

101

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



SINTESIS, AKTIVITAS ANTIMIKROBA, ANTIKANKER, DAN
KAJIAN DOCKING MOLECULAR SENYAWA BARU TURUNAN
(E)-7-STIRIL DIHIDRO TETRAZOLO[1,5- α]PIRIMISIN MELALUI
REAKSI BIGINELLI TERMODIFIKASI

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. HERY SUWITO, M.Si	0003086304
Dr. ALFINDA NOVI KRISTANTI	0015116702
Dr. MIRATUL KHASANAH	0004036705

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**SINTESIS, AKTIVITAS ANTIMIKROBA, ANTIKANKER, DAN
KAJIAN DOCKING MOLECULAR SENYAWA BARU TURUNAN
(E)-7-STIRIL DIHIDRO TETRAZOLO[1,5- α]PIRIMISIN MELALUI
REAKSI BIGINELLI TERMODIFIKASI**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. HERY SUWITO, M.Si	0003086304
Dr. ALFINDA NOVI KRISTANTI	0015116702
Dr. MIRATUL KHASANAH	0004036705

**DIBIAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

HALAMAN PENGESAHAN

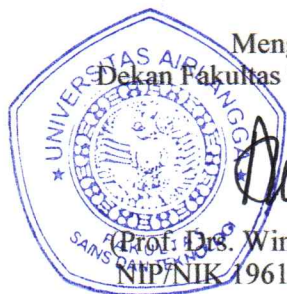
Judul : SINTESIS, AKTIVITAS ANTIMIROBA,
ANTIKANKER, DAN KAJIAN DOCKING
MOLEKULAR SENYAWA BARU TURUNAN (E)-7-
STIRIL DIHIDRO TETRAZOLO[1,5-]PIRIMIDIN
MELALUI REAKSI BIGINELLI TERMODIFIKASI

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Drs HERY SUWITO, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0003086304
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 081381780138
Alamat surel (e-mail) : herys08032002@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Dra ALFINDA NOVI KRISTANTI
NIDN : 0015116702
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. Dra MIRATUL KHASANAH M.Si
NIDN : 0004036705
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 105,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 310,368,000



Mengetahui,
Dekan Fakultas SAINTEK UNAIR

(Prof. Drs. Win Darmanto, Ph.D)
NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. Drs HERY SUWITO, M.Si)
NIP/NIK 196303081987011001

Menyetujui,
Ketua Lembaga penelitian dan Inovasi

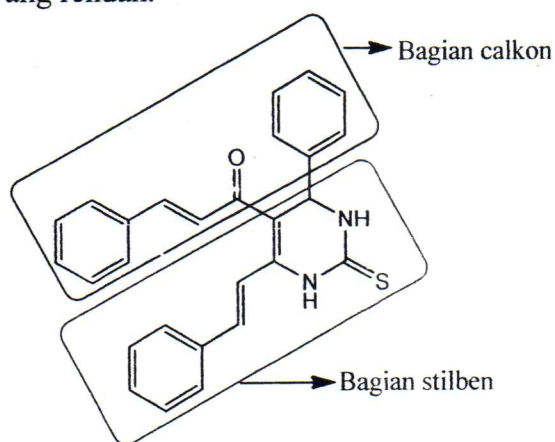
(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

RINGKASAN

Selain malaria, penyakit infeksi dan penyakit kanker saat ini menjadi permasalahan lokal dan global. Jumlah kasus kanker di dunia diperkirakan akan meningkat dari sekitar 14 juta menjadi 22 juta per tahun dalam masa dua dekade mendatang. Dalam masa yang sama jumlah kematian akibat kanker diprediksi akan meningkat dari 8,2 juta menjadi 13 juta per tahun (WHO, 2014). Lebih dari 60% kasus tersebut terjadi di Afrika, Asia, dan Amerika Selatan. Di samping itu daerah ini menyumbang sebanyak 70% kematian akibat kanker (WHO, 2014).

Kemoterapi merupakan salah satu metode yang biasa digunakan dalam terapi kanker melalui penggunaan senyawa antikanker. Obat-obat kanker tersebut pada umumnya bersifat sebagai agen sitotoksik. Namun senyawa-senyawa ini biasanya memiliki efek samping yang serius (Nishimura *et al.*, 2007) dan timbulnya resistensi sel kanker. Oleh sebab itu masih diperlukan penelitian untuk menemukan senyawa-senyawa antikanker dengan efikasi tinggi dan efek samping yang rendah.



Struktur molekul target penelitian

Paradigma baru dalam desain senyawa yang memiliki aktivitas farmakologis adalah mendesain senyawa bioaktif adalah dengan membuat molekul hibrida yang tersusun dari bagian-bagian yang telah dikenal memiliki bioaktivitas. Pada penelitian ini didesain dan disintesis molekul target yang memiliki struktur hibrida dari dihidropirimidin (DHPM), calkon, dan stilben. Molekul target disintesis melalui dua tahap reaksi. Tahap pertama sintesis senyawa turunan DHPM, yang disintesis pada tahun pertama, dan tahap ke dua adalah sintesis molekul target melalui reaksi aldol "type". Tujuan dari desain dan sintesis

molekul target yang berupa suatu molekul hibrida adalah untuk mendapat molekul yang sangat bioaktif. Sampai akhir penelitian tahun 1, telah berhasil sintesis dan dikarakterisasi secara spektroskopi 8 buah senyawa turunan DHPM menggunakan reaksi Biginelli dari asetil aseton, turunanbenzaldehyd, dan urea atau tiourea, menggunakan pTSA sebagai katalisator. Disamping itu telah senyawa hasil sintesis telah diuji aktivitas antikankernya terhadap sel kanker widr, dan diperoleh hasil bahwa senyawa MT-3 [5-acetyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one] memiliki aktivitas antikanker yang paling potensial dengan nilai IC_{50} sebesar 19,67 $\mu\text{g/mL}$ dan aktivitas ini lebih kuat dibanding doxorubicin sebagai kontrol positif..

Kata kunci: turunan DHPM, reaksi Biginelli, Widr cancer cell line, antikanker

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Ucapan syukur kehadiran Allah SWT kami panjatkan atas rahmat dan ridloNya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian kami untuk program Tahun 1 yang berjudul **“Sintesis, aktivitas antimikroba, antikanker, dan kajian docking molekular senyawa baru turunan (E)-7-stiril dihidrotetrazolo[1,5- α]pirimidin melalui reaksi Biginelli termodifikasi”**. Pada Tahun 1 ini disintesis senyawa antara yang akan menjadi sinton netral bagi sintesis molekul target yang dilakukan pada Tahun 2.

Penelitian yang dilaksanakan di Universitas Airlangga didasarkan atas *road map* penelitian yang telah digariskan, yaitu untuk menuju Universitas Airlangga menjadi pusat unggulan riset dibidang kesehatan yang ditujukan pada kemandirian penyediaan bahan baku obat secara nasional dan terciptanya internasionalisasi di bidang penelitian, pendidikan dan publikasi. Tujuan tersebut akan dicapai dengan menyediakan berbagai macam skim penelitian, salah satunya adalah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi.

Pada kesempatan ini peneliti menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor dan ketua LPI Universitas Airlangga atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan kepada peneliti untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga atas kepercayaan yang diberikan, dukungan dan kesempatan yang diberikan.
3. Ketua Departemen Kimia atas ijin yang diberikan untuk menggunakan fasilitas laboratorium.

Penelitian masih belum selesai secara tuntas. Oleh sebab itu banyak kekurangan dan peneliti mengharapkan kritik dan saran agar penelitian ini dapat diselesaikan tepat waktu dengan hasil yang memuaskan.

Surabaya, 15 November 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Senyawa turunan pirimidin	5
2.2. Bioaktivitas Turunan Pirimidin	5
2.3. Senyawa antikanker dan mekanisme kerjanya	6
2.4. Mekanisme kerja senyawa antimikroba	9
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1. Tujuan Penelitian	10
3.2. Manfaat Penelitian	10
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
4.1. Tempat Penelitian	12
4.2. Bahan dan Alat Penelitian	12
4.2.1. Sampel Penelitian	12
4.2.2. Bahan-bahan kimia	12
4.2.3. Alat Penelitian	13
4.3. Prosedur	13
4.3.1. Prosedur umum sintesis molekul intermediate (tahun I)	13
4.3.2. Prosedur umum sintesis molekul target 2 (tahun II)	13
4.3.3. Uji antikanker senyawa hasil sintesis	14
4.3.4. Uji antimikroba senyawa hasil sintesis	14
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	15
5.1. Sintesis molekul target	15
5.2. Karakterisasi senyawa hasil sintesis	17
5.3. Uji antikanker	20
5.4. Luaran	21
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	22
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	23



7.1.	Kesimpulan	23
7.2.	Saran	23
	Daftar Pustaka	24
	Lampiran	26
	Hasil Publikasi	27

DAFTAR TABEL

Tabel No	Keterangan	halaman
5.1.	Rendemen, Massa molekul relatif (Mr) dan hasil uji KLT senyawa hasil sintesis	16
5.2	Nilai elektrofilitas gugus karbonil turunan benzaldehid dan nilai nukleofilitas gugus amino dari urea/tiourea	17
5.3	Hasil analisis spektrum FTIR senyawa hasil sintesis	18
5.4	Hasil analisis senyawa hasil sintesis dengan HRESI-MS	18
5.5	Nilai IC50 senyawa hasil sintesis terhadap selkanker Widr	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar No	Keterangan	halaman
2.1	Kemungkinan <i>cross-linking</i> rantai DNA dengan <i>alkylating agents</i> . (Sumber: Patrick, 2002).	8
2.2	Mekanisme kerja Calicheamicin γ_1^1 sebagai pemutus rantai DNA (Sumber: Patrick, 2002).	8

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Keterangan
No	
1	Hasil Publikasi

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Selain malaria, penyakit infeksi dan penyakit kanker saat ini menjadi permasalahan lokal dan global. Jumlah kasus kanker di dunia diperkirakan akan meningkat dari sekitar 14 juta menjadi 22 juta per tahun dalam masa dua dekade mendatang. Dalam masa yang sama jumlah kematian akibat kanker diprediksi akan meningkat dari 8,2 juta menjadi 13 juta per tahun (WHO, 2014). Lebih dari 60% kasus tersebut terjadi di Afrika, Asia, dan Amerika Selatan. Di samping itu daerah ini menyumbang sebanyak 70% kematian akibat kanker (WHO, 2014).

Kemoterapi merupakan salah satu metode yang biasa digunakan dalam terapi kanker melalui penggunaan senyawa antikanker. Obat-obat kanker tersebut pada umumnya bersifat sebagai agen sitotoksik. Namun senyawa-senyawa ini biasanya memiliki efek samping yang serius (Nishimura *et al.*, 2007) dan timbulnya resistensi sel kanker.

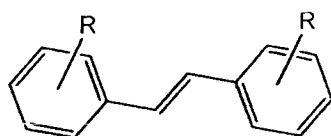
Senyawa-senyawa yang bersifat antikanker banyak yang didesain memiliki aktivitas melalui mekanisme sebagai antimetabolit. Senyawa antimetabolit ini bekerja melalui inhibisi jalur metabolisme, sehingga mengganggu perkembang-biakan sel (Avendano dan Menendez, 2008). Protein yang terlibat dalam perkembang-biakan sel sering dijadikan target dalam mendesain dan mensintesis senyawa antikanker.

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, dan jamur. Penyakit ini tersebar baik secara langsung atau tidak langsung. Menurut WHO, Indonesia masih digolongkan sebagai negara resiko tinggi bagi perkembangan penyakit infeksi (WHO, 2014). Disamping penyebaran penyakit infeksi melalui jalur penularan yang umum (*foodborne*, *waterborne*, atau *vectorborne*), permasalahan lain yang muncul adalah semakin banyak terjadinya resistensi mikroba terhadap senyawa antimikroba yang biasa digunakan pada terapi penyakit infeksi. Hal ini menuntut untuk ditemukannya senyawa antimikroba baru.

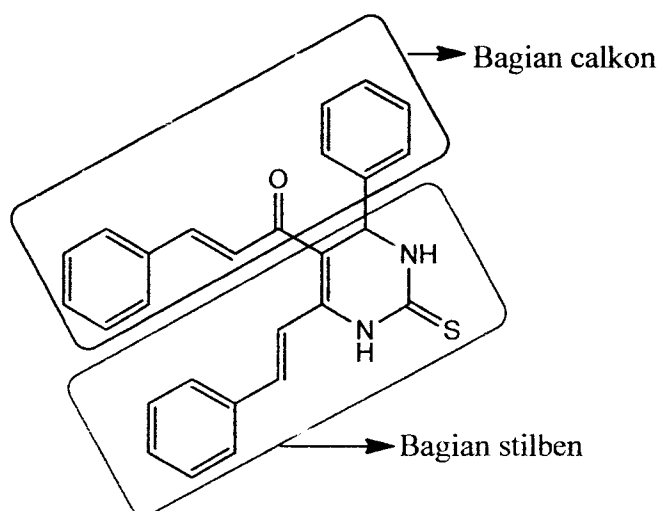
Golongan senyawa organik yang dikenal memiliki aktivitas antikanker dan antimikroba adalah stilben. Resveratrol ((*E*)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol) dan Calkon (3'-hydroxy-3,4,4',5-tetramethoxy-cis-stilben) adalah contoh senyawa golongan stilben yang sudah dikenal memiliki bioaktivitas antikanker yang potensial. Stilben merupakan senyawa organik yang memiliki kerangka C6 – C2 – C6. Pada umumnya stilben disintesis menggunakan reaksi Wittig dan analognya, atau reaksi Mc. Murry (Chalal *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2015; Belluti, 2010). Akan

tetapi pelaksanaan reaksi ini memerlukan kondisi kering dan bebas oksigen sehingga cukup sulit dilaksanakan di negara tropis seperti Indonesia. Oleh sebab itu perlu dicari metode alternatif sintesis senyawa analog stilben yang mudah dan sederhana.

Pada saat ini, senyawa-senyawa turunan dihidropirimidin (DHPM) mendapatkan perhatian besar dari para peneliti. Struktur inti DHPM diduga bertanggung jawab terhadap spektrum luas bioaktivitas seperti anticonsulvan, antituberkulosis, antiamuba, antihistamin, antihipertensi, dan antidepresan (Wang *et al.*, 2012). Oleh sebab itu pengembangan metode sintesis yang sederhana bagi senyawa golongan ini menjadi penting bagi sintesis organik. Pada penelitian ini, akan disintesis senyawa-senyawa turunan (*E*)-3-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)prop-2-en-1-one yang merupakan memiliki struktur DHPM, dimana struktur molekulnya mengandung struktur stilben termodifikasi dan calkon.



Struktur umum stilben



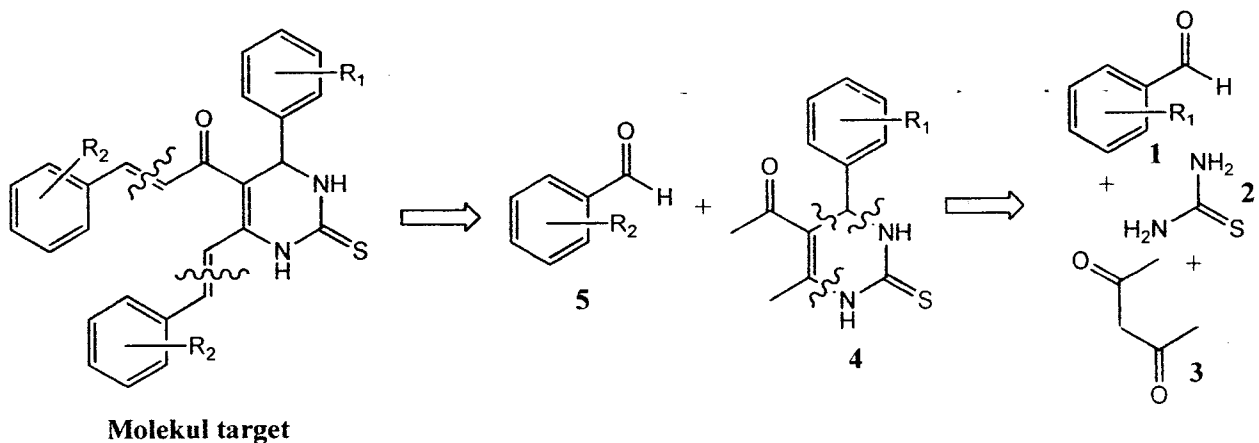
(*E*)-3-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)prop-2-en-1-one

Reaksi multikomponen merupakan reaksi kimia yang melibatkan tiga atau lebih komponen reaksi untuk membentuk satu produk tunggal (Armstrong *et al.*, 1996). Dalam perkembangannya, reaksi multikomponen telah dijadikan sebagai strategi penting dalam sintesis senyawa organik. Hal ini disebabkan reaksi ini memiliki efisiensi yang tinggi serta memungkinkan untuk mendesain sintesis molekul target dari beberapa komponen reaksi berbeda dalam satu langkah reaksi tunggal. Disamping itu proses pemurnian produk reaksi juga sederhana karena semua pereaksi organik yang digunakan akan habis terpakai untuk membentuk senyawa target (Zhu *et al.*, 2005; Domling,

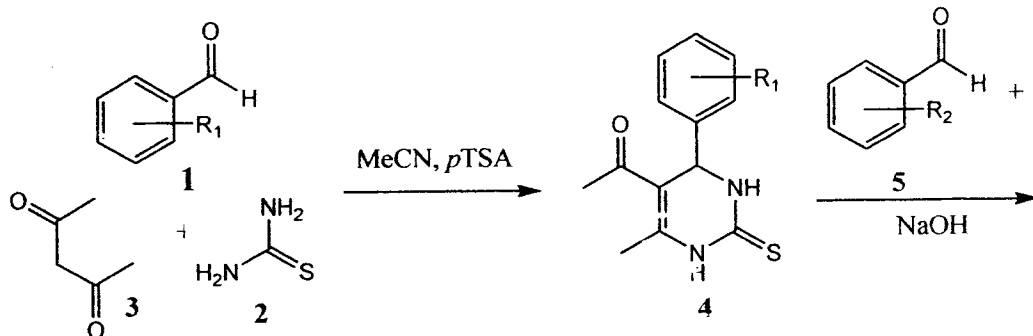
2006). Reaksi multikomponen yang digunakan dalam sintesis kerangka senyawa heterosiklik pada umumnya berguna untuk mendapatkan “*drug-like*” molekul (Kappe, 2000).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka pada penelitian ini akan disintesis senyawa-senyawa turunan (*E*)-3-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5yl)prop-2-en-1-one yang memiliki bagian stilben dan kalkon melalui dua tahap reaksi, yaitu tahap 1) sintesis turunan DHPM melalui reaksi Biginelli, dilanjutkan tahap 2) pembentukan molekul target melalui reaksi “aldol type” menggunakan katalis basa. Pemilihan senyawa golongan ini didasarkan pada alasan sebagai berikut: (1) struktur molekul senyawa tersusun atas bagian kerangka DHPM, bagian stilbene, dan bagian kalkon. Senyawa-senyawa yang memiliki masing-masing struktur tersebut dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antikanker dan antimikroba. Dengan membuat senyawa yang memiliki ketiga buah kerangka tersebut diharapkan diperoleh senyawa yang memiliki aktivitas aditif, (2) reaksi Biginelli yang digunakan untuk mensintesis molekul target merupakan reaksi yang sederhana dan mudah dilaksanakan. Demikian pula untuk reaksi aldol, peneliti telah berpengalaman dalam mensintesis senyawa melalui reaksi aldol, dan (3) berdasarkan penelusuran pustaka yang dilakukan peneliti, masih jarang publikasi yang melaporkan senyawa dengan struktur seperti molekul target.

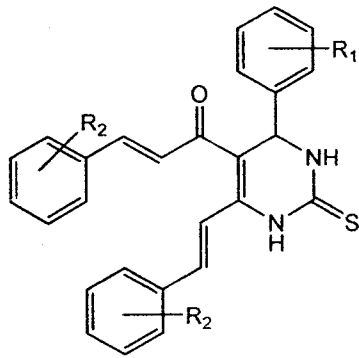
Dalam mendesain jalur sintesis suatu molekul target, tahap awal yang dilakukan melakukan analisis retrosintesis untuk mendapatkan jalur sintesis yang dapat diaplikasikan dan memperoleh reaktan yang diperlukan. Analisis retrosintesis molekul target pada penelitian ini adalah sebagai berikut.



Beranjak dari hasil analisis retrosintesis di atas, maka tahap awal adalah sintesis turunan DHPM (4) menggunakan reaksi Biginelli menggunakan pereaksi 1, 2, dan 3. Tahap berikutnya adalah mensintesis molekul target dengan mereaksikan senyawa 4 dengan turunan benzaldehid 5 menggunakan reaksi aldol type. Berdasarkan analisis retrosintesis tersebut, maka tahapan reaksi sintesis molekul target tersebut adalah sebagai berikut.



Molekul target tahun ke 1



Molekul target tahun ke 2

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Senyawa turunan pirimidin

Pirimidin adalah senyawa heterosiklik cincin 6 yang mengandung dua buah atom nitrogen. Senyawa golongan ini tersebar luas di alam, karena turunan pirimidin merupakan komponen penyusun asam nukleat, seperti timin, urasil, dan sitosin (Gilchrist, 1993). Karena memiliki bermacam-macam aktivitas biologis, banyak jurnal ilmiah yang melaporkan metode sintesis turunan pirimidin.

Metode umum sintesis yang dipakai dalam mensintesis pirimidin adalah dengan mereaksikan reagen yang mengandung kerangka N-C-N dengan reagen yang mengandung kerangka C-C-C, dengan ketentuan bahwa ke dua pereaksi tersebut masing-masing bersifat bis-nukleofil dan bis-elektrofil. Pirimidin dapat dibuat dari reaksi antara senyawa 1,3-dikarbonil dengan formamida. Reaksi sikloadisi antara 1,3,5-triazin dengan alkanamina. Akan tetapi reaksi ini kurang disukai karena menghasilkan HCN yang beracun (Gilchrist, 1993)

Metode yang paling sering digunakan dalam mensintesis turunan pirimidin adalah dengan menggunakan turunan kalkon sebagai sumber bis-elektrofil dan memiliki skeleton C-C-C. Sebagai sumber bis-nukleofil dengan skeleton N-C-N, diperoleh dari sumber yang berbeda, tergantung turunan pirimidin yang akan dihasilkan. Jika diinginkan turunan 2-hidroksi pirimidin, digunakan urea (Ramiz, *et al.*, 2010). Jika yang ingin disintesis adalah turunan 2-amino pirimidin, maka yang dipakai adalah guanin (Bukhari, *et al.*, 2011), sedang jika yang ingin disintesis adalah turunan pirimidin-2-tiol, maka pereaksi yang dipakai adalah tiourea (Patel & Patel, 2010).

2.2. Bioaktivitas Turunan Pirimidin

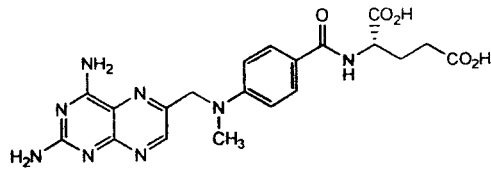
Senyawa-senyawa golongan pirimidin merupakan senyawa yang memperlihatkan beragam aktivitas biologis. Contoh yang paling terkenal dari senyawa turunan pirimidin ini adalah pirimetamin (2) yang memiliki aktivitas anti-malaria. Trimetoprim (3), dan sikloguanil (4) juga merupakan senyawa yang bersifat anti-malaria (Mokmak, 2006). Penggunaan pirimetamin sebagai asenyawa antimalaria pada awalnya adalah menggantikan penggunaan kuinin dan klorokuin, karena adanya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap senyawa-senyawa tersebut (Pribadi, *et al.*, 1981). Akan tetapi saat ini juga teramati resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap

pirimetamin. Metotrexat adalah senyawa turunan pirimidin yang digunakan dalam terapi kanker. Sama dengan yang terjadi pada pirimetamin, saat ini telah pula terdeteksi adanya resistensi penderita kanker terhadap senyawa ini. (Avendano & Menendez, 2008). Chang, *et al* (2004) berhasil mensintesis turunan pirimidin 2,4,6-trisubstitusi, serta menemukan bahwa senyawa yang telah disintesis memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor adenosine A1 yang selektif. Senyawa dengan aktivitas biologis seperti ini dapat diaplikasikan sebagai senyawa antikanker. Bukhari, *et al* (2011) melaporkan bahwa turunan 4,6-diarilpirimidin-2-amina memperlihatkan aktivitas antibakteri dan anti-leishmania yang memiliki aktivitas sebanding dengan senyawa standar Amphotericin B.

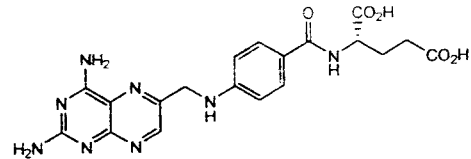
2.3. Senyawa antikanker dan mekanisme kerjanya

Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai oleh pertumbuhan sel dan jaringan tidak terkontrol. Karena pertumbuhan sel kanker yang sangat cepat dan tidak normal, maka terapi kanker, terutama secara kimia, ditujukan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker ini (Fox & Whitesell, 1997). Senyawa kimia yang digunakan dalam terapi kanker bekerja melalui beberapa macam mekanisme, yaitu sebagai antimetabolit, alkylating agent, DNA intercalator, dan chain cutters, inhibitor polimerisasi tubulin, dan senyawa yang menghambat jalur signal transduksi bagi pertumbuhan dan proliferasi sel tumor (Patrick, 2002; Avendano & Menendez, 2008).

Antimetabolit dapat didefinisikan sebagai senyawa yang menghambat jalur metabolisme, dan pada umumnya menghambat biosintesis asam nukleat. Senyawa antimetabolit dapat berkompetisi dengan substrat alam pada sisi ikatan enzim yang terlibat pada proses biosintesis atau dapat berikatan dengan asam nukleat sehingga menghambat fungsi normalnya dan memicu proses apoptosis (Avendano & Menendez, 2008). Dihidrofolat reduktase (DHFR) merupakan enzim yang mengkatalisis reduksi dihidrofolat (DHF) menjadi tetrahidrofolat (THF) pada sintesis timidin. Timidin merupakan substrat yang diperlukan untuk sintesis DNA. Oleh sebab itu DHFR merupakan target bagi pengembangan obat antikanker. Methotrexate dan aminopterin (16) merupakan senyawa antikanker yang bekerja sebagai inhibitor enzim DHFR yang paling kuat (Avendano & Menendez, 2008).

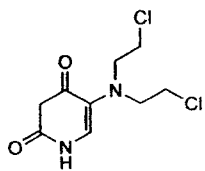


Methotrexate

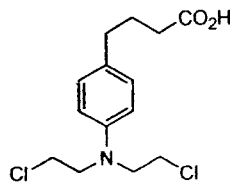


Aminopterin

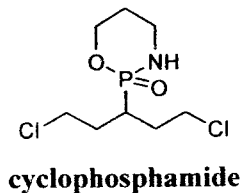
Suatu senyawa antikanker yang bersifat sebagai alkylating agent merupakan suatu elektrofil yang dapat bereaksi dengan gugus nukleofil dari DNA, membentuk suatu ikatan kovalen. Jika terdapat dua gugus elektrofilik pada senyawa antikanker, maka akan terjadi cross linking pada satu rantai DNA (intra-strand) atau cross linking antar rantai DNA (inter-strand). Terjadinya cross-linking DNA dengan alkylating agents ini menyebabkan terganggunya fungsi normal DNA. Contoh senyawa yang bekerja menggunakan mekanisme ini adalah uracil mustard, chlorambucil, dan cyclophosphamide (Patrick, 2002).



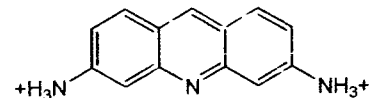
uracil mustard



chlorambucil

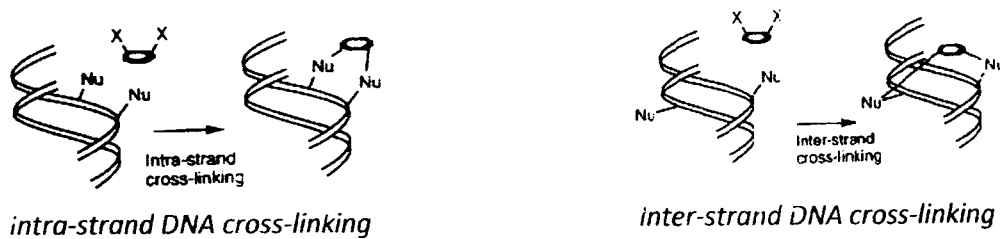


cyclophosphamide



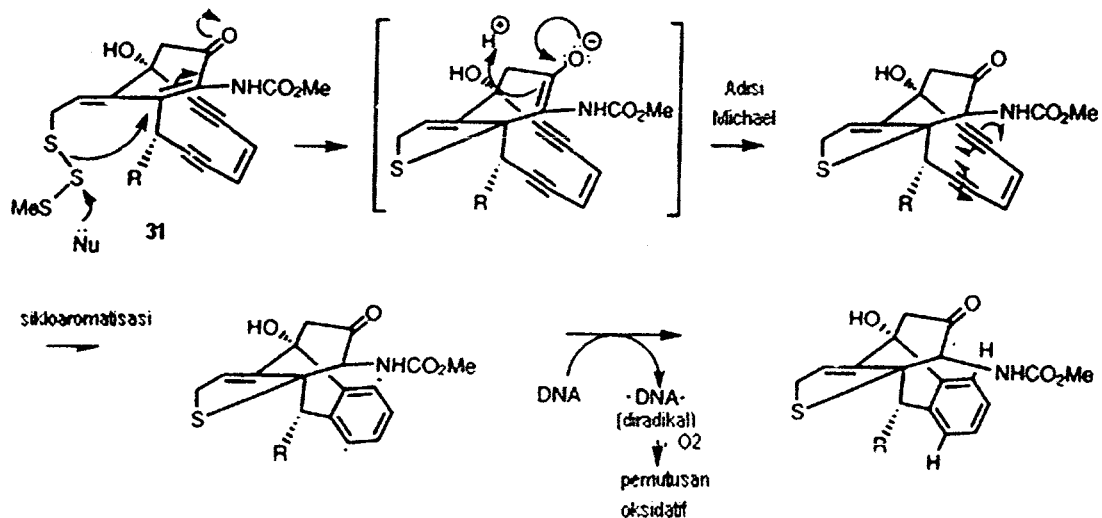
proflavin

Senyawa antikanker yang bekerja secara interkalasi akan mengikat DNA dengan menyisipkan dirinya di antara pasangan basa DNA. Proses interkalasi ini merusak struktur DNA untai ganda, sehingga mencegah proses kopi DNA. Akibatnya sintesis protein terhalangi. Untuk dapat menyisipkan dirinya pada pasangan basa DNA, senyawa tersebut harus planar dengan ukuran yang sesuai. Selain itu, harus bersifat hidrofobik, sehingga terjadi interaksi yang kuat antara senyawa dengan pasangan basa di bagian atas dan bawah. Persyaratan ini sesuai untuk senyawa golongan aromatis atau heteroaromatis. Contoh obat yang bekerja melalui mekanisme ini adalah proflavin (Patrick, 2002).



Gambar 2.1. Kemungkinan *cross-linking* rantai DNA dengan *alkylating agents*. (Sumber: Patrick, 2002).

Senyawa antikanker dapat bereaksi dengan DNA, sehingga rantai DNA menjadi putus. Calicheamicin γ_1^1 merupakan senyawa yang bekerja sebagai DNA cutters. Senyawa ini berikatan dengan DNA pada sisi minor groove, untuk kemudian memotong cincin DNA dengan cara membentuk suatu radikal yang reaktif (Patrick, 2002)



Gambar 2.2. Mekanisme kerja Calicheamicin γ_1^1 sebagai pemutus rantai DNA (Sumber: Patrick, 2002).

Gangguan komunikasi intra- atau inter-selular adalah penyebab utama mekanisme patogen. Berdasarkan hal tersebut, penelitian obat modern lebih difokuskan pada terapi yang berdasarkan signal transduksi (Avendano & Menendez, 2008). Senyawa antikanker generasi yang lebih baru didesain bekerja melalui jalur signal transduksi yang memicu terjadinya apoptosis. Hal ini dapat dicapai dengan menghambat aktivitas onkoprotein yang mencegah terjadinya apoptosis atau mengaktifkan protein pro-apoptosis. Sebagai suatu faktor transkripsi, protein p53 tidak terlibat langsung pada jalur apoptosis, tetapi mengatur gen lain yang memicu apoptosis. Pada kanker, gen penyandi p53 ini mengalami mutasi, sehingga tidak dapat menjalankan fungsinya. Oleh sebab itu

mendesain suatu molekul yang dapat mengaktifkan kembali fungsi protein p53 melalui inhibisi interaksi p53 – MDM2 adalah salah satu metode untuk menemukan senyawa antikanker. Senyawa antikanker yang sudah diketahui bekerja melalui mekanisme ini adalah Nutlin 1, 2 dan 3 (Vassilev, 2005).

2.4. Mekanisme kerja senyawa antimikroba

Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh berbagai macam mikroorganisme, seperti bakteri, jamur, virus, atau parasit. Sampai saat ini telah dikenal banyak sekali obat-obatan yang digunakan dalam terapi penyakit infeksi. Dari banyaknya senyawa antimikroba yang telah digunakan, terdapat enam buah mekanisme kerja senyawa antimikroba. Golongan yang pertama adalah senyawa antimikroba yang bertindak sebagai inhibitor pada biosintesis komponen dinding sel. Senyawa-senyawa golongan ini menginhibisi kerja enzim rasemase dan suatu enzim sintase yang terlibat pada sintesis dipeptida D-alanil-D-alanin. Contoh dari senyawa golongan ini adalah D-sikloserine yang dipergunakan dalam terapi lini ke dua penyakit tuberkulosa. Kelompok ke dua adalah senyawa antimikroba yang bekerja sebagai *Membrane-Active Agents*. Yang dimaksud sebagai *membrane-active agents* adalah senyawa yang dapat merusak membran sitoplasma mikroorganisme. Contoh senyawa antimikroba yang bekerja melalui mekanisme ini adalah polymixins.

Golongan ketiga adalah senyawa antimikroba yang bekerja melalui inhibisi sintesis protein. Wakil senyawa yang bekerja melalui mekanisme ini adalah tetrasiklin. Kelompok keempat adalah senyawa antimikroba yang mampu menghambat sintesis asam nukleat. Rifampisin adalah senyawa dari golongan ini. Golongan berikutnya adalah senyawa antimikroba yang bekerja melalui inhibisi sintesis tetrahidrofolat. Sulfonamida adalah contoh dari antimikroba golongan ini. Golongan terakhir adalah senyawa anti mikroba yang berfungsi melalui inhibisi biosintesis sterol. Wakil dari golongan ini adalah trimethoprim (Simons & Russel dalam Smith, 2006).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Melakukan sintesis

Tahun 1 : senyawa-senyawa turunan 1-(6-methyl-4-phenyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)ethan-1-one

Tahun 2 : senyawa-senyawa turunan (*E*)-4-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-yl)but-2-en-1-one

2. Menguji aktivitas antikanker in vitro senyawa-senyawa hasil sintesis.
3. Menguji aktivitas antimikroba senyawa-senyawa hasil sintesis

Sasaran penelitian adalah:

Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat diperoleh senyawa antikanker dan antimikroba baru yang potensial, sehingga senyawa tersebut dapat diproduksi di Indonesia. Hal ini akan dapat mengurangi ketergantungan terhadap impor obat.

3.2. Manfaat Penelitian

Dalam bidang kesehatan, salah satu permasalahan mendasar yang dihadapi Indonesia adalah pengadaan bahan baku obat yang masih tergantung dari impor. Menurut data Kementerian Badan Usaha Miliik Negara (BUMN), saat ini sekitar 92% bahan baku obat berasal dari impor, sebagai besar berasal dari China, India, dan Eropa. Tiongkok masih menjadi negara sumber pemasok terbesar kebutuhan bahan baku obat Indonesia, yakni sekitar Rp 6,84 triliun (60%), India di posisi kedua Rp 3,42 triliun (30%), dan Eropa Rp 1,4 triliun (10%). Oleh sebab itu pemerintah dan pelaku usaha tengah merancang upaya menekan ketergantungan impor tersebut, mulai dari komponen bahan baku hingga teknologi yang digunakan.

Guna menjawab permasalahan tersebut maka penelitian sintesis bahan baku obat dengan teknologi yang dapat dilaksanakan di Indonesia merupakan suatu keniscayaan. Pada usul penelitian yang diajukan, senyawa antikanker dan antimikroba yang memiliki struktur dasar heterostilben, yaitu (*E*)-7-stiril-4,7-dihidro tetrazolo[1,5- α]pirimidin disintesis melalui reaksi

multikomponen Biginelli yang mudah dan sederhana. Keberhasilan teknologi sintesis ini telah dibuktikan oleh peneliti karena telah melakukan penelitian pendahuluan. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah: (1) senyawa-senyawa baru yang merupakan turunan (*E*)-3-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5yl)prop -2-en-1-one (2) Golongan senyawa antikanker dan antimikroba baru yang diharapkan memiliki aktivitas yang potensial. Keberhasilan penelitian ini akan membuka peluang untuk memproduksi senyawa antikanker dan antimikroba turunan (*E*)-3-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro pyrimidin-5yl)prop -2-en-1-one di dalam negeri. Hal ini akan berdampak pada penghematan devisa negara.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di lokasi berikut ini:

1. Sintesis molekul target dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi – Universitas Airlangga
2. Analisis Infra Red dan Spektroskopi Massa dilaksanakan di Laboratorium Instrumentasi, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi – Universitas Airlangga
3. Analisis NMR dilaksanakan di Laboratorium Terpadu, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga.
4. Analisis HRESI-MS dilaksanakan di Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Chulalongkorn – Thailand.
5. Uji antikanker dilaksanakan di Laboratorium Bagian Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran – Universitas Gadjah Mada.
6. Uji antimikroba dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

4.2. Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1. Sampel penelitian

Sampel penelitian yang digunakan untuk menguji aktivitas antikanker senyawa hasil sintesis adalah kanker cell line, yaitu sel kanker HepG2 dan sel kanker Widr Mikroba yang digunakan untuk uji antimikroba adalah *Escherichia coli* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 10231, dan Multi Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA).

4.2.2. Bahan-bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat kemurnian pro-sintesis untuk pereaksi, sedang pelarut yang digunakan memiliki derajat kemurnian pro-analisis. Bahan-bahan kimia tersebut adalah NaOH, asetilaseton, 4-chlorobenzaldehid, 4-fluorobenzaldehid, 2,4-dimetoksi benzaldehid, 2,5-dimetoksi benzaldehid, 2,3-dimetoksi

benzaldehyd, 2-metoksi benzaldehyd, 3-metoksi benzaldehyd, 4-metoksi benzaldehyd, tiourea, *p*TSA, kloroform, etilasetat, n-heksana, diklorometana, metanol, etanol, DMSO, THF, aseton, asetonitril, Na₂SO₄ anhidrat, plat silika gel GF254, Plat silika gel preparative 60 F254, silika gel untuk kolom kromatografi, Medium EMB, Medium MSA, dan Medium SDA

4.2.3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang biasa dipakai pada laboratorium kimia organik. Untuk karakterisasi senyawa hasil sintesis digunakan spektrofotometer infra merah (FTIR), High Resolution Spectrometer Massa (HRMS), dan spektrometer NMR. Penentuan nilai MIC (uji antimikroba) digunakan alat UV-Vis spektrofotometer. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antikanker digunakan Elisa Plate Reader.

4.3. Prosedur

4.3.1. Prosedur umum sintesis molekul intermediate (tahun 1)

Ke dalam labu alas bulat leher tiga dimasukkan berturut-turut 4 mmol turunan benzaldehyd, 5 mmol asetilaseton, 5 mmol urea/tiourea, dan 0.8 mmol *p*TSA. Larutkan campuran reaksi tersebut dengan 6 mL asetonitril. Campuran reaksi direfluks selama 1 jam kemudian didinginkan ke dalam penangas es sampai dingin, kemudian ditambahkan 3 mL etanol dingin dan 3 mL akuades dingin. Endapan disaring, dicuci dengan etanol dingin, kemudian dikeringkan. Endapan direkristalisasi dengan pelarut etanol-air. Senyawa murni yang diperoleh ditentukan titik lelehnya, kemurniannya, dan struktur molekulnya secara spektroskopi (FT-IR, HRESI-MS, NMR).

4.3.2. Prosedur umum sintesis molekul target 2 (tahun II)

Ke dalam labu alas bulat leher tiga dimasukkan berturut-turut 3 mmol turunan benzaldehyd, 1 mmol turunan DHPM hasil reaksi dari tahap 1 (intermediate) dan 8 mL etanol, diaduk sampai larut. Setelah larut, ditambahkan larutan 1 mmol KOH dalam etanol (5 mL). Campuran reaksi direfluks pada suhu ruang sampai pereaksi DHPM habis bereaksi (dikontrol dengan KLT). Selanjutnya ke dalam campuran reaksi ditambahkan sedikit air dan beberapa tetes HCl. Endapan yang terbentuk disaring, selanjutnya direkristalisasi dengan system pelarut yang sesuai. Senyawa

murni yang diperoleh ditentukan titik lelehnya, kemurniannya, dan struktur molekulnya secara spektroskopi (FT-IR, HRESI-MS, NMR)

4.3.3. Uji antikanker senyawa hasil sintesis.

Uji antikanker senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan MTT assay. *Cell line* kanker (sel kanker payudara dan kanker serviks) dengan konsentrasi 1×10^4 sel tiap sumuran ditumbuhkan pada 96 plat sumuran dengan medium RPMI 1640 yang mengandung 10% FBS selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan senyawa hasil sintesis (7 macam konsentrasi untuk tiap jenis senyawa), dan diinkubasi lebih lanjut selama 24 jam. Setelah penambahan larutan 0,5% MTT sebanyak 0,1 volume medium untuk tiap sumuran, inkubasi dilanjutkan selama 4 jam pada suhu 37°C / 5% CO_2 . Kemudian ditambahkan larutan penghenti reaksi (0,04 N HCl dalam isopropanol) sebanyak volume yang sama ke dalam masing-masing sumuran kultur sel. Setelah itu absorbansi larutan diukur pada λ 570 nm. Perlakuan ini dilakukan triplo. Sebagai kontrol positif digunakan doxorubicin. Nilai IC_{50} ditentukan menggunakan program %Probit.

4.3.4. Uji antimikroba senyawa hasil sintesis

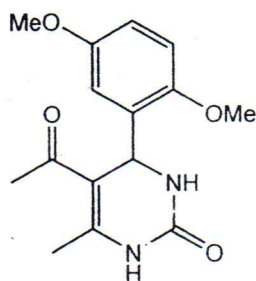
Mikroba uji ditumbuhkan pada medium yang berbeda. Medium EMB (Eosin Methylene Blue) digunakan untuk menumbuhkan *E. coli*, MSA (Manitol Salt Agar) untuk *S. aureus*, dan SDA (Sabouraud Dextrose Agar) untuk *C. albicans*. Uji antimikroba dilaksanakan menggunakan metode difusi cakram kertas dan metode dilusi.

Metode difusi dilakukan menggunakan medium MHA (Mueller Hinton Agar). Senyawa uji disuspensikan ke dalam larutan fisiologis dan diukur densitas optisnya (OD) sampai mencapai nilai 0,5 standard McFarland. Untuk bakteri dan 0,08-0,1 untuk jamur. Suspensi mikroba (1 mL) ditumbuhkan pada cawan petri yang mengandung medium MHA steril sampai memadat. Senyawa uji selanjutnya diinjeksikan pada cakram kertas dan selanjutnya ditempatkan pada medium yang mengandung mikroba uji, dan diinkubasi selama 24 jam untuk bakteri dan 48 jam untuk jamur. Selanjutnya diukur diameter hambatnya. Cara kerja ini diulangi secara triplo.

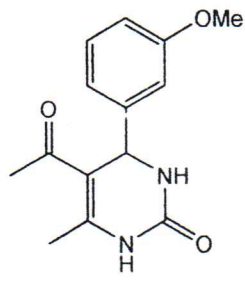
BAB 5
HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Sintesis molekul target

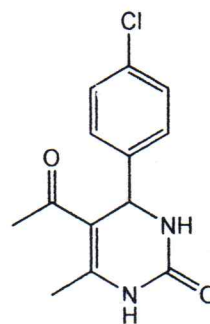
Molekul target disintesis melalui dua tahap reaksi, yaitu melalui reaksi multikomponen Biginelli dan melalui reaksi aldol type. Pada tahun pertama disintesis molekul intermediate turunan DHPM menggunakan reaksi multikomponen Biginelli. Reaksi dilakukan dengan mereaksikan asetil aseton, turunan benzaldehid, dan tiourea secara serempak menggunakan katalisator *p*TSA. Pada tahun pertama telah berhasil disintesis 8 buah turunan DHPM dengan struktur molekul sebagai berikut.



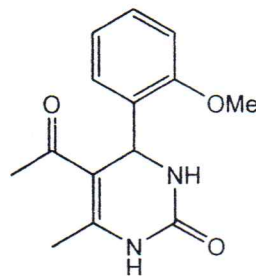
MT-1



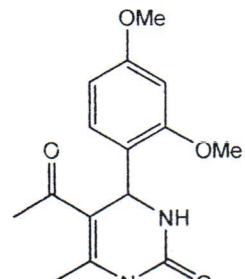
MT-2



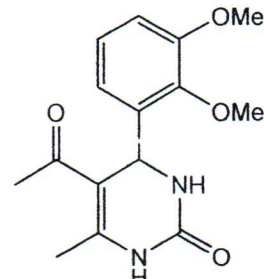
MT-3



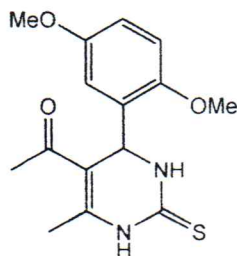
MT-4



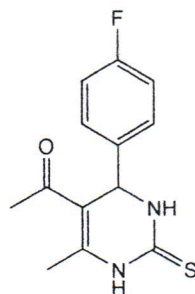
MT-5



MT-6



MT-7



MT-8

Rendemen hasil reaksi, hasil uji kemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis, dan penentuan titik leleh senyawa hasil sintesis ditampilkan pada **Tabel 5.1** berikut ini.

Tabel 5.1. Rendemen, Massa molekul relatif (M_r) dan hasil uji KLT senyawa hasil sintesis

Senyawa	Rendemen (%)	Titik leleh (°C)	Kromatografi Lapis Tipis	
			R _f	Sistem eluen
MT-1	46	246-248	0,46	1
MT-2	62	256-258	0.45	1
MT-3	38	248-250	0.42	2
MT-4	50	268-270	0,33	1
MT-5	53	218-220	0,40	2
MT-6	49	244-246	0.48	3
MT-7	34	246-248	0.58	3
MT-8	50	266-268	0,70	3

Keterangan: sistem **eluen 1**: diklorometana:etilasetat = 2:1; sistem **eluen 2**: CHCl_3 :etil asetat = 2:3; sistem **eluen 3**: diklorometana:etilasetat = 3:1;

Berdasarkan hasil rendemen yang diperoleh, dapat diamati bahwa besarnya sifat elektrofilitas gugus karbonil dari turunan benzaldehid sebagai salah satu pereaksi memegang peranan penting terhadap kereaktifannya. Semakin tinggi sifat elektrofilitasnya (nilai muatan partial positif makin tinggi) maka makin tinggi kereaktifannya. Sifat nukleofilitas gugus amino pada urea atau tiourea juga mempengaruhi kereaktifannya. Makin tinggi sifat nukleofilitasnya, makin tinggi pula kereaktifannya. Besarnya elektrofilitas gugus karbonil dari pereaksi turunan benzaldehid dan besarnya nukleofilitas gugus amino dari urea/tiourea ditentukan menggunakan program HyperChem release 8.0 menggunakan metode *semi empirical* AM1, dan ditampilkan pada **Tabel 5.2** berikut ini.

Berdasarkan data rendemen yang diperoleh terdapat sedikit data yang sedikit mengalami penyimpangan jika dikaitkan dengan teori kereaktifan yang diajukan. Hal ini disebabkan hasil reaksi yang diperoleh tidak menghasilkan produk tunggal, melainkan produk campuran dengan produk hasil reaksi samping. Hasil reaksi samping yang diperoleh tidak diisolasi.

Tabel 5.2. Nilai elektrofilitas gugus karbonil turunan benzaldehid dan nilai nukleofilitas gugus amino dari urea/tiourea

Senyawa	Muatan (Coulomb)	
	Gugus karbonil	Urea/tiourea
MT-1	+0,223	-0,140 (urea)
MT-2	+0,222	-0,140 (urea)
MT-3	+0,221	-0,140 (urea)
MT-4	+0,228	-0,140 (urea)
MT-5	+0,226	-0,140 (urea)
MT-6	+0,223	-0,140 (urea)
MT-7	+0,225	-0,399 (tiourea)
MT-8	+0,226	-0,399 (tiourea)

5.2. Karakterisasi senyawa hasil sintesis

Penentuan struktur molekul senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan berdasarkan data spektroskopi yang meliputi FTIR, HRESI-MS, ^1H -, dan ^{13}C -NMR. Sebelum Dilakukan analisis spektroskopi, senyawa hasil sintesis ditentukan kemurniannya terlebih dahulu dengan menentukan titik lelehnya dan berdasarkan analisis Kromatografi Lapis Tipis, seperti telah ditampilkan pada **Tabel 5.1**.

Karakterisasi yang mula-mula dilakukan adalah menggunakan spektrofotometer FTIR. Hasil analisis yang diperoleh ditampilkan pada **Tabel 5.3** berikut ini. Berdasarkan analisis tersebut diketahui bahwa semua gugus fungsi yang membentuk kerangka dasar senyawa DIIPM dapat teramati, seperti gugus amida sekunder, karbonil keton, karbonil amida, gugus aromatis, gugus $\text{C}=\text{C}$, dan gugus aril-alkil eter.

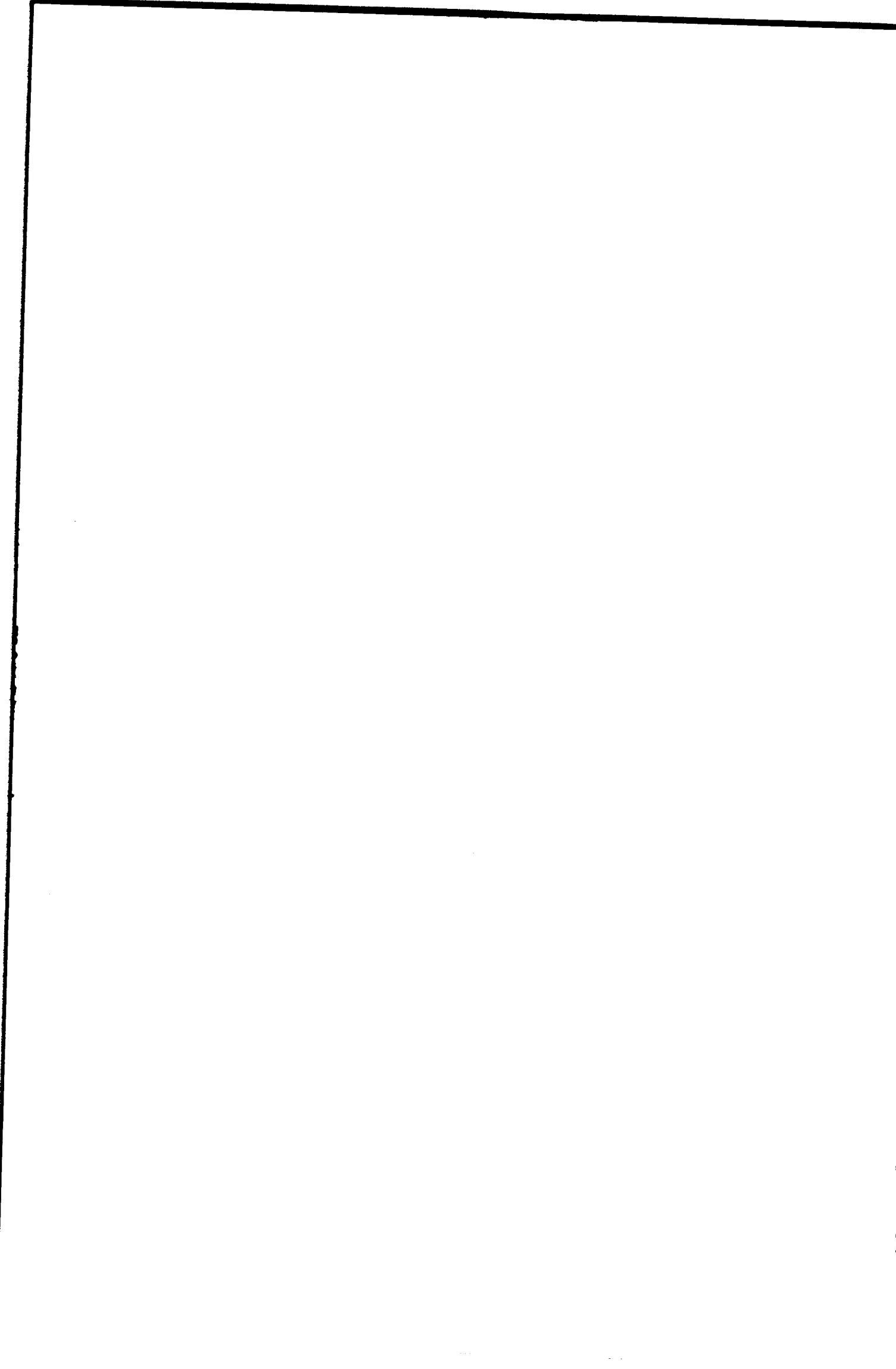
Tabel 5.3. Hasil analisis spektrum FTIR senyawa hasil sintesis

Gugus fungsi	ν (cm ⁻¹)							
	MT-1	MT-2	MT-3	MT-4	MT-5	MT-6	MT-7	MT-8
-NH-	3272	3341	3200	3271	3250	3375	3287	3215
-CH _{sp2} stretching	3115	3115	3154	3125	3115	3121	3117	2981
-CH _{sp3} stretching	2947	2954	2972	2968	2947	2943	3003	2833
-C=O keton	1715	1715	1715	1715	1714	1703	1618	1633
-C=O amida	1681	1678	1632	1612	1701	1641	-	-
C=C aromatis	1485	1487	1493	1462	1496	1620	1580	1496
Calkil-O-Caril	1113	1217	1244	1113	1236	-	-	1249
-C=S	-	-	-	-	-	-	1179	1175
C-Cl	-	-	-	-	-	737	-	-
C-F	-	-	-	-	-	-	1186	-

Tahap berikutnya adalah analisis menggunakan HRESI-MS. Analisis menggunakan instrumen ini diperoleh data massa molekul relatif dan rumus molekul. Hasil analisis menggunakan FRESI-MS ditampilkan pada **Tabel 5.4** berikut.

Tabel 5.4. Hasil analisis senyawa hasil sintesis dengan HRESI-MS

Senyawa	Terhitung [Mr]	Teramati Mr [M+Na] ⁺	Rumus Molekul
MT-1	290,1267	313,1270	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₄
MT-2	260,1161	283,1165	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃
MT-3	264,0666	287,0669	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₂ O ₂
MT-4	260,1161	283,1166	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃
MT-5	290,1267	313,1269	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₄
MT-6	290,1267	313,1270	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₄
MT-7	306,1038	329,1039	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃ S
MT-8	264,0733	287,0735	C ₁₃ H ₁₃ FN ₂ OS



Tahap terakhir dari proses penentuan struktur molekul senyawa hasil sintesis adalah analisis spektrum proton NMR dan spektrum karbon NMR. Hasil elusidasi yang diperoleh adalah sebagai berikut.

5-acetyl-4-(2,5-dimethoxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm) 2,03 (s, 3H); 2,28 (s, 3H); 3,65 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 5,52 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H); 6,57 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H); 6,82 (dd, $J = 8,9, 3,1$ Hz, 1H); 6,94 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H); 7,33 (s, 1H); 9,12 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm). 18,60; 29,65; 49,77; 55,27; 55,9; 107,85; 112,1; 112,16; 113,76; 122,37; 148,09; 150,34; 152,16; 153,10; 194,43.

5-acetyl-4-(3-methoxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-2), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm) 2.29 (s, 3H); 2.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H); 3.73 (s, 3H); 5.24 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H); 6.81 (s, 1H); 6.82 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H); 6.84 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H); 7.25 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H); 7.80 (s, 1H); 9.17 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm) 18.87; 30.27; 53.67; 54.98; 109.38; 112.21; 112.67; 118.41; 129.65; 145.72; 148.17; 152.14; 159.34; 194.29

5-acetyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm). 2,09 (s, 3H); 2,25 (s, 3H); 5,22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3,5$ Hz, 1H); 7,22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H); 7,22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H); 7,35 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H); 7,35 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,5$ Hz, 2H); 7,81 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 3,6$ Hz ; $^4J_{\text{HH}} 2,0$ Hz, 1H); 9,18 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2,0$ Hz, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm). 18,96; 30,41; 53,06; 1109,50; 28,30; 128,30; 128,46; 128,46; 131,82; 143,19; 148,44; 152,03; 194,09.

5-acetyl-4-(2-methoxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-4), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm) 2,02 (s, 3H); 2,29 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 5,57 (d, 1H, 3,3 Hz); 6,9 (m, 1H; 7,6 Hz); 7,03 (td, 1H; 1,9 dan 8Hz); 7,03 (td, 1H; 1,9 dan 8Hz); 7,26 (td, 1H; 7,7 dan 1,8 Hz); 7,33 (s, 1H); 9,11 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm) 18.64; 29.62; 48.65; 55.43; 107,76; 111,22; 120.39; 126.74; 128.90; 131.02; 148,15; 152,19; 156,24; 194,43.

5-acetyl-4-(2,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-5). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm), 2,01 (s, 3H); 2,40 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 3,86 (s, 3H); 5,65 (s, 1H); 5,89 (s, 1H); 6,41 (m, 2H, 8,24); 6,41 (m, 2H, 8,24); 6,93 (d, 1H, 8,3); 8,35 (s broad, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm), 19,57; 29,41; 50,05; 55,56; 55,56; 99,03; 104,14; 107,16; 121,77; 127,63; 147,95; 153,66; 157,76; 161,07; 196,10.

5-acetyl-4-(2,3-dimethoxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (MT-6), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm), 2.04 (s, 3H); 2.26 (s, 3H); 3.79 (s, 3H); 3.81 (s, 3H); 5.55 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H); 6.73 (dd, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 1H); 6.95 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H); 7.02 – 6.98 (m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm), 18.82; 29.99; 49.28; 55.72; 60.28; 108.72; 112.25; 119.21; 124.02; 137.17; 145.64; 147.73; 151.85; 152.43; 194.44.

1-(4-(2,5-dimethoxyphenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)ethan-1-one (MT-7). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm). 2.04 (s, 3H); 2.40 (s, 3H); 3.72 (s, 3H); 3.86

(s, 3H); 5.75 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H); 6.59 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H); 6.79 (dd, $J = 9.0, 2.9$ Hz, 1H); 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H); 7.46 (s, 1H); 7.93 (s, 1H). ^{13}C - NMR (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm). 19,64; 29,80; 51,22; 56,19; 56,29; 108,33; 111,86; 113,48; 114,73; 129,90; 144,23; 152,16; 154,29; 175,05; 196,08.

1-(4-(4-fluorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)ethan-1-one (MT-8). ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ_{H} (ppm). 2,17 (s, 3H); 2,34 (s, 3H); 5,29 (d, $^3J_{\text{HH}} = 3,9$ Hz, 1H); 7,18 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,9$ Hz, 2H); 7,18 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,9$ Hz, 2H); 7,26 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz ; $^4J_{\text{HF}} = 5,5$ Hz, 2H); 7,26 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz ; $^4J_{\text{HF}} = 5,5$ Hz, 2H); 9,75 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 4,3$ Hz ; $^4J_{\text{HH}} = 1,8$ Hz, 1H); 10,30 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1,8$ Hz, 1H). ^{13}C - NMR (100 MHz, DMSO- d_6 δ_{H} (ppm). 18,28; 30,46; 53,02; 110,49; 115,39; 115,39; 128,58; 139; 144,73; 161,52; 174,10; 194,71.

Berdasarkan data spektroskopi dan analisis spektrum yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa-senyawa hasil sintesis sesuai dengan struktur molekul target yang telah direncanakan.

5.3. Uji antikanker

Senyawa-senyawa hasil sintesis selanjutnya diuji aktivitas antikankernya terhadap sel kanker HepG2 dan sel kanker Widr menggunakan metode MTT assay. Aktivitas antikanker senyawa uji dinyatakan sebagai IC_{50} , dan ditampilkan pada Tabel 5.5. berikut ini.

Tabel 5.5. Nilai IC_{50} senyawa hasil sintesis terhadap sel kanker HepG2 dan Widr

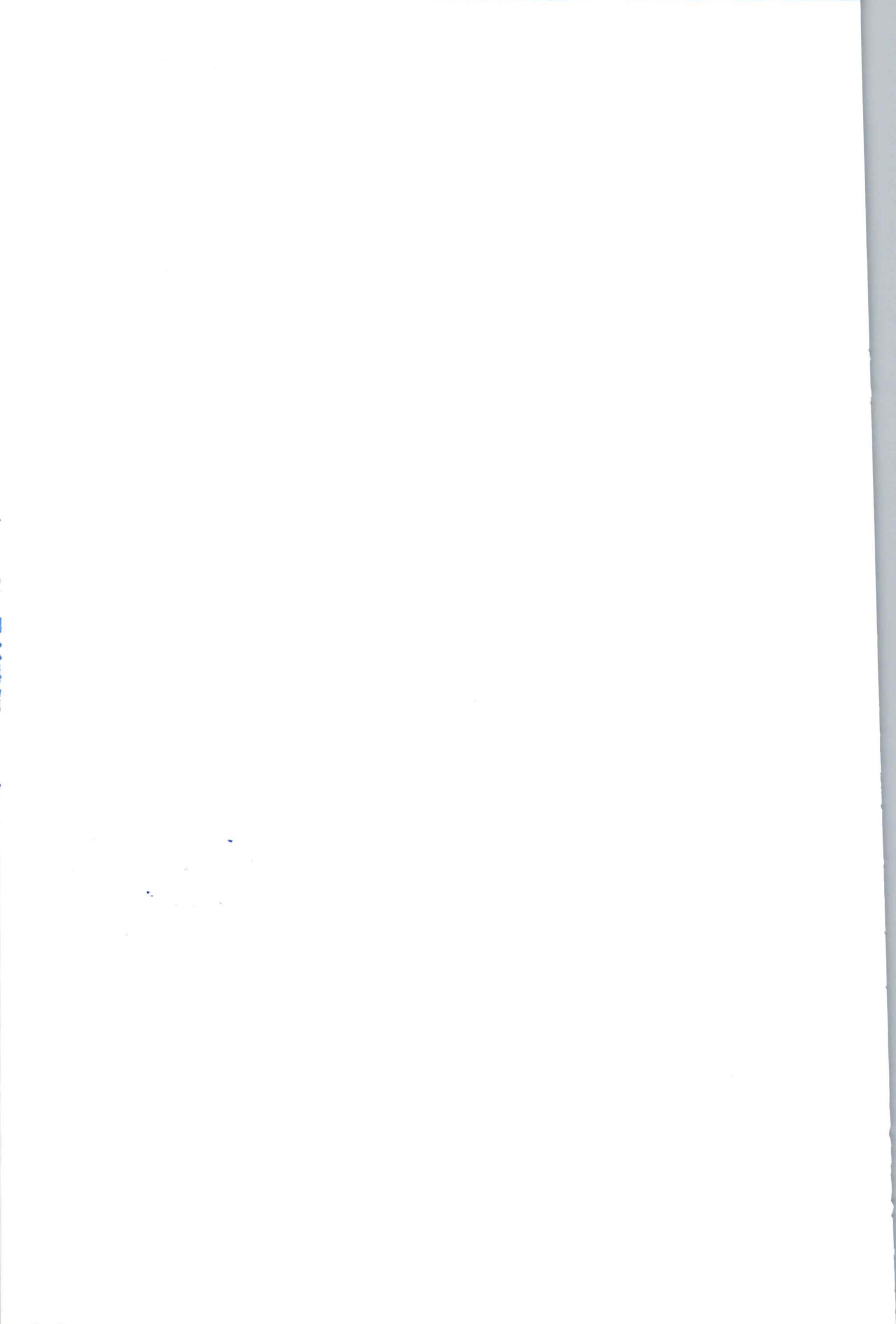
Senyawa	Sel kanker Widr (IC_{50})	
	$\mu\text{g/mL}$	μM
MT-1	156.51	0,54
MT-2	1387.11	5,33
MT-3	19,67	0,07
MT-4	359.14	1,38
MT-5	99.16	0,34
MT-6	178.43	0,61
MT-7	136.11	0,44
MT-8	116.74	0,44
Doxorubicin	28.70	0,05

Berdasarkan hasil skrining aktivitas antikanker terhadap senyawa-senyawa hasil sintesis menggunakan metode MTT assay diperoleh hasil bahwa senyawa MT-3 memiliki aktivitas antikanker tertinggi (IC_{50} sebesar 19,67 $\mu\text{g/mL}$ / 0,07 μM). yang lebih kuat dibanding doxorubicin sebagai kontrol positif.

5.4. Luaran

Luaran yang dicapai adalah satu publikasi yang terbit pada jurnal Molbank sebagai berikut, dan ditampilkan pada lampiran.

Suwito, H., Hardiyanti, H.D., Ul Haq, K., Kristanti, A.N., Khasanah, M., 2018, (*E*)-3-[3-(4-Morpholinophenyl)acryloyl]-2*H*-chromen-2-one, Molbank, 2019, M1027.



BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Sampai laporan akhir ini selesai ditulis, tahapan yang telah diselesaikan adalah:

1. Sintesis dan karakterisasi secara spektroskopi delapan buah molekul antara yang nantinya akan berfungsi sebagai sinton pada tahap berikutnya.
2. Uji antikanker senyawa-senyawa hasil sintesis terhadap sel kanker Widr menggunakan metode MTT assay.

Rencana yang akan dilaksanakan pada tahapan berikutnya adalah:

1. Uji antikanker senyawa-senyawa hasil sintesis terhadap sel kanker HepG2.
2. Sintesis dan karakterisasi secara spektroskopi molekul target berupa senyawa-senyawa turunan (*E*)-4-phenyl-1-(4-phenyl-6-((*E*)-styryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-yl)but-2-en-1-one.
3. Uji antikanker molekul target yang dihasilkan terhadap HepG2 cancer cells line dan Widr cancer cells line menggunakan metode MTT assay.
4. Uji aktivitas antimikroba terhadap molekul target yang dihasilkan menggunakan bakteri gram positif, bakteri gram negatif, dan jamur untuk mempelajari apakah senyawa-senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas antimikroba dengan spektrum luas.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, dapat disimpulkan:

1. Senyawa turunan DHPM dapat disintesis menggunakan reaksi multikomponen Biginelli
2. Sifat elektrofilitas dan nukleofilitas pereaksi yang digunakan mempengaruhi jumlah rendemen yang diperoleh.
3. Senyawa MT-3 [5-acetyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one] memiliki aktivitas antikanker yang paling potensial dengan nilai IC_{50} sebesar 19,67 $\mu\text{g/mL}$ / 0,078 μM terhadap sel Widr dan aktivitasnya lebih kuat dibanding doxorubicin sebagai kontrol positif..

7.2. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh disarankan untuk menggunakan senyawa-senyawa hasil reaksi sebagai sinton pada sintesis pengembangan struktur DHPM yang diperoleh, karena senyawa-senyawa hasil sintesis masih mengandung gugus fungsi yang dapat ditransformasi lebih lanjut.



Daftar Pustaka

- Armstrong, R.W., Combs, A.P., Tempest, P.A., Brown, S.D., Keating, T.A., 1996, Multiple-Component Condensation Strategies for Combinatorial Library Synthesis, *Acc. Chem. Res.*, 29 (3):123-131.
- Avendano, C., Menendez, J.C., 2008, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 1st Ed., Elsevier, Amsterdam.
- Belluti, F., Fontana, G., Dal Bo, L., Carenini, N., Giommarelli, C., Zunino, F., 2010, Design, synthesis and anticancer activities of stilben-coumarin hybrid compounds: identification of novel proapoptotic agents, *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 3543-3550.
- Chalal, M., Delmas, D., Meunier, P., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, 2014, Inhibition of cancer derived cell lines proliferation by synthesized hydroxylated stilbenes and new ferrocenyl-stilbene analogs. Comparison with resveratrol, *Molecules*, 19, 7850-7868.
- Domling, A., 2006, Recent developments in isocyanide based multicomponent reactions in applied chemistry, *Chem. Rev.*, 106: 17-89.
- Haleel, A., Arthi, P., Reddy, N.D., Veena, V., Sakthiel, N., Arun, Y., Perumal, P.T., Rahiman, A.K., 2015, *RSC Advances*, DOI: 10.1039/C4RA11197D.
- Hassankhani, A., Mosadegh, E., 2015, An efficient synthesis of tetrahydrotetrazolo[1,5- α]quinazoline derivatives by a three-component reaction of 5-aminotetrazole, arylaldehydes, and dimedone, *Scientia Iranica, Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering*, 22(3), 942-947.
- Kappe, C.O., 2000, Biologically active dihydropyrimidinones of the Biginelli-type. A literature survey, *Eur. J. Med. Chem.*, 35: 1043-1052.
- Nishimura, R., Tabata, K., Arakawa, M., Ito, Y., Kimura, Y., Akihisa, T., Nagai, H., Sakuma, A., Kohno, H., Suzuki, T., 2007, Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(10), 1878-1883.
- Raju, C., Madhaiyan, K., Uma, R., Sridhar, R., Ramakrishna, S., 2012, Antimicrobial and antioxidant activity evaluation of tetrazolo[1,5- α]pyrimidines: A simple diisopropylammonium trifluoroacetate mediated synthesis, *RSC Advances*, 2, 11657-11663.
- Reddy, G.C., Prakash, S.S., Diwakar, L., 2015, Stilbene heterocycles: synthesis, antimicrobial, antioxidant and anticancer activities. *The Pharma Innovation Journal*, 3(12):24-30.
- Smith, J., 2006, *Smith and Williams Introduction to the Principles of Drug Design and Action*, 4th Ed., Taylor & Francis, London.

Suresh, L., Onkara, P., Kumar, P.S.V., Pydisetty, Y., Chandramouli, G.V.P., 2016, Ionic liquid-promoted multicomponent synthesis of fused tetrazolo[1,5- α]pyrimidines as α -glucosidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 4007-4014.

Warg, S-B., Deng, X-Q., Zeng, Y., Yuan, Y-P., Quan, Z-S., Guan, L-P., 2012, Synthesis and evaluation of anticonvulsant and antidepressant activities of 5-alkoxytetrazolo[1,5-c]thieno[2,3-e]pyrimidine derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, 56, 139-144.

WHO, 2013, World Malaria Report 2013, http://www.who.int/malaria/publications/world_report_2013/en/.online accessed on 14 january 2014

Zhu, J., Bienaymee, F., 2005, *Multicomponent Reactions*, 1st Eds. Wiley-VCH, Weinheim.

LAMPIRAN

Hasil publikasi

Short Note

(E)-3-[3-(4-Morpholinophenyl)acryloyl]-2H-chromen-2-one

Hery Suwito *, Helda Dwi Hardiyanti, Kautsar Ul Haq, Alfinda Novi Kristanti and Miratul Khasanah

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya 60115, Indonesia; hyuga.helda@gmail.com (H.D.H.); Kautsar.ul.haq-2016@fst.unair.ac.id (K.U.H.); alfinda-n-k@fst.unair.ac.id (A.N.K.); miratul-k@fst.unair.ac.id (M.K.)

* Correspondence: herys08032002@yahoo.com or hery-s@fst.unair.ac.id; Tel.: +62-31-5922-427

Received: 23 September 2018; Accepted: 25 October 2018; Published: 29 October 2018

check for updates

Abstract: A new compound (E)-3-[3-(4-morpholinophenyl)acryloyl]-2H-chromen-2-one, a coumarin based chalcone derivative, has been successfully synthesized employing a molecular hybridization method through the reaction between 3-acetylcoumarin and 4-morpholinobenzaldehyde using a Claisen–Schmidt reaction using *p*TSA as a catalyst. The structure of the title compound was established using spectroscopic data FTIR, HRESI-MS, ¹H- and ¹³C-NMR. The anticancer activity against breast cancer cells line T47D and cervix cancer cells line HeLa was determined using an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

Keywords: molecular hybridization; coumarin-chalcone; anticancer

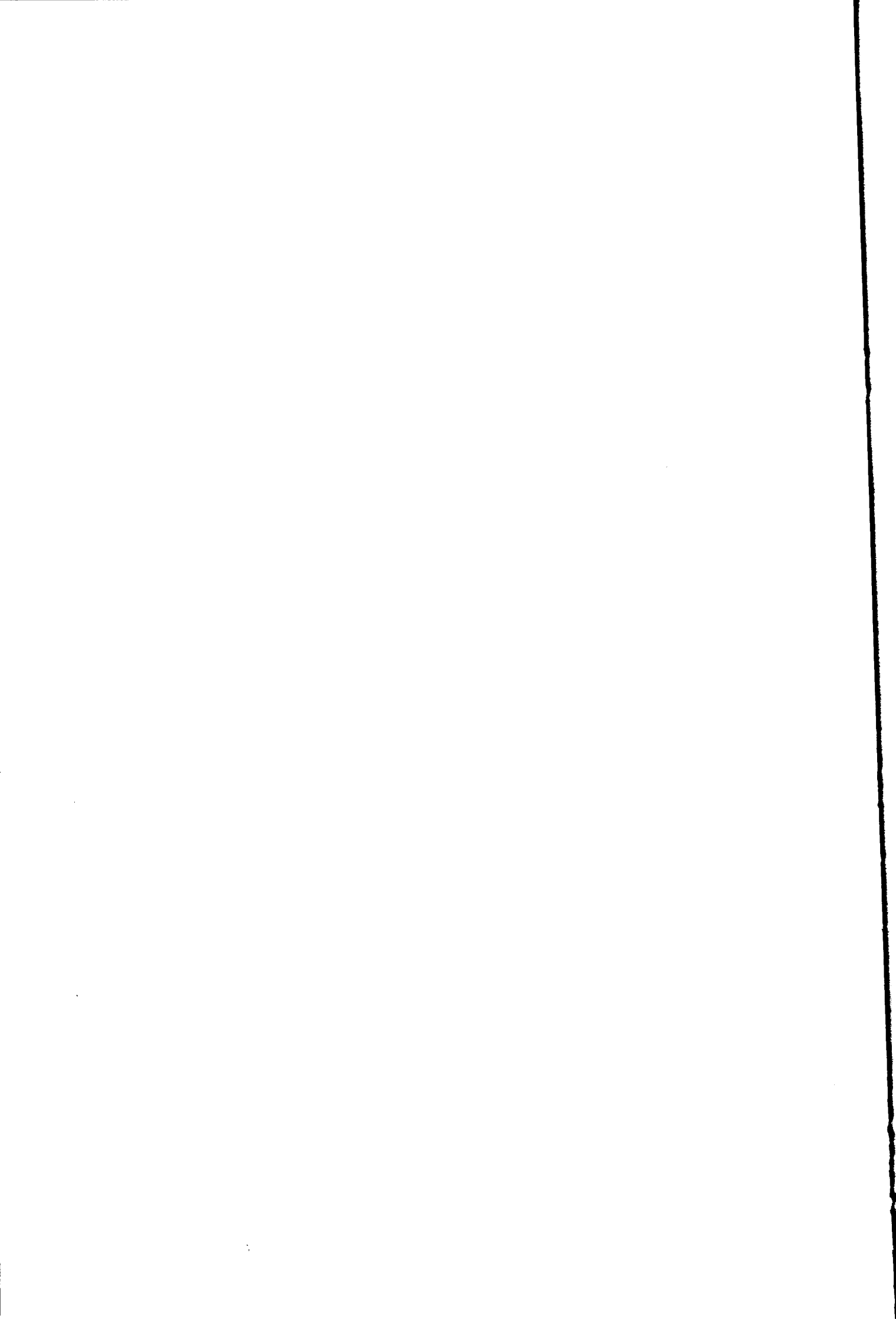
1. Introduction

Combining different pharmacophoric moieties from different bioactive compounds to generate a new hybrid compound showing better affinity and efficacy, with fewer undesired side effects, than the parent compounds becomes a new concept in drug design and development, which is known as molecular hybridization [1]. An example of such hybridization is a compound constructed from coumarin and chalcones. Coumarins are secondary metabolites possessing a benzopyran ring that can also be found as synthetic products and are already known for their various pharmacological activities such as antimycobacterial [2], inhibitor of HIV-1 [3], inhibitor of platelet aggregation, and to smooth muscle contraction in vitro [4]. Meanwhile, chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones) belong to the group of flavonoids, which can be obtained from a plant origin and from synthesis. The bioactivities of chalcones are well known, such as cytotoxic agents against tumor cells [5], along with being antimalarial [6,7], antibacterial [8,9], and anticancer [10]. The pharmacological activities of coumarin–chalcone derivatives containing urea moiety as an anticancer agent has also been reported [11].

Based on this consideration, we designed a coumarin–chalcone hybrid compound containing morpholino-phenyl moiety and synthesized it successfully through a Claisen–Schmidt reaction. Furthermore, the prepared compound was evaluated in relation to its anticancer activity against breast cancer cell line T47D and cervix cancer cell line HeLa using an MTT assay.

2. Results and Discussion

The title compound 5 was prepared using a two-step reaction. The first step was the synthesis of 3-acetylcoumarin 3 from the reaction of 2-hydroxybenzaldehyde 1 with ethyl acetoacetate 2. Compounds of the ketocoumarin type are usually synthesized from salicylaldehyde using a cyclic



secondary amine piperidine [12]. However, in our experiment, we used triethyl amine, a tertiary amine, as a catalyst.

Compound 3 was then reacted with 4-morpholinobenzaldehyde 4 to furnish the target molecule 5 employing a Claisen–Schmidt reaction. First, we conducted the synthesis of compound 5 using a solution of KOH 40% as a catalyst as is generally used for aldol condensation. However, we did not get the desired product. We assumed that KOH solution hydrolyzed the 3-acetylcoumarin. Then we decided to use *p*-toluenesulfonic acid (*p*TSA) as a catalyst, and the reaction proceeded to give the desired product. The reaction process is displayed in Figure 1.

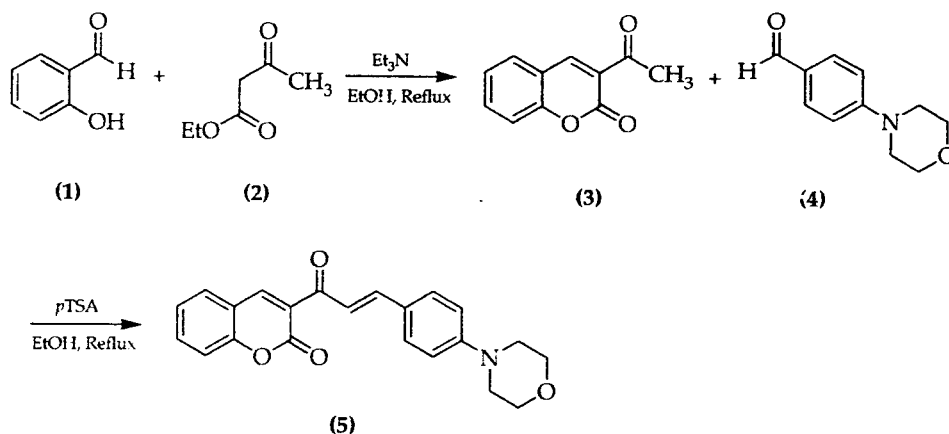
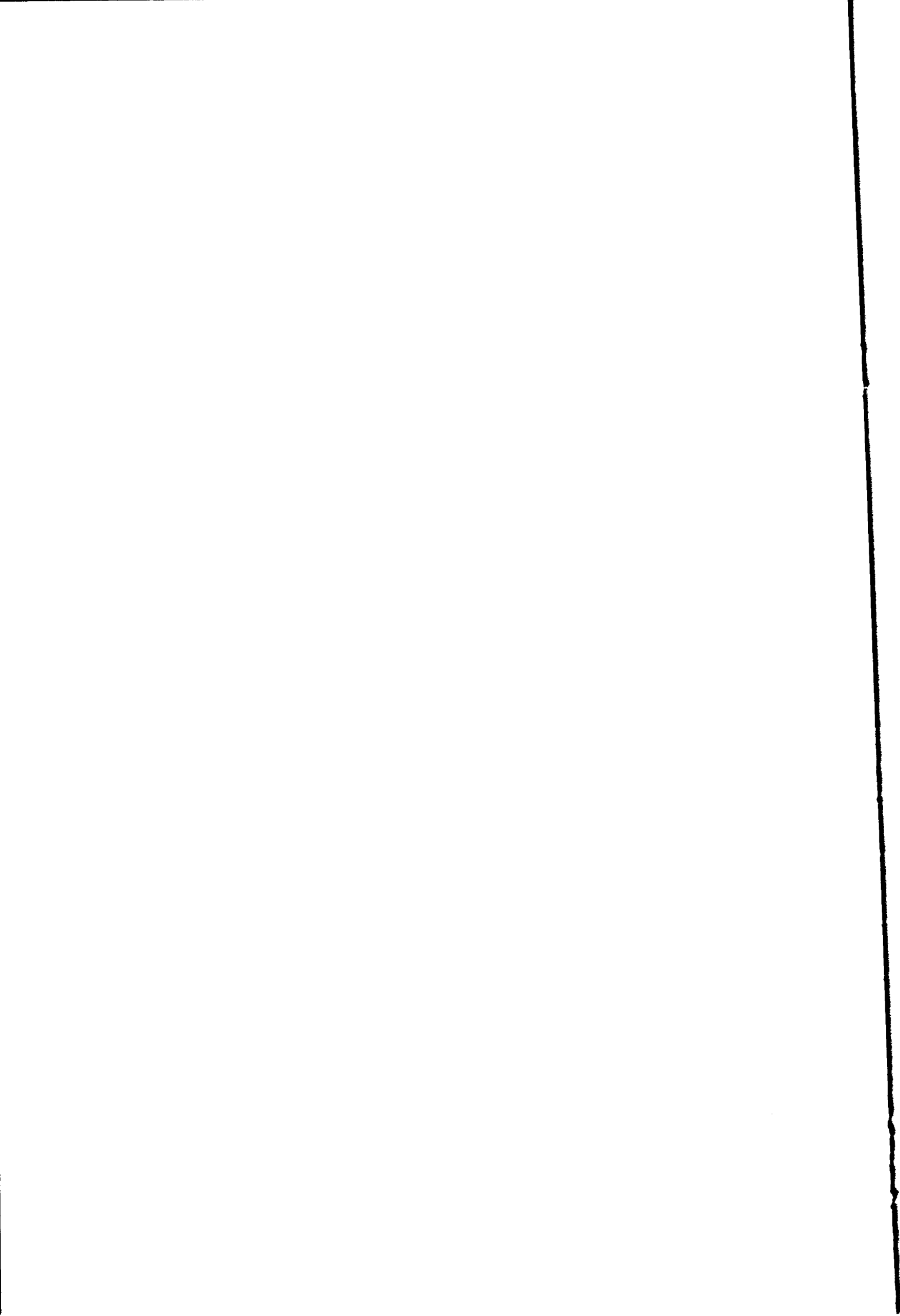


Figure 1. Synthesis pathway of the target molecule.

(*E*)-3-[3-(4-Morpholinophenyl)acryloyl]-2*H*-chromen-2-one: red needle crystal (0.88 g, 24%), R_f 0.58 (*n*-hexane:ethyl acetate 3:2), HRMS(ESI) $[M + Na]^+$ for $C_{22}H_{19}NO_4$ $m/z = 384.1212$ (calculated) and 384.1215 (observed); IR (DRS, KBr, cm^{-1}): 3094 (C–H aromatic), 2855 (C–H aliphatic), 1724 (C=O ketone), 1605 (C=C conjugated), 1572 (C=C aromatic), 1171 (C–O ether). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H 8.57 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.66 (m, 2H), 7.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.86 (t, $J = 5.3$ Hz, 4H), 3.28 (t, $J = 5.3$ Hz, 4H). ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ_C 186.3 (C), 159.6 (C), 155.3 (C), 153.0 (C), 147.8 (CH), 145.6 (CH), 134.1 (CH), 130.9 (CH), 130.1 (CH), 125.9 (C), 125.8 (C), 125.0 (CH), 120.6 (CH), 118.8 (C), 116.8 (CH), 114.6 (CH), 66.7 (CH_2), 48.0 (CH_2).

This paper discusses only the title compound 5 because compound 3 is already known. The spectroscopy data of compound 3 are presented in Supplementary Materials (Figures S1–S4). The HRMS spectrum of the title compound showed a positive molecular ion of $[M + Na]^+$ at $m/z = 384.1215$, suitable for a molecular formula of $C_{22}H_{19}NO_4$, which corresponded to 14 equivalent double bonds of (Supplementary Materials Figure S6). Analysis of the FTIR spectrum showed a stretching vibration band of a C–H aromatic bond at ν_{max} (cm^{-1}) 3094, and followed subsequently with a stretching vibration band of a C–H aliphatic bond at 2855, vibration band of ketone group at 1724, vibration band of conjugated alkene at 1605, vibration band of C–C aromatic bond at 1572, and stretching vibration band of C–O ether group at 1171 cm^{-1} (Supplementary Materials Figure S5).

From the 1H -NMR spectrum, the existence of a coumarin fragment substituted at position 3 was shown via four signals, those were three signals of aromatic protons at 7.66, 7.39, and 7.34 ppm and a signal of a conjugated olefinic proton at 8.57 ppm. The presence of a chalcone scaffold with *E* geometry was proved via two coupled ($J = 15.6$ Hz) olefinic proton signals at 7.85 and 7.79 ppm. Furthermore, a para disubstituted benzene fragment was shown via two coupled ($J = 8.9$ Hz) aromatic signals at 7.61 ppm and 6.89 ppm. The existence of a morpholine fragment was proved by two triplet signals at 3.86 and 3.28 ppm with the integration of four for each signal representing two symmetrical ethylene fragment (Supplementary Materials Figure S7a,b). The spectrum of ^{13}C -NMR



exhibited 18 signals indicating that the molecular structure consisted of 8 symmetrical carbon atoms (Supplementary Materials Figure S8), whereas the correlation of the proton atoms with carbon atoms were assigned using the 2-D NMR experiment of Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) (Supplementary Materials Figure S10) and Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (HMQC) (Supplementary Materials Figure S9) as shown in Table 1 and Figure 2 below.

Table 1. NMR data of the title compound in CDCl₃.

No. Atom	δ_H (ppm) (mult, J Hz)	δ_C (ppm)	HMBC
2		159.6	
3		125.8	
4	8.57 (s, 1H)	147.8	C-2, C-3, C-4a, C-5, C-8a, C-9
4a		118.8	
5	7.66 (m, 2H) overlapped with H-7	130.1	
6	7.34 (t, J = 7.6 Hz, 1H)	125.0	C-4a, C-8
7	7.66 (m, 2H) overlapped with H-5	134.1	
8	7.39 (d, J = 8.3 Hz, 1H)	116.8	C-4a, C-6
8a		155.3	
9		186.3	
10	7.79 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	120.6	C-3, C-9, C-12
11	7.85 (d, J = 15.6 Hz, 1H)	145.6	C-9, C-10, C-12, C-13, C-17
12		125.9	
13, 17	7.61 (d, J = 8.9 Hz, 2H)	130.9	C-11, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17
14, 16	6.89 (d, J = 8.9 Hz, 2H)	114.6	C-12, C-13, C-14, C-16, C-17
2', 6'	3.86 (t, J = 5.3 Hz, 4H)	48.0	C-2', C-3', C-5', C-6'
3', 5'	3.28 (t, J = 5.3 Hz, 4H)	66.7	C-2', C-3', C-5', C-6'

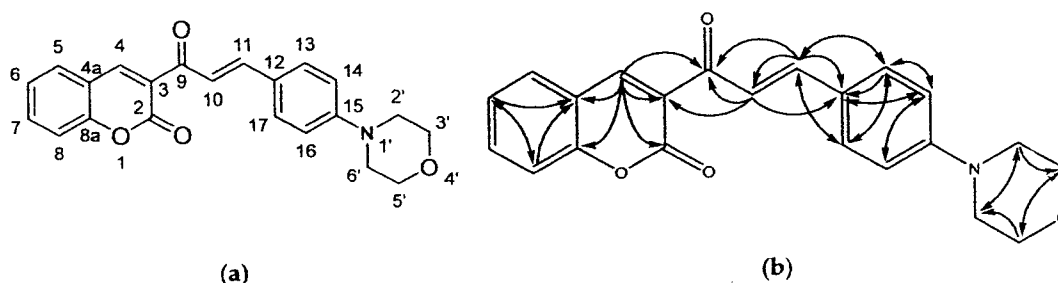


Figure 2. (a) Structure numbering, and (b) HMBC correlation of the title compound.

The anticancer activity of the prepared compound against cervix cancer cells line HeLa and breast cancer cells line T47D was determined using an MTT assay, and revealed an IC₅₀ of 0.90 μ M for breast cancer cells line T47D and of 2.32 μ M for cervix cancer cell HeLa, and it can be considered as not active as an anticancer compound (Supplementary Materials Table S1).

3. Materials and Methods

3.1. General

All reagents and solvents were provided from the commercial sources (E.Merck, Darmstadt, Germany or Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and used without prior purification. The reaction progress was monitored via a Thin Layer Chromatography (TLC) experiment using an aluminium silica gel plate GF₂₅₄ (0.25 mm) employing different solvents. The TLC spot was detected using UV light ($\lambda = 254$ nm). The FTIR spectrum was recorded on a IRTracer100 spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a diffuse reflectance method), whereas the mass spectrum was recorded on a HRESIMS QTOF micrOTOF-Q II Bruker Compass (Billerica, MA, USA). The NMR spectrum (¹H-, and ¹³C-APT)

was recorded on a JEOL JNM-ECS400 spectrometer (at 400 and 100 MHz) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) with CDCl_3 as the solvent and internal standard.

3.2. Synthesis of 3-Acetylcoumarin 3

The mixture of 0.65 g (5 mmol) ethyl acetoacetate, 0.61 g (5 mmol) salicylaldehyde, and three drops of triethylamine in 10 mL ethanol was refluxed in a round bottom flask for 8 h. The reaction progress was monitored via TLC and was stopped when it completed. The precipitate was filtered off and recrystallized using ethanol.

3.3. Synthesis of the Title Compound 5

The mixture of 3-acetylcoumarin 3 (0.1881 g; 1 mmol), 4-morpholinobenzaldehyde 4 (1.1911 g; 1 mmol), and *p*TSA (0.034 g; 0.2 mmol) in 10 mL ethanol was refluxed for 6 h. The reaction progress was monitored with TLC and stopped at completion. The precipitate was then filtered off and subjected to column chromatography for purification using *n*-hexane:ethyl acetate (3:2) as a mobile phase to furnish the pure title compound.

3.4. Evaluation of Anticancer Activity

The evaluation of the anticancer activity of the title compound was conducted using an MTT assay following the protocol of Tabata et al. [13]. The cancer cells were seeded in a 96-well plate at a density of 1×10^4 cells/well with a phenol red-free RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 medium (containing 10% FBS (fetal bovine serum)) and maintained for 24 h. Subsequently, the tested compound (various concentrations) was applied for 24 h. After addition of 0.5% MTT solution, the incubation was continued for a further 4 h at 37 °C/5% CO_2 . The stop solution (0.04 N HCl in isopropanol) was added to the culture medium to each well. Then, the absorbance at 570 nm (peak) and 630 nm (bottom) was measured using an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) reader. It was conducted in triplicate. Doxorubicin was used as a positive control. The value of IC_{50} was determined using a probit analysis (SPSS 17, IBM Analytics, New York, NY, USA).

4. Conclusions

We have successfully synthesized a new compound (*E*)-3-[3-(4-morpholinophenyl)acryloyl]-2H-chromen-2-one through a Claisen–Schmidt reaction using a molecular hybridization method between 3-acetylcoumarin, 4-morpholinobenzaldehyde, and *p*TSA as a catalyst.

Supplementary Materials: The following are available online, FTIR, HRESI-MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT) spectra, and anticancer evaluation of the title compound are reported in the Supplementary Materials as Figures S1–S10 and Table S1.

Author Contributions: H.S. brought the idea, managed the research, and wrote the paper. H.D.H. performed the synthesis, K.U.H. and A.N.K. analyzed the whole spectra, while M.K. conducted the anticancer test. All the authors have read the draft.

Funding: The research is funded by the Ministry of Research, Technology and Higher Education of The Republic of Indonesia through Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi 2018 Research Grant.

Acknowledgments: The authors acknowledge Ministry of Research, Technology and Higher Education of The Republic of Indonesia for the research funding. Furthermore, the authors acknowledge Preecha Phuwapraisirisan from the Department of Chemistry, Chulalongkorn University and Rico Ramadhan from the Department of Chemistry, Airlangga University for the high resolution mass spectroscopy measurement.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Molecular hybridization: A useful tool in the Design of New Drug Prototypes. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829–1852. [CrossRef] [PubMed]

2. Appendino, G.; Mercalli, E.; Fuzzati, N.; Arnoldi, L.; Stavri, M.; Gibbons, S.; Ballero, M.; Maxia, A. Antimycobacterial Coumarins from the Sardinian Giant Fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2108–2110. [CrossRef] [PubMed]
3. Ma, T.; Liu, L.; Xue, H.; Li, L.; Han, C.; Wang, L.; Chen, Z.; Liu, G. Chemical Library and Structure-Activity Relationships of 11-Demethyl-12 oxo Calanolide A Analogues as Anti-HIV-1 Agents. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1432–1446. [CrossRef] [PubMed]
4. Hoult, J.R.S.; Paya, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 713–722. [CrossRef]
5. Go, M.L.; Wu, X.; Liu, X.L. Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 483–499. [CrossRef]
6. Liu, M.; Wilairat, P.; Go, M.-L. Antimalarial Alkoxyated and Hydroxylated Chalcones: Structure-Activity Relationship Analysis. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4443–4452. [CrossRef] [PubMed]
7. Suwito, H.; Jumina, M.; Pudjiastuti, P.; Fanani, M.Z.; Kimata-Arigo, Y.; Katahira, R.; Kawakami, T.; Fujiwara, T.; Hase, Y.; Mohd Sirat, H.; et al. Design and Synthesis of Chalcone derivatives as Inhibitors of the Ferredoxin-Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Interaction of *Plasmodium falciparum*: Pursuing New Antimalarial Agents. *Molecules* **2014**, *19*, 21473–21288. [CrossRef] [PubMed]
8. Nielsen, S.F.; Boesen, T.; Larsen, M.; Kristian, S.; Kromann, H. Antibacterial Chalcones—Bioisosteric Replacement of the 4'-hydroxy Group. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3047–3054. [CrossRef] [PubMed]
9. Suwito, H.; Krsitanti, A.N.; Hayati, S.; Dewi, S.R.; Amalina, I.; Puspaningsih, N.N.T. Antimicrobial Activities and In silico Analysis of Methoxy Amino Chalcone Derivatives. *Procedia Chem.* **2016**, *18*, 103–111. [CrossRef]
10. Su, Y.-K.; Huang, W.-C.; Lee, W.-H.; Bamodu, O.A.; Zucha, M.A.; Astuti, I.; Suwito, H.; Yeh, C.-T.; Lin, C.-M. Methoxyphenyl Chalcone Sensitizes Aggressive epithelial Cancer to Cisplatin Through Apoptosis Induction and Cancer Stem Cell eradication. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
11. Kurt, B.Z.; Kandas, N.O.; Dag, A.; Sonmez, F.; Kucukislamoglu, M. Synthesis and biological evaluation of novel coumarine-chalcone derivatives containing urea moiety as potential anticancer agents. *Arab. J. Chem.* **2017**. [CrossRef]
12. Rowatt, B.; Herlihy, S.; Davidson, R. Ketocoumarins as Photoinitiators and Photosensitizers in Inks. Eur. Pat. Appl. EP2870147A1, 27 July 2012. Available online: <https://patents.google.com/patent/EP2870147A1> (accessed on 23 October 2018).
13. Tabata, K.; Motani, K.; Takayanagi, N.; Nishimura, R.; Asami, S.; Kimura, Y.; Ukiya, M.; Hasegawa, D.; Akihisa, T.; Suzuki, T. 4-Hydroxyderricin from *Angelica keiskei* Roots Induces Caspase-dependent Apoptotic Cell Death in HL60 Human Leukemia Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1404–1407. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

