

Bidang Kesehatan

**LAPORAN**  
**Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional**  
**Tahun Anggaran 2009**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

Sintesis Senyawa Baru Siklooksigenase-2 (COX-2) Inhibitor  
Yang Berpotensi Kemopreventiv Kanker  
Dari *Kaempferia galanga* Linn.

Peneliti :

Dra. Juni Ekowati, MSi.

Prof. Dr. Sukardiman, MS.

Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009,  
Sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang  
Kegiatan Penelitian Strategis Nasional Nomor : 276/H3/KR/2009, Tanggal  
16 Februari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Oktober, 2009



**Bidang Kesehatan**

**LAPORAN**  
**Hibah Kompetitif Penelitian Strategis Nasional**  
**Tahun Anggaran 2009**



Sintesis Senyawa Baru Siklooksigenase-2 (COX-2) Inhibitor  
Yang Berpotensi Kemopreventif Kanker  
Dari *Kaempferia galanga* Linn.

Peneliti :

Dra. Juni Ekowati, MSi.  
Prof. Dr. Sukardiman, MS.  
Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009,  
Sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang  
Kegiatan Penelitian Strategis Nasional Nomor : 276/H3/KR/2009, Tanggal  
16 Februari 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**Oktober, 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : Sintesis Senyawa Baru Siklooksigenase-2 (COX-2) Inhibitor Yang Berpotensi Sebagai Kemopreventiv Kanker Dari *Kaempferia galanga* Linn.
  
2. Ketua Peneliti
  - a. Nama Lengkap : Dra. Juni Ekowati, Apt., MSi
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 132009462
  - d. Pangkat/Golongan : Lektor Kepala/ Gol. IVa
  - e. Jabatan : Dosen
  - 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. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :
  - a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
  - b. Biaya yang diusulkan : Rp. 99.709.000,-
  - c. Biaya yang disetujui tahun I : Rp. 60.000.000,-

Mengetahui  
Dekan / Pusat Penelitian,

Prof. Dr. Achmad Syahrani, MS., Apt.  
NIP. 130809077

Surabaya, 11 Desember'09  
Ketua Peneliti,

Dra. Juni Ekowati,MSi.,Apt  
NIP. 132009462

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiani Lukiswanto, DEA., drh.  
NIP. 131837004

## RINGKASAN

Penggunaan *nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)* pada kanker colon, dengan target jalur inflamasi dan proliferasi sel menjadi momentum penelitian senyawa NSAIDs, khususnya COX-2 inhibitor sebagai chemopreventive pada kanker. Salah satu turunan sinamat yaitu etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari *Kaempferia galanga* yang diketahui mempunyai aktivitas anti inflamasi seperti NSAIDs juga mampu menghambat tumor promoter activating B-4 aktivasi EBV, sehingga dapat dikembangkan untuk pencegahan kanker terutama pada tumor-promoting stage. Sehubungan dengan masih ditemukannya efek samping yang membahayakan pada COX-2 inhibitor golongan coxib, maka pada penelitian ini akan diteliti peluang etil *p*-metoksisinamat sebagai lead compound COX-2 inhibitor baru.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh beberapa senyawa baru COX-2 inhibitor yang berpotensi sebagai kemopreventif kanker dari *Kaempferia galanga* Linn.

Berdasarkan tujuan penelitian di atas, maka disusun metode penelitian sebagai berikut : modifikasi gugus fungsi EPMS sebagai COX2 inhibitor yang beraktivitas kemopreventif kanker dilakukan dengan melalui reaksi hidrolisis EPMS, pembentukan asil halida, amida aromatis dan tiourea. Struktur senyawa ditentukan dengan spektrofotometri IR, <sup>1</sup>HNMR dan HRMS. Afinitas COX-2 inhibitor ditentukan dengan docking studies dengan program Autodock Vina (pdb : 1cx2). Terhadap senyawa hasil modifikasi struktur dilakukan skreening anti kanker melalui uji BST konsentrasi , sedangkan aktivitas kemopreventif kanker secara in vivo menggunakan induser benzopiren untuk mengetahui tingkat kejadian kanker.

Dari diperoleh beberapa senyawa baru hasil modifikasi struktur EPMS yaitu (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-on; asam *N*-(*p*-metoksi-sinamoil)-antranilat, *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida, *N*-tolil-*N'*-*p*-metoksisinamoil-tiourea. Berdasarkan docking studies, *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida, *N*-*p*-metoksi-sinamoil-*N*-toliltiourea mempunyai afinitas relatif tinggi terhadap COX-2. Senyawa-senyawa hasil sintesis tersebut mempunyai aktivitas sitotoksik dengan BSL test (LC<sub>50</sub> (ppm): EPMS = 29,03 ppm, *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida = 13,59 ppm, *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiourea = 33,56 ppm. EPMS dapat digunakan sebagai senyawa penuntun memperoleh kemopreventiv kanker. Persentase pertumbuhan kanker dari EPMS dan beberapa derivatnya adalah sebagai berikut : EPMS 40 mg/kg BB = 85,7%; EPMS 80 mg/kg BB = 62,5%; *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida 40 mg/kg BB = 40,0%; *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida 80 mg/kg BB = 30,0%; *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiourea 40 mg/kg BB = 50,0%; *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiourea 80 mg/kg BB = 37,5%; sedangkan sebagai pembanding digunakan Celecoxib 20 mg/kg BB dengan persen pertumbuhan = 33.3%.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya atas selesainya Penelitian STRATNAS 2009 yang berjudul Sintesis Senyawa Baru Siklooksigenase-2 (COX-2) Inhibitor Yang Berpotensi Sebagai Kemopreventiv Kanker Dari *Kaempferia galanga* Linn. selesai sesuai dengan waktu yang diberikan.

Rasa terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA., drh. selaku Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat dan seluruh Tim Reviewer Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengerjakan penelitian ini.

Rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu selesainya penelitian ini.

Besar harapan penulis melalui tulisan ini akan mendapatkan banyak masukan agar penelitian sebagai persiapan disertasi akan menjadi lebih baik dan sempurna untuk memperoleh gelar Doktor di Program Studi MIPA. Amien.

Surabaya, Desember 2009

**SISTEMATIKA LAPORAN  
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS  
NASIONAL  
BATCH I (KLASTER GIZI & KESEHATAN)  
TAHUN ANGGARAN 2009**

**DAFTAR ISI**

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I	17
IV. METODE PENELITIAN	18
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	45
<b>B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH</b>	76
<b>C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN</b>	77

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1. Pengaruh cyclooxygenase terhadap proses terjadinya kanker	2
Gambar 1.2. Beberapa contoh senyawa COX-2 inhibitor	4
Gambar 2.1. Tanaman Kencur	6
Gambar 2.2. Etil <i>p</i> -metoksisinamat	7
Gambar 2.3. Asam <i>p</i> -metoksisinamat	7
Gambar 2.4. Struktur kristal COX-1 & COX-2	8
Gambar 2.5. Katalitik Step dari cyclooxygenase	8
Gambar 2.6. Mekanisme kerja NSAID	9
Gambar 2.7. Farmakofor COX-2 inhibitor	10
Gambar 2.8. Human COX-2 active site in complex with BTBO2472	10
Gambar 2.9. Tipe Kanker	12
Gambar 2.10. Sintesis turunan tiourea dengan metode Xu	13
Gambar 2.11. Reaksi antara asam antranilat dan kloral	14
Gambar 2.12. Reaksi pembentukan 1,2-dihidro-4H-3,1-benzoxazin-4-on dengan intermediat imin	14
Gambar 2.13. Senyawa intermediat untuk membentuk cincin benzoxazin menggunakan cyclization agent	15
Gambar 2.14. Pembentukan cincin benzoxazin menggunakan cyclization agent	15
Gambar 2.15. Reaksi pembentukan intermediat benzoxazin dari asil klorida dan asam antranilat	16
Gambar 4.1. Kerangka Konseptual	18
Gambar 4.2. Skema Rancangan Penelitian	20
Gambar 5.1. Mekanisme Reaksi Substitusi Asil Nukleofilik pada sintesis (E)-2-(4-metoksistiril)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-on	29
Gambar 5.2. Mekanisme Pembentukan Lakton pada sintesis (E)-2-(4-metoksistiril)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-on dari asam antranilat	29
Gambar 5.3. Reaksi antara <i>p</i> -aminofenol dan <i>p</i> -metoksisinamoil klorida	30
Gambar 5.4. Mekanisme Sintesis <i>N</i> -( <i>p</i> -tolil)- <i>N'</i> - <i>p</i> -metoksisinamoiltiourea	31

**DAFTAR TABEL**

		<b>Halaman</b>
Tabel 5.1.	Uji Kemurnian EPMS secara KLT	27
Tabel 5.2.	Uji Kemurnian APMS secara KLT	28
Tabel 5.3.	Hasil Docking molekul AP dan 2AT terhadap COX-2	32
Tabel 5.4.	Persentase Timbulnya Kanker dari EPMS, AP dan 2AT	33

**DAFTAR LAMPIRAN**

		<b>Halaman</b>
Lampiran 1	Spektra HNMR EPMS	45
Lampiran 2	Spektra IR, HNMR, HRMS APMS	46
Lampiran 3	Spektra HNMR dan HRMS CCl	49
Lampiran 4	Spektra IR, HNMR dan HRMS AN-Up	51
Lampiran 5	Spektra IR, HNMR dan HRMS AN-Mid	54
Lampiran 6	Spektra IR, HNMR dan HRMS AP	57
Lampiran 7	Spektra IR, HNMR dan HRMS 2AT	59
Lampiran 8	Kristal Senyawa EPMS dan turunannya	64
Lampiran 9	Hasil Docking Derivat EPMS terhadap COX-2	65
Lampiran 10	Probit Analisis	67
Lampiran 11	Hasil Uji Kemopreventif Kanker	74
Lampiran 12	Peralatan Utama Penelitian	75

**BAB 1. PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang Masalah**

Perkembangan kearah modernisasi menyebabkan terjadinya pergeseran jenis penyakit. Kalau dulu penyakit infeksi merupakan penyebab kematian terbanyak, kini penyakit akibat usia lanjut dan proses degenerasi semakin menonjol. Kematian karena penyakit jantung koroner dan stroke makin meningkat, dan penyakit tumor atau kanker merupakan salah satu penyakit degenerasi yang juga ditakuti. Dikenal dua macam tumor, yaitu tumor jinak dan tumor ganas atau disebut kanker. Tumor jinak tidak banyak mengganggu, dan pertumbuhannya lambat. Sebaliknya tumor ganas, karena pertumbuhannya sangat cepat dan tidak terkendali, maka ia akan sangat mengganggu, dapat menyebar ke organ-organ lain dan menyebabkan kematian.

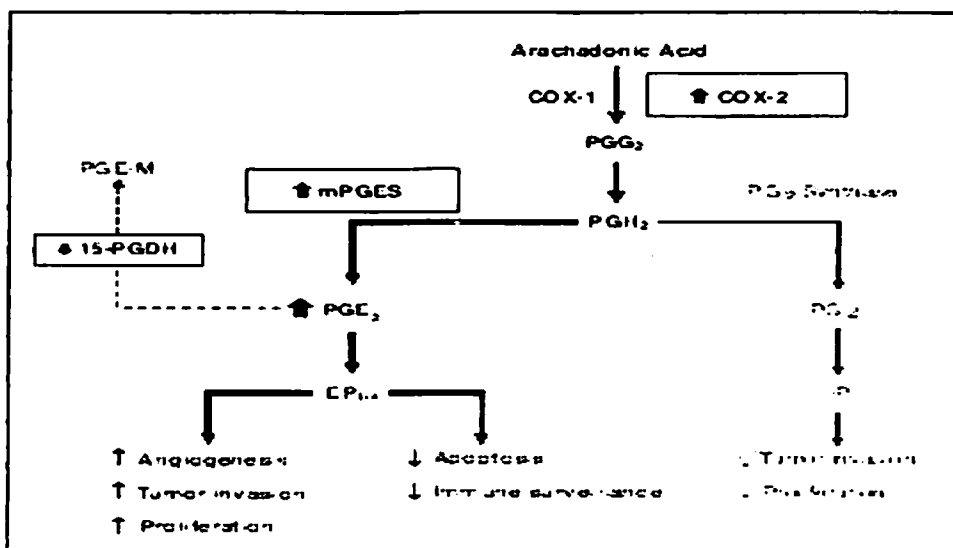
Di Amerika, ditemukan lebih dari 600.000 kasus kanker baru setiap tahunnya, atau sebanyaknya 1.600 orang per hari, dan satu dari lima orang Amerika meninggal karena kanker. Pada penderita kanker, umumnya diawali dengan proses menjalarnya sel kanker melalui pembuluh darah dan tumbuh disembarang jaringan menjadi tumor. Seiring dengan itu, terjadi pula pertumbuhan pembuluh darah baru (angiogenesis) menyebar ke arah berkembangnya tumor. Angiogenesis ini diperlukan oleh sel tumor sebagai saluran penyedia nutrien, oksigen dan sirkulasi kotoran agar dapat terus tumbuh dan menyebar (Finetti F *et al.*, 2008).

Berkaitan dengan itu para peneliti kini memusatkan perhatian pada proses penghambat pertumbuhan sel kanker baik dengan induksi apoptosis atau mencegah pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis); Meiyanto *et al.*, 2008). Pada pertumbuhan sel tumor, melalui 3 fase yaitu inisiasi, promotif dan progresif. Untuk mengendalikan ini diperlukan langkah pencegahan antara lain berupa bahan preventif-kemo (chemopreventive) yang meregulasi apoptosis dan mencegah angiogenesis.

Apoptosis merupakan program bunuh diri sel yang berperan menjaga homeostatis perkembangan biakan sel. Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang dapat menyebabkan terjadinya kanker. Pada sel-sel kanker antara lain kolorektal kanker, kanker kulit dan kanker payudara terjadi overekspresi COX-2 yang berakibat overproduksi prostanoide. (Gierach *et al.*, 2008).

Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru, yang dipicu oleh peningkatan produksi prostaglandin PGE<sub>2</sub> hasil metabolisme asam

arakhidonat yang dikatalisis oleh *cyclooxygenase-2* (COX-2). Peningkatan produksi prostaglandin dapat menimbulkan respon inflamasi pada solid tumors, termasuk kanker payudara dan colon rectal. Prostaglandin mempengaruhi motilitas sel kanker, invasi, vascularisasi dan proses metastatik. Hal ini mendorong ekspresi proangionik faktor, seperti vascular endothelial growth factor dan fibroblast growth factor. Oleh karena itu COX merupakan salah satu target therapeutic pada angiogenesis (Barnes & Bundred, 2005).



Gambar 1.1. Pengaruh Cyclooxygenase terhadap proses terjadinya kanker (Csiki & Johnson, 2006).

*Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAIDs)* adalah senyawa yang dapat menghambat 2 isoform *cyclooxygenase* (COX-1 dan COX-2), enzyme yang bertanggung jawab pada pembentukan prostaglandin dari asam arakhidonat (Rainsford, 2007, Ackerstaff *et al*, 2007). Martinez *et al.*, (2006) juga melaporkan bahwa *NSAIDs* terutama COX-2 inhibitor memacu apoptosis dan menghambat angiogenesis sel kanker.

COX-2 inhibitor yang ada di pasaran, terutama golongan coxib dapat digunakan sebagai kemopreventiv kanker yang bersifat proapoptotik dan menghambat angiogenesis, tetapi mempunyai efek samping bersifat protrombotik dan berbahaya karena meningkatkan infark myocardial (Dilber, S.P. *et al*, 2008). Hal ini mendorong dilakukannya penelitian sintesis obat baru penghambat COX-2 yang mempunyai efek samping minimal.

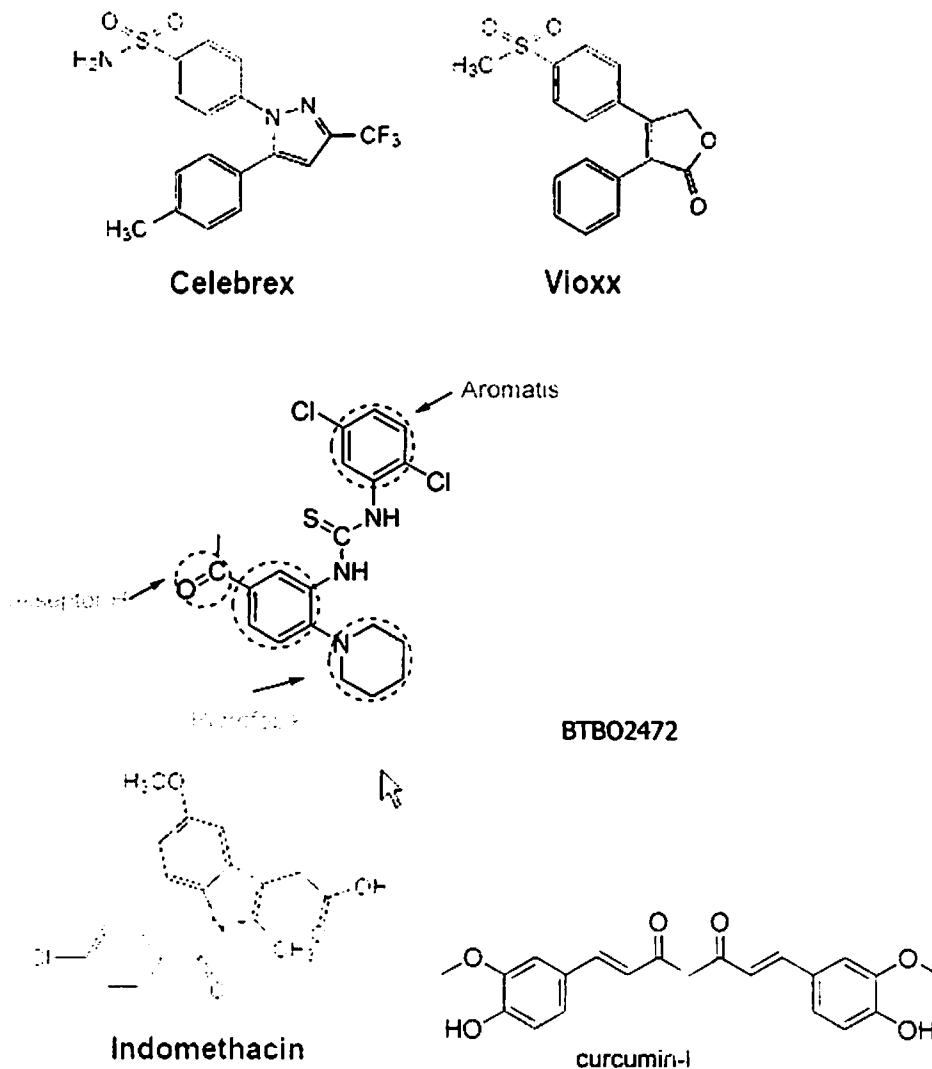
Indonesia yang dikenal sebagai *mega center biodiversity* kedua di dunia, mempunyai potensi kandungan kimia cukup besar berupa metabolit primer maupun sekunder sebagai sumber obat. Sejak jaman dahulu kala nenek moyang hingga sekarang kita telah memanfaatkan tumbuhan untuk bahan obat-obatan. Contohnya pada pengobatan nyeri, radang maupun infeksi digunakan ramuan yang mengandung kencur (*Kaempferia galanga* L.) (Santosa dkk., 1997; Ekowati<sup>a</sup> dkk., 2009).

Santosa dkk., (1997) melaporkan bahwa etil *p*-metoksisinamat (EPMS) adalah bahan aktif yang berperan terhadap aktivitas tersebut, dengan cara menghambat pembentukan prostaglandin (PG) (Sadono & Hasmono, 2000). Khotib *et al* (2007) dan Sulaiman *et al* (2008) melaporkan bahwa EPMS dalam ekstrak *Kaempferia galanga* mempunyai aktivitas anti nociceptiv dan antiinflamasi.

Xue & Chen (2001) melaporkan EPMS sebagai penghambat tumor promoter teleocidin B-4 yang diinduksi Epstein-Barr virus (EBV) maupun ornitin dekarboksilase pada epidermis dan papiloma kulit mencit. Tewtrakul *et al* (2005) melaporkan hasil uji toksisitas ekstrak *Kaempferia galanga* dengan Brine Shrimp Lethality test pada mencit (LD50 = 26.84 µg). Hal ini memberikan ide kepada peneliti untuk memanfaatkan EPMS dari rimpang kencur sebagai material awal untuk pembuatan senyawa penghambat COX-2 yang dapat digunakan sebagai kemopreventiv kanker yang mempunyai aktivitas tinggi dan efek samping rendah.

Ditinjau dari strukturnya, Michaux *et al.*, (2006) melaporkan pendekatan berdasarkan topologi *binding site* pada COX-2, yaitu adanya 4 poin farmakofor (gugus fungsi yang berikatan dengan *binding site* enzim) COX-2, yaitu satu akseptor ikatan hidrogen, dua gugus hidrofobik dan satu gugus aromatik. Rajakrishnan *et al.*, (2008) melaporkan juga berdasarkan metode Docking (SYBYL 6.81 dan AutoDock 3.0), diketahui senyawa *small peptide* dapat menghambat COX-2 dengan potensi dalam range nanomolar. Chopra *et al.*, (2008) menyebutkan model farmakofor COX-2 inhibitor yang terdiri dari satu akseptor hidrogen, 1 donor hidrogen, 1 gugus aromatis dan 1 gugus hidrofobik alifatik.

Contoh senyawa mengandung farmakofor COX-2 inhibitor seperti terlihat pada Gambar 1.2.



Gambar 1.2. Beberapa contoh senyawa COX-2 inhibitor

Pada Gambar 1.2. tampak beberapa contoh COX-2 inhibitor yang mengandung farmakofor sesuai yang dinyatakan berupa akseptor ikatan hidrogen, gugus hidrofobik dan aromatis (Michaux *et al*, 2006, Chopra *et al*, 2008).

Contoh pada senyawa BTBO2472, gugus karbonil berinteraksi dengan asam amino Hys90 melalui ikatan hidrogen, ikatan ini memegang peranan sangat penting pada kompleks senyawa tsb dengan COX-2. Sedangkan gugus piperidin dan diklorofenil masing-masing berikatan dengan hydrofobik channel di sebelah atas dan bawah sisi aktif enzim. Interaksi antara CH... $\pi$  terlihat pada gugus piperidin dan Tyr355. Gugus diklorofenil dikelilingi oleh aromatis residu pada Trp387, Phe381 dan Tyr385 (Michaux *et al.*, 2006).

Untuk mendapatkan farmakofor COX2 inhibitor tersebut di atas, dilakukan beberapa tahap reaksi kimia. Langkah pertama adalah merubah EPMS menjadi

APMS (asam *p*-metoksisinamat) melalui reaksi hidrolisis. Langkah kedua merubah APMS menjadi halida asamnya yaitu *p*-metoksisinamoil klorida (Dolzhenko *et al*, 2006; Ekowati, dkk., 2009). *p*-metoksisinamoil klorida ini selanjutnya akan direaksikan beberapa tahap melalui reaksi substitusi nukleofilik pada gugus asil halida dengan beberapa amina aromatis sehingga diperoleh senyawa amida dan turunan tiourea.

Dalam rangka memperkuat dugaan bahwa senyawa-senyawa yang akan disintesis mempunyai aktivitas hambatan terhadap COX-2, maka akan dilakukan docking studies terhadap COX-2 menggunakan program Autodock Vina dengan pembandingan senyawa SC558. Selain itu akan dilakukan uji skrining terhadap *Artemia salina* dengan BST dan uji kemopreventif kanker menggunakan induser benzopiren dengan binatang coba mencit jantan Balb/C.

#### 1.4. Rumusan Masalah :

- 1.4.1. Apakah modifikasi struktur EPMS menjadi senyawa amida dan kelompok *p*-metoksisinamoiltiourea akan menghasilkan senyawa baru yang mempunyai *binding affinity* terhadap COX-2 ?
- 1.4.2. Apakah senyawa-senyawa yang mempunyai *binding affinity* tertinggi terhadap COX-2 tersebut mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap *Artemia salina* dengan uji BST?
- 1.4.3. Apakah senyawa-senyawa tersebut mempunyai aktivitas kemopreventif kanker pada mencit yang diinduksi dengan benzopiren secara *in vivo* ?

#### 1.5. Hipotesis Penelitian :

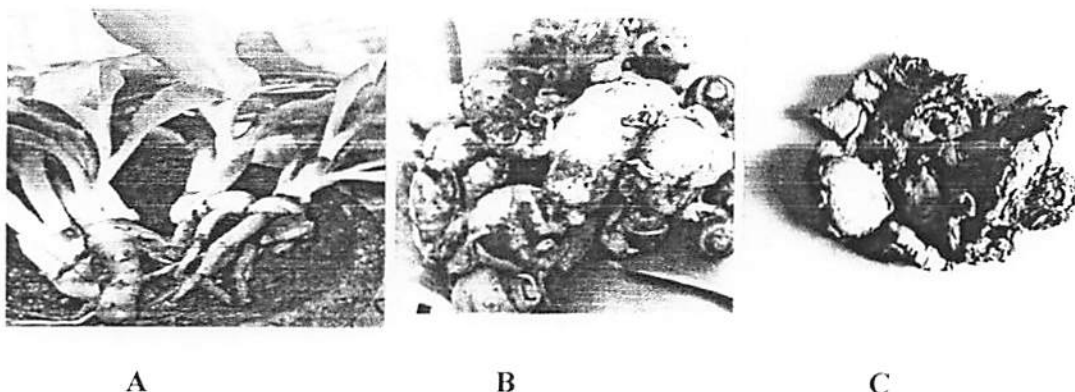
- 1.5.1. Diperoleh senyawa-senyawa baru turunan EPMS yang mempunyai afinitas COX-2 inhibitor.
- 1.5.2. Senyawa-senyawa hasil sintesis tersebut mempunyai aktivitas sitotoksik dengan BSL test
- 1.5.3. Senyawa-senyawa hasil sintesis tersebut mempunyai aktivitas kemopreventif kanker pada mencit yang diinduksi benzopiren.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

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

Tanaman kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) merupakan tanaman suku Zingiberaceae dengan ciri-ciri seperti terlihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Tanaman kencur

Pada Gambar 2.1 A. tampak terna berwarna yang hampir menutupi tanah, tidak berbatang, rimpangnya bercabang dengan daun unggal, lonjong, bagian atas tidak berambut, bagian bawah berambut halus, ujung runcing dan berwarna hijau dengan bunga berwarna putih. Pada Gambar 2.1B tampak rimpang kencur basah, dan rimpang kencur kering (Gambar 2.1C) yang berwarna coklat pada bagian luar dan putih pada bagian dalam (TOI, 2009; Wikipedia, 2009).

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).

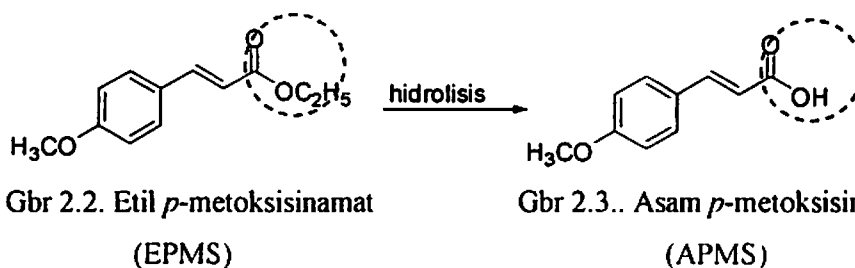
### 2.2. Tinjauan tentang Etil *p*-metoksisinamat (EPMS)

Etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari *Kaempferia galanga* Linn. (kencur) berpeluang untuk dikembangkan sebagai senyawa golongan *NSAIDs* terutama *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).

Hasil analisis GC/MS kandungan kimia 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 (Gambar 2.2.) mengalami hidrolisis menjadi asamnya yaitu asam *p*-metoksisinamat (APMS) (Sadono & Hasmono, 2001) (Gambar 2.3.).



Pada Gambar 2.2., gugus fungsi ester mengalami metabolisme menjadi gugus asam karboksilat (Gambar 2.3.). Ekowati *et al.*, (2004) telah membuktikan reaksi hidrolisis EPMS menjadi APMS yang direflux selama 2 jam dengan pereaksi larutan KOH 5% dalam etanol, kemudian diasamkan dengan larutan HCl diperoleh hasil 80%.

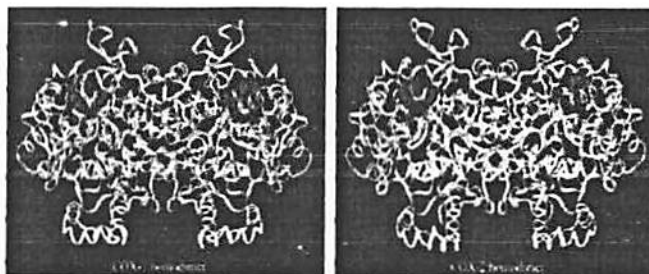
Pada penelitian penulis berikutnya menunjukkan bahwa apabila ikatan rangkap alifatik pada APMS dirubah menjadi ikatan tunggal melalui reaksi hidrogenasi, maka aktivitas analgesik senyawa tersebut yang diuji dengan metode writhing test akan menurun ( $ED_{50} = 101$  mg/kg bb) (Ekowati *et al.*, 2007). Perubahan gugus asam karboksilat menjadi amida aromatis, menunjukkan perubahan pada aktivitas biologis berupa sedasi pada hewan coba mencit Balb/C. Hal ini diduga berhubungan dengan peningkatan lipofilisitas senyawa sehingga lebih mudah menembus membran brain barrier (Ekowati *et al.*, 2009).

## 2.5. Tinjauan tentang Siklooksigenase (COX-1 dan COX-2)

Siklooksigenase adalah hemeprotein yang terikat membran, yang mengadakan katalisis bi-oksigenasi asam arakhidonat menjadi prostaglandin G2 dan direduksi jadi

prostaglandin H<sub>2</sub>, jadi memacu jalur prostanooid dari kaskade asam arakhidonat. 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 (prosta-glandin J<sub>2</sub> atau prostacyclin), kontraksi otot polos, kelahiran dan agregasi platelet (Simmon *et al*, 2004).

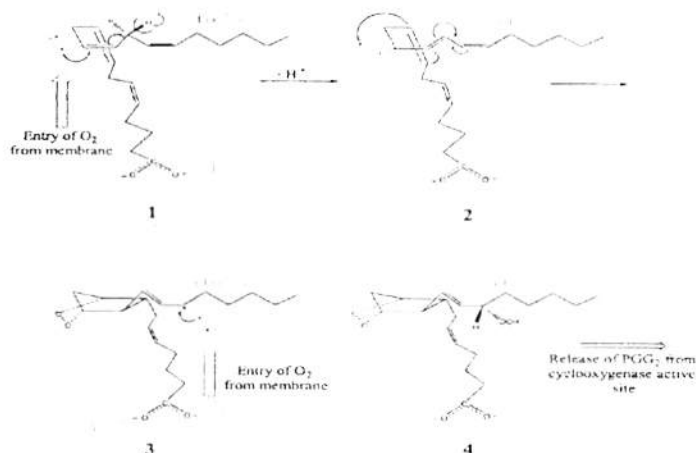
Penemuan dua bentuk enzim COX-1 dan COX-2 dapat menimbulkan berbagai faktor seperti endotoksin bakterial (lipopoly saccharide), interleukin-1, phorbol esters dan mi-togen lain yang hanya terdapat dalam sel inflamasi yang dirangsang.



Gbr. 2.4. Struktur kristal COX-1 dari ovin (kiri) dan COX-2 dari murine (kanan) mengandung 4 domain (Simmon *et al.*, 2004).

Dari Gambar 2.4., tampak 4 domain penting pada enzim 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).

Mekanisme siklooksigenase mengkatalisis asam arakhidona: menjadi prostaglan-din dapat dilihat pada Gambar 2.5.



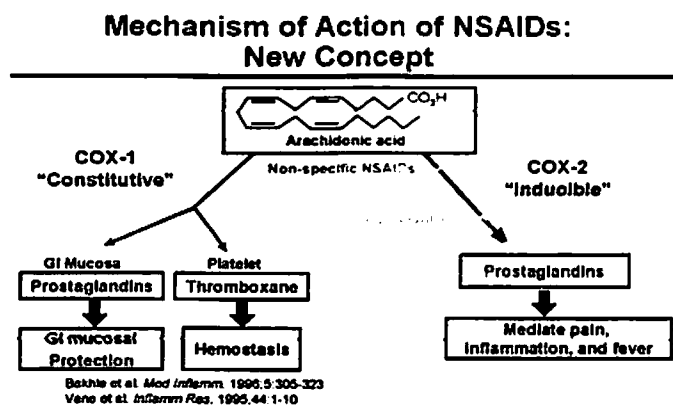
Gambar. 2.5. Katalitik step dari siklooksigenase (Simmons *et al.*, 2004).

Pada Gambar 2.5, tahapan pertama reaksi katalisis siklooksigenase adalah asam ara-khidonat yang terikat pada *active site* siklooksigenase (Arg120 & Tyr355), membentuk ori-entasi bentuk L dengan merubah posisi C15 sehingga memungkinkan terjadinya pengambil-hidrogen oleh Tyr385. Tahap kedua dimulai dengan masuknya molekul O<sub>2</sub> dari membran domain enzim dan terikat pada C11 & C9 sehingga membentuk endoperoksida. Tahap ketiga bentuk radikal pada C15 diserang molekul O<sub>2</sub> yang kedua, mengakibatkan reabstraksi hidrogen dari Tyr385 menghasilkan prostaglandin PGG<sub>2</sub> dan regenerasi radikal tyrosil berikutnya.

## 2.6. Tinjauan tentang COX-2 Inhibitor

Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs (*NSAIDs*) dapat digolongkan menjadi 2, non selective inhibitor (COX-1 dan COX-2) dan selective inhibitor (COX-2). Potensi rasio COX-2/COX-1, yang menunjukkan selektif inhibitor COX-2 dengan potensi rasio lebih besar dari 10 didapat pada : nimesulide, flufenasin, asam nifumik, asam mefenamat. *NSAIDs* dengan COX-1 selektif dengan potensi rasio sampai 100 ialah indometasin, tolmetin dan piroksikam.

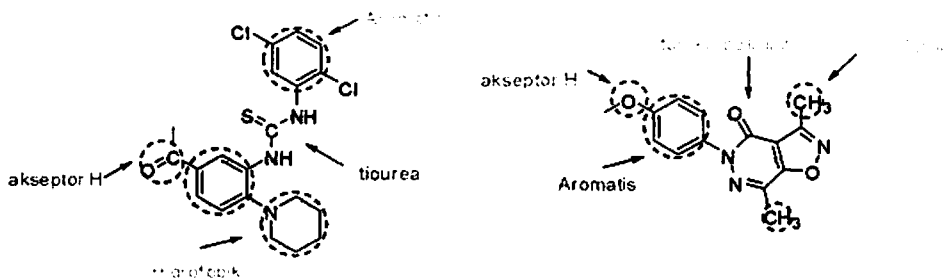
Mekanisme kerja *NSAIDs* terutama pada hambatan enzim siklooksigenase (COX-1 dan COX-2)



Gambar 2.6. Mekanisme kerja *NSAIDs*

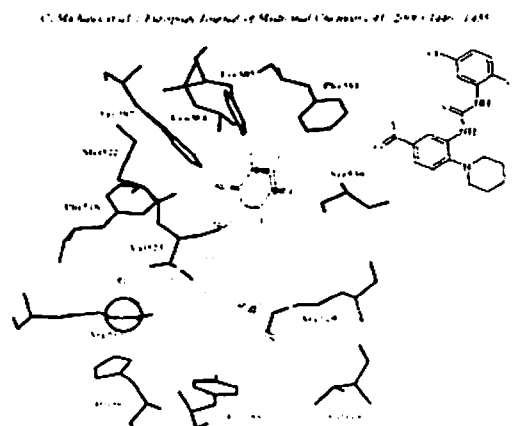
Pada Gambar 2.6, tampak jelas mekanisme kerja *NSAIDs* yang menghambat COX-1 dan COX-2. Hambatan yang tidak spesifik tersebut menimbulkan efek samping pada saluran cerna dan homeostasis, sehingga dikembangkan *NSAIDs* yang spesifik menghambat COX-2.

Michaux *et al.* (2006) melaporkan adanya 4 point farmakofor pada COX-2 inhibitor, contohnya pada senyawa BTBO2472 (Gambar 2.7).



Gambar 2.7. Farmakofor pada senyawa BTBO2472 (Michaux *et al.*, 2006).

Pada Gambar 2.7., tampak 4 point farmakofor pada senyawa COX-2 inhibitor, yaitu gugus hidrofobik, akseptor ikatan hidrogen, turunan karboksilat dan cincin aromatis. Interaksi farmakofor BTBO2472 dg active site COX-2 dapat dilihat pada Gbr 2.8.



Gbr 2.8. Human COX-2 active site in complex with BTBO2472 (Michaux *et al.*, 2006).

Pada Gambar 2.8, tampak interaksi gugus karboksil senyawa uji membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino His90 pada enzim COX-2. Selain itu, cincin piperidin dan gugus diklorofenil berinteraksi dengan asam amino Tyr355. Sedangkan gugus diklorofenil dikelilingi oleh asam amino Trp387, Phe 381 dan Tyr 385 (Michaux *et al.*, 2006).

Dilaporkan bahwa *NSAIDs* yang spesifik menghambat COX-2 mempunyai ciri-ciri yaitu akseptor ikatan hidrogen, dua gugus hidrofobik dan cincin aromatis (Michaux *et al.*, 2006).

## 2.7. Tinjauan tentang kanker

Kanker adalah keadaan yang terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut : mandiri dalam signal pertumbuhan, tidak peka signal

anti pertumbuhan, menghindari apoptosis, memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, angiogenesis, invasi dan metastase ke jaringan lain. Kanker disebabkan dari multi stage proses karsinogenesis yang saling berhubungan, yaitu : inisiasi (*normal cell* → *transformed or initiated cell*), promosi (*initiated cell* → *preneoplastic cell*), dan progresi (*preneoplastic cell* → *neoplastic cell*).

Sel yang tertransformasi kemudian berubah menjadi *preneoplastic cells*; proses promosi ini berlangsung tidak secepat inisiasi. Deregulasi signal transduction pathways seperti serine threonine kinase, Akt kinase/protein kinase B (Akt[PKB]), activator protein 1 (AP-1), nuclear factor kappa B (NF-kappa B), mitogen-activated protein kinase (MAPK), androgen receptor, estrogen receptor, and Raf/Ras pathways juga berkontribusi pada proses carcinogenesis (Meiyanto *et al*, 2008)..

Terdapat 6 Karakter sel kanker (Budiani, 2009) yaitu :

1. Growth signal autonomy:

- Sel normal memerlukan sinyal eksternal untuk pertumbuhan dan pembelahannya
- Sel kanker mampu memproduksi growth factors dan growth factor receptors sendiri.
- Dalam proliferasinya sel kanker tidak tergantung pada sinyal pertumbuhan normal.
- Mutasi yang dimilikinya memungkinkan sel kanker untuk memperpendek Growth Factor pathways .

2. Evasion Growth inhibitory signals :

- Sel normal merespon sinyal penghambatan pertumbuhan untuk mencapai homeostasis. Jadi ada waktu tertentu bagi sel normal untuk proliferasi dan istirahat.
- Sel kanker tidak mengenal dan tidak merespon sinyal penghambatan pertumbuhan.
- Keadaan ini banyak disebabkan adanya mutasi pada beberapa gen (proto-onkogen) pada sel kanker.

3. Evasion of Apoptosis Signals :

- Sel normal akan dikurangi jumlahnya dengan mekanisme apoptosis. bila ada kerusakan DNA yang tidak bisa lagi direparasi.

ditentukan oleh pemendekan telomere pada kromosom yang akan berlangsung setiap ada replikasi DNA.

- Sel kanker memiliki mekanisme tertentu untuk tetap menjaga telomere tetap panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri.
- Kecacatan dalam regulasi pemendekan telomere inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki *..nlimited replicative potential*.

#### 5. Angiogenesis (*formation of blood vessels*):

- Sel normal memiliki ketergantungan terhadap pembuluh darah untuk mendapatkan suplay oksigen dan nutrient yang diperlukan untuk hidup. Namun, arsitektur pembuluh darah sel normal lebih sederhana atau konstan sampai dengan sel itu dewasa.
- Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah baru ini diperlukan untuk survival sel kanker dan ekspansi ke bagian lain dari tubuh (metastase).
- Kecacatan pada pengaturan keseimbangan induser angiogenik dan inhibitorynya dapat mengaktifkan angiogenic switch.

#### 6. Invasion and metastasis :

- Normal sel memiliki kepatuhan untuk tidak berpindah ke lokasi lain di dalam tubuh.
- Perpindahan sel kanker dari lokasi primernya ke lokasi sekunder atau tertierinya merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker
- Mutasi memungkinkan peningkatan aktivitas enzim-enzim yang terlibat invasi sel kanker (MMPs)
- Mutasi juga memungkinkan berkurangnya atau hilangnya adesi antar sel oleh molekul-molekul adisi sel, meningkatnya attachment, degradasi dan migrasi

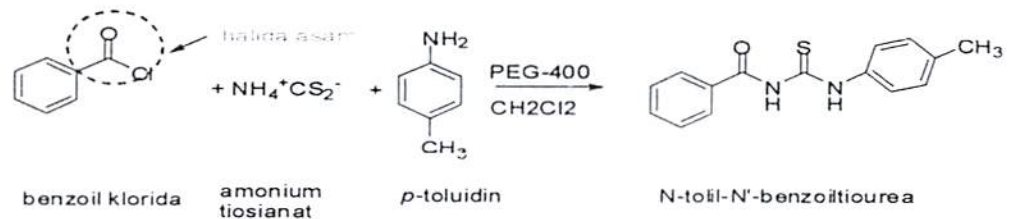
Pada percobaan *in vitro*, perbedaan karakter antara sel normal dan kanker adalah sebagai berikut :

- Sel normal akan tumbuh sebagai selapis sel (*monolayer*) jika dibiakan dalam petridish, semua ini karena adanya kepekaan terhadap *contact inhibition* dengan sel-sel tetangganya (bila sel normal sudah menyentuh sel tetangganya maka pertumbuhannya akan berhenti).
- Transformed cells (sel kanker) memiliki fenotipe sebagai berikut :

- o Tumbuh terus tanpa mengenal *contact inhibitory signals*, tumbuh menumpuk ke atas bukan sebagai monolayer.
- o Dapat tumbuh dalam kondisi minim serum (serum / FBS (fetal bovine seru) berisi banyak Growth factor, sel kanker mampu memenuhi kebutuhan Growth factors sendiri.
- o Morfologi sel kanker lebih membulat dengan inti yang relatif lebih besar (karena aktif membelah).

## 2.9. Tinjauan tentang Sintesis Turunan Tiourea

Sintesis turunan tiourea khususnya benzoiltiourea, dilaporkan pertama kali oleh Xu *et al.*, (2003) (Gambar 2.10). Prinsip reaksi tersebut adalah reaksi substitusi nukleofilik halida asam dengan amonium tiosianat dilanjutkan dengan reaksi adisi nukleofilik dengan senyawa amina.



Gambar 2.10. Sintesis turunan tiourea dengan metode Xu *et al.*, (2003).

Pada Gambar 2.10. tersebut, asil halida yang digunakan adalah benzoil klorida sedangkan senyawa aminanya adalah anilin tersubstitusi halogen (floro dan kloro). Hasil sintesisnya adalah *N*-fenil-*N'*-benzoiltiourea, *N*-(4-klorofenil)-*N'*-benzoiltiourea dan *N*-(4-fluorofenil)-*N'*-benzoiltiourea.

Prinsip reaksi yang sama dengan Xu (2003) juga diterapkan oleh Arslan *et al.* (2004) dan Ozer *et al.* (2009) pada sintesis senyawa turunan benzoil tiourea, yang meng-ganti pelarut diklorometana dengan aseton. Reaksi sintesis ini dilakukan pada temperatur kamar dan memberikan prosentase hasil yang relatif tinggi.

Suzana *et al.*, (2009) melaporkan sintesis beberapa turunan tiourea menurut metode Xu dengan cara mengubah pereaksi amina yang digunakan. Senyawa-senyawa tersebut yaitu *N*-(4-tolil)-*N'*-2-klorobenzoiltiourea, *N*-(4-tolil)-*N'*-4-klorobenzoiltiourea dan *N*-(4-tolil)-*N'*-2,4-diklorobenzoiltiourea.



[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

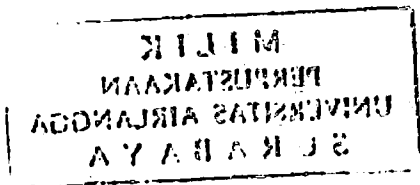
[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

[Faint, illegible text]

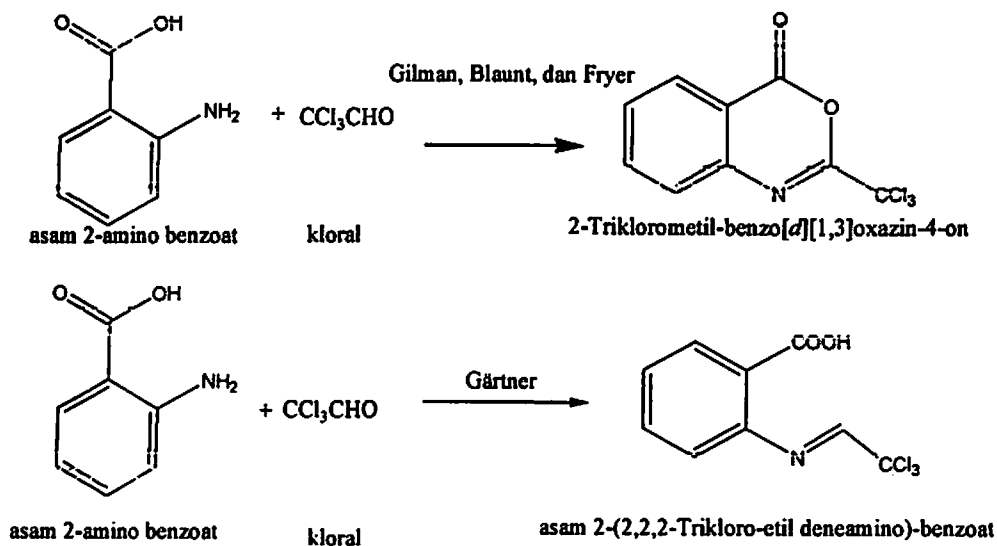
[Faint, illegible text]



## 2.10. Tinjauan tentang Benzoxazin

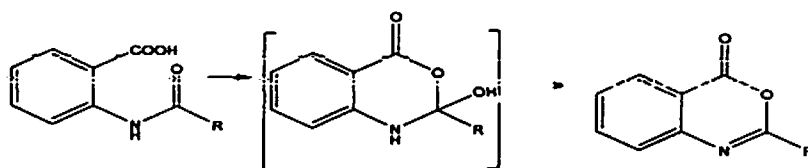
### 2.10.1 Tinjauan tentang Sintesis turunan Benzoxazin

Gärtner mereaksikan asam antranilat dengan kloral dan menghasilkan imin. Sedangkan, menggunakan bahan awal yang sama, Gilman, Blaunt, dan Fryer menghasilkan cincin tertutup (Wiklund, 2004). Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Reaksi antara asam antranilat dan kloral

Ketika asam antranilat dikondensasi dengan aldehida, maka 1,2-dihidro-4H-3,1-Benzoxazin-4-on terbentuk melalui serangan nukleofil intra molekul dan pergeseran proton. Produk akhir lebih stabil dari pada bentuk intermediet imin (gambar 2.12) dan pada kondisi normal tidak dapat diisolasi. Reaktifitas dari senyawa ini belum banyak dieksplorasi. (Wiklund, 2004)



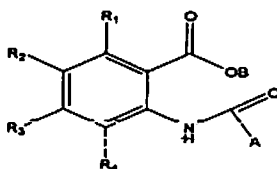
Gambar 2.12 Reaksi pembentukan 1,2-dihidro-4H-3,1-Benzoxazin-4-on dengan intermediet imin (Wiklund, 2004)

Metode yang dapat digunakan untuk sintesis benzoxazin dapat dibagi menjadi tiga kelas :

1. Metode dimana pembentukan intermediet benzoxazin menggunakan pengaruh dari *cyclization agent*.

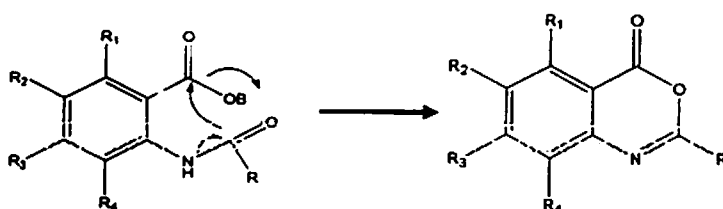
2. Metode yang didasarkan pada seleksi reaktan dengan heteroatom yang sesuai. Reaktan ini memiliki potensial yang diperlukan untuk membentuk bagian heterosiklik dari molekul benzoxazin
3. Metode yang menggunakan formasi asam antranilat (3,1-benzoxazol) sebagai lang-kah kunci dari reaksi. (Shariat, *et.al.*,2004).

Struktur umum dari intermediet yang dapat diubah menjadi cincin benzoxazinon dengan menggunakan *cyclization agent* dapat dilihat pada gambar 2.13



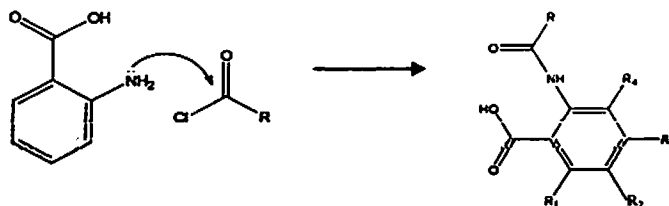
**Gambar 2.13.** Senyawa intermediet yang digunakan untuk membentuk cincin benzoxazin dengan menggunakan *cyclization agent* (Shariat, *et.al.*,2004)

Senyawa pada gambar 2.13 merupakan derivat dari asam antranilat dimana gugus fungsi A adalah gugus yang stabil sedangkan gugus OB adalah gugus pergi yang dapat menginduksi terbentuknya cincin heterosiklik dari molekul benzoxazin (Shariat, *et.al.*,2004). Gugus pergi adalah gugus apa saja yang dapat digeser dari ikatannya dengan suatu atom karbon. Sedangkan *cyclization agent* menyebabkan serangan nukleofil dari atom oksigen terhadap atom karbon yang mengikat gugus pergi OB. (gambar 2.14)



**Gambar 2.14.** Pembentukan cincin benzoxazin dengan menggunakan *cyclization agent* (Shariat, *et.al.*,2004)

Untuk membuat senyawa intermediet benzoxazin dapat dilakukan dengan mere-aksikan asil klorida dan asam antranilat seperti pada gambar 2.15.



**Gambar 2.15. Reaksi pembentukan intermediet benzoxazin dari asil klorida dan asam antranilat**

Hasil penelitian Archer menunjukkan bahwa stabilitas cincin benzoxazin terhadap serangan nukleofilik bergantung pada R yang mengikat pada posisi 2. Jika R merupakan hidrogen atau alkil berukuran kecil, maka peluang terbukanya cincin karena serangan nukleofil lebih besar.

### **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I**

#### **3.1. Tujuan**

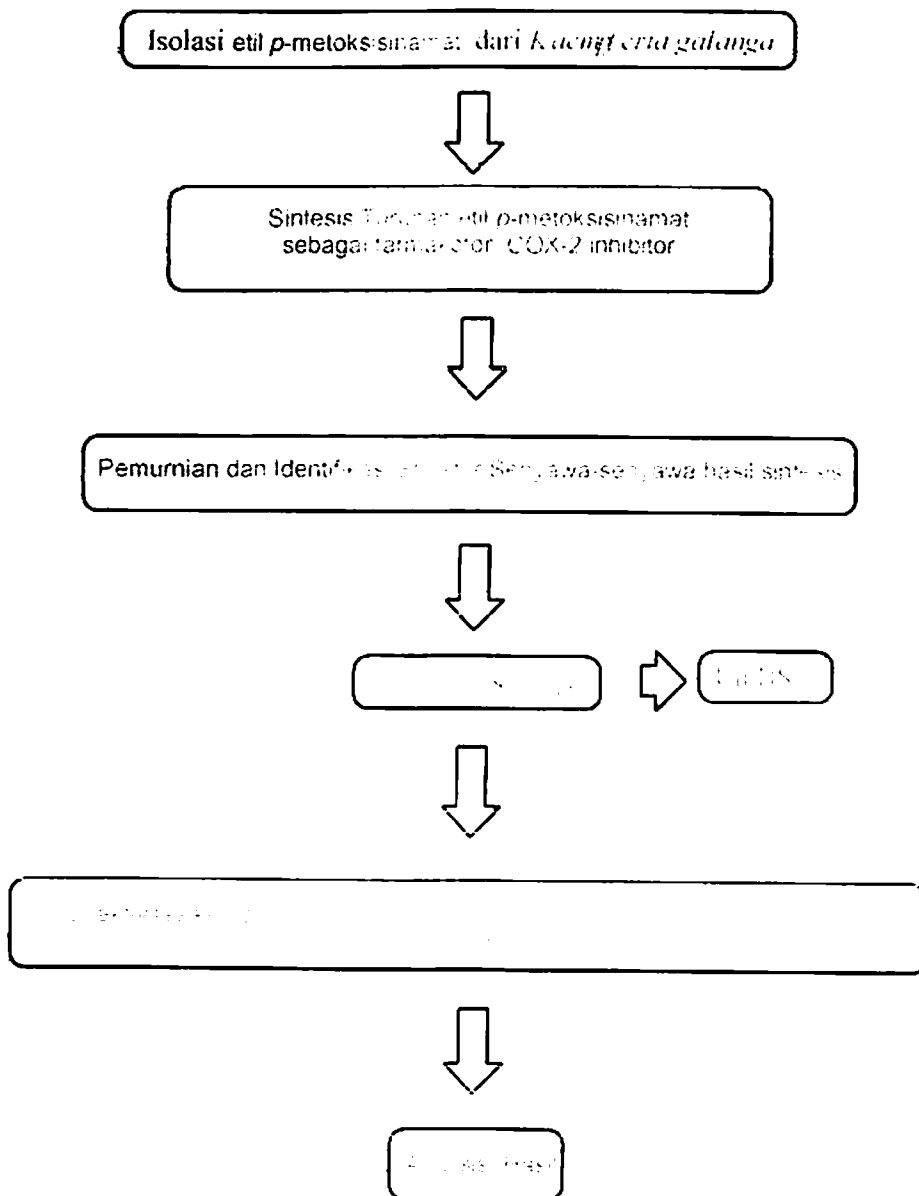
- 3.1.1. Memperoleh senyawa baru hasil modifikasi struktur EPMS yang diduga mempunyai aktivitas COX-2 inhibitor.
- 3.1.2. Membuktikan aktivitas senyawa hasil sintesis sebagai COX-2 inhibitor.
- 3.1.3. Membuktikan aktivitas senyawa hasil sintesis sebagai kemopreventif kanker.
- 3.1.4. Menghasilkan publikasi ilmiah senyawa baru COX-2 inhibitor dari *Kaempferia galanga* Linn.

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

- 3.2.1. Di bidang kimia organik, diperolehnya informasi baru tentang modifikasi struktur EPMS menjadi COX-2 inhibitor yang dapat digunakan untuk modifikasi senyawa-senyawa analog.
- 3.2.2. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam pengobatan penyakit lain yang berhubungan dengan COX-2, seperti diabetes melitus dan Alzheimer.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1. Desain Penelitian



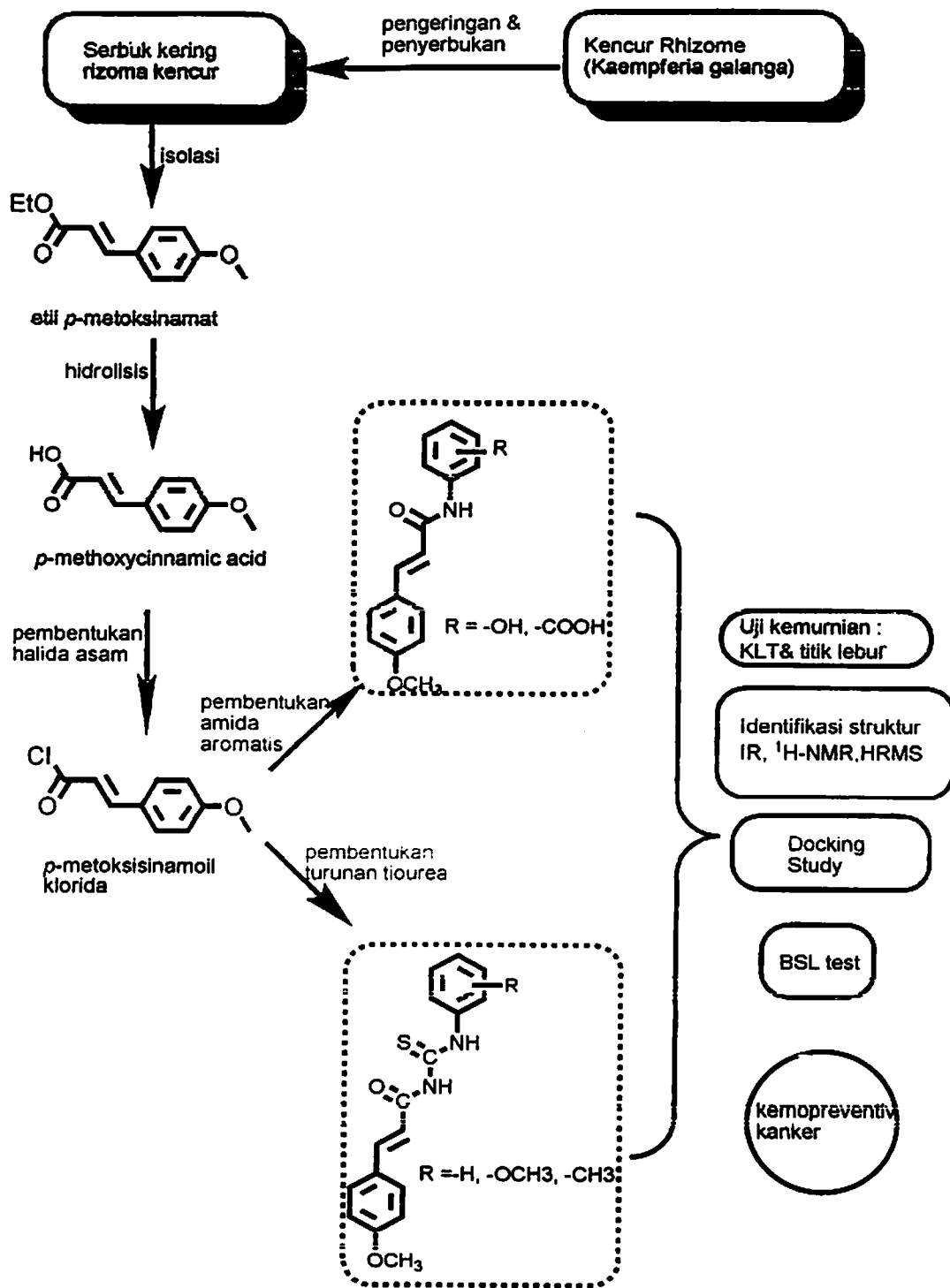
Gambar 4.1. Skema Desain Penelitian

### 4.2. Alat dan Bahan :

**4.2.1. Bahan** : kencur, tionil klorida p.s, piridin p.a, THF p.a, trietilamina p.a., amonia p.a, asam antranilat p.s., *p*-aminofenol p.a, *p*-toluidin p.a., benzena p.a., CMC-Na teknis, normal saline steril, eter p.a., kloroform p.a., petroleum eter p.a, heksana teknis, etil asetat p.a., asam a-setat glasial p.a., metanol p.a, etanol 96% teknis,

**4.2.2. Alat** diklorometana p.a., benzopiren p.a.  
: alat gelas di laboratorium, Spektrofotometer Jasco FT-IR 5300, Spektrometer NMR Bruker, Electrothermal Mel-Temp, Corning Hot Plate P 351, Neraca analitik Shimadzu LM-20, jarum suntik 26G/30G dan spuit 1 ml, papan bedah, seperangkat gunting operasi.

### 4.3. Rancangan Penelitian



Gambar 4.2. Skema Rancangan Penelitian



#### 4. 4. Prosedur Preparasi Sampel

##### 4.4.1. Pembuatan serbuk rimpang kencur

Rimpang kencur diperoleh dari Kebun Balai Materia Medika yang dipanen pada musim kemarau, dimana hasil metabolit sekunder paling besar. Rimpang kencur tersebut dicuci dan dibilas hingga bersih dan ditiriskan. Rimpang yang sudah bersih diiris tipis-tipis, ke-mudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruangan selama satu minggu sambil dibolak-balik hingga kering, kemudian dioven pada suhu 50°C selama 24 jam (Natta *et al.*, 2008). Setelah kering, kemudian irisan rimpang kencur diserbuk dengan alat peng-giling untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi seperti prosedur di bawah ini :

##### 4.4.2. Isolasi etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari ekstrak rimpang kencur

Serbuk rimpang kencur kering sebanyak 5 kg direndam dengan etanol 96% dalam tabung perkolator sampai semua serbuk terendam ( $\pm$  5L) dan dibiarkan selama semalam. Setelah itu ekstrak diteteskan perlahan-lahan melalui kran perkolator dan ditampung dalam labu Erlenmeyer sampai didapatkan perkolat sebanyak 2,5 L. Perkolat dipekatkan sampai diperoleh kira-kira 500 ml perkolat pekat. Perkolat didinginkan dalam lemari es sampai terbentuk kristal putih kecoklatan, setelah itu kristal disaring dan dilanjutkan pemurnian dengan kromatografi kolom untuk isolasi etil *p*-metoksisinamat.

Isolasi etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dari ekstrak rimpang kencur dilakukan dengan kromatografi kolom, menggunakan fase diam Kiesel gel 60 Merck dan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (5:2). Tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Penyiapan sampel : ditimbang 5 gram ekstrak kering dilarutkan dalam etanol 96%, kemudian diberi adsorben silika secukupnya dan diaduk sampai kering sehingga analit teradsorpsi pada silika tersebut.
2. Penyiapan fase gerak : diukur *n*-heksana 150 ml, dan etil asetat 60 ml sehingga diperoleh perbandingan (5 : 2).
3. Penyiapan fase diam : 50 g silika gel dikeringkan dalam oven 105°C selama 1 jam, kemudian dicampur dengan fase gerak. Setelah itu dituang pelan-pelan ke dalam ko-lom, kelebihan fase gerak dikeluarkan sampai permukaan fase gerak sedikit di atas permukaan fase diam.
4. Proses pemisahan : sampel dituang hati-hati ke dalam kolom dan ditambahkan fase gerak perlahan-lahan sambil kran bawah dibuka. Fase gerak yang keluar

ditampung dalam fraksi-fraksi dalam jumlah volume masing-masing 3 ml. Selanjutnya masing-masing fraksi diperiksa komponennya dengan kromatografi lapisan tipis, menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (5:2). Noda hasil elusi dilihat dengan lampu UV  $\lambda$  254 nm, kemudian ditentukan Rfnya. Fraksi-fraksi yang mempunyai harga Rf yang sama dijadikan satu dan dibandingkan dengan Rf etil *p*-metoksisinamat standard (Ekowati, *et al.*, 2007).

Isolat yang diperoleh diuji kemurniannya dengan pemeriksaan titik lebur dan kromatografi lapisan tipis (KLT). Eluen yang digunakan pada KLT adalah heksana-etil asetat-aseton (13:3:10), heksana-kloroform-asam asetat (5:4:1), heksana-etilasetat (5:2). Identifikasi struktur isolat dilakukan dengan alat Infra Merah spektrofotometer,  $^1\text{H-NMR}$  spektrometer.

#### 4.4.3. Hidrolisis etil *p*-metoksisinamat (EPMS) menjadi asam *trans p*-metoksisinamat (APMS)

Ke dalam labu alas bulat dimasukkan 10 g (48.5 mmol) EPMS dan dilarutkan dalam 50 ml etanol 96%. Selanjutnya ditambahkan larutan 5% KOH / etanol sebanyak 25 ml. Campuran di refluks pada suhu  $80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Setelah refluks dihentikan, larutan didinginkan, kristal disaring dan dilarutkan dengan 10 ml air suling. Setelah itu ditambah HCl terbentuk endapan putih. Endapan dicuci beberapa kali dengan air untuk menghilangkan garam KCl yang terbentuk sebagai hasil samping reaksi dan disaring. Pemurnian senyawa hasil hidrolisis dilakukan dengan rekristalisasi menggunakan campuran etanol-air (70 : 30). Kristal yang terbentuk dikeringkan di oven pada suhu  $30-40^\circ\text{C}$  (Ekowati dkk, 2007).

Kristal yang diperoleh diuji kemurniannya dengan pemeriksaan titik lebur dan kromatografi lapisan tipis (KLT). Eluen yang digunakan pada KLT adalah kloroform -aseton - asam asetat (20:10:1), kloroform-etanol (5:1), kloroform-eter-asam asetat (20:10:1). Identifikasi struktur kristal dilakukan dengan alat infra merah spektrofotometer,  $^1\text{H-NMR}$ , HRMS spektrometer.

#### 4.4.4. Sintesis *p*-metoksisinamoil klorida dari asam *p*-metoksisinamat.

Ke dalam larutan dari 1 g asam *p*-metoksisinamat dalam benzena kering dan 1 tetes piridin dimasukkan 2.4 eq. tionil klorida. Campuran direflux semalam dalam kondisi berisi gas  $\text{N}_2$ , setelah itu kelebihan tionil klorida dan pelarut dihilangkan dengan rotary evaporation. Penambahan benzena kering diulang dan sisa tionil

klorida dihilangkan dengan *rotary evaporation* sehingga dihasilkan padatan kuning. *p*-metoksisinamoil klorida yang terbentuk disimpan di dalam gas N<sub>2</sub>.

#### 4.4.5. Reaksi *p*-metoksisinamoil klorida dengan ammonium tiosianat dan *p*-toluidina

Ke dalam labu reaksi dimasukkan 0,57 g (7,5 mmol) ammonium tiosianat, PEG 4 tetes dan 12,5 ml diklorometana dan 0,99 g (5 mmol) *p*-metoksisinamoil klorida. Campuran tersebut dimasukkan microwave, dan diiradiasi dengan kekuatan P2 selama 30x2 detik. Pada campuran tersebut akan tampak berwarna kuning, kemudian ke dalamnya dimasukkan 615 mg (5 mmol) *p*-toluidin dan dilanjutkan iradiasi selama 30x3 detik (terbentuk warna merah bata). Setelah itu ke dalam campuran tersebut ditambahkan berturut-turut 100 ml HCl 3N, diaduk dan cuci dengan aquadest; 100 ml NaOH 1N dan dicuci dengan aquadest. Rekristalisasi senyawa hasil sintesis dilakukan dengan pelarut etanol 70%.

#### 4.4.6. Reaksi *p*-metoksisinamoil klorida dengan asam antranilat.

1 gram *p*-metoksisinamoil klorida kering dan 0,6 gram asam antranilat dimasukkan dalam labu alas bulat dan ditambahkan 20 mL benzena kering. Campuran dipanaskan pada suhu 80-90 ° C selama tiga jam sambil diaduk dengan stirer. Pemanas listrik dimatikan dan terus diaduk selama dua belas jam pada suhu kamar. Pelarut diuapkan menggunakan rotavapor. Padatan yang diperoleh kemudian dicuci dengan air suling dan ditambah Natrium Karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) satu persen sampai pH 7-8, endapan lalu disaring menggunakan penyaring Buchner dan dilakukan kromatografi kolom serta uji KLT dan titik lebur. Hasil reaksi kemudian dipisahkan dari hasil sampingnya dengan kromatografi kolom, menggunakan 15 gram silika gel dan eluen kloroform : metanol (100 : 1). Cairan ditampung dan dilakukan uji KLT, vial yang memiliki noda yang sama kemudian disatukan dan diuapkan.

#### 4.4.7. Reaksi *p*-metoksisinamoil klorida dengan *p*-aminofenol.

Ke dalam larutan *p*-aminofenol dalam THF ditambahkan TEA. Kemudian ditambahkan juga larutan *p*-metoksisinamoil klorida dalam THF secara perlahan-lahan pada suhu 0°C, N<sub>2</sub> atm; selanjutnya reaksi dilanjutkan pada suhu kamar selama 16 jam. Setelah reaksi selesai, campuran tersebut diuapkan dengan penurunan tekanan.

Residu yang terbentuk ditambah aquadest, diaduk selama sekitar 30 menit, padatan yang terbentuk disaring. Padatan tersebut dicuci dengan  $\text{CHCl}_3$ , diaduk lagi 1 jam, dan saring.

#### 4.4.8. Uji Kemurnian

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

#### 4.4.9. Identifikasi Struktur Derivat EPMS

Identifikasi struktur senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan infra merah (IR), spektrometer resonansi magnet inti <sup>1</sup>H-NMR dan HRMS.

#### 4.5. Docking Studies

Docking studies dilakukan terhadap senyawa hasil sintesis terhadap COX-2 yang dikom-pleks dengan SC558, menggunakan program AutoDock Vina (pdb : code 1cx2). Hasil docking terbaik bila memenuhi kriteria :

- a. Energi afinitas terendah (kcal/mol)
- b. Secara geometris, struktur senyawa uji dapat menempati lekukan yang sama dengan SC558 pada enzim COX2. Hal ini tampak secara visual dengan cara mem-bandingkannya dengan struktur kristal dari SC558 pada domain active enzim.

#### 4.6. Uji Sitotoksik EPMS dan Dertivatnya dengan Metode BST

##### 4.6.1. Penetasan kista udang *Artemia salina*

Air laut dengan salinitas 5-150 ppt, pH 7,0-8,5; pada suhu kamar ( $\pm 30^\circ\text{C}$ ) dimasukkan dalam wadah kecil berbentuk botol terbalik, diberi sistem aerasi. Kista *Artemia salina* dimasukkan ke dalamnya, dengan konsentrasi 1g/1L, sambil terus diaerasi dan suhu dijaga 28-30 °C, sehingga *nauplii* dapat terpisahkan dari bagian kista atau kulit kista. Sesudah  $\pm 24$  jam, kista udang akan menetas menjadi *nauplii* siap digunakan untuk melakukan pengujian.

#### 4.6.2. Pembuatan Larutan Kontrol

Ke dalam vial transparan 10 ml dipipet 50,0  $\mu$ l DMSO dan 4 ml air laut, kemudian diaduk sampai homogen. Cek pH dan suhu larutan. Sebanyak 10 ekor *nauplii* dimasukkan ke dalam vial, ditambah air laut sampai 5,0 ml; kemudian dihomogenkan kembali.

#### 4.6.3. Pembuatan Larutan Uji EPMS dan derivatnya

Sebanyak 25,0 mg senyawa uji dilarutkan dalam etanol sampai 50,0 ml, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 500 ppm. Kemudian disiapkan vial transparan 10 ml yang sudah dikalibrasi 5,0 ml. Dari larutan induk dibuat 5 macam konsentrasi yang berbeda-beda pada tiap vial, yaitu 0 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm dan 500 ppm (dilakukan 3 kali replikasi). Selanjutnya dilakukan penguapan pelarut pada tiap-tiap sampel, setelah itu ditambahkan 50,0  $\mu$ l DMSO dan kurang lebih 4 ml air laut. Campuran tersebut diaduk homogen, dicek pH dan suhu larutan. Sebanyak 10 ekor *nauplii* dimasukkan pada tiap vial, ditambah air laut sampai 5,0 ml dan dihomogenkan kembali.

### 4.7. UJI KEMOPREVENTIF KANKER SECARA IN-VIVO

Mencit jantan sebanyak 80 ekor mengalami proses adaptasi penelitian, dikelompokkan secara acak menjadi 8 kelompok. Kelompok I adalah kontrol negatif, hanya diberikan CMC-Na; kelompok II.1 diberikan senyawa uji EPMS dosis 40 mg/kg BB, kelompok II.2 diberikan senyawa uji EPMS dosis 80 mg/kg BB, kelompok III.1 diberikan senyawa uji AP dosis 40 mg/kg BB, kelompok III.2 diberikan senyawa uji AP dosis 80 mg/kg BB, kelompok IV.1 diberikan senyawa uji 2AT dosis 40 mg/kg BB, kelompok IV.2 diberikan senyawa uji 2AT dosis 80 mg/kg BB, kelompok V diberikan celebrex 20 mg/kg BB sebagai kontrol positif. Semua kelompok mendapatkan induksi benzopiren sebanyak 0,6 mg/0,2 ml dalam oleum olivarum secara injeksi subkutan pada daerah scapular sebanyak lima kali tiap dua hari sekali, serta diberikan bahan uji setiap hari selama 1 bulan. Selanjutnya seluruh mencit dipelihara dalam suasana dan diet yang sama selama 2 bulan.

Pengamatan makroskopis pertumbuhan kanker pada mencit dilakukan setiap hari selama 2 bulan. Sedangkan parameter keberhasilan dari penelitian ini adalah benjolan kanker pada daerah tengkuk.

Aktivitas efek kemopreventif dengan cara menentukan presentasi tingkat kejadian kanker, dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Persentasi tingkat kejadian kanker} : \frac{\text{jumlah mencit kena kanker}}{\text{jumlah mencit dalam kelompok uji}} \times 100\%$$

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Isolasi EPMS

Berdasarkan metode 4.4.2. isolasi EPMS dari rimpang kencur diperoleh 2,4 % EPMS. Bentuk kristal jarum, tidak berwarna, bau aromatis dan berasa sedikit pedas (Gambar L8). Berdasarkan uji KLT dengan 3 macam eluen (Tabel 4.1.) diperoleh informasi adanya 1 noda pada isolat tersebut. Jarak lebur isolat tersebut 46-47 (°C).

**Tabel 5.1. Uji kemurnian secara KLT**

Eluen	Rf	Warna noda	Jumlah noda
kloroform : asam asetat : aseton (20:1:10)	0,62	ungu	satu
kloroform : etanol (5:1)	0,90	ungu	satu
Heksana : etil asetat (4:2)	0,72	ungu	satu

#### 5.2. Identifikasi struktur EPMS secara Spektroskopi :

Berdasarkan data spektroskopi IR, dan <sup>1</sup>H-NMR diperoleh informasi sebagai berikut Dari Gambar L1.1. dan L1.2. diketahui bahwa isolat adalah etil *p*-metoksinamat sebagai kristal putih (m.p. 46°C) <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>) 3,82 (3H, s); 6,96 (1H, d, *J* = 15,9Hz); 6,88 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 6,96 (1H, d, *J* = 15,9 Hz); 7,46 (2H, d, *J* = 8,8 Hz); 4,24 (2H, m, *J* = 7,2 Hz); 1,32 (3H, t, *J* = 7,2H). IR (KBr) 3007, 2980, 2935, 1705, 1630, 1602, 1253, 1209, 829 cm<sup>-1</sup> (Gambar L1.1 dan L1.2).

#### 5.3. Sintesis APMS dari EPMS

Hidrolisis EPMS sesuai metode 4.4.2 menghasilkan 80% APMS. Identifikasi APMS : bentuk kristal jarum, tidak berwarna, tidak berbau dan menyebabkan lidah terasa tebal. Berdasarkan uji KLT dengan 3 macam eluen (Tabel 4.2.) diperoleh informasi adanya 1 noda pada isolat tersebut. Jarak lebur isolat tersebut 169°C.

**Tabel 5.2. Hasil KLT dari APMS**

Eluen	Rf	Warna noda	Jumlah noda
kloroform : asam asetat : aseton (20:1:10)	0,56	ungu	satu
kloroform : etanol (5:1)	0,56	ungu	satu
Heksana : etil asetat (4:2)	0,25	ungu	satu

Berdasarkan hasil identifikasi struktur diperoleh data sebagai berikut :

Asam *p*-metoksisinamat (80%) berbentuk kristal putih (Gambar L8) (t.l. 169°C). HRMS *m/z* EI, 178 ( $M^+$ ).  $^1\text{H}$  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  $\text{cm}^{-1}$ . Calculated Mass  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$  178.0630. Measured Mass 178.0617 (Gambar L 2.1, L.2.2, L.2.3).

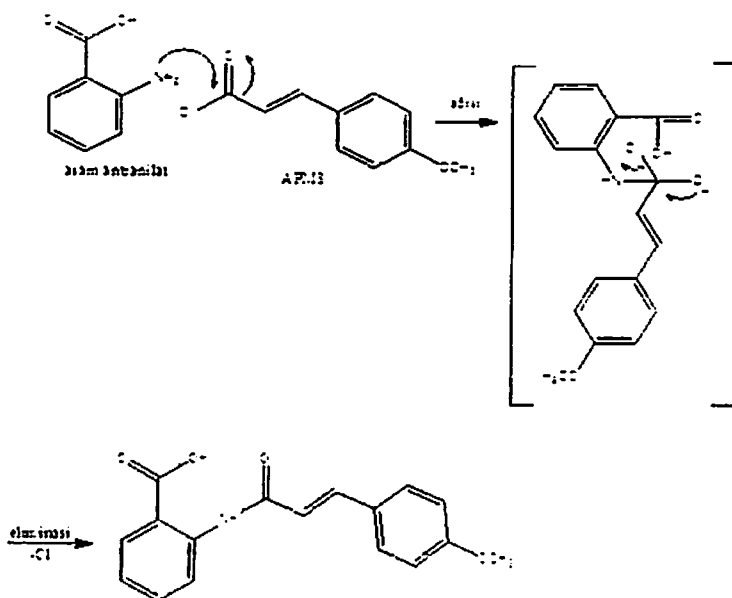
#### 5.4. Sintesis *p*-metoksinamoil klorida dari APMS

Sintesis *p*-metoksinamoil klorida dari APMS sesuai metode 3.4.3. diperoleh prosentase hasil 90%, berupa padatan kuning pucat (Gambar L8) (m.p. 51°C) MS *m/z* EI , 196 ( $M^+$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 3.87 (3H, s), 6.51 (1H, d,  $J = 15.2\text{ Hz}$ ), 6.96 (2H, d,  $J = 5.0\text{ Hz}$ ), 7.53 (1H, d,  $J = 16\text{ Hz}$ ), 7.62 (2H, d,  $J = 5.0\text{ Hz}$ ). Calc. Mass  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{Cl}$  196.0291. Measured Mass 196.0276. (Gambar L3.1, L3.2)

#### 5.5. Hasil Reaksi antara *p*-metoksinamoil klorida dengan asam antranilat

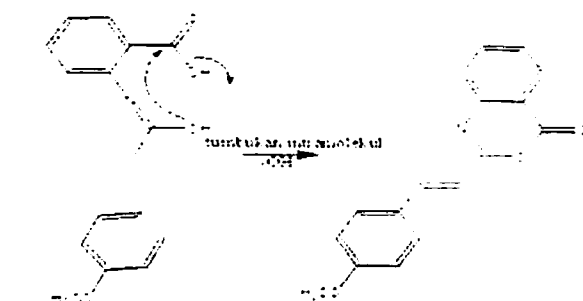
Reaksi antara *p*-metoksinamoil klorida dengan asam antranilat menghasilkan 2 macam senyawa (AN Up & AN mid) karena terbentuknya lakton intra molekuler sesuai reaksi sebagai berikut :





Gambar 5.1. Mekanisme Reaksi Substitusi Asil Nukleofilik pada sintesis (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*d*] [1,3] oxazin-4-on (AN Up).

Reaksi pembentukan lakton secara intramolekuler seperti Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Mekanisme Pembentukan Lakton pada sintesis (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*d*] [1,3]oxazin-4-on (AN Up) (sebelah kanan) dari asam *N*-(*p*-metoksinamoil) antranilat (sebelah kiri).

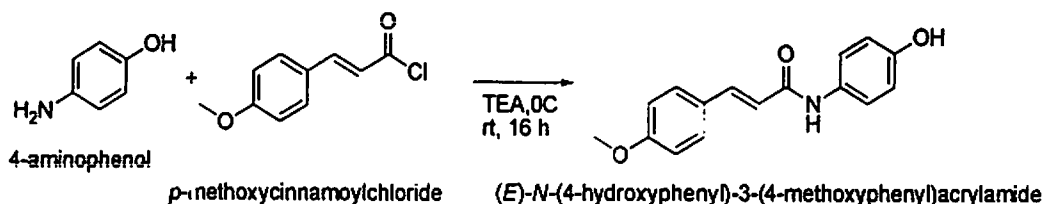
Senyawa AN Up berbentuk kristal kuning (192°C), prosentase hasil 30%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) 3.86 (3H, s), 6.66 (1H, d, *J* = 16 Hz), 6.95 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 7.47 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.62 (3H, m), 7.81 (2H, m). MS *m/z* EI. 279 (*M*<sup>+</sup>). IR (KBr) 2937, 2843, 2567, 1685, 1624, 1288, 1255 cm<sup>-1</sup>. Senyawa AN Up tersebut adalah (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*d*] [1,3] oxazin-4-on (AN Up) (Gambar. L4.1, L4.2, L4.3, L4.4).

Senyawa AN mid berupa padatan putih (m.p.145°C). <sup>1</sup>H NMR (DMSO) 3.79 (3H, s), 6.72 (1H, d, *J* = 15.8 Hz), 6.98 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.14 (1H, t, *J* = 15.8 Hz), 7.68 (2H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 8.60 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.61 (2H,

m), 11.29 (1H, s). IR (KBr) 3318, 3034, 1672, 1601, 1256, 829  $\text{cm}^{-1}$ . Calc. Mass.  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$  297.1001. Measured Mass 297.0984. Senyawa AN mid adalah asam *N*-(*p*-metoksisinamoil)antranilat (Gambar. L5.1, L5.2, L5.3, L5.4).

### 5.6. Hasil Reaksi *p*-metoksisinamoilklorida dengan *p*-aminofenol

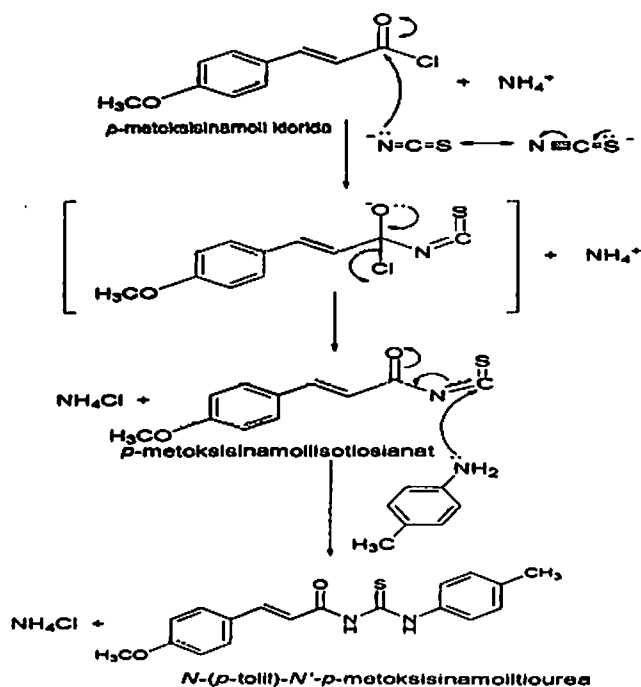
Reaksi antara *p*-metoksisinamoilklorida dengan *p*-aminofenol sesuai metode 4.4.5. seperti Gambar 5.3. menghasilkan senyawa (*E*)-*N*-(*p*-hidroksifenil)-3-(4-metoksifenil)akrilamida (AP) adalah kristal berwarna coklat muda (m.p. 185°C)  $^1\text{H}$  NMR (DMSO) 3.79 (3H, s), 6.63 (1H, d,  $J = 15.58$  Hz), 6.71 (2H, d,  $J = 8.86$  Hz), 6.99 (2H, d,  $J = 8.74$  Hz), 7.61 (1H, d,  $J = 15.58$  Hz), 7.46 (2H, d,  $J = 8.86$  Hz), 7.54 (2H, d,  $J = 8.74$  Hz), 9.86 (1H, s), 10.21 (1H, s). IR (KBr) 3308, 3096, 1655, 1508, 1251, 823  $\text{cm}^{-1}$ . Calc. Mass  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$  269.1052. Measured Mass 269.1075. (Gambar. L6.1, L6.2, L6.3, L6.4).



Gambar 5.3. Reaksi antara *p*-aminofenol dan *p*-metoksisinamoilklorida.

### 5.7. Hasil reaksi *p*-metoksisinamoil klorida dengan amonium tiosianat dan *p*-toluidin

Mekanisme reaksi metode 4.4.4 tampak seperti skema di bawah ini yang meliputi substituisi asil halida oleh isotiosianat dilanjutkan reaksi adisi amina aromatis (*p*-toluidin) menghasilkan *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiourea (45%) (m.p. 202°C).

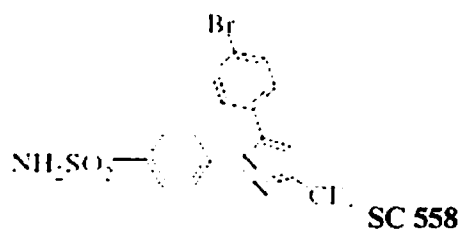


Gambar 5.4. Mekanisme sintesis *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiourea

Analisis spektroskopi *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiourea adalah sbb : HRMS  $m/z$  EI, 326 ( $M^+$ ).  $^1\text{H}$  NMR (DMSO) 3.84 (3H, s), 2.36 (3H, s), 6.44 (1H, d,  $J = 15,3\text{Hz}$ ), 6.96 (2H, d,  $J = 5.0\text{ Hz}$ ); 7.76 (1H, d,  $J = 15,3\text{ Hz}$ ); 7.55 (2H, d,  $J = 5.0\text{ Hz}$ ); 9.16 (1H, s); 12.55 (1H, s). IR (KBr) 3018, 2364, 1673, 1537, 1288, 1151  $\text{cm}^{-1}$ . Calculated Mass  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$  326.1095. Measured Mass 326.1089 (Gambar. L7.1, L7.2, L7.3, L7.4).

### 5.10. Hasil Docking

Hasil docking senyawa uji AP dan 2 AT terhadap COX-2 dengan program Autodock Vina seperti Tabel 4.1. Sebagai senyawa acuan adalah SC558 yang mempunyai struktur sbb:



Tabel 5.3. Hasil Docking molekul AP dan 2 AT terhadap COX-2

Molekul	Binding affinity (kcal/mol)
	COX-2
SC-558	-11
EPMS	-6.2
AP	-8.2
2AT	-7.4
AN Up	-7.4
AN mid	-6.4

**Keterangan :**

- SC 558 : ligand pembanding COX-2 inhibitor  
 EPMS : etil *p*-metoksisinamat  
 AP : *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida  
 2AT : *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiurea  
 AN Up : (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*d*] [1,3] oxazin-4-on  
 AN Mid : asam *N*-(*p*-metoksisinamoil)antranilat

Dari data pada Tabel 5.3. dipilih senyawa AP dan 2 AT yang diuji untuk BST dan kemopreventif kanker pada mencit yang diinduksi benzopiren karena *binding affinity* terhadap COX-2 relatif besar.

**5.10. Hasil Uji BST :**

Dari Uji BST terhadap *Artemia salina* dengan metode 4.6. diperoleh data (Lampiran 9) dan harga LC<sub>50</sub> (ppm) sebagai berikut :

- senyawa Etil *p*-metoksisinamat = 29,03 ppm
- senyawa *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida = 13,59 ppm
- senyawa *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiurea = 33,56 ppm

Data di atas memberi petunjuk bahwa senyawa-senyawa yang akan diujikan untuk kemopreventif kanker mempunyai aktivitas sitotoksik.

**5.11. Uji Kemopreventif kanker**

Pengujian kemopreventif kanker sampai saat ini masih terus dilakukan. Sampai pengamatan 1,5 bulan tampak mulai timbul luka di daerah tengkuk mencit, beberapa terjadi perontokan bulu dan terdapat benjolan lunak (Gambar L11.1, L11.2,

L11.3). Dari 80 mencit selama penelitian ada 10 ekor yang mati ; dari kelompok kontrol negatif (CMC Na) 2 ekor (salah satu mencit dibedah dan dibuat irisan histopatologi jaringan hepar dengan pewarnaan HE). Hasil irisan terlihat pada Gambar L9.4,; yang menunjukkan terjadinya Inflamasi, proliferasi fibroblast (dominan), atrofi sel lurik. Proliferasi fibroblast menunjukkan indikasi ke arah fibrosarcoma bila induksi dilanjutkan.

Pengamatan makroskopis menghasilkan angka kejadian kanker sbb :

**Tabel 5.4. Persentase Timbulnya Kanker dari EPMS, AP, 2AT**

Bahan Uji	Jumlah Mencit	Jumlah Mencit Terkena Kanker	Persentase Timbulnya Kanker
Kontrol Negatif	8	8	100,0
EPMS 40 mg/kg BB	7	6	85,7
EPMS 80 mg/kg BB	8	5	62,5
AP 40 mg/kg BB	10	4	40,0
AP 80 mg/kg BB	10	3	30,0
2AT 40 mg/kg BB	10	5	50,0
2 AT 80 mg/kg BB	8	3	37,5
Celebrex 20 mg/kg BB	9	3	33,3

Dari data awal di atas, memberikan indikasi bahwa EPMS dapat ditingkatkan aktivitasnya sebagai kemopreventiv kanker melalui modifikasi struktur sebagai COX-2 inhibitor. Penurunan persentase timbulnya kanker menguatkan dugaan bahwa farmakofor senyawa hasil modifikasi struktur EPMS dalam berinteraksi dengan residu asam amino pada COX-2 mempunyai peranan penting terhadap aktivitas kemopreventiv kanker. Hasil mikroskopis irisan histopatologi dengan pewarnaan HE dan analisis imunohistokimia thdp COX-2 dari EPMS dan beberapa turunannya perlu dilakukan untuk mendukung data seperti tersebut di atas.

**KESIMPULAN :**

1. Diperoleh senyawa-senyawa baru turunan EPMS yang mempunyai *binding affinity* terhadap COX-2 berdasarkan program AutoDock Vina, yaitu (*E*)-2-(4-metoksistiril)-4*H*-benzo[*a*][1,3]oxazin-4-on (-7,4 kcal/mol); asam *N*-(*p*-metoksisinamoil)antranilat (-6,4 kcal/mol), *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida (-8,2 kcal/mol), *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiurea (-7,4 kcal/mol).
2. Aktivitas sitotoksik beberapa turunan EPMS dengan BST terhadap *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> (ppm):
  - EPMS = 29,03 ppm
  - *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida = 13,59 ppm
  - *N*-(*p*-tolil)-*N'*-*p*-metoksisinamoiltiurea = 33,56 ppm
3. Aktivitas kemopreventif EPMS dan beberapa turunan EPMS pada mencit yang diinduksi benzopiren, yang dinyatakan dalam presentase timbulnya kanker adalah sbb :
  - EPMS 40 mg/kg BB = 85,7%
  - EPMS 80 mg/kg BB = 62,5%
  - *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida 40 mg/kg BB = 40,0%
  - *N*-(*p*-hidroksifenil)-4-metoksisinamida 80 mg/kg BB = 30,0%
  - *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiurea 40 mg/kg BB = 50,0%
  - *N*-*p*-metoksisinamoil-*N*-toliltiurea 80 mg/kg BB = 37,5%

**SARAN :**

1. EPMS dapat dimanfaatkan sebagai alternatif kemopreventif kanker dan ditingkatkan aktivitasnya melalui modifikasi struktur sebagai COX-2 inhibitor.
2. Perlu dilakukan analisis histopatologi dan imunohistokimia terhadap COX-2 jaringan yang terkena kanker .

**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.
- Baek SJ, Leigh C. Wilson, Chang-Ho Lee<sup>1</sup> and Thomas E. Eling. 2002. Dual Function of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Inhibition of Cyclooxygenase and Induction of NSAID-Activated Gene. *JPET*. Vol. 301, Issue 3, 1126-1131, June 2002.
- 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, Hadi Poerwono, M. Rudyanto, Astika GN, Syahrani A, Siswono H, Tutuk Budiati, 2004. *Transformasi Gugus Fungsi asam p-hidroksisinamat dalam usaha mencari senyawa analgetika baru*, Laporan Penelitian Project Grant, QUE Project, Surabaya.
- 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, 2009. Structure Modification of *p*-methoxycinnamic acid Isolated from *Kaempferia galanga* to Improve its antinociceptive activity. Second Collaborative Joint Seminar USM-Unair, Penang, Malaysia.
- Gale GA., Krtikara K, Pittayakhajonwut P. Sivichal S. 2007. In Search of cyclooxygenase inhibitors, anti Mycobacterium tuberculosis and anti-malariai drugs from Thai flora and microbes. *J. Pharmacology & Therapeutic*. Articles in Press. Elsevier.
- Jeanelle M. Martinez, Tina Sali, Ryuji Okazaki, Colleen Anna. Melinda Hollingshead, Curtis Hose, Anne Monks, Nigel J. Walker, Seung Joon Baek, and Thomas E. Eling. 2006. Drug-Induced Expression of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-Activated Gene/Macrophage Inhibitory Cytokine-1/Prostate-Derived Factor, a Putative Tumor Suppressor, Inhibits Tumor Growth. *J.of Pharm. And Exp. The Therapeutics Fast Forward*.
- Lien EJ., 1987. *SAR : Side Effect and Drug Design*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 451-2.
- Luo DZ, 2004. *Pain Research*. Human Press Inc. New Jersey. pp. 11-24.
- 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.
- Oliff, A.; Gibbs, J.B.; and Mc Cormick F. 1996. New molecular targets for cancer therapy. *Scientific American*, September . p:110-115.

- Sadono and Hasmono D., 2000. The Availability Involve / Profile of Farmakokinetik 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.**
- Santosa, MH., 1997. Metabolism of Metabolite Secunder of Plant Medicine The Indonesia At Culture of Cell of Hepatosit of Insulation Mouse, **Research Report , Institute Research of University Airlangga**
- Tewtrakul S., Yucnyongsawad S., Kummee S. and Atsawajaruwan L. 2005. Chemical component and biological activities of volatile oil of *kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarin 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. **XVIth EUCARPIA Congress. Edinburg. Scotland.**



## 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	Juni Ekowati, Hadi Poerwono, Achmad Syahrani, Nuzul Wayuning Dyah, Tutuk Budiati, Kimio Hagshiyama. Antinociceptive activity derivats of Kaempferia galanga <i>Second Collaborative Seminar USM-Unair, Jakarta-Indonesia, 2009.</i>
2	Juni Ekowati, Marcellino Rudyanto, Suzana, M.I. Susilowaty, H. Poerwono, GN. Astika, A. Syahrani, H. Siswono, Tutuk Budiati Novel Analgesic Compounds from hydroxycinnamic acids <i>First Collaborative Seminar USM-Unair, Penang-Malaysia, 2007.</i>
3	Juni Ekowati, M.I. Susilowaty, Marcellino Rudyanto, Tutuk Budiati Moluscide Activity of Natural Anacardic Acids against Pomacea sp. <i>IOCD Seminar, Surabaya, 2007</i>
4	Marcellino Rudyanto, Juni Ekowati, Suzana. Synthesis and Anticancer Prescreening of Lasiodiplodin Derivatives Derived from Natural Anacardic Acids. <i>ITSF Seminar on Science and Technology, Jakarta, 2006.</i>
5	Juni Ekowati Sintesis asam 3-(4-metoksifenil)propanoat dari asam <i>p</i> -hidroksisinamat, <i>Seminar Himpunan Kimia Indonesia X, Surabaya, 2006</i>
6	Juni Ekowati Pengaruh katalis pada sintesis asam <i>o</i> -metoksisinamat menurut reaksi Knoevenagel <i>Seminar Himpunan Kimia Indonesia IX, Malang, 2005</i>
7	Juni Ekowati, Suzana, Tutuk Budiati 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	Marcellino Rudyanto, Juni Ekowati, Hadi Poerwono. 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 <i>p</i> -methoxycinnamoyl thiourea of COX-2 inhibitor (author)	BPPS	2009
2	Sintesis Senyawa Baru COX-2 Inhibitor dari Etil <i>p</i> -metoksisinamat Hasil Isolasi <i>Kaempferia galangal</i> Yang Berpotensi Sebagai Kemopreventiv Kanker (author)	Penelit. StratNas Unair (DP2M Dikti)	2008
3	Structure Modification of <i>p</i> -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 Benzoilasi Asam <i>p</i> -hidroksisinamat (author)	DP2M Dikti	2007
5	Aplikasi Iradiasi Gelombang Mikro pada Sintesis Asam <i>o</i> -metoksisinamat dan Asam <i>o</i> -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, Tutuk Budiati Novel Analgesic Compounds from hydroxycinnamic acids <i>First Collaborative Seminar USM-Unair, 2007, Penang-Malaysia.</i>
2	Juni Ekowati, M.I. Susilowaty, Marcellino Rudyanto, Tutuk Budiati Moluscide Activity of Natural Anacardic Acids against Pomacea sp. <i>IOCD Seminar, 2007, Surabaya</i>
3	Juni Ekowati, Suzana, Tutuk Budiati 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>
4	Tutuk Budiati Hubungan Struktur-aktivitas beberapa senyawa inhibitor Enzim sulfhidril <i>J. Matematika, Ilmu Pengetahuan Alam dan pengajarannya, No.2, 2004</i>
5	Tutuk Budiati Sintesis Metil Anakardat dan Uji Aktivasnya sebagai Inhibitor enzim sulfhidril <i>J. Biosains Pasca Sarjana, Vol.6, No.2, 2004</i>
6	Tutuk Budiati inhibisi Asam Anakardat terhadap aktivitas proteolitik papain <i>J. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Vol.8, No.2, 2003</i>
7	Tutuk Budiati 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 Kaempferia galanga 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

II. Riwayat Pendidikan	
<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 Investigator 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 Sambiloto ( <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 Sambiloto ( <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 invivo (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**

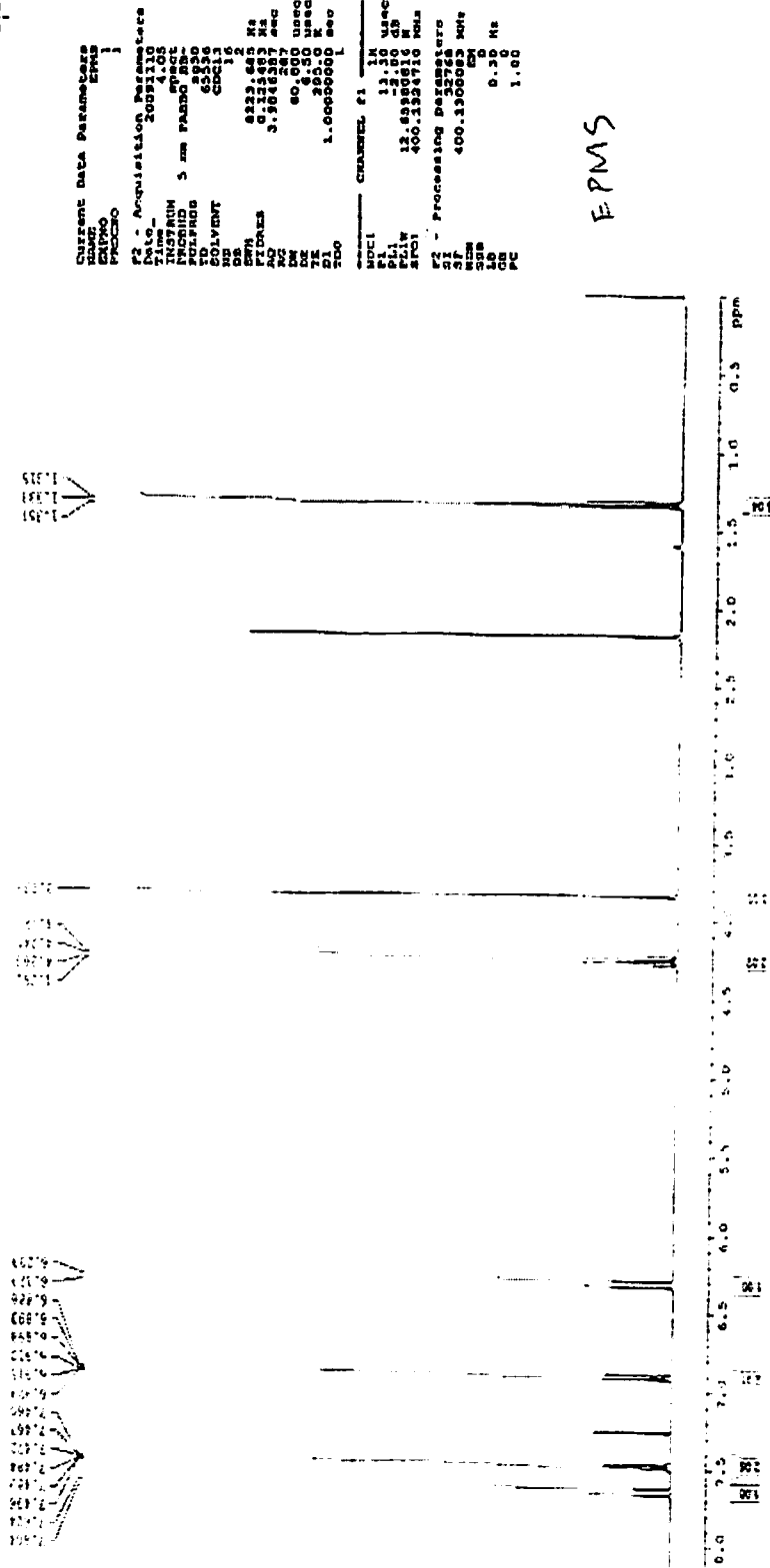
- 1 Sukardiman, Sutarjadi (1999). Penapisan senyawa bioaktif dari akar cerme (*Phyllanthus acidus*) , Cermin Dunia Kedokteran
- 2 Sukardiman, IGP Santa , Wied Aris K. (1999). Uji antikanker fraksi flavonoid dari herba *Dendrothoe pentandra* pada kanker fibrosarcoma mencit hasil induksi benzopirena, Cermin 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., Sisindari, 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). Inducing Apoptosis Andrographolide on TD-47 Human Breast Cancer Cell Lines, African Journal , Complementary and Alternative Medicine, Vol 4 , No 3, author**



Lampiran I

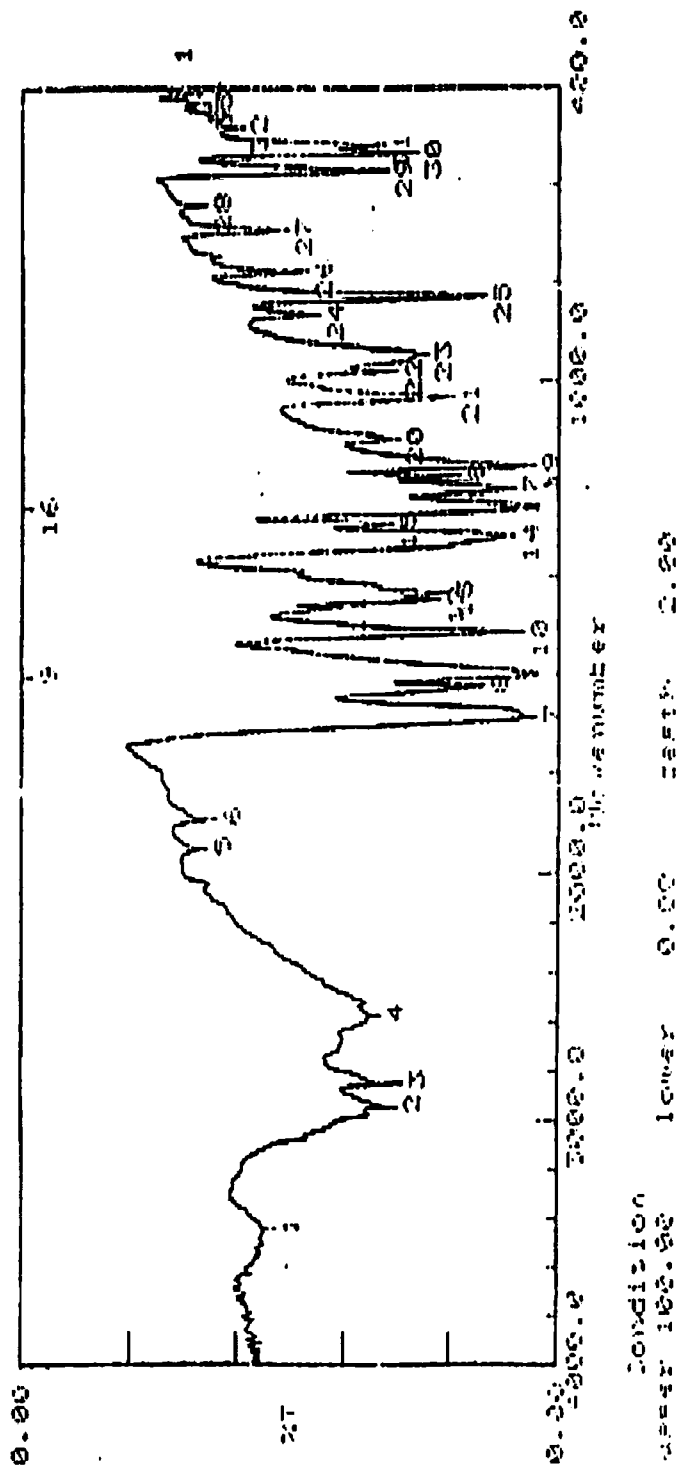
Spektra IR, <sup>1</sup>HNMR, EPMS



Gambar L1.2. Spektra <sup>1</sup>HNMR Senyawa EPMS

Lampiran 2

Spektra IR, <sup>1</sup>HNMR, HRMS, APMS



Gambar L2.1. Spektra IR Senyawa APMS



**Sample: III-No.311**

**Instrument: JEOL JMS600**

**Inlet: Direct Probe**

**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**

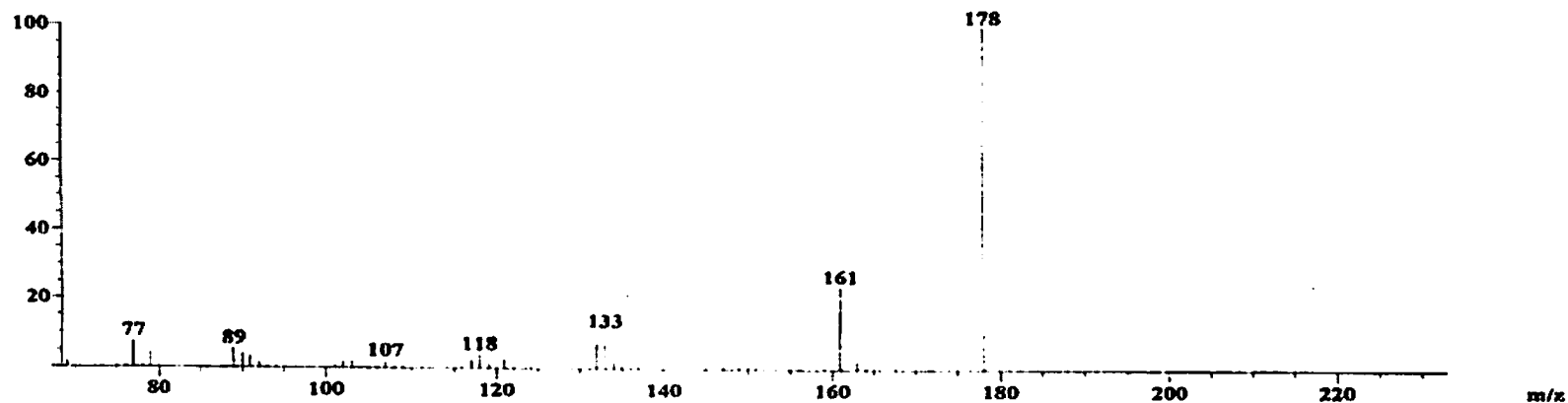
**Printed by: JEOL**

**Scan: 22**

**R.T.: 0:32.2**

**Base: m/z 178; 53.8%FS TIC: 1262962**

**#Ions: 70**



**Gambar L2.3. Spektra HRMS Senyawa APMS**

Lampiran 3  
Spektra <sup>1</sup>HNMR dan HRMS senyawa CCI

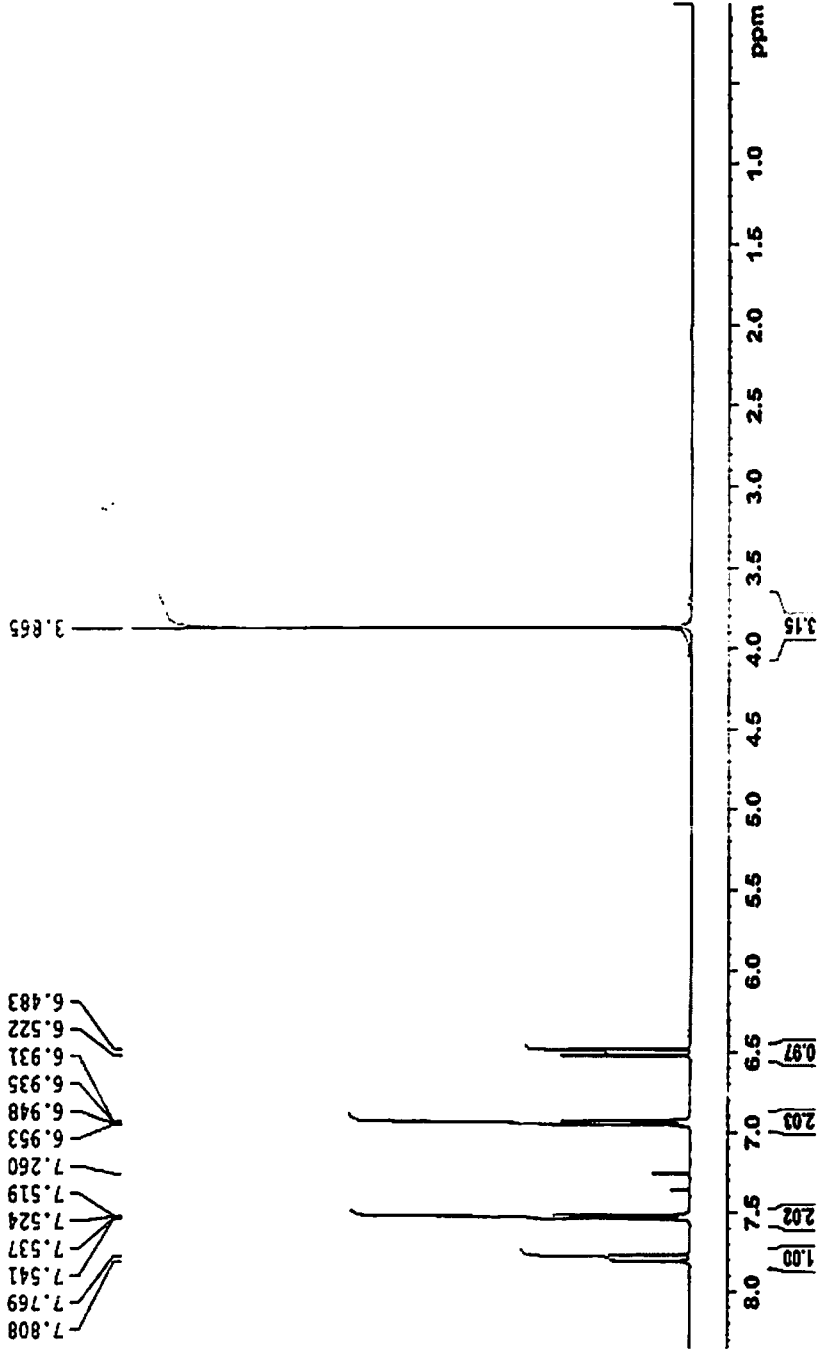
**BRUKER**

Current Data Parameters  
 NAME 02-149-crude  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20080324  
 Time 11.01  
 INSTRUM 5 mm PABBO HD-  
 PROBHD 5 mm PABBO HD-  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 8  
 DS 2  
 SWH 9223.665 Hz  
 FIDRES 0.125483 Hz  
 AQ 3.9846387 sec  
 RG 144  
 CW 60.000 use  
 ME 30.00 use  
 TE 300.2 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TDO 1

\*\*\*\*\* CHANNEL f1 \*\*\*\*\*  
 NUC1 1H  
 P1 14.00 use  
 PL1 -1.40 dB  
 SFO1 400.1324710 MHz

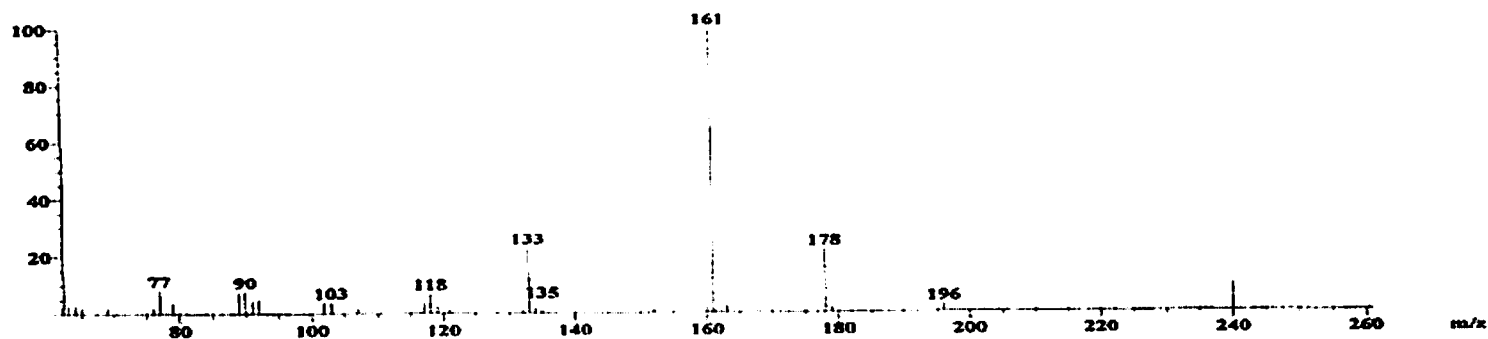
F2 - Processing Parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1300032 MHz  
 WDW RM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00



Gambar L3.1. Spektra <sup>1</sup>HNMR Senyawa CCI

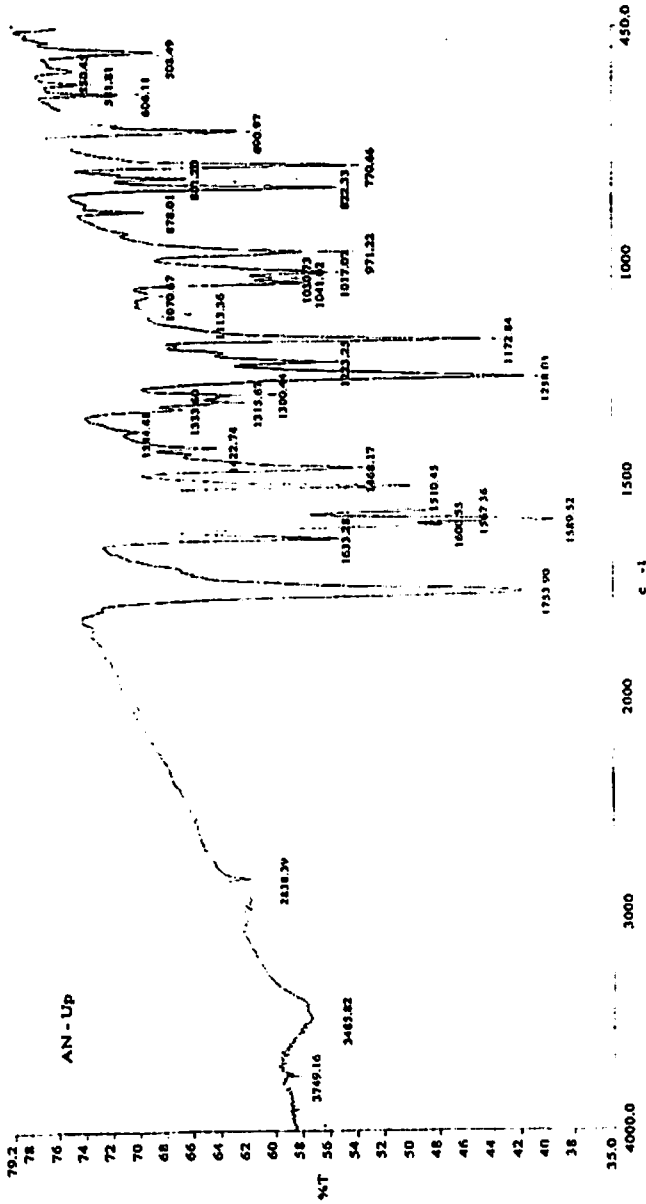
**Sample: C-Cl-No.313****Instrument: JEOL JMS600****Inlet: Direct Probe****Ionization mode: EI+****Run By: JEOL****Printed by: JEOL****Scan: 84****R.T.: 2:05.2****Base: m/z 165; 31%FS TIC: 737055****#Ions: 231****Selected Isotopes :  $H_{0-9}C_{0-10}O_{0-2}Cl_{0-1}$** **Error Limit : 10 mmu**

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
196.0276	0.4%	$C_{10}H_9O_2Cl$	196.0291	1.5

**Sample: C-Cl-No.313****Instrument: JEOL JMS600****Inlet: Direct Probe****Ionization mode: EI+****Run By: JEOL****Printed by: JEOL****Scan: 24****R.T.: 0:35.2****Base: m/z 161; 6.8%FS TIC: 228977****#Ions: 59****Gambar L3.2. Spektra HRMS Senyawa CCl**

Lampiran 4

Spektra IR, <sup>1</sup>HNMR, HRMS AN-Up



Gambar L4.1. Spektra IR AN-Up





**Sample: AN-up-No.318**

**Instrument: JEOL JMS600**

**Inlet: Direct Probe**

**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**

**Printed by: JEOL**

**Scan: 130**

**R.T.: 3:14.2**

**Base: m/z 266; 11.6%FS TIC: 322231**

**#Ions: 93**

**Selected Isotopes : H<sub>0-13</sub>C<sub>0-17</sub>N<sub>0-1</sub>O<sub>0-3</sub>**

**Error Limit : 10 mmu**

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
279.0874	1.8%	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	279.0895	2.1

**Sample: AN-up-No.318**  
**Instrument: JEOL JMS600**  
**Inlet: Direct Probe**

**Ionization mode: EI+**

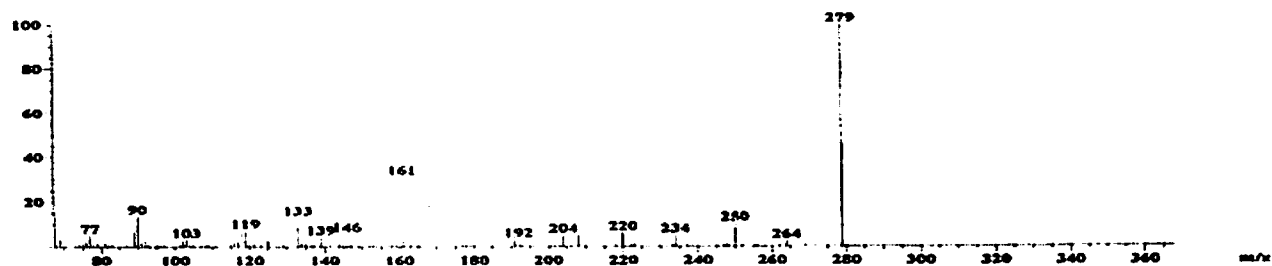
**Run By: JEOL**  
**Printed by: JEOL**

**Scan: 78**

**R.T.: 1:56.2**

**Base: m/z 279; 20%FS TIC: 806481**

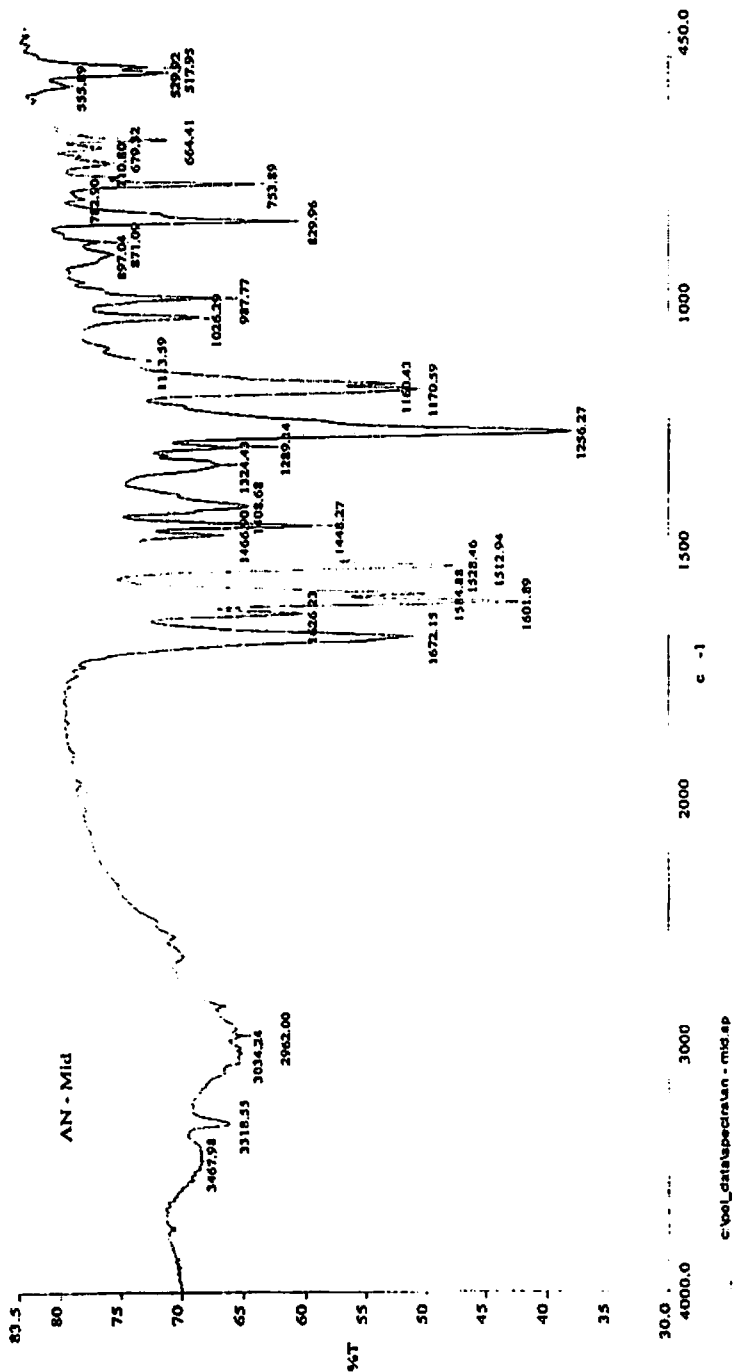
**#Ions: 169**



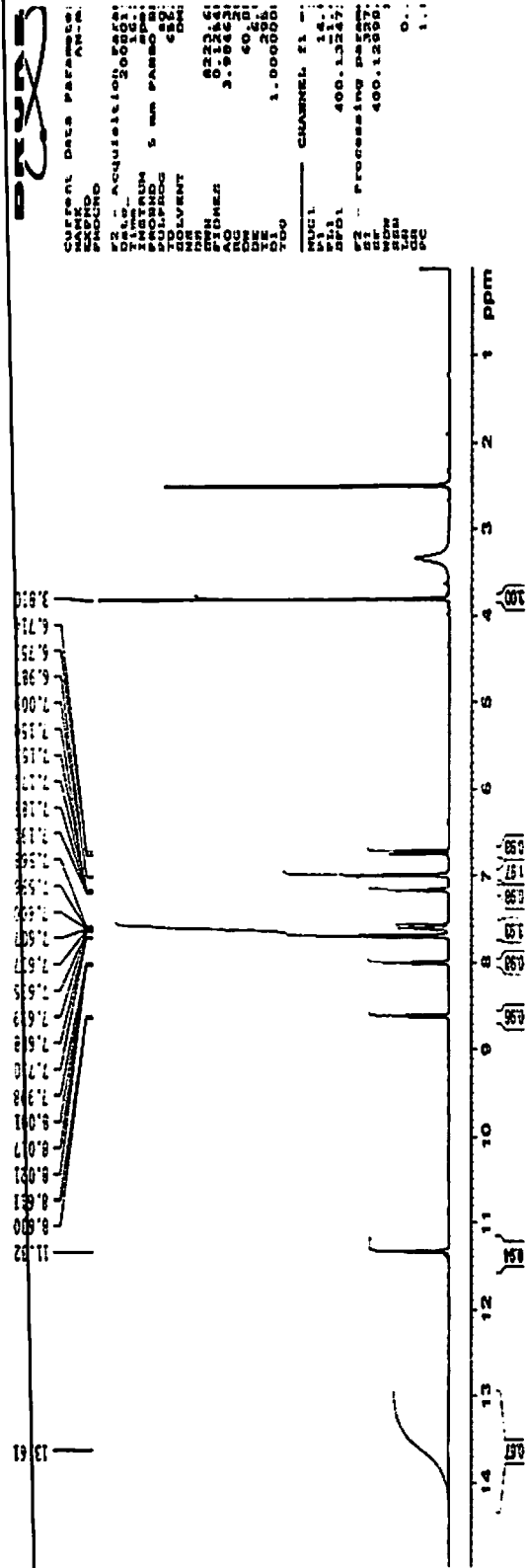
**Gambar L4.4. Spektra HRMS Senyawa AN-up**

Lampiran 5

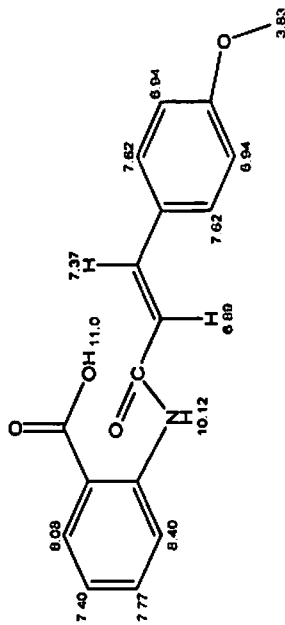
Spektra IR, <sup>1</sup>HNMR, HRMS AN-Mid



Gambar 5.1. Spektra IR AN-Mid



Gambar L5.2. Spektra <sup>1</sup>H NMR AN-mid



Gambar L5.3. Prediksi Spektra <sup>1</sup>H NMR AN-mid

**Sample: AN-mid-No.319**  
**Instrument: JEOL JMS600**  
**Inlet: Direct Probe**

**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**  
**Printed by: JEOL**

**Scan: 718**  
**Base: m/z 265; .5%FS TIC: 74776**

**R.T.: 17:56.2**

**#Ions: 56**

**Selected Isotopes : H<sub>0-15</sub>C<sub>0-17</sub>N<sub>0-1</sub>O<sub>0-4</sub>**

**Error Limit : 10 mmu**

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
297.0984	16.1%	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>1</sub> O <sub>4</sub>	297.1001	1.7

**Sample: AN-mid-No.319**  
**Instrument: JEOL JMS600**  
**Inlet: Direct Probe**

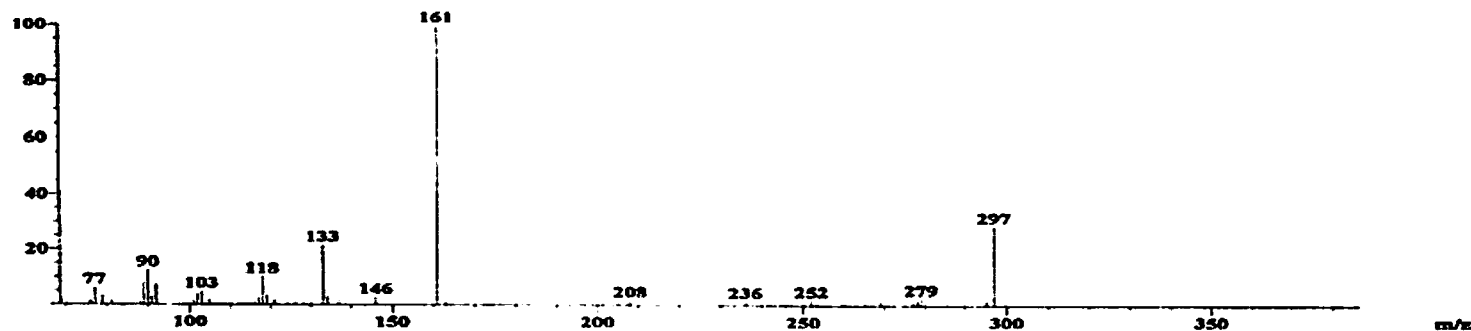
**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**  
**Printed by: JEOL**

**Scan: 188**  
**Base: m/z 161; 9.9%FS TIC: 306083**

**R.T.: 4:41.2**

**#Ions: 59**



**Gambar 5.6. Spektra HRMS AN-mid**



**Sample: Ap-No.317**  
**Instrument: JEOL JMS600**  
**Inlet: Direct Probe**

**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**  
**Printed by: JEOL**

**Scan: 134**  
**Base: m/z 261; 1%FS TIC: 316830**

**R.T.: 3:20.2**

**#Ions: 233**

**Selected Isotopes : H<sub>0-15</sub>C<sub>0-16</sub>N<sub>0-1</sub>O<sub>0-3</sub>**

**Error Limit : 10 mmu**

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
269.1075	15.6%	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	269.1052	-2.3

**Sample: Ap-No.317**  
**Instrument: JEOL JMS600**  
**Inlet: Direct Probe**

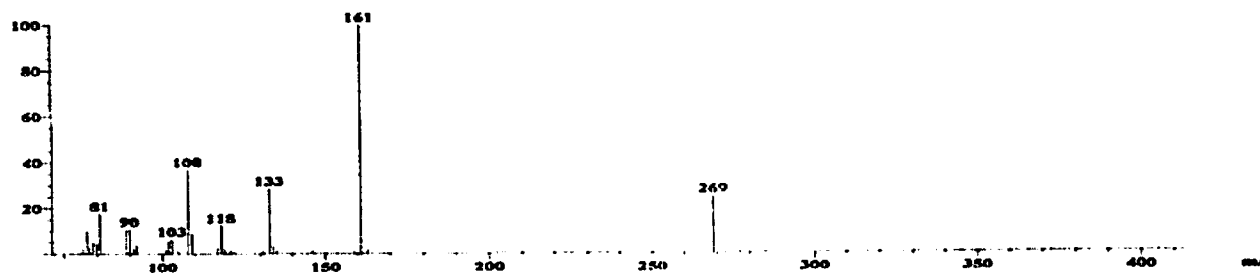
**Ionization mode: EI+**

**Run By: JEOL**  
**Printed by: JEOL**

**Scan: 346**  
**Base: m/z 161; 9.5%FS TIC: 367493**

**R.T.: 8:38.3**

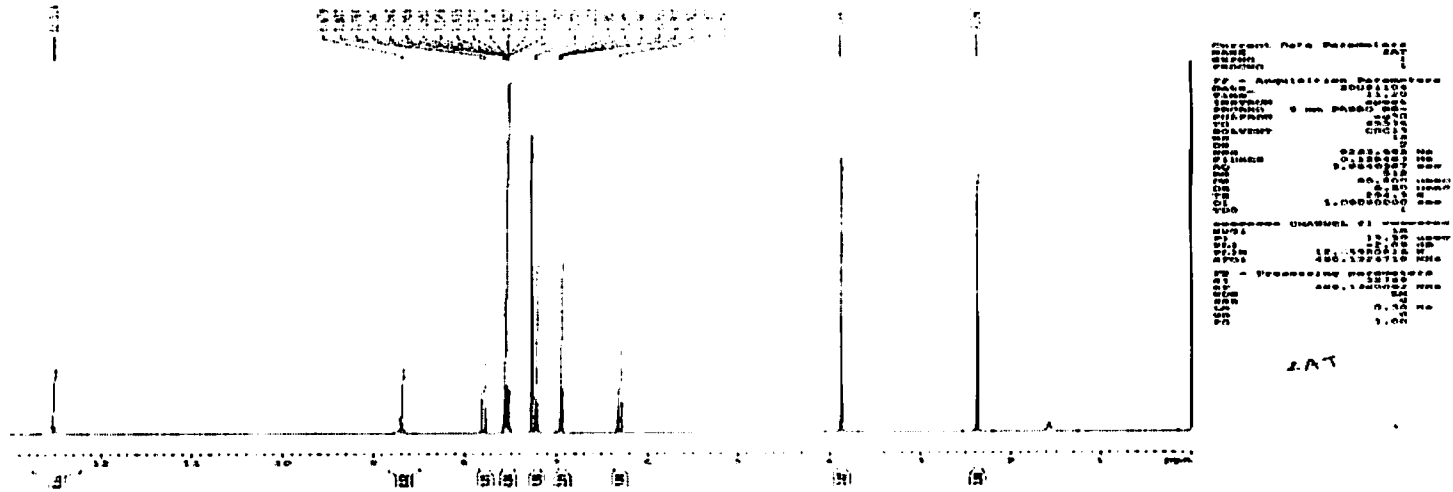
**#Ions: 61**



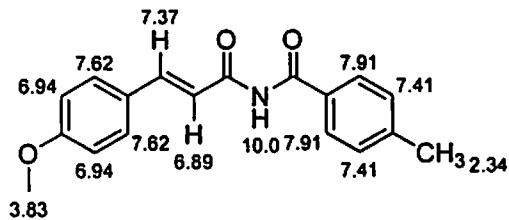
**Gambar L6.5. Spektra HRMS AP**

Lampiran 7

Spektra IR, <sup>1</sup>HNMR, HRMS Senyawa 2AT



Gambar L7.2. Spektra <sup>1</sup>HNMR Senyawa 2AT



Gambar L7.3. Prediksi Spektra <sup>1</sup>HNMR Senyawa 2AT





09/11/05

15:42:18

Page 1

File: EI6H  
 Sample: 2 AT-No.293  
 Instrument: JEOL JMS600  
 Inlet: My Inlet

Date Run: 11-05-2009

Time Run: 15:00:38

Ionization mode: EI+

Run By: JEOL  
 Printed by: JEOL

Scan: 68  
 Base: m/z 298; 97%FS TIC: 2331976 (Max Inten : 1016691)

R.T.: 1:41.1

#Ions: 248

Selected Isotopes : H<sub>0-18</sub> C<sub>0-18</sub> N<sub>0-2</sub> O<sub>0-3</sub> S<sub>0-1</sub> Error Limit : 10 mmu

Measured Mass	% Base	Formula	Calculated Mass	Error
326.1095	0.2%	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	326.1089	-0.6

09/11/05 11:56:13

Page 1

File: EI6  
 Sample: 2 AT-No.293  
 Instrument: JEOL JMS600  
 Inlet: My Inlet

Date Run: 11-05-2009

Time Run: 11:04:55

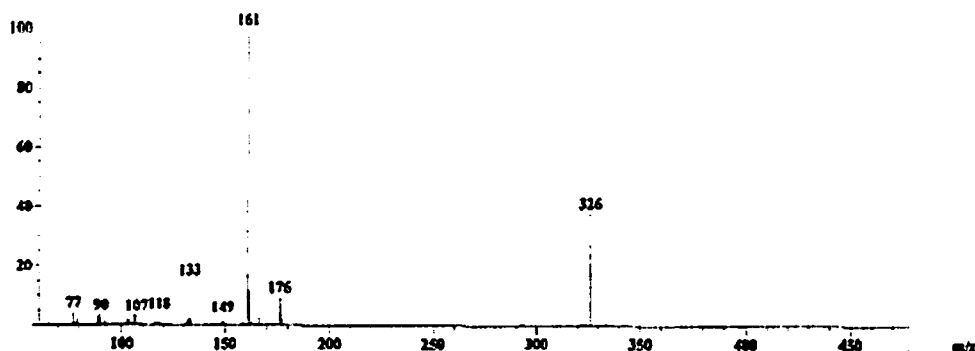
Ionization mode: EI+

Run By: JEOL  
 Printed by: JEOL

Scan: 63  
 Base: m/z 161; 89.9%FS TIC: 2477843 (Max Inten : 943069)

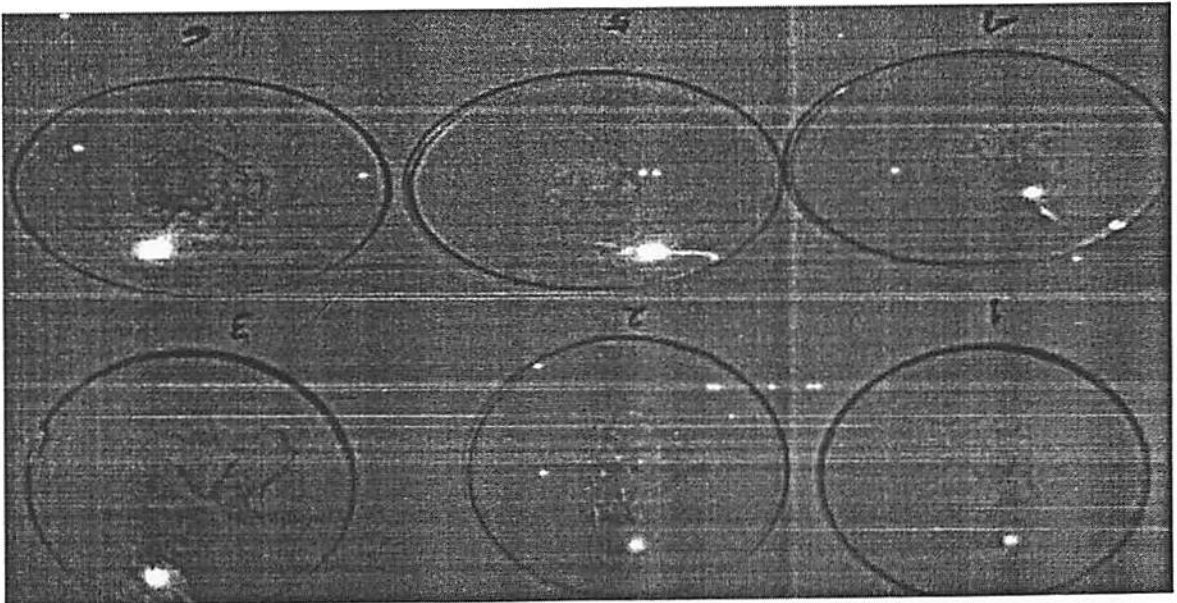
R.T.: 1:33.6

#Ions: 111



**Gambar 18. Kristal Senyawa EPMS dan turunannya**

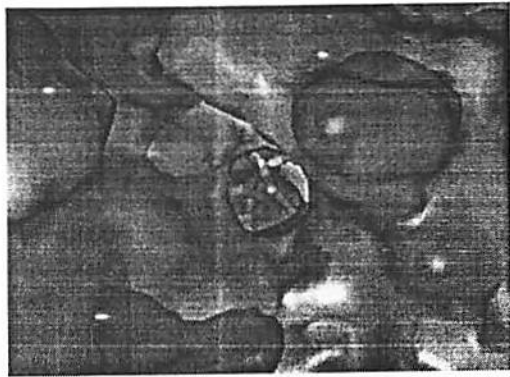
1. Ethyl *p*-methoxycinnamate (EPMS)
2. *p*-methoxycinnamic acid (APMS)
3. *p*-methoxycinnamoyl chloride (CCI)
4. (E)-2-(4-methoxystyryl)-4H-3,1-benzoxazin-4-one (ANUp)
5. N-(4-methoxycinnamoyl)anthranilic acid (ANmid)
6. N-(4-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol (AP)



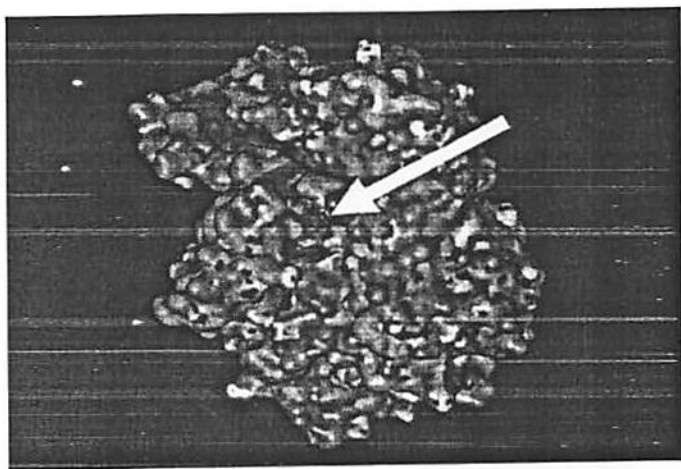
**Kristal Senyawa EPMS dan turunannya**

**Lampiran 8**

Gambar L9.2. Struktur kristal SC558 yang didocking di dalam active site COX2



Gambar L9.1. Permukaan struktur kristal COX-2 yang dikompleks dengan SC558

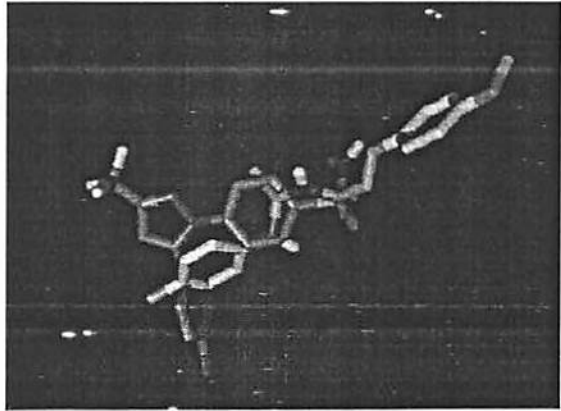


*COX-2 Docking*

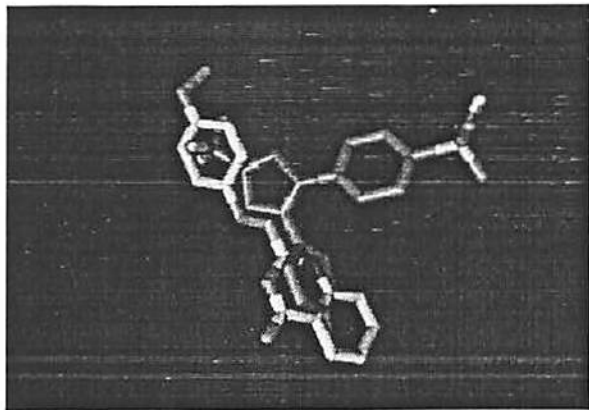
Hasil Docking Derivat EPMS terhadap COX-2

Lampiran 9

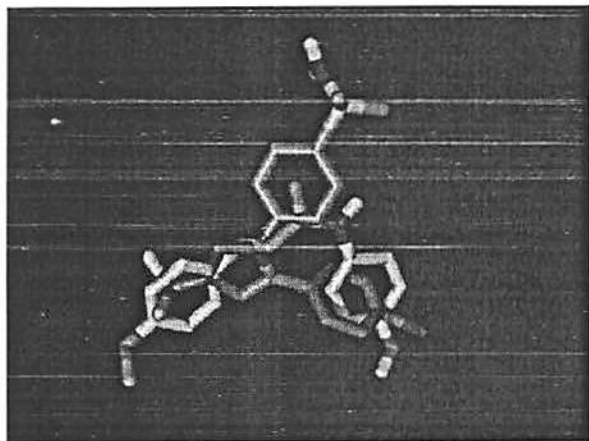
Gambar L.9.5. Docking Senyawa *p*-toluidin-SC558



Gambar L.9.4. Docking Senyawa AN up-SC558



Gambar L.9.3. Docking AP-SC558



## Lampiran 10

## Probit Analysis :

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> kons EPMS	1.597	.474	3.373	.001	.669	2.525
Intercept	-2.337	.772	-3.028	.002	-3.108	-1.565

a. PROBIT model:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$  (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	.762	3	.858 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	kons EPMS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.699	10	10	9.758	.242	.976
	2	2.000	10	8	8.046	-.046	.805
	3	1.699	10	6	6.470	-.470	.647
	4	1.398	10	4	4.588	-.588	.459
	5	1.000	10	3	2.299	.701	.230

## Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for kons EPMS			95% Confidence Limits for log(kons EPMS) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	PROBIT .010	1.015	.006	4.128	.006	-2.198
.020	1.503	.016	5.343	.177	-1.795	.728
.030	1.929	.029	6.300	.285	-1.540	.799
.040	2.327	.045	7.138	.367	-1.348	.854
.050	2.710	.064	7.905	.433	-1.192	.898
.060	3.086	.087	8.628	.489	-1.060	.936
.070	3.458	.114	9.319	.539	-.944	.969
.080	3.830	.144	9.989	.583	-.841	1.000
.090	4.202	.179	10.645	.623	-.747	1.027
.100	4.576	.219	11.290	.660	-.660	1.053
.150	6.515	.496	14.467	.814	-.305	1.160
.200	8.628	.944	17.743	.936	-.025	1.249
.250	10.978	1.627	21.303	1.041	.211	1.328
.300	13.630	2.630	25.333	1.134	.420	1.404
.350	16.656	4.057	30.079	1.222	.608	1.478
.400	20.146	6.035	35.915	1.304	.781	1.555
.450	24.217	8.695	43.451	1.384	.939	1.638
.500	29.026	12.154	53.716	1.463	1.085	1.730
.550	34.790	16.472	68.483	1.541	1.217	1.836
.600	41.821	21.649	90.831	1.621	1.335	1.958
.650	50.584	27.674	126.200	1.704	1.442	2.101
.700	61.814	34.632	184.732	1.791	1.539	2.267
.750	76.744	42.825	287.088	1.885	1.632	2.458
.800	97.651	52.922	480.821	1.990	1.724	2.682
.850	129.312	66.321	895.767	2.112	1.822	2.952
.900	184.117	86.403	1998.163	2.265	1.937	3.301

.910	200.520	91.904	2430.713	2.302	1.963	3.386
.920	220.000	98.205	3009.554	2.342	1.992	3.479
.930	243.610	105.553	3809.243	2.387	2.023	3.581
.940	272.987	114.316	4960.097	2.436	2.058	3.695
.950	310.839	125.089	6708.831	2.493	2.097	3.827
.960	362.069	138.903	9576.258	2.559	2.143	3.981
.970	436.761	157.789	14850.980	2.640	2.198	4.172
.980	560.430	186.598	26658.723	2.749	2.271	4.426
.990	830.195	242.302	67243.202	2.919	2.384	4.828

a. Logarithm base = 10.

### Probit Analysis

[DataSet2] F:\data probit seny2.sav

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> log kons AP	1.153	.441	2.611	.009	.288	2.018
Intercept	-1.307	.717	-1.821	.069	-2.024	-.589

a. PROBIT model:  $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$  (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

#### Chi-Square Tests

	Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	.759	3	.859 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for log kons AP			95% Confidence Limits for log(log kons AP) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	.130	.000	1.568	-.885	-8.269	.195
.020	.225	.000	2.157	-.648	-7.324	.334
.030	.318	.000	2.644	-.498	-6.725	.422
.040	.412	.000	3.082	-.385	-6.275	.489
.050	.509	.000	3.494	-.293	-5.909	.543
.060	.609	.000	3.889	-.215	-5.597	.590
.070	.713	.000	4.273	-.147	-5.325	.631
.080	.821	.000	4.650	-.085	-5.080	.667
.090	.934	.000	5.023	-.030	-4.858	.701
.100	1.051	.000	5.394	.022	-4.654	.732
.150	1.715	.000	7.268	.234	-3.810	.861
.200	2.531	.001	9.255	.403	-3.141	.966
.250	3.534	.003	11.442	.548	-2.569	1.059
.300	4.769	.009	13.922	.678	-2.058	1.144
.350	6.296	.026	16.812	.799	-1.587	1.226
.400	8.195	.072	20.292	.914	-1.145	1.307
.450	10.576	.190	24.655	1.024	-.722	1.392
.500	13.593	.485	30.446	1.133	-.314	1.484
.550	17.471	1.202	38.788	1.242	.080	1.589
.600	22.547	2.863	52.373	1.353	.457	1.719
.650	29.347	6.370	78.715	1.468	.804	1.896
.700	38.744	12.614	141.870	1.588	1.101	2.152
.750	52.288	21.566	327.559	1.718	1.334	2.515
.800	73.009	32.831	992.604	1.863	1.516	2.997
.850	107.736	47.394	4086.142	2.032	1.676	3.611
.900	175.785	69.176	26359.063	2.245	1.840	4.421
.910	197.851	75.231	41657.927	2.296	1.876	4.620
.920	224.972	82.235	68638.289	2.352	1.915	4.837



.930	259.103	90.497	119111.848	2.413	1.957	5.076
.940	303.378	100.490	220932.290	2.482	2.002	5.344
.950	363.180	112.984	447970.662	2.560	2.053	5.651
.960	448.667	129.340	1030384.368	2.652	2.112	6.013
.970	581.813	152.291	2877193.235	2.765	2.183	6.459
.980	821.883	188.530	1.131E7	2.915	2.275	7.053
.990	1416.675	262.359	9.838E7	3.151	2.419	7.993

a. Logarithm base = 10.

**Cell Counts and Residuals**

	Number	log kons AP	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.699	10	10	9.645	.355	.964
	2	2.000	10	8	8.411	-.411	.841
	3	1.699	10	7	7.428	-.428	.743
	4	1.398	10	6	6.198	-.198	.620
	5	1.000	10	5	4.389	.611	.439

**Probit Analysis**

[DataSet3] F:\data probit seny3.1sav.sav

**Parameter Estimates**

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> log kons 2AT	1.096	.371	2.953	.003	.369	1.823
Intercept	-1.672	.649	-2.575	.010	-2.322	-1.023

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

## Chi-Square Tests

		Chi-Square	df <sup>a</sup>	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.120	3	.989 <sup>b</sup>

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

## Cell Counts and Residuals

	Number	log kons 2AT	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.699	10	9	9.007	-.007	.901
	2	2.000	10	7	6.983	.017	.698
	3	1.699	10	6	5.752	.248	.575
	4	1.398	10	4	4.442	-.442	.444
	5	1.000	10	3	2.822	.178	.282

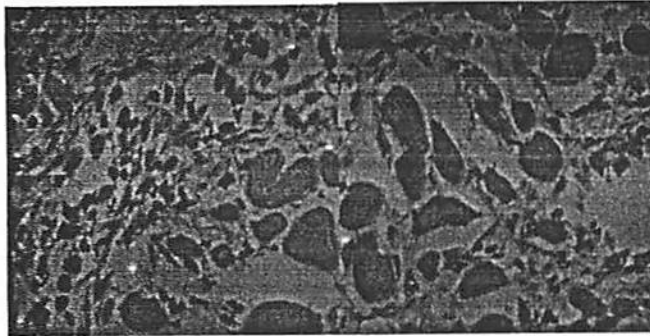
## Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for log kons 2AT			95% Confidence Limits for log (log kons 2AT) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	PROBIT	.253	.000	2.223	-.597	-5.114
	.449	.000	3.171	-.348	-4.379	.501
	.645	.000	3.978	-.190	-3.914	.600
	.848	.000	4.721	-.072	-3.564	.674
	1.059	.001	5.432	.025	-3.279	.735
	1.280	.001	6.124	.107	-3.038	.787
	1.511	.001	6.807	.179	-2.826	.833
	1.753	.002	7.486	.244	-2.637	.874
	2.007	.003	8.167	.302	-2.465	.912

.100	2.272	.005	8.851	.356	-2.306	.947
.150	3.803	.022	12.420	.580	-1.654	1.094
.200	5.727	.073	16.408	.758	-1.140	1.215
.250	8.136	.198	21.053	.910	-0.703	1.323
.300	11.153	.483	26.678	1.047	-.316	1.426
.350	14.938	1.083	33.803	1.174	.035	1.529
.400	19.711	2.275	43.362	1.295	.357	1.637
.450	25.776	4.500	57.198	1.411	.653	1.757
.500	33.564	8.346	79.251	1.526	.921	1.899
.550	43.706	14.352	118.420	1.641	1.157	2.073
.600	57.155	22.695	195.379	1.757	1.356	2.291
.650	75.418	33.223	359.610	1.877	1.521	2.556
.700	101.014	45.998	738.174	2.004	1.663	2.868
.750	138.463	61.783	1696.511	2.141	1.791	3.230
.800	196.714	82.418	4461.993	2.294	1.916	3.650
.850	296.208	111.847	14201.430	2.472	2.049	4.152
.900	495.747	160.044	62546.217	2.695	2.204	4.796
.910	561.412	174.034	89723.917	2.749	2.241	4.953
.920	642.641	190.450	132903.884	2.808	2.280	5.124
.930	745.587	210.097	204907.910	2.872	2.322	5.312
.940	880.172	234.213	332644.269	2.945	2.370	5.522
.950	1063.563	264.825	578681.612	3.027	2.423	5.762
.960	1328.411	305.560	1110425.636	3.123	2.485	6.045
.970	1746.031	363.770	2478115.456	3.242	2.561	6.394
.980	2511.129	457.724	7218739.769	3.400	2.661	6.858
.990	4452.543	655.117	3.907E7	3.649	2.816	7.592

a. Logarithm base = 10.

**Lampiran 11**  
**Hasil Uji Kemopreventif Kanker**



Gambar L11.1. Irisan kulit tengkuk dan kepala mencit kelompok CMC-Na dipapar selama 1 bulan

**LAMPIRAN 12****Peralatan Utama yang digunakan pada penelitian ini :**

<b>No</b>	<b>Laboratorium</b>	<b>Jenis Alat</b>	<b>Keterangan</b>
<b>1</b>	<b>Sintesis Farmasi dan Kimia Medisinal</b>	<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>	<b>Semua dalam keadaan baik dan siap untuk digunakan</b>
<b>2</b>	<b>LDB</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Spektrofotometer UV&amp; IR, spektrometer MS dan NMR</li> </ul>	<b>Semua dalam keadaan baik dan siap untuk digunakan</b>
<b>3</b>	<b>Farmasi Klinik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hot Plate Apparatus-Cimarec 2</li> <li>- Peralatan bedah</li> <li>- Jangka sorong</li> <li>- Mikropipet</li> <li>- sentrifuge</li> </ul>	<b>Semua dalam keadaan baik dan siap untuk digunakan</b>
<b>4</b>	<b>Laboratorium Hewan FFUA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rak hewan</li> </ul>	<b>Siap digunakan</b>

**B. Daftar Artikel Ilmiah :**

1. Telah diseminarkan pada Second Join Conference Unair-USM, di Surabaya 2009.

Judul :

**Antinociceptive Activity of Derivates of *p*-methoxycinnamic acid  
Isolated From *Kaempferia galanga* L.**

Juni Ekowati<sup>1\*</sup>, A. Syahrani<sup>1</sup>, Nuzul WD<sup>1</sup>, Hadi Poerwono<sup>1</sup>, Siswandono<sup>1</sup>, T. Budiati<sup>1</sup>,  
Shigeru Sasaki<sup>2</sup>, Takayasu Yamauchi<sup>2</sup>, Kimio Higashiyama<sup>2</sup>, 2009

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya  
60286, Indonesia

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

**ABSTRACT**

The structure modification of *p*-methoxycinnamic acid isolated from *Kaempferia galanga* L. to improve its activity as antinociceptive agent has been carried out. The structure modification was carried out by hydrogenation of vinylc double bond (using Pd/C catalyst) and introducing the appropriate groups on the carboxyl moiety to produce amide compounds. The synthesis of amide began with treating commercially *p*-amino phenol, anthranilic acid or ammonia solution with *p*-methoxycinnamoyl chloride. Those compounds were subjected to writhing test using acetic acid as pain inducer in mice as experimental animal at dose levels 50, 100 and 200 mg/kg. From this research, we concluded that the product compounds exhibited significant ( $P < 0.05$ ) antinociceptive activity, which product of hydrogenation of vinylc double bond of *p*-methoxycinnamic acid and formation amide of *p*-methoxycinnamoyl chloride with anthranilic acid decreased the antinociceptive activity of *p*-methoxycinnamic acid derivatives.

**Key words :** *p*-methoxycinnamic acids derivates, synthesis, antinociceptive activity,  
*Kaempferia galanga*

## 2. Akan diajukan pada Jurnal ARTOCARPUS :

**Judul :** Sintesis Derivat Etil *p*-metoksisinamat dari *Kaempferia galanga* Linn. dan aktivitasnya terhadap *Artemia Salina* melalui uji Brine Shrimp Lethality Test.

### C. Sinopsis Penelitian Lanjutan Stratnas Tahun 2010 :

**Judul :** Sintesis Senyawa Baru *p*-metoksisinamoil Tiourea Yang Berpotensi Kemopreventiv Kanker Dari *Kaempferia galanga* Linn. : Penghambat Proses Angiogenesis

#### ABSTRAK :

**Latar belakang :** Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan progresif neoplasma dan proses metastasis bergantung pada angiogenesis. Penggunaan nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) pada khususnya COX-2 inhibitor pada kanker payudara dan kanker kolon dengan target jalur inflamasi dan angiogenesis menjadi momentum penelitian senyawa NSAIDs sebagai chemopreventive pada kanker. Etil *p*-metoksisinamat (EPMS) isolat dari *Kaempferia galanga* diketahui mempunyai aktivitas anti inflamasi seperti NSAIDs dengan menghambat pembentukan PGE<sub>2</sub>, juga mampu menghambat tumor promoter activating B-4 aktivasi EB V. Oleh karena itu EPMS mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi COX-2 inhibitor yang dapat menghambat proses angiogenesis untuk pencegahan kanker terutama pada tumor-promoting stage.

**Tujuan jangka panjang :** Pemanfaatan tanaman asli Indonesia sebagai bahan baku senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai kemopreventiv kanker.

**Target khusus :** Memperoleh beberapa senyawa baru kelompok *p*-metoksisina-moiltiourea dari *Kaempferia galanga* Linn. yang berpotensi sebagai kemopreventif kanker dengan mekanisme hambatan proses angiogenesis.

**Metode :** Modifikasi gugus fungsi EPMS menjadi derivat *p*-metoksisinamoil tiourea melalui reaksi hidrolisis, pembentukan asil halida dan derivat *p*-metoksisinamoil tiourea (siklis dan alifatis). Struktur senyawa ditentukan dengan spektrofotometri UV, IR, NMR dan MS. Pengujian aktivitas kemopreventiv kanker dilakukan dengan skrining senyawa uji melalui *docking studies* menggunakan program AutoDock 3.0, dilanjutkan pengujian sebagai COX-2 inhibitor dengan hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi dengan injeksi complete Freund's adjuvant (CFA) secara intrapianar dan diamati inflamasi yang terjadi. Hasil senyawa yang mempunyai aktivitas antiinflamasi tinggi, diuji kemampuan kemopreventiv kanker terhadap mencit yang diinduksi benzopiren, diamati persen pertumbuhan