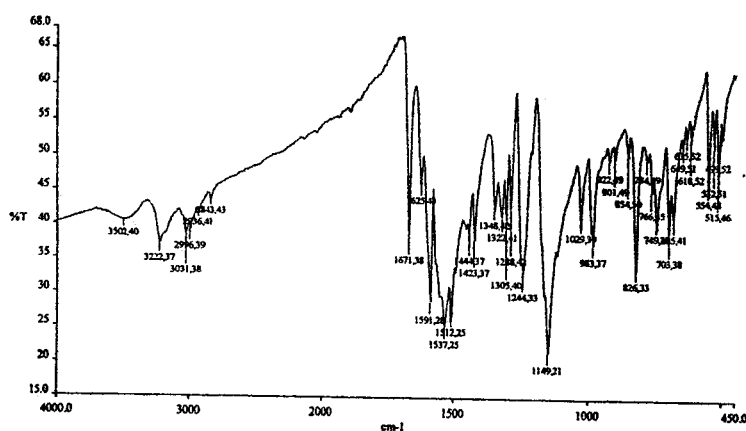
Dari gambar 5.6-5.8, diketahui bahwa senyawa hasil hidrolisis EPMS dengan metode 4.3.1.1. adalah asam *p*-metoksisinamat (persentase hasil 80%) berbentuk kristal putih (t.l. 169-170°C), UV(etanol)  $\lambda_{\text{maks}} = 288 \text{ nm}$ .  $^1\text{H NMR}$  (DMSO) 3.78 (3H, s), 6.60 (1H, d,  $J = 16\text{Hz}$ ), 6.96 (2H, d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ ), 7.53 (1H, d,  $J = 16 \text{ Hz}$ ), 7.62 (2H, d,  $J = 5.0 \text{ Hz}$ ). IR (KBr) 2937, 2843, 2567, 1685, 1624, 1288, 1255  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3. Sintesis derivat akrilmaida

#### 5.3.1. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida (1AT)

Sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida hasil reaksi antara *p*-metoksisinamoil klorida dengan amonium tiosianat dan anilin sesuai prosedur 4.3.1.1. memberikan hasil senyawa padat bentuk kristal kuning muda. Titik lebur 192-193°C.

Hasil pengamatan dengan spektroskopi IR ditunjukkan pada gambar 5.10.



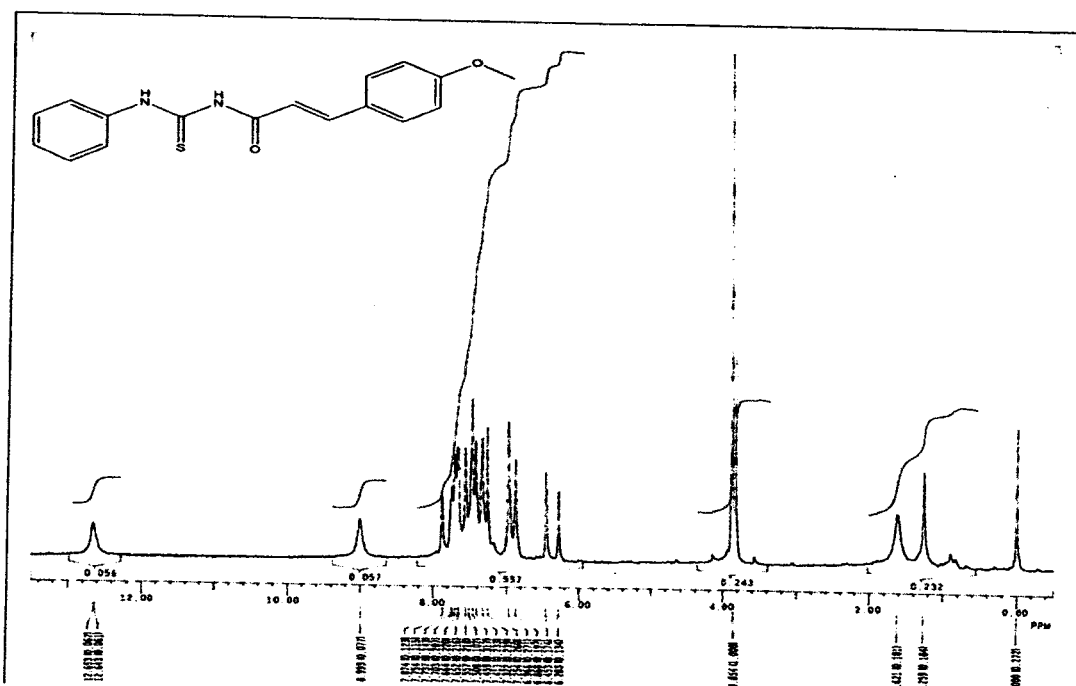
Gambar 5.9. Spektra IR (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida pellet : KBr

Interpretasi spektra IR (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida dapat dilihat pada Tabel V.2.

Tabel V.2 Interpretasi data spektrum inframerah senyawa hasil sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida

Interpretasi Gugus fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )
N-H amida	3193
C-H aromatis	2926
C=O amida	1674
C=C aromatis	1511
C=S tiokarbonil	1151
C-O-C aril alkil eter	1249
C-N amida	825

Hasil pengamatan spektra <sup>1</sup>H-NMR ditunjukkan pada gambar 5.10.



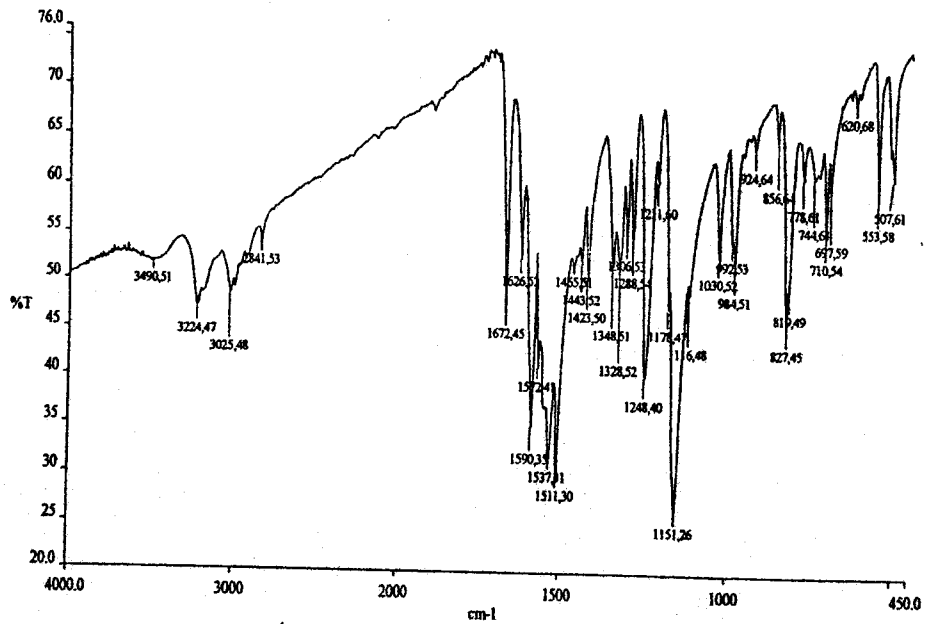
Gambar 5.10. Spektra <sup>1</sup>H-NMR (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida

Dari Gambar 5.9-5.10 diketahui bahwa hasil sintesis adalah (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida dengan persentase hasil 27%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.87 (3H, s), 6.31 (1H, d, *J* = 15.60 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 15.60 Hz), 7.71 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 6.94 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 7.50 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 7.41 (2H, t, *J* = 6.80 Hz), 7.28 (1H, t, *J* = 10.80 Hz), 8.69 (1H, s), 12.63 (1H, s).

### 5.3.2. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil)akrilamida (2AT)

Sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-fenilkarbamotioil)akrilamida hasil reaksi antara *p*-metoksisinamoil klorida dengan amonium tiosianat dan *p*-metilanilin sesuai prosedur 4.3.1.1. memberikan hasil senyawa padat bentuk kristal kuning. Titik lebur 192-193°C.

Hasil pengamatan spektra IR ditunjukkan pada gambar 5.11.

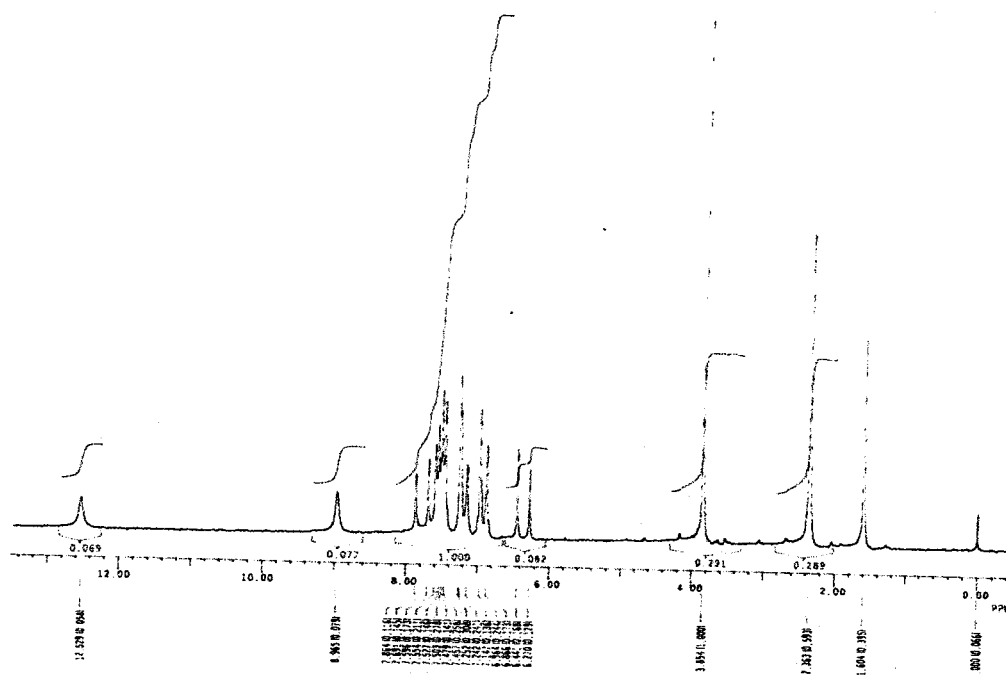


Gambar 5.11. Spektra IR (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil) akrilamida (Pellet : KBr)

Tabel V.3 Interpretasi data spektrum inframerah senyawa hasil sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil) akrilamida

Interpretasi Gugus fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )
N-H amida	3241
C-H aromatis	3025
C=O amida	1672
C=C aromatis	1511
C=S tiokarbonil	1151
C-O-C aril alkil eter	1245
C-N amida	827



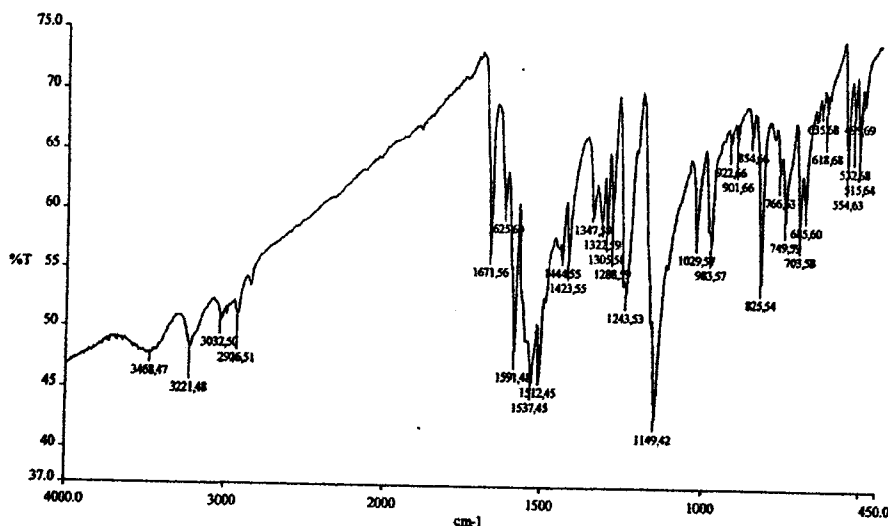


Gambar 5.12. Spektra  $^1\text{H-NMR}$  (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil) akrilamida, pelarut  $\text{CDCl}_3$

Dari gambar 5.11-5.12, diketahui senyawa tersebut adalah (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil)akrilamida dengan persentase hasil 30%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 2.37 (3H, s), 3.87 (3H, s), 6.31 (1H, d,  $J = 15.40$  Hz), 6.93 (2H, d,  $J = 9.60$  Hz), 7.21 (2H, d,  $J = 8$  Hz), 7.78 (1H, d,  $J = 15.40$  Hz), 7.54 (4H, m), 8.68 (1H, s), 12.51 (1H, s). IR (KBr) 3224, 3025, 1672, 1590, 1537, 1248, 1151, 827  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3.2. (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida (6AT)

Sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida hasil reaksi antara *p*-metoksisisnamoil klorida dengan amonium tiosianat dan *p*-metoksianilin sesuai prosedur 4.3.1.1. memberikan hasil senyawa padat bentuk kristal hijau muda. Titik lebur 180-181°C. Hasil pengamatan dengan spektrofotometri IR terlihat pada Gambar 5.13.



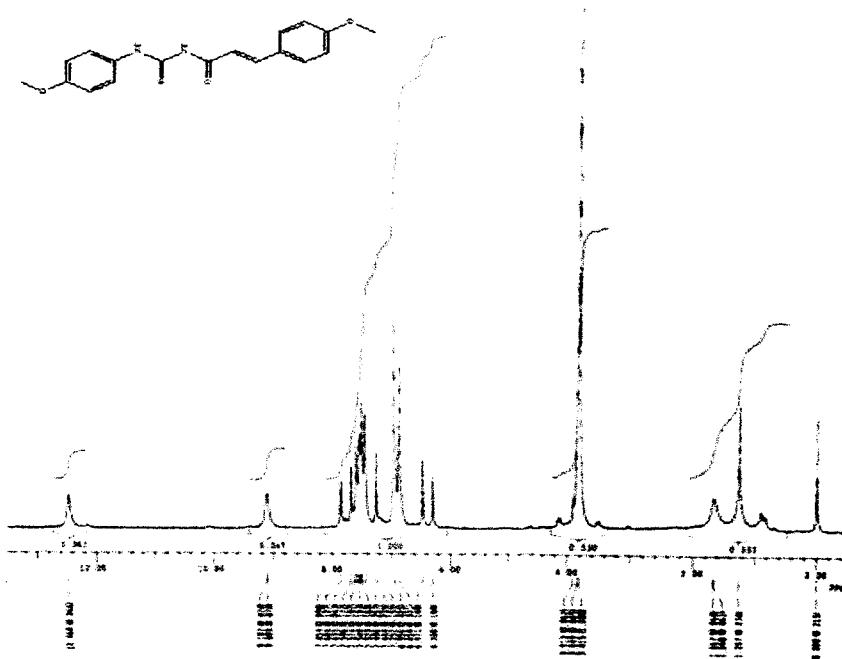
Gambar 5.13. Spektra IR (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida. Pellet : KBr

Interpretasi data Gambar 5.13. dapat dilihat pada Tabel V.4.

Tabel V.4 Interpretasi data spektrum inframerah senyawa hasil sintesis (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)akrilamida

Interpretasi Gugus fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )
N-H amida	3221
C-H aromatis	3025
C=O amida	1672
C=C aromatis	1511
C=S tiokarbonil	1151
C-O-C aril alkil eter	1241
C-N amida	825

Hasil pengamatan spektroskopi <sup>1</sup>H-NMR tampak pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14. Spektra  $^1\text{H-NMR}$  (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil) akrilamida Pelarut :  $\text{CDCl}_3$

Dari Gambar 5.13-5.14 diketahui bahwa hasil sintesis adalah (*E*)-3-(4-metoksifenil)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil) akrilamida sebesar 35%, berupa kristal hijau muda (tl. 181-182°C).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 3.85 (6H, s), 6.35 (1H, d,  $J = 15.58$  Hz), 7.35 (2H, d,  $J = 8.86$  Hz), 6.86 (2H, d,  $J = 8.74$  Hz), 7.7 (1H, d,  $J = 15.58$  Hz), 7.46 (2H, d,  $J = 8.86$  Hz), 7.54 (2H, d,  $J = 8.74$  Hz), 9.10 (1H, s), 12.47 (1H, s). IR (KBr) 3308, 3096, 1655, 1508, 1251, 823  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.4. Hasil Uji Hambatan COX-2 terhadap sel MCF-7

##### 5.4.1. Hasil Uji Sitotoksik terhadap sel MCF-7

Uji sitotoksitas yang dilakukan pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan sitotoksik larutan uji terhadap sel MCF-7. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel V.5.

Tabel V.5. Pengamatan Hasil Uji Sitotoksik pada sel MCF-7

sampel	replikasi1	replikasi 2	replikasi 3	rata2	Persenta se hidup sel MCF7
kontrol	0.428	0.407	0.407	0.4140	
media	0.111	0.113	0.11	0.1113	
1AT 0.5 ug/ml	0.392	0.398	0.393	0.3943	93.50
1AT 5 ug/ml	0.394	0.402	0.47	0.4220	102.64
1AT 50ug/ml	0.402	0.409	0.428	0.4130	99.67
<b>1AT 500 ug/ml</b>	0.358	0.311	0.292	0.3203	<b>69.06</b>
2AT 0.5 ug/ml	0.38	0.354	0.394	0.3760	87.45
2AT 5 ug/ml	0.372	0.404	0.413	0.3963	94.16
2AT 50ug/ml	0.406	0.401	0.395	0.4007	95.60
<b>2AT 500 ug/ml</b>	0.32	0.321	0.319	0.3200	<b>68.95</b>
6AT 0.5 ug/ml	0.376	0.416	0.406	0.3993	95.15
6AT 5 ug/ml	0.415	0.407	0.433	0.4183	101.43
6AT 50 ug/ml	0.397	0.363	0.348	0.3693	85.24
6AT 500 ug/ml	0.333	0.334	0.334	0.3340	<b>73.57</b>
EPMS 0.5 ug/ml	0.394	0.365	0.404	0.3877	91.30
EPMS 5 ug/ml	0.382	0.382	0.41	0.3913	92.51
EPMS 50ug/ml	0.400	0.410	0.387	0.3990	95.04
<b>EPMS 500 ug/ml</b>	0.333	0.313	0.34	0.3287	<b>71.81</b>

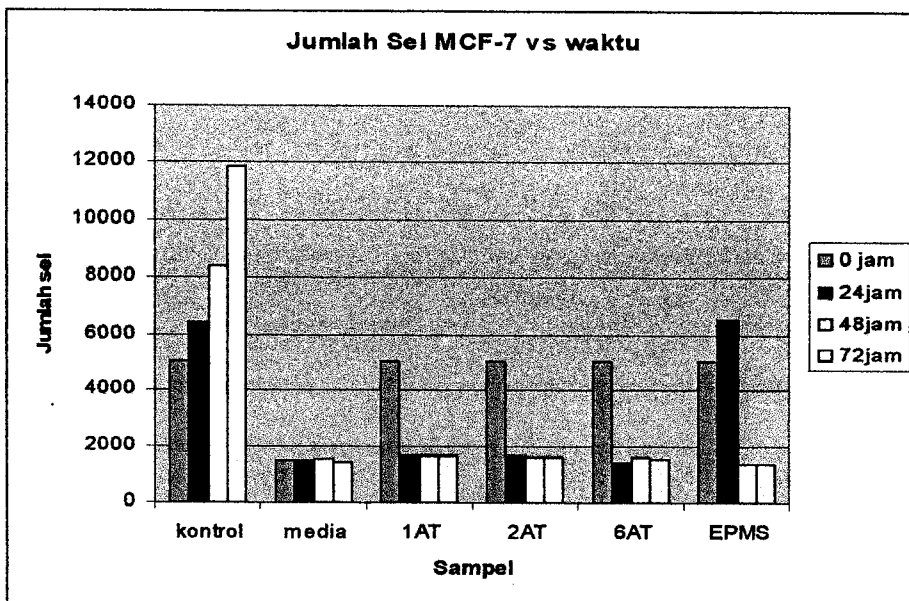
Uji sitotoksik pada Tabel V.5. tampak bahwa sampai pada konsentrasi 500 ug/ml inkubasi 24 jam, semua senyawa uji menunjukkan hasil aktifitas sitotoksik yang relatif rendah. Semua senyawa uji menunjukkan aktivitas sitotoksik terbesar pada konsentrasi 500 ug/ml, yang dipengaruhi oleh lipofilitas senyawa uji.

Uji aktivitas sitotoksik ini menggunakan metode kolorimetrik berdasarkan kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria untuk mengkonversi MTT {(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid}, suatu substrat berwarna kuning yang tidak larut dalam air, menjadi formazan yang berwarna biru gelap yang juga tidak larut dalam air dan melekat pada sel (Doyle *and* Griffiths, 2000). Jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup (Mosmann, 1983).

Reaksi reduksi MTT menjadi formazan hanya dapat dilakukan oleh sel hidup, oleh karena itu absorbansi dari formazan yang terbentuk berbanding lurus terhadap viabilitas populasi sel (Mossman, 1983). Kemampuan enzimatik ini diperkirakan berbeda pada tiap sel yang masih hidup, ada kemungkinan terdapat sel yang masih normal, tapi

juga terdapat sel yang terkena efek toksik dan belum mati sehingga kemampuan enzimatisnya akan menurun. Pertimbangan itulah yang kemudian mendasari pengkonversian data absorbansi menjadi persen kehidupan sel, bukan sebagai persen kematian sel.

Hasil pengamatan uji anti proliferasi pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$  ditampilkan pada Gambar 5.15.



Gambar 5.15. Histogram Jumlah sel MCF-7 vs. waktu

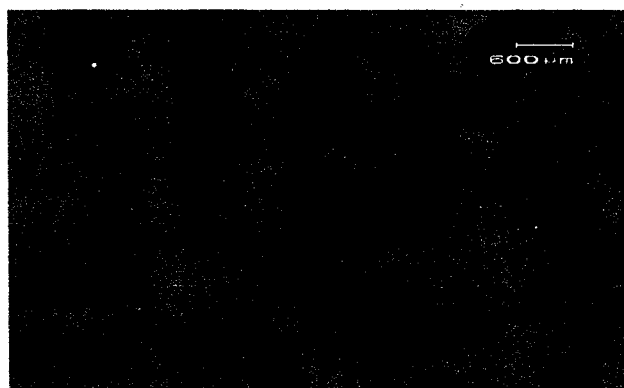
Pada Gambar 5.15 tampak bahwa ada perbedaan bermakna ( $\alpha < 0,05$ ) hasil uji anti proliferasi antara kontrol, media, sampel 1AT, 2AT, 6AT dan EPMS. Terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara aktivitas EPMS dengan turunannya aktivitas anti proliferasi. Untuk mengetahui apakah aktivitas antiproliferasi tersebut melalui hambatan COX-2, maka dilakukan uji imunositokimia COX-2 terhadap MCF-7.

Hasil pengamatan uji imunositokimia dapat dilihat pada gambar 5.16-5.18.

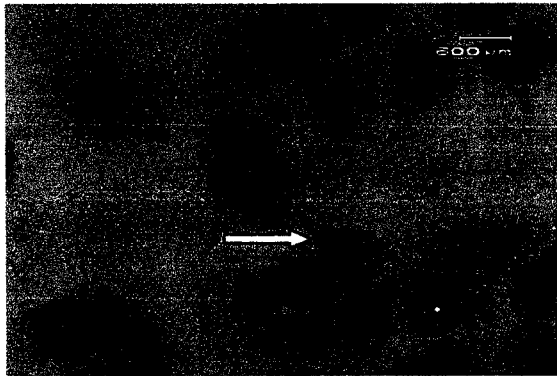


Gambar 5.16. Sel MCF7 diberi antiCOX-2

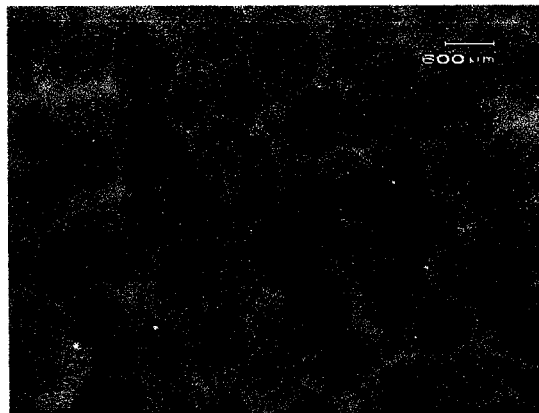
Dari Gambar 5.16. tersebut, tampak bahwa sel MCF-7 tidak mengekspresikan COX-2. Hal ini sejalan dengan penelitian Liu & Rose (1996) dan Timoshenko *et al.* (2008). Pada Gambar 5.16. tersebut, beberapa sel MCF7 menunjukkan hiperkromatin, beberapa sel menunjukkan mitosis (profase) yang menunjukkan sel kanker tersebut sangat aktif. Setelah diberi perlakuan berupa sample EPMS, 1AT, 2AT dan 6AT terhadap sel MCF-7, tampak seperti pada Gambar 5.17-5.20.



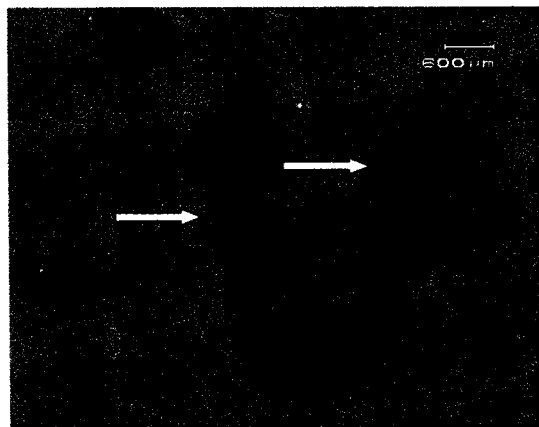
Gambar 5.17. Sel MCF7 + EPMS diberi antiCOX-2



Gambar 5.18. Sel MCF7 + 1AT, diberi antiCOX-2



Gambar 5.19. Sel MCF7 + 2AT diberi antiCOX-2



Gambar 5.20. Sel MCF7 + 6AT diberi antiCOX-2

Secara kualitatif, pada gambar 5.17-5.20, tampak adanya tanda-tanda kematian sel yaitu piknosis dan karyoreksis. Hal itu memperkuat hipotesis adanya efek hambatan pertumbuhan kanker payudara dari senyawa-senyawa derivat EPMS. Saran dari pene-

litian ini adalah melakukan uji pada sel kanker lain seperti sel kanker payudara T47D dan pengujian *in vivo*, sehingga diperoleh informasi yang sesuai tentang hambatan COX-2 pada sel kanker payudara.



## KESIMPULAN dan SARAN

### Kesimpulan :

1. Berdasarkan moldock score, derivat EPMS yang mempunyai afinitas lebih tinggi terhadap COX-2 adalah tiourea.
2. Derivat tiourea dari EPMS dapat diperoleh dari reaksi substitusi dan adisi nukleofilik terhadap asil halidanya.
3. Derivat tiourea dari EPMS memiliki aktivitas antiproliferasi sel MCF-7 dan menyebabkan terjadinya piknosis dan karyoreksis pada MCF7.
4. Derivat tiourea EPMS belum terbukti menghambat ekspresi COX-2 pada sel MCF-7.

### Saran :

1. Perlu dilakukan uji hambatan ekspresi COX-2 pada sel kanker payudara lain, mis T47D.
2. Perlu dilakukan penelitian ADMET terhadap senyawa-senyawa derivat tiourea dari EPMS.
3. Perlu dilakukan uji in vivo terhadap senyawa-senyawa yang memenuhi persyaratan ADMET.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ackerstaff E, Barjor Gimi, Dmitri Artemov, and Zaver M Bhujwalla. 2007. Anti-Inflammatory Agent Indomethacin Reduces Invasion and Alters Metabolism in a Human Breast Cancer Cell Line. *Neoplasia*. March; 9(3): 222–235.
- Dolzhenko AV, Korkodinova LM, Kotegov VP, Vasilyuk MV, Novikova VV, 2006. Synthesis And Biological Activity of N-Acyl-5-broanthranilic Acids, *Pharm. Chem. Journal*. Vol. 40 (8), pp. 418-420
- Ekowati J, Suzana, Nuzul WD, Susilowaty MI, Hadi Poerwono, Rudyanto M, Astika GN, Syahrani A, Siswono H, Tutuk Budiati, 2007. Novel Analgesic Compounds from *p*-hydroxycinnamic acid. *First Collaborative Joint Seminar USM-Unair*, Penang, Malaysia.
- Ekowati J, Nuzul WD, Hadi Poerwono, Siswandono, Tutuk Budiati, Shigeru Sasaki, Takayasu Yamauchi, Kimio Higashiyama, 2007. Structure Modification of *p*-methoxycinnamic acid Isolated from *Kaempferia galanga* to Improve its antinociceptive activity. *Research Report Colaborative Research Airlangga University-Hoshi University*, PHK-B Universitas Airlangga.
- Mc Murry, 2000. *Organic Chemistry*. 5<sup>th</sup> Ed., Wadsworth Inc., Belmont. California.
- Michaux C., de Leval X., Julemont F., Dogne Jean-Michel, Pirotte B., Durant F., 2006. Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors and identification of original lead compounds from 3D data base searching method. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol 41 (12). pp. 1446-1455.
- Sadono and Hasmono D., 2000. The Availability Involve / Profile of Farmakokinetic of Crystal EPMS (The Active Isolate Substance of Powder Rimpang *Kaempferia galanga*) at Rabbit as Animal Researches, *Research Report, Institute Research of Airlangga University, Surabaya*.
- 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*. Vol. 27 (Suppl.2) : Thai herbs.pp.504-507.
- Rainsford, 2007. Anti Inflammatory Drug in 21<sup>st</sup> Century, *Subcell Biochem* 2007; 42 : 3-27.
- Rigas, B; Kashfi, K. 2005. Cancer prevention: a new era beyond cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther.*;314:1–8
- 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.
- Xue Y, Chen H. 2001. The anti tumor promoters from *Kaempferia galanga* L. one kind of traditional chinese vegetables. *Abstracts of the XVIIth EUCARPIA Congress.Edinburg. Scotland*.

## DAFTAR PUBLIKASI ILMIAH :

## 1. Publikasi : Submit : Jurnal Farmasi Indonesia

## Judul :

Sintesis Turunan *p*-metoksisinamoiltiourea & Uji Aktivitasnya sebagai Anti Inflamasi

Jani Ekowati<sup>1\*</sup>, J. Khotieb<sup>2</sup>, N. Dahlia<sup>1</sup>, Siswandono<sup>1</sup>, T. Budiati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Departemen Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

**Abstrak**

Tujuan penelitian ini adalah sintesis dua turunan *p*-metoksisinamoiltiourea, yaitu *N*-(*p*-metoksi-sinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dari material awal asam *p*-metoksisinamat dan uji aktifitasnya sebagai antiinflamasi. Metode pemanasan konvensional dengan lama pemanasan total 3,5 jam menghasilkan persentase hasil masing-masing 34% dan 26 %. Hasil uji aktivitas antiinflamasi kedua senyawa uji terhadap mencit yang diinduksi *Complete Freud Adjuvant* secara intraplantar dengan parameter waktu ketahanan panas dan tebal plantar menghasilkan data kedua senyawa uji memiliki aktivitas antiinflamasi pada dosis 50-200 mg/kgBB. Berdasarkan analisis dengan Two way Anova, menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna aktivitas antiinflamasi kedua senyawa uji ( $p > 0,05$ ) dengan parameter waktu ketahanan panas dan tebal plantar.

**Abstract**

The object of this research was synthesizing of two derivatives of *p*-methoxycinnamoylthiourea, ie. *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*N'*-(*p'*-methoxyphenyl)thiourea and *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*N'*-(phenyl) thiourea from *p*-methoxycinnamic acid as starting material, then evaluated their activity as anti inflammatory. Total time reaction for 3.5 hr by conventional method produced 34% and 26% yield, respectively. Both compounds showed anti inflammatory activity in dose 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200mg/kg bw by intraplantar induction of *Complete Freud Adjuvant*. No significantly different activity of both compounds ( $p > 0,05$ ) by Two way Anova, with heat resistency time and thickness of plantar as parameter.

## Sintesis Turunan *p*-metoksisinamoiltiurea dan Uji Aktivitasnya sebagai Anti Inflamasi

Juni Ekowati<sup>1\*</sup>, J. Khotieb<sup>2</sup>, N. Dahlia<sup>1</sup>, Siswandono<sup>1</sup>, T. Budiati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Departemen Biomedik Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

### Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah sintesis dua turunan *p*-metoksisinamoiltiurea, yaitu *N*-(*p*-metoksinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiurea dan *N*-(*p*-metoksinamoil)-*N'*-(fenil)tiurea dari material awal asam *p*-metoksinamat dan uji aktifitasnya sebagai antiinflamasi. Metode pemanasan konvensional dengan lama pemanasan total 3,5 jam menghasilkan persentase hasil masing-masing 34% dan 26 %. Hasil uji aktivitas antiinflamasi kedua senyawa uji terhadap mencit yang diinduksi *Complete Freud Adjuvant* secara intraplantar dengan parameter waktu ketahanan panas dan tebal plantar menghasilkan data kedua senyawa uji memiliki aktivitas antiinflamasi pada dosis 50-200 mg/kgBB. Berdasarkan analisis dengan Two way Anova, menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna aktivitas antiinflamasi kedua senyawa uji ( $p > 0,05$ ) dengan parameter waktu ketahanan panas dan tebal plantar.

### Abstract

The object of this research was synthesizing of two derivatives of *p*-methoxycinnamoylthiourea, ie. *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*N'*-(*p'*-methoxyphenyl)thiourea and *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*N'*-(phenyl)thiourea from *p*-methoxycinnamic acid as starting material, then evaluated their activity as anti inflammatory. Total time reaction for 3.5 hr by conventional method produced 34% and 26% yield, respectively. Both compounds showed anti inflammatory activity in dose 50 mg/kg, 100 mg/kg and 200mg/kg bw by intraplantar induction of *Complete Freud Adjuvant*. No significantly different activity of both compounds ( $p > 0,05$ ) by Two way Anova, with heat resistency time and thickness of plantar as parameter.

### Pendahuluan

Prevalensi penderita nyeri inflamasi yang terus meningkat dan efek samping obat analgesik anti inflamasi terhadap penderita telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Nyeri yang menimbulkan rasa tidak menyenangkan tersebut menyebabkan penurunan kualitas hidup penderita karena terjadinya pembatasan fungsi tubuh (Tunks *et al*, 2008; Page *et al*, 2002). Sebagian besar efek terapi dan efek samping obat analgesik anti inflamasi berdasarkan penghambatan biosintesis prostaglandin, terutama menghambat enzim cyclooxygenase (COX), yang mempunyai dua bentuk isoform COX-1 dan COX-2.

Hambatan pada aktivitas COX-1 menyebabkan gangguan pada saluran cerna (Dilber *et al.*, 2008; Dipiro, 2008). Ditemukannya senyawa golongan coxib, penghambat COX-2 selektif yang memiliki efek samping lebih rendah terhadap saluran cerna ternyata belum memberikan hasil memuaskan. Hambatan yang terlalu besar terhadap aktivitas

COX-2 memberikan efek samping yang serius terhadap kardiovaskular, sehingga terjadi penarikan rofecoxib dari peredaran (Rainsford, 2007). Oleh karena itu, masih perlu dilakukan pencarian anti inflamasi yang lebih aman.

Usaha untuk memperoleh anti inflamasi yang berefek samping minimal, berawal dari ditemukannya beberapa asam amino yang berbeda pada *binding site* COX-1 dan COX-2 (Simon *et al*, 2004). Michaux *et al.*, (2006) melaporkan pendekatan berdasarkan topologi *binding site* pada COX-2, yaitu adanya 4 poin farmakofor COX-2, yaitu satu akseptor ikatan hidrogen, dua gugus hidrofobik dan satu gugus aromatik.

Beberapa turunan tiourea telah dilaporkan mempunyai aktivitas antiinflamasi diantaranya 4-nitrobenzoiltiourea dan 4-klorobenzoiltiourea (Budiati dkk, 2010). Berdasarkan hal tersebut di atas, pada penelitian ini akan disintesis dua turunan *p*-metoksisinamoiltiourea yaitu *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*(*p'*-metoksifenil)tiourea, serta diuji aktivitasnya sebagai anti inflamasi. Sejauh ini penelitian ini belum pernah dilaporkan sebelumnya. Berdasarkan analisis retrosintesis, *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*(fenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*(*p'*-metoksifenil)tiourea dapat disintesis dari asam *p*-metoksisinamat melalui dua tahapan reaksi yaitu reaksi adisi dan substitusi nukleofilik (Gambar 1).

Asam *p*-metoksisinamat (APMS) merupakan salah satu material awal yang berpotensi dikembangkan menjadi senyawa baru yang memiliki aktivitas penghambat COX-2. Struktur APMS mengandung gugus fungsi asam karboksilat, inti aromatis, gugus metoksi dan ikatan rangkap vinilik. APMS bisa disintesis dari reaksi Knoevenagel (Ekowati *et al*, 2005) maupun hidrolisis etil *p*-metoksisinamat dari rimpang kencur. APMS sebagai analgesik memiliki ED<sub>50</sub> 93,65 mg/kg (Ekowati *et al.*, 2007). Dalam usaha untuk meningkatkan aktifitasnya sebagai anti inflamasi, APMS akan dimodifikasi strukturnya dengan penambahan farmokofor tertentu, yaitu gugus-gugus akseptor ikatan hidrogen, dua gugus hidrofobik, dan gugus aromatis (Gambar 2).

Pengujian aktivitas anti inflamasi dilakukan secara per oral, dengan beberapa dosis pada hewan coba mencit yang dibuat model inflamasi dengan diinjeksi *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) (LaBuda & Fuchs, 2000). Parameter yang akan diamati adalah waktu ketahanan terhadap stimulus panas dengan metode stimulasi panas *warm plate* (48°C) dan tebal plantar pada kaki mencit yang telah diinjeksi CFA dibandingkan dengan celecoxib.

### Metodologi

**Kimiawi :** Semua bahan kimia dari E.Merck. Penentuan titik leleh dengan sistem kapiler memakai alat Mel Temp tanpa dikoreksi. Waktu ketahanan panas diuji dengan *Hot Plate* 35100 (Ugo Basile), sedangkan tebal plantar diukur dengan jangka sorong. Penentuan spektra  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  diperoleh Spektrometer BRUKER instrument, Pembuatan spektra IR dengan Spektrofotometer IR Perkin Elmer Spectrum One. Spektra MS ditentukan dengan JEOL JMS 600 spectrometer (EI).

**Sintesis *p*-metoksisinamoilklorida.** 5,6 mmol APMS, benzena 20 ml, piridin 0,02 ml dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan 28 mmol tionil klorida. Campuran tersebut dialiri dengan gas nitrogen, direfluks 24 jam, pada suhu 80-85°C. Sisa tionil klorida dalam benzena diuapkan dengan rotavapor. Residu ditambah dengan benzena 10 ml, kemudian benzena diuapkan dengan rotavapor, residu disimpan dalam gas nitrogen.

**Sintesis Turunan *p*-metoksisinamoiltiourea.** Ke dalam labu alas bulat dimasukkan 7,5 mmol amonium tiosianat, 0,4 ml PEG 400, 5 mmol *p*-metoksisinamoil klorida dan 15 ml diklorometana, diaduk dan direfluks pada 40-50°C selama 1,5 jam. Setelah itu, 5 mmol amina aromatis (anilin atau *p*-metoksianilin) ditambahkan dan direfluks lagi pada suhu yang sama selama 3 jam. Hasil reaksi diuapkan pada lemari asam hingga didapatkan senyawa berbentuk padat. Padatan dicuci berturut-turut dengan larutan HCl

0,1 N, larutan  $\text{NaHCO}_3$  5% dan air. Padatan direkristalisasi dengan etanol 70%. Identifikasi senyawa hasil sintesis dilakukan secara spektrofotometri IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  dan HRMS.

### **Uji aktivitas Antiinflamasi dengan induser CFA**

**Penyiapan Hewan Coba.** Pada penelitian ini digunakan mencit putih *Mus Musculus* strain BalB/c (Pusvetma), jantan dengan berat badan 20-25 gram, umur 2-3 bulan, sehat, tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh, sebanyak 72 ekor (9 kelompok). Mencit tersebut ditempatkan dalam kandang dengan temperatur ruangan  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang cukup, diadaptasikan lingkungan selama satu minggu sebelum perlakuan. Kelompok uji terdiri dari kelompok yang tidak diinjeksi CFA, kelompok plasebo (mencit diinjeksi CFA tetapi hanya diberi CMC-Na), kelompok yang diberi senyawa pembanding (celecoxib), dan 2 kelompok mencit untuk senyawa uji dengan 3 takaran dosis yang berbeda.

**Penyiapan Senyawa Uji.** Senyawa uji dibuat dalam bentuk suspensi dalam CMC-Na 0,5%, diberi peroral dengan volume 0,5ml/20mgBB. Dosis Celecoxib sebagai pembanding 40 mg/kgBB. Dosis senyawa uji yaitu *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-feniltiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea berturut-turut 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB.

**Pembuatan Model Inflamasi.** Pada kelompok inflamasi, mencit dibuat model nyeri inflamasi melalui injeksi CFA pada daerah intraplantar tungkai kaki sebelah kanan atau kiri (0,04 ml) dengan *syringe* Hamilton jarum ukuran 26G. Setelah itu mencit dianestesi dengan eter, dan ditempatkan pada papan bedah dengan posisi tengkurap. Mencit diinjeksi, kemudian dimasukkan ke kandang sesuai kelompoknya. Pada kelompok kontrol dilakukan perlakuan yang sama dengan injeksi normal saline sebagai pengganti CFA.

## Tahapan Pengujian

**Evaluasi hiperalgesia.** Pada uji ini, mencit ditempatkan pada *warm plate* yang diatur pada suhu  $48 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , kemudian penghitung waktu diaktifkan. Respon nyeri mencit diamati seperti *licking, jumping, tapping, fluttering, frizing, rearing (escape)*. Pada saat respon terjadi, penghitung waktu segera dimatikan dan mencit dikeluarkan dari *warm plate*. Besaran waktu yang didapat dicatat dalam satuan detik (s). Pengujian waktu ketahanan terhadap stimulus panas dilakukan pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, dan 21. *Baseline* juga ditentukan terlebih dahulu sebelum injeksi dilakukan pada hari ke 0.

**Evaluasi tebal plantar.** Pengukuran evaluasi tebal plantar dilakukan dengan jangka sorong. Pengukuran tebal plantar dilakukan pada hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14 dan 21.

**Analisis Statistik.** Waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas dan tebal plantar pada tiap kelompok dosis dibandingkan dengan kontrol negatif dan positif dengan uji statistik pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 14, sampai 21. Uji statistik yang digunakan adalah *two way ANOVA*.

## Hasil dan Pembahasan

**Sintesis.** Sintesis turunan tiourea dapat dilakukan melalui beberapa jalur seperti yang dilaporkan oleh Katritzky *et al.* (2004) dan Xiao *et al.* (2009). Pada penelitian ini dipilih jalur reaksi sintesis turunan tiourea melalui reaksi antara halida asam, ammonium tiosianat dan amina aromatis seperti yang pernah dilaporkan oleh Xu *et al.* (2003) dan Budiati *et al.* (2010). Sintesis turunan *p*-metoksisinamoiiltiourea diawali dengan preparasi *p*-metoksisinamoiil klorida dari APMS dan diperoleh persentase hasil 90%, berupa padatan kuning pucat (tl.  $51^{\circ}\text{C}$ ) MS  $m/z$  EI, 196 ( $\text{M}^+$ ).  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 3.87 (3H, s), 6.51 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz), 6.96 (2H, d,  $J = 5.0$  Hz), 7.53 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz), 7.62 (2H, d,  $J =$



5.0 Hz ). HRMS (EI, m/z) *Calc. Mass* C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>Cl 196.0291. *Measured Mass* 196.0276.

Setelah diperoleh *p*-metoksisinamoil klorida, selanjutnya melalui dua tahap reaksi menghasilkan derivat *p*-metoksisinamoiltiourea. Pada tahap pertama adalah reaksi substitusi nukleofilik antara *p*-metoksisinamoil klorida dengan ammonium tiosianat menggunakan katalis PEG 400. Reaksi tahap kedua adalah adisi nukleofil, yaitu atom N dari amina aromatis (yaitu anilin dan *p*-metoksianilin), me-nyerang atom C yang terikat pada gugus gugus C=N yang bermuatan positif sehingga akan terbentuk turunan *p*-metoksisinamoiltiourea yaitu *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea & *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea.

Persentase hasil sintesis *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-feniltiourea sebanyak 26%, berupa kristal kuning (tl. 199-200°C). MS m/z EI, 312 (M<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.87 (3H, s), 6.31 (1H, d, *J* = 15.60 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 15.60 Hz ), 7.71 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 6.94 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 7.50 (2H, d, *J* = 9.60 Hz), 7.41 (2H, t, *J* = 6.80 Hz), 7.28 (1H, t, *J* = 10.80 Hz), 8.69 (1H, s), 12.63 (1H,s). IR (KBr) 3222, 3031, 1671, 1591, 1537, 1244, 1149, 826 cm<sup>-1</sup>. <sup>13</sup>C NMR (DMSO) 55.46 ppm, 114.96 ppm, 124.16 ppm, 126.37 ppm, 126.79 ppm, 128.86 ppm, 130.41 ppm, 137.68 ppm, 146.45 ppm, 162.19 ppm, 166.02 ppm, 178.66 ppm. *Calc. Mass* C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> 312.0932. *Measured Mass* 312.0928.

Persentase hasil sintesis *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea sebesar 34%, berupa kristal hijau muda (tl. 181-182°C). MS m/z EI , 342 (M<sup>+</sup>). <sup>1</sup>H NMR (DMSO) 3.76 (3H, s), 3.80 (3H,s), 6.86 (1H, d, *J* = 15.80 Hz), 6.95-7.03 (4H, m), 7.51-7.59 (4H, m), 7.70 (1H, d, *J* = 15.80 Hz ), 11.43 (1H, s), 12.58 (1H,s). <sup>13</sup>C NMR (DMSO) 55.49, 55.61, 114.01, 114.84, 117.23, 125.92, 126.88, 130.33, 130.94, 144.60, 157.59, 161.65, 166.83, 179.23 ppm. IR (KBr) 3235, 3034, 1673, 1593, 1509, 1252, 1150, 825 cm<sup>-1</sup>. *Calc. Mass* C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> 342.1038. *Measured Mass*. 342,1031.

Dari penelitian ini diketahui adanya gugus metoksi yang bersifat pendorong elektron pada *p*-metoksianilina dapat meningkatkan persentase hasil *N*-(*p*-metoksisinamoil)-

*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea yang lebih besar dibandingkan persentase hasil sintesis *N*-(4-metoksisinamoil)-*N'*-feniltiourea. Adanya resonansi pada *p*-metoksianilina akan menyebabkan atom C aromatik yang terikat pada atom N menjadi lebih elektronegatif sehingga atom N pada *p*-metoksianilin kereaktifannya meningkat sebagai nukleofil (Mc Murry, 2008).

Persentase hasil reaksi pada kondisi reaksi diatas masih belum maksimal, yang disebabkan terlalu lama reaksi pada tahap pertama sehingga ada kecenderungan *p*-metoksisinamoil isotiosianat bereaksi lanjutan dengan amonium tiosianat, sehingga jumlah *p*-metoksisinamoil isotiosianat yang bereaksi dengan anilin maupun *p*-metoksianilin berkurang. Oleh karena itu dibutuhkan penelitian lanjutan optimasi kondisi reaksi.

**Uji Aktivitas.** Pada penelitian ini, nyeri inflamasi secara patofisiologi, diperoleh dengan cara injeksi intraplantar CFA 40  $\mu$ l pada kaki kanan mencit (Anonim,2007). Sebelum dilakukan injeksi intraplantar, dilakukan pengukuran waktu ketahanan terhadap stimulus panas dengan menggunakan *Warm Plate* dan tebal plantar dengan menggunakan jangka sorong untuk mendapatkan data *base line*.

Parameter yang diukur adalah waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas dan tebal plantar pada kaki yang telah diinjeksi CFA. Hasil pengamatan pada Gambar 3, menunjukkan perubahan penurunan waktu ketahanan terhadap stimulus panas pada kelompok mencit yang mendapat perlakuan injeksi CFA. Pada mencit yang mendapatkan injeksi intraplantar *Normal Saline* (NS) tidak mengalami inflamasi, ditandai dengan tidak berubahnya waktu ketahanan stimulus panas pada uji dengan menggunakan *warm plate*.

Pada gambar 4, tampak peningkatan tebal plantar mulai terlihat pada hari ke-2 ( $p < 0,001$ ) dan proses inflamasi mencapai puncak pada hari ke-7 setelah pemberian injeksi CFA. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara

kelompok injeksi intraplantar CFA dan kelompok injeksi NS dengan parameter waktu ketahanan terhadap stimulus panas yang ditunjukkan mulai hari ke-3 setelah injeksi CFA ( $F_{(1,70)} = 108,35$ ;  $p=0,001$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-3 setelah mendapatkan injeksi intraplantar CFA mencit telah mengalami nyeri inflamasi. Perbedaan bermakna juga terukur pada parameter tebal plantar antara kelompok yang mendapat injeksi NS dan kelompok yang mendapat injeksi CFA ( $F_{(1, 70)} = 507,61$ ;  $p < 0,001$ ).

Pemberian injeksi intraplantar CFA mengakibatkan terjadinya proses inflamasi melalui pengaktifan respon seluler dan humoral antibodi tubuh. Pada keadaan inflamasi yang disebabkan oleh CFA, membutuhkan aktivitas sistem imun terutama makrofag. Proses inflamasi yang terjadi dimulai setelah proses kemotaksis dan fagositosis. Pada proses ini fosfolipase  $A_2$  yang terikat pada membran sel akan dilepaskan, sehingga terjadi pengaktifan jalur asam arakidonat. Metabolisme asam arakidonat melalui jalur *cyclooxygenase* menghasilkan prostaglandin dan tromboksan. Beberapa penelitian menunjukkan mediator yang paling dominan pada perkembangan inflamasi dan nyeri adalah PGE2 dan PGI2 (Simmons, 2004).

Proses inflamasi yang terjadi juga mengakibatkan ekstrasvasasi dan deposisi cairan plasma serta protein sehingga terjadi oedema. Tanda-tanda lain terjadinya inflamasi adalah kemerahan, peningkatan temperatur tempat inflamasi dan *hyperalgesia* (Katzung, 2002).

**Efek senyawa uji pada mencit yang mengalami nyeri inflamasi.** Setelah mencit mengalami inflamasi, diberikan senyawa uji *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N*-(fenil)tiourea dengan dosis 50 mg/kg, 100 mg/kg, dan 200 mg/kg per oral, yang bertujuan untuk menguji pengaruh senyawa baru ini dalam penghambatan perkembangan nyeri inflamasi. Sebagai pembanding adalah celecoxib dosis 40 mg/kgBB. Perlakuan tersebut

dimulai pada hari ke-7 setelah mencit mendapatkan injeksi intraplantar CFA, selanjutnya berturut-turut setiap hari selama tujuh hari sampai hari ke-13. Pengamatan dilakukan pada hari ke 8, 10, 12 dan 14. Hasil pengamatan terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pemberian senyawa uji pada mencit yang mengalami nyeri inflamasi dengan parameter waktu ketahanan terhadap stimulus panas

Kel	Perlakuan	Waktu ketahanan stimulus panas (detik) hari ke- (X ± SD)			
		8	10	12	14
Injeksi NS (n=8)	CMC-Na	12.58±5.29	13.80± 5.36	11.00±3.83	12.20±2.99
Injeksi CFA (n=64)	CMC-Na	6.18±1.86	6.78±2.29	6.41±2.55	7.19±3.63
	Celecoxib 40mg/kg	7.49±2.57	8.29±1.57	9.20±3.38	9.18±2.84
	Senyawa 1 (50mg/kg)	7.17±1.57	8.99±1.81	9.11±1.66	9.43±1.89
	Senyawa 1 (100mg/kg)	8.29±8.07	9.00±2.96	10.05± 3.17	11.21±2.88
	Senyawa 1 (200mg/kg)	9.35±1.78	9.60±2.90	10.47±1.98	11.30±1.84
	Senyawa 2 (50mg/kg)	7.64±2.23	8.73±2.66	9.60±2.08	9.99±2.83
	Senyawa 2 (100mg/kg)	8.70±2.32	8.88±3.49	9.35±1.99	10.54±2.65
	Senyawa 2 (200mg/kg)	8.93±1.61	10.58±1.85	11.06±1.49	11.80±3.29

Keterangan :

NS = injeksi Normal saline; CFA = injeksi Complete Freund's Adjuvant;

Senyawa 1 = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea per oral

Senyawa 2 = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea per oral

Dari Tabel 1 di atas diketahui bahwa pemberian *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dengan dosis 50mg/kg, 100mg/kg dan 200mg/kg menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok CMC-Na ( $p < 0.001$ ). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji memberikan efek terhadap penurunan nyeri inflamasi. Jika dibandingkan dengan celecoxib 40mg/kg, hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ) yang berarti *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea memiliki efek yang hampir sama dengan celecoxib. Perhitungan  $ED_{50}$  senyawa uji masing-masing *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea = 98,87 mg/BB dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea = 101,20 mg/kgBB.

Pengaruh pemberian senyawa uji pada tebal plantar kaki mencit setelah injeksi NS dan CFA yang dilakukan pada hari 8, 10, 12 dan 14, tampak pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh pemberian senyawa uji pada mencit yang mengalami inflamasi dengan parameter tebal plantar setelah injeksi CFA.

Kel	Perlakuan	Tebal plantar (cm) setelah injeksi hari ke- ( $\bar{X} \pm SD$ )			
		8	10	12	14
Injeksi NS (n=8)	CMC-Na	0.244± 0.018	0.237± 0.015	0.241± 0.022	0.240± 0.022
Injeksi CFA (n=64)	CMC-Na	0.406± 0.016	0.379± 0.030	0.376± 0.021	0.348± 0.018
	Celecoxib 40mg/kg	0.329± 0.027	0.327± 0.032	0.321± 0.037	0.311± 0.038
	Senyawa 1 (50mg/kg)	0.362± 0.043	0.341± 0.049	0.336± 0.052	0.321± 0.046
	Senyawa 1 (100mg/kg)	0.361± 0.025	0.350± 0.030	0.331± 0.033	0.314± 0.027
	Senyawa 1 (200mg/kg)	0.365± 0.027	0.348± 0.024	0.320± 0.021	0.301± 0.033
	Senyawa 2 (50mg/kg)	0.363± 0.035	0.338± 0.055	0.334± 0.029	0.317± 0.022
	Senyawa 2 (100mg/kg)	0.360± 0.025	0.359± 0.032	0.341± 0.019	0.310± 0.031
	Senyawa 2 (200mg/kg)	0.361± 0.022	0.335± 0.018	0.320± 0.021	0.300± 0.016

Keterangan :

NS = injeksi Normal saline; CFA = injeksi Complete Freund's Adjuvant ;

Senyawa 1 = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea per oral

Senyawa 2 = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea per oral

Dari Tabel 2 di atas dan dilanjutkan analisis statistik uji *Two Way ANOVA* ( $p < 0.01$ ) diketahui bahwa senyawa *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea pada dosis 50mg/kg, 100mg/kg, dan 200mg/kg menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok CMC-Na. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji memberikan efek penurunan nyeri inflamasi. Bila senyawa uji dibandingkan dengan celecoxib 40mg/kg ( $p > 0,05$ ), menunjukkan pada senyawa dosis 50 dan 100 mg/kg tidak ada perbedaan bermakna dengan celecoxib. Namun pada dosis 200mg/kg, senyawa uji memberikan perbedaan yang bermakna terhadap celecoxib, yaitu waktu ketahanan panas mencit lebih tinggi yang berarti memiliki efek lebih baik dari celecoxib.

Berdasarkan data-data di atas, menunjukkan bahwa kedua senyawa uji pada dosis 50, 100, dan 200 mg/kg memberikan perbedaan yang bermakna terhadap kelompok mencit yang hanya diberikan CMC-Na ( $p < 0,001$ ). Hal ini menunjukkan bahwa

kedua senyawa uji memiliki aktivitas dalam penurunan tebal plantar. Jika kedua senyawa uji dibandingkan dengan celecoxib, menunjukkan bahwa senyawa pada dosis 50 mg/kg tidak memberikan perbedaan bermakna ( $p>0,05$ ), tetapi pada dosis 100 dan 200 mg/kg memberikan perbedaan bermakna terhadap celecoxib ( $p<0,05$ ).

**Pengaruh penghentian pemberian senyawa uji pada aktivitas anti inflamasi.** Pengaruh penghentian pemberian senyawa uji terhadap waktu ketahanan panas maupun tebal plantar dilakukan pada hari ke-21. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Tabel 5 yang menunjukkan bahwa setelah penghentian pemberian senyawa uji tidak mengurangi efek yang ditimbulkan.

Tabel 5. Pengaruh penghentian pemberian senyawa uji pada mencit yang mengalami inflamasi dengan parameter waktu ketahanan terhadap stimulus panas.

Kelompok	Waktu ketahanan (detik) setelah injeksi ( $X \pm SD$ )	
	Hari ke-14	Hari ke-21
CFA + CMC-Na	7.19±3.63	6.34 ± 1.72
CFA + Celecoxib 40mg/kg	9.18±1.68	10.86± 2.84
CFA + Senyawa 1 (50mg/kg)	7.17±1.57	6.52 ± 1.31
CFA + Senyawa 1 (100mg/kg)	11.28±2.88	11.80 ± 1.63
CFA + Senyawa 1 (200mg/kg)	10.21±1.84	11.08 ± 2.60
CFA + Senyawa 2 (50mg/kg)	8.73±2.66	8.89 ± 1.48
CFA + Senyawa 2 (100mg/kg)	10.54±2.65	10.45 ± 1.06
CFA + Senyawa 2 (200mg/kg)	10.80±3.29	10.71 ± 3.18

Keterangan :

Senyawa 1= *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea per oral

Senyawa 2= *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea

Dengan uji *Independent t-test*, hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan waktu ketahanan terhadap stimulus panas dan tebal plantar pada tiap-tiap dosis pada hari ke-14 yaitu hari pengukuran setelah pemberian senyawa. Berdasarkan harga  $ED_{50}$  kedua senyawa uji, hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kedua senyawa dalam menurunkan rasa nyeri yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan waktu ketahanan terhadap stimulus panas ( $p>0,05$ ).

Tabel 6. Pengaruh penghentian pemberian senyawa uji pada mencit yang mengalami inflamasi dengan parameter tebal plantar

Kelompok	Tebal plantar (cm) setelah injeksi ( $X \pm SD$ )	
	Hari ke-14	Hari ke-21
CFA + CMC-Na	0.348±0.018	0.338± 0.022
CFA + Celecoxib 40mg/kg	0.311±0.038	0.292± 0.036
CFA + Senyawa 1 (50mg/kg)	0.314±0.045	0.298± 0.048
CFA + Senyawa 1 (100mg/kg)	0.314±0.027	0.302± 0.038
CFA + Senyawa 1 (200mg/kg)	0.311±0.033	0.296± 0.015
CFA + Senyawa 2 (50mg/kg)	0.317± 0.022	0.288±0.038
CFA + Senyawa 2 (100mg/kg)	0.316±0.031	0.305±0.025
CFA + Senyawa 2 (200mg/kg)	0.311±0.016	0.292±0.027

Keterangan :

Senyawa 1= *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea per oral

Senyawa 2= *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea per oral

Dari Tabel 6 di atas dan analisis *One Way ANOVA* pada hari ke-21 dan *Paired-Samples t-test* pada hari ke-14 dan 21, tidak ada perbedaan bermakna antara hari ke 14 dan 21 pada kedua senyawa tersebut. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa uji memiliki efek penjagaan (*maintenance effect*). Efek penjagaan tersebut diduga diakibatkan karena salah satu hasil metabolit senyawa uji adalah APMS memiliki aktivitas analgesik antiinflamasi yang terlibat langsung pada penghambatan mediator inflamasi.

.Aktivitas analgesik antiinflamasi senyawa uji ini berkaitan dengan adanya gugus farmakofor seperti pada senyawa penghambat COX-2 selektif yaitu cincin aromatik, akseptor ikatan H, dan gugus hidrofobik pada kedua senyawa uji tersebut (Michaux *et al*, 2006). Hal ini juga didukung oleh *docking study* yang telah dilakukan dengan program Mollegro v 11.00 (Ekowati *et al*, 2010). Pada Gambar 5 dan 6, tampak *docking* senyawa uji dengan penghambat COX-2 selektif di *active site* enzim tersebut. Dari Tabel 7 diperoleh data bahwa *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-feniltiourea memiliki *MolDockScore* terhadap COX-2 lebih rendah daripada *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea. Secara teoritis aktivitas antiinflamasi *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea juga akan lebih rendah daripada *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea.

Tabel 7. MolDock Score APMS, Celecoxib dan Senyawa Uji terhadap COX-2

No	Senyawa	MolDock Score for COX-2 (kkal/mol)
1.	APMS	-95.6337
2.	Celecoxib	-160.535
3.	<i>N</i> -( <i>p</i> -metoksisinamoil)- <i>N'</i> -feniltiourea	-141.426
4.	<i>N</i> -( <i>p</i> -metoksisinamoil)- <i>N'</i> -( <i>p'</i> -metoksifenil)tiourea	-153.824

Hasil uji aktivitas antiinflamasi senyawa uji secara *in vivo* secara teoritis berbeda dengan empiris. Hal ini disebabkan hasil uji juga dipengaruhi oleh fakta-fakta lain, yaitu hasil uji *in silico* dengan program ChemBioUltra v 12.00 terhadap senyawa uji. Berdasarkan uji *in silico* tersebut, diperoleh data bahwa nilai log P dari *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea adalah 3,52; sedangkan nilai log P dari *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea adalah 3,39. Nilai MR *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea adalah 92,07 cm<sup>3</sup>/mol, sedangkan nilai MR *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea adalah 99,32 cm<sup>3</sup>/mol.

Perbedaan sifat lipofilik dan sterik kedua senyawa uji disebabkan adanya penambahan gugus metoksi pada *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea. Gugus metoksi menyebabkan lipofilitas *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea menurun sedangkan halangan sterik lebih besar sehingga memiliki aktivitas anti-inflamasi lebih rendah dibandingkan senyawa *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea. Walaupun demikian, gugus metoksi memungkinkan terjadinya ikatan hidrogen yang lebih banyak antara *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea dengan reseptor karena terdapat penambahan atom O, sehingga aktivitas meningkat (Siswandono & Soekardjo, 2008).

Dari penelitian ini diperoleh informasi aktivitas turunan *p*-metoksisinamoiltiourea, yaitu *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea sebagai antiinflamasi berhubungan dengan aktivitas hambatan COX-2. Hal



ini sejalan dengan penelitian yang pernah dilaporkan oleh Sulaiman *et al*, (2007) dan Dilber *et al* (2008). Informasi ini menambah kemajuan di bidang farmasi dan kedokteran tentang calon obat baru bagi penyakit-penyakit lain yang berhubungan dengan aktivitas COX-2, seperti misalnya kanker (Dannenberg & Subbaramiah, 2003; Ackerstaff *et al*, 2007).

## Kesimpulan

1. Sintesis *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea dapat dilakukan dari material awal APMS dengan persentase hasil masing-masing 26% dan 34%.
2. *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dan *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea memiliki aktivitas antiinflamasi.
3. Tidak ada perbedaan potensi antiinflamasi dari kedua senyawa uji.

## Pustaka :

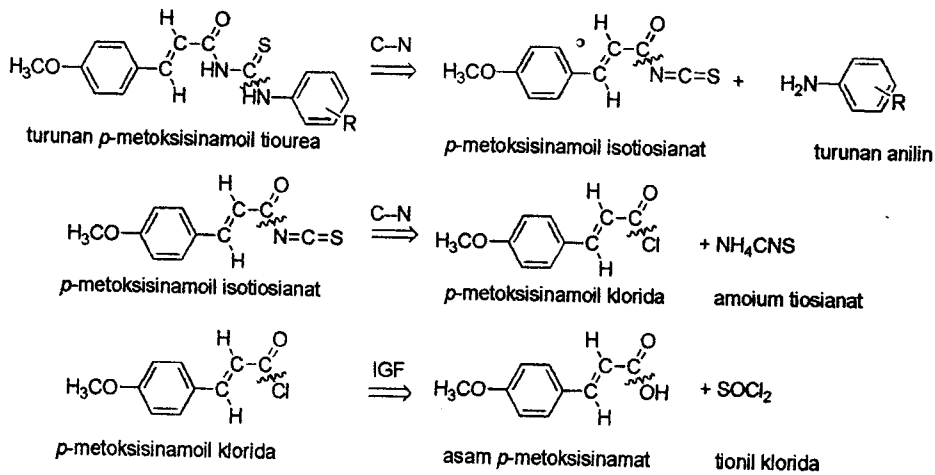
- Anonim. 2007. **Freund's Adjuvant**, [www.upenn.edu/regulatoryaffairs/pdf/3useof\\_CompleteFreundAdjuvant.pdf](http://www.upenn.edu/regulatoryaffairs/pdf/3useof_CompleteFreundAdjuvant.pdf), diakses 16 November 2009.
- Ackerstaff E, Barjor Gimi, Dmitri Artemov, and Zaver M Bhujwalla. 2007. Anti-Inflammatory Agent Indomethacin Reduces Invasion and Alters Metabolism in a Human Breast Cancer Cell Line. **Neoplasia**. 9(3), pp. 222–235.
- Baumann, T. J., 2008. Pain Management, in : Dipiro, J. T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Wells, B.G, & Posey, L.M., (Eds), **Pharmacotherapy : a Pathophysiology Approach. 7<sup>th</sup> edition**, New York : McGraw-Hill Companies, inc., pp.1103-1116.
- Budiati T, Suzana, Surdijati. 2010. Sintesis, Uji Aktivitas Analgesik dan Antiin-flamasi Senyawa Benzoiltiourea tersubstitusi. **Majalah Farmasi Indonesia** 21 (1). pp. 68-76.
- Dannenberg Aj & Subbaramiah K. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia : Rationale and promise. **Cancer cell**. 4, pp.431-436.
- Dilber, S.P., Dobric, S.L., Juranic, Z.D., Markovic, B.D., Vladimirov, S.M., & Juranic, I.O., 2008. Docking Studies & Anti-inflammatory Activity of  $\beta$ -Hydroxy-  $\beta$ -arylpropanoic Acids. Serbia : **Molecules**. pp.603-615.
- Ekowati, J., Suzana, Budiati, T. 2005. Pengaruh Posisi Gugus Metoksi *para* dan *meta* terhadap hasil Sintesis asam *p*-metoksisinamat dan asam *m*-metoksisinamat, **Airlangga J. of Pharmacy**, Vol. 5 (3).
- Ekowati, J., N. Wahyuning, D., Astika, G.N., Budiarti, T., Siswandono. 2007. Novel Analgesic Compounds from hydroxycinnamic acids, **First Collaborative Seminar USM-Unair**, Penang-Malaysia.

- Ekowati, J., Sukardiman, Budiarti, T., Sasaki, S., & Highasiyama, K., Siswandono. 2010. Docking Study and Structure Modification Ethyl *p*-methoxycinnamate Isolated from *K. galanga* to Enhance Its Selectivity on COX-2. **Proceeding International Conference of Med. Plants**, Surabaya.
- Katzung, B.G., 2002. **Basic & Clinical Pharmacology**, Ed 8<sup>th</sup>, New York:McGraw-Hill Companies Inc, pp.6-20.
- 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, p.1799-805.
- LaBuda, C.J., & Fuchs, P.N., 2000. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory & neuropathic pain in rats. **Experimental Neurology**, Vol 163, pp.490-494.
- Michaux, C., Leval, X., Julemont, F., Dogne, J., Pirotte, B., Durant, F., 2006. Structure-based pharmacophore of COX-2 selective inhibitors & identification of original lead compounds from 3D database searching method. **Eur. J. of Med. Chem.** pp.1446-1455.
- Rainsford, K.D., 2007. Anti-inflammatory drugs in the 21<sup>st</sup> century, **Subcell Biochem**, Vol 42, pp.3-27.
- Simmons, D.L., Botting, R. M., and Hla, Timothy. 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandins and Synthesis Inhibition, **Pharmacological Reviews**, Vol 56, No 3, pp. 387-437
- Siswandono & Soekardjo, B., 2008. **Kimia Medisinal 2**, Surabaya; Airlangga University Press, hal, 283-307.
- Sulaiman, M.R., Zakaria, Z.A., Daud, I.A., Ng, Y.C., & Hidayat, M.T., 2007. Antinociceptive & anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Kaempferia galanga* leaves in animal models. **J. of Nat. Med.**, Vol 62, No 2, pp. 221-227.
- Tjay, T.H., & Rahardja, K., 2007. **Obat-Obat Penting. Edisi 6**. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 312-319.
- Willis CL & Willis M. 2004. **Organic Synthesis**. (Terj. Marcellino Rudyanto). Airlangga University Press. Surabaya.
- 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 Chem.** 121, pp : 51-54.

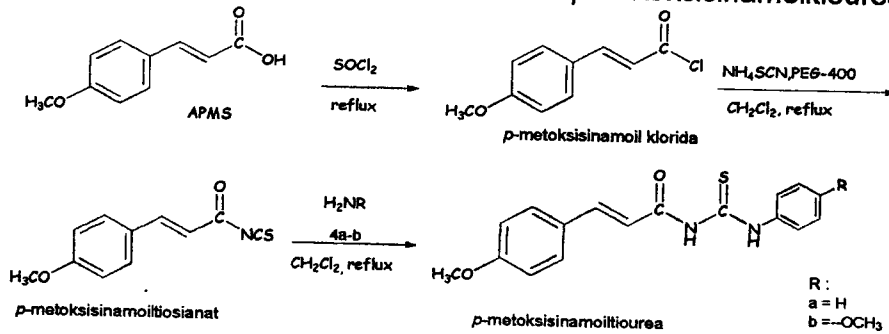
### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Rektor Universitas Airlangga atas dukungan dana penelitian melalui dana penelitian Project Grand 2010 dan Hibah Bersaing 2011.

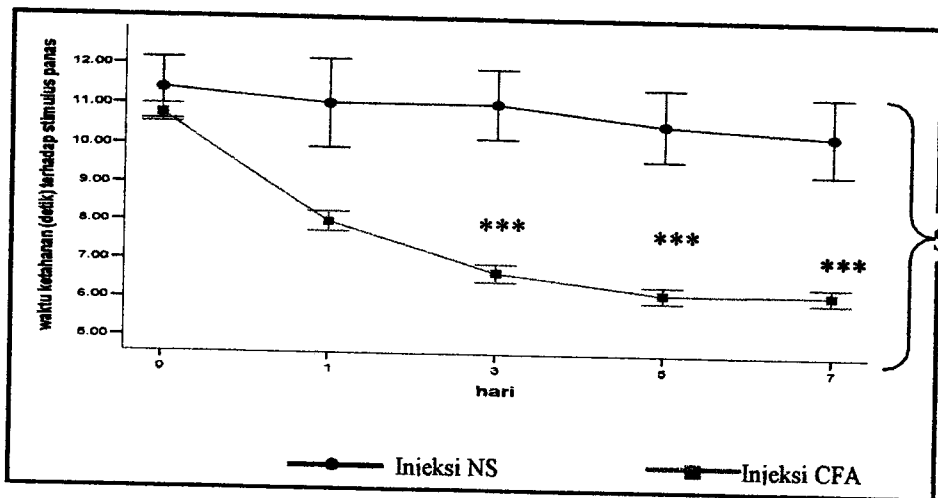
Lampiran Gambar :



Gambar 1. Analisis Retrosintesis Turunan *p*-metoksisinamoiltiourea



Gambar 2. Tahapan Sintesis Turunan *p*-metoksisinamoiltiourea

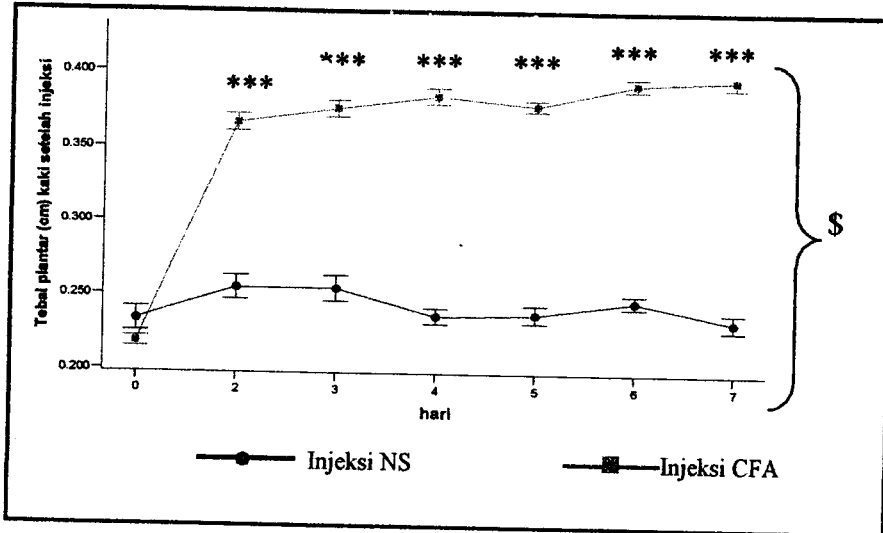


Keterangan :

\$ F<sub>(1, 70)</sub> = 108,354 ; p < 0,001 dengan uji Two Way ANOVA

\*\*\* p < 0,001 dengan uji Independent Sample t-test pada hari ke 3, 5, dan 7

Gambar 3. Perkembangan nyeri inflamasi pada mencit yang diinjeksi CFA intraplantar dengan parameter waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas



Keterangan :

\$  $F_{(1,70)} = 507,616$  ;  $p < 0,001$  dengan uji *Two Way ANOVA*

\*\*\*  $p < 0,001$  dengan uji *Independent Sample t-test* pada hari ke 2 hingga hari ke 7

Gambar 4. Perkembangan nyeri inflamasi pada mencit yang diinjeksi CFA intraplantar dengan parameter tebal plantar tempat injeksi.

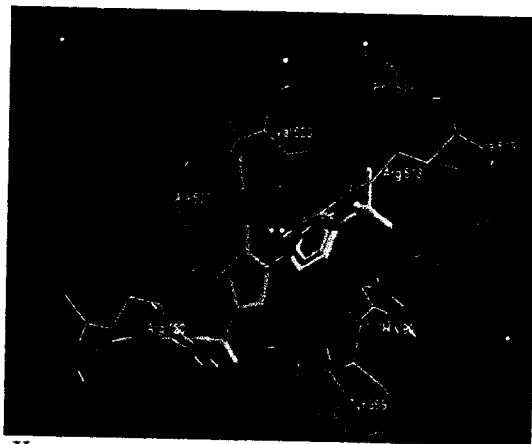


Keterangan :

merah muda = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea

Kuning = SC558 (celecoxib)

Gambar 5. Docking senyawa (*N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea dan SC558 pada *active site* enzim COX-2



Keterangan :

coklat = *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(*p'*-metoksifenil)tiourea

kuning = SC558 (celecoxib)

Gambar 6. Docking senyawa *N*-(*p*-metoksisinamoil)-*N'*-(fenil)tiourea dan SC558 pada *active site* enzim COX-2

1. Publikasi di International Seminar Medicinal Chemistry 2011, sebagai Poster Presentation

Judul :

**The Potency of Ethyl *p*-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* and Its Derivative as Cancer Chemoprevention Agent**

Juni Ekowati<sup>1\*</sup>, Sukardiman<sup>2</sup>, Shigeru Sasaki<sup>3</sup>, Siswandono<sup>1</sup>, Tutuk Budiati<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departement of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia

<sup>2</sup> Departement of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia

<sup>3</sup> Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa, Tokyo 152-8501, Japan

\*E-mail : j\_ekowati@yahoo.com

**ABSTRACT :**

Ethyl *p*-methoxycinnamate is major component from rhizome of *Kaempferia galanga*, has been reported as analgesic-anti inflammatory against cyclooxygenase-2 and inhibitor of papilloma. Moreover, based on its structure that has a vinyl double bond conjugated with the carbonyl group, it is interesting to investigate its possibility as cancer chemoprevention agent through antioxidant mechanism. It was also strategic to use it as starting material for the synthesis of its derivative, namely *N*-(phenyl)-*N'*-(*p'*-methoxyphenyl)thiourea. Synthesis of the derivative was carried out by reaction its acyl halide with ammonium thiocyanate and aniline using microwave irradiation method. The product was confirmed by UV-Vis, FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HRMS spectroscopic method. Ethyl *p*-methoxycinnamate and its derivative were subjected to chemoprevention test against fibrosarcoma's carcinogenesis in mice as animal model, at different dosages i.e. 20, 40 and 80 mg/kg, orally by the use of celecoxib as positive control. Fibrosarcoma's carcinogenesis was produced by the induction of 0,3% benzo(a)pyrene subcutaneously into mice. Both compounds were also studied for the ability to scavenge the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The result showed that the ability *N*-(phenyl)-*N'*-(*p'*-methoxyphenyl)thiourea to scavenge DPPH radical was stronger than that ethyl *p*-methoxycinnamate. Based on pathological examination, it demonstrated that carcinogenesis process of fibrosarcoma could be inhibited by ethyl *p*-methoxycinnamate and its derivative. *In silico* method in COX-2 active site by docking study using Molegro program showed the possibility of *N*-(phenyl)-*N'*-(*p'*-methoxyphenyl)thiourea to interact with COX-2 was better than that of ethyl *p*-methoxycinnamate itself. Those facts explained the prospect cancer chemopreventive activity the derivatives of ethyl *p*-methoxycinnamate.

Keywords : ethyl *p*-methoxycinnamate, *Kaempferia galanga*, cyclooxygenase-2, antioxidant, benzo(a)pyrene

## The Potency of Ethyl *p*-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* and Its Derivative as Cancer Chemoprevention Agent

Juni Ekowati<sup>1</sup>, Sukardiman<sup>2</sup>, Shigeru Sasaki<sup>3</sup>, Siswandono<sup>1</sup>, Tutuk Budiati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departement of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia

<sup>2</sup>Departement of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia

<sup>3</sup>Institute of Medicinal Chemistry, Hoshi University, Ebara 2-4-41, Shinagawa, Tokyo 152-8501, Japan

\*E-mail: j\_ekowati@yahoo.com

### ABSTRACT :

Ethyl *p*-methoxycinnamate is major component from rhizome of *Kaempferia galanga*. has been reported as analgesic-anti inflammatory against cyclooxygenase-2 and inhibitor of papilloma. Moreover, based on its structure that has a vinylic double bond conjugated with the carbonyl group, it is interesting to investigate its possibility as cancer chemoprevention agent through antioxidant mechanism. It was also strategic to use it as starting material for the synthesis of its derivative, namely *N*-(phenyl)-*N'*-(*p*'-methoxyphenyl)thiourea. Synthesis of the derivative was carried out by reaction its acyl halide with ammonium thiocyanate and aniline using microwave irradiation method. The product was confirmed by UV-Vis, FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HRMS spectroscopic method. Ethyl *p*-methoxycinnamate and its derivative were subjected to chemoprevention test against fibrosarcoma's carcinogenesis in mice as animal model, at different dosages i.e. 20, 40 and 80 mg/kg, orally by the use of celecoxib as positive control. Fibrosarcoma's carcinogenesis was produced by the induction of 0,3% benzo(a)pyrene subcutaneously into mice. Both compounds were also studied for the ability to scavenge the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The result showed that the ability *N*-(phenyl)-*N'*-(*p*'-methoxyphenyl) thiourea to scavenge DPPH radical was stronger than that ethyl *p*-methoxycinnamate. Based on pathological examination, it demonstrated that carcinogenesis process of fibro-sarcoma could be inhibited by ethyl *p*-methoxycinnamate and its derivative. In silico method in COX-2 active site by docking study using Molegro program showed the possibility of *N*-(phenyl)-*N'*-(*p*'-methoxyphenyl)thiourea to interact with COX-2 was better than that of ethyl *p*-methoxycinnamate itself. Those facts explained the prospect cancer chemopreventive activity the derivatives of ethyl *p*-methoxycinnamate.

Keywords : ethyl *p*-methoxycinnamate, *Kaempferia galanga*, cyclooxygenase-2, antioxidant, benzo(a)pyrene

International Seminar on Medicinal Chemistry  
and Timmerman Award  
Surabaya 2011

**LAMPIRAN II****SARANA PENELITIAN :**

1. Pelaksanaan penelitian dilakukan di laboratorium Sintesis Farmasi, laboratorium Kimia Medisinal, Laboratorium Dasar Bersama Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, dan laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
2. Peralatan Utama yang digunakan pada penelitian ini :

No	Laboratorium	Jenis Alat	Keterangan
1	Sintesis Farmasi dan Kimia Medisinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- seperangkat alat gelas untuk sintesis</li> <li>- Rotavapor</li> <li>- Kolom kromatografi</li> <li>- Bejana kromatografi lapisan tipis</li> <li>- Electrothermal melting point apparatus</li> </ul>	Semua dalam keadaan baik dan siap untuk digunakan
2	LDB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spektrofotometer IR,</li> <li>- spektrometer H NMR</li> </ul>	Semua dalam keadaan baik dan siap untuk digunakan

## SINOPSIS PENELITIAN HIBAH BERSAING TAHUN II

### II. Substansi Penelitian

#### ABSTRAK

**Latar belakang :** Hasil penelitian pendahuluan tahun I menunjukkan bahwa beberapa derivat EPMS bentuk tiourea yaitu (*E*)-*N*-(fenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil) akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metilfenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil) akrilamida, (*E*)-*N*-(4-metoksifenilkarbamotioil)-3-(4-metoksifenil) akrilamida dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara, MCF-7. Hasil molekular docking eksperimental juga menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut berinteraksi dengan COX-2 lebih baik daripada bentuk amidanya. Sel kanker payudara, MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang tidak mengekspresikan COX-2. Untuk membuktikan hambatan ekspresi COX-2 akan digunakan sel kanker payudara T47D. Selain itu akan dilakukan uji *in silico* aspek farmakokinetika (ADMET) senyawa-senyawa tersebut di atas. Senyawa yang memberikan profil ADMET sesuai dengan obat-obat yang beredar di pasaran akan di uji secara *in vivo* pada tikus betina menggunakan induser DMBA.

**Tujuan jangka panjang :** Penyediaan bahan baku obat yang dapat menghambat pertumbuhan kanker, contohnya kanker payudara.

**Target khusus :** Memperoleh beberapa senyawa baru kelompok *p*-metoksisinamoi tiourea dari *Kaempferia galanga* Linn. yang berpotensi sebagai kemopreventif kanker.

**Metode :** Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D & uji anti proliferasi terhadap sel T47D dengan MTT assay; Uji imunositokimia COX-2 terhadap sel T47D; uji *in silico* ADMET senyawa uji dengan QuickProp Schrodinger Program; pengujian aktivitas kemopreventif kanker payudara dilakukan dengan hewan coba tikus betina galur SD, secara per oral dan induser DMBA; analisis histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan H&E; uji imunohistokimia dengan pengecatan COX-2.



## BIODATA / RIWAYAT HIDUP PENELITI UTAMA DAN ANGGOTA PENELITI

## Ketua Peneliti

Nama lengkap dengan gelar : Dra. Juni Ekowati, Apt., MSi.  
 Tempat/tanggal lahir : Bojonegoro, 2 Juni 1967  
 Jenis kelamin : Perempuan  
 Pangkat/Jabatan/NIP : Pembina / IVa/ 132 009 462  
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
 Pendidikan:

No.	Universitas	Tahun	Gelar	Bidang Studi
1	Universitas Airlangga Surabaya	1990	Dra.	Farmasi
2	Universitas Airlangga Surabaya	1990	Apoteker	Farmasi
3	Universitas Airlangga Surabaya	2007	MSi	Farmasi

## Daftar Publikasi:

No.	Publikasi
1	<b>Juni Ekowati, Hadi Poerwono, Achmad Syahrani, Nuzul Wayuning Dyah, Tutuk Budiati, Kimio Hagshiyama.</b> Antinociceptive activity derivats of <i>Kaempferia galanga</i> <i>Second Collaborative Seminar USM-Unair, Jakarta-Indonesia, 2009.</i>
2	<b>Juni Ekowati, Marcellino Rudyanto, Suzana, M.I. Susilowaty, H. Poerwono, GN. Astika, A. Syahrani, H. Siswono, Tutuk Budiati</b> <b>Novel Analgesic Compounds from hydroxycinnamic acids</b> <i>First Collaborative Seminar USM-Unair, Penang-Malaysia, 2007.</i>
3	<b>Juni Ekowati, M.I. Susilowaty, Marcellino Rudyanto, Tutuk Budiati</b> Moluscide Activity of Natural Anacardic Acids against <i>Pomacea</i> sp. <i>IOCD Seminar, Surabaya, 2007</i>
4	<b>Marcellino Rudyanto, Juni Ekowati, Suzana.</b> <b>Synthesis and Anticancer Prescreening of Lasiodiplodin Derivatives Derived from Natural Anacardic Acids.</b> <i>ITSF Seminar on Science and Technology, Jakarta, 2006.</i>
5	<b>Juni Ekowati</b> Sintesis asam 3-(4-metoksifenil)propanoat dari asam <i>p</i> -hidroksisinamat, <i>Seminar Himpunan Kimia Indonesia X, Surabaya, 2006</i>
6	<b>Juni Ekowati</b> Pengaruh katalis pada sintesis asam <i>o</i> -metoksisinamat menurut reaksi Knoevenagel <i>Seminar Himpunan Kimia Indonesia IX, Malang, 2005</i>
7	<b>Juni Ekowati, Suzana, Tutuk Budiati</b> Pengaruh Posisi Gugus Metoksi para dan meta terhadap hasil Sintesis asam <i>p</i> -metoksisinamat dan asam <i>m</i> -metoksisinamat <i>Airlangga Journal of Pharmacy, Vol. 5 No. 3, 2005.</i>
8	<b>Marcellino Rudyanto, Juni Ekowati, Hadi Poerwono.</b> Synthesis of Amides from Natural Anacardic Acids. <i>ITSF Seminar on Science and Technology, Jakarta, 2004.</i>

9	<b>Juni Ekowati</b> Sintesis Asam 3-O-benzoil betulinat dengan material awal Asam Betulinat Hasil Isolasi dari <i>Avenia marina</i> <i>Majalah Farmasi Airlangga</i> , Vol 2(1), 2002
---	---

## Penelitian :

No	Judul Penelitian	Dana	Thn
1	Docking studies of derivates of p-methoxycinnamoyl thiourea of COX-2 inhibitor (author)	BPPS	2009
2	Sintesis Senyawa Baru COX-2 Inhibitor dari Etil p-metoksisinamat Hasil Isolasi <i>Kaempferia galangal</i> Yang Berpotensi Sebagai Kemopreventiv Kanker (author)	Penelit. StratNas Unair (DP2M Dikti)	2008
3	Structure Modification of p-methoxycinnamic acid Isolated from <i>Kaempferia galanga</i> to Improve its anti-nociceptive activity (author)	Project Grant PHK-B	2007
4	Aplikasi Iradiasi Gelombang Mikro pada Reaksi Benzilasi Asam p-hidroksisinamat (author)	DP2M Dikti	2007
5	Aplikasi Iradiasi Gelombang Mikro pada Sintesis Asam o-metoksisinamat dan Asam o-hidroksisinamat menurut reaksi Knoevenagel (author)	DP2M Dikti	2005
6	Utilisation of Anacardic Acid isolated from Cashew Nut Shell Liquid as Starting Material for the Synthesis of Bioactive Materials: Synthesis and Toxicological Evaluation of Lasiodiplodin Derivatives (co-author)	International Toray Science Foundation-Japan (ITSF)	2005
7	Transformasi Gugus Fungsi Asam Hidroksisinamat dalam usaha mencari senyawa analgesik baru (author)	QUE Project	2004
8	Sintesis Senyawa benzoil tiourea dan uji aktivitasnya sebagai penekan syaraf pusat pada mencit (co-author)	P4T Dikti	2004
9	Sintesis Turunan Asam sinamat yang berfungsi sebagai tyrosinase Inhibitor (co-author)	QUE project	2003

## Pengabdian Kepada Masyarakat :

No	Judul Pengabdian	Dana	Thn
1	Pelatihan Cara Pembuatan Makanan Yang Sehat, Higienis dan Halal Bagi Usaha Kecil di Surabaya	DIPA Unair	2007
2	Pelatihan Cara Pembuatan Makanan dan Minuman Yang Halal Bagi Usaha Makanan Kecil dan Menengah di Surabaya	DIPA Unair	2008

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

### Anggota Peneliti

Nama lengkap dengan gelar : Prof. Dr. Tutuk Budiati, Apt., MS.  
 Tempat/tanggal lahir : Malang, 26 Januari 1948  
 Jenis kelamin : Perempuan  
 Pangkat/Jabatan/NIP : Pembina Utama Muda / IVc / 130 531 780  
 Jabatan Fungsional : Guru Besar  
 Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

### Pendidikan:

No.	Universitas	Tahun	Gelar	Bidang Studi
1	Universitas Airlangga Surabaya	1972	Dra.	Farmasi
2	Universitas Airlangga Surabaya	1994	Apoteker	Farmasi
3	Institut Teknologi Bandung	1990	MS	Kimia Organik
4	Universitas Airlangga Surabaya	2003	Dr	Kimia Organik

### Daftar Publikasi:

No.	Publikasi
1	Juni Ekowati, Marcellino Rudyanto, Suzana, M.I. Susilowaty, H. Poerwono, GN. Astika, A. Syahrani, H. Siswono, <b>Tutuk Budiati</b> <b>Novel Analgesic Compounds from hydroxycinnamic acids</b> <i>First Collaborative Seminar USM-Unair, 2007, Penang-Malaysia.</i>
2	Juni Ekowati, M.I. Susilowaty, Marcellino Rudyanto, <b>Tutuk Budiati</b> Moluscide Activity of Natural Anacardic Acids against Pomacea sp. <i>IOCD Seminar, 2007, Surabaya</i>
3	Juni Ekowati, Suzana, <b>Tutuk Budiati</b> Pengaruh Posisi Gugus Metoksi para dan meta terhadap hasil Sintesis asam p-metoksisinamat dan asam m-metoksisinamat <i>Airlangga Journal of Pharmacy, Vol. 5 No. 3, 2005.</i>
4	<b>Tutuk Budiati</b> Hubungan Struktur-aktivitas beberapa senyawa inhibitor Enzim sulfhidril <i>J. Matematika, Ilmu Pengetahuan Alam dan pengajarannya, No.2, 2004</i>
5	<b>Tutuk Budiati</b> Sintesis Metil Anakardat dan Uji Aktivitasnya sebagai Inhibitor enzim sulfhidril <i>J. Biosains Pasca Sarjana, Vol.6, No.2, 2004</i>
6	<b>Tutuk Budiati</b> Inhibisi Asam Anakardat terhadap aktivitas proteolitik papain <i>J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Vol.8, No.2, 2003</i>
7	<b>Tutuk Budiati</b> Perbandingan Sintesis nhibisi Asam Anakardat terhadap aktivitas proteolitik papain <i>J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Vol.8, No.2, 2003</i>

## Penelitian :

No	Judul Penelitian	Dana	Tahun
1	Structure Modification of p-methoxycinnamic acid Isolated from <i>Kaempferia galanga</i> to Improve Antinociceptive Activity (co-author)	Project Grant PHK-B	2007
2	Green Chemistry: Sintesis Benzoilurea, Benzoiltiourea dan Turunannya pada Kondisi Bebas Pelarut dengan Iradiasi Gelombang Mikro (co-author)	DP2M	2006
3	Aplikasi Iradiasi Gelombang Mikro pada Sintesis Asam o-metoksisinamat dan Asam o-hidroksisinamat menurut reaksi Knoevenagel (co-author)	DP2M	2005
4	Transformasi Gugus Fungsi Asam Hidroksisinamat dalam usaha mencari senyawa analgesik baru (co-author)	QUE Project	2004
5	Sintesis Senyawa benzoil tiourea dan uji aktivitasnya sebagai penekan syaraf pusat pada mencit (co-author)	P4T Dikti	2004
6	Sintesis Turunan Asam sinamat yang berfungsi sebagai tyrosinase Inhibitor (author)	QUE project	2003

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

### 1. DATA PRIBADI

1. Nama lengkap	: Prof. Dr.Sukardiman,Drs, Apt,MS	
2. NIP	: 131 801 629	
3. Jabatan akademik	: Lektor Kepala	
4. Pangkat dan golongan	: Pembina Tk 1 / IV -b	
5. Tanggal lahir	: 9 Januari 1963	
6. Tempat lahir	: Kebumen	
7. Jenis kelamin	: Pria	
8. Agama Islam	: Islam	
9. Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga	
10. Fakultas / Jurusan	: Fakultas Farmasi Departemen Farmakognosi dan Fitokimia	
11. Jabatan struktural	: Sekretaris Program Magister Ilmu Farmasi	
12. Alamat Perguruan Tinggi	: Jl.Darmawangsa Dalam Surabaya	
13. Telp / Fax	: 5033710 / 5020514	
14. Status perkawinan	: Kawin	
15. Alamat	: Jl.Wonosari Kidul 161 Surabaya	
16. Telp.	a. Rumah	: 5684161
	b. HP	: 081 852 5342
	c. e-mail	: sukardiman@unair.ac.id maman_ht@yahoo.com

<b>II. Riwayat Pendidikan</b>	
<b>1. Pendidikan Formal</b>	
Tahun 1976	: Lulus SD Bumiharjo I , Kebumen
Tahun 1979	: Lulus SMP 3 Kebumen
Tahun 1982	: Lulus SMAN Kebumen
Tahun 1987	: Lulus Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi Unair
Tahun 1988	: Lulus Apoteker , Fakultas Farmasi Unair
Tahun 1992	: Lulus Pendidikan Magister / Strata 2 (S2) Kimia , Bidang Minat Biokimia Program Pasca Sarjana ITB Bandung
Tahun 2007	: Lulus Program Doktor / Strata 3 (S3) MIPA Bidang Minat Farmasi Program Pasca Sarjana Unair Surabaya
<b>2. Pendidikan Tambahan</b>	
1. 1988	: Pelatihan Uji Aktivitas Bahan Alam , Jurusan Farmasi UI , Jakarta.
2. 1989-1990	: Program Pencangkakan / Magang di PAU (Pusat Antar Universitas ) Bioteknologi , ITB Bandung.
3. 1993	: Pelatihan Calon Dosen Pembimbing Lapangan (DPL) KKN , LPPM , Unair
4. 1995	: Pelatihan Statistik , LPPM , Unair
5. 1996	: Pelatihan Dosen Wali, Fakultas Farmasi Unair
6. 1998	: Pelatihan Bioteknologi, FMIPA, Unair
7. 1999	: Pelatihan Kewirausahaan, LPPM Unair
8. 2000	: Pelatihan Aplied Aproach (AA) , Pekerti, Unair
9. 2004	: Short Research (3 bulan), Pharmacognosy Phytochemistry Analysis, Saarland University, Saarbrucken , Germany (DAAD)
10. 2006-2007	: Short Research (10 bulan), Moleculer Biology Analysis, Institute of Biochemisry, University Medicine – Charite, Berlin, Germany



<b>III. Riwayat Pekerjaan</b>	
1998 – 1999	: CPNS
1990 - 1992	: IIIa / Asisten Ahli Madya
1992 – 1994	: IIIb / Asisten Ahli
1994 – 1996	: IIIc / Lektor Muda
1998 – 2000	: IIId / Lektor
2000 – 2002	: IVa / Lektor Kepala
2004 - sekarang	: IVb / Lektor Kepala
<b>IV. Penghargaan</b>	
1. Mahasiswa Teladan Tingkat Fakultas Farmasi Unair (1986)	
2. Lulusan Terbaik Fakultas Farmasi Unair (1988)	
3. Satya Lencana Kesetiaan ( 2002)	
4. Young Investegator Award dari Perhimpunan Dokter Ahli Mikrosirkulasi Asia (1999)	
5. Penyaji Terbaik Hasil Penelitian Ilmu Penelitian Dasar (IPD) , DP3M , Jakarta , 2004.	
6. Lulus Cumlaude Program Doktor 2007.	
7. Dosen Berprestasi Tingkat Fakultas Farmasi UNAIR, 2008	
8. Dosen Berprestasi Bidang Penelitian Tingkat Universitas Airlangga, 2008	
<b>V. Pengalaman Organisasi</b>	
1. Anggota BPM (Badan Perwakilan Mahasiswa ) ( 1984-1986)	
2. Ketua Senat Fakultas Farmasi Unair ( 1986 – 1988)	
3. Sekretaris II Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami (PERHIPBA) Pusat (2000-2003)	
4. Sekretaris II Yayasan Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami (PERHIPBA) (2003 - sekarang)	
5. Anggota Seksi Penelitian dari Perhimpunan Patobiologi Indonesia (PPI) Pusat	
6. Ketua Komisi Penelitian dan Pengembangan Obat Tradisional , LPPM UNAIR , 2008-2010.	
7. Anggota Dewan Redaksi , Majalah Eksakta, UNAIR , 2008-2010	
<b>VI. Keanggotaan Profesi</b>	
1999 – sekarang	: Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia (ISFI)
1999 - sekarang	: Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami (PERHIPBA)
2006 - sekarang	: Perhimpunan Patobiologi Indonesia (PPI)
<b>VII. Pembicara / Penyaji Makalah</b>	
1. Agustus, 1995 : Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Sambung Nyawa ( <i>Gynura procumbens</i> ) terhadap Sel Kanker Hasil Induksi Benzopirena pada Mencit secara <i>invivo</i> , Seminar Nasional Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami, ITB, Bandung.	
2. Februari 1999 : Cytotoxic mekanisme of flavonoid from temu kunci ( <i>Kaempferia pandurata</i> ) in cell culture of human mammary carcinoma, on Conggres of Clinical Hemorrhology and Microcirculation of Asia, in Bandung.	
3. September , 2002 : Penapisan Senyawa Antikanker dari Tanaman Obat Indonesia dengan Molekul Target Enzim DNA Topoisomerase , Seminar Nasional POKJANAS TOI, Kelompok Kerja Nasional Tanaman Obat Indonesia, ITB Bandung.	
4. November , 2003 : Aktivitas Antikanker Senyawa Andrografolida dari Herba Sambilotto ( <i>Andrographis paniculata</i> Nees) terhadap Sel Leukemia Manusia, Seminar Nasional HKI (Himpunan Kimia Indonesia) , UNM, Malang.	
5. Mei , 2004 , Induksi Apoptosis Senyawa Senyawa Andrografolida dari Herba Sambilotto ( <i>Andrographis paniculata</i> Nees) terhadap Sel Kanker Mieloma, Seminar Nasional Hasil Penelitian Ilmu Dasar , DP3M, Jakarta.	
6. September, 2005 : Anticancer Activity of Andrographolide and Pinostrobin, Joint Seminar in Pharmaceutical Sciences and Future, Hoshi University, Tokyo, Japan.	
7. 6-8 Februari 2006 : DNA Topoisomerase as Molecul Target to Discovery Anticancer Bioactive Compound , International Seminar of Enzim, Surabaya.	
8. 12 Juni 2008 ,Penyusunan Roadmap Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi UNAIR	

### VIII. Pengalaman Riset

- 1 Uji sitotoksik isolat herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada kultur sel kanker mencit hasil induksi benzopirena ( Penelitian Dosen Muda/BBI, Ketua Peneliti) , 1997
- 2 Uji aktivitas antitumor triterpen dari kulit batang Kecapi Kera (*Sandoricum emarginatum*) pada kultur sel tumor hasil induksi Benzopirena dan SDMH (Penelitian IPD, anggota peneliti) , 1997
- 3 Uji aktivitas antitumor triterpen dari kulit batang Kecapi Kera (*Sandoricum emarginatum*) pada tumor hasil induksi Benzopirena dan SDMH secara invivo (Penelitian IPD, anggota peneliti) , 1998
- 4 Mekanisme sitotoksik senyawa flavonoid dari temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap kultur sel kanker payudara manusia ( Penelitian Risbin IPTEKDOK, ketua peneliti) , 1999-2000
- 5 Penapisan senyawa antikanker dari tanaman obat Indonesia dengan molekul target enzim DNA Topoisomerase ( Penelitian Domestic Collaborative ResearscvH Grant Program/ DCRG ; Ketua peneliti) , 2000
- 6 Uji sitotoksik senyawa andrographolid dari *Andrographis paniculata* terhadap kultur sel leukemia limfoblastik manusia (Penelitian Dosen Muda/BBI , ketua peneliti), 2001
- 7 Pengaruh pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma secara invitro ( Penelitian IPD, Ketua Peneliti), 2001
- 8 Uji Antikanker Ekstrak Metanol Beberapa Tanaman Obat Indonesia terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma (Penelitian Proyek Grant, Ketua Peneliti), 2001-2002
- 10 Potensi dan Mekanisme Antikanker Senyawa Andrografolid dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) secara in vitro dan ivivo (RUT X, Ketua Peneliti) 2003-2004
- 11 Uji Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Herba Sambiloto ( *Andrographis paniculata* Ness) terhadap Kultur Sel Kanker ( IPD, Ketua Peneliti) , 2004
- 12 Uji Antikanker dan Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya*) terhadap Kultur Sel Kanker (IPD, Ketua Peneliti) , 2005
- 13 Induksi Apoptosis dan Peningkatan Ekspresi p53, Bax serta Aktivasi Enzim Caspase Sel Kanker Payudara Manusia oleh Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb ( Hibah Bersaing, Ketua Peneliti) , 2006
- 14 Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Sel Kanker Payudara Manusia T47-D (Research Grant-Program B , Fakultas Farmasi Unair , Ketua Peneliti) , 2006
- 15 Pengembangan Campuran Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Kunyit (*Curcuma domestica*) sebagai Sediaan Fitofarmaka Antikanker Payudara ( Program Insentif Riset Terapan , Menristek, Ketua Peneliti), 2007-2009

### VIII. Publikasi

- 1 **Sukardiman**, Sutarjadi (1999). Penapisan senyawa bioaktif dari akar cerme (*Phyllanthus acidus*) , Cermin Dunia Kedokteran
- 2 **Sukadiman**, IGP Santa , Wied Aris K. (1999). Uji antikanker fraksi flavonoid dari herba *Dendrothoe petandra* pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi benzopirena, Cermin Dunia Kedokteran.
- 3 Pratiwi, P., **Sukardiman** (1998). Uji aktivitas antitumor triterpen dari kulit batang Kecapi Kera (*Sandoricum emarginatum*) pada kultur sel tumor hasil induksi Benzopirena dan SDMH.
- 4 **Sukardiman**, Made Oka D, Mulyadi T , Agus (2000). Cytotoxic mekanisme of flavonoid from temu kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma, Clinical Hemorrhology and Microcirculation.
- 5 **Sukardiman**, Sutarjadi , Anang (2000). Uji antikanker ekstrak Metanol akar cerme (*Phyllanthus acidus*) pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi benzopirena, Majalah Farmasi Indonesia.
- 6 **Sukardiman** (2000) Isolasi dan uji sitotoksik senyawa triterpen dari kulit batang mahoni (*Swietenia mahagoni*), Jurnal Medika Esakta, Lembaga Penelitian UNAIR.
- 7 **Sukardiman**, Hadi P., Sismindari, S.Mubarika (2002). Skrining Antikanker dari Ekstrak dan Fraksi Herba Benalu Teh (*Dendrothoe pentandra*) dengan molekul target enzim

- DNA Topoisomerase, Majalah Farmasi Airlangga.
- 8 **Sukardiman, A.Rahman, Wiwied E. (2002)** Aktivitas sitotoksik Senyawa Andrografolid dari Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Kultur Sel Leukimia manusia, Media Kedokteran Hewan.
  - 9 **Sukardiman, A.Rahman, Wiwied E. (2003).** Aktivitas Antikanker Senyawa Pinostrobin dari Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* ) terhadap Kultur Sel Mieloma, Media Kedokteran Hewan.
  - 10 **Hani P, Sukardiman (2004).** Aktivitas Antikanker Ekstrak Metanol dari Herba bandotan (*Ageratum conyzoides*) terhadap Sel Kanker Mieloma, Majalah Farmasi Airlangga
  - 11 **Sukardiman, A.Rahman, Nadia F. (2005) .** Skrining Aktivitas Antikanker dari Ekstrak Metanol dan Ekstrak Eter dari Lumut Hati (*Marchantia catharactarum*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test, Majalah Farmasi Airlangga
  - 12 **Sukardiman, Wiwied Ekasari, Sismindari (2005).** Induksi Apoptosis Senyawa Andrografolida dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Kultur Sel Kanker, Kedokteran Hewan.
  - 13 **Sukardiman, Hadi P., Sismindari, S.Mubarika (2006).** Skrining Aktivitas Antikanker dari Ekstrak Metanol Tanaman Familia Asteraceae dengan Molekul Target Enzim DNA Topoisomerase , di Jurnal FMIPA Jember.
  - 14 **Sukardiman, Wiwied E., Hapsari Putri. (2006).** Aktivitas Antikanker dan Induksi Apoptosis Fraksi Kloroform Daun Pepaya (*Carica papaya*) terhadap Kultur Sel Kanker, submit di Jurnal Kedokteran Hewan
  - 15 **Sukardiman, Aty W, Noor Cholies Z, Sismindari (2007).** Inducting Apoptosis Andrographolide on TD-47 Human Breast Cancer Cell Lines, **African Journal , Complementary and Alternative Medicine, Vol 4 , No 3, author**