



UNIVERSITAS INDONESIA

**DESAIN SENYAWA PENGHAMBAT ER- α ANALOG KURKUMIN
TETRAHIDROINDAZOL, SINTESIS, DAN UJI SITOTOKSIK
TERHADAP BEBERAPA SEL KANKER**

DISERTASI

**HARIYANTI
1606861901**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM PASCASARJANA
DEPOK
2021**



UNIVERSITAS INDONESIA

**DESAIN SENYAWA PENGHAMBAT ER- α ANALOG KURKUMIN
TETRAHIDROINDAZOL, SINTESIS, DAN UJI SITOTOKSIK
TERHADAP BEBERAPA SEL KANKER**

DISERTASI

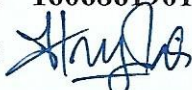
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor Ilmu Farmasi

**HARIYANTI
1606861901**

**FAKULTAS FARMASI
PROGRAM DOKTOR ILMU FARMASI
DEPOK
MEI 2021**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**








Nama : Hariyanti
NPM : 1606861901
Tanda Tangan : 
Tanggal : 24 Mei 2021

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :
Nama : Hariyanti
NPM : 1606861901
Program Studi : Doktor Ilmu Farmasi
Judul Disertasi : Desain senyawa penghambat ER- α Analog Kurkumin
TetrahydroIndazol, Sintesis, dan Uji Sitotoksik Terhadap
Beberapa Sel Kanker

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Promotor	: Prof. Dr. apt. Hayun, M.Si.	()
Kopromotor	: Prof. Dr. apt. Arry yanuar, M.Si.	()
	: Dr. Kusmardi, M.Si.	()
Tim Penguji	: Prof. Dr. Sumi Hudiyono (Ketua)	()
	: Dr. apt. Fadlina Chany Saputri M.Si. (Anggota)	()
	: Dr. Ade Arsianti, M.Si. (Anggota)	()
	: Prof. Dr. apt. Siswandono, M.S. (Anggota)	()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 24 Mei 2021

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga naskah disertasi dapat diselesaikan. Penulisan disertasi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Penulis menyadari tanpa adanya bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak, disertasi ini tidak dapat selesai dengan baik dan tepat pada waktunya. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan rasa hormat kepada:

- (1) Bapak Prof. Dr. apt. Hayun, M.Si. selaku Promotor, Prof. Dr. apt. Arry Yanuar, M.Si., dan Dr. Kusmardi, M.Si. selaku Kopromotor yang telah banyak menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan, membimbing, serta memotivasi saya dalam penelitian dan penulisan disertasi ini;
- (2) Prof. Dr. Sumi Hudiyono, Dr. apt. Fadlina Chany Saputri M.Si., Dr. Ade Arsianti, M.Si., dan Prof. Dr. apt. Siswandono, M.S., selaku penguji yang telah memberikan banyak koreksi, masukan, dan saran yang sangat berharga;
- (3) Kementerian Riset dan Teknologi, Direktorat Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan beasiswa Pendidikan Program Doktor;
- (4) Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia (Dr. Mahdi Jufri, M.Si, Apt) dan Ketua Prodi Pasca Sarjana Ilmu Farmasi UI;
- (5) Ketua Program Studi Pasca Sarjana Ilmu Farmasi Universitas Indonesia Dr. apt. Sutriyo, M.Si. beserta jajarannya atas dukungan dan kerjasamanya;
- (6) Staf pengajar Program Doktor Ilmu Farmasi Universitas Indonesia atas segala ilmu, arahan, dan dukungan yang diberikan;
- (7) Prof. Dr. Gunawan Suryoputro, M.Hum., selaku Rektor Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA (UHAMKA) serta wakil Rektor yang telah mendorong dan memberikan izin untuk melanjutkan studi S3 serta memberikan arahan, bantuan material dan motivasi selama saya menempuh studi;
- (8) Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si., sebagai Dekan Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA (FFS UHAMKA) serta Wakil Dekan FFS UHAMKA yang telah memberikan dukungan dana, kesempatan, dan fasilitas selama saya menempuh studi;

- (9) Mbak Fairuz Nurul Fithri, mbak Lia Indriana, dan Bapak Agus Rahman selaku Staf Laboratorium Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal FFUI atas bantuan dan kebersamaannya;
- (10) Teman-teman tim Penguji Pusat Penelitian Kimia LIPI, Serpong: mbak Sofa, mbak Dini, mbak Mega, dan pak Ahmad atas bantuan dan kerjasamanya yang telah memfasilitasi penggunaan alat NMR dan LC-MS;
- (11) Tim Penguji Laboratoria Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB) LAPTIAB BPPT, Serpong yang telah memfasilitasi pengujian sitotoksik;
- (12) Sahabat yang telah banyak memberikan bantuan dan motivasi dalam menyelesaikan disertasi: Dr. Azminah, Teman-teman seperjuangan perkuliahan doktor S3 FFUI: Dr. Yesi, Dr. Rini, dan para kandidat doktor ibu Fauziyah, Ibu Kori Yati, Ibu Elly, Ibu Dwity, dan Ibu Okpri atas semangat, kebersamaan dan dukungan moril;
- (13) Teman-teman seperjuangan grup curcumawati: Wiji, Titah, Rahmah, dan Intan atas bantuan, semangat, kebersamaan dan dukungan moril;
- (14) Keluarga tercinta, Nurman Irawan, SE, MM., Ak. serta anak-anakku Rizki Qanita, Ahmad Fadhilah, dan Almira Khairunnisa yang selalu menjadi penyejuk hati qurota'ayun dan memberikan dukungan moril, materil, pengertian, kesabaran, doa serta kasih sayang yang tak terhingga;
- (15) Rekan sejawat dosen di FFS UHAMKA yang telah memberikan dukungan, motivasi, doa, pengertian dan kerjasamanya selama saya menempuh studi;
Semua pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungan, doa, dan bantuan kepada penulis selama masa perkuliahan maupun selama penelitian berlangsung.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan seminar hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima segala kritik dan saran demi evaluasi dan perbaikan di masa yang akan datang. Semoga naskah ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan farmasi pada khususnya.

Depok, 24 Mei 2021

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hariyanti
NPM : 1606861901
Program Studi : Doktor Ilmu Farmasi
Fakultas : Farmasi
Jenis karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul : **Desain senyawa penghambat ER- α Analog Kurkumin TetrahidroIndazol, Sintesis, dan Uji Sitotoksik Terhadap Beberapa Sel Kanker** beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 24 Mei 2021

Yang menyatakan



(Hariyanti)

ABSTRAK

Nama : Hariyanti
Program Studi : Doktor Ilmu Farmasi
Judul Disertasi : Desain senyawa penghambat ER- α Analog Kurkumin TetrahidroIndazol, Sintesis, dan Uji Sitotoksik Terhadap Beberapa Sel Kanker
Pembimbing : Prof. Dr. apt. Hayun, M.Si., Prof. Dr. apt. Arry Yanuar, M.Si. dan Dr. Kusmardi, M.Si.

Analog Kurkumin Indazol (AKI) merupakan senyawa analog yang berpotensi dikembangkan sebagai antikanker. Pengembangan analog kurkumin maupun struktur indazol merupakan struktur yang mempunyai potensi baik terhadap aktivitas antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh senyawa baru analog kurkumin tetrahidroindazol yang mempunyai aktivitas penghambatan antikanker yang selektif. Penelitian diawali dengan melakukan desain senyawa analog kurkumin tetrahidroindazol secara *in silico*. Hasil skrining *in silico* 186 senyawa desain didasarkan pada penapisan model farmakofor dengan *cut off* 3 fitur kimia dan terpilih 14 senyawa, kemudian dilanjutkan dengan penambatan molekular yang menghasilkan 10 senyawa hit. Berdasarkan acuan 10 senyawa tersebut, dilakukan sintesis dengan reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dan dihasilkan 6 senyawa agak berbeda dari senyawa hit yaitu senyawa 3-(4-metoksifenil)-7-(3-metoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10A), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3-metoksi, 4-hidroksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10B), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3-metoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10C), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3,4-dimetoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10D), 1-(7-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-il)etan-1-on (10E), dan 1-(7-(4-hidroksibenziliden)-3-(4-hidroksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-il)etan-1-on (10F). Enam senyawa hasil sintesis diuji aktivitas penghambatannya secara *in vitro* terhadap sel kanker MCF-7, HeLa, WiDr dan selektivitasnya terhadap sel normal Vero. Aktivitas penghambatan terhadap MCF-7 menunjukkan nilai IC₅₀ antara 39,08-224,10 μ M, Nilai IC₅₀ senyawa 10B lebih aktif daripada senyawa penuntun, kurkumin. Aktivitas penghambatan terhadap HeLa menunjukkan nilai IC₅₀ antara 46,36-191,50 μ M, Nilai IC₅₀ senyawa 10D lebih aktif daripada senyawa penuntun, kurkumin. Aktivitas penghambatan terhadap WiDr menunjukkan nilai IC₅₀ antara 27,20-109,00 μ M, Nilai IC₅₀ senyawa 10B, 10C, 10D, 10E lebih aktif daripada senyawa penuntun, kurkumin. Nilai selektivitas terhadap sel normal Vero, beberapa senyawa hasil sintesis menunjukkan lebih selektif dibandingkan senyawa kurkumin, dan kontrol positif (tamoksifen, dan doxorubicin) dengan nilai IS >2,00 yaitu senyawa 10B pada sel kanker MCF-7, dan senyawa 10B pada sel kanker HeLa. Senyawa 10A, 10B, dan 10C lebih selektif terhadap sel kanker WiDr.

Kata Kunci: pemodelan farmakofor, analog kurkumin tetrahidro indazol, sitotoksitas, selektivitas, MCF-7, HeLa, WiDr, Vero.

ABSTRACT

Name : Hariyanti
Study Program : Doktor Ilmu Farmasi
Title : Design of ER- α inhibitor compounds, TetrahydroIndazole Analogs of Curcumin, Synthesis, and Its Cytotoxic Assay Against Some Cancer Cells
Counsellor : Prof. Dr. apt. Hayun, M.Si., Prof. Dr. apt. Arry Yanuar, M.Si. dan Dr. Kusmardi, M.S.

Indazole Analogs of Curcumin (IACs) Compound is an analog compound that has the potential to be developed as anticancer activity. Development of curcumin analogues and indazole structures are structures that have good potential for anticancer activity. This study aims to obtain a new compound curcumin analogue tetrahydro-indazole which has selective anticancer inhibitory activity. The research began with the design of the curcumin analog compound tetrahydroindazole in silico. The results of screening in silico 186 design compounds were based on a pharmacophore model with a cut off of 3 chemical features and 14 compounds were selected, then continued with molecular docking which produced 10 hit compounds. Based on the reference of these 10 compounds, the synthesis was carried out with the Claisen-Schmidt condensation reaction and produced 6 slightly different compounds from the hit compound, namely 3-(4-methoxyphenyl)-7-(3-methoxybenzylidene)-5,6,7-tetrahydro-4H-indazole (10A), 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-(3-methoxy, 4-hydroxybenzylidene)-5,6,7-tetrahydro-4H-indazole (10B), 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-7-(3-methoxybenzylidene)-5,6,7-tetrahydro-4H-indazole (10C), 3-(3,4-dimethoxybenzylidene)-5,6,7-tetrahydro-4H-indazole (10D), 1-(7-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5,6,7-hexahydro-2H-indazol-2-yl) ethan-1-one (10E), and 1-(7-(4-hydroxybenzylidene)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5,6,7-hexahydro-2H-indazol-2-yl) ethan-1-one (10F). Six compounds were tested for their inhibitory activity in vitro against cancer cells MCF-7, HeLa, WiDr and their selectivity against Vero cells. The inhibitory activity against MCF-7 showed an IC_{50} value between 39.08-224.10 μ M, the IC_{50} value of 10B compound was more active than the lead compound, curcumin. Inhibitory activity against HeLa showed IC_{50} values between 46.36-191.50 μ M, IC_{50} values for 10D compounds were more active than the lead compound, curcumin. The inhibitory activity against WiDr showed IC_{50} values between 27.20-109.00 μ M, IC_{50} values of 10B, 10C, 10D, 10E compounds were more active than the lead compound, curcumin. Selectivity values for normal Vero cells, several compounds showed more selectivity than curcumin, and positive controls (tamoxifen and doxorubicin) with an IS value > 2.00 , namely 10B compounds in MCF-7 cells, and 10B compounds in HeLa cells. The three compounds that are 10A, 10B, and 10C compounds are more selective against WiDr cells.

Keywords: Pharmacophore modelling, Tetrahydro-Indazole analog of curcumin, cytotoxicity, selectivity, MCF-7, HeLa, WiDr, Vero.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
1.6 Batasan Penelitian	6
1.7 Model Operasional Penelitian	7
1.8 Kebaruan Penelitian.....	7
2. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Kanker	9
2.1.1 Kanker Payudara.....	20
2.1.2 Kanker Serviks.....	14
2.1.3 Kanker Kolorektal	18
2.1.4 Tamoksifen	20
2.1.5 Doxorubicin	21
2.1.6 <i>Cell line</i> MCF-7	22
2.1.7 <i>Cell line</i> HeLa.....	22
2.1.8 <i>Cell line</i> WiDr.....	23
2.1.9 <i>Cell line</i> Vero.....	23
2.2 Reseptor Estrogen	24
2.3 Kurkumin dan Antikanker.....	26
2.3.1 Pengembangan senyawa kurkumin monokarbonil sebagai antikanker	28
2.3.2 Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik (AKMA), Analog Kurkumin Indazol (AKI), dan Antikanker	29
2.4 Senyawa Derivat Indazol dan Aktivitas Antikanker	31
2.5 Substitusi Basa Mannich	32
2.6 Sintesis Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik (AKMA).....	33
2.7 Sintesis Analog Kurkumin Heksahidro/Tetrahydro-Indazol (AKI)	36

2.8	CADD (<i>Computer Aided Drug Desain</i>)	37
2.8.1	SBDD (<i>Structure Based Drug Design</i>).....	38
2.8.2	LBDD (<i>Ligand Based Drug Designed</i>)	39
2.9	Pemodelan Farmakofor.....	40
2.9.1	<i>Ligand Based Pharmacophore</i>	41
2.9.2	<i>Structure Based Pharmacophore</i>	41
2.10	Validasi berdasarkan nilai RMSD	42
2.11	Isolasi dan Pemurnian.....	42
2.12	Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis.....	43
2.12.1	Kromatografi Lapis Tipis	43
2.12.2	Titik Lebur	44
2.12.3	Spektroskopi Infra Merah	44
2.12.4	Spektroskopi Massa	46
2.12.5	Spektroskopi Resonansi Magnet Inti	47
2.13	Uji Sitotoksitas.....	50
2.13.1	MTT Assay.....	51
2.13.2	Indeks Selektivitas (IS).....	52
2.14	Kerangka Teori.....	53
2.15	Kerangka Konsep	54
3.	METODOLOGI PENELITIAN.....	55
3.1.	Rancangan Alur Penelitian	55
3.2.	Tempat Penelitian	55
3.3.	Alat	56
3.4.	Bahan.....	57
3.5.	Cara Kerja.....	57
3.5.1.	Perancangan senyawa AKMA dan AKI.....	57
3.5.2.	Farmakofor 3D	62
3.5.3.	Jalur Sintesis Senyawa Target	67
3.5.4.	Uji Sitotoksitas dengan MTT.....	67
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	71
4.1	Rancangan Senyawa AKMA dan AKI	71
4.2	Pemodelan Farmakofor.....	73
4.3	Penapisan Virtual 186 Senyawa AKMA dan AKI dengan model terpilih	76
4.4	Penambatan Molekul senyawa AKI terpilih dengan Autodock4.2 terintegrasi LigandScout 4.2	77
4.5	Visualisasi Hasil Penambatan Molekul senyawa AKI Terpilih pada Reseptor 1SJ0	80
4.6	Analisis Prediksi ADMET, Kelarutan, Profil Farmakokinetika, dan Nilai <i>Synthetic Accessibility</i> (SA)	87
4.7	Sintesis Senyawa AKI	90
4.7.1	Sintesis AKI Jalur 1	90
4.7.2	Sintesis AKI Jalur 2	94
4.7.3	Sintesis AKI Jalur 3	111
4.8	Konfirmasi aktivitas senyawa hasil sintesis secara <i>in silico</i>	121
4.8.1	Validasi dengan Metode <i>Redocking</i>	121

4.8.2	Penambatan Molekuler senyawa hasil sintesis, Kurkumin, Tamoksifen, dan Doxorubicin	122
4.8.3	Visualisasi Hasil Penambatan Molekuler senyawa hasil sintesis, Kurkumin, Tamoksifen, dan Doxorubicin	123
4.8.4	Analisis Prediksi ADMET, Kelarutan, dan Profil Farmakokinetika dan Drug-likeness	127
4.9	Uji Sitotoksisitas dengan MTT	132
4.10	Perbandingan nilai IC_{50} dengan nilai ΔG	138
4.11	Nilai Indeks Selektivitas	140
5	KESIMPULAN DAN SARAN	143
5.1	Kesimpulan.....	143
5.2	Saran	143
	DAFTAR REFERENSI.....	145
	LAMPIRAN	159

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Kode PDB dari Reseptor Estrogen α (RE- α)	56
Tabel 3.2	Definisi fitur farmakofor pada Aplikasi Ligandscout	60
Tabel 4.1	Jenis fitur-fitur farmakofor dan nilai farmakofor fit pada 17 senyawa training set dengan program LigandScout 4.2. Warna merah sebagai HBA, warna kuning sebagai interaksi hidrofobik dan warna ungu sebagai cincin aromatik.....	73
Tabel 4.2	Hasil Validasi ROC Validasi Retrospektif senyawa inhibitor Reseptor Estrogen α (383 senyawa aktif, 20674 decoys, and 21057 total senyawa) dengan program Ligandscout 4.2	74
Tabel 4.3	Nilai Sensitifitas, Spesifitas dan Akurasi 3 model terpilih	74
Tabel 4.4	Hasil Skrining 186 senyawa AKMA dan AKIA Farmakofor dengan model 2.....	77
Tabel 4.5	Nilai ΔG dan jumlah clusternya pada 14 senyawa terpilih terhadap reseptor estrogen α (PDB: 1SJ0) dengan pelaksanaan <i>running Genetic Algoritma</i> (GA) sebanyak 100 kali	80
Tabel 4.6	Hasil Visualisasi 2D dan 3D lima senyawa terpilih, Kurkumin, 4-OH-tamoksifen, dan Tamoksifen pada reseptor 1SJ0	81
Tabel 4.7	Kontak residu 10 senyawa terpilih, Kurkumin, 4-OH-tamoksifen, dan Tamoksifen.....	84
Tabel 4.8	Visualisasi 2D dan 3D Jarak fitur kimia dengan pola segitiga	85
Tabel 4.9	Jarak antar fitur farmakofor pada senyawa terpilih	86
Tabel 4.10	Perbandingan nilai Rf senyawa hasil sintesis tahap 1 jalur 1 (3A – 3E) dengan senyawa pembanding.....	91
Tabel 4.11	Perbandingan nilai Rf senyawa hasil sintesis tahap 2 jalur 1	92
Tabel 4.12	Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 1 Jalur 2.	95
Tabel 4.13	Data Hasil FTIR senyawa 3 dari tahap 1 jalur 2	96
Tabel 4.14	Data Hasil $^1\text{H-NMR}$ senyawa 3 dari tahap 1 jalur 2	97
Tabel 4.15	Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Tahap 2 jalur 2.....	100
Tabel 4.16	Data Hasil FTIR senyawa 3 dari tahap 2 jalur 2	100
Tabel 4.17	Rendemen dan Karakteristik Produk Tahap 3 Jalur 2.....	102
Tabel 4.18	Data Hasil FTIR Produk Tahap 3 Jalur 2.....	102
Tabel 4.19	Data Hasil $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Produk Tahap 3 Jalur 2.....	109

Tabel 4.20	Hasil HRMS Produk Tahap 3 Jalur 2.....	110
Tabel 4.21	Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 2 Jalur 3113	
Tabel 4.22	Data Hasil FTIR Produk Tahap 2 Jalur 3.....	114
Tabel 4.23	Data Hasil ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Produk Tahap 2 Jalur 3 (10E & 10F)	116
Tabel 4.24	Hasil HRMS Produk Tahap 2 Jalur 3.....	121
Tabel 4.25	Nilai ΔG dan jumlah <i>cluster</i> -nya pada 6 senyawa AKI terhadap reseptor estrogen α (PDB: 1SJ0) dengan pelaksanaan <i>running Genetic Algoritma</i> (GA) sebanyak 100 kali	123
Tabel 4.26	Hasil Visualisasi 2D dan 3D 10A-10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada reseptor 1SJ0	124
Tabel 4.27	Kontak residu senyawa 10A-10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin	126
Tabel 4.28	Hasil Prediksi rediksi ADMET, Solubilitas, Profil Farmakokinetik, dan <i>Drug-Likeness</i> senyawa 10A - 10F, kurkumin, Tamoksifen, dan Doxorubicin	130
Tabel 4.29	Nilai IC ₅₀ senyawa 10A - 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero.	135
Tabel 4.30	Perbandingan nilai IC ₅₀ (10 ² μ M) dan ΔG PDB 1SJ0 (kkal/mol) senyawa 10A - 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero.....	139
Tabel 4.31	Nilai IS senyawa 10A -10F, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel Vero.....	141

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Jalur persinyalan pada pembentukkan sel kanker payudara.....	12
Gambar 2.2	Dampak onkogen E6 dan E7 dalam pensinyalan Wnt	16
Gambar 2.3	Mekanisme hubungan pensinyalan terkait estrogen dan kanker dengan HPV positif	17
Gambar 2.4	Jalur persinyalan pada pembentukkan sel kanker Kolorektal	19
Gambar 2.5	Mekanisme Kerja Doxorubicin	23
Gambar 2.6	Struktur Kurkumin di Alam.....	27
Gambar 2.7	Struktur Senyawa Gamavuton-0 (GVT-0)	28
Gambar 2.8	Analog Kurkumin Monokarbonil Tersubstitusi Basa Mannich .	29
Gambar 2.9	Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik. $R \neq R'$	30
Gambar 2.10	Sintesis Analog Kurkumin Heksahidro-2H-Indazol (AKI) simetrik	31
Gambar 2.11	Mekanisme Reaksi Mannich.	32
Gambar 2.12	Sintesis AKMA	33
Gambar 2.13	Kondensasi Claisen-Schmidt antara Aseton dengan Benzaldehid Tanpa Pelarut dengan Katalis Padatan NaOH.....	34
Gambar 2.14	Mekanisme Reaksi Kondensasi Claisen-Schmidt dalam Suasana Basa	35
Gambar 2.15	Mekanisme reaksi pembuatan senyawa AKMA	35
Gambar 2.16	Mekanisme reaksi kondensasi tahap 1	35
Gambar 2.17	Struktur 7-(benziliden tersubstitusi)-3-(phenyl tersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3, 3a,4,5, 6, 7hexahidro-2H-indazol	36
Gambar 2.18	Skema reaksi kondensasi gugus keton dengan senyawa nukleofil nitrogen.....	37
Gambar 2.19	Skema reaksi sikloadisi 1,3-dipolar dengan azomethine imina..	37
Gambar 2.20	Tabel Sederhana Data IR Beberapa Gugus Fungsi yang Umum	45
Gambar 2.21	Nilai Geseran Kimia ^1H Pada Spektroskopi NMR Proton	48
Gambar 2.22	Nilai Geseran Kimia ^{13}C Pada Spektroskopi NMR Karbon.....	48
Gambar 2.23	Spektrum HMQC senyawa Kuinidin dalam CDCl_3 (500 MHz)	49
Gambar 2.24	Spektrum HMBC senyawa Kuinidin dalam CDCl_3 (500 MHz).	50
Gambar 2.25	Konversi MTT menjadi Formazan	51

Gambar 4.1	Fitur model farmakofor dan jarak antar fitur dengan program LigandScout 4.2.....	73
Gambar 4.2	Model farmakofor 2D (A) dan 3D (B) pada E4D600 dengan program LigandScout 4.2	73
Gambar 4.3	Kurva ROC Model 2	76
Gambar 4.4	Fitur farmakofor antara senyawa ligan nativ E4D600 dengan ER α yang berasal dari struktur turunan sinar-X (kode PDB: 1SJ0)...	78
Gambar 4.5	Visualisasi struktur 2D menggambarkan kantong hidrofobik berupa interaksi ikatan hidrofobik ligan nativ E4D600 dengan residu pada reseptor. Interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen donor dan akseptor digambarkan masing-masing sebagai bola kuning, panah hijau dan merah.....	78
Gambar 4.6	Visualisasi Superpose ligan ko-kristal (biru) dengan Ligan <i>Copy</i> Menggunakan Autodock 4.2 terintegrasi dengan Ligandscout .	79
Gambar 4.7	Visualisasi Superpose pada struktur 2D antara ligan ko-kristal (biru) pada sebelah kiri dengan Ligan <i>Copy</i> sbelah kanan.....	79
Gambar 4.8	Usulan mekanisme reaksi kondensasi aldol tahap 1 jalur 1..	92
Gambar 4.9	Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 1...	91
Gambar 4.10	Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 2,...	101
Gambar 4.11	Usulan mekanisme reaksi tahap 3 jalur 2 (10A-10D)....	110
Gambar 4.12	Usulan skema pembentukan senyawa AKI simestris dan asimetris.....	111
Gambar 4.13	Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 3, senyawa 10E-0F .. .	113
Gambar 4.14	Analisa Korelasi H dan C Hasil HMQC Senyawa 10E.....	117
Gambar 4.15	Analisa Korelasi H dan C Hasil HMBC Senyawa 10E.....	118
Gambar 4.16	Analisa Korelasi H dan C Hasil HMQC Senyawa 10F.....	119
Gambar 4.17	Analisa Korelasi H dan C Hasil HMBC Senyawa 10F..	120
Gambar 4.18	Visualisasi Superpose ligan ko-kristal (biru) dengan Ligan <i>Copy</i> Menggunakan Autodock 4.2 terintegrasi dengan LigandScout 4.4..	122
Gambar 4.19	Visualisasi Superpose pada struktur 2D antara ligan ko-kristal (biru) pada sebelah kiri dengan Ligan <i>Copy</i> sbelah kanan.....	122
Gambar 4.20	Grafik Nilai IC ₅₀ (μ M) Senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero..	134

Gambar 4.22	Grafik perbandingan nilai IC_{50} dan ΔG PDB 1SJ0 senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero.....	140
Gambar 4.23	Grafik Nilai IS Senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, dan WiDr terhadap sel Vero	142

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja Lengkap Penelitian	159
Lampiran 2 Rancangan desain struktur dan sintesis senyawa	160
Lampiran 3 Desain senyawa AKMA dan AKI	161
Lampiran 4 Data set inhibitor Reseptor Estrogen α (RE- α)	167
Lampiran 5 Kurva ROC 10 Model	171
Lampiran 6 Prediksi sifat fisiko-kimia, kelarutan, profil farmakokinetika, <i>drug-likeness</i> , dan nilai <i>synthetic accessibility</i> (SA) dengan SwissADME	172
Lampiran 7 Hasil sintesis berupa gambar produk dan KLT senyawa 3, 5, 6, 9, dan 10	174
Lampiran 8 Spektrum FTIR, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, MS senyawa 3E, 3F, 9E, 9F, 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F	181
Lampiran 9 Perhitungan Rendemen Senyawa AKI (10A – 10F)	201
Lampiran 10 Data perhitungan penentuan IC ₅₀	203
Lampiran 11 Data morfologi sel kanker dan sel normal beserta kurva hubungan % Inhibisi dan Log C penentuan IC ₅₀	215

DAFTAR SINGKATAN

AKM	: Analog Kurkumin Monokarbonil
AKI	: Analog Kurkumin heksahidro/tetrahidro Indazol
AKMA	: Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik
AKIA	: Analog Kurkumin heksahidro-2H-Indazol Asimetrik
ER- α	: <i>Estrogen receptor α</i>
ER- β	: <i>Estrogen receptor β</i>
RMSD	: <i>Root Mean Square Deviation</i>
TP	: <i>True Positive</i>
TN	: <i>True Negative</i>
FN	: <i>False Negative</i>
FP	: <i>False Positive</i>
CADD	: <i>Computer Aided Drug Design</i>
SBDD	: <i>Structure Based Drug Design</i>
LBDD	: <i>Ligan Based Drug Design</i>
PDB	: <i>Protein Data Bank</i>
SVBS	: <i>Screening Virtual Based Structure</i>
ROC	: <i>Receiver Operating Characteristics</i>
EF	: <i>Enrichment Factor</i>
BBB	: <i>Blood Barrier Brain</i>
GI	: <i>Gastrointestinal</i>
P-gp	: <i>P-glikoprotein</i>
SA	: <i>Synthetic Accesibility</i>
HBA	: <i>Hydrogen Bond Acceptor</i>
HBD	: <i>Hydrogen Bond Donor</i>
AR	: <i>Aromatic Ring</i>
CYP	: <i>Cytochrome P450</i>
HCl	: <i>Hydrochloride</i>
NaOH	: <i>Natrium Hydroxyde</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapir Tipis</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform Infra Red</i>
HRMS	: <i>High Resolution Mass Spectra</i>
$^1\text{H-NMR}$: <i>1-Hydrogen-Nuclear Magnetic Resonance</i>
$^{13}\text{C-NMR}$: <i>13-Carbon-Nuclear Magnetic Resonance</i>
MTT	: <i>Microculture Tetrazolium</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modification of Eagles Medium</i>
PBS	: <i>Phosphat Buffer Saline</i>
RPMI	: <i>Roswel Park Memoriam Institute</i>
IC	: <i>Inhibition Concentration</i>
IS	: <i>Indeks Selektivitas</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah kelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan serta penyebaran sel abnormal yang tidak terkontrol (American Cancer Society, 2020). Penyakit kanker menempati posisi ketiga penyebab kematian di Indonesia setelah penyakit Jantung dan stroke. Pada wanita dominan menderita kanker payudara dan kanker serviks, dan pada pria terbanyak kanker paru, dan kolorektal (Kemkes, 2019). Berdasarkan GLOBOCAN 2020 pada penelitian kanker di seluruh dunia, diperkirakan 19,3 juta kasus kanker baru (18,1 juta tidak termasuk kanker kulit nonmelanoma) dan hampir 10,0 juta kematian akibat kanker (9,9 juta tidak termasuk kanker kulit nonmelanoma) terjadi pada tahun 2020. Kematian tertinggi pada tiga jenis kanker adalah kanker payudara, kanker paru-paru, dan kanker kolorektal (Sung *et al.*, 2021). Kanker merupakan penyakit yang kompleks dengan ciri- ciri transduksi sinyal proliferasi dalam waktu lama, terjadinya penurunan penekan pertumbuhan, penurunan kematian sel, replikasi yang berlangsung terus-menerus, perangsangan angiogenesis, dan terjadi invasi serta metastasis. Kemampuan kanker tersebut terjadi akibat ketidakstabilan genetik (Hanahan & Weinberg, 2011).

Beberapa obat antikanker telah digunakan untuk mengobati penyakit kanker. Namun dalam penggunaannya obat antikanker tersebut memberikan beberapa efek samping. Antikanker yang ditujukan untuk membunuh sel kanker juga diketahui dapat membunuh sel normal sehingga memberikan efek samping terkait kemoterapi seperti kelelahan, mual, muntah, rambut rontok, dan kematian juga dapat terjadi pada kasus berat (Majeed *et al.*, 2014). Oleh karena itu, untuk mengurangi efek samping tersebut perlu ditemukan obat yang bersifat selektif pada sel kanker.

Akhir-akhir ini bahan alam berperan penting dalam proses penemuan obat baru dan sekitar 67% dari obat yang beredar di pasaran sekarang ini terinspirasi dari sumber alam. Salah satunya yaitu kurkumin. Kurkumin diisolasi dari akar tumbuhan *Curcuma longa* Linn., merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa alam yang telah diteliti selama puluhan tahun. Secara tradisional, *Curcuma longa* Linn. telah digunakan sebagai antiseptik, anti inflamasi, dan senyawa penyembuh luka. Selain itu, kurkumin juga telah diteliti dapat memberikan efek sebagai antioksidan, antimikroba, antivirus, antimalaria,

dan antikanker (Manohar *et al.*, 2013). Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa kurkumin merupakan agen sitotoksitas yang poten terhadap beberapa turunan sel *line* dari leukemia, kanker serviks, kanker kolorektal, kanker kulit, kanker prostat, dan sel kanker payudara, dan lain-lain (Manohar *et al.*, 2013; Ohori *et al.*, 2006). Namun demikian, kurkumin belum dapat diterima sebagai senyawa obat (agen terapeutik). Hal ini disebabkan karena rendahnya bioavailabilitas di dalam tubuh yang disebabkan oleh absorpsinya yang buruk, cepat dimetabolisme, metabolik yang tidak aktif, dan cepatnya eliminasi dari dalam tubuh sehingga menghasilkan aktivitas biologis yang rendah. Selain itu, kurkumin juga memiliki kelarutan yang buruk (Anand *et al.*, 2007; Mirzaei *et al.*, 2017). Kurkumin telah terbukti memiliki stabilitas yang rendah dalam larutan air pada pH fisiologis dan mudah terdegradasi. Kurkumin dalam buffer fosfat pada pH 7,4, sekitar 90% kurkumin terdegradasi dalam 30 menit (Shen, Liu, An, & Ji, 2016). Penelitian kurkumin dalam bidang formulasi menghasilkan studi klinis membuktikan bahwa nanopartikel kurkumin menunjukkan kelarutan dan bioavailabilitas yang meningkat. Khasiat terapi dari nanopartikel kurkumin meningkat dengan menerapkan obat dalam nanoform yang berbeda (Rajsekhar, Arvind Bharani, Jini Angel, Ramachandran, & Rajsekhar, 2015) dan juga membuat terobosan pembuatan nanopartikel kurkumin *food grade* dengan penurunan kristalinitas dan memaksimalkan pemanfaatan kurkumin karena peningkatan *bioaccessibility* (Ubeyitogullari & Ciftci, 2019). Selain pengembangan formulasi, pengembangan struktur kurkumin juga dilakukan modifikasi struktur kurkumin agar dapat meningkatkan kestabilan dan memberikan efek antikanker yang lebih baik.

Analog kurkumin monokarbonil (AKM) merupakan salah satu bentuk modifikasi kurkumin yang dapat meningkatkan potensi 10-30 kali lipat terhadap *cell lines* dan protein selular jika dibandingkan dengan kurkumin (Ohori *et al.*, 2006; Shetty *et al.*, 2015; Yin, *et al.*, 2013). Profil farmakokinetik AKM akan jauh lebih stabil jika dibandingkan dengan kurkumin apabila berada dalam kondisi pH 6,5. Hal tersebut berdasarkan modifikasi struktur kurkumin yang meningkatkan stabilitas dan kelarutan melibatkan penghilangan gugus keto-enol yang rentan hidrolisis (Shetty *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2009). AKM dan Analog kurkumin monokarbonil asimetrik (AKMA) memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel kanker SMMC-7221, MCF-7, dan PC-3 lebih baik dari kurkumin (Li *et al.*, 2015). Modifikasi senyawa AKM menjadi AKMA

bertujuan menghilangkan salah satu gugus hidroksil yang berperan dalam mempercepat metabolisme obat di dalam tubuh, gugus hidroksi adalah kelompok hidrofilik yang paling umum dihasilkan oleh fungsionalisasi metabolisme (El-haj *et al.*, 2018).

Substitusi basa Mannich dietilamin pada cincin fenil AKM menunjukkan peningkatan aktivitas dan selektivitas sebagai antikanker (Yerdelen, Gul, Sakagami, & Umemura, 2014). Basa Mannich berperan sebagai gugus farmakofor penting pada obat dengan potensi tinggi (Bala, Sharma, Kajal, Kamboj, & Saini, 2014). Substitusi basa Mannich juga telah berhasil dilakukan pada kurkumin, pirazol kurkumin dan siklovalon (Untung, Iskandarsyah, & Hayun, 2017). AKMA tersubstitusi basa Mannich juga telah menunjukkan potensi terhadap aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan MCF-7 (Prasetyaningrum, Bahtiar, & Hayun, 2018).

Pengembangan senyawa AKMA dapat dilanjutkan dengan memodifikasi struktur monokarbonil menjadi struktur heksahidro-2H-indazol, mengacu pada beberapa penelitian yang telah memodifikasi struktur AKM simetrik menjadi Analog Kurkumin Heksahidro-2H-Indazol simetrik (AKI) dan telah menunjukkan aktivitas antioksidan dan antitumor yang baik pada sel Hep G2, WI38, VERO and MCF-7) (Bayomi *et al.*, 2015; Bayomi *et al.*, 2013). Beberapa penelitian juga menunjukkan aktivitas antikanker yang lebih baik pada senyawa hasil modifikasi dengan pembentukan gugus indazol (Reddy *et al.*, 2014; Plescia, Raffa, Plescia, & Casula, 2010). Struktur indazol merupakan bagian struktur yang mempunyai potensi baik terhadap aktivitas antikanker. Struktur tersebut jarang diperoleh dari alam, umumnya diperoleh melalui sintesis kimia (Zhang, 2018). Pengembangan struktur indazol juga pada beberapa penelitian telah menunjukkan potensi yang baik pada sel kanker serviks (Sreenivasulu *et al.*, 2017; Kornicka A. *et al.*, 2017) dan juga menghasilkan aktivitas yang tinggi pada sel kanker kolon WiDr baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Solano *et al.*, 2020). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dikembangkan rancangan senyawa baru menjadi senyawa analog kurkumin indazol (AKI). Pengujian sitotoksitas dilakukan pada 3 sel kanker dengan prevalensi tinggi yaitu sel kanker payudara (MCF-7), sel kanker serviks (HeLa), dan kanker kolorektal (WiDr) (Kemkes, 2019). Pada penelitian ini diawali dengan penapisan dengan pemodelan farmakofor dan penambatan molekular terhadap ER- α (*Estrogen receptor- α*). ER- α merupakan faktor kunci pada perkembangan kanker payudara dan juga ER- α dieskpresikan pada bagian stroma kanker serviks (Gupta, *et.al.*, 2011; Hong, 2017), tetapi

ER- α tidak diekspresikan secara bermakna pada kanker kolorektal (Caiazza, 2015). Pada beberapa penelitian sebelumnya telah banyak dilaporkan bahwa pengembangan senyawa AKM dan Indazol aktif terhadap kanker kolorektal WiDr (Zhang *et al.*, 2018; Solano, 2020; Kurnia *et al.*, 2019). Oleh karena itu pada penelitian ini akan melakukan eksploitasi lebih jauh pada senyawa AKI pada 3 jenis sel *line* yaitu sel kanker payudara (MCF-7), sel kanker serviks (HeLa), dan kanker kolorektal (WiDr).

Pengembangan obat kanker berdasarkan pendekatan *in silico* diharapkan dapat menghasilkan obat yang lebih berdaya guna. Pencarian obat secara *in silico* dapat dilakukan melalui perancangan obat berdasarkan *Computer Aided Drug Design* (CADD) (Bourgoin-Voillard & Shaw, 2012). Perancangan dengan metode ini dapat dilakukan dengan pendekatan farmakofor untuk mempermudah komparasi terhadap kemiripan energi dengan senyawa lain yang sudah diketahui memiliki aktivitas tinggi (*pharmacophore query*) (Mughtaridi, 2014; de Kloe, Bailey, Leurs, & de Esch, 2009). Senyawa hasil farmakofor dilakukan *virtual screening* berdasarkan model hipotesis dan dievaluasi berdasarkan *structure based drug design* (SBDD) (Sliwoski, Kothiwale, Meiler, & Lowe, 2014; McInnes, 2007). Senyawa hit juga dilakukan analisis prediksi profil farmakokinetika dengan menggunakan prediksi Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET). Parameter farmakokinetika adalah besaran yang diturunkan secara matematis dari model yang berdasarkan hasil pengukuran kadar obat utuh atau metabolitnya dalam darah, urin atau cairan hayati lainnya. Parameter farmakokinetik suatu obat dapat digunakan untuk memperoleh gambaran dan mempelajari suatu kinetika absorpsi, distribusi dan eliminasi di dalam tubuh (Darvas *et al.*, 2001).

Mensintesis senyawa turunan lebih efektif dibandingkan dengan sintesis acak yang sulit, mahal dan memakan waktu (Hughes, Rees, Kalindjian, & Philpott, 2011). Keuntungan melakukan sintesis turunan ini diantaranya adalah memiliki probabilitas tinggi untuk menghasilkan senyawa yang lebih aktif dari senyawa penuntun (Carey & Sundberg, 2007; Hunziker, Koch, & Press, 2016). Oleh karena itu pengembangan modifikasi struktur kurkumin menjadi AKI diarahkan pada studi *in silico* meliputi pemodelan farmakofor, panambatan molekular terhadap ER- α , prediksi sifat fisikokimia, profil farmakokinetika, dan *drug-likeness*. Senyawa AKMA dan AKI terpilih hasil studi *in silico*, dilakukan sintesis dan elusidasi struktur. Kemudian dilanjutkan uji selektivitas

terhadap sel normal, dan pengujian aktivitas sitotoksik pada tiga jenis kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr.

1.2 Rumusan Masalah

Prevalensi kanker masih tinggi baik di dunia maupun di Indonesia. Terapi dengan obat yang sudah ada masih belum memberikan hasil maksimal. Pengembangan obat yang terinspirasi dari bahan alam terus dikembangkan, salah satunya adalah pengembangan senyawa turunan kurkumin yaitu AKM dan AKMA, dan telah memberikan hasil baik terhadap aktivitas pada beberapa sel kanker diantaranya sel kanker payudara (Prasetyaningrum, Bahtiar, & Hayun, 2018; Bayomi *et al* 2015, Li *et al*, 2015). Pengembangan senyawa AKM dan AKMA dengan modifikasi menjadi kurkumin indazol yaitu AKI berpotensi mendapatkan senyawa analog kurkumin baru yang aktif sebagai antikanker a. Rumusan penelitian ini adalah:

1. Apakah studi *in silico* dengan kombinasi metode pemodelan farmakofor dan penambatan molekuler dapat mempercepat proses penapisan senyawa AKMA dan AKI?
2. Apakah senyawa rancangan baru yaitu senyawa AKI dapat disintesis melalui senyawa intermedietnya yaitu AKMA dengan rendemen baik?
3. Apakah senyawa baru AKI yang diperoleh melalui sintesis organik terbukti lebih aktif secara *in vitro* terhadap sel kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr dibandingkan dengan senyawa penuntun kurkumin?
4. Bagaimana selektivitas aktivitas antikanker senyawa AKI baru terhadap sel normal Vero?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh senyawa AKMA dan AKI yang potensial pada reseptor estrogen α kanker melalui studi *in silico*
2. Memperoleh senyawa-senyawa baru AKI melalui sintesis organik dengan rendemen baik.
3. Mendapatkan data sitotoksik senyawa AKI melalui pengujian aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr.

4. Mengetahui selektivitas aktivitas antikanker senyawa AKI baru terhadap sel normal Vero

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah

1. Studi *in silico* dengan kombinasi metode pemodelan farmakofor dan penambatan molekuler dapat digunakan untuk melakukan penapisan senyawa AKMA dan AKI
2. Senyawa rancangan baru AKI hasil penapisan secara *in silico* dapat dibuat secara sintesis organik dengan rendemen baik.
3. Senyawa baru AKI mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker pada sel *line* payudara MCF-7, HeLa, dan WiDr dibandingkan dengan kurkumin.
4. Senyawa baru AKI mempunyai data selektivitas aktivitas antikanker terhadap sel kanker pada sel *line* MCF-7, HeLa, dan WiDr dibandingkan dengan kurkumin

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

1. Mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya dalam ilmu kimia medisinal dalam penemuan obat baru. Menambahkan kandidat senyawa baru yang berpotensi sebagai obat antikanker.
2. Melakukan pengembangan ilmu pengetahuan dengan diseminasi hasil penelitian melalui publikasi hasil penelitian di jurnal terindeks atau seminar internasional.
3. Memperoleh senyawa baru AKI yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr dan selektivitas terhadap sel Vero
4. Menambah wacana bidang perancangan obat berbasis komputer, sintesis dan uji sitotoksik senyawa hasil sintesis, khususnya aktivitas sitotoksik terhadap pertumbuhan sel kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr

1.6 Batasan Penelitian

Batasan kegiatan penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut:

1. Studi *in silico* senyawa AKMA dan AKI berdasarkan farmakofor model, penambatan molekul, simulasi molekuler dinamik yang berinteraksi dengan reseptor estrogen α .
2. Sintesis senyawa AKI melalui sintesis organik serta mengkonfirmasi strukturnya

3. Pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel line kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr dan selektivitas pada sel Vero.

1.7 Model Operasional Penelitian

Model operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: merancang desain senyawa AKMA dan AKI yang diperkirakan aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker pada mekanisme inhibisi ER- α , menskrining hasil rancangan dengan farmakofor model, penambatan molekular, sifat fisiko-kimia, profil ADME, dan memilih senyawa AKI dengan acuan hasil penambatan molekul untuk disintesis di laboratorium dan mengkonfirmasi strukturnya, menguji aktivitas sitotoksik dan menemukan mekanisme kerja antikanker senyawa baru AKI secara *in silico* terhadap sel line kanker MCF-7, HeLa, dan WiDr dan selektivitas pada sel Vero.

1.8 Kebaruan Penelitian

1. Desain dan skrining senyawa AKMA dan AKI sebagai penghambat reseptor estrogen α kanker payudara berdasarkan *Computer Aided Drug Design (CADD)* dengan pendekatan skrining terhadap senyawa desain berdasarkan farmakofor model (*ligan base*) dan *molecular docking (structure base)*.
2. Mensintesis senyawa AKI yang merupakan senyawa baru belum pernah disintesis, hal ini ditelusuri dengan menggunakan *Molbase* dan *Pubchem Compound*.
3. Belum ada publikasi senyawa baru AKI sebelumnya sebagai penghambat perkembangan sel kanker terhadap sel line kanker payudara MCF-7, sel line kanker serviks HeLa, dan sel kanker kolon WiDr serta selektivitasnya pada sel Vero.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang banyak diderita oleh masyarakat dunia akhir-akhir ini. Pada tahun 2012 diperkirakan terdapat 8 juta kasus kanker baru di seluruh dunia, 5,3 juta kematian akibat kanker dan 15,6 juta orang yang hidup dengan kanker. Banyaknya jumlah kematian yang diakibatkan karena kanker menyebabkan penyakit ini menjadi salah satu penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian di dunia. Penyakit kanker menempati posisi ketiga penyebab kematian di Indonesia setelah penyakit Jantung dan stroke. Pada wanita dominan menderita kanker payudara dan kanker serviks, dan pada pria terbanyak kanker paru, dan kolorektal (Kemkes, 2019).

Kanker dapat didefinisikan sebagai suatu penyakit yang timbul ketika adanya pertumbuhan sel abnormal yang tidak terkontrol yang mengabaikan aturan pembelahan sel normal. Sel normal secara teratur tergantung pada sinyal yang mengontrol apakah sel akan membelah, berdiferensiasi menjadi sel lain, atau mati. Sel kanker berkembang secara mandiri dalam sinyal sehingga menghasilkan pertumbuhan dan pembelahan yang tidak terkontrol. Pembelahan ini akan berakibat fatal jika terus berlanjut dan menyebar. Hampir 90% dari kematian terkait kanker disebabkan karena kanker yang menyebar (metastasis) (Hejmadi, 2010).

Kanker berbeda dengan tumor. Tumor adalah kondisi dimana pertumbuhan sel tidak normal sehingga membentuk suatu lesi atau dalam banyak kasus terjadi benjolan di tubuh. Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan (tumor ganas) serta mempunyai ciri-ciri umum: mandiri dalam signal pertumbuhan, tidak peka terhadap signal anti pertumbuhan, menghindari apoptosis, memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, angiogenesis, invasi dan metastase ke jaringan lain. Ciri-ciri kanker terdiri dari enam kemampuan biologis yang diperoleh selama beberapa tahap perkembangan tumor manusia. Keunggulan ini merupakan prinsip pengorganisasian untuk merasionalisasi kerumitan penyakit neoplastik. Mereka termasuk mempertahankan pensinyalan proliferasi, menghindari penekanan pertumbuhan, melawan kematian sel, memungkinkan keabadian replikatif, menginduksi angiogenesis, dan mengaktifkan invasi dan metastasis. Yang mendasari ciri-ciri ini adalah ketidakstabilan genom, yang menghasilkan keragaman genetik yang mempercepat perolehannya, dan

pembengkakan, yang mendorong berbagai fungsi tanda-tanda. Kemajuan konseptual dalam dekade terakhir telah menambahkan dua ciri yang muncul dari potensi umum ke dalam daftar ini pemrograman ulang metabolisme energi dan menghindari pengurangan kekebalan. Selain sel kanker, tumor menunjukkan dimensi lain dari kompleksitas: tumor mengandung repertoar sel yang direkrut dan tampaknya normal yang berkontribusi pada perolehan ciri-ciri hall-mark dengan menciptakan " lingkungan mikro tumor. " Pengakuan akan penerapan luas konsep-konsep ini akan semakin mempengaruhi perkembangan cara baru untuk mengobati kanker pada manusia (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.1.1 Kanker Payudara

Kanker payudara adalah kanker yang paling sering ditemukan pada wanita, baik yang tinggal di negara maju maupun di negara berkembang. Berdasarkan data WHO, pada tahun 2011, diperkirakan lebih dari 508.000 wanita di seluruh dunia meninggal karena kanker payudara. Insidensi terjadinya kanker payudara berbeda-beda di setiap belahan dunia, yaitu sebesar 19,3 per 100.000 wanita di Afrika Timur dan 89,7 per 100.000 wanita di Eropa Barat, sedangkan di Amerika pada tahun 2011, terdapat 220.097 wanita dan 2.078 pria didiagnosis mengalami kanker payudara, dengan angka kematian sebesar 40.931 pada wanita dan 443 pada pria (American Cancer Society, 2020). Pada 2018, diperkirakan 2,1 juta wanita baru lahir didiagnosis dengan kanker payudara, kurang lebih satu kasus baru didiagnosis setiap 18 detik; selain itu, 626.679 wanita penderita kanker payudara meninggal (Harbeck, 2019)

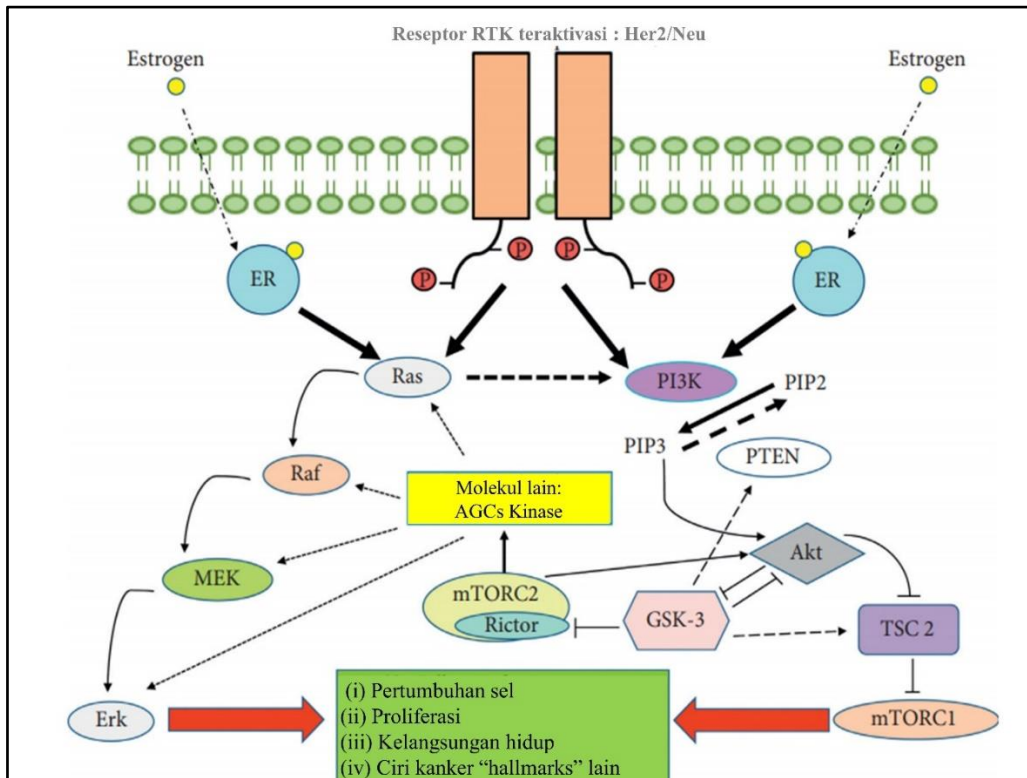
Kanker payudara adalah keganasan yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia dan dapat disembuhkan pada ~ 70-80% pasien dengan stadium awal, penyakit non-metastasis. Kanker payudara stadium lanjut dengan metastasis organ jauh dianggap tidak dapat disembuhkan dengan terapi yang tersedia saat ini. Pada tingkat molekuler, kanker payudara adalah penyakit heterogen; fitur molekuler termasuk aktivasi reseptor faktor pertumbuhan epidermal manusia 2 (HER2, dikodekan oleh ERBB2), aktivasi reseptor hormon (reseptor estrogen dan reseptor progesteron) dan / atau mutasi BRCA. Strategi pengobatan berbeda menurut subtype molekuler. Penatalaksanaan kanker payudara adalah multidisiplin; itu termasuk lokoregional (pembedahan dan terapi radiasi) dan pendekatan terapi sistemik. Terapi sistemik termasuk terapi endokrin untuk reseptor hormon positif penyakit, kemoterapi, terapi anti-HER2 untuk penyakit HER2-positif, zat penstabil tulang, poli (ADP-ribosa) polimerase penghambat untuk pembawa mutasi BRCA dan, baru-baru ini, imunoterapi. Konsep terapi masa depan dalam kanker payudara bertujuan untuk

individualisasi terapi serta pengobatan de-eskalasi dan eskalasi berdasarkan biologi tumor dan respon terapi dini. Di samping inovasi perawatan lebih lanjut, akses yang sama di seluruh dunia kemajuan terapeutik tetap menjadi tantangan global dalam perawatan kanker payudara di masa depan (Harbeck, 2019).

Kanker payudara bisa turun-temurun atau sporadis. Mutasi yang paling sering dikaitkan dengan kanker herediter termasuk yang memengaruhi gen perbaikan kerusakan DNA (DDR), yang paling penting adalah mutasi pada gen BRCA1, BRCA2, dan TP53. Kanker sporadis mewakili sekitar 85% dari semua kasus kanker payudara dan dikaitkan dengan beberapa faktor risiko yang disebutkan di atas; Namun, itu juga telah dikaitkan dengan paparan karsinogen, seperti polutan udara, radiasi elektromagnetik, dan disregulasi ekspresi gen DDR. Karsinoma duktal in situ merupakan jenis kanker payudara yang paling terdiagnosis, diikuti oleh karsinoma lobular in situ. Kanker payudara dibagi menjadi sub tipe yang berbeda berdasarkan ada atau tidak adanya reseptor estrogen (ER), reseptor progesteron (PR), dan reseptor HER2. Dengan demikian, kita dapat membedakan antara sub tipe luminal, menjadi ER / PR +, sub tipe Her2 +, yang memiliki reseptor yang diekspresikan berlebih, dan sub tipe triple negative atau basal-like (TNBC). Mengikuti klasifikasi ini, sub tipe luminal dapat dibagi menjadi luminal A, dicirikan oleh ekspresi ER / PR +, HER2-, dan Ki67 rendah, dan luminal B, yang ditandai dengan ekspresi ER / PR +, HER2 +, dan Ki67 tinggi. Sub tipe Her2 + adalah ER / PR negatif, dan triple negatif menunjukkan kurangnya semua reseptor ini (Ortega, 2020).

Pada sel kanker payudara jalur pensinyalan sel pada respon dimediasi oleh reseptor peka kalsium atau faktor yang diinduksi hipoksia atau mekanisme sel apoptosis itu sendiri. Perubahan yang langsung terlibat dalam perkembangan jalur kanker payudara adalah yang dimediasi oleh ER dan reseptor tipe-2 faktor pertumbuhan epidermal manusia (HER2 / Neu atau c-ErbB2). Aktivitas reseptor HER2 pada gilirannya mendorong pensinyalan jalur lain seperti jalur protein yang diaktifkan mitogen (MAPK) atau komponen sel seperti glikogen sintase kinase-3 (GSK-3) dan jalur PI3K / Akt / mTOR, mekanisme keduanya dapat dilihat pada **Gambar 2.1** yang menunjukkan pentingnya proses integrasi dan transduksi sinyal dalam perkembangan dan perkembangan kanker payudara. Pensinyalan sel kanker payudara yang dimediasi oleh reseptor tirosin kinase (RTKs) Her2 / Neu dan reseptor estrogen (ER), merupakan dua komponen kunci perkembangan kanker payudara. Aktivasi mereka memulai jalur PI3K /Akt/mTOR dan MAPK, yang akhirnya mendorong pertumbuhan sel, proliferasi,

kelangsungan hidup, dan ciri khas kanker lainnya. Pada **Gambar 2.1**, menyajikan dua jalur yaitu Ras dan PI3K. Ras dapat mempromosikan aktivasi PI3K, dan beberapa AGC kinase (seperti SGK-3) yang diaktifkan oleh mTORC2 juga berinteraksi dengan jalur MAPK (Ortega, 2020).



Gambar 2.1 Jalur persinyalan pada pembentukan sel kanker payudara

(Sumber: Ortega, 2020, telah diolah kembali).

Beberapa penelitian juga mengkaji hubungan pensinyalan Wnt dengan perkembangan kanker payudara. Protein Wnt, sekelompok glikoprotein yang disekresikan, terutama bergabung dengan reseptor *Frizzled* (FZD) dan / atau *low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6* (LRP5 / 6), memulai Jalur pensinyalan β -catenin-dependent dan -independent. Jalur ini diatur oleh beberapa antagonis *secreted Frizzled-related proteins* (SFRP) dan *dickkopf-related protein* (DKK), memainkan peran penting dalam perkembangan embrio dan homeostasis orang dewasa. Aktivasi yang berlebihan dari pensinyalan Wnt terlibat dalam beberapa hal penyakit manusia termasuk kanker. Tikus transgenik Wnt memberikan bukti yang meyakinkan itu. Pensinyalan Wnt terlibat dalam inisiasi dan perkembangan kanker payudara, yang selanjutnya diperkuat dengan pengamatan pada pasien kanker payudara klinis dan studi pada *in vitro* sel kanker payudara manusia yang

dibudidayakan. Menargetkan ligan / reseptor Wnt telah terbukti efektif pada pertumbuhan tumor payudara pada model hewan dan xenograft manusia, tetapi efeknya pada metastasis kanker payudara masih belum jelas. (Yin, 2018)

Studi dari tikus transgenik Wnt dengan jelas menunjukkan bahwa pensinyalan Wnt, terutama jalur β -catenin, mampu memulai karsinogenesis payudara. Pengamatan pada pasien klinis manusia menunjukkan sinyal Wnt yang terlalu aktif di bagian kanker payudara sebagai hasil dari regulasi ligan dan atau reseptor Wnt, serta menurunnya regulasi antagonis Wnt. CSC (*cancer stem cells*) diperkaya pada kanker payudara transgenik Wnt tikus dan kanker payudara yang terlalu aktif pada manusia. Kanker payudara yang digerakkan oleh Wnt menunjukkan *fenotipe basal-like/triple-negative* dan EMT (*epithelial-mesenchymal transition*), dan jalur *Wnt canonical* dan *noncanonical* keduanya berkontribusi pada pembentukan MIC (*metastasis-initiating cells*) dan penyebaran dini kanker. Meskipun tidak cukup, terdapat fakta menunjukkan bahwa inaktivasi pensinyalan Wnt dapat membantu MIC ke dalam keadaan tidak aktif untuk menghindari serangan kekebalan sebelum metastasis nyata terjadi. (Yin, 2018). Beberapa laporan pasien kanker payudara telah mendokumentasikan pentingnya aktivasi jalur Wnt dan komponennya sedemikian rupa sehingga regulasi tersebut dapat dimanfaatkan secara terapeutik dengan hasil yang menjanjikan. Selain itu, penelitian terbaru telah memberikan penekanan pada pentingnya jalur Wnt pada kanker payudara triple negatif, subtype molekuler dari kanker payudara. Oleh karena itu, pemahaman tentang pensinyalan Wnt dan penargetannya untuk merawat pasien kanker payudara dapat menjadi pendekatan yang meyakinkan. (Kazi, 2016)

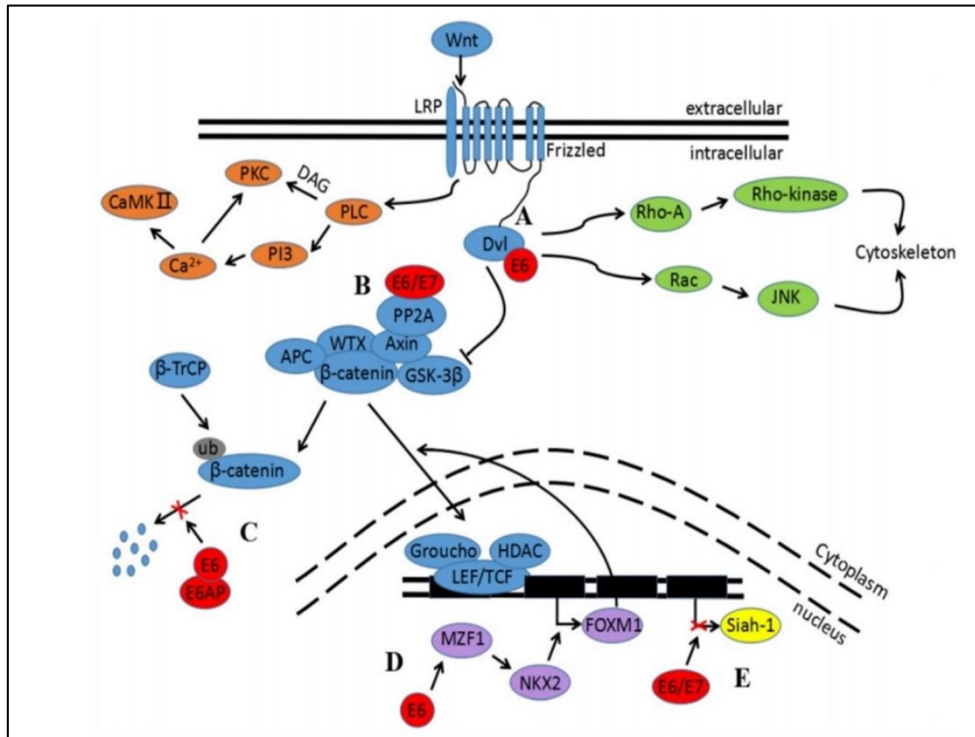
Penyakit metastasis tetap menjadi penyebab utama kematian pada pasien kanker payudara. *Basal-like breast cancer* (BLBC) dikaitkan dengan perilaku agresif, fenotipe seperti batang, tingkat histologis tinggi, gambaran klinis yang buruk, dan tingkat kekambuhan dan atau metastasis yang tinggi. Namun, mekanisme pembentukan fenotipe BLBC masih belum jelas. Dalam studi ini, kami mengevaluasi berbagai faktor yang berkontribusi terhadap fenotipe fisik dan fisiologis BLBC dan mengidentifikasi Wnt5b sebagai faktor regulasi kunci yang mengatur fenotipe BLBC dengan mengaktifkan pensinyalan Wnt *canonical* dan *non-canonical*. Wnt5b menunjukkan spesifisitas *basal-like* dalam sel dan sampel klinis pada tingkat mRNA dan protein, dan juga menunjukkan korelasi yang baik dengan fenotipe mirip basal pada tingkat mRNA. Selain itu, Wnt5b merupakan target terapeutik yang menjanjikan untuk pengobatan LGK-974. Ini akan memberikan

wawasan baru tentang diagnosis dan pengobatan BLBC. Selain itu, kami mengidentifikasi bahwa CK1 α diekspresikan pada tingkat rendah dalam BLBC dan aktivasi CK1 α oleh pyrvinium merupakan strategi alternatif untuk pengobatan BLBC. Wnt5b tidak hanya merupakan biomarker diagnostik tetapi juga merupakan target terapi potensial dari BLBC. (Jiang, 2019).

2.1.2 Kanker Serviks

Kanker Serviks adalah tumor yang sangat agresif dan merupakan salah satu penyebab utama kematian terkait kanker pada wanita, dengan perkiraan 570.000 kasus baru dan 311.000 kematian pada tahun 2018 di seluruh dunia (Bray, 2018). Wanita dengan kanker serviks dianggap memiliki kualitas hidup yang lebih rendah. Perkembangan kanker serviks, dari epitel mukosa serviks normal menjadi neoplasia intraepitel serviks (CIN) grade 1, 2, dan 3, menjadi kanker serviks dikaitkan dengan infeksi human papillomavirus (HPV) risiko tinggi yang persisten. Selain itu, sejumlah faktor risiko, termasuk aktivitas seksual dini, banyak pasangan seksual, penggunaan kontrasepsi oral jangka panjang, faktor genetik seperti onkogen aktif dan p53, penggunaan tembakau dan infeksi virus lainnya seperti HIV dan virus herpes simpleks (HSV) tipe II. Infeksi HPV memainkan peran utama dalam kanker serviks (16). DNA HPV berintegrasi ke dalam genom sel inang seperti HPV16 dan HPV18, mengganggu kerangka pembacaan terbuka dan menyebabkan gen E6 dan E7 berlebih. Telah diverifikasi bahwa E6 dan E7 memberikan efek karsinogenik dengan mengikat pada regulator siklus sel, p53 dan retinoblastoma (Rb). Sementara protein E6 dan E7 diregulasi, E6 dapat berinteraksi dengan protein terkait untuk membentuk kompleks dan mengikat p53. Pengikatan ini menghidrolisis p53 dan mengakibatkan hilangnya regulasi negatif yang diinduksi oleh p53 dari proliferasi sel, sehingga menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkendali dan analisis gen dan jalur komprehensif dari perkembangan kanker serviks transformasi maligna. E7 memiliki afinitas tinggi untuk Rb, yang mengontrol siklus sel. Pengikatan E7 ke Rb dapat mendisosiasi kompleks Rb-E2F, sehingga melepaskan E2F untuk menjalankan perannya sebagai faktor transkripsi, yang mengarah pada siklus sel yang tidak terkendali dan keabadian seluler. Selain itu, sentrosom adalah pusat pengatur mitosis yang sering meningkat jumlahnya dalam sel kanker. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa peningkatan jumlah sentrosom yang tidak normal dikaitkan dengan kelainan kromosom struktural pada lesi serviks dengan risiko tinggi infeksi HPV (Yi, 2020).

HPV memainkan peran penting dalam inisiasi dan perkembangan kanker serviks. β -catenin telah terbukti mempercepat karsinogenesis serviks yang dimediasi HPV tipe-16 pada tikus transgenik; Selain itu, transformasi HPV yang mengekspresikan keratinosit manusia membutuhkan aktivasi jalur Wnt. Oleh karena itu, mengaktifkan jalur *canonical* Wnt diperlukan dan cukup untuk mendorong transformasi sel yang diabadikan HPV. Selain itu, percobaan telah menunjukkan bahwa onkogen virus E6 dan E7 secara aktif diekspresikan dalam jaringan kanker serviks. Karenanya, ekspresi E6 dan E7 dalam sel epitel dan interaksinya dengan protein seluler menjadi pusat penelitian karsinogenik HPV. Namun, tidak semua pasien yang terinfeksi HPV akan mengembangkan kanker serviks. Beberapa temuan menunjukkan bahwa aktivasi jalur Wnt *canonical* merupakan persyaratan sekunder untuk memulai transformasi ganas. Ada juga beberapa studi terbaru yang menunjukkan dampak onkogen E6 dan E7 dalam pensinyalan Wnt, seperti yang terlihat pada **Gambar 2.2** Baik E6 dan E7 mengatur ekspresi β -catenin dan meningkatkan transkripsi yang dimediasi TCF. Hal ini disebabkan oleh penurunan protein ubiquitin ligase tipe 3 Siah-1, yang bertindak sebagai protein yang mengandung pengulangan beta-transdusin (β -TrCP) dan menginduksi degradasi β -catenin. Lebih lanjut, protein terkait E6 / E6 (E6AP) menstabilkan β -catenin. Mekanisme interaksi antara E6 / E6AP dan β -catenin belum diklarifikasi, tetapi E6 / E6AP secara alternatif dapat berpartisipasi dalam sekuestrasi regulator negatif dalam pensinyalan Wnt. Kemungkinan lain adalah bahwa E6 menginduksi ekspresi Myeloid zinc finger 1 (MZF1), dan akibatnya mengaktifkan transkripsi NK2 homeobox 1 (NKX2-1). Karena promotor *Forkhead box* protein M1 (FOXM1) mengandung tiga lokasi putatif untuk NKX2-1, dan karena FOXM1 dapat menginduksi translokasi inti β -catenin dengan mengikat langsung ke β -catenin, E6 secara tidak langsung mengaktifkan jalur pensinyalan Wnt. Selain itu, studi *in vivo* menunjukkan bahwa interaksi E6 dan Dvl2 meningkatkan aktivitas transkripsi TCF. E7 juga berikatan kuat dengan subunit katalitik PP2A untuk menghambat aktivitasnya, dan selanjutnya berkontribusi pada stabilisasi β -catenin dalam sitoplasma (Wang, 2018).



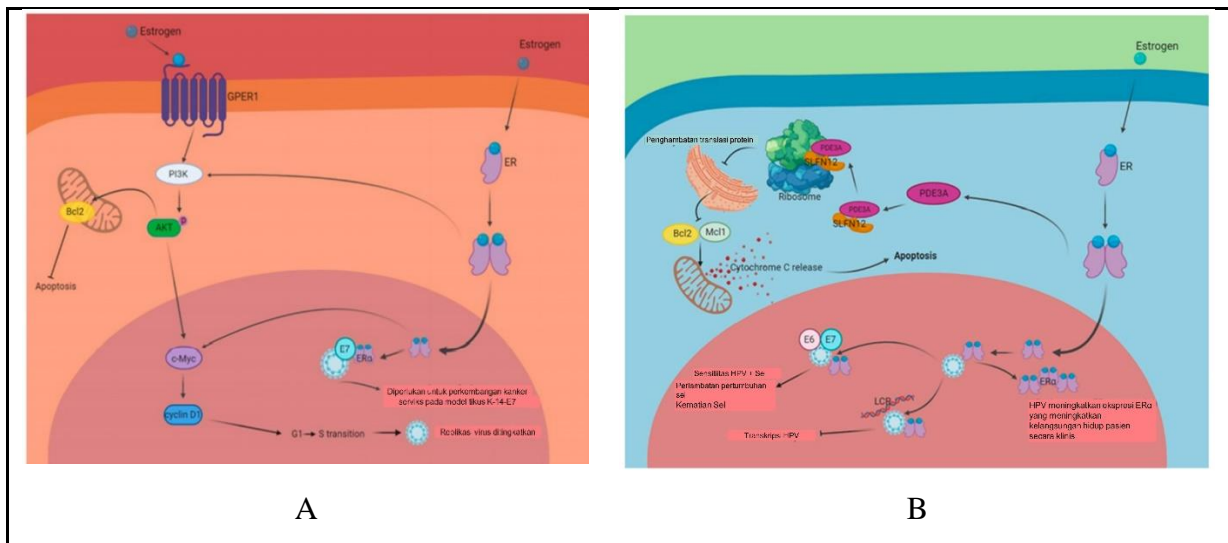
Gambar 2.2 Dampak onkogen E6 dan E7 dalam pensinyalan Wnt

(sumber: Wang, 2018)

Pada **Gambar 2.2** menunjukkan: A) Pengikatan E6 dan Dvl dapat memblokir degradasi β -catenin dan meningkatkan aktivitas transkripsi TCF, B) E6 dan E7 mengikat subunit katalitik dari PP2A untuk PLC menghambat aktivitasnya dan selanjutnya berkontribusi pada stabilisasi β -catenin dalam sitoplasma, C) E6 / E6AP dapat melindungi β -catenin dari degradasi, D) E6 menginduksi ekspresi MZF1 dan akibatnya mengaktifkan transkripsi NKX2-1 sebelum mempromosikan ekspresi FOXM1. FOXM1 kemudian dapat menginduksi translokasi nuklir β -catenin, E) E6 dan E7 mengatur ekspresi β -catenin dan meningkatkan transkripsi yang dimediasi TCF; Hal ini terkait dengan penurunan protein Siah-1 (Wang, 2018).

Selain korelasi dengan jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin, telah banyak penelitian juga melaporkan hubungan korelasi bermakna antara kanker serviks dengan ekspresi ER- α . Hasil penelitian Kwasniewska (2011) mengungkapkan bahwa ekspresi RE dan Reseptor Progesteron (RP) pada kanker planoepitelial dan adenokarsinoma serviks mengalami penurunan hingga tidak terdeteksi. Hanya dalam kasus tunggal dalam pola pewarnaan ekspresi RE dan RP dicatat. Dalam sel stroma dari neoplasma yang diuji, ekspresi yang lebih tinggi dari kedua jenis reseptor ditemukan. Perbandingan ekspresi RE dan RP dalam pola

pewarnaan dan stroma pada karsinoma sel skuamosa dan adenokarsinoma serviks, menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi secara statistik pada sel stroma (Kwasniewska, et.al., 2011). Pada penelitian Hong (2017) juga melaporkan bahwa ER- α dan PRB terutama diekspresikan di stroma tetapi tidak di jaringan karsinoma kanker serviks, dan ekspresi mereka sangat berkorelasi. ER- α stroma lebih banyak ditemukan pada tumor stadium awal dibandingkan pada tumor stadium lanjut. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi ER α dan PRB stroma merupakan indikator prognostik independen karsinoma sel skuamosa serviks (Hong, et.al., 2017).



Gambar 2.3 Mekanisme hubungan pensinyalan terkait estrogen dan kanker dengan HPV positif. A: HPV dan estrogen dalam karsinogenesis, dan B: HPV dan estrogen sebagai kemungkinan paradigma pengobatan.

(Sumber: James, et.al., 2020, telah diolah kembali)

Pada penelitian James (2020) mengungkapkan berdasarkan **Gambar 2.3** bahwa estrogen yang bersirkulasi berinteraksi dengan reseptornya dan berbagai interaksi dapat berkontribusi pada pertumbuhan dan kematian sel yang terinfeksi HPV. (A): HPV dan estrogen dalam karsinogenesis. Interaksi antara estrogen dan GPER1 atau ER telah terbukti mengaktifkan jalur PI3K. Ini meningkatkan ekspresi Bcl2 dan menghambat apoptosis. Jalur PI3K juga mengaktifkan c-Myc dan cyclin D1. Ini meningkatkan perkembangan siklus sel dan promosi transisi G1 ke S meningkatkan replikasi virus. Selain itu, penelitian pada tikus menunjukkan bahwa ekspresi HPV E7 dan ER diperlukan untuk perkembangan kanker serviks. (B): HPV dan estrogen sebagai kemungkinan paradigma pengobatan. Aktivasi estrogen dari phosphodiesterase 3A (PDE3A) menstabilkan pergantian protein dari Schlafen

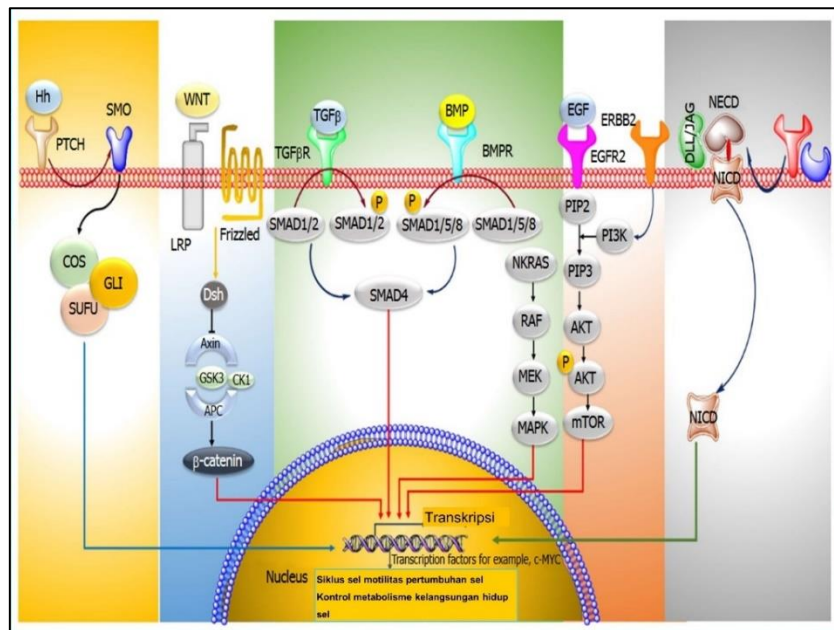
12 (SLFN12). SLFN12 mengikat ribosom dan menghentikan terjemahan protein ER, termasuk memblokir Bcl2 dan Mcl1. Ini menginduksi pelepasan sitokrom C dari mitokondria dan memulai apoptosis. Estrogen dan ER- α juga terbukti berinteraksi dengan HPV 16 E6 dan E7 untuk meningkatkan sensitivitas sel HPV + terhadap estrogen. Selain itu, estrogen dan ER- α telah terbukti berinteraksi dengan HPV16 LCR untuk menghambat transkripsi HPV. Akhirnya, HPV telah terbukti meningkatkan ekspresi ER- α dan ini berkorelasi dengan peningkatan ekspresi ER- α dan ini berkorelasi dengan peningkatan hasil klinis (James, et.al., 2020).

2.1.3 Kanker Kolorektal

Kanker kolorektal adalah jenis kanker paling umum kedua dalam keganasan dan penyebab utama keempat dari kematian terkait kanker di seluruh dunia (Bray, 2018). Sonic Hedgehog (SHH), virus tumor mammae tikus tipe sayap Wnt/ β -catenin, mengubah faktor pertumbuhan- β /SMAD, reseptor faktor pertumbuhan epidermal, dan Notch adalah jalur pensinyalan utama yang terlibat dalam perkembangan kanker kolorektal. Terapi yang ditargetkan memerlukan informasi mengenai jalur menyimpang tertentu. Kemajuan dalam terapi gen telah menghasilkan pengenalan target terapeutik baru yang terkait dengan kaskade transduksi sinyal ini. Kanker kolorektal adalah proses bertahap di mana mutasi terjadi sepanjang waktu dan aktivasi onkogen serta penonaktifan gen penekan jaringan terjadi. Perubahan genetik yang bertanggung jawab atas induksi karsinogenesis termasuk hilangnya heterozigositas pada gen penekan tumor seperti adenomatous polyposis coli, mutasi atau penghapusan gen seperti p53 dan K-ras. Oleh karena itu, banyak pendekatan terapi gen seperti koreksi gen, terapi prodrug yang diarahkan oleh virus, manipulasi imunogenetik, dan viroterapi saat ini sedang dieksplorasi. Pengembangan strategi baru untuk pengiriman obat yang aman dan efektif ke lokasi kanker adalah kebutuhan saat ini. (Khopkar, 2018).

Jalur utama yang dapat ditargetkan untuk terapi kanker kolorektal adalah, Sonic Hedgehog (SHH), Wnt/ β -catenin, transformasi faktor pertumbuhan- β (TGF- β) / SMAD, EGFR dan jalur Notch dapat dilihat pada **Gambar 2.4**. Jalur Hh sangat penting dalam perkembangan normal berbagai organ seperti epitel usus. Ligan Hh berikatan dengan reseptor Patched protein (Ptch), yang menundukkan aktivitas reseptor Smoothed (Smoh). Pengikatan ligan ke PTCH1 menghasilkan aktivasi faktor transkripsi GLI yang dimediasi Smoh, yang kemudian memodulasi ekspresi berbagai gen target Hh. Ekspresi mRNA SHH, SMO, GLI1 dalam jaringan kanker usus besar sangat meningkat dibandingkan dengan sel

normal. Vismodegib adalah penghambat Hh yang bekerja dengan menargetkan Smoothened yang merupakan modulator jalur Hh. Untuk menanyakan antagonis Hh novel dengan aktivitas yang memicu munculnya gangguan, sekelompok ~ 300 antagonis yang berpotensi dihaluskan disaring. Pada sel kanker usus besar, Hh003 memicu apoptosis tergantung kaspase sedangkan tidak ada aktivitas apoptosis yang digambarkan oleh vismodegib. Dibandingkan dengan vismodegib, Hh003 menampilkan penekanan serupa di jalur Hh. Hh003 menggambarkan lebih banyak penekanan pada koloni pembentuk tumor *in vitro* dan proliferasi kanker usus besar secara *in vivo* (Tiwari, 2018).



Gambar 2.4 Jalur persinyalan pada pembentukkan sel kanker Kolorektal

(Sumber: Tiwari, 2018, telah diolah kembali).

Reseptor Frizzled (Fz) dan protein 5 atau 6 terkait reseptor lipoprotein densitas rendah (LRP5 atau LRP6) adalah target dari keluarga protein Wnt. Elemen utama dari jalur pensinyalan Wnt / β -catenin adalah kompleks penghancuran β -catenin; yang terdiri dari protein penekan tumor yang dikodekan oleh gen *antigen presenting cells* (APC), Axin, CKI, dan GSK3. Ketika pengikatan reseptor tidak terjadi, kompleks ini mengalami pengikatan dengan protein β -catenin (dikodekan oleh gen CTNNB1), yang kemudian mengalami degradasi melalui jalur ubiquitin-proteasome. Sebaliknya, pengikatan reseptor oleh ligan Wnt menyebabkan deaktivasi kompleks penghancuran β -catenin dan akumulasi β -catenin. Ini kemudian ditranslokasi ke nukleus untuk pembentukan kompleks dengan faktor sel-T /

faktor peningkat limfoid, faktor transkripsi, menyebabkan aktuasi transkripsi dari gen target. Pada sebagian besar kanker usus besar (sporadis) mutasi kedua alel APC (gen penekan tumor) terjadi yang mengarah pada stabilisasi β -catenin dan stimulasi gen jalur WNT, seperti TCF, yang diperlukan untuk pemeliharaan crypt usus besar. Pada beberapa kanker kolon, identifikasi mutasi titik pada APC β -catenin yang membawa alel tipe liar telah dilakukan. Aquaporin5 (AQP5), saluran protein air, memiliki aktivitas onkogenik pada banyak jenis kanker ganas seperti kanker kolorektal (Tiwari, 2018).

Kanker kolorektal juga menunjukkan adanya hubungan dengan reseptor estrogen. Pada penelitian Maingi (2020) mengungkapkan bahwa sinyal reseptor estrogen yang tidak normal dapat meningkatkan risiko perkembangan berbagai penyakit termasuk kanker kolorektal. *Estrogen Receptor- β* (ER- β) adalah subtype utama dalam epitel kolon dan memberikan efek anti tumor melalui berbagai mekanisme. Banyak peneliti telah memulai pencarian mekanisme biologis di mana estrogen dan senyawa mirip estrogen dapat mempengaruhi patogenesis kanker kolorektal. Ulasan ini mengeksplorasi temuan terbaru tentang peran terapeutik ER- β dalam epitel kolon sebagai calon kandidat untuk terapi endokrin yang ditargetkan pada kanker kolorektal (Maingi, et.al., 2020). Caiazza (2015) menyatakan pensinyalan estrogen memiliki peran anti-tumorigenik dalam mukosa kolon, melalui aktivasi selektif dari pensinyalan pro-apoptosis yang dimediasi oleh ER- β , penghambatan sinyal inflamasi, dan modulasi lingkungan mikro tumor dan mekanisme pengawasan imun yang berbeda. Hilangnya ekspresi ER- β secara selektif selama progresi kanker kolorektal menyoroti pentingnya pensinyalan onkosupresif ini, dan memberikan kesulitan dalam menggunakan pensinyalan yang sama ini sebagai target terapeutik. ER- β adalah reseptor estrogen utama yang diekspresikan dalam epitel kolon normal dan maligna, dengan ekspresi ER- α yang terbatas atau tidak teramati pada kolon (Caiazza, et.al., 2015).

2.1.4 Tamoksifen

Tamoksifen biasa diberikan secara oral. Konsentrasi puncak plasma dicapai dalam 4-7 jam setelah pemberian. Tamoksifen memiliki dua fase eliminasi, sehingga half-life tamoksifen yang pertama adalah 7-14 jam di sirkulasi dan 4-11 hari pada fase eliminasi kedua. Tamoksifen kebanyakan diekskresi melalui hati oleh enzim-enzim CYP, dan dikonversi menjadi metabolit dalam 4-6 jam setelah pemberian obat secara oral. 15,16 Agen kemoterapi yang biasa digunakan pada kanker payudara stadium awal adalah kombinasi cyclophosphamide, methotrexate, dan Fluorouracil (CMF) atau kombinasi fluorouracil,

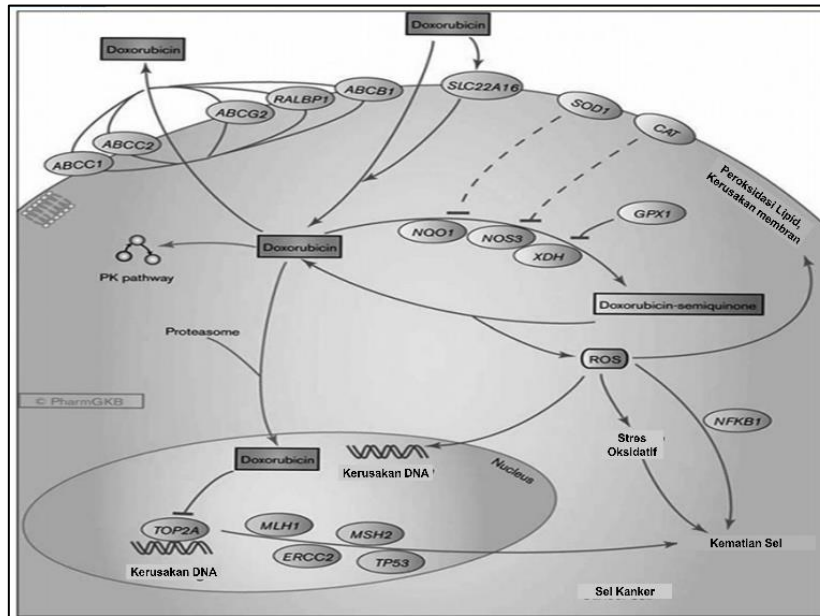
doxorubicine, cyclophosphamide (FAC). Penelitian-penelitian yang ada masih membuktikan bahwa kanker payudara cukup responsif terhadap terapi ini (katzung, 2012).

Tamoksifen mempunyai mekanisme kerja yang kompleks karena struktur molekulnya. Secara kimiawi sangat mirip dengan estrogen / estradiol namun estradiol adalah steroid mengandung karbon sedikit dan tamoksifen memiliki rantai karbon lebih banyak yang penting untuk aksi antagonisnya. Tamoksifen sendiri merupakan pro-obat dengan afinitas yang relatif rendah terhadap reseptor estrogen. Ini dimetabolisme oleh keluarga sitokrom P₄₅₀ (lebih khusus CYP2D6) menjadi metabolit aktif seperti endoksifen (4-OH-N-desmetil-tamoksifen). Menariknya, metabolit ini telah terbukti mengikat *estrogen receptor* (ER) dengan afinitas hampir 100 kali lipat lebih besar daripada tamoxifen. Tindakan pro- dan anti-estrogenik tamoxifen dimediasi oleh ikatan kompetitifnya dengan ER- α dan atau β yang kemudian mengalami perubahan konformasi. Kompleks inti yang membentuk mengubah ekspresi gen yang bergantung pada estrogen untuk menghasilkan banyak sinyal pemacu pertumbuhan baik di dalam maupun di luar nucleus (Sporn et. al., 2003).

2.1.5 Doxorubicin

Doxorubicin merupakan obat antikanker golongan anthracycline. Obat ini bekerja dengan menghambat enzim topoisomerase II, menghambat sintesis DNA dan RNA, menghasilkan radikal bebas semiquinone dan oksigen melalui proses reduksi, dan berikatan dengan membran seluler yang mengubah transpor ion dan cairan. Efikasinya meningkat jika diberikan secara kombinasi (Thorn, 2011)

Mekanisme aksi doxorubicin yang tepat masih kompleks dan masih belum jelas. Doksorubisin berinteraksi dengan DNA dengan interkalasi sehingga menghambat biosintesis makromolekul. Hal ini selanjutnya menghambat perkembangan enzim topoisomerase II, dan melemaskan superkoil dalam DNA untuk transkripsi. Doksorubisin menstabilkan kompleks topoisomerase II setelah ia memutuskan rantai DNA untuk replikasi, mencegah heliks ganda DNA disegel kembali dan dengan demikian menghentikan proses replikasi dapat dilihat pada **Gambar 2.5**. Mekanisme doksorubisin HCl lainnya adalah kemampuannya untuk menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan DNA dan membran sel (Rivankar, 2014).



Gambar 2.5 Mekanisme Kerja Doxorubicin

(Sumber: Rivankar, 2014, telah diolah kembali)

2.1.6 Sel *line* MCF-7

Cancer cell line MCF-7, kanker payudara jenis luminal A, menunjukkan gambaran histopatologis dengan reseptor estrogen positif, yang menandakan kanker jenis ini juga bergantung pada faktor hormonal (Kumar *et al.*, 2015). Pada kanker payudara reseptor estrogen positif, ditemukan juga amplifikasi gen BCL2, protein anti apoptosis yang berperan dalam resistensi sel kanker terhadap kemoterapi. Penelitian yang dilakukan oleh Wang dan Phang pada tahun 1995 menunjukkan adanya hubungan antara estrogen dengan amplifikasi gen BCL2 pada kanker payudara. Selain itu, MCF-7 juga menunjukkan adanya perubahan ekspresi pada protein kinase C berupa peningkatan aktivitas yang berperan dalam transduksi sinyal pada patogenesis dan progresi dari sel kanker. Mutasi genetik pada gen-gen inilah yang kemudian berperan dalam patofisiologi dan patogenesis dari kanker payudara, yaitu dengan menghambat respon pertahanan tubuh normal terhadap sel kanker (Fix, Shah, Efferth, Farwell, & Zhang, 2010).

Sel *line* MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang pertama kali diisolasi pada tahun 1970 dari jaringan kanker payudara adenocarcinoma pasien wanita usia 69 tahun. MCF-7 merupakan singkatan dari Michigan Cancer Foundation-7, yang 24 Universitas Indonesia merupakan suatu Institut di Detroit. Sel MCF-7 sangat berguna untuk penelitian *in vitro* kanker payudara karena sel ini memiliki beberapa karakteristik ideal terhadap epitel

kelenjar susu. Hal ini meliputi kemampuannya untuk memproses esterogen via reseptor esterogen. Sel MCF-7 juga sensitif terhadap sitokeratin. Ketika ditumbuhkan secara *in vitro*, sel ini akan tumbuh secara monolayer. Sel ini telah menghasilkan data yang banyak mengenai kanker payudara. Sel ini positif esterogen reseptor (ER) dan positif progesteron reseptor (PR) dan memiliki subtipe molekuler luminal A. Sel MCF-7 merupakan sel yang tidak agresif dan noninvasif, serta telah dipertimbangkan memiliki potensial metastatik yang rendah (Comsa *et al.*, 2015).

2.1.7 Sel *line* HeLa

Sel *Line* HeLa merupakan sel *line* manusia pertama yang dapat kultur, dan sejak saat itu telah banyak digunakan untuk penelitian biologi (Landry, *et al.*, 2013). Penerapannya telah memberikan kontribusi pada lebih dari 70.000 publikasi. Sel *line* ini berasal dari serviks seorang pasien yang menderita kanker serviks bernama Henrietta Lacks, yang kemudian meninggal pada tahun 1957. Salah satu penggunaan awal sel HeLa adalah untuk pengembangan vaksin terhadap virus polio (Landry *et al.*, 2013). Sel ini bersifat imortal dan produktif sehingga banyak digunakan dalam penelitian ilmiah (Watts and Denise, 2010).

2.1.8 Sel *line* WiDr

Sel *line* WiDr merupakan sel yang diisolasi dari kolon pasien wanita umur 78 tahun yang menderita kanker kolon primer. Sel WiDr memproduksi karsinoembrionik antigen dan membutuhkan waktu kurang lebih 15 jam satu siklus sel. Pada sel WiDr 25 Universitas Indonesia terjadi mutasi p53 GA pada posisi 273 sehingga terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin Hasil pengujian tumorigenisitas menunjukkan bahwa hewan uji yang diinokulasi dengan sel WiDr dapat meningkatkan volume tumor pada hewan uji normal (Noguchi *et al.*, 1979).

2.1.9 Sel *line* Vero

Sel Vero merupakan jalur sel (*continuous cell line*) yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Monyet ini merupakan salah satu jenis mamalia yang biasanya digunakan dalam penelitian biologi molekuler dan mikrobiologi. Salah satu penggunaan sel vero adalah dalam pembuatan vaksin. Sel Vero merupakan sel monolayer dan termasuk jenis *epithelial-like* (borhani, Beier-Sexton, & Azad, 2000). Sel ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren dan

membentuk ikatan kovalen. Sel Vero berbentuk poligonal dan pipih. Sel Vero sensitif terhadap infeksi SV-40, SV-5, campak, arboviruses, reoviruses, rubella, simian adenoviruses, poliovirus, virus influenza, virus Para-influenza, pernapasan virus syncytial, vaksinia, dan lainnya. Sel HepG2, yang mudah untuk menangani, mempertahankan banyak karakteristik morfologi hati sel parenkim dan mengandung beberapa enzim yang bertanggung jawab untuk aktivasi berbagai xenobiotik (Senthilraja & Kathilresan, 2015).

2.2 Reseptor Estrogen

Reseptor estrogen merupakan salah satu reseptor intraseluler (*nuclear receptor*) yang memperantarai aksi hormon 17β -estradiol (estrogen) di dalam tubuh. Estrogen, ketika berikatan dengan reseptornya, bekerja meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel sistem reproduksi baik pada wanita dan pria. Estrogen juga dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL, sehingga berpotensi mengurangi risiko penyakit kardiovaskular. Estrogen juga berperan penting pada perkembangan otak, penyakit autoimun, dan metabolisme tulang. Hal yang juga penting dari estrogen adalah dapat memicu pertumbuhan, proliferasi dan metastase berbagai tipe kanker (payudara, ovarium, colorectal, prostat, dan endometrial) (gao & Silveyra, 2019).

Ada dua sub tipe reseptor estrogen. Sub tipe pertama, reseptor estrogen α yang klasik, pertama kali diklon tahun 1986; dan sub tipe kedua, reseptor estrogen β ditemukan paling terkini. Kedua sub tipe reseptor ini bervariasi dalam struktur, dan gen-gen pengkode mereka di dalam kromosom-kromosom yang berbeda (Bourgoin-Voillard *et al.*, 2010).

Jika suatu reseptor estrogen berikatan dengan ligannya, maka akan terjadi perubahan konformasi reseptor yang memungkinkan berikatan dengan koaktivator. Kompleks estrogen-reseptornya kemudian akan berikatan dengan ERE yang terletak di dekat gen yang akan dikontrol transkripsinya. Setelah berikatan dengan suatu protein koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Aktivasi transkripsi gen tadi akan menghasilkan mRNA yang mengarahkan pada sintesis protein tertentu, yang kemudian mempengaruhi berbagai fungsi sel, tergantung sel targetnya. Ligan yang mengikat reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen untuk berikatan dengan reseptornya disebut *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs), suatu golongan obat yang cukup penting. Selektivitas ini mungkin dicapai karena ternyata reseptor estrogen pada jaringan berbeda bervariasi struktur kimianya, hal ini memungkinkan obat sejenis SERMs untuk berinteraksi secara selektif pada reseptor estrogen pada jaringan tertentu (Bourgoin-Voillard *et al.*, 2010).

ER subtype ER- α dan ER- β mempengaruhi perkembangan dan perkembangan kanker terkait hormon dengan mengarahkan fungsi biologis yang berbeda. ER- α berhubungan dengan proliferasi yang menyimpang, peradangan dan perkembangan keganasan. ER- β tampaknya menentang tindakan ER- α pada proliferasi sel dengan memodulasi ekspresi dari banyak gen yang diregulasi oleh ER- α dan menunjukkan antimigrator dan anti-invasif sifat dalam sel kanker (Thomas & Gustafsson, 2011). Mekanisme molekular reseptor estrogen dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.

ER- α diekspresikan terutama dalam uterus, hati, ginjal dan jantung dapat pula di ko-ekspresikan pada beberapa jaringan termasuk kelenjar susu, epididimis, tiroid, adrenal, tulang dan area otak. ER- α terletak pada lokus kromosomal 6q25.1. Fungsi transaktivasi ER- α dimediasi oleh dua transkripsi *activation functions* (AFs) yang memperbolehkan reseptor untuk menstimulasi transkripsi gen pengatur estrogen yaitu *N-terminal* ligan-independent *activation function* (AF-1) dan *C-terminal* ligan-dependent *activation function* (AF-2) terletak dalam ligan-binding domain (LBD) (Matthews, 2003).

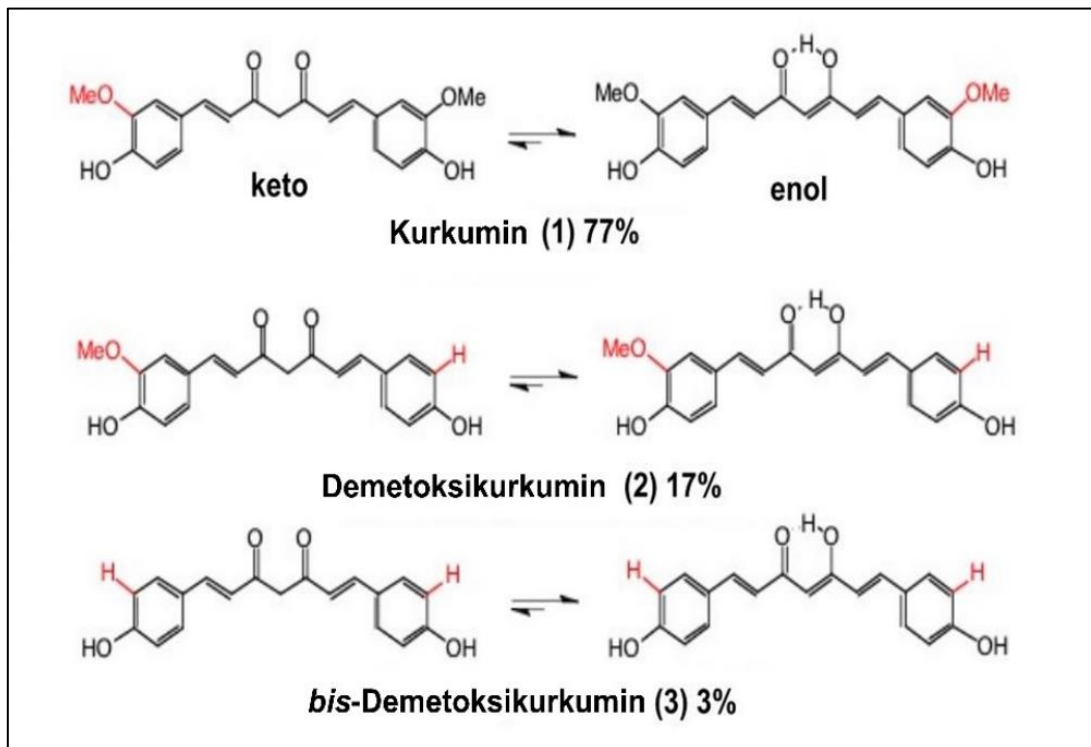
ER- α merupakan faktor kunci dalam perkembangan kanker payudara pada manusia. Ekspresi dan aktivitas ER- α diatur oleh banyak sinyal intraseluler dan ekstraseluler. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada keterkaitan antara ER- α dengan β -catenin. Penelitian Gupta *et. al.* (2011) menunjukkan adanya *cross-talk* antara β -catenin dan ER- α dalam sel kanker payudara manusia. Pelemahan β -catenin oleh RNAi menghasilkan penurunan yang signifikan dari mRNA ER- α dan atau level protein pada sel kanker payudara MCF-7, T-47D, dan BT-474 dan dalam pengurangan yang signifikan ekspresi estradiol dari gen target ER- α pS2 dan GREB1. Selain itu, pembungkaman β -catenin mengakibatkan penurunan pertumbuhan sel MCF-7 yang signifikan baik dengan tidak adanya maupun adanya estradiol. β -catenin dan ER- α tidak dapat di-immunopresipitasi oleh antibodi ER- α dari lisat sel. Disimpulkan bahwa β -catenin merupakan regulator positif ER- α mRNA dan ekspresi protein (Gupta, *et.al.*, 2011).

Pada penelitian Lombardi (2020), aktivasi ER- α juga berperan dalam invasi dan pertumbuhan sel PC-3 yang tidak bergantung pada penjangkaran. Efek ini diblokir oleh *pretreatment* dengan PKF 118–310, senyawa yang mengganggu kompleks β -catenin / TCF/LEF, menunjukkan bahwa ER/ β -catenin terlibat dalam semua karakteristik seluler perkembangan tumor secara *in vitro* (Lombardi, *et.al.*, 2020). Liu (2019) melaporkan bahwa reseptor estrogen (ERs) berpartisipasi dalam karsinogenesis dengan mengatur

langsung NOD-like receptors (NLRs). Hasil penelitian menunjukkan bahwa NLR dan ER diekspresikan secara berbeda pada jaringan neoplasma yang berbeda. Perbedaan ekspresi tersebut dapat mempengaruhi regulasi inflamasi dan tumorigenesis. Kesimpulan penelitian ini adalah ER dapat mengatur jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin pada kanker dengan menargetkan NLR (Liu, *et al.*, 2019). Penelitian Gao (2013) menyimpulkan pensinyalan ER bekerja secara sinergis dengan Wnt3A dalam mempromosikan diferensiasi osteogenik, Wnt3A dapat saling silang dengan pensinyalan ER dengan mengatur ekspresi ER α dan mengatur ekspresi ER- β dalam MPCs (Gao, *et al.*, 2013).

2.3 Kurkumin, dan Antikanker

Kurkumin (1,7-bis-4 (4'-hidroksi-3'-metoksi fenil) hepta-1,6-diene-3,5-dion) dikenal sebagai bahan alam berwarna kuning yang diisolasi dari *Curcuma longa*, L. Pertama kali ditemukan oleh Vogel dan Pelletier (Van Der Goot, 1997). Di alam kurkumin selalu terdapat bersama dengan dua turunan senyawa lainnya yaitu dimetoksi kurkumin dan bis-demetoksikurkumin, yang dikenal dengan nama kurkuminoid, struktur pada **Gambar 2.6** (Shetty *et al.*, 2015). Kurkumin praktis tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik, praktis tidak larut dalam air pada pH asam dan netral, larut dalam alkali dan sangat rentan terhadap perubahan pH. Kurkumin dapat larut dalam air dengan pH alkali karena gugus fenol pada kurkumin menyumbangkan unsur hidrogennya membentuk ion fenolat yang larut dalam air. Stabilitas kurkumin meningkat dalam kondisi asam dengan pH di bawah 6,5 namun stabilitasnya menurun seiring dengan peningkatan pH membentuk produk degradasi kurkumin yaitu asam ferulat dan vanillin. Kurkumin memiliki berat molekul 368,38 g/mol dengan titik lebur sekitar 183°C (Majeed *et al.*, 2014; Gantait, Barman, & Mukherjee, 2011; Kumavat *et al.*, 2013).



Gambar 2.6 Struktur Kurkumin di Alam

(Sumber: Shetty *et al.*, 2015, telah diolah kembali)

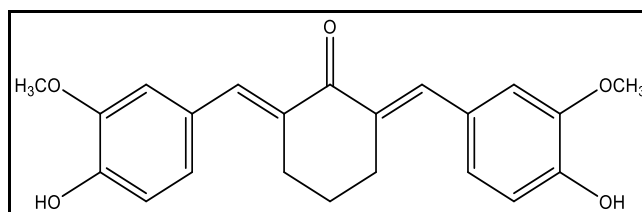
Kurkumin memiliki beberapa aktivitas biologis seperti, antiinflamasi, antioksidan, antiinfeksi, antikanker, dan untuk pengobatan luka (Wilken, Veena, Wang, & Srivatsan, 2011; Arfeen, Bhagat, Patel, Prasad, & Roy, 2016; Rainey, Motte, Aggarwal, & Petit, 2015). Kurkumin memodulasi karsinogenesis payudara melalui efeknya pada siklus sel dan proliferasi, apoptosis, penuaan, penyebaran kanker dan angiogenesis. Sebagian besar NFκB, PI3K / Akt / mTOR, MAPK dan JAK / STAT adalah jalur signaling kunci yang terlibat (Banik, Parasuraman, Adhikary, & Othman, 2017). Kurkumin mengalami metabolisme dalam tubuh menjadi senyawa yang lebih polar melalui reaksi glukuronidasi dan sulfatasi (Prasad, Tyagi, & Aggarwal, 2014). Studi yang dilakukan oleh Sharma, *et al.* (2007) menunjukkan rendahnya kadar kurkumin dalam plasma darah manusia setelah diberikan secara oral. Rendahnya bioavailabilitas dan ketidakstabilan kurkumin dalam larutan inilah yang kemudian membuat banyak peneliti melakukan berbagai upaya modifikasi guna menghasilkan analog kurkumin yang memiliki tingkat kestabilan dan bioavailabilitas yang lebih baik, namun tetap memiliki efek terapeutik yang besar.

Penelitian analog kurkumin banyak menunjukkan ktivitas terhadap antikanker diantaranya AKM dan Analog kurkumin monokarbonil asimetrik (AKMA) memiliki

kemampuan menghambat proliferasi sel kanker SMMC-7221, MCF-7, dan PC-3 lebih baik dari kurkumin (Li *et al.*, 2015). Sementara itu substitusi basa Mannich dietilamin pada cincin fenil AKM menunjukkan peningkatan aktivitas dan selektivitas sebagai antikanker (Yerdelen *et al.*, 2014). Basa Mannich berperan sebagai gugus farmakofor penting pada obat dengan potensi tinggi (Bala *et al.*, 2014) (Substitusi basa Mannich juga telah berhasil dilakukan pada kurkumin, pirazol kurkumin dan siklovalon (Untung *et al.*, 2017).

2.3.1 Pengembangan senyawa kurkumin monokarbonil sebagai antikanker

Modifikasi kurkumin menjadi analog kurkumin monokarbonil (AKM) dapat meningkatkan potensi 10-30 kali lipat dibandingkan kurkumin pada sejumlah *cell lines* dan protein-protein seluler. Derivat senyawa siklovalon telah diketahui mempunyai efek antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker (Mohd Aluwi *et al.*, 2016; Bayomi *et al.*, 2013; Bayomi *et al.*, 2015) dan mampu menghambat kerja siklooksigenase (COX) (Nurrochmad, 1998). AKM jauh lebih stabil pada pH 6,5, sehingga menunjukkan profil farmakokinetik lebih baik dan regresi tumor yang lebih besar dalam *xenografts* kanker *in vivo* dibandingkan kurkumin (Shetty, Kim, Shim & Snyder, 2015; Liang *et al.*, 2009). Senyawa gamavuton-0 (GVT-0) [1,5- *bis*(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on] (**Gambar 2.7**) merupakan salah satu senyawa analog kurkumin. Senyawa ini mempunyai jembatan rantai karbon yang lebih pendek (pentadienon) dari pada kurkumin (heptadiendion), satu gugus karbonil dan sama sekali tidak mempunyai gugus metilen. Senyawa ini lebih stabil pada pH di atas 6,5 dibandingkan dengan kurkumin dan tetap mempunyai sifat antioksidan. Senyawa ini mempunyai aktivitas antioksidan dan antiinflamasi (Masuda *et al.*, 1993; Sardjiman *et al.*, 1997; Sardjiman, 2000). Senyawa ini juga dilaporkan mempunyai aktivitas antitumor (Youssef and El-Sherbeny, 2005).

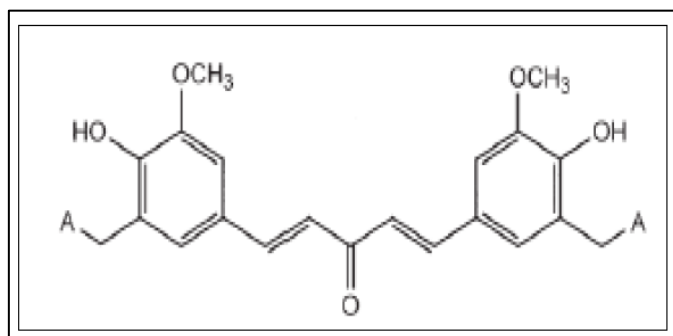


Gambar 2.7 Struktur Senyawa Gamavuton-0 (GVT-0)

(sumber : Sardjiman *et al.*, 1997)

Sementara itu substitusi cincin fenil AKM dengan basa Mannich menunjukkan peningkatan aktivitas dan selektivitas sebagai antikanker dan basa Mannich dietilamin

(**Gambar 2.8**) merupakan salah satu senyawa dengan aktivitas terbaik (Yerdelen, Gul, Sakagami & Umemura, 2014). Basa Mannich berfungsi sebagai gugus farmakofor penting pada obat dengan potensi tinggi (Bala, *et al.*, 2014; Subramaniapillai, 2013). Substitusi basa Mannich pada pirazol kurkumin menghasilkan senyawa yang mempunyai kelarutan lebih baik dibandingkan kurkumin dan kurkumin pirazol (Hayun, Iskandarsyah & Untung, 2015).



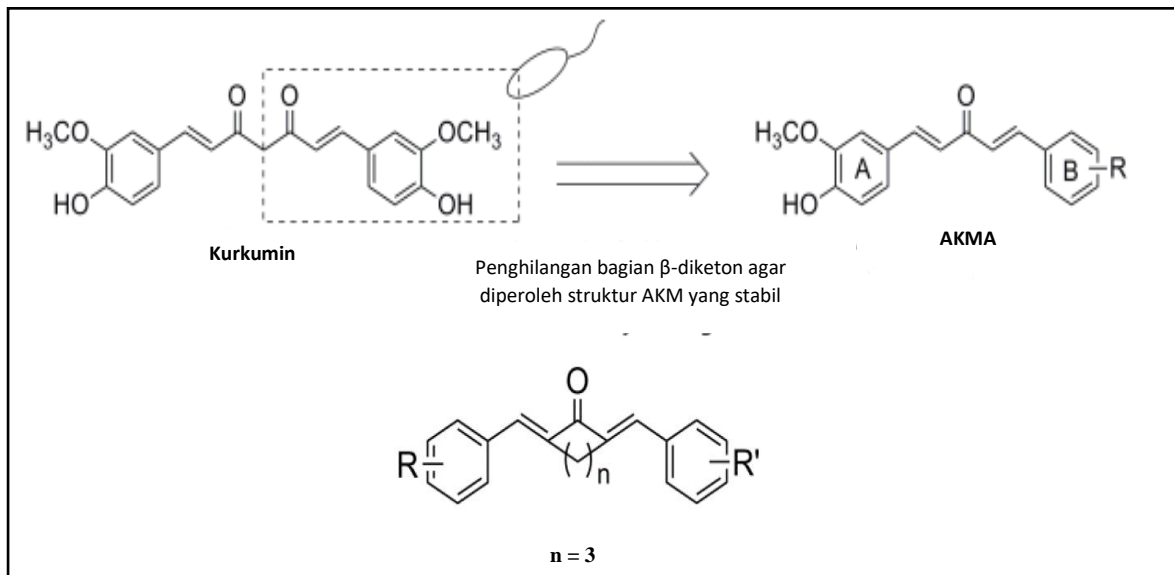
Gambar 2.8 Analog Kurkumin Monokarbonil Tersubstitusi Basa Mannich (Aminometil,A)

(Sumber : Yerdelen, Gul, Sakagami & Umemura, 2014)

2.3.2 Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik (AKMA), Analog Kurkumin Indazol (AKI) dan Antikanker

Riset-riset pengembangan AKM asimetrik (AKMA) dengan gugus fungsi pada kedua cincin fenil berbeda masih sedikit (Zao, Liu & Liang, 2013). Beberapa AKMA menunjukkan aktivitas anti inflamasi (Zhang *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2014b). Qingyong Li (2015) telah melakukan desain dan sintesis dari 12 senyawa analog monokarbonil kurkumin asimetrik dan lima senyawa analog monokarbonil kurkumin simetrik, berdasarkan hasil pengujian, seluruh senyawa yang disintesis memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan Vitamin C (Li *et al.*, 2015). Seluruh senyawa analog yang disintesis menunjukkan performa yang baik sebagai anti proliferasi jika dibandingkan dengan kurkumin pada sel kanker SMMC-7221, MCF-7, dan PC-3. Substitusi basa Mannich pada AKM simetrik terjadi pada kedua cincin fenil senyawa tersebut pada posisi *orto* dari gugus hidroksi (Yerdelen, Gul, Sakagami & Umemura, 2014; Hayun, Iskandarsyah & Untung, 2017). Hal tersebut menyebabkan peningkatan bobot molekul (BM) yang besar. BM > 500 dalton merupakan salah satu penyebab penghambatan permeabilitas pada membran biologis (Lipinski *et al.*, 1997). Aktivitas antikanker dua senyawa AKMA tersubstitusi basa Mannich dietilamin yaitu senyawa yang salah satu cincin fenilnya tidak tersubstitusi atau tersubstitusi metil menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada sel HeLa, sel MCF-7 setara cisplatin tetapi

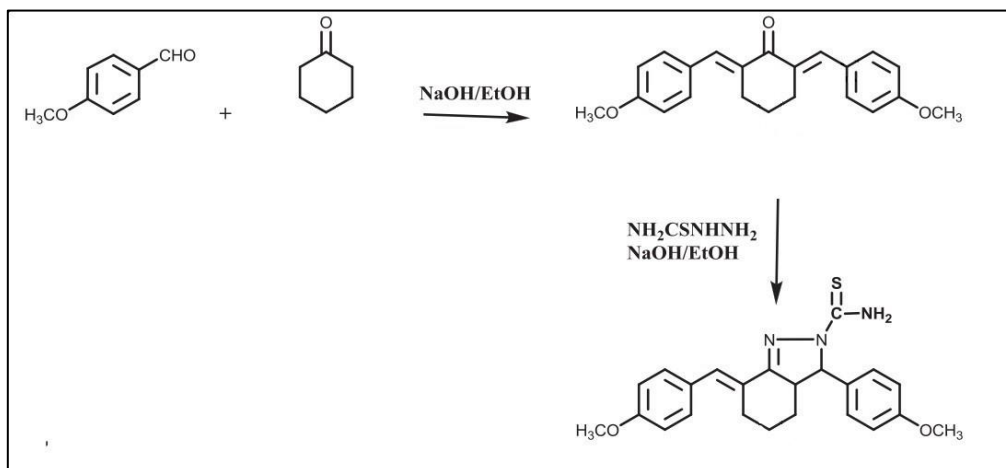
mempunyai toksisitas pada sel secara umum lebih rendah (Prasetyaningrum *et al.*, 2017). Senyawa aminometil dari kurkumin asimetris tersubstitusi metil menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi dan selektif terhadap kanker kolorektal (Kurnia *et al.*, 2019).



Gambar 2.9 Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik. $R \neq R'$

(Sumber: Zhang *et al.*, 2014a, telah diolah kembali)

Pengembangan senyawa AKM simetris telah dilanjutkan dengan memodifikasi struktur monokarbonil menjadi struktur heksahidro-2H-indazol pada beberapa penelitian menjadi analog kurkumin heksahidro-2H-heksahidro-2H-indazol (AKI) (**Gambar 2.10**) dan telah menunjukkan aktivitas antioksidan dan antitumor yang baik pada senyawa Analog Kurkumin Heksahidro-2H-Indazol pada sel Hep G2, WI38, VERO and MCF-7) (Bayomi *et al.*, 2015; Bayomi *et al.*, 2013). Beberapa penelitian juga menunjukkan aktivitas antikanker yang baik pada senyawa hasil modifikasi dengan gugus indazol (Reddy *et al.*, 2014; Plescia, Raffa, Plescia, & Casula, 2010).



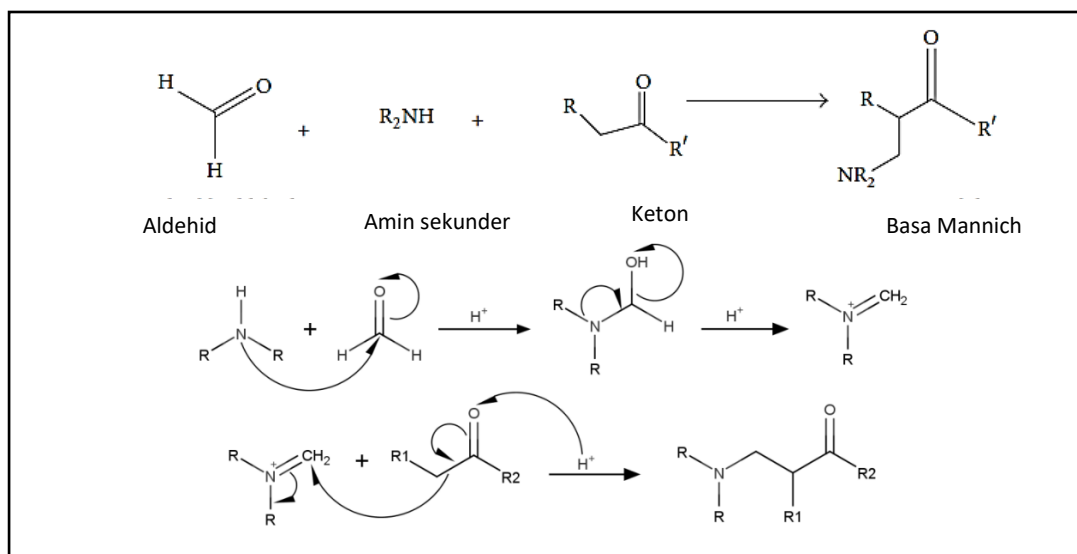
Gambar 2.10 Sintesis Analog Kurkumin Heksahidro-2H-Indazol (AKI) simetrik.
(Sumber: Bayomi *et al.*, 2015 telah diolah kembali).

2.4 Senyawa Derivat Indazol dan Aktivitas Antikanker

Indazol dan analognya adalah bagian struktur penting dengan berbagai aktivitas farmakologis. Ada minat yang meningkat dalam pengembangan senyawa yang mengandung bagian indazol untuk melawan berbagai jenis penyakit. Berbagai gugus bioaktif dapat dengan mudah dimasukkan ke dalam turunan indazol dan sejumlah pengembangan obat dan evaluasi aktivitas biologisnya termasuk aktivitas penghambatan sitotoksik terhadap sel kanker payudara, kanker serviks, dan kanker kolorektal (Zhang *et al.*, 2018). Penelitian Reddy (2018) terhadap sintesis senyawa analog Benzotiazol-1H-indazol menunjukkan aktivitas penghambatan sitotoksik tinggi terhadap sel kanker payudara MCF-7, sel kanker paru A549, sel kanker melanoma A375, dan sel kanker kolon HT-29 (Reddy *et al.*, 2018). Penelitian Solano (2020) senyawa Diarylurea berbasis N-fenilindazol baru telah dirancang, disintesis dan dievaluasi sebagai agen antikanker potensial. Studi viabilitas sel *in vitro* dari turunan ini menggambarkan potensi yang baik dengan nilai IC₅₀ dalam kisaran 0,4–50 µM di beberapa sel kanker termasuk kanker payudara metastasis murine 4T1, murine glioblastoma GL261, kanker payudara triple negative manusia MDA-MB-231, manusia kanker pankreas MIAPaCa-2, dan sel kanker kolorektal WiDr. Sepuluh novel hidrazida-hidrazon terkait indole dan indazol dirancang dan disintesis. Semua senyawa yang disintesis dievaluasi sitotoksitasnya terhadap empat sel kanker manusia (HeLa, MDA-MB-231, MCF-7, dan A549). Tiga dari senyawa hasil sintesis menunjukkan sitotoksitas yang menjanjikan khususnya pada beberapa sel yang diuji dengan nilai IC₅₀ berkisar antara 1,93 dan 25,6 µM (Sreenivasulu *et al.*, 2017).

2.5 Substitusi Basa Mannich

Reaksi Mannich adalah reaksi adisi nukleofilik yang melibatkan kondensasi dari senyawa dengan hidrogen aktif dengan amina (primer atau sekunder) dan aldehid (formaldehid atau paraformaldehid) (**Gambar 2.11**). Basa Mannich berfungsi sebagai gugus farmakofor penting yang selanjutnya digunakan untuk sintesis dari berbagai agen terapi dengan potensi tinggi yang memiliki rantai aminoalkil. Selain sebagai gugus farmakofor yang penting, adanya rantai samping Mannich dapat meningkatkan kelarutan sehingga meningkatkan bioavailabilitas dari molekul obat (Subramaniapillai, 2013). Kelarutan suatu senyawa dalam air dapat meningkat dengan adanya atom nitrogen yang terkuarternisasi dalam derivat aminometil. Atom nitrogen yang terdapat dalam gugus basa Mannich dapat terionisasi, maka dapat meningkatkan kelarutan senyawa organik dalam air (Roman, 2015). Beberapa contoh obat yang dengan basa Mannich antara lain yaitu kokain, fluoxetine, atropin, asam ethakrinat, triheksifenidil, prosiklidin, ranitidin, biperiden, dan sebagainya (Bala *et al.*, 2014; Subramaniapillai, 2013).



Gambar 2.11 Mekanisme Reaksi Mannich

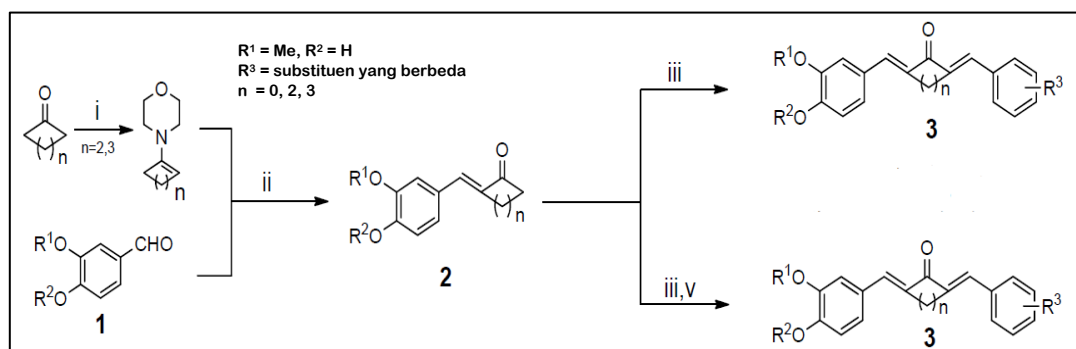
(Sumber: Bala *et al.*, 2014, telah diolah kembali)

Substitusi basa Mannich pada pirazol kurkumin menghasilkan senyawa yang mempunyai kelarutan lebih baik dibandingkan kurkumin dan kurkumin pirazol, sedangkan bioaktivitasnya masih dalam proses pengujian (Hayun, Iskandarsyah & Untung, 2015). Selain itu, substitusi basa Mannich morfolin, metilpiperazin, piperidin dan pirolidin pada diklofenak, asam mefenamat dan sejumlah senyawa fenolik (benzofenon, kalkon)

meningkatkan aktivitas antiinflamasinya (Bandgar & Hote, 2012; Roman, 2015). Substitusi basa Mannich pada AKM simetrik dapat menyebabkan peningkatan bobot molekul (BM) yang besar. BM > 500 dalton merupakan salah satu penyebab penghambatan permeabilitas pada membran biologis (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1997). Basa Mannich dan turunannya merupakan intermediet untuk sintesis molekul bioaktif dan reaksi Mannich banyak digunakan untuk pembentukkan senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen (Kurnia, *et al.*, 2018).

2.6 Sintesis Analog Kurkumin Monokarbonil Asimetrik (AKMA)

Studi yang dilakukan Zhang *et al* (2014) menunjukkan bahwa sintesis AKMA dapat dilakukan mengikuti skema pada **Gambar 2.12**. Reagen kimia dan kondisi yang diperlukan adalah: (i) Asam p-toluen sulfonat (p-TSA), sikloheksan, 90°C, refluks, 4 jam. Pelarut diuapkan diperoleh senyawa enamin berupa cairan kental berwarna kuning, yang kemudian segera direaksikan dengan senyawa **1** dengan kondisi: (ii) etanol, 90°C, refluks, 4 jam, larutan HCl jenuh. Pelarut diuapkan, diperoleh residu produk senyawa **2** yang kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom. Senyawa **2** kemudian direaksikan dengan senyawa aldehid yang mempunyai substitusi berbeda dengan kondisi: (iii) gas HCl, etanol, 50-70°C, refluks, 3-5 jam. Campuran reaksi kemudian dituangkan ke dalam air es, endapan disaring dan dimurnikan akan diperoleh senyawa **3**. Pada reaksi ini menggunakan keton siklik [siklopentanon ($n=2$) atau sikloheksanon ($n=3$)].



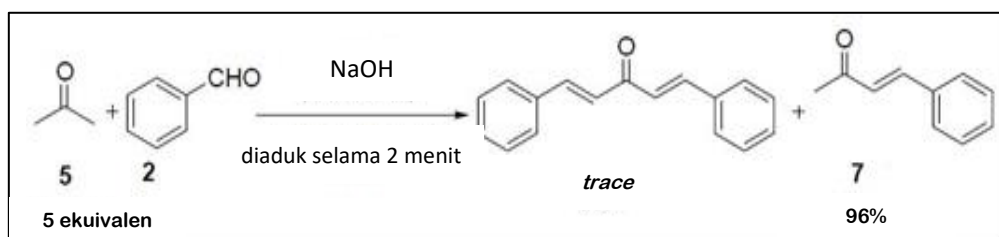
Gambar 2.12 Sintesis AKMA

(Sumber: Zhang *et al.*, 2014, telah diolah kembali)

Selain dengan membentuk senyawa enamin pada tahap awal sintesis salah satu rantai AKMA, sintesis tahap awal AKMA juga dapat dilakukan dengan langsung mereaksikan aseton atau sikloalkanon dengan benzaldehida atau turunannya seperti metode yang

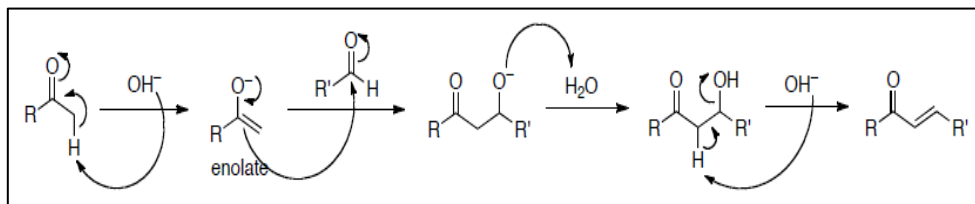
dilakukan oleh Furniss *et al.* (1989). Berdasarkan metode tersebut, benzilidenaseton dapat disintesis dengan mencampurkan benzaldehida 42,5 gr (40,5 ml, 0,4 mol) dan aseton 63,5 gr (80 ml, 1,1 mol) dengan penambahan NaOH 10% sebanyak 10 ml secara perlahan dalam waktu 30 menit agar suhu dalam campuran tersebut tetap berada pada suhu antara 25-30°C. Selanjutnya campuran diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 2 jam, dinetralkan dengan HCl cair, dan dipindahkan ke dalam corong pisah. Lapisan organik pada bagian atas dipisahkan dan lapisan air pada bagian bawah lalu diekstrak dengan 20 ml toluen. Ekstrak tersebut kemudian ditambahkan ke dalam lapisan organik berwarna kuning, dipisahkan, lalu dicuci dengan aquadest dan dikeringkan dengan sedikit magnesium sulfat. Selanjutnya dilakukan distilasi pada tekanan atmosfer untuk menghilangkan toluen dan residu yang diperoleh didistilasi dengan tekanan yang lebih rendah.

Studi yang dilakukan oleh Rahman *et al.* (2012) juga menunjukkan bahwa senyawa (*E*)-4-Fenilbut-3-en-2-on atau benzilidenaseton (**7**) 96% dapat disintesis dengan mereaksikan aseton (**5**) berlebih (5 ekuivalen) dengan benzaldehida (**2**) (1 ekuivalen) tanpa pelarut dengan katalis padatan natrium hidroksida (basa) (**Gambar 2.13**). Senyawa produk (**7**) yang diinginkan kemudian dimurnikan dengan metode *flash* kromatografi dengan silika gel sebagai fase diam. Sintesis benzilidenaseton melibatkan reaksi kondensasi Claisen-Schmidt yang merupakan kondensasi aldol di mana konversi antara aromatik aldehyd dan keton membentuk β -hidroksi keton dengan katalis asam atau basa, yang selanjutnya terjadi dehidrasi sehingga membentuk keton tidak jenuh.



Gambar 2.13 Kondensasi Claisen-Schmidt antara Aseton dengan Benzaldehida Tanpa Pelarut dengan Katalis Padatan NaOH

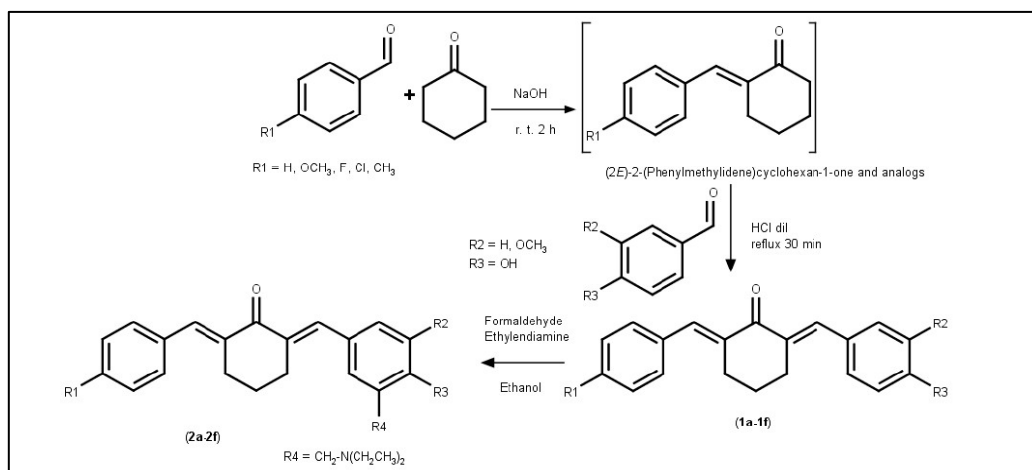
(Sumber: Rahman, Ali, Jahng, & Kadi, 2012, telah diolah kembali)



Gambar 2.14 Mekanisme Reaksi Kondensasi Claisen-Schmidt dalam Suasana Basa

(Sumber: Crowley, 2007, telah diolah kembali)

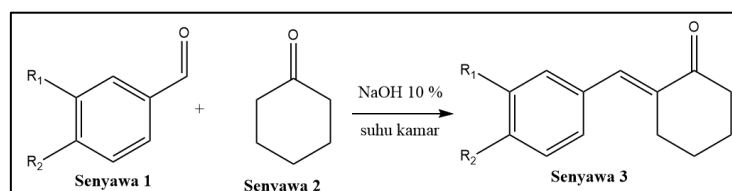
Studi yang dilakukan pada kelompok penelitian kami telah berhasil melakukan sintesis senyawa AKMA dengan mengadopsi metode Furniss *et al.* (1989) pada dua tahap reaksi (Prasetyaningrum, Bahtiar, & Hayun, 2018). Mekanisme reaksi yang terjadi sebagai berikut:



Gambar 2.15 Mekanisme reaksi pembuatan senyawa AKMA

(Sumber: Prasetyaningrum *et al.*, 2018)

Pada penelitian Garepalli 2018 menunjukkan pemkain kondisi basa (NaOH) dan memberikan produk sama tetapi menghasilkan reaksi yg lebih sederhana dan produk yang lebih stabil dan rendemen yang baik. Reaksi yang terjadi pada **Gambar 2.16** (Garepalli, 2016).

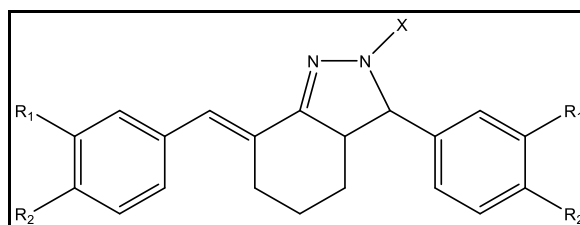


Gambar 2.16 Mekanisme reaksi kondensasi tahap 1

2.7 Sintesis Analog Kurkumin Heksahidro/Tetrahydro--Indazol (AKI)

Senyawa 7-(benziliden-tersubstitusi)-3-(fenil-tersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol merupakan senyawa turunan senyawa siklovalon. Penelitian Wasi (2013) menginformasikan senyawa tersebut dibuat dengan mereaksikan siklovalon dengan hidrazine dengan bantuan radiasi gelombang mikro. Prinsip reaksi yang terjadi adalah reaksi adisi nukleofilik gugus karbonil pada siklovalon dan amina primer pada hidrazin terbentuk senyawa imina. Senyawa ini juga memberikan hasil yang sangat baik dalam melawan bakteri *Multi Drug Resistance* (MDR). Penelitian Bayomi *et al.* juga menunjukkan aktivitas antikanker baik secara *in vitro* maupun *in vivo* meningkat ketika AKM dimodifikasi dengan senyawa hidrazin tersubstitusi menjadi Analog Kurkumin Indazol (AKI) (Bayomi *et al.*, 2015). Aktivitas antikanker AKI asimetrik belum diketahui.

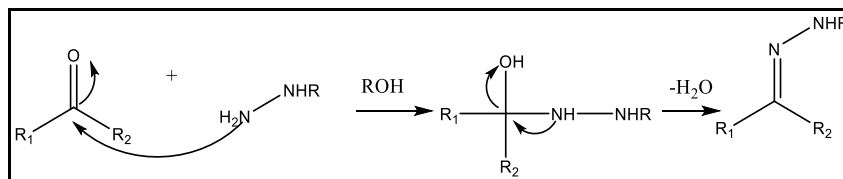
Sintesis senyawa AKI dapat dilakukan berdasarkan Bayomi *et al.*, 2013. Metode umum untuk sintesis AKI adalah senyawa AKI simetrik (1 mmol), dan hidrazin hidrat (1 ml, 20 mmol) dalam etanol absolut (15 ml) dipanaskan pada refluks sambil diaduk selama 21 jam. Campuran reaksi kemudian diuapkan, dan residu yang diperoleh dicuci dengan air, disaring, dikeringkan, dan direkristalisasi dari etanol untuk menghasilkan senyawa target.



Gambar 2.17 Struktur 7-(benziliden tersubstitusi)-3-(fenil tersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol

(Sumber: Wasi, Sharma, Gupta, & Intodia, 2013)

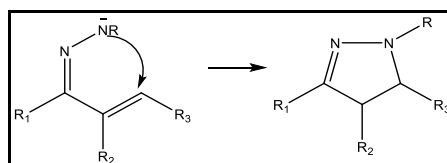
Mekanisme reaksi yang terjadi pada pembentukan senyawa AKI adalah melalui 2 mekanisme reaksi yaitu reaksi kondensasi gugus karbonil keton dengan senyawa nukleofil nitrogen dan sikloadisi 1,3 dipolar intramolekular. Mekanisme pertama merupakan pembentukan senyawa imina dapat digambarkan seperti pada **Gambar 2.18** sebagai berikut:



Gambar 2.18 Skema reaksi kondensasi gugus keton dengan senyawa nukleofil nitrogen

(Sumber: Carey & Sundberg, 2007, telah diolah kembali)

Mekanisme kedua melalui mekanisme sikloadisi 1,3 dipolar intramolekular dapat digambarkan seperti pada **Gambar 2.19** sebagai berikut:



Gambar 2.19 Skema reaksi sikloadisi 1,3-dipolar dengan azometin imina

(Sumber: Nájera, Carmen; Sansano, José M; Yus, 2015, telah diolah kembali)

2.8 CADD (*Computer Aided Drug Design*)

Pendekatan komputasi dalam desain obat, proses penemuan dan pengembangan mendapatkan eksplorasi, implementasi, dan kekaguman yang sangat cepat. Penemuan obat baru adalah proses yang sangat kompleks, berisiko dan mahal dalam hal waktu, uang, dan tenaga kerja. Metode desain obat berbantuan komputer/*computer-aided drug design* (CADD) banyak digunakan sebagai pendekatan desain obat baru. Telah terlihat bahwa dengan menggunakan pendekatan CADD kita dapat mengurangi biaya penemuan dan pengembangan obat hingga 50%. CADD terdiri dari penggunaan proses berbasis program perangkat lunak apa pun untuk menetapkan standar yang menghubungkan aktivitas dengan struktur (Talevi, 2018).

Virtual screening atau *in silico* dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi jumlah senyawa kimia yang sangat besar (pada umumnya, sebuah database senyawa kimia berisi 102-1015 senyawa) secara virtual hingga diperoleh jumlah yang sangat kecil untuk kemudian akan disintesis dan dianalisis lebih lanjut sampai diperoleh beberapa kandidat obat untuk target protein yang diharapkan. Meskipun penggunaan metode komputasi telah dimulai sejak tahun 1970-an, namun, teknik *virtual screening* baru dipergunakan pada tahun 1972. Sejak saat itu, beberapa fakta sukses yang didapatkan dari aplikasi teknik ini pada beberapa studi kasus penyakit tertentu serta ditemukannya beberapa obat baru (dan telah

disetujui oleh institusi yang berwenang, seperti FDA di Amerika) menunjukkan adanya relevansi antara beberapa keberhasilan tersebut dengan CADD, salah satunya adalah melalui penggunaan teknik *virtual screening*. Selain itu, teknik *virtual screening* juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi beberapa senyawa kimia baru yang relevan untuk menggantikan peranan suatu obat. Ada dua metode dalam perancangan senyawa obat baru yang menggunakan penapisan *in silico*, yaitu metode berdasarkan struktur target baik berupa enzim maupun reseptor yang bertanggung jawab atas toksisitas atau aktivitas suatu senyawa di dalam tubuh (*structure-based drug design*) dan metode yang didasarkan pada senyawa yang diketahui berikatan dengan target atau dikenal sebagai ligan (*ligand-based drug design*).

2.8.1 SBDD (*Structure-Based Drug Design*)

Dalam SBDD, struktur protein target diketahui dan interaksi atau bio-afinitas untuk semua senyawa yang diuji (Talevi, 2018). Metode kimia komputasi SBDD memanfaatkan informasi dari struktur protein target guna mencari sisi aktif protein yang berkaitan dengan senyawa. Prediksi sisi aktif sebagai dasar perancangan senyawa yang diharapkan berikatan dengan protein target tersebut dan memiliki aktivitas biologis yang menunjukkan interaksi yang lebih baik dengan protein target. Pemanfaatan informasi dari struktur target maupun sifat fisikokimia ligan, dapat dilakukan penapisan uji interaksi senyawa-senyawa yang diketahui aktif (ligan) pada sisi aktif protein, dan informasi yang diperoleh maka perancangan senyawa baru diharapkan lebih poten dari senyawa yang sudah ada. (Pranowo & Hetadi, 2011).

Penambatan molekul adalah metode *in silico* yang memprediksi penempatan molekul kecil atau ligan dalam situs aktif protein target mereka (reseptor). Itu terutama digunakan untuk estimasi akurat dari mode pengikatan yang paling menguntungkan dan bio-afinitas ligan dengan reseptornya, saat ini telah secara luas diterapkan pada penyaringan virtual untuk optimalisasi senyawa (Talevi, 2018). Penambatan molekul digunakan untuk memperoleh suatu perkiraan dan orientasi ikatan ligan, afinitas ikatan dan peran dari bahan pelarut di dalam interaksi ligan-protein, untuk menentukan apakah dua molekul saling berinteraksi. Penambatan molekul dapat digunakan untuk memilih substrat protein spesifik yang potensial dari sejumlah besar database kimia dan untuk meramalkan ADME (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Ekskresi) dari obat-obat baru dan calon obat. Keuntungannya adalah tidak menghabiskan uji, pelarut dan tidak meninggalkan residu kimia yang beracun bagi lingkungan hidup. Metode docking dapat memprediksikan struktur 3D dari kompleks

ligan protein. Ligan dapat melekat pada binding site protein, sehingga interaksi intramolekuler dapat dipelajari. Metode komputasi docking mempunyai potensi sebagai penapisan virtual. Alat-alat komputasional harus otomatis, cepat dan data dipercaya dalam memperkirakan hubungan kompleks-protein ligan sesuai dengan tempat ikatannya.

2.8.2 LBDD (*Ligand-Based Drug Design*)

LBDD adalah metode kimia komputasi berdasarkan informasi sifat fisikokimia senyawa dapat dikalkulasi dengan bantuan komputer guna menurunkan suatu persamaan yang dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa (Purnomo, 2009). Dalam LBDD, struktur 3D dari protein target tidak diketahui tetapi pengetahuan tentang ligan yang mengikat dengan yang diinginkan situs target diketahui. Ligan ini dapat digunakan untuk mengembangkan model atau molekul farmakofor yang memiliki semua fitur struktural yang diperlukan untuk mengikat ke situs aktif target. Secara umum teknik berbasis ligan adalah pendekatan berbasis farmakofor dan hubungan aktivitas struktur-kuantitatif (QSAR). Dalam LBDD diasumsikan bahwa senyawa yang memiliki kesamaan dalam strukturnya juga memiliki aksi biologis dan interaksi yang sama dengan protein target (Talevi, 2018).

1. Pemetaan Farmakofor

Farmakofor merupakan posisi geometrik tiga dimensi dari gugus-gugus yang terdapat di dalam suatu ligan yang membentuk suatu pola yang unik yang dapat dikenali oleh reseptor secara spesifik yang bertanggung jawab terhadap proses pengikatan ligan dengan suatu reseptor dan aktivasi reseptor tersebut (Thomas, 2007). Farmakofor mempunyai beberapa komponen berupa atom atau gugus fungsi spesifik seperti cincin aromatic, akseptor atau donor ikatan H dan pusat muatan hubungan geometri antar gugus fungsi. Farmakofor juga memperhitungkan jarak sudut ikatan dan sudut torsi dari struktur 3D (Jorgensen, 2004).

2. Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA)

Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) merupakan sebuah usaha, yang termasuk di dalam *Ligand Based Drug Design* (LBDD) yang digunakan untuk menganalisa hubungan antara deskriptor-deskriptor fisika kimia terhadap aktivitas biologis yang ditimbulkannya, untuk mengurangi faktor keberuntungan dari proses penemuan. Struktur tiga dimensi (3D) yang tidak ada pada target obat potensial, sehingga desain obat berbasis ligan (LBDD) adalah salah satu pendekatan populer untuk penemuan obat dan pengoptimalan senyawa penuntun. Hubungan aktivitas struktur 3D (3D QSAR) dan pemodelan farmakofor adalah alat yang paling penting dan banyak digunakan dalam desain

obat berbasis ligan yang dapat memberikan wawasan penting tentang sifat interaksi antara target obat dan molekul ligan dan memberikan model prediksi yang sesuai untuk optimasi senyawa penuntun. QSAR menggunakan parameter-parameter fisika-kimia yang diduga memiliki pengaruh besar pada aktivitas biologis dari suatu obat. Parameter-parameter di dalam QSAR haruslah merupakan sifat-sifat fisika-kimia yang dapat direpresentasikan dengan nilai yang berupa angka-angka. Hubungan kuantitatif struktur aktivitas atau QSAR memadukan statistika dengan sifat fisikokimia senyawa yang diprediksi dengan bantuan komputer untuk menurunkan suatu persamaan yang digunakan untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa. Predictor yang digunakan dalam studi QSAR diperoleh dari hasil pengukuran (*measurable*) seperti kerapatan, energy ionisasi, titik didih, masa molekul, momen dipol, tetapan keasaman dan lipofilisitas. Nilai-nilai tersebut digunakan untuk menghasilkan persamaan-persamaan umum (general) yang menunjukkan hubungan sifat-sifat fisika-kimia dengan aktivitas biologisnya (Muhammad, 2018)

2.9 Pemodelan Farmakofor

Konsep dasar farmakofor telah dipelajari selama satu dekade, dan penggunaan teknik pemodelan farmakofor sebagai sarana untuk penemuan obat baru meningkat sejak studi CADD. Menurut pengertian IUPAC tahun 1998 (Union, Pure, & Chemistry, 1998), farmakofor adalah bagian dari fitur sterik dan elektronik yang diperlukan untuk memastikan interaksi supermolekular yang optimal dengan struktur biologi yang spesifik dan untuk memicu atau memblok respon biologis. Terdapat beberapa macam fitur farmakofor yang biasa digunakan, yaitu diantaranya adalah donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hirogen, hidrofobik, dan area-area yang terionisasi negatif maupun positif. Sebuah fitur farmakofor menggambarkan sebuah sifat tertentu dan tidak terikat hanya oleh suatu gugus tertentu saja. Dengan demikian, gugus-gugus yang mempunyai sifat yang sama akan mempunyai fitur farmakofor yang sama (Wermuth *et al.*, 1998).

Pemodelan farmakofor sangat berguna dalam skrining virtual, terutama jika informasi tentang target sangat kurang (dengan menggunakan *ligan-based pharmacophore*). Bahkan jika informasi tentang target tersedia cukup lengkap, penggunaan farmakopor sangat berguna untuk mengurangi waktu dalam skrining virtual secara signifikan, karena skrining dengan pemodelan farmakofor dapat mengeliminasi senyawa-senyawa yang tidak memiliki fitur-fitur farmakofor yang sesuai dengan cepat. Berdasarkan cara pembuatannya farmakofor dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu farmakofor yang dibuat berdasarkan fitur-fitur

kimia yang *overlap* dari sekumpulan ligan-ligan aktif yang telah dijabarkan secara fleksibel (*ligand-based pharmacophore*) dan farmakofor yang dibuat berdasarkan kesamaan interaksi antara ligan-ligan dengan situs aktif reseptornya (*structure-based pharmacophore*) (Wolber *et al.*, 2008). *Structure-based pharmacophore* dapat dibedakan lebih lanjut menjadi dua sub-kategori, yaitu: *macromolecule-ligan complex based* (berdasarkan kompleks reseptor dengan ligan) dan *macromolecule based* (hanya berdasarkan struktur reseptor saja) (Yang, 2010).

2.9.1 Ligand Based Pharmacophore

Ligand Based Pharmacophore atau pemodelan farmakofor berbasis ligan menjadi kunci dari strategi komputasional untuk memfasilitasi penemuan obat saat target struktur makromolekulnya belum diketahui. Pada pemodelan farmakofor berbasis ligan, fitur kimia umum dari struktur 3D dari set ligan yang telah diketahui yang mempresentasikan interaksi esensial antara ligan dengan makromolekul target yang spesifik. Secara umum, pembentukan farmakofor dari multi ligan (disebut sebagai senyawa *training set*) yang meliputi dua langkah utama yaitu pembuatan ruang konformasi untuk setiap ligan pada training set untuk mempresentasikan fleksibilitas konformasi ligan, dan mengatur multi ligan pada training set dan mendeterminasikan fitur kimia umum yang esensial untuk mengkonstruksi model farmakofor. Pengaturan fleksibilitas konformasional ligan mengkonduksi alignment molecular mempresentasikan teknik kunci juga merupakan pemodelan farmakofor berbasis ligan (Yang, 2010; Kumar P, Singh, Sharma, Mukta, & Anupama, 2015).

Saat ini berbagai generator farmakofor otomatis telah dikembangkan, termasuk *software* komersial telah tersedia, antara lain Hypogen (Accelrys Inc., <http://www.accelrys.com>) (Li *et al.*, 2000), MOE (*Chemical Computing Group*, <http://www.chemcomp.com>) dan beberapa program akademik lainnya.

2.9.2 Structure based Pharmacophore

Structure based Pharmacophore atau pemodelan farmakofor berbasis struktur bekerja secara langsung dengan struktur 3D dari target makromolekular atau kompleks makromolekul ligan. Protokol pemodelan farmakofor berbasis struktur melibatkan analisis komplemen fitur kimia pada situs aktif dan hubungan spasialnya, serta subsekuen model farmakofor dengan fitur yang telah dipilih. Metode pemodelan farmakofor berbasis struktur

lebih lanjut dapat diklasifikasikan ke dalam dua sub kategori: kompleks makromolekul ligan dan makromolekul tanpa ligan. Pendekatan kompleks makromolekul-ligan adalah menempatkan situs ikatan ligan pada target makromolekul dan mendeterminasi poin interaksi kunci antara ligan makromolekul (Yang, 2010). Contoh *software* yang digunakan untuk pemodelan farmakofor berbasis struktur adalah LigandScout (Wolber & Langer, 2005), Pocket v.2 (Chen & Lai, 2006) dan GPBM (Ortuso, Langer, & Alcaro, 2006). LigandScout merupakan software dengan representasi terbaik untuk kompleks makromolekul-ligan.

2.10 Validasi berdasarkan nilai RMSD

Validasi metode pada penambatan molekular dilakukan dengan melakukan penambatan ligan ko-kristal pada reseptor. Ligan ko-kristal dibuat seperti halnya pada preparasi senyawa uji. Validasi metode penambatan yang dilakukan dengan *redocking* ligan ko-kristal pada *binding site*. Nilai RMSD $\leq 2,0$ dianggap sebagai acuan dalam simulasi docking, apabila RMSD $\leq 2,0$ maka bias maju ke langkah selanjutnya, jika tidak maka harus dikonfigurasi kembali (Kellenberger, Rodrigo, Muller, & Rognan, 2004).

Protokol skrining virtual berdasarkan struktur disarankan menggunakan validasi retrospektif untuk meningkatkan kualitasnya. Pada umumnya sumber data untuk validasi retrospektif untuk beberapa target molekular protein disediakan di *a directory of usefull decoys* (DUD). Dalam data set DUD terdapat 2950 senyawa aktif terhadap 40 target yang berbeda. Untuk setiap senyawa aktif terdapat 36 *decoy* dengan sifat fisika sama tetapi memiliki topologi yang berbeda, validasi ini dilakukan untuk melihat kemampuan protokol untuk mengidentifikasi senyawa aktif terhadap protein target secara retrospektif dengan EF_{20%} dan EF_{max} (faktor pengayaan) sebagai fungsi obyektif. Nilai EF_{20%} dihitung dengan membandingkan nilai antara *true positive* dengan *false positive* terhadap 20% *false positive*, sedangkan nilai EF_{max} membandingkan nilai antara *true positive* dengan *false positive* terhadap 100% *false positive* (Huang, Shoichet, & Irwin, 2006).

2.11 Isolasi dan Pemurnian

Isolasi terhadap hasil akhir dari suatu reaksi, dibutuhkan untuk mendapatkan suatu produk yang murni dari campuran reaksi. Hasil reaksi yang masih berada dalam campuran mungkin saja masih mengandung pelarut, reagen yang berlebihan ataupun kemungkinan produk yang diinginkan bercampur dengan hasil reaksi lain yang tidak diinginkan (Furniss *et al.*, 1978). Beberapa teknik yang berhubungan dengan isolasi dan pemurnian:

2.11.1 Teknik filtrasi

Filtrasi terhadap suatu campuran setelah reaksi berlangsung merupakan hal yang penting karena dapat mengisolasi produk yang berada dalam bentuk padatan dari pelarutnya maupun dapat memisahkan zat pengotor dan reaktan yang tidak larut dari produk reaksi yang masih berada dalam larutan.

2.11.2 Teknik rekristalisasi

Senyawa organik berbentuk padat yang diisolasi dari suatu hasil reaksi organik jarang yang sudah berada dalam bentuk murni. Pemurnian dari senyawa tersebut umumnya efektif dengan cara kristalisasi menggunakan pelarut maupun campuran pelarut yang sesuai. Proses rekristalisasi terdiri dari: (a) melarutkan senyawa yang belum murni kedalam pelarut yang sesuai pada waktu titik didihnya; (b) menyaring larutan panas tersebut sehingga zat pengotor yang tidak larut akan terpisah; (c) mendinginkan filtrat panas tersebut, hal ini akan membuat zat yang tadinya terlarut akan mengkristal; (d) pisahkan Kristal dari supernatant, keringkan. Contoh pelarut yang umum digunakan untuk teknik kristalisasi adalah, metanol, etanol, aseton, etil asetat, asam asetat glacial, kloroform, dietil eter, benzena, dioksan, sikloheksan.

2.11.3 Ekstraksi pelarut

Untuk tahap pertama pemisahan dan pemurnian komponen hasil reaksi umumnya melibatkan proses ekstraksi pelarut. Pelarut yang umumnya digunakan untuk ekstraksi adalah dietil eter atau diisopropil eter, benzena, toluen, kloroform, dan metilen klorida. Pelarut-pelarut tersebut dipilih berdasarkan sifat kelarutan zat yang akan diekstraksi terhadap pelarut.

2.12 Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis

2.12.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan jenis kromatografi yang menggunakan fase diam berupa padatan adsorben dan fase gerak berupa cairan. KLT menggunakan fase diam berupa lapisan adsorben yang seragam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium atau plat plastik, dan fase gerak yang digunakan berupa campuran dari beberapa jenis pelarut. Prinsip umum KLT yaitu pemisahan campuran karena adanya pergerakan fase gerak melewati permukaan datar, analit akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda-beda tergantung dari afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak (Muderawan, 2009). Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa

bercak atau pita. Setelah pelat ditaruh dalam bejana tertutup rapat berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler. Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi (Stahl, 1985).

Kelebihan KLT dibandingkan kromatografi kertas adalah keserbagunaan, kecepatan dan kepekaannya. Keserbagunaan KLT disebabkan karena kenyataan bahwa disamping selulosa, sejumlah penyerap yang berbeda-beda dapat disaputkan pada pelat kaca atau penyangga lain yang digunakan untuk kromatografi. Keuntungan KLT yang lain adalah hanya diperlukan jumlah cuplikan yang sedikit kira-kira 0,1 g, kebutuhan ruang minimal dan penanganannya sederhana (Stahl, 1985).

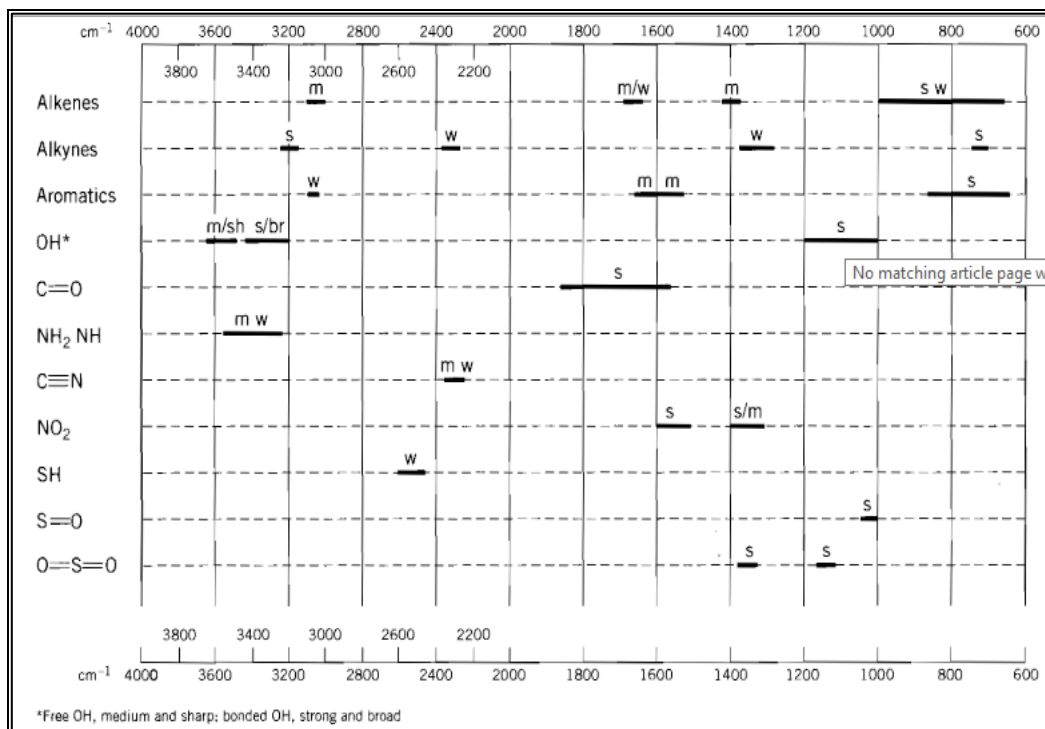
2.12.2 Titik Lebur

Kristal senyawa organik murni pada umumnya memiliki titik lebur yang jelas dan tajam. Dimana jarak lebur, yang merupakan perbedaan antara temperatur ketika kristal mulai hancur pertama kali dengan temperatur dimana zat telah melebur sempurna, sempit. Jarak lebur yang lebar (lebih dari 5°C) mengindikasikan bahwa senyawa tidak murni, sedangkan jarak lebur yang sempit (0,5-2°C) mengindikasikan bahwa senyawa murni. Pengujian titik lebur dapat menghasilkan sedikit perbedaan (kurang lebih 2-3°C) disebabkan oleh perbedaan teknik pengerjaan atau akurasi termometer. Kehadiran pengotor dalam jumlah kecil dapat menghasilkan peningkatan jarak lebur dan menyebabkan peleburan terjadi pada temperatur yang lebih rendah daripada titik lebur senyawa murni (Vinod & Craine, 2011). Dalam menentukan nilai titik lebur suatu zat yang belum diketahui secara pasti nilainya, secara praktis disarankan untuk mengisi dua pipa kapiler dengan zat tersebut. Kemudian salah satu pipa kapiler dimasukkan ke dalam alat penentu titik lebur yang suhu alatnya dinaikkan secara cepat untuk memperkirakan nilai titik lebur zat tersebut. Setelah itu keluarkan pipa kapiler tersebut dan suhu alat penentu titik lebur diturunkan hingga suhunya 30°C. Lalu pipa kapiler yang kedua dimasukkan ke dalam alat untuk ditentukan titik leburnya secara lebih akurat dengan menggunakan perkiraan suhu lebur dari pipa kapiler pertama tadi (Furniss *et al.*, 1978).

2.12.3 Spektroskopi Inframerah

Spektrofotometri inframerah merupakan teknik analisis suatu senyawa yang digunakan untuk menentukan gugus fungsi senyawa dan karakteristik senyawa yang sudah diketahui strukturnya. Daerah bilangan gelombang dituliskan dalam satuan cm^{-1} . Daerah

radiasi spektrofotometri inframerah berkisar antara bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} . Pada spektrum absorpsi dibuat dengan bilangan gelombang pada sumbu x dan persentase transmittan (T) pada sumbu y (Khopkar, 1990). Spektrofotometri inframerah dapat digunakan untuk analisis sampel berupa cairan maupun padatan. Analisis pada sampel cairan mempunyai sel khusus berupa pelat NaCl. Cairan diteteskan pada pelat berupa lapisan tipis. Untuk sampel berupa padatan digunakan teknik pelet KBr. Teknik ini dilakukan dengan cara menumbuk (0,1-2,0)% sampel dengan KBr, kemudian ditekan dengan tekanan tinggi dalam cetakan hingga membentuk pelet KBr yang transparan. Pelet tersebut diletakkan dalam sel alat spektrofotometer inframerah kemudian didapatkan spektrum IR sampel (Harmita, 2006).



Gambar 2.20 Tabel Sederhana Data IR Beberapa Gugus Fungsi yang Umum

Ket: s=kuat; m=menengah; w=lemah; sh=tajam; br=lebar

(Sumber : Silverstein *et al.*, 2005)

Daerah yang paling banyak digunakan untuk berbagai keperluan praktis adalah 4000-690 cm^{-1} yang biasa disebut sebagai daerah IR tengah. Spektroskopi IR juga digunakan dalam penentuan struktur, khususnya senyawa organik dan juga untuk analisis kuantitatif, seperti analisis kuantitatif untuk pencemar udara, misalnya karbon monoksida dalam udara dengan teknik non-dispersif. Spektrum infra merah memberikan puncak-puncak maksimal yang jelas sebaik puncak minimumnya. Spektrum absorpsi dibuat dengan bilangan

gelombang pada sumbu X dan persentase transmitan (T) pada sumbu Y. Karakteristik gugus fungsional spektrum inframerah suatu zat diidentifikasi berdasarkan posisi atau frekuensi (cm^{-1}), bentuk (*broad*) dan intensitas relatif serapan (*strong, medium, weak*) (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005)

Bila sinar infra merah dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi akan diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan atau ditransmisikan tanpa diserap. Gambaran antara persen absorbansi atau persen transmitansi lawan frekuensi akan menghasilkan suatu spektrum infra merah. Transisi yang terjadi didalam serapan infra merah berkaitan dengan perubahan-perubahan vibrasi dalam molekul (Sastrohamidjojo, 2001). Energi dalam spektroskopi infra merah dibutuhkan untuk transisi vibrasi, maka radiasi infra merah hanya terbatas pada perubahan energi setingkat molekul. Untuk tingkat molekul, perbedaan dalam keadaan vibrasi dan rotasi digunakan untuk mengadsorpsi sinar infra merah. Jadi untuk dapat mengadsorpsi, molekul harus memiliki perubahan momen dipol sebagai akibat dari vibrasi. Radiasi medan listrik yang berubah-ubah akan berinteraksi dengan molekul dan akan menyebabkan amplitudo salah satu gerakan molekul (Khopkar, 1990). Spektroskopi infra merah mengandung banyak serapan yang berhubungan dengan sistem vibrasi yang berinteraksi dalam suatu molekul akan memberikan puncak-puncak yang sangat karakteristik dalam spektra. Corak puncak ini dikenal sebagai “sidik jari” molekul yang merupakan daerah yang mengandung sejumlah besar vibrasi yang tidak dapat dimengerti. Dengan membandingkan spektra infra merah dari dua senyawa yang diperkirakan identik maka dapat dinyatakan kedua senyawa tersebut identik atau tidak. Akan jauh lebih sulit untuk membedakan ikatan-ikatan tertentu dalam area sidik jari daripada dalam area yang lebih ‘bersih’ yang berada dalam area dengan bilangan gelombang yang lebih besar. Hal penting dalam area sidik jari ini adalah setiap senyawa yang berbeda menghasilkan pola lembah yang berbeda-beda pada spektrum bagian ini (Khopkar, 1990).

2.12.4 Spektroskopi Massa

Spektrometer massa adalah suatu instrumen yang menghasilkan berkas ion dari suatu zat uji, memilah ion tersebut menjadi spektrum sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan (m/e) dan merekam kelimpahan reaktif tiap jenis ion yang ada (Harmita, 2006). Spektroskopi massa ini untuk mengetahui berat molekul senyawa dan ditunjang dengan adanya fragmentasi ion molekul yang menghasilkan pecahan-pecahan spesifik untuk suatu senyawa berdasarkan m/e dan masing-masing fragmen yang terbentuk. Terbentuknya

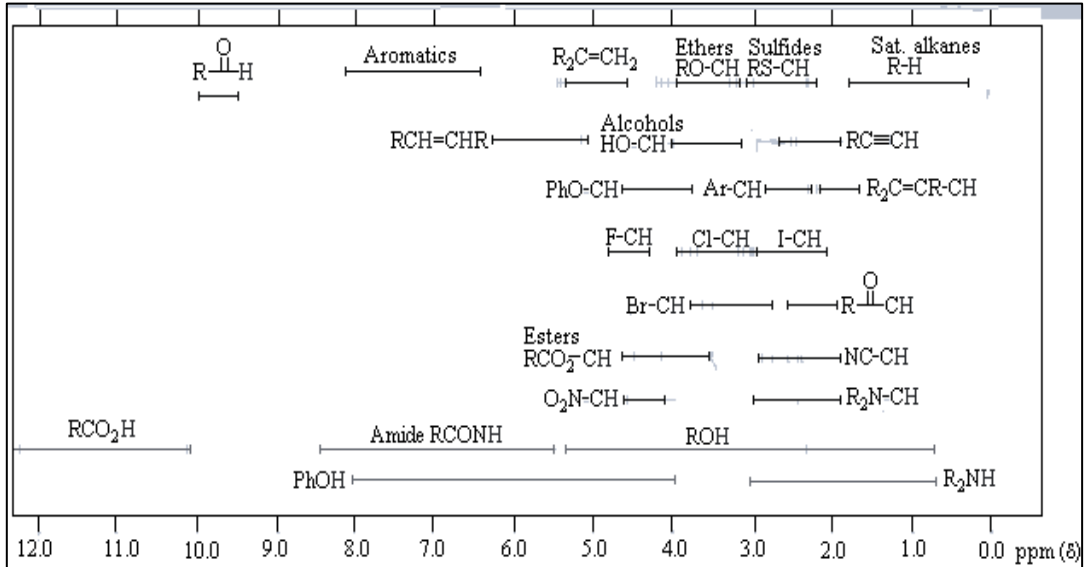
fragmen-fragmen dengan terjadinya pemutusan ikatan apabila disusun kemudian akan dapat menentukan kerangka struktur senyawa yang diperiksa. Molekul senyawa organik pada spektrometer massa, ditembak dengan berkas elektron dan menghasilkan ion bermuatan positif yang mempunyai energi yang tinggi karena lepasnya elektron dari molekul yang dapat pecah menjadi ion yang lebih kecil (Sastrohamidjojo, 2004).

Spektrometer massa terdiri dari sistem pemasukan cuplikan, ruang pengion dan percepatan, tabung analisis, pengumpul ion dan penguat dan pencatat. Keuntungan utama spektrometri massa sebagai metode analisis yaitu metode ini lebih sensitif dan spesifik untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui atau untuk menetapkan keberadaan senyawa tertentu. Hal ini disebabkan adanya pola fragmentasi yang khas untuk setiap senyawa sehingga dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dan rumus molekul. Puncak ion molekul penting dikenali karena memberikan bobot molekul senyawa yang diperiksa. Puncak paling kuat pada spektrum, disebut puncak dasar (*base peak*), dinyatakan dengan nilai 100% dan kekuatan puncak lain, termasuk puncak ion molekulnya dinyatakan sebagai persentase puncak dasar tersebut (Silverstein, Bassler, & Kiemle, 2005).

2.12.5 Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti

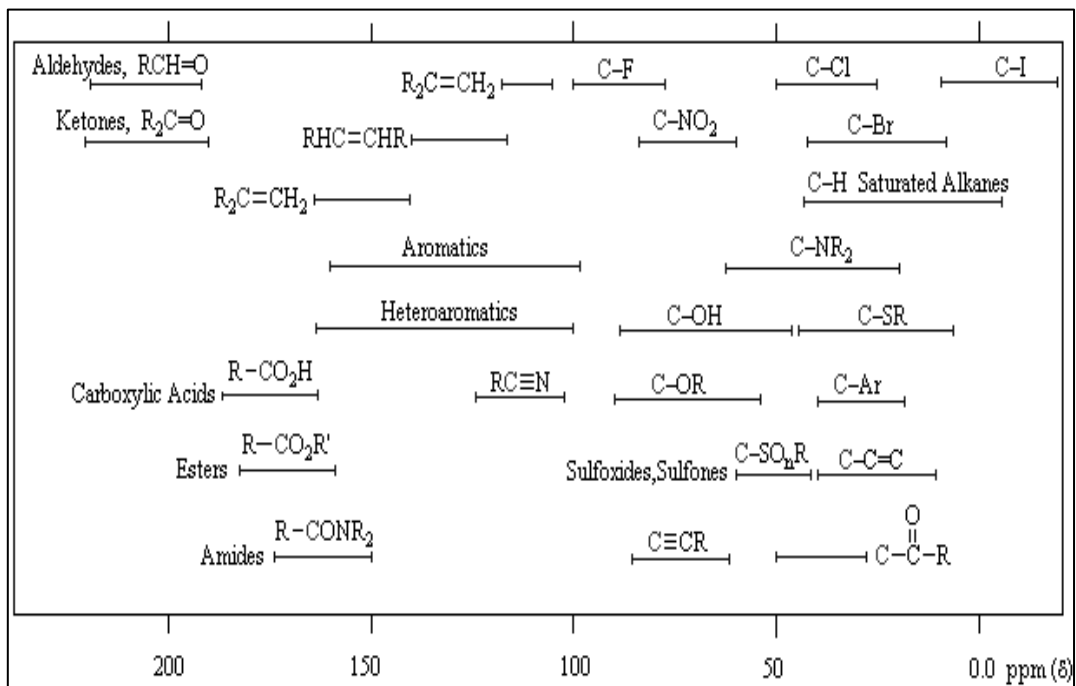
Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI) atau *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) didasarkan pada pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik pada daerah frekuensi radio 4-600 MHz oleh partikel inti atom yang berputar di dalam medan magnet. Untuk menentukan struktur senyawa organik, cuplikan yang diperiksa harus murni. Tetra metil silane (TMS) dipakai sebagai standar pada spektroskopi ini karena mempunyai kerapatan elektron paling tinggi (Harmita, 2006).

Spektrum dapat diperoleh dari senyawa yang mengandung atom-atom yang intinya mempunyai momen magnet tidak sama dengan nol. Di antara inti-inti atom tersebut adalah proton (^1H), inti fluor (^{19}F), isotop nitrogen, dan banyak yang lain. Inti karbon (^{12}C) yang sangat penting dalam kimia organik tidak memiliki momen magnet sehingga studi NMR dengan karbon hanya terbatas pada isotop ^{13}C (Silverstein *et al.*, 2005).



Gambar 2.21 Nilai Geseran Kimia ^1H Pada Spektroskopi NMR Proton

(Sumber : Silverstein *et al.*, 2005)



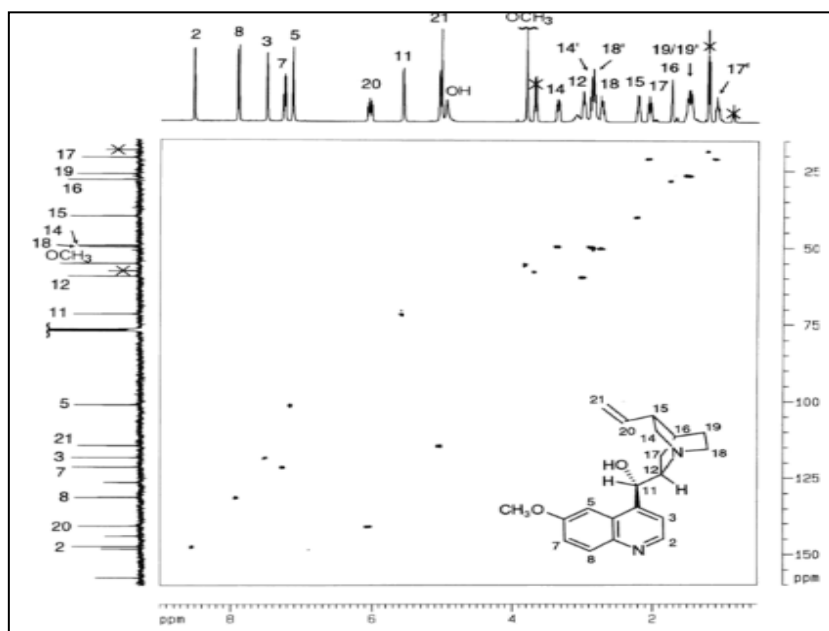
Gambar 2.22 Nilai Geseran Kimia ^{13}C Pada Spektroskopi NMR Karbon

(Sumber : Silverstein *et al.*, 2005)

Spektrometri resonansi magnet proton dapat menentukan banyaknya jenis lingkungan atom yang berbeda yang ada dalam molekul, beberapa atom hidrogen pada masing-masing jenis lingkungan hidrogen, serta berapa banyaknya atom hidrogen yang ada pada atom karbon tetangga. Banyak inti (atau lebih tepat, inti dengan paling tidak jumlah

proton atau neutronnya ganjil) dapat dianggap sebagai magnet kecil. Inti seperti proton (^1H atau H-1) dan inti karbon-13 (^{13}C atau C-13; kelimpahan alaminya sekitar 1%). Karbon-12 (^{12}C), yang dijadikan standar penentuan massa, tidak bersifat magnet. Bila sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C (bahkan semua senyawa organik) ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Karena ada interaksi ini, magnet kecil akan terbagi atas dua tingkat energi (tingkat yang sedikit agak lebih stabil (+) dan keadaan yang kurang stabil (-) yang energinya berbeda. Spektra RMI biasanya ditentukan dari larutan substansi yang akan dianalisis. Untuk itu pelarut yang digunakan tidak boleh mengandung atom hidrogen, karena adanya atom hidrogen pada pelarut akan mengganggu puncak-puncak spektrum (Harmita, 2006).

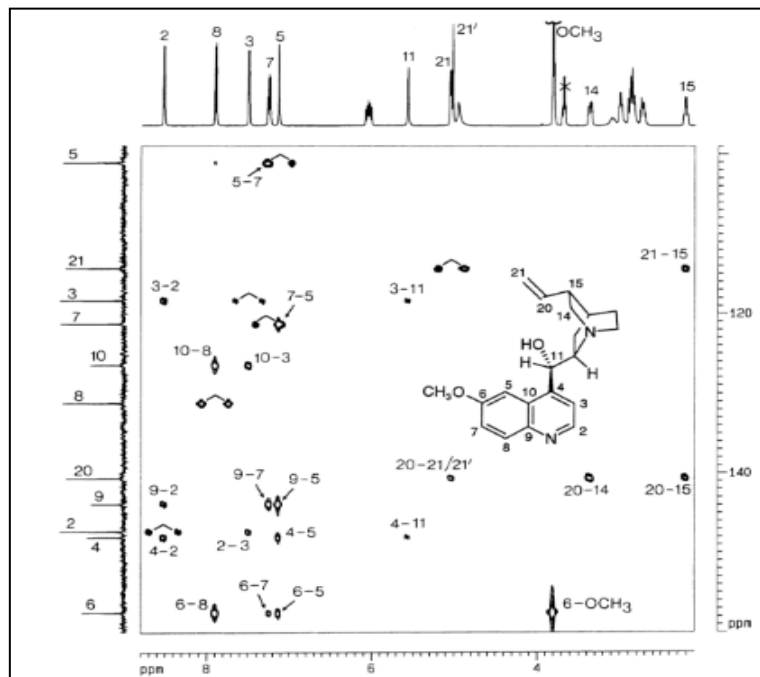
Pada analisis dengan spektroskopi NMR, terdapat juga analisis dua dimensi (2D) yang merupakan kombinasi hasil dua spektrum NMR satu dimensi untuk mendapatkan gambaran hubungan proton dan karbon yang lebih jelas. HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) adalah salah satu jenis NMR 2D yang dapat dimanfaatkan dalam elusidasi struktur karena dapat menggambarkan hubungan ^1H dan ^{13}C yang saling berikatan, sehingga dapat diketahui jumlah proton yang terikat dengan karbon yang sama maupun karbon yang tidak berikatan dengan proton (Duddeck & Dietrich, 1992). Contoh spektrum dapat dilihat pada **Gambar 2.23**.



Gambar 2.23 Spektrum HMQC senyawa Quinidin dalam CDCl_3 (500 MHz)

(Sumber: Duddeck & Dietrich, 1992)

HMBC (*Heteronuclear Multiple bond correlation*) menggambarkan korelasi jarak jauh (*long range coupling*) antara ^{13}C dengan ^1H pada posisi dua sampai dengan tiga ikatan, sehingga dengan spektrum ini dapat diketahui posisi tetangga karbon dan proton (Duddeck & Dietrich, 1992; Richards & Hollerton, 2010). Contoh spektrum dapat dilihat pada **Gambar 2.24**.



Gambar 2.24 Spektrum HMBC senyawa Kuinidin dalam CDCl_3 (500 MHz)

(Sumber: Duddeck & Dietrich, 1992)

2.13 Uji Sitotoksitas

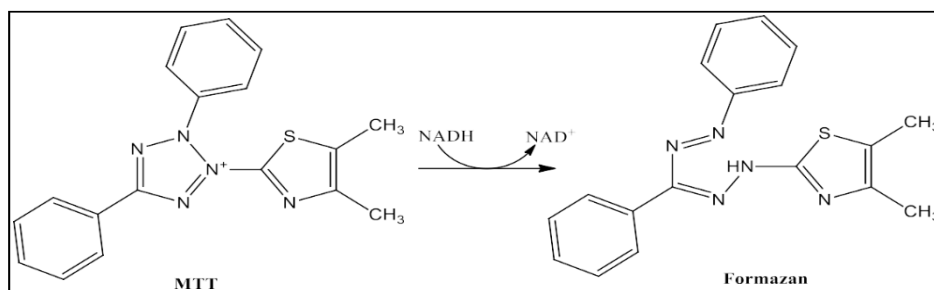
Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel. Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Haryoto *et al.*, 2013).

Beberapa pengujian dapat digunakan dalam menentukan efek penghambatan pada sel secara *in vitro*. Mulai dari pengujian sederhana dengan mengukur viabilitas sel setelah terpapar molekul uji, seperti *dye exclusion* yang mengukur integritas dan efek pada pertumbuhan sel, sampai pengujian yang mengukur viabilitas sel secara tidak langsung dengan menguji kemampuan sel untuk mereduksi senyawa seperti MTT, MTS, SRB, dan alamar Blue atau pembentukan ATP (Longo-Sorbelo *et al.*, 2006).

2.13.1 MTT Assay

Salah satu cara pengujian sitotoksitas yaitu dengan pengujian *cell-based*. Pengujian *cell-based* sering digunakan dalam menskrining kumpulan senyawa untuk menentukan bahwa molekul uji memiliki efek pada pembelahan sel atau memperlihatkan secara langsung efek sitotoksitas yang berkaitan dengan kematian sel. Tanpa memperhatikan jenis atau tipe sel yang digunakan, yang paling penting adalah seberapa banyak viabilitas sel yang tersisa pada akhir pengujian (Riss *et al.*, 2016).

Salah satu metode dalam menentukan viabilitas sel adalah dengan menggunakan metoda pengujian MTT (4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide). Sel hidup akan mereduksi MTT menjadi formazan yang berwarna ungu dengan bantuan oleh enzim dehidrogenase (NADH dan NADPH) (**Gambar 2.5**). Formazan yang terbentuk akan dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 570 nm. Ketika sel mati, sel akan kehilangan kemampuan untuk mereduksi MTT tersebut sehingga formazan yang dihasilkan sedikit. Pembentukan warna inilah yang menandakan sel yang hidup (Riss *et al.*, 2016).



Gambar 2.25 Konversi MTT menjadi Formazan

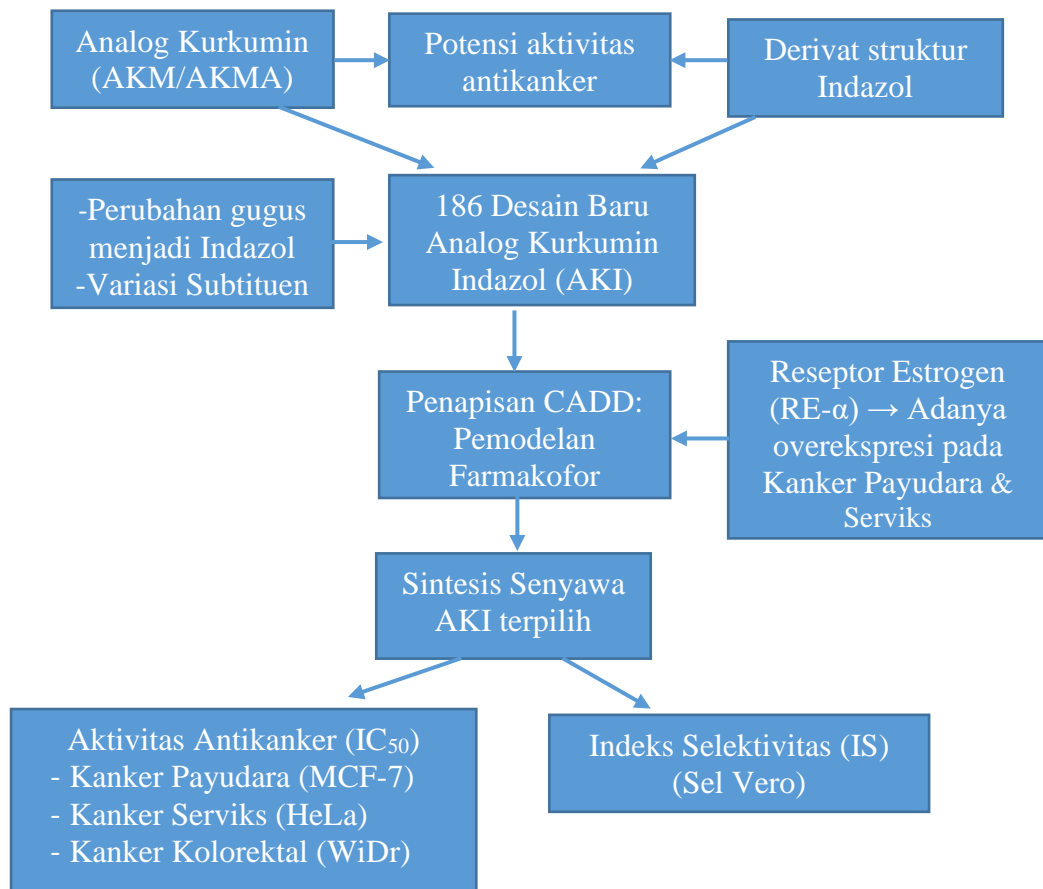
(Sumber : Riss *et al.*, 2016)

Jumlah langkah uji telah diminimalkan sebisa mungkin untuk mempercepat pengolahan sampel. Reagen MTT menghasilkan nilai absorbansi latar belakang yang rendah dengan tidak adanya sel. Untuk setiap jenis sel, hubungan linear antara jumlah sel dan sinyal yang dihasilkan dapat ditetapkan, sehingga memungkinkan suatu kuantifikasi akurat dari perubahan dalam tingkat proliferasi sel (Anonim, 2011).

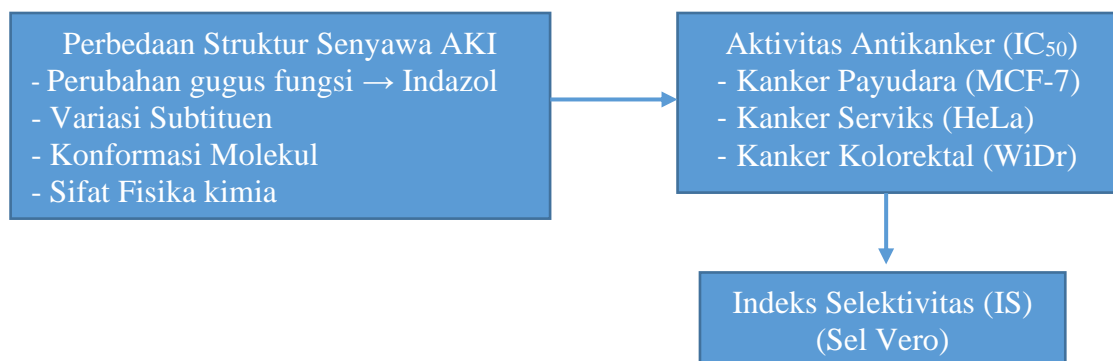
2.13.2 Indeks Selektivitas (IS)

Indeks Selektivitas (IS) menggambarkan perbedaan aktivitas senyawa pada sel normal dan sel kanker. Nilai IS didapatkan membandingkan nilai IC_{50} sel normal dengan nilai IC_{50} sel kanker. Semakin besar nilai IS maka semakin selektif senyawa tersebut terhadap target yang diinginkan. Nilai IS kurang dari 2 mengindikasikan toksisitas senyawa secara umum yang artinya senyawa tidak selektif (Badisa *et al.*, 2006).

2.14 Kerangka Teori



2.15 Kerangka Konsep



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Alur Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan melalui tahapan *in silico*, sintesis dan uji aktivitas. Tahap pertama desain senyawa AKI melalui pendekatan simulasi *in silico*. Hasil skrining secara *in silico* dilakukan sintesis dan diidentifikasi dengan KLT, FTIR, LCMS, dan NMR. Senyawa hasil sintesis diuji aktivitas berupa uji selektivitas terhadap sel normal, uji sitotoksik terhadap sel kanker (MCF-7, HeLa, WiDr), dan sel normal Vero. Alur penelitian lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian Rancangan obat berbasis komputer dilakukan di Laboratorium Komputasi Biomedik dan Rancangan Obat Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok. Sintesis senyawa dan analisis FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi dan Medisinal Fakultas Farmasi UI. Analisis ¹H-NMR, ¹³C-NMR, dan LCMS dilakukan Di Kimia LIPI, Puspiptek, Serpong. Uji sitotoksik di LAPTIB, BPPT, Serpong.

3.3 Alat

Alat alat yang digunakan untuk skrining senyawa secara *in silico* adalah piranti keras yang digunakan pada penelitian ini adalah komputer dengan spesifikasi: Desktop-AF57S8U, Processor Intel(R) Core(TM) i5-5200 CPU@ 2.20 GHz 2.20 GHz, RAM 16 GB, *Operating System* Windows 10, 64 bit, *Graphic Card* AMD Radeon R9-M275 4GB. Komputer terhubung dengan jaringan internet. Piranti lunak yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Program MarvinSketch, LigandScout 4.2, dan LigandScout 4.4; AutoDockTools (v 4.2) yang terintegrasi pada program LigandScout 4.2, dan LigandScout 4.4; SwissADME <http://swissadme.ch/>. Alat-alat yang digunakan adalah alat gelas untuk sintesis dan pemurnian: timbangan analitik, kertas saring, tabung reaksi, penangas air, termometer, pelat pemanas, pengaduk magnetik, oven vakum, bejana KLT, UV-cabinet, penguap vakum putar, kolom kromatografi, vial dan botol penampung berbagai ukuran, mikropipet, lemari pendingin, alat uji antioksidan, corong pisah, corong *Buchner*, kertas Whatmann, alat uji titik lebur, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, spektrofotometer ¹H-NMR dan ¹³C-NMR, LC-MS atau HRMS.

Alat-alat yang digunakan untuk aktivitas biologis: *Biosafety Cabinet Level-2*, (Nuair, USA), Inkubator CO₂ (Binder, Germany), Alat Sentrifugasi (Tommy, Japan), *Inverted Microscope* (Nikon, Japan), flask T25 (Corning, USA), tabung 15 mL (Corning, USA), tabung 1.5 mL (Axygen, USA), perangkat hemositometer, Improved Neubauer, *96-wells Tissue Culture Plate* (Corning, USA), *12-wells Tissue Culture Plate* (Corning, USA), micropipet, 200ul, 1000ul (Gilson, USA), pipet tips 200ul, 1000ul (Axygen, USA).

3.4 Bahan

Bahan uji *in silico* tahap 1:

Bahan yang digunakan adalah data sekuens dan data struktur tiga dimensi (3D) Estrogen Reseptor Homo sapiens yang diperoleh dari *online* diperoleh dari *database*: NCBI, *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank* <http://www.pdb.org/pdb/home/>.

Tabel 3.1 Kode PDB dari Reseptor Estrogen α (ER- α)

No	Kode PDB	Resolusi (Å)	Tahun	Keterangan	Ref	Ligan Nativ
1	1SJ0	1,9	2004	Hormon/Faktor Pertumbuhan	Kim, S	E4D600
2	2OUZ	2,0	2007	Hormon/Faktor Pertumbuhan	Vajdos, FF	C3D999
3	2P7Z	2,5	2008	Reseptor hormon	Abad, MC	OHT201
4	3OS8	2,03	2010	Hormon/Faktor Pertumbuhan	Bruning	KN01

Data tes set dari penghambat reseptor estrogen α (RE α) diperoleh dari 30 senyawa dari www.pubchem.com dan 4 senyawa merupakan ligan nativ. *Decoy* diperoleh dari basis data *A Directory of Useful Decoys* (DUD) <http://dude.docking.org/>, dengan cara memasukkan data “tes set”. Data set untuk validasi model juga didapatkan dari *Directory of Useful Decoys* (DUD) <http://dude.docking.org/> untuk sel target 1SJ0 sebanyak 383 senyawa aktif dan 20.674 *decoys* (Mysinger, Carchia, Irwin, & Shoichet, 2012). Data parameter farmakokinetik dan Nilai *Synthesis Accesibiity* (SA) diperoleh dari SwissADME <http://swissadme.ch/>.

Bahan-bahan untuk sintesis, pemurnian: vanillin (Merck, Jerman), benzaldehida (Merck Jerman), p-metoksibenzaldehida (Merck, Jerman), p-flourobenzaldehida (Merck,

Jerman), p-klorobenzaldehida (Merck, Jerman), p-metilbenzaldehida (Merck, Jerman), sikloheksanon (Merck, Jerman), 3,4-dimetoksibenzaldehida (Merck, Jerman), sodium hidroksida (Merck, Jerman), asam klorida 37 % (Merck, Jerman), n- heksana (Merck, Jerman), metanol (Merck, Jerman), etil asetat (Merck, Jerman), metanol (Merck, Jerman), aquades, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman), etanol absolut (Merck, Jerman), Hidrazin (Merck, Jerman), fenilhidrazin (Merck, Jerman), silika gel kromatografi kolom (Merck, Jerman), lempeng KLT Silika Gel F245 (E. Merck 05554) dan Lempeng Kaca Silika Gel F254 (Merck, Jerman).

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji aktivitas biologis: Media Pertumbuhan {Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), RPMI, (Gibco, USA), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Hyclone, USA)}, Penisilin-streptomisin (Invitrogen, USA), *Phosphate buffer saline* (PBS), (Gibco, USA), Trypsin (Gibco, USA), DMSO (Sigma USA), Etanol (Merck, Germany), MTT (Sigma, USA), *Vero cell line*, *HeLa cell line*, *WiDr cell line*, dan *MCF-7 cell line*.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Perancangan senyawa AKMA dan AKI

Sebanyak 186 Senyawa yang akan diuji aktivitas penghambat Estrogen Reseptor α secara *in silico* merupakan derivat senyawa AKMA dan 7-(benziliden tersubstitusi)-3-(fenil tersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol/Analog Kurkumin Heksahidro-2H-indazol Asimetrik (AKI) dan dirancang berdasarkan skema sintesis pada **Lampiran 2**.

Perancangan senyawa AKMA dan AKI dilakukan menggunakan Program MarvinSketch, dengan output .smi. Perancangan senyawa lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

3.5.2 Farmakofor 3D

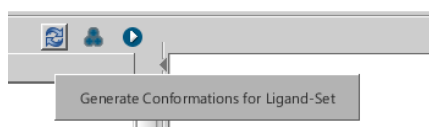
3.5.2.1 Persiapan data sebagai data set

Pada tahap ini disiapkan data set dari penghambat reseptor estrogen α (RE α) diperoleh sebanyak 34 senyawa, dan diperoleh file .smi. Nama senyawa penghambat RE α lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

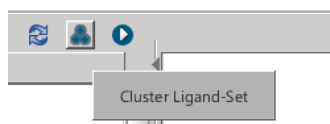
3.5.2.2 Pembuatan model farmakofor 3D

Pembentukan model farmakofor 3D menggunakan LigandScout 4.2 melalui (*ligand-based*) dengan tahapan sebagai berikut:

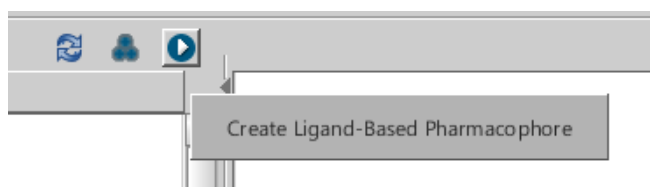
1. Persiapan ligan *set* dengan cara mengumpulkan berkas senyawa yang telah diketahui aktif (dalam format .pdb, .mol atau .smi).
2. Senyawa aktif yang telah dikelompokkan berdasarkan *cluster*-nya kemudian disusun menjadi *training set* dan *test set*.
3. Pembentukan konformasi *training-set*



4. Pengelompokan (*clustering*) senyawa aktif berdasarkan kemiripan fitur kimia.



5. Pembentukan model farmakofor 3D menggunakan *training set*.



3.5.2.3 Validasi model farmakofor 3D

Sepuluh model farmakofor 3D yang telah terbentuk, masing-masing dipindahkan ke *Screening perspective*.

1. Pembuatan *file database* dari *test set* dan *decoy* melalui *input file* .smi dan *output file* .ldb.
2. *Test set* dan *decoy* dalam format .ldb dimasukkan ke *screening databases* tandai *database test set* dengan warna hijau dan *database decoy* dengan warna merah, pilih satu model farmakofor kemudian dilakukan proses *screening* (klik *icon perform screening*), proses ini akan berjalan selama beberapa waktu.
3. Setelah proses *screening* selesai, plotkan kurva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) yang terdiri dari nilai AUC (*Area Under Curve*) dan EF (*Enrichment Factor*).

ROC adalah teknik untuk memvisualisasikan, mengatur dan memilih pengklasifikasi berdasarkan kerjanya. Kurva ROC adalah fungsi dari Sp (spesifitas) terhadap Se (sensitivitas). Nilai di bawah area ROC (AUC) adalah metode penting untuk mengukur kinerja tes. Nilai dari kurva ROC hanya terdiri dari 0 sampai 1. Semakin nilai kurva ROC mendekati 1 maka akan semakin baik. Rumus perhitungan nilai Sensitivitas, Spesifitas dan Akurasi sebagai berikut:

$$Se = \frac{TP}{P} \quad (2.1)$$

$$Sp = \frac{TN}{TN+FP} \quad (2.2)$$









$$Akurasi = \frac{TP+TN}{P+N} \quad (2.3)$$

di mana Se adalah Sensitivitas, Sp adalah spesifitas atau selektivitas, TP adalah jumlah positif benar, TN adalah jumlah senyawa negatif benar, FP adalah jumlah senyawa positif palsu, P adalah jumlah keseluruhan senyawa positif, dan N adalah jumlah keseluruhan senyawa negatif.

3.5.2.4 *Virtual screening* berdasarkan ligan

1. Database senyawa 168 senyawa rancangan dalam bentuk format file .mol
2. Model farmakofor terbaik dipilih untuk dilakukan proses skrining terhadap database turunan ldb.
3. Database turunan ldb. dimasukkan ke dalam *screening database* dan tandai dengan warna hijau.
4. Pilih model farmakofor kemudian dilakukan proses *screening* (klik *icon perform screening*), proses ini akan berjalan selama beberapa waktu. Lakukan hal yang sama pada model farmakofor model lain.
5. Hasil senyawa hit hasil skrining database senyawa rancangan kemudian diurutkan berdasarkan nilai farmakofor fit terbaik.
6. Visualisasi fitur farmakofor senyawa hit yang meliputi HBA (*Hydrogen Bond Acceptor*), HBD (*Hydrogen Bond Donor*), AR (*Aromatic Ring*), dan interaksi hidrofobik.

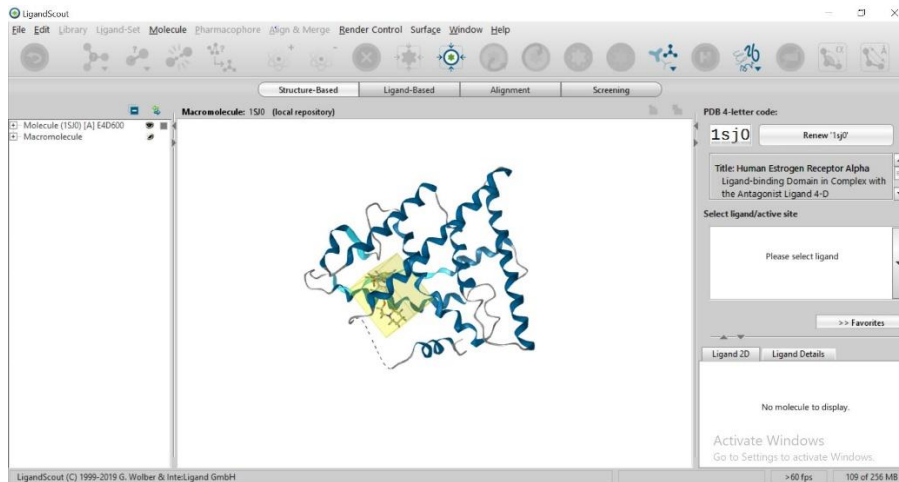
Tabel 3.2 Definisi fitur farmakofor pada Aplikasi LigandScout

Gambaran pada LigandScout	Fitur farmakofor
	Hidrogen Bond Donor (HBD)
	Hidrogen Bond Akseptor (HBA)
	Positive Ionizable area
	Negatively Ionizable area
	Interaksi Hidrofobik
	Cincin aromatic
	Lokasi pengikatan Fe
	Lokasi pengikatan Zink

3.5.2.5 Penambatan molekuler dengan metode Autodock 4.2 terintegrasi pada LigandScout, Analisis Sifat Fisikokimia, Prediksi Farmakokinetika, dan *druglikeness* dengan SwissADME.

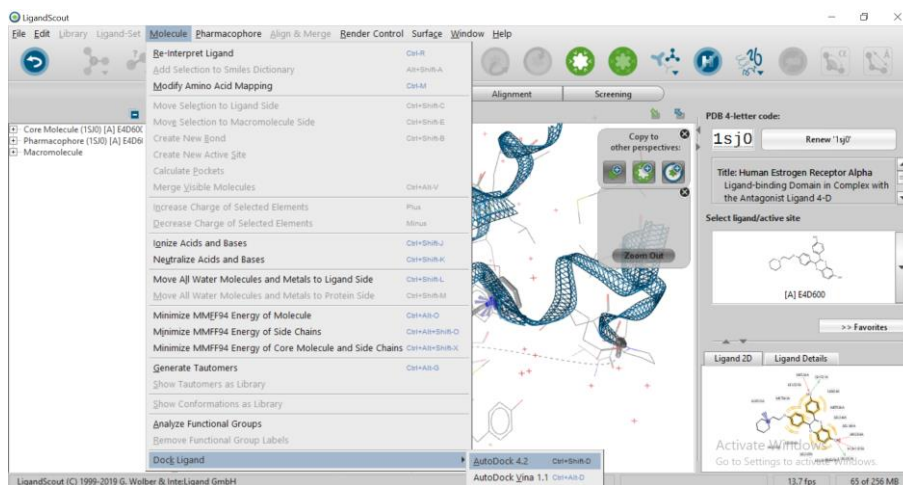
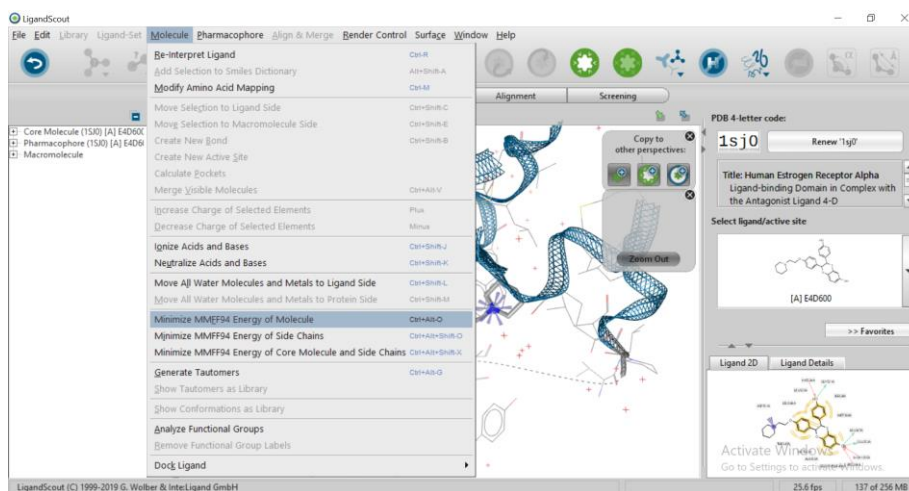
1. Validasi kinerja *docking*

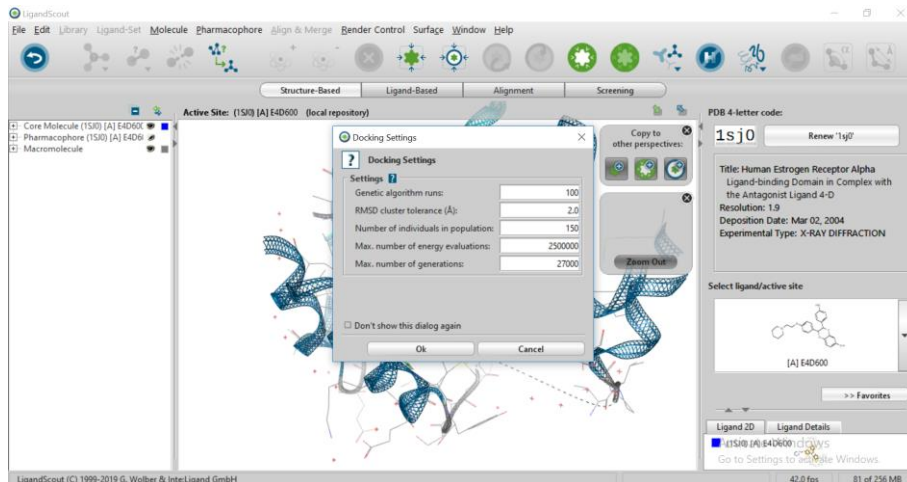
- a. Persiapan makromolekul yang telah diunduh melalui *database* PDB (*Protein Data Bank*)



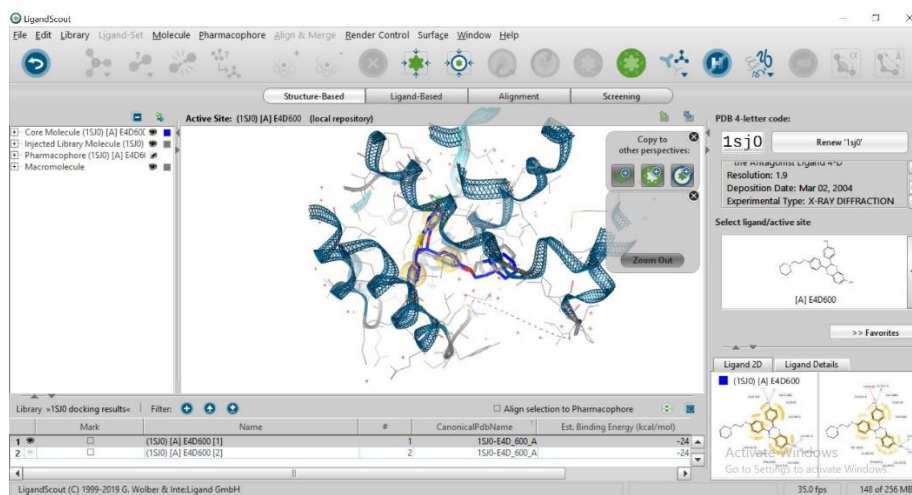
Klik gridbox sesuai dari ligan E4D600

- b. Minimisasi ligan menggunakan MMFF94, kemudian dilakukan penambatan molekular dengan Autodock 4.2. dan diatur parameter genetic algorithm runs.





c. Hasil proses penambatan molekul dengan Autodock 4.2



2. Analisis hasil docking berupa nilai *binding affinity* dan RMSD (untuk validasi kinerja docking), jumlah *cluster*, visualisasi hasil docking untuk melihat interaksi ligan dengan makromolekul.
3. Analisis prediksi sifat fisiko-kimia, prediksi farmakokinetika, *drug-likeness*, dan *Synthetic Accessibility* (SA) dengan SwissADME melalui mengakses secara online <http://swissadme.ch/>. File input .smi yang telah disiapkan dengan MarvinSketch.

3.5.3 Jalur Sintesis Senyawa Target

Sintesis senyawa analog kurkumin indazol (AKI) terpilih (senyawa 6) pada awal sintesis dilakukan menggunakan sintesis jalur 1. Pada hasil tahap 3 didapatkan senyawa yang tidak stabil, oleh karena itu dirancang jalur lain untuk mendapatkan senyawa AKI

(senyawa 10) yaitu jalur 2 dan jalur 3. Skema lengkap reaksi dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

3.5.3.1 Sintesis senyawa AKI jalur 1

3.5.3.1.1 Sintesis Tahap 1 senyawa 3

Sintesis senyawa **3** {(2E)-2-[(fenil/ 4-metilfenil / 4-metoksifenil / 4-fluorofenil /4-klorofenil)metiliden]sikloheksanon} dilakukan diadopsi dari metode Furnis (1989), dimana dibuat campuran dari 0,32 mol turunan aromatik aldehid (-H/p-metil/p-metoksi/p-kloro/p-fluorobenzaldehida) dan 0,88 mol sikloheksanon di dalam Erlenmeyer, rendam dalam wadah berisi air dengan suhu kamar. Kemudian dibuat larutan 0,8 g natrium hidroksida (NaOH) dalam 8 ml aquades. Campuran turunan aromatik aldehid dan sikloheksanon diaduk dengan pengaduk magnetik, kemudian ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH sampai habis. Setelah larutan NaOH habis pengadukan terus dilakukan selama 2 jam. Pengadukan dihentikan, campuran dinetralkan dgn HCl hingga pH 7, cek dengan indikator universal. Pindahkan larutan kedalam corong pisah, lalu pisahkan lapisan organik dari lapisan air. Lapisan air yang ada diekstraksi dengan 16 mL toluen. Campurkan lapisan toluen dengan lapisan organik. Kemudian campuran dicuci dengan 16 mL air, keringkan dengan natrium sulfat anhidrat dan disaring. Uapkan toluen dan sisa sikloheksan dengan evaporator.

3.5.3.1.2 Sintesis Tahap 2 senyawa 5

Metode yang digunakan pada sintesis senyawa **5** {(2E,10E)-2-[(4-hidroksi-3-metoksifenil)metiliden] -6-[(fenil/4-metilfenil/4-metoksifenil/4-fluorofenil/4-klorofenil)metiliden] sikloheksan-1-on} merupakan metode yang diadopsi dari metode Furnis (1989). Campuran masing-masing senyawa **3** 0,005 mol dengan 0,01 mol vanilin (**4**) dalam 10 ml etanol. Masing-masing campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik sambil dipanaskan hingga mendidih. Satu tetes HCl pekat yang telah diencerkan ditambahkan dalam 1 ml etanol. Pengadukan dilakukan selama 30 menit. Dinginkan di dalam *freezer* selama 15 menit, uapkan pelarutnya. Ditambahkan campuran dari asam asetat glasial dan air (1:1) dingin sebanyak 10 mL. Disaring dengan corong Buchner, kemudian endapan dicuci kembali dengan asam asetat glasial dan air (1:1) dingin sebanyak 10 mL, lalu dikeringkan. Keringkan pada suhu 100°C menggunakan oven vakum. Dilakukan uji kemurnian secara KLT fase gerak heksana dan etil asetat (2:1)

dan pengujian titik lebur. Setelah itu struktur senyawa diidentifikasi menggunakan spektrofotometri FTIR dalam KBr dan dielusidasi lebih lanjut strukturnya menggunakan HRMS, spektrometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

3.5.3.1.3 Sintesis Tahap 3 senyawa 6

Senyawa 6 {7-(benziliden tersubstitusi)-3-(feniltersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro -2H-indazol} disintesis mengacu pada cara sintesis yang digunakan Bayomi *et al.*, (2013). Pada sintesis senyawa 6 a-e dengan mencampurkan senyawa (5) (1 mmol) dan hidrazin monohidrat ($\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) (1 ml, 20 mmol) dalam etanol absolut (15 ml) dipanaskan pada refluks sambil diaduk selama 21 jam. Untuk sintesis senyawa 6 f-j dengan mencampurkan senyawa (5) (1 mmol) dan Fenilhidrazin hidroklorida ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NNH}\cdot\text{HCl}$) (1,2 mmol) dalam etanol absolut 20 ml kemudian tambahkan NaOH sampai netral kemudian diaduk sampai homogen dipanaskan pada refluks sambil diaduk selama 20 jam. Campuran reaksi kemudian diuapkan, dan residu yang diperoleh dicuci dengan air, disaring, dikeringkan, dan direkristalisasi dari etanol untuk menghasilkan senyawa target Kristal yang diperoleh, dikeringkan dalam oven vakum suhu 100°C selama 1 jam, persen (%) hasil dihitung, dan kemudian diuji kemurniannya secara KLT menggunakan fase gerak campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1), ditentukan jarak leburnya dan diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Spektra FT-IR direkam dalam KBr. Spektra UV-Vis direkam dalam pelarut asetonitril. Spektra NMR direkam dalam pelarut CDCl_3 dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.

3.5.3.2 Sintesis senyawa AKI jalur 2

3.5.3.2.1 Sintesis Tahap 1 senyawa 3

Sintesis senyawa 3 {(2E)-2-[(4-metoksifenil/3,4-dimetoksifenil) benziliden] sikloheksanon} dilakukan diadopsi dari metode Garrepalli (2014), dimana dibuat campuran dari 0,01 mol turunan aromatik aldehid (p-metoksi/3,4-dimetoksi-benzaldehida) dan 0,01 mol sikloheksanon di dalam Erlenmeyer, rendam dalam wadah berisi air dengan suhu kamar. Campuran turunan aromatik aldehid dan sikloheksanon diaduk dengan pengaduk magnetik, kemudian ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH 5 M sampai pH 11. Setelah itu pengadukan terus dilakukan selama 1 jam. Endapan yang terbentuk disaring dan dicuci dengan etanol absolut dan dikeringkan ke dalam oven

vakum. Dilakukan uji kemurnian secara KLT fase gerak heksana dan etil asetat (2:1) dan pengujian titik lebur. Setelah itu struktur senyawa diidentifikasi menggunakan spektrofotometri FTIR dalam KBr dan dikonfirmasi lebih lanjut strukturnya menggunakan spektrometri $^1\text{H-NMR}$.

3.5.3.2.2 Sintesis Tahap 2 senyawa 9

Metode yang digunakan pada sintesis senyawa 9 {3-(4-metoksifenil/ 3,4-dimetoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol} merupakan metode yang diadopsi dari metode Minu (2009). Campuran masing-masing senyawa 3 sebanyak 0,01 mol dengan 0,1 mol senyawa hidrazin mohohidrat dalam 20 ml metanol. Kemudian campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan menggunakan refluks pada suhu refluks selama 2 jam. Setelah itu didiamkan pada lemari pendingin sampai terbentuk endapan. Endapan yang terbentuk disaring kemudian dikeringkan angin dan simpan produk pada lemari es. Produk tahap 2 ini merupakan produk yang tidak stabil, endapan yang terbentuk segera dilanjutkan untuk sintesis tahap selanjutnya.

3.5.3.2.3 Sintesis senyawa AKI Tahap 3 jalur 2 (senyawa 10A – 10D)

Sintesis senyawa 10A – 10D {(E)-3-(4-metoksi/ 3,4-dimetoksi-fenil)-7-(4-metil/4-metoksi/3,4-dimetoksi-benziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol} disintesis menggunakan metode yang diadopsi dari metode Hayun (2012). Pada sintesis senyawa 10A-10D campuran senyawa (9) (0,001 mmol) dan senyawa aldehid (vanilin atau p-metil/p-metoksi/ 3,4-dimetoksi-benzaldehida) (4) sebanyak 0,001 mol dalam asam asetat glasial (15 ml) dipanaskan pada refluks pada penangas minyak sambil diaduk selama 3 jam, pemantauan KLT.

Hasil sintesis diteteskan ke dalam beaker glas berisi kristal es, dan terbentuk suspensi. Suspensi tersebut diaduk sampai terbentuk endapan. Endapan yang terbentuk disaring dan dikeringkan dalam vakum oven. Endapan tersebut dicuci dengan etanol atau metanol, dan diekstraksi dengan etil asetat, kemudian diuji kemurniannya secara KLT menggunakan fase gerak campuran heksan : etilasetat (2:1), ditentukan jarak leburnya dan diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Spektra FT-IR direkam dalam KBr. Spektra UV-Vis direkam dalam pelarut asetonitril. Spektra NMR direkam dalam pelarut CDCl_3 dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.

3.5.3.3 Sintesis senyawa AKI jalur 3

Pada tahap ini dilakukan dengan mengadopsi metode Sardjiman (1997) untuk mendapatkan senyawa 5G atau bis-2,6(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon pada tahap 1 dan metode Hayun (2012) untuk mendapatkan senyawa 10E, dan 10F pada tahap 2.

3.5.3.3.1. Sintesis senyawa AKI tahap 1 jalur 3

Sintesis senyawa bis-2,6(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon (5G) mengacu pada penelitian Sardjiman (1997). Senyawa 4-hidroksibenzaldehid, 1,22 g (0,01 mol), 1 mL (0,01 mol) sikloheksanon dipanaskan pada suhu 25-30 °C sampai larutan jernih terbentuk dan diaduk selama 2 jam, lalu larutan HCl_(p) 0,2 mL ditambahkan dan sintesis dilanjutkan selama 2 jam. Setelah didiamkan selama 2 hari, campuran ditambahkan dingin Asam asetat glasial : air (1: 1) dingin dan disaring. Endapan yang didapatkan dicuci dengan etanol dingin, kemudian dengan air panas dan dikeringkan dalam oven vakum. Kemudian diuji kemurniannya secara KLT menggunakan fase gerak campuran heksan : etilasetat (2:1), dan diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan FT-IR.

3.5.3.3.2. Sintesis senyawa AKI tahap 2 jalur 3

Sintesis senyawa 10E dan 10F dilakukan dengan mereaksikan senyawa AKM simetris yaitu sikovalon (2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenziliden)sikloheksanon) dan senyawa senyawa bis-2,6(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon (5G). Senyawa sikovalon (2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenziliden)sikloheksanon) dan senyawa 2,6-bis((E)-4-hidroksibenziliden)sikloheksanon sebanyak 0,01 mol dengan 0,1 mol senyawa Hidrazin mohohidrat dan dalam 20 ml asam asetat glasial. Kemudian campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan menggunakan refluks pada suhu refluks selama 3 jam. Hasil sintesis diteteskan ke dalam batu es sampai terbentuk suspensi kemudian suspensi yang terbentuk didiamkan sampai terbentuk endapan. Endapan tersebut dicuci dengan etanol, dan diekstraksi dengan etil asetat. Kemudian diuji kemurniannya secara KLT menggunakan fase gerak campuran heksan : etilasetat (2:1), ditentukan jarak leburnya dan diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan FT-IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Spektra FT-IR direkam dalam KBr. Spektra UV-Vis direkam dalam pelarut asetonitril. Spektra NMR direkam dalam pelarut CDCl₃ dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.

3.5.4 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT

3.5.4.1 Penyiapan kultur sel

3.5.4.1.1 *Cell Thawing*

Cryo cell diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian hangatkan dalam gelas kimia yang sudah berisi air steril dengan suhu 37 °C sampai mencair. Setelah itu sterilkan wadah dengan alkohol 70%. Suspensi sel dipindahkan ke dalam flask kultur 25 cm² yang sebelumnya telah diisi dengan media kultur. Kultur sel diberi penanda nama sel, jenis sel, dan tanggal *thawing*. Sel diamati di bawah mikroskop, kemudian disimpan di dalam inkubator pada suhu 37 °C dan 5% CO₂. Perkembangan sel diamati setiap hari dibawah mikroskop *inverted* (Freshney, 2010).

3.5.4.1.2 Sel Subkultur

Kultur sel yang telah mencapai konfluensi 70-80% dilakukan pemanenan secara tripsinasi. Media kultur dibuang menggunakan pipet kemudian kultur dicuci dengan FBS. Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata diatas permukaan kultur dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Sel diamati di bawah mikroskop *inverted* sampai sel terlepas dari dasar flask kultur. Kemudian ditambahkan media kultur 5 mL untuk menghentikan aktivitas tripsin. Kemudian disentrifus (1200 rpm) selama 5 menit untuk memisahkan pellet sel dan medium yang sudah tercampur dengan tripsin. Kemudian supernatan dibuang dan sisa pelet ditambahkan medium 1 mL lalu diresuspensi hingga homogen dan dipindahkan ke dalam *flask* kultur 75 cm². Selanjutnya diberi penanda yaitu tanggal subkultur, nama sel, dan jenis media. Sel disimpan kembali di dalam inkubator 37 °C dan 5% CO₂, kondisi sel diamati setiap hari di bawah mikroskop, dan media kultur diganti setiap hari sampai konfluens (Freshney, 2010).

3.5.4.1.3 Panen Sel

Sel yang telah disubkultur dengan konfluens 70-80% siap digunakan untuk uji. Media kultur dibuang, kemudian kultur dicuci dengan PBS. Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0.25%) secara merata diatas permukaan kultur dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit, suhu 37 °C dan 5% CO₂. Sel diamati di bawah mikroskop *inverted* sampai sel terlepas dipindahkan ke dalam *conical tube* steril 15 mL dan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan

endapan sel ditambahkan dengan media kultur 1 mL dan diresuspensikan (Freshney, 2010).

3.5.4.1.5 Perhitungan Sel

Jumlah sel dihitung menggunakan pewarnaan *trypan blue* dan peralatan *haemocytometer* untuk menentukan jumlah sel/mL. Sebanyak 20 μL diambil dimasukkan ke *microtube* dengan medium 180 μL . Diambil 50 μL campuran ditambah *trypan blue* 50 μL dimasukkan ke *haemocytometer* kemudian dihitung jumlah selnya. Selanjutnya ditambahkan media kultur sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki yaitu 5×10^3 sel dalam 100 μl media penumbuh (Freshney, 2010).

3.5.4.2 Penentuan nilai IC_{50} dan Indeks Selektivitas (IS)

Sel uji dalam media penumbuhan (RPMI 1640, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Fetal Bovine Serum (FBS) 5%, Penisilin 100U/mL, Streptomisin 100ug/mL) dipindahkan ke dalam sumuran 96-*well plates* masing-masing 100 μL (5×10^3 sel), tiga sumur tidak diisikan sel karena akan digunakan sebagai kontrol pelarut. Distribusi sel diamati melalui mikroskop *inverted*. Kemudian inkubasi sel kembali selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 sampai kultur mencapai konfluensi 50%. Selanjutnya, ganti media kultur dengan media baru. Kemudian beri perlakuan dengan senyawa uji (senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, dan 10F). Senyawa uji disiapkan dengan melarutkan 5 mg senyawa uji dengan DMSO 50 μL , kemudian dibuat seri konsentrasi sampel 3,125 $\mu\text{g/mL}$; 6,25 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$; 200 $\mu\text{g/mL}$, pengenceran dilakukan dengan media kultur. Seri konsentrasi sampel dimasukan kedalam sumuran secara triplo. Selanjutnya diinkubasi kembali dalam inkubator CO_2 selama 48 jam. Media penumbuh diganti setiap hari dengan media yang baru. Pada hari ke-3, dilakukan penambahan 10 μl larutan MTT 5 mg/mL dalm PBS ke dalam tiap sumuran, dan selanjutnya dilakukan inkubasi selama 4 jam di dalam inkubator CO_2 . Selanjutnya media dibuang dan kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan etanol sebanyak 100 μL . Pembacaan absorbansi dilakukan dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm (Bahuguna, *et al.*, 2017). Persentase viabilitas sel dapat dihitung berdasarkan nilai absorbansi dengan Persamaan berikut:

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100 \quad (2.4)$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 100 \% - \% \text{ Sel hidup} \quad (2.5)$$

Untuk menghitung nilai IC_{50} dilakukan dengan membuat model grafik sigmoid terbaik berdasarkan data % inhibisi dan log C menggunakan software GraphPad Prism 8.0. Pengujian ini dilakukan terhadap senyawa uji, kurkumin (sebagai *lead compound*), tamoksifen, dan doxorubicin sebagai kontrol positif. Dari data IC_{50} yang diperoleh, kemudian dihitung nilai IS nya dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Indeks Selektivitas (IS)} = \frac{IC_{50} \text{ terhadap sel normal}}{IC_{50} \text{ terhadap sel kanker}} \quad (2.6)$$

•

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rancangan Senyawa AKMA dan AKI

Senyawa AKMA dan AKI dirancang sebanyak 186 senyawa, struktur lengkap 186 senyawa tersebut terdapat pada **Lampiran 3**. Senyawa tersebut dirancang berdasarkan pengembangan senyawa AKMA dan AKI (analog kurkumin heksahidro-2H-indazol simetrik), dan telah memberikan hasil baik terhadap aktivitas pada beberapa sel kanker diantaranya sel kanker payudara (Prasetyaningrum, Bahtiar, & Hayun, 2017; Bayomi *et al* 2015, Li *et al*, 2015). Pengembangan senyawa AKMA dengan modifikasi menjadi kurkumin heksahidro-2H-indazol yaitu AKI berpotensi mendapatkan senyawa analog kurkumin baru yang aktif sebagai antikanker payudara.

Struktur senyawa AKI yang dirancang memiliki substituen berbeda-beda pada salah satu gugus benzena yaitu ada enam substituen (-H, -CH₃, -F, -Cl, -OCH₃, -diOCH₃) dengan mempertimbangkan perbedaan sifat keelektronegatifan, muatan elektronik, dan efek induksi pada substituen dapat membuat bentuk geometri berbeda tiap senyawa analog sehingga dapat membuat variasi interaksi ikatan terhadap reseptor dan juga karena ketersediaan bahan pereaksi yang tersedia di pasaran saat ini.

Senyawa AKMA dan AKI yang dirancang merupakan senyawa yang didapatkan pada jalur 1 dengan 4 tahap sintesis, skema reaksi lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Sintesis senyawa tersebut melalui mekanisme reaksi yang berbeda, 4 tahap reaksi tersebut meliputi tahap-tahap sebagai berikut:

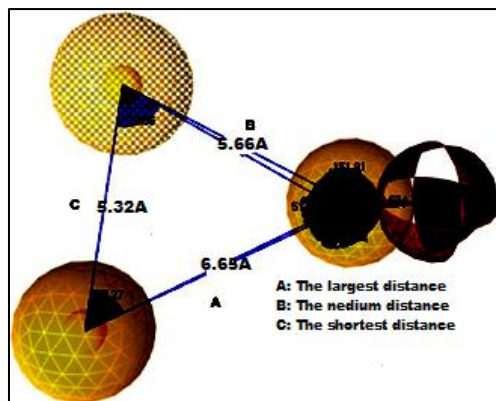
1. Tahap sintesis pertama merupakan sintesis pembuatan senyawa benziliden-sikloheksanon dengan prinsip reaksi kondensasi Claisen-Schmidt yang merupakan kondensasi aldol di mana konversi antara aromatik aldehyd dan keton membentuk β -hidroksi keton dengan katalis asam atau basa, yang selanjutnya terjadi dehidrasi sehingga membentuk keton tidak jenuh.
2. Tahap sintesis kedua merupakan sintesis pembuatan senyawa AKMA melalui prinsip yang sama dengan tahap pertama yaitu reaksi kondensasi Claisen-Schmidt.
3. Tahap sintesis ketiga ada 2 arah sintesis yaitu
 - a. Sintesis pembentukkan senyawa Analog Kurkumin Tetrahidro-3aH-Indazol Asimetrik (AKI) melalui melalui 2 mekanisme reaksi yaitu reaksi kondensasi gugus karbonil keton dengan senyawa nukleofil nitrogen dan sikloadisi 1,3 dipolar

intramolekular. Mekanisme pertama merupakan pembentukan senyawa imina. Reaksi kedua melalui mekanisme sikloadisi 1,3 dipolar intramolekular.

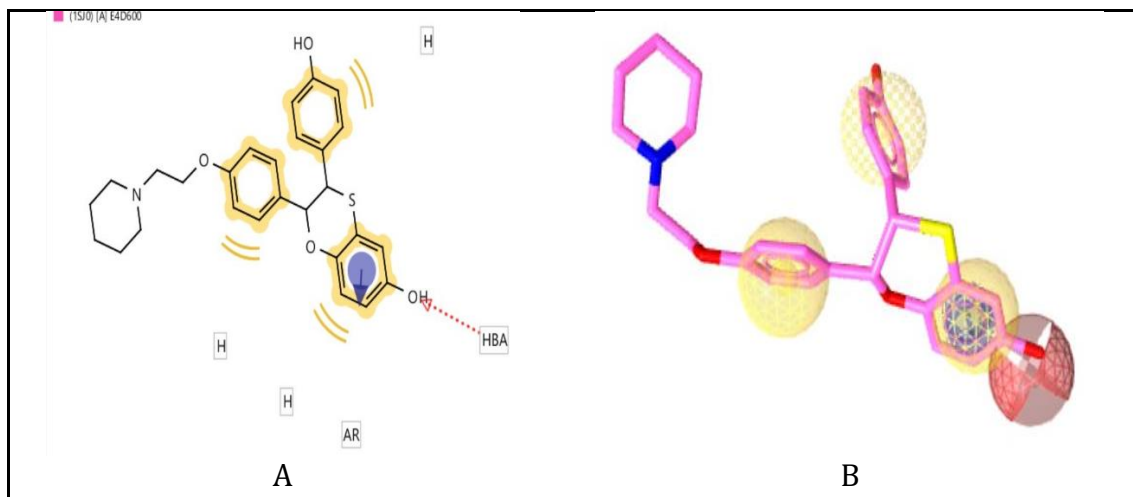
- b. Sintesis pembentukan senyawa Analog Kurkumin Heksahidro-2H-Indazol Asimetrik (AKI) melalui melalui 1 mekanisme reaksi yaitu mekanisme pembentukan senyawa imina pada senyawa AKM (2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenziliden)sikloheksanon dan senyawa 2,6-bis((E)-(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon dengan penambahan hidrazin dan pelarut asam asetat glasial sehingga terbentuk senyawa indazol tersubstitusi asil.
4. Tahap sintesis keempat adalah sintesis pembentukan senyawa AKI tersubstitusi Basa Mannich. Prinsip reaksi yang terjadi adalah reaksi adisi nukleofilik oleh formalin dan senyawa amina sekunder.

Pada senyawa AKMA dan AKI juga ditambahkan substituen baru yaitu basa Mannich dengan pertimbangan bahwa penambahan substituen Basa Mannich berfungsi sebagai gugus farmakofor penting yang selanjutnya digunakan untuk sintesis dari berbagai agen terapi dengan potensi tinggi yang memiliki rantai aminoalkil. Selain sebagai gugus farmakofor yang penting, adanya rantai samping Mannich dapat meningkatkan kelarutan sehingga meningkatkan bioavailabilitas dari molekul obat (Subramaniapillai, 2013). Reaksi substitusi basa Mannich dapat terjadi apabila terdapat tiga senyawa penting yaitu formaldehida (aldehida), senyawa amina (sekunder/primer) dan senyawa dengan hidrogen aktif, senyawa dengan hidrogen aktif yang biasa digunakan pada reaksi substitusi basa mannich adalah suatu keton, ester, asam (fenol) dan nitro alkena (Joshi *et al.*, 2004). Oleh karena itu pada senyawa AKMA, substitusi basa Mannich terjadi pada cincin yang terdapat gugus -OH (fenol) yakni pada cincin vanilin/p-hidroksibenzena. Gugus -OH merupakan gugus pengaktivasi reaksi substitusi elektrofilik, oleh karena itu substitusi elektrofilik akan terjadi pada posisi -orto atau -para dari gugus -OH (Balasainath, 2011), pada senyawa AKMA dan AKI posisi -para telah terisi oleh alkena, oleh karena itu otomatis basa Mannich akan tersubstitusi pada posisi -orto dari -OH.

4.2 Pemodelan Farmakofor



Gambar 4.1 Fitur model farmakofor dan jarak antar fitur dengan program LigandScout 4.2.



Gambar 4.2 Model farmakofor 2D (A) dan 3D (B) pada E4D600 dengan program LigandScout 4.2.

Pemodelan farmakofor berbasis struktur 3D dibuat menggunakan LigandScout 4.2. LigandScout secara otomatis membuat fitur-fitur farmakofor seperti HBA (*Hydrogen Bond Acceptor*), HBD (*Hydrogen Bond Donor*), AR (*Aromatic Ring*), interaksi hidrofobik, interaksi aromatik positif dan negatif terionisasi dari 3D-geometri molekul bioaktif. Selama penapisan virtual, terjadi penyelarasan ligan berdasarkan fitur farmakofor mereka dalam ruang 3D menggunakan algoritma (Wolber & Langer, 2005). Validasi model farmakofor 3D berbasis struktur melibatkan penapisan virtual 383 molekul aktif di ER α dan 20.674 *decoy* ER α yang diambil dari *Database Enhanced Decoys enhanced* (DUDe) dari struktur 3 dimensinya.

Hasil farmakofor 3D dari *training set* menghasilkan 10 model dengan skor hit berkisar 0,7679 – 0,7718 dan menghasilkan 3 fitur farmakofor yaitu warna merah sebagai HBA, warna kuning sebagai interaksi hidrofobik dan warna ungu sebagai cincin aromatik. Interaksi HBA diberikan pada gugus hidroksil pada rantai aromatis dan gugus eter, interaksi hidrofobisitas diberikan pada gugus aromatis yang juga menunjukkan interaksi cincin aromatis. Hasil model farmakofor 3D dapat dilihat jenis fitur dan jarak antar fitur pada **Gambar 4.1**. Model farmakofor 3D dan 2D pada salah satu *training set* yaitu E4D600 dapat dilihat pada **Gambar 4.2**. Nilai hasil pemodelan 10 model dan jenis fitur-fitur farmakofor yang ditandai oleh perbedaan warna pada senyawa *training set* dapat dilihat pada **Tabel 4.1, dan 4.2**.

Tabel 4.1 Jenis fitur-fitur farmakofor dan nilai farmakofor fit pada 17 senyawa *training set* dengan program LigandScout 4.2. Warna merah sebagai HBA, warna kuning sebagai interaksi hidrofobik dan warna ungu sebagai cincin aromatik

No	Nama senyawa aktif	Type	Kesesuaian fitur*)			Pharmacophore fit
1	4-Hidroksitamoksifen	Training	■	■	■	44.59
2	Arzoxifene	Training	■	■	■	55.22
3	AZD9496	Training	■	■	■	33.87
4	BHPI	Training	■	■	■	43.95
5	Brilanestrant	Training	■	■	■	43.60
6	C3D999	Training	■	■	■	53.99
7	E4D600	Training	■	■	■	54.13
8	Elacestrant	Training	■	■	■	54.11
9	Ferutinin	Training	■	■	■	45.44
10	GW_5638	Training	■	■	■	43.42
11	GW_7604	Training	■	■	■	44.23
12	ICI_164384	Training	■	■	■	44.83
13	Nafoxidine	Training	■	■	■	46.52
14	Raloxifene	Training	■	■	■	55.10
15	Raloxifene_D4	Training	■	■	■	55.14

Model-model farmakofor yang telah didapatkan kemudian dilakukan validasi model dengan menambahkan senyawa *decoy* sebagai validator, kemudian dianalisis data hasil validasi berupa kurva ROC, nilai AUC, nilai EF, Spesifitas, Sensitivitas dan Akurasi.

Grafik ROC adalah grafik dua dimensi dengan rasio TP sebagai sumbu Y dan rasio FP sebagai sumbu X. Grafik ROC menggambarkan persaingan relatif antara positif benar dan positif palsu. Kurva ROC model 2 dapat dilihat pada **Gambar 4.3**, Kurva ROC model 1 sampai dengan 10 terdapat pada **Lampiran 5**. Hasil validasi pemodelan farmakofor model 2 merupakan model terpilih. Model yang terpilih sebaiknya memiliki skor farmakofor fit yang tertinggi dan memenuhi parameter validasi yang sesuai.

Tabel 4.2 Hasil Validasi ROC Validasi Retrospektif senyawa penghambat Reseptor Estrogen α (383 senyawa aktif, 20674 *decoy*, and 21057 total senyawa)dengan program LigandScout 4.2

Model	AUC				EF				Hits	TP	FP	Skor Hit
	1%	5%	10%	100%	1%	5%	10%	100%				
1	1,0	1,0	1,0	0,79	25,4	9,8	6,1	4,3	3327	259	3068	0,7718
2	1,0	1,0	1,0	0,80	26,7	9,8	6,2	4,2	3458	263	3195	0,7712
3	1,0	1,0	1,0	0,79	23,8	9,8	6,0	4,1	3449	257	3192	0,7692
4	1,0	1,0	1,0	0,78	24,9	9,5	5,9	4,2	3320	252	3068	0,7686
5	1,0	1,0	1,0	0,79	25,7	9,4	3,9	3,7	3581	257	3324	0,7685
6	1,0	1,0	1,0	0,78	24,9	9,5	5,9	4,2	3320	252	3068	0,7685
7	1,0	1,0	1,0	0,79	24,1	9,4	6,1	3,9	3665	263	3402	0,7684
8	1,0	1,0	1,0	0,78	25,9	9,5	5,9	4,2	3335	253	3082	0,7682
9	1,0	1,0	1,0	0,78	25,9	9,5	5,9	4,2	3335	253	3082	0,7681
10	1,0	1,0	1,0	0,78	25,9	9,5	5,9	4,2	3335	253	3082	0,7679

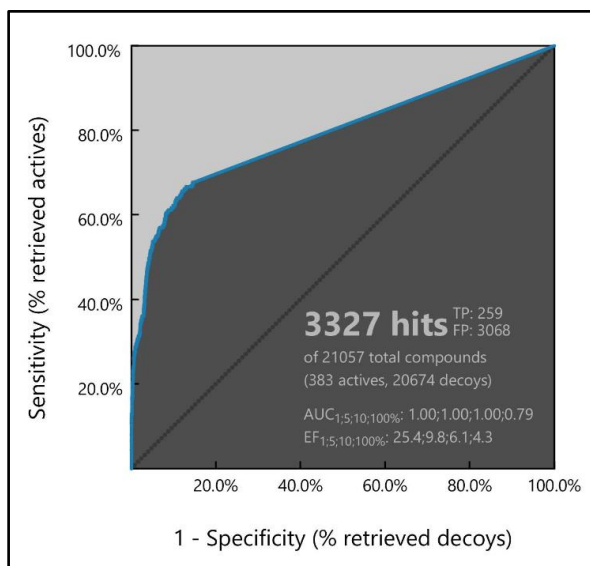
Pada validasi pemodelan farmakofor digunakan *test set* dan *decoy* sebagai pengecoh, dengan tujuan sebagai *benchmarking* pada proses penapisan virtual. Pada **Tabel 4.3** menunjukkan model 1, 2, dan 3 merupakan model yang terpilih disebabkan nilai ROC dan EF memenuhi syarat validasi. Model-model tersebut dipilih berdasarkan nilai AUC (*Area Under Curve*) 100 % di atas 65 dan nilai EF (*Enrichment Factor*) pada 1 % diatas 1.

Tabel 4.3 Nilai Sensitifitas, Spesifitas dan Akurasi 3 model terpilih

Parameter Penapisan	Model 1	Model 2	Model 3
TP	259	263	257
FP	3065	3195	3192
TN	17609	17479	17482
FN	124	120	126
P	383	383	383
N	20674	20674	20674
Sensitifitas (Se)	0,676	0,687	0,671
Spesifitas (Sp)	0,852	0,845	0,846
Akurasi	0,849	0,843	0,842

Parameter validasi pemodelan farmakofor juga mempertimbangkan nilai spesifitas, sensitifitas dan akurasi yang dapat dilihat pada **Tabel 4.3** Hasil nilai sensitifitas, spesifitas dan akurasi untuk model 1, 2, dan 3 menunjukkan hasil yang baik karena mempunyai nilai $> 0,5$. Lone *et al.*, 2017 menyatakan satu set dari lima hipotesis dengan sensitifitas $> 0,5$, spesifitas $> 0,5$, nilai AUC $> 0,7$ dan skor hit $> 0,7$ telah dapat digunakan sebagai model penapisan virtual (Lone, Manhas, Athar, & Jha, 2018). Hasil

penapisan penghambat reseptor Estrogen α menunjukkan model 2 dengan nilai paling baik yaitu nilai sensitifitas sebesar 0,687; nilai spesifitas sebesar 0,845; nilai AUC 100 % sebesar 0,80; nilai akurasi 0,843 dan skor hit sebesar 0,7712. Oleh karena itu, penapisan virtual 186 senyawa AKMA dan AKI menggunakan model 2.

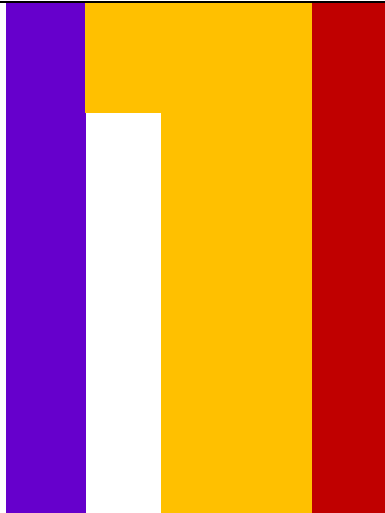


Gambar 4.3 Kurva ROC Model 2

4.3 Penapisan Virtual 186 senyawa AKMA dan AKI dengan model terpilih

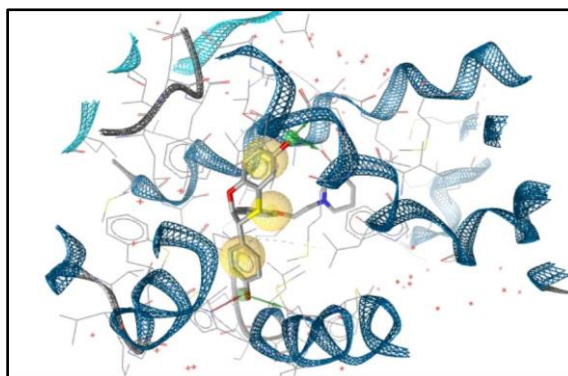
Hasil Fitur utama interaksi farmakofor dari 4-OH Tamoksifen pada ER α termasuk interaksi hidrofobik, HBA dan interaksi cincin aromatis (**Gambar 4.1**). Hasil skrining virtual dari 186 senyawa AKMA dan AKI, 14 senyawa analog dilaporkan pada **Tabel 4.4** dalam bentuk nilai farmakofor fit yang mengukur geometris fitur molekul untuk model farmakofor berbasis struktur 3D. Sebuah model yang lebih tinggi menunjukkan indikator angka, dan ada model yang sesuai dengan model farmakofor juga harus menunjukkan aktivitas di ER α karena tidak semua fitur dari model dapat dicocokkan dengan dua fitur yang dapat dihilangkan selama proses *virtual screening*. Dalam hal ini, fitur yang tidak dapat dicocokkan akan menghasilkan skor farmakofor yang lebih rendah. Hasil nilai farmakofor fit pada senyawa rancangan terpilih berkisar 45,32-53,43. Senyawa 6B8, 6B10, dan 6B7 nilai farmakofor terbaik yang berarti bahwa fitur kimianya selaras dengan fitur model farmakofor 4-OH Tamoksifen.

Tabel 4.4 Hasil Skrining 186 senyawa AKMA dan AKI Farmakofor dengan model 2

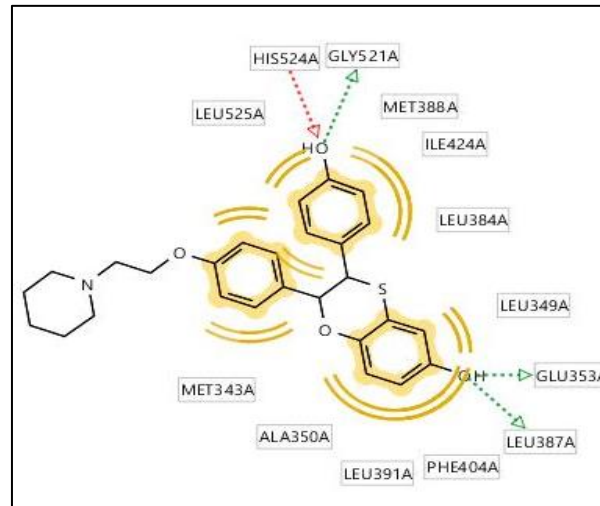
No	Senyawa Analog	Fitur Farmakofor	Farmakofor Fit
1	6B8		53,43
2	6B10		53,39
3	6B7		53,39
4	6A4		46,27
5	6B5		46,22
6	6B2		46,20
7	6B4		45,96
8	6B3		45,95
9	6B1		45,92
10	6A11		45,89
11	6B9		45,79
12	6A12		45,58
13	6B11		45,53
14	6A6		45,32

4.4 Penambatan Molekul senyawa AKMA dan AKI terpilih dengan Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout 4.2

Struktur turunan sinar-X dari ER α dalam kompleks dengan Ligan E4D600 (kode PDB: 1SJ0) dipilih untuk studi studi *in silico* AKMA dan AKI karena parameter yang baik untuk resolusi eksperimental (1,9 Å), nilai-R bebas dan nilai-R kerja yaitu 0,272 dan 0,218. Nilai R menggambarkan suatu ukuran seberapa baik struktur yang disempurnakan memprediksi data yang diamati (Kim *et al.*, 2004). Interaksi yang diturunkan dari struktur turunan sinar-X mengungkapkan bahwa E4D600 membentuk interaksi hidrofobik yang dominan dengan cincin aromatik, dan ikatan hidrogen dengan oksigen fenoksi dan hidroksil (**Gambar 4.4 dan 4.6**).

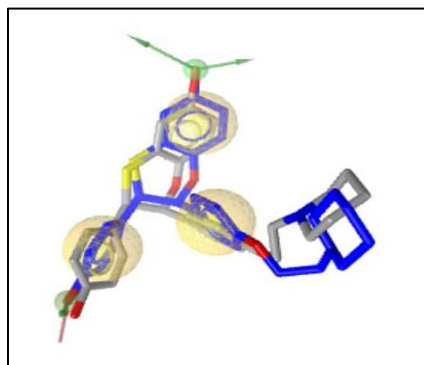


Gambar 4.4 Fitur farmakofor antara senyawa ligan nativ E4D600 dengan ER α yang berasal dari struktur turunan sinar-X (kode PDB: 1SJ0).

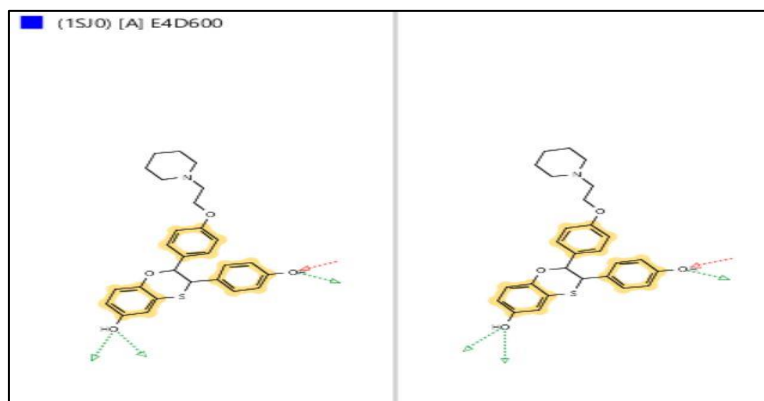


Gambar 4.5 Visualisasi struktur 2D menggambarkan kantong hidrofobik berupa interaksi ikatan hidrofobik ligan nativ E4D600 dengan residu pada reseptor. Interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen donor dan akseptor digambarkan masing-masing sebagai bola kuning, panah hijau dan merah.

Sebelum melakukan simulasi penambatan molekul, dilakukan validasi metode penambatan dengan mengekstraksi ligan ko-kristal (E4D600) dari struktur kristalografi ER- α menjadi ligan *copy* dan menambatkannya ke sisi aktifnya untuk memverifikasi bahwa program penambatan dapat mereproduksi konformasi bioaktif antagonis E4D600. Konformasi ligan dengan penambatan terbaik yang ditunjukkan pada **Gambar 4.7** memiliki nilai RMSD sebesar 0,940 Å dibandingkan dengan konformasi yang diperoleh ligan ko-kristal pada reseptor.



Gambar 4.6 Visualisasi Superpose ligan ko-kristal (biru) dengan Ligan *Copy* Menggunakan Autodock 4.2 terintegrasi dengan LigandScout 4.2.



Gambar 4.7 Visualisasi Superpose pada struktur 2D antara ligan ko-kristal (biru) pada sebelah kiri dengan Ligan *Copy* sebelah kanan.

Penambatan molekul merupakan suatu metode simulasi untuk memprediksikan interaksi antara ligan dan enzim (reseptor). Reseptor yang digunakan harus sudah tervalidasi dengan nilai RMSD < 2.0 Å. Penambatan molekul 14 senyawa rancangan terpilih pada sisi aktif reseptor 1SJ0 menggunakan program Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout 4.2 dengan parameter pelaksanaan *running Genetic Algoritma* (GA) sebanyak 100 kali, jumlah generasi algoritma 27.000, jumlah evaluasi energi 2.500.000, dan populasi 150. Hasil penambatan molekuler dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

Penambatan molekuler senyawa terpilih dilakukan *running* sebanyak 100 kali, dan didapatkan *cluster* yang menyatakan kelompok konformasi molekul yang sama, dan nilai ΔG didapatkan rerata nilai energi dari konformasi kelompok *cluster* yang terbaik (Shityakov & Förster, 2014; Atkovska et al., 2014). Hasil penambatan molekul dari 14 senyawa rancangan terpilih menunjukkan 10 nilai ΔG terbaik berkisar -18.11 sampai -20.90 dan sepuluh senyawa tersebut masih berpotensi untuk dilanjutkan sintesis karena mempunyai nilai ΔG mendekati nilai ΔG tamoksifen. Lima senyawa yang memiliki nilai ΔG di bawah -19,87 yang merupakan nilai energi bebas dari tamoksifen. Senyawa-senyawa tersebut adalah senyawa 6B7, 6B8, 6B9, 6B10 dan senyawa 6B11. Struktur kelima senyawa tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Nilai energi bebas paling besar dihasilkan oleh senyawa 6B5 dengan nilai ΔG sebesar -16,87 dan nilai nilai energi bebas paling kecil diberikan pada senyawa 6B7 dengan nilai ΔG sebesar -20,97.

Tabel 4.5 Nilai ΔG dan jumlah clusternya pada 14 senyawa terpilih terhadap reseptor estrogen α (PDB: 1SJ0) dengan pelaksanaan *running Genetic Algoritma* (GA) sebanyak 100 kali.

No	Nama Senyawa (Kode)	Energi Ikatan ΔG (kkal/mol)	Jumlah <i>cluster</i>
1	6A4	-18,04	22
2	6A6	-18,11	15
3	6A11	-14,26	17
4	6A12	-16,34	4
5	6B1	-18,36	4
6	6B2	-18,57	3
7	6B3	-18,92	4
8	6B4	-18,37	5
9	6B5	-16,87	4
10	6B7	-20,97	4
11	6B8	-20,88	6
12	6B9	-20,90	4
13	6B10	-20,57	5
14	6B11	-20,47	8
15	Tamoksifen	-19,87	3
16	Kurkumin	-18,30	2
17	4-OH-Tamoksifen	-19,82	9

4.5 Visualisasi Hasil penambatan molekul Senyawa AKMA dan AKI Terpilih

Interaksi reseptor 1SJ0 dengan ligan (senyawa rancangan terpilih) yang terbentuk setelah proses penambatan dapat divisualisasikan dengan program Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout untuk dilihat interaksinya berupa fitur farmakofor yang terbentuk dan residu asam amino yang terlibat interaksi antara reseptor 1SJ0 dengan ligan yang merupakan 10 senyawa rancangan terpilih. Hasil visualisasi interaksi fitur-fitur farmakofor dengan reseptor 1SJ0 dapat dilihat pada **Tabel 4.6**.

Hasil visualisasi di atas menunjukkan jenis fitur-fitur farmakofor yang berpengaruh terhadap interaksi senyawa ligan terhadap reseptor 1SJ0. Fitur-fitur kimia yang berperan pada senyawa 6B7, 6B8, 6B10, dan 6B11 sama seperti pada senyawa tamoksifen yaitu interaksi hidrofobik. Pada senyawa 6B1, dan 6B9 fitur kima yang berperan interaksi hidrofobik dan HBA yaitu akseptor ikatan hidrogen. Pada senyawa 6B3 fitur kima yang berperan interaksi hidrofobik dan HBD yaitu donor ikatan hidrogen. Senyawa 6A6, 6B2, dan 6B4 menunjukkan interaksi 3 fitur kimia meliputi interaksi hidrofobuk, HBD yaitu donor ikatan hidrogen, dan HBA yaitu akseptor ikatan hidrogen.

Tabel 4.6 Hasil Visualisasi 2D dan 3D senyawa terpilih, Kurkumin, 4-OH-tamoksifen, dan Tamoksifen pada reseptor 1SJ0

Senyawa	Visualisai 2D	Visualisai 3D
6A6		
6B1		
6B2		
6B3		

Tabel 4.6 Lanjutan

Senyawa	Visualisai 2D	Visualisai 3D
6B4		
6B7		
6B8		
6B9		
6B10		

Tabel 4.6 Lanjutan

Senyawa	Visualisasi 2D	Visualisasi 3D
6B11		
Tamoksifen		
Kurkumin		
4-OH-tamoxifen		

Tabel 4.7 Kontak residu 10 senyawa terpilih, Kurkumin, 4-OH-tamoksifen, dan Tamoksifen

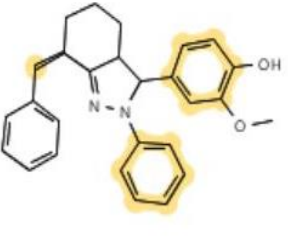
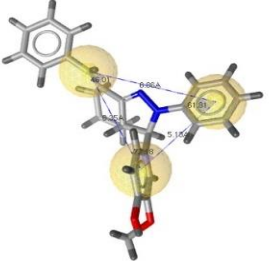
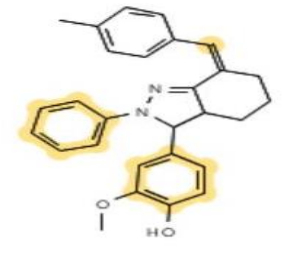
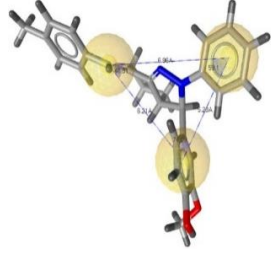
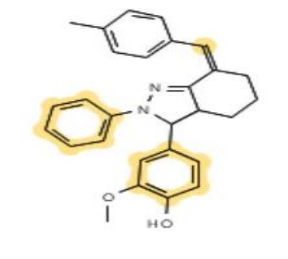
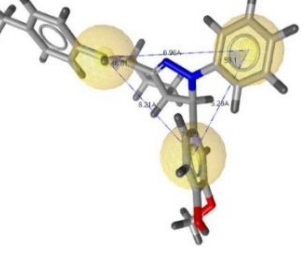
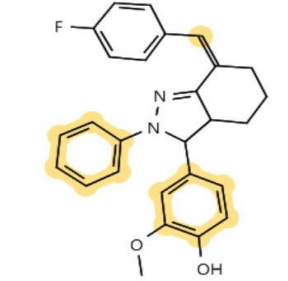
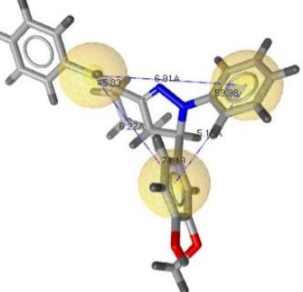
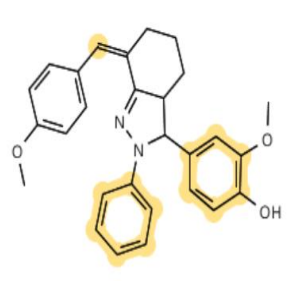
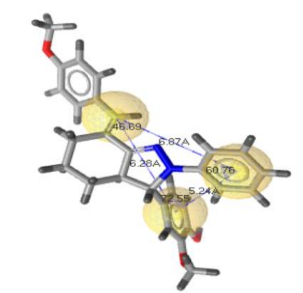
Kontak Residu	Nama Senyawa												
	6A6	6B1	6B2	6B3	6B4	6B7	6B8	6B9	6B10	6B11	Tam*	Kur	4OHT
Leu 525A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√		√
Thr 347A	√	√	√	√	√					√	√		√
Trp 383A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√		√
Leu 536A			√			√	√	√	√		√		√
Leu 354A			√			√	√	√	√		√		√
Ala 350A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Met 388A	√	√	√			√	√	√	√	√	√		√
Leu 391A	√			√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Phe 404A				√	√		√	√	√	√	√	√	√
Leu 428A	√					√	√	√	√	√	√		√
Leu 384A	√					√	√	√	√	√	√		√
Ile 424A	√	√	√				√	√	√	√	√	√	√
Met 343A	√		√		√		√	√			√	√	√
Phe 425A							√	√			√	√	√
His 524A	√	√	√								√	√	√
Met 421A	√	√	√					√		√	√	√	√
Leu 346A		√		√	√		√	√		√	√	√	√
Glu 353A				√									√
Leu 349A				√	√					√			√
Leu 387A				√	√	√			√	√		√	√
Met 522A						√	√	√	√				√
Leu 402A								√					√

*: Tam = Tamoksifen, Kur = Kurkumin, 4OHT=4-hidroksi-tamoksifen

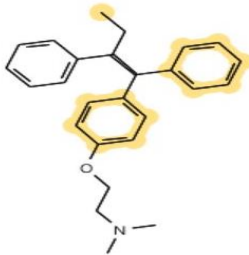
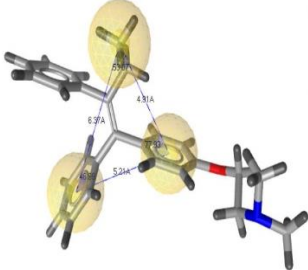
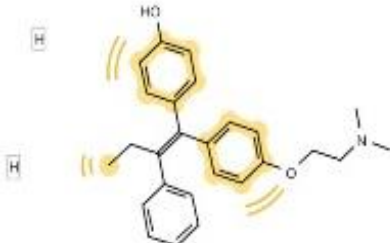
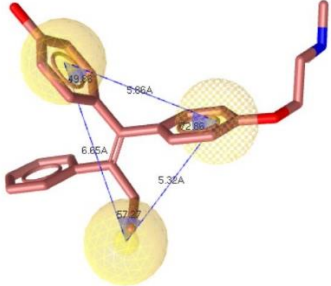
Kontak residu asam amino pada reseptor 1SJ0 yang berinteraksi dengan 10 senyawa ligan yang sama dengan tamoksifen adalah Leu 525A, Trp 383A, dan Ala 350A. Senyawa ligan yang memiliki kontak residu paling banyak kemiripan dengan tamoksifen (17 kontak residu) adalah senyawa 6B9 sebanyak 17 kontak residu, dan senyawa 6B8 sebanyak 15 kontak residu. Residu asam amino yang memiliki kontak dengan semua senyawa termasuk tamoksifen dan kurkumin adalah Ala350A.

Visualisasi 3D dan jarak selisih antar fitur kimia senyawa rancangan terpilih yang mirip dengan senyawa pembanding tamoksifen, dalam hal ini memiliki 3 fitur interaksi hidrofobik yaitu senyawa 6B7, 6B8, 6B9, 6B10, dan 6B11 dapat ditunjukkan pada **Tabel 4.8** dan **Tabel 4.9**.

Tabel 4.8 Visualisasi 2D, 3D dan jarak fitur kimia senyawa terpilih, tamoksifen dan fitur model 2 dengan pola segitiga

Nama Senyawa	Gambar fitur 2D	Gambar fitur 3D
6B7		
6B8		
6B9		
6B10		
6B11		

Tabel 4.8 Lanjutan

Nama Senyawa	Gambar fitur 2D	Gambar fitur 3D
Tamoksifen		
Fitur Model 2		

Tabel 4.9 Jarak antar fitur farmakofor pada senyawa terpilih berdasarkan Gambar 4.1

No	Senyawa	Selisih jarak (Å)		
		A	B	C
1	6B7	6,87	6,26	5,24
2	6B8	6,96	6,21	5,26
3	6B9	6,98	6,86	5,11
4	6B10	6,91	6,22	5,15
5	6B11	6,87	6,28	5,24
	Rerata Jarak (Å) ± SD	6,92 ± 0,051	6,37 ± 0,28	5,20 ± 0,066
6	Fitur farmakofor Model 2	6,65	5,56	5,32
7	Tamoksifen	6,37	5,21	4,91
	Selisih rerata jarak senyawa - Model 2	0,27	0,81	0,12
	Selisih rerata jarak senyawa - Tamoksifen	0,55	1,16	0,29

Pola jarak fitur antar interaksi hidrofobik 5 senyawa terpilih menunjukkan pola segitiga yang mirip dengan pola segitiga interaksi hidrofobik pada Model 2 dan senyawa pembanding tamoksifen. Jarak antar fitur dibagi 3 berdasarkan tiga kategori yaitu selisih

jarak A adalah jarak terpanjang antara 2 fitur interaksi hidrofobik, jarak B adalah jarak panjang medium antara 2 fitur interaksi hidrofobik, jarak C adalah jarak terpendek antara 2 fitur interaksi hidrofobik. Hasil pada **Tabel 4.9** menunjukkan 5 senyawa yang memiliki pola fitur interaksi hidrofobik segitiga yang mirip dengan bentuk model 2 menunjukkan rerata selisih jarak A adalah $6,92 \pm 0,051 \text{ \AA}$, rerata selisih jarak B $6,37 \pm 0,28 \text{ \AA}$ dan rerata selisih jarak C adalah $5,20 \pm 0,066 \text{ \AA}$. Selisih jarak fitur senyawa dengan model 2 yang paling kecil adalah jarak C sebesar $0,12 \text{ \AA}$, kemudian jarak A sebesar $0,27 \text{ \AA}$, dan paling besar adalah jarak B sebesar $0,81 \text{ \AA}$. Hal yang sama ditunjukkan pada selisih jarak senyawa dengan Tamoksifen, yang paling kecil adalah jarak C sebesar $0,29 \text{ \AA}$, kemudian jarak A sebesar $0,55 \text{ \AA}$, dan paling besar adalah jarak B sebesar $1,16 \text{ \AA}$.

4.6 Analisis Prediksi ADMET, Solubilitas, Profil Farmakokinetik, Drug-Likeness, dan Nilai *Synthetic Accessibility* (SA)

Bioavailabilitas oral yang tinggi sering menjadi pertimbangan penting untuk pengembangan molekul bioaktif sebagai agen terapeutik. Dengan demikian, tujuan untuk penelitian obat adalah untuk mendapatkan pemahaman yang cukup tentang sifat molekul yang membatasi bioavailabilitas oral untuk memfasilitasi desain yang cocok untuk calon kandidat obat yang baru. Sebelum suatu senyawa disintesis atau diuji sebagai obat, perlu dikalkulasi nilai *drug-likeness* berdasarkan struktur molekul (Veber *et al.* 2002). Metode yang mengevaluasi *drug-likeness* adalah dengan menggunakan aturan *Lipinski's Rule of Five* yang dikembangkan oleh Lipinski pada tahun 1997. Aturan ini sukses digunakan sebagai panduan untuk menghubungkan sifat fisik obat dengan pengembangan obat (Veber *et al.* 2002). Aturan yang ditetapkan oleh Lipinski adalah berat molekul (BM) yang tidak lebih dari 500 g/ml, nilai koefisien partisi (logP yang berkaitan dengan lipofilisitas atau hidrofobisitas) kurang dari 5, mempunyai jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5, dan mempunyai jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10 (Lipinski *et al.*, 1997).

Karakter hidrofilik atau hidrofobik obat merupakan faktor penting yang mempengaruhi absorpsi dan dalam teori, berat molekul obat tidak penting. Namun, dalam prakteknya, obat memiliki BM kurang dari 500 adalah karena senyawa dengan berat molekul tinggi lebih mungkin untuk memiliki sejumlah besar kelompok fungsional polar, dan absorpsi obat menjadi terbatas. Gugus polar yang tidak memasuki kriteria lipinski biasanya tidak aktif secara oral dan harus diadministrasikan secara injeksi (Patrick, 2001). Nilai log P berkaitan dengan lipofilisitas atau hidrofobitas, yaitu kemampuan suatu

senyawa kimia untuk larut dalam lemak, lipid, minyak, dan pelarut non polar. Lipofilisitas dinyatakan sebagai rasio kelarutan oktanol dan air yang muncul dalam beberapa bentuk pada setiap analisis fisika-kimia terkait dengan absorpsi. Pada hidrogen donor dan akseptor juga ditentukan nilainya karena jika terlalu banyak kelompok hidrogen donor dan akseptor dapat menghambat permeabilitas melintasi membran bilayer. Kemampuan hidrogen donor dapat dihitung secara tidak langsung oleh koefisien partisi antara hidrogen (Lipinski 1997).

Koefisien partisi antara n-oktanol dan air ($\log P_{o/w}$) adalah deskriptor klasik untuk Lipofilisitas. Parameter ini merupakan sifat fisikokimia penting pada penemuan prediksi sifat farmakokinetika obat. Banyak metode komputasi untuk estimasi $\log P_{o/w}$ dikembangkan dengan kinerja beragam pada berbagai perangkat kimia. Metode umum adalah dengan menggunakan beberapa prediktor untuk memilih metode yang paling akurat untuk seri kimia tertentu seperti iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, dan SILICOSIT atau untuk menghasilkan estimasi konsensus $\log P_{o/w}$ (Daina, Michielin, & Zoete, 2017). Berdasarkan prediksi konsensus $\log P_{o/w}$ menunjukkan senyawa 6B8, 6B9, dan 6B10 tidak memenuhi syarat pada nilai Log P hal ini sama seperti senyawa Tamoksifen yaitu memiliki nilai Log P lebih dari 5. Nilai log P tiga senyawa tersebut diatas 5 berkisar 5,2 – 5,4 menunjukkan bersifat lebih lipofilik.

Kelarutan senyawa dalam air merupakan sifat utama yang mempengaruhi penyerapan obat dalam saluran cerna (Ali, Badawy, Shah, Rehman, & El, 2017). Prediksi kelarutan juga dilakukan dengan SwissADME secara *online*. Dalam hal itu, SwissADME memberikan akses ke lima model prediksi yang tersedia secara bebas; yaitu XLOGP3, metode atomistik termasuk faktor korektif dan perpustakaan berbasis pengetahuan; WLOGP, implementasi kami sendiri dari metode atomistik murni berdasarkan sistem fragmen Wildman dan Crippen; MLOGP, tipe metode topologis yang mengandalkan hubungan linier dengan 13 deskriptor molekuler yang diimplementasikan dari data referensi; SILICOS-IT, sebuah metode hybrid yang mengandalkan 27 fragmen dan 7 penjelas topologi dan iLOGP, metode berbasis fisika mengandalkan energi bebas solvasi dalam n-oktanol dan air yang dihitung dengan model Generalized-Born dan model area permukaan yang dapat diakses pelarut (GB / SA). iLOGP dibandingkan dengan dua set obat atau eksternal seperti obat dan melakukan sama atau lebih baik dari enam prediktor mapan. Log konsensus $P_{o/w}$ adalah rata-rata aritmatika dari nilai-nilai yang diprediksi

oleh lima metode yang diusulkan. Kelas solubilitas atau skala Log S dikategorikan sebagai berikut: tidak larut < -10 < kurang larut < -6 < cukup larut < -4 < laru $t < -2$ sangat larut < 0 < sangat mudah larut. Hasil prediksi pada **Lampiran 6** menunjukkan kelas kelarutan 10 senyawa dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelas kelarutan cukup larut untuk senyawa 6A6, 6B1, 6B2, 6B3, 6B4 dengan nilai Log S sebesar -4,80, sampai -5,11 berdasarkan ESOL dan nilai Log S sebesar -5,19 sampai -5,84 berdasarkan Ali. Kelas kelarutan kurang larut untuk senyawa 6B7, 6B8, 6B9, 6B10, dan 6B11 dengan nilai Log S sebesar -6,36, sampai -6,95 berdasarkan ESOL dan nilai Log S sebesar -6,77 sampai -7,42 berdasarkan Ali. Tamoksifen menunjukkan hasil prediksi kelas solubilitas kurang larut berdasarkan ESOL maupun Ali.

Prediksi sifat farmakokinetik dan *drug-likeness* dari 10 senyawa dilakukan oleh versi *online* SwissADME dan data ditunjukkan pada **Lampiran 6**. Menurut sifat farmakokinetik, semua senyawa menunjukkan absorpsi pada gastrointestinal (GI) yang tinggi kecuali senyawa tamoksifen yang memiliki penyerapan yang rendah. Sepuluh senyawa rancangan terpilih memiliki permeabilitas BBB, tetapi tidak pada tamoksifen dan kurkumin. Hampir semua senyawa rancangan terpilih merupakan substrat P-gp kecuali senyawa 6B3, dan kurkumin. P-glycoprotein (P-gp) adalah anggota dari superfamili transporter *ATP binding cassette* (ABC), yang menentukan berbagai penyerapan dan penembusan obat (Wang, Li, Yang, & Yang, 2005). Senyawa rancangan hampir semua menunjukkan penghambatan terhadap isomer Cytochrome P450 (CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4) kecuali 6B10 tidak menunjukkan penghambatan pada CYP3A4. Pada enzim CYP1A2 9 senyawa tidak menunjukkan penghambatan kecuali senyawa 6B1. Pada hasil prediksi menunjukkan bahwa kurkumin memiliki kemampuan absorpsi pada GI yang tinggi, akan tetapi hasil penelitian telah menunjukkan bahwa kurkumin memiliki stabilitas yang rendah dalam larutan air pada pH fisiologis dan mudah terdegradasi. Kurkumin dalam buffer fosfat pada pH 7,4, sekitar 90% kurkumin terdegradasi dalam 30 menit (Shen, Liu, An, & Ji, 2016).

Prediksi *drug-likeness* juga dilakukan tergantung pada aturan Lipinski, Ghose dan Veber yang dipilih dan skor ketersediaan hayati. Aturan Lima dari Lipinski menyatakan bahwa penyerapan atau permeasi suatu molekul lebih mungkin ketika berat molekul di bawah 500 g / mol, nilai log P lebih rendah dari 5, dan molekul memiliki paling banyak 5 H-donor dan 10 H atom -aseptor. Ghose mendefinisikan kendala kemiripan obat sebagai

berikut: log P yang dihitung adalah antara -0,4 dan 5,6, berat molekul antara 160 dan 480, refraksi molar antara 40 dan 130, dan jumlah total atom antara 20 dan 70. Veber (GSK), mendefinisikan aturan kendala kemiripan obat sebagai jumlah *rotatable bound* $N_{rotb} \leq 10$ dan $TSA \leq 140$. Skrining sepuluh senyawa terpilih yang memenuhi syarat Lipinski ada 7 senyawa yaitu: 6A6, 6B1, 6B2, 6B3, 6B4, 6B7, dan 6B11. Hal ini menunjukkan kelima senyawa tersebut berpotensi memiliki kriteria penilaian keserupaan dengan obat (*drug-likeness*), namun 3 senyawa masih diterima dengan satu pelanggaran. Menurut proses skrining dengan Ghose aturan menunjukkan bahwa lima senyawa ditolak yaitu 6B7, 6B8, 6B9, 6B10, dan 6B11 dengan satu pelanggaran. Namun, proses skrining dengan aturan Veber dan Egan (Pharmacia) semua senyawa memenuhi kriteria penilaian *drug-likeness*, namun pada skrining dengan aturan Muegge (Bayer) tiga senyawa ditolak yaitu 6B9, 6B10, dan 6B11 dengan 1 pelanggaran aturan *drug-likeness* tersebut. Prediksi *drug-likeness* juga dilakukan dengan melihat nilai bioavailabilitas untuk memprediksi kemungkinan suatu senyawa memiliki setidaknya 10% bioavailabilitas oral pada tikus atau permeabilitas Caco-2 yang terukur (Daina, Michielin, & Zoete, 2017). Semua senyawa menunjukkan nilai availabilitas sebesar 0,55.

Nilai *Synthetic Accesibility* (SA) adalah skor berdasarkan analisis fragmen struktur lebih dari 13 juta senyawa dengan asumsi bahwa semakin banyak fragmen molekuler yang sering, semakin mudah molekul dibuat. Metode kontribusi fragmental ini dikoreksi oleh deskriptor untuk ukuran dan kompleksitas molekul. Nilai SA berkisar antara 1 (mudah disintesis) sampai 10 (sangat sulit disintesis) (Daina, Michielin, & Zoete, 2017). Hasil prediksi menunjukkan semua sepuluh senyawa tersebut memiliki nilai SA berkisar 4,24 – 4,67, menunjukkan nilai kesulitan yang tidak berbeda untuk disintesis.

Nilai prediksi sifat fisiko-kimia, profil farmakokinetika, solubilitas, *drug-likeness*, dan *Synthetic Accesibility* dapat mendukung data bahwa 10 senyawa rancangan terpilih yang merupakan senyawa baru yang telah dikonfirmasi melalui *pubchem* dan mempunyai nilai prediksi yang baik dan layak untuk dilanjutkan untuk disintesis.

4.7 Sintesis senyawa AKI

4.7.1 Sintesis senyawa AKI jalur 1

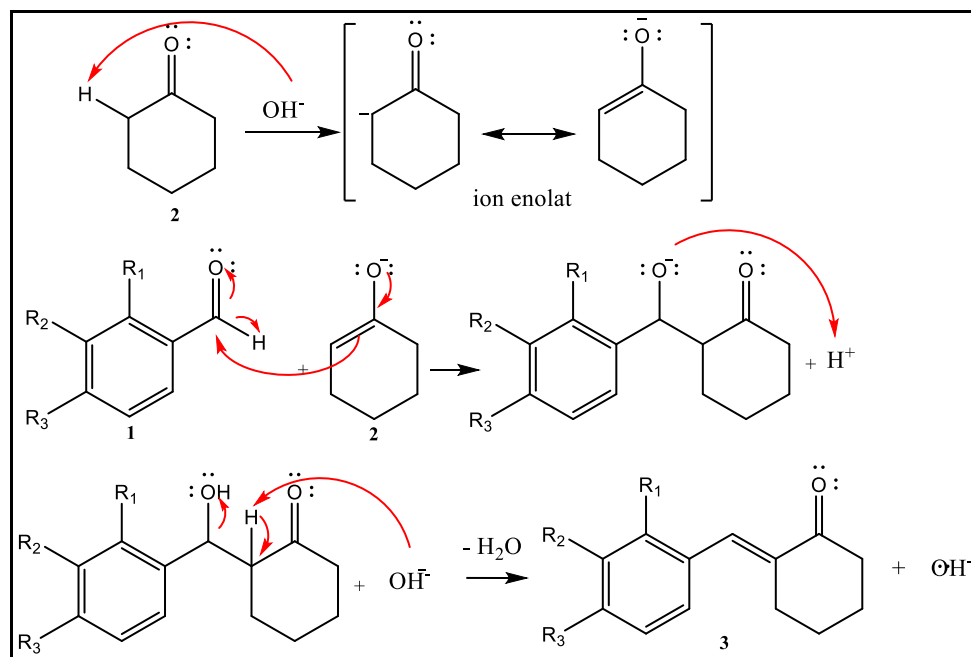
4.7.1.1 Sintesis tahap 1

Pada tahap 1 pada jalur 1, dilakukan reaksi antara lima jenis senyawa aromatik aldehid dengan siklovalon menggunakan metode yang diadopsi dari Furnis (1989) (2009). Pada sintesis tahap ini diperoleh lima senyawa yakni 2-benzilidensikloheksanon (3A), 2-(4- metil)benzilidensikloheksanon (3B), 2-(4-fluoro)benzilidensikloheksanon (3C), 2-(4- kloro)benzilidensikloheksanon (3D), 2-(4-metoksi)benzilidensikloheksanon (3E). Hasil produk sintesis tahap 1 jalur 1 dan KLT senyawa tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 7 Tabel L7-a** dan perbandingan nilai Rf senyawa hasil sintesis dan senyawa pembanding tahap 1 (prasetyaningrum, 2018) dapat dilihat pada **Tabel 4.10**.

Tabel 4.10. Perbandingan nilai Rf senyawa hasil sintesis tahap 1 jalur 1 dengan senyawa pembanding

Kode Senyawa	(Etil Asetat : n-Heksan = 1 : 2)	
	Rf hasil sintesis	Rf pembanding
3A	0,812 dan 0,875	0,812 dan 0,875
3B	0,8 dan 0,83	0,8 dan 0,83
3C	0,73 dan 0,83	0,73 dan 0,83
3D	0,53 dan 0,75	0,53 dan 0,75
3E	0,55 dan 0,65	0,55 dan 0,65

Usulan mekanisme reaksi yang berperan dalam pembentukan senyawa **3** adalah reaksi kondensasi aldol dengan katalis NaOH (**Gambar 4.8**). Katalis NaOH dapat memberikan % rendemen dan waktu reaksi yang lebih cepat dibandingkan dengan katalis lain (Rahman, *et al.*, 2012). Ion OH pada basa NaOH akan memprotonasi hidrogen alfa pada sikloheksanon sehingga membentuk asam enolat. Ion enolat ini akan bertindak sebagai nukleofilik yang akan berinteraksi dengan gugus karbonil pada p-metoksibenzaldehida yang akan membentuk β hidroksi karbonil (senyawa aldol). β -hidroksi karbonil ini kemudian akan mengalami dehidrasi sehingga membentuk suatu ikatan rangkap di antara karbon α dan β (enon terkonjugasi). Pada reaksi tahap I ini, pembentukan ion enolat yang terjadi tidak terlalu kuat, sehingga masuknya aromatik aldehid pada kedua α -karbon dari sikloheksanon dapat dihindari. Reaksi adisi terhadap aldehid pada pembentukan aldol juga dapat berjalan baik pada temperatur ruang dengan penggunaan larutan basa encer sebagai katalis (Carey & Sundberg, 2007).



Gambar 4.8. Usulan mekanisme reaksi kondensasi aldol tahap 1 jalur 1

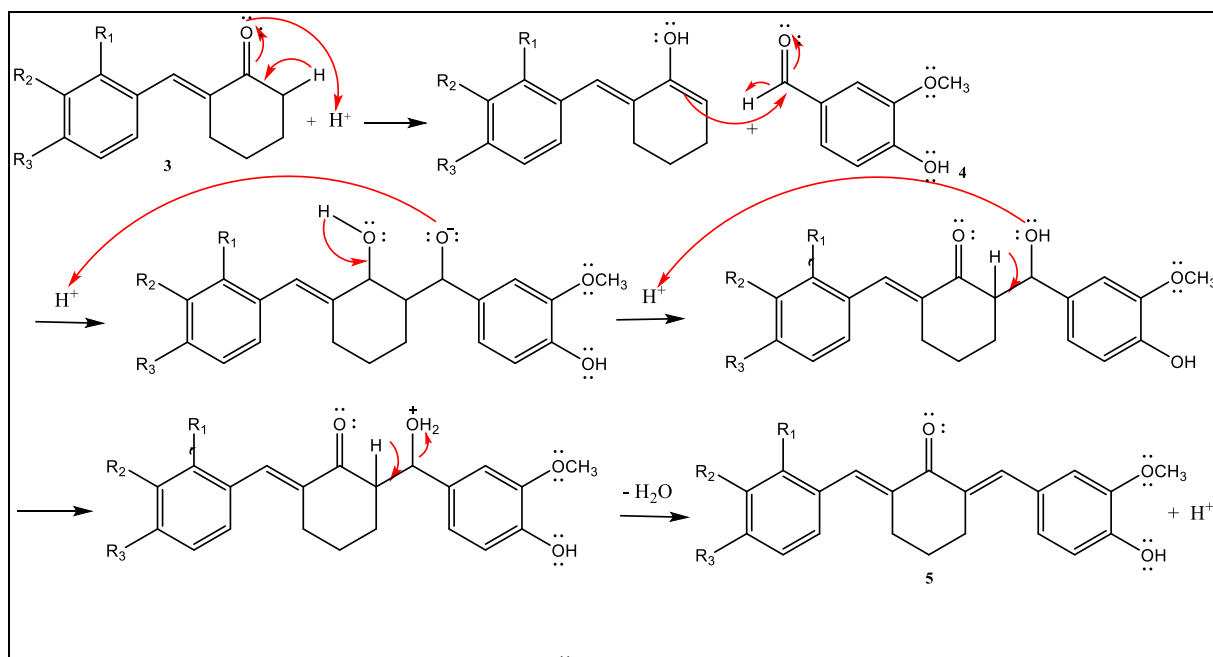
4.7.1.2 Sintesis tahap 2

Sintesis tahap 2 pada jalur 1 dilakukan dengan mereaksikan hasil senyawa pada tahap 1 dengan vanilin/4-hidroksibenzaldehida. Metode yang digunakan pada reaksi dengan vanilin merupakan metode yang diadopsi dari Furniss (1989). Pada tahap ini diperoleh enam senyawa AKMA yakni, 2-benziliden-6-(4-hidroksi-3-metoksi benziliden) sikloheksanon (5A), 2-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-6-(4-metilbenziliden) sikloheksanon (5B), 2-(4-fluorobenziliden)-6-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden) sikloheksanon (5C), 2-(4-klorobenziliden)-6-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden) sikloheksanon (5D), 2-(4-hidroksi-3-metoksi benziliden) sikloheksanon -6-(4-metoksi benziliden) (5E). Hasil produk sintesis tahap 2 jalur 1 dan KLT senyawa tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 7 Tabel L7-b** dan perbandingan nilai R_f senyawa hasil sintesis dan senyawa pembanding tahap 1 (Prasetyaningrum, 2018) dapat dilihat pada **Tabel 4.11**.

Tabel 4.11. Perbandingan nilai Rf senyawa hasil sintesis tahap 2 jalur 1 dengan senyawa pembanding

Kode Senyawa	R ₁	R ₂	(Etil Asetat : n-Heksan = 1 : 2)	
			Rf hasil sintesis	Rf pembanding
5A	-H	-H	0,8	0,8
5B	-H	-CH ₃	0,75	0,75
5C	-H	-Cl	0,75	0,75
5D	-H	-F	0,52	0,52
5E	-H	-OCH ₃	0,55	0,55

Reaksi sintesis tahap 2 jalur 1 merupakan reaksi Claisen-Schmidt antara senyawa 3 (hasil sintesis tahap I) dengan vanillin, usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur pada **Gambar 4.9**. Reaksi ini melibatkan asam HCl encer sebagai katalisatornya. Pada dasarnya mekanisme reaksi pada tahap 2 jalur 1 ini hampir sama dengan reaksi tahap 1. Namun, pada tahap 2 ini katalis yang digunakan adalah asam encer sehingga terbentuk senyawa enol yang akan bertindak sebagai nukleofil pada reaksi adisi dengan vanilin. Setelah reaksi adisi tersebut, akan terjadi reaksi eliminasi atau dehidrasi sehingga terbentuk satu ikatan rangkap di antara atom karbon α dan β (Carey & Sundberg, 2007).



Gambar 4.9. Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 1

4.7.1.3 Sintesis tahap 3

Pada sintesis tahap 3 pada jalur 1 mengadopsi dari Bayomi, 2013. Pada tahap ini 6 senyawa AKMA hasil sintesis tahap 2 direaksikan dengan senyawa hidrazin monohidrat atau fenil hidrazin dalam etanol absolut pada suhu kamar sambil diaduk selama 21 jam. Pada tahap ini seharusnya terbentuk sepuluh senyawa (6A1–6A5/6B1-6B5 atau 6A6-6A11/6B6-6B11) yang merupakan lima senyawa {7-(benziliden tersubstitusi)-3-(feniltersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro -2H-indazol} dan 5 senyawa {7-(benziliden tersubstitusi)-3-(feniltersubstitusi)-2-(tersubstitusi)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro -2H-indazol}. Tetapi pada tahap ini ke sepuluh senyawa tersebut tidak berhasil disintesis, karena tidak stabilnya produk yang terbentuk dan rendemen yang sangat rendah. Hasil sintesis tahap 3 dapat dilihat pada **Lampiran 7 Tabel L7-c**.

Oleh karena tidak berhasilnya sintesis senyawa target (senyawa **6**), maka dilakukan variasi jalur sintesis dan dirancang sintesis jalur 2 dan jalur 3 (senyawa **10**) untuk tetap mendapatkan senyawa indazol yang mirip dengan senyawa 6 dan merupakan senyawa baru. Skema jalur sintesis jalur 2 dan jalur 3 dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

4.7.2 Sintesis senyawa AKI jalur 2

4.7.2.1 Sintesis tahap 1 jalur 2

Pada tahap ini dilakukan sintesis dengan mengadopsi metode Garrepalli, 2014. Sintesis senyawa **3** {(2E)-2-[(4-metoksifenil/3,4-dimetoksifenil)benziliden]sikloheksan-1-on} dilakukan diadopsi dari metode Garrepalli (2014), dimana dibuat campuran dari 0,01 mol turunan aromatik aldehyd (p-metoksi/3,4-dimetoksi-benzaldehyda) dan 0,01 mol sikloheksanon di dalam Erlenmeyer, rendam dalam wadah berisi air dengan suhu kamar⁽²¹⁾. Campuran turunan aromatik aldehyd dan sikloheksanon diaduk dengan pengaduk magnetik, kemudian ditambahkan tetes demi tetes larutan NaOH 5 M sampai pH 11. Setelah itu pengadukan terus dilakukan selama 1 jam. Endapan yang terbentuk disaring dan dicuci dengan etanol absolut dan dikeringkan ke dalam oven vakum. Dilakukan uji kemurnian secara KLT fase gerak heksana dan etil asetat (2:1) dan pengujian titik lebur

Reaksi tahap 1 jalur dilakukan terhadap sikloheksanon dan 7 senyawa aldehyd (benzaldehyda, p-metilbenzaldehyda, p-klorobenzaldehyda, p-fluorobenzaldehyda, p-metoksibenzaldehyda, 3,4-dimetoksibenzaldehyda, 3-nitobenzaldehyda) dan semuanya terbentuk 7 senyawa produk yang murni benzilidensikloheksanon (3A), p-

metilbenzilidensikloheksanon (3B), p-klorobenzilidensikloheksanon (3C), p-fluorobenzilidensikloheksanon (3D), p-metoksibenzilidensikloheksanon (3E), 3,4-dimetoksibenzilidensikloheksanon (3F), dan 3-nitrobenzilidensikloheksanon (3G). Pada tahap ke 3 hanya dua senyawa yang dilanjutkan yaitu senyawa 3E dan 3F hal itu karena tidak semua terbentuk senyawa yang stabil dan bagus rendemennya. Senyawa yang diperoleh mempunyai karakteristik serbuk berwarna kuning. Usulan mekanisme reaksi tahap 1 jalur 2 sama dengan jalur 1 dapat dilihat pada **Gambar 4.8**. Hasil produk sintesis tahap 1 jalur 2, dan KLT senyawa tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 7 Tabel L7-d**. Hasil perbandingan Rf sintesis tahap 1 jalur 2 pada **Tabel 4.12** dan FTIR dan $^1\text{H-NMR}$ dapat dilihat pada **Tabel 4.13**, dan **4.14**.

Tabel 4.12. Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 1 jalur 2

Senyawa	Rendemen (%)	Rf (Etil Asetat : n-Heksan = 1 : 2)
3A	50,74	0,88
3B	48,75	0,83
3C	62,15	0,83
3D	10,04	0,75
3E	97,64	0,65
3F	97,46	0,50
3G	41,51	0,66

Reaksi sintesis tahap I ini berlangsung dalam suasana basa, yaitu dengan menggunakan NaOH 5 N sebagai katalis dan penambahan katalis pada setiap reaksi dikonfirmasi pH sekitar 11. Pemilihan katalis basa untuk tahap I memegang peranan penting dalam pembentukan senyawa, karena pada tahap I ini diharapkan aromatik aldehyd hanya akan tersubstitusi pada salah satu rantai α -karbon dari sikloheksanon. Reaktifitas pembentukan ion enolat pada α -karbon primer lebih kuat jika dibandingkan α -karbon sekunder, hal ini terjadi karena pada pembentuka ion enolat ion OH dari katalis basa akan menyerang atom H dari α -karbon, dengan semakin banyak jumlah H pada α -karbon akan mempermudah pembentukan ion enolat (Carey & Sundberg, 2007). Pada reaksi tahap I ini, pembentukan ion enolat yang terjadi tidak terlalu kuat, sehingga masuknya aromatik aldehyd pada kedua α -karbon dari sikloheksanon dapat dihindari. Reaksi adisi terhadap aldehyd pada pembentukan aldol juga dapat berjalan baik pada temperatur ruang dengan penggunaan larutan basa encer sebagai katalis (Carey & Sundberg, 2007). Pada penelitian reaksi tahap I ini berlangsung selama satu jam pada

temperatur ruang, dengan selalu dilakukan pengadukan. Basa NaOH juga berperan dalam reaksi kondensasi Aldol, meskipun kemampuan katalis basa untuk menginisiasi terjadinya reaksi dehidrasi pada atom β -hidroksiketon bercabang tidak terlalu kuat, karena energi yang diperlukan untuk reaksi dehidrasi lebih besar dari pada reaksi adisi, sedangkan katalis yang digunakan tidak terlalu kuat untuk menginisiasi reaksi dehidrasi.

Pada senyawa aldol α -karbonhidroksi merupakan alkil sekunder sehingga pada reaksi dehidrasi ada dua kemungkinan mekanisme yang terjadi yakni mekanisme E1 atau E2. Reaksi E1 adalah reaksi eliminasi unimolekular dimana akan terjadi dalam dua tahap yakni ionisasi membentuk karbokation dan deprotonasi membentuk ikatan rangkap dua, reaksi ini terjadi pada alkil tersier dan alkil sekunder, serta penggunaan basa lemah sebagai katalis. Sedangkan mekanisme E2 adalah reaksi eliminasi bimolekular dimana reaksi eliminasi terjadi dalam satu tahap, reaksi ini terjadi pada alkil primer dan terkadang pada alkil sekunder, dengan basa kuat sebagai katalis (Carey & Sundberg, 2007). Reaksi dehidrasi pada tahap ini berlangsung dengan mekanisme E2, karena penggunaan NaOH sebagai katalis dan α -karbonhidroksi merupakan alkil sekunder. Oleh karena itu meskipun dibutuhkan energi yang tinggi namun permasalahan tersebut dapat diimbangi dengan reaksi eliminasi yang berlangsung dengan satu tahap. Pada tahap 1 jalur 2 ini terbentuk produk sangat stabil dan mudah dimurnikan, sehingga dapat dilakukan elusidasi struktur dengan FTIR dan $^1\text{H-NMR}$.

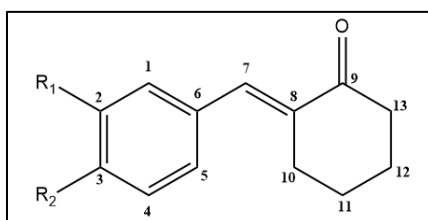
Tabel 4.13. Data Hasil FTIR senyawa 3 dari tahap 1 jalur 2

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})						
	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G
H-C= aromatik	3006	3010	3050	3050	3040	3020	3050
C-H alifatik	2920	2950	2920	2920	2920	2920	2930
C=O keton	1660	1660	1660	1660	1660	1660	1650
C=C aromatik	1537	1550	1550	1550	1510	1520	1530
C-O eter	-	-	-	-	1170	1160	-
C-Cl	-	-	833	-	-	-	-
C-F	-	-	-	1220	-	-	-
C-N	-	-	-	-	-	-	1280

Pada sintesis senyawa 3 dari jalur 2 senyawa terkonfirmasi terbentuk senyawa derivat benziliden pada KLT, FTIR, dan $^1\text{HNMR}$. Hasil sintesis senyawa 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, dan 3G menunjukkan spot tunggal kecuali senyawa 3G, terlihat masih ada 2 spot. Hasil FTIR ke tujuh senyawa menunjukkan bilangan gelombang adanya gugus karbonil

(C=O) keton bagian sikloheksanon sekitar 1650–1660 cm^{-1} dan adanya substituen dari bagian aromatisnya untuk senyawa 3C, 3D, 3E, 3F, dan 3G. Pada senyawa senyawa 3C menunjukkan adanya gugus C-Cl pada bilangan gelombang 833 cm^{-1} , senyawa 3D menunjukkan adanya gugus C-F pada bilangan gelombang 1220 cm^{-1} , senyawa 3E, 3F menunjukkan adanya gugus C-O eter berturut-turut pada bilangan gelombang 1170 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} dan senyawa 3G menunjukkan adanya gugus C-N menunjukkan adanya substituen NO_2 pada benzena pada bilangan gelombang 1280 cm^{-1} .

Tabel 4.14. Data Hasil $^1\text{H-NMR}$ senyawa 3 dari tahap 1 jalur 2



No	Senyawa, δ (ppm), m, J (Hz)	
	3E ($\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{-OCH}_3$)	3F ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{-OCH}_3$)
1	7,47; d; 2H; J = 7	7,02; 1H; s
2	6,94; d; 2H; J = 7	-
3	-	-
4	6,94; d; 2H; J = 7	7,12; d; 1H; J = 8
5	7,47; d; 2H; J = 7	6,91; d; 1H; J = 8
6	-	-
7	7,76; s; 1H	7,76; s; 1H
8	2,17	-
9	-	-
10	-	-
11	1,81; p; 1H	1,83; p; 1H
12	2,92; m; 2H	1,58; m; 2H
13	-	2,95; m; 2H
R_1	-	-
R_2	3,85; s; 3H	3,92; d; 6H

Berdasarkan hasil sintesis senyawa 3 sebanyak tujuh senyawa, yang dilanjutkan untuk sintesis tahap berikutnya adalah senyawa 3E dan 3F. Kedua senyawa tersebut telah terkonfirmasi HNMR dan sejalan dengan spektrum FTIR. Spektrum HNMR senyawa 3E menunjukkan adanya keberadaan benzena dapat di deteksi dengan baik berdasarkan hasil $^1\text{H-NMR}$ ditunjukkan ada dua pasang atom karbon simetris yakni pasangan karbon C-2 dan C-4 dengan puncak triplet pada δ 6,94 J=7,0 Hz, atom C-2 dan C-4 memiliki karakteristik tetangga yang sama sehingga puncak untuk kedua atom tersebut muncul menjadi satu namun dengan integrasi dua kali lipat dari jumlah -H pada setiap atom, nilai

couplingnya menunjukkan jika tetangga yang mempengaruhi berada pada posisi orto. Pasangan atom simetris lainnya ialah atom C-1 dan C-5 dengan puncak doublet pada δ 7,47 ppm $J=7,0$ Hz, nilai coupling juga menunjukkan bahwa atom tetangga yang mempengaruhi pemisahan ialah berada pada posisi orto. Pada atom C-3 yang memiliki puncak pergeseran kimia pada senyawa 3E tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada posisi tersebut. Adanya gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom R₂ singlet pada δ 3,85 ppm. Nilai pergeseran kimia atom C-1,5 > C-2,4, hal tersebut terjadi karena pengaruh efek deshielded dari gugus keton dan alkena terkonjugasi yang sangat elektronegatif. Semakin dekat posisi atom karbon dengan gugus tersebut maka nilai δ nya akan semakin tinggi (*upfield*). Dengan adanya substitusi metoksi semakin memperjauh jarak antara puncak atom C1,5 dan C2,4, dimana puncak C2,4 bergeser ke kanan, hal tersebut terjadi karena gugus -OCH₃ merupakan gugus penarik elektron, sehingga elektronegatifitas yang mempengaruhi atom C-2,4 semakin kecil. Pada atom C-7 ditunjukkan oleh puncak singlet pada 7,76 ppm. Untuk atom C11 muncul puncak pentet pada δ 1,81, puncak pentet muncul akibat jumlah atom H dari kedua tetangganya berjumlah empat. Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014). Untuk atom C10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada δ 2,92 ppm, hal tersebut menunjukkan jika pengaruh penarikan elektron dari cincin p-metoksibenzenaa, tapi terbentuk integrasi yang tidak sesuai yang seharusnya integrasi 2 dan 4, yang ada terbentuk integrasi 1 dan 2.

Spektrum ¹H-NMR senyawa 3F menunjukkan adanya benzena dengan adanya 3 puncak sekitar δ 6-7 ppm untuk atom C-1, C-4, dan C-5. Puncak atom C-1 muncul pada δ 7,02 dengan integrasi 1,02 secara *singlet*, puncak atom C4- muncul pada δ 6,91 dengan integrasi 0,95 secara *doublet* dengan $J = 8,0$ Hz menunjukkan adanya proton atom tetangga pada posisi orto, dan puncak atom C-5 muncul pada δ 7,12 dengan integrasi 1,02 secara *doublet* dengan $J = 8,0$ Hz juga menunjukkan adanya proton atom tetangga pada posisi orto. Pada atom C-2, dan C-3 pada senyawa 3F tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada ke dua posisi tersebut. Adanya gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom R₁, R₂ secara doublet pada δ 3,92 ppm dengan integrasi sebesar 6,06 menunjukkan adanya 6 proton pada dua gugus -OCH₃.

Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014) dan itu terdapat pada senyawa 3F yaitu: δ 1,83 secara multiplet. Untuk atom C-10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada δ 2,95 ppm, hal tersebut menunjukkan jika pengaruh penarikan elektron dari cincin p-dimetoksibenzena.

4.7.2.2 Sintesis tahap 2 jalur 2

Metode yang digunakan pada sintesis senyawa 4 atau 3-(4-metoksifenil/ 3,4-dimetoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol merupakan metode yang diadopsi dari metode Minu (2009). Campuran masing-masing senyawa 3 sebanyak 0,01 mol dengan 0,1 mol senyawa Hidrazin monohidrat dalam 20 ml metanol. Kemudian campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan menggunakan refluks pada suhu refluks selama 2 jam. Setelah itu didiamkan pada lemari pendingin sampai terbentuk endapan. Endapan yang terbentuk disaring kemudian dikeringkan angin dan simpan produk pada lemari es. harus segera digunakan untuk sintesis tahap 3. Pada tahap ini dapat dianalisis dengan alat FTIR yang terlihat jelas pada pembentukan gugus -NH pada ke tujuh produk tahap ini.

Sintesis tahap 2 dilakukan dengan mereaksikan senyawa 3 dengan senyawa hidrazin monohidrat dan menghasilkan senyawa 3-fenil-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9A), 3-(4-metilfenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9B), 3-(4-klorofenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9C), 3-(4-fluorofenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9D), 3-(4-metoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9E), 3-(3,4-dimetoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9F), dan 3-(4-nitrofenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol (9G). Hasil sintesis tahap 2 jalur 2 berupa perbandingan R_f dan % rendemen pada Tabel 4.16. Senyawa produk tahap merupakan senyawa murni, tetapi tidak stabil karena pembentukan senyawa imina (azometina) yang dapat beresonansi sehingga senyawa hasil sintesis harus digunakan segera untuk tahap berikutnya. Oleh karena itu senyawa 9E dan 9F harus segera digunakan untuk sintesis tahap 3. Pada tahap ini dapat dianalisis dengan alat FTIR yang terlihat jelas pada pembentukan gugus -NH pada ke tujuh produk tahap ini. Hasil produk sintesis tahap 2 jalur 2, rendemen dapat dilihat pada **Tabel 4.15**, dan KLT senyawa tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 7 Tabel L7-e**. Hasil FTIR dapat dilihat pada **Tabel 4.16**.

Tabel 4.15 Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 2 jalur 2

Senyawa	Rendemen (%)	Rf (Etil Asetat : n-Heksan = 1 : 2)
9A	99,20	0,8
9B	56,87	0,84
9C	99,50	0,78
9D	24,16	0,72
9E	69,64	0,67
9F	94,72	0,24
9G	46,12	0,36

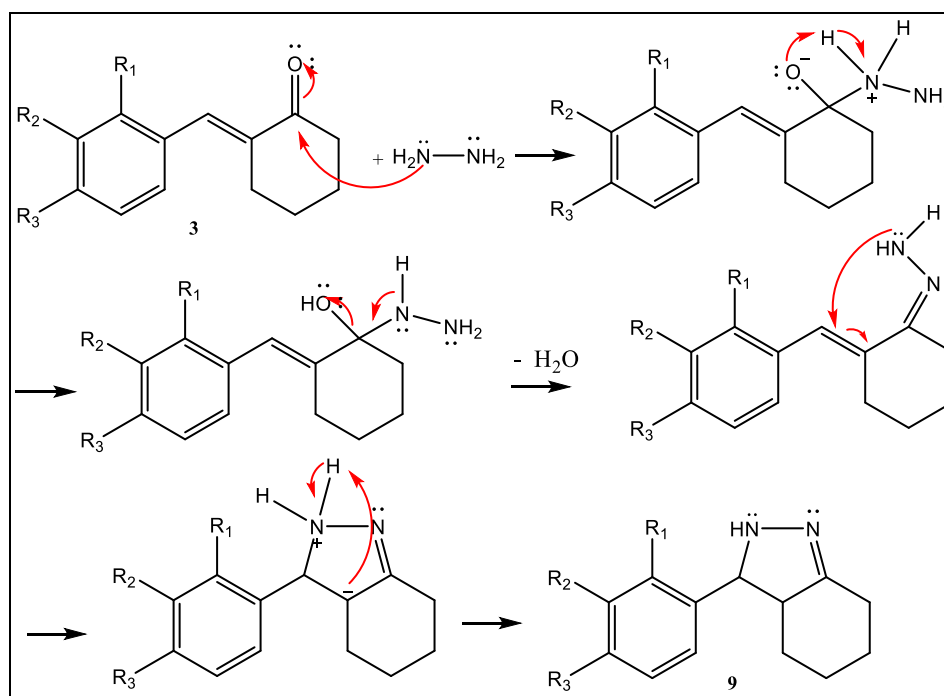
Tabel 4.16. Data Hasil FTIR senyawa 3 dari tahap 2 jalur 2

Gugus Fungsi	Bilangan Geombang (cm ⁻¹)						
	9A	9B	9C	9D	9E	9F	9G
H-C= aromatik	3006	3010	3050	3050	3040	3020	3050
C-H alifatik	2920	2950	2920	2920	2920	2920	2930
C=N	1600	1606	1600	1600	1610	1600	1610
C-N	1270	1270	1280	1270	1290	1270	1270
N-H	3300	3340	3330	3330	3290	3300	3344
C=C aromatik	1537	1550	1550	1550	1510	1520	1530
C-O eter	-	-	-	-	1170	1160	-
C-Cl	-	-	833	-	-	-	-
C-F	-	-	-	1220	-	-	-

Analisis FTIR senyawa 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, dan 9G menunjukkan ke-tujuh senyawa terdapat bilangan gelombang yang khas yang menunjukkan adanya gugus -NH pada produk, yaitu bilangan gelombang berkisar pada 3290 – 3344 cm⁻¹, dan juga terbentuk bilangan gelombang baru untuk adanya C-N pada ke tujuh senyawa muncul bilangan gelombang sekitar 1270 – 1290 cm⁻¹. Pada ke tujuh spektrum senyawa juga menunjukkan hilangnya bilangan gelombang utk C=O keton, sehingga memperkuat bahwa pada produk senyawa 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F, dan 9G terbentuk gugus indazol. Konfirmasi ke-tujuh senyawa tidak bisa untuk spektrum HNMR maupun CNMR, karena ketidakstabilan produk senyawa, ditunjukkan adanya perubahan warna putih menjadi kuning.

Mekanisme reaksi yang terjadi pada tahap 2 jalur 2 yaitu pembentukan senyawa 4 melalui dua mekanisme reaksi yaitu reaksi kondensasi gugus karbonil keton dengan senyawa nukleofil nitrogen dan sikloadisi 1,3 dipolar intramolekular. Mekanisme pertama merupakan pembentukan senyawa imina (azometin). Mekanisme kedua melalui mekanisme sikloadisi 1,3 dipolar intramolekular. Senyawa azometin- imina dianggap 1,3-

dipol dari tipe aza-allyl yang merupakan zat antara sementara dan harus dihasilkan in situ (Nájera, Carmen; Sansano, José M; Yus, 2015). Oleh karena produk pada tahap ini bukan merupakan senyawa stabil, sehingga harus segera direaksikan pada tahap selanjutnya. Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 2 dapat dilihat pada **Gambar 4.10**.



Gambar 4.10 Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 2.

4.7.2.3 Sintesis tahap 3 jalur 2

Pada tahap 3 jalur 2 menghasilkan empat senyawa AKI yaitu 3-(4-metoksifenil)-7-(3-metoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10A), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3-metoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10B), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3,4-dimetoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10C), 3-(3,4-dimetoksifenil)-7-(3,4-dimetoksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol (10D). Senyawa yang diperoleh mempunyai karakteristik serbuk berwarna berbeda-beda (kuning-jingga kemerahan). Rendemen produk senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D didapat sebesar berturut-turut 61,00%, 35,20 %, 74,34 %, 23,69 %, dan 42,2 % dapat dilihat pada **Lampiran 9**. Hasil sintesis tahap 3 jalur 2: perbandingan R_f pada **Tabel 4.22** dan foto produk serta KLT pada **Lampiran7 Tabel L7-f**. Kemurnian senyawa yang telah diperoleh dianalisis dengan melakukan pengamatan titik lebur dapat dilihat pada **Tabel 4.17**. Selanjutnya dilakukan elusidasi struktur dengan menggunakan instrumen FT-IR

(Tabel 4.18), $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (Tabel 4.19) dan HR-MS (Tabel 4.20). Data spektrum lengkap FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, dan HR-MS dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

Tabel 4.17 Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 3 Jalur 2

Senyawa	Rendemen (%)	Rf (Etil Asetat: n-Heksan = 1 : 1)	Jarak Lebur (°C)
10A	61,00	0,78	252 – 254
10B	35,20	0,32	242 – 244
10C	74,34	0,47	238 – 240
10D	56,13	0,44	234 - 236

Tabel 4.18. Data Hasil FTIR senyawa 6 dari tahap 3 jalur 2

Gugus Fungsi	Bilangan Geombang (cm^{-1})			
	10A	10B	10C	10D
OH	-	3200	-	-
H-C= aromatik	3040	3020	3020	3020
C-H alifatik	2920	2920	2920	2920
C=C aromatik	1520	1520	1520	1520
C=N	1610	1600	1600	1600
C-O eter	1170	1160	1160	1160
C=O	-	-	-	-

Pada sintesis tahap 3 jalur dihasilkan 4 senyawa dengan kisaran yaitu senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D, ke empat senyawa tersebut telah terkonfirmasi oleh KLT, FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, dan HR-MS. Berdasarkan hasil KLT, ke empat produk tersebut menunjukkan spot tunggal dan berbeda dari senyawa awal dapat dilihat pada Tabel 4.18 dan Gambar L6-f. Spektrum FTIR senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D menunjukkan beberapa perubahan dari bilangan gelombang senyawa awal yaitu senyawa 9E, dan 9F. Spektrum ke empat senyawa tersebut menunjukkan hilangnya spektrum dengan puncak tajam untuk gugus N-H pada bilangan gelombang yaitu 3290 cm^{-1} pada senyawa 10A dan 3300 cm^{-1} pada senyawa 10B, 10C, dan 10D. Pada senyawa 10B terdapat bilangan gelombang 3200 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus OH.

Senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D terkonfirmasi $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$ dengan nilai geseran kimia yang khas pada masing-masing produk. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 10A menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat di deteksi dengan baik berdasarkan hasil $^1\text{H-NMR}$ ditunjukkan ada tiga puncak dengan dua puncak secara doublet untuk pasangan proton atom karbon simetris pada C-2-C-4 dan C-1-C-5 dan satu

puncak secara triplet untuk proton pada C-16, C-17, C-19, dan C-20. Pasangan karbon C-2 dan C-4 dengan puncak doublet pada δ 7,320 ppm $J=8,0$ Hz, atom C-2 dan C-4 memiliki karakteristik tetangga yang sama sehingga puncak untuk kedua atom tersebut muncul menjadi satu namun dengan integrasi dua kali lipat dari jumlah -H pada setiap atom, nilai couplingnya menunjukkan jika tetangga yang mempengaruhi berada pada posisi orto. Pasangan atom simetris lainnya ialah atom C-1 dan C-5 dengan puncak doublet pada δ 7,538 ppm $J=8,0$ Hz, nilai coupling juga menunjukkan bahwa atom tetangga yang mempengaruhi pemisahan ialah berada pada posisi orto. Dengan adanya substitusi metoksi semakin memperjauh jarak antara puncak atom C-1,5 dan C-2,4, dimana puncak C-2,4 bergeser ke kanan, hal tersebut terjadi karena gugus -OCH₃ merupakan gugus penarik elektron, sehingga elektronegatifitas yang mempengaruhi atom C-2, dan C-4 semakin kecil. Pada atom C-16, C-17, C-19, dan C-20 juga merupakan dua pasangan atom simetris yaitu C-16 dan C-20 dan C-17 dengan C-19, kedua pasangan tersebut masing-masing memiliki karakteristik tetangga yang sama sehingga puncak untuk kedua pasangan atom tersebut muncul menjadi satu namun dengan integrasi empat kali lipat dari jumlah -H pada setiap atom dan bertumpuk membentuk triplet, nilai couplingnya menunjukkan jika tetangga yang mempengaruhi berada pada posisi orto. Nilai geseran kimia (δ) atom C-16, C-17, C-19, dan C-20 muncul pada δ 6,876-6,910 ppm $J=8,0$ Hz.

Pada atom C-3, dan C-18 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10A sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada posisi tersebut. Adanya dua gugus metoksi ditandai dengan adanya dua puncak atom pada δ 3,84 ppm dengan integrasi sebesar 6,18 menunjukkan adanya 3 proton dari dua OCH₃ pada R₂ dan R₄. Pada atom C-7 ditunjukkan oleh puncak singlet pada 7,76 ppm. Untuk atom C-11 muncul puncak multiplet pada sekitar δ 1,88-1,86 dengan integrasi sebesar 2,05. Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014). Untuk atom C-10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada sekitar δ 2,77-2,79 ppm dengan integrasi sebesar 4,05, hal tersebut menunjukkan jika pengaruh penarikan elektron dari cincin p-metoksibenzena.

Berdasarkan hasil analisis spektrum ¹³C-NMR, terlihat bahwa jumlah atom karbon sesuai dengan jumlah puncak yang muncul. -CH₂ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2002). Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut pada δ 22,03;

24,53; 27,14 ppm. Puncak atom karbon dari substituen $-\text{OCH}_3$ pada dua cincin benzena muncul pada δ 55,38 ppm; dan 55,49 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Untuk atom C penyusun cincin aromatik akan muncul pada δ 110-155 ppm (Field, 2008), hasil analisis ^{13}C -NMR menunjukkan jika puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut sekitar δ 113,79-131,04 ppm. Puncak atom C-3 dan C-18 pada dua benzena yang bersebelahan dengan $-\text{OCH}_3$ muncul pada δ 144,36 ppm; dan 145,03 ppm. Atom C-7 dan C-9 yang merupakan atom $\text{C}=\text{N}$ muncul lebih *downfield* pada δ 158,78 ppm; dan 158,88 ppm.

Spektrum HNMR senyawa 10B menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat dideteksi dengan baik berdasarkan hasil ^1H -NMR ditunjukkan ada empat puncak yang menunjukkan integrasi enam proton cincin aromatis pada C-1, C-4, C-5, C-16, C-17, dan C-20 serta satu proton etilenik pada C-14. Atom proton C1 muncul pada dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 7,24-7,24 ppm dengan integrasi 0,93, atom proton C-5 muncul pada dengan puncak doublet pada δ 7,16 ppm $J=8,0$ Hz dengan integrasi 1,00, atom proton C-4 dan C-17 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,94 ppm $J=7,0$ Hz dengan integrasi 2,01, dan atom C-16, C-20, dan -C14 muncul secara multiplet dengan puncak bertumpuk pada δ 6,86-6,94 ppm $J=8,0$ Hz dengan integrasi 3,03, nilai coupling juga menunjukkan bahwa atom tetangga yang mempengaruhi pemisahan ialah berada pada posisi orto.

Pada atom C-2, C-3, C-18, dan C-19 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10A sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada posisi C-2, C-3, C-19 dan adanya gugus hidroksi pada atom C-18,. Adanya tiga gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom pada δ 3,89 ppm; 3,91 ppm; 3,92 ppm dengan integrasi sebesar 2,98; 5,63; 3,39 menunjukkan adanya perkiraan 9 proton dari OCH_3 pada R_1 , R_2 , dan R_4 . Untuk atom C-11 muncul puncak multiplet pada sekitar δ 1,88-1,90 dengan integrasi sebesar 1,97. Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014). Untuk atom C-10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada sekitar δ 2,80-2,82 ppm dengan integrasi sebesar 4,0.

Berdasarkan hasil analisis spektrum ^{13}C -NMR senyawa 10B, terlihat bahwa jumlah atom karbon sesuai dengan jumlah puncak yang muncul. $-\text{CH}_2$ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2008). Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut

pada δ 22,17; 24,62; 27,24 ppm. Puncak atom CH pada C-8 muncul pada δ 31,155 ppm. Puncak atom dari tiga substituen $-\text{OCH}_3$ pada dua cincin benzena muncul pada δ 55,97 ppm; 56,06 ppm dan 56,09 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Untuk atom C penyusun cincin aromatik akan muncul pada δ 110-155 ppm (Field, 2008), hasil analisis ^{13}C -NMR menunjukkan jika puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut sekitar δ 110,17-129,55 ppm. Puncak atom C-2, C-3 dan C-19 pada dua benzena yang bersebelahan dengan $-\text{OCH}_3$ muncul pada δ 148,64 ppm; 140,21 ppm; dan 149,35 ppm. Atom C-7 dan C-9 yang merupakan atom $\text{C}=\text{N}$ muncul lebih *downfield* pada δ 144,13 ppm; dan 145,53 ppm.

Spektrum ^1H -NMR senyawa 10C menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat dideteksi dengan baik berdasarkan hasil ^1H -NMR ditunjukkan ada empat puncak yang menunjukkan integrasi tujuh proton cincin aromatis pada C-1, C-4, C-5, C-16, C-17, C-19 dan C-20 serta satu proton etilenik pada C-14. Atom proton C1 muncul pada dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 7,24-7,24 ppm dengan integrasi 1,00, atom proton C-5 muncul pada dengan puncak doublet doublet pada δ 7,165 ppm $J=8,0$ Hz dengan integrasi 1,18, atom proton C-4 dan C-17 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,86 ppm–6,88 ppm $J=8,5$ Hz dengan integrasi 2,20, atom C-14, C-16 muncul secara doublet pada δ 6,86 ppm–6,88 ppm $J=8,5$ Hz dengan integrasi 1,78, C-19 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,98 ppm $J=7,0$ Hz dengan integrasi 1,14, dan C-20 muncul pada δ 6,94 ppm $J=1,5$ Hz; 8 Hz muncul secara doublet doublet dengan integrasi 1,21. Nilai *coupling* $J=6-9$ Hz juga menunjukkan bahwa atom tetangga yang mempengaruhi pemisahan ialah berada pada posisi orto (Field, 2008).

Pada atom C-2, C-3, dan C-18 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10C sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada posisi C-2, C-3, C-18. Adanya tiga gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom pada δ 3,90 ppm; 3,91 ppm; 3,92 ppm dari OCH_3 pada R_1 , R_2 , dan R_4 . Untuk atom C11 muncul puncak multiplet pada sekitar δ 1,88-1,92 dengan integrasi sebesar 2,37. Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014). Untuk atom C-10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada sekitar δ 2,80-2,82 ppm dengan integrasi sebesar 4,79.

Berdasarkan hasil analisis spektrum ^{13}C -NMR senyawa 10C, terlihat bahwa jumlah atom karbon sesuai dengan jumlah puncak yang muncul. $-\text{CH}_2$ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2008). Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut pada δ 22,23; 24,68; 27,27 ppm. Puncak atom CH pada C-8 muncul pada δ 31,15 ppm. Puncak atom dari tiga substituen $-\text{OCH}_3$ pada dua cincin benzena muncul pada δ 56,02 ppm; 56,05 ppm dan 56,02 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Untuk atom C penyusun cincin aromatik akan muncul pada δ 110-155 ppm (Field, 2008), hasil analisis ^{13}C -NMR menunjukkan jika puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut sekitar δ 110,085-129,638 ppm. Puncak atom C-2, C-3 dan C-18 pada dua benzena yang bersebelahan dengan $-\text{OCH}_3$ muncul pada δ 148,29 ppm; 148,65 ppm; dan 149,22 ppm. Atom C-7 dan C-9 yang merupakan atom $\text{C}=\text{N}$ muncul lebih *downfield* pada δ 144,02 ppm; dan 145,73 ppm.

Spektrum ^1H -NMR senyawa 10D menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat dideteksi dengan baik berdasarkan hasil ^1H -NMR ditunjukkan ada empat puncak yang menunjukkan integrasi enam proton cincin aromatis pada C-1, C-4, C-5, C-16, C-17, dan C-20 serta satu proton etilenik pada C-14. Atom proton C-1 muncul pada dengan puncak singlet tidak sempurna pada δ 6,952 ppm dengan integrasi 1,12, dan atom proton C5 muncul pada dengan puncak doublet pada δ 7,172-7,191 ppm $J=8,0$ Hz dengan integrasi 1,00. Atom proton C-4 dan C-17 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,94 ppm $J=7,0$ Hz dengan integrasi 2,01. Atom C-16, dan C-20 muncul secara singlet dengan puncak bertumpuk pada δ 6,88 ppm dengan integrasi 1,83. Atom C14 muncul secara singlet dengan puncak bertumpuk pada δ 6,87 ppm dengan integrasi 0,40. Nilai coupling pada senyawa 10D menunjukkan bahwa atom tetangga yang mempengaruhi pemisahan ialah berada pada posisi orto.

Pada atom C-2, C-3, C-18, dan C-19 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10D sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi gugus metoksi pada posisi C-2, C-3, C-18 dan C-19. Adanya empat gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom pada δ 3,89 ppm; 3,91 ppm; 3,92 ppm; dan 6,93 dengan integrasi sebesar 3,07; 3,13; 3,51; dan 3,37 menunjukkan adanya perkiraan 12 proton dari OCH_3 pada R_1 , R_2 , R_3 dan R_4 . Untuk atom C-11 muncul puncak multiplet pada sekitar δ 1,87-1,90 dengan integrasi sebesar 2,20. Pada bagian cincin sikloheksanon umumnya akan

muncul puncak pada daerah δ 0-2 ppm (Harmita, 2014). Untuk atom C-10 dan C-12 puncaknya muncul pada daerah yang sangat berdekatan, sehingga menghasilkan puncak multiplet pada sekitar δ 2,80-2,82 ppm dengan integrasi sebesar 4,44.

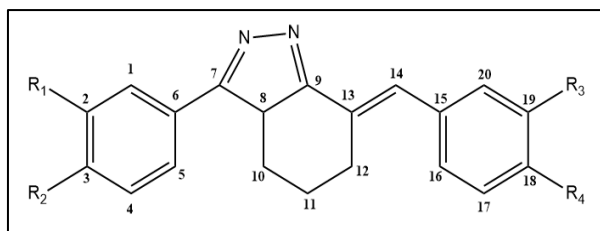
Berdasarkan hasil analisis spektrum ^{13}C -NMR senyawa 10D, terlihat bahwa jumlah atom karbon sesuai dengan jumlah puncak yang muncul. $-\text{CH}_2$ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2008). Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut pada δ 22,38; 24,81; 27,34 ppm. Puncak atom CH pada C-8 muncul pada δ 31,15 ppm. Puncak atom dari empat substituen $-\text{OCH}_3$ pada dua cincin benzena berbentuk simetris sehingga muncul dua puncak yaitu pada δ 56,04 ppm; dan 56,08 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Untuk atom C penyusun cincin aromatik akan muncul pada δ 110-155 ppm (Field, 2008), hasil analisis ^{13}C -NMR menunjukkan jika puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut sekitar δ 109,92-122,12 ppm. Puncak atom C-2, C-3, C-18, dan C-19 pada dua benzena yang bersebelahan dengan $-\text{OCH}_3$ muncul pada δ 148,29 ppm; 148,65 ppm; dan 149,22 ppm. Atom C-7 dan C-9 yang merupakan atom C=N muncul pada δ 127,60 ppm; dan 129,85 ppm.

Analisis HR-MS yang digunakan untuk memprediksi berat molekul adalah dengan metode ESI mode (+). Hasil analisis HR-MS senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D menunjukkan formula molekul $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$, $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$, $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ dan $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ dengan berat molekul perhitungan masing-masing 346,16813; 392,17361; 376,17896; dan 406,18926 Da sedangkan m/z yang diperoleh 347,17514 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 393,18003 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 409,21152 Da ($[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}]^+$); dan 407,19619 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Senyawa 10C menunjukkan adanya ion *adduct* dari proton dan CH_3OH , hal tersebut berdasarkan Huang (1999) bahwa analisis BM menggunakan ESI-MS dapat menghasilkan beberapa ion *adduct* termasuk CH_3OH . Hal tersebut dapat disebabkan adanya pengotor karena ketidakmurnian senyawa 10C, adanya CH_3OH sebagai pengotor kemungkinan disebabkan pada proses pemurnian yang tidak sempurna (Huang, Siegel, Kruppa, & Laukien, 1999; Keller, Sui, Young, & Whittal, 2008). Data BM perhitungan dengan m/z yang diperoleh dari spektrum HRMS dilihat perbedaannya sehingga diperoleh *mass error*. Senyawa dikatakan memiliki struktur yang sama dengan yang diharapkan jika memiliki *mass error* dibawah 5 ppm (Bristow & Webb, 2003) atau dibawah 0,001 Da (Brenton & Godfrey, 2010). Berdasarkan Pavia (2000) nilai akurasi hasil HRMS berkisar 0,005%,

jika BM senyawa berkisar 300 Da sampai 500 Da maka nilai *mass error* berkisar 0,015 Da sampai 0,025 Da (Pavia, Lampman, & Kriz, 2000). Berdasarkan **Tabel 4.20** dapat dilihat bahwa *mass error*nya berada dibawah 5 ppm dan juga di bawah 0,001 Da sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa tersebut sesuai dengan yang direncanakan. Berdasarkan data hasil interpretasi spektra HRMS, FT-IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D sesuai dengan yang diharapkan.

Senyawa 3-(4-metoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol 9E dan 9F akan bereaksi dengan benzaldehida tersubstitusi dalam pelarut yang sesuai akan mengalami kondensasi menghasilkan senyawa 3-(4-metoksifenil)-7-(3-metoksi, 4-hidroksibenziliden)-3a,5,6,7-tetrahidro-4H-indazol. Hal ini karena gugus metil pada C pada hidrogen α senyawa 9E dan 9F cukup reaktif (*acidic*) karena bersebelahan pada karbon azometina (gugus C=N) (Meiyyanathan, 2006). Atom N azometina (seperti O karbonil) dalam asam asetat glasial terprotonasi, kemudian diikuti oleh stabilisasi melalui resonansi mengakibatkan deprotonasi gugus karbon α membentuk karbanion. Usulan mekanisme reaksi kondensasi dapat dilihat dapat dilihat pada **Gambar 4.11**.

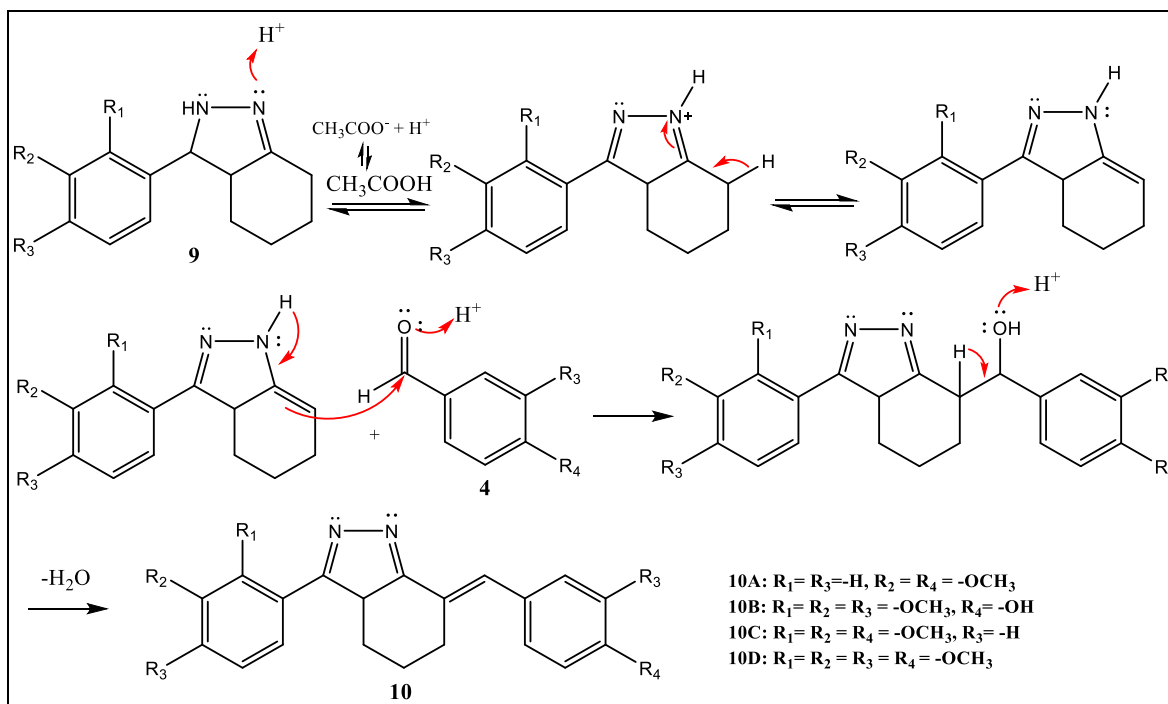
Tabel 4.19. Data Hasil $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Produk Tahap 3 Jalur 2



No	Senyawa, δ (ppm), m, J (Hz)							
	10A $\text{R}_1 = \text{R}_3 = -\text{H},$ $\text{R}_2 = \text{R}_4 = -\text{OCH}_3$		10B $\text{R}_1 = \text{R}_3 = \text{R}_2 = -\text{OCH}_3,$ $\text{R}_4 = -\text{OH}$		10C $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{R}_2 = -\text{OCH}_3,$ $\text{R}_3 = -\text{H}$		10D $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = -\text{OCH}_3,$	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	7,54; d; 2H; J = 8	128,51	7,24; d; 1H; J = 2,5	110,92	7,23; 1H; J = 1,5	110,92	6,88; s; 2H	111,04
2	7,32; d; 2H; J = 8	114,28	-	149,21	-	148,29	-	148,94
3	-	131,00	-	149,35	-	148,65	-	149,27
4	7,32; d; 2H; J = 8	145,05	6,94; m; 2H; J = 8	110,17	6,89; d; 2H; J = 9	111,08	7,19; 1H; dd; J = 1,5; 8	111,04
5	7,54; d; 2H; J = 8	128,51	7,17; dd; 1H; J = 2,5; 8	111,08	7,17; dd; 1H; J = 1,5; 8	112,77	6,91; s; 2H	112,66
6	-	114,70	-	119,85	-	123,93	-	119,42
7	-	157,88	-	145,53	-	145,73	-	129,85
8	-	-	-	31,16	-	31,15	-	31,15
9	-	158,77	-	144,13	-	144,02	-	128,00
10	2,78; m; 4H	22,07	2,81; m; 4H	22,17	2,81; m; 4H	22,29	2,81; m; 4H	27,34
11	1,87; m; 2H	24,59	1,97; m; 2H	24,17	1,90; m; 2H	24,68	1,88; m; 2H	24,81
12	2,78; m; 4H	27,16	2,81; m; 4H	27,24	2,81; m; 4H	27,27	2,81; m; 4H	22,38
13	-	114,70	-	114,81	-	122,39	-	121,30
14	7,10; s; 1H	129,38	6,89; dd; 2H; J = 5; 8	129,85	6,97; s; 1H; J = 1,5	129,55	6,87; s; 1H	122,12
15	-	129,99	-	123,93	-	126,17	-	119,42
16	6,89; dd; 4H; J = 8	131,00	6,89; dd; 2H; J = 5; 8	122,39	6,94; dd; 1H; J = 1,5; 8	119,85	6,91; s; 2H	111,28
17	6,89; dd; 4H; J = 8	113,82	6,94; m; 2H; J = 8	112,77	6,89; d; 2H; J = 9	114,81	6,94; dd; 1H; J = 3,5; 8.	109,92
18	-	144,36	-	148,36	-	148,29	-	148,71
19	6,89; dd; 4H; J = 8	113,82	-	148,64	6,87; d; 2H; J = 8,5	110,95	-	148,16
20	6,89; dd; 4H; J = 8	131,00	6,89; m; 3H; J = 5; 8	122,39	6,87; d; 2H; J = 8,5	111,17	6,88; s; 2H	109,92
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
R ₁	-	-	3,91; d; 6H	55,06	3,91; d; 6H	56,09	3,93; s; 3H	56,08
R ₂	3,84; d; 6H	55,38	3,92; s; 3H	55,99	3,91; d; 6H	56,05	3,92; d; 3H	56,04
R ₃	-	-	3,91; d; 6H	56,09	-	-	3,91; s; 3H	56,08
R ₄	3,84; d; 6H	55,49	-	-	3,92; 3H	56,02	3,89; s; 3H	56,04

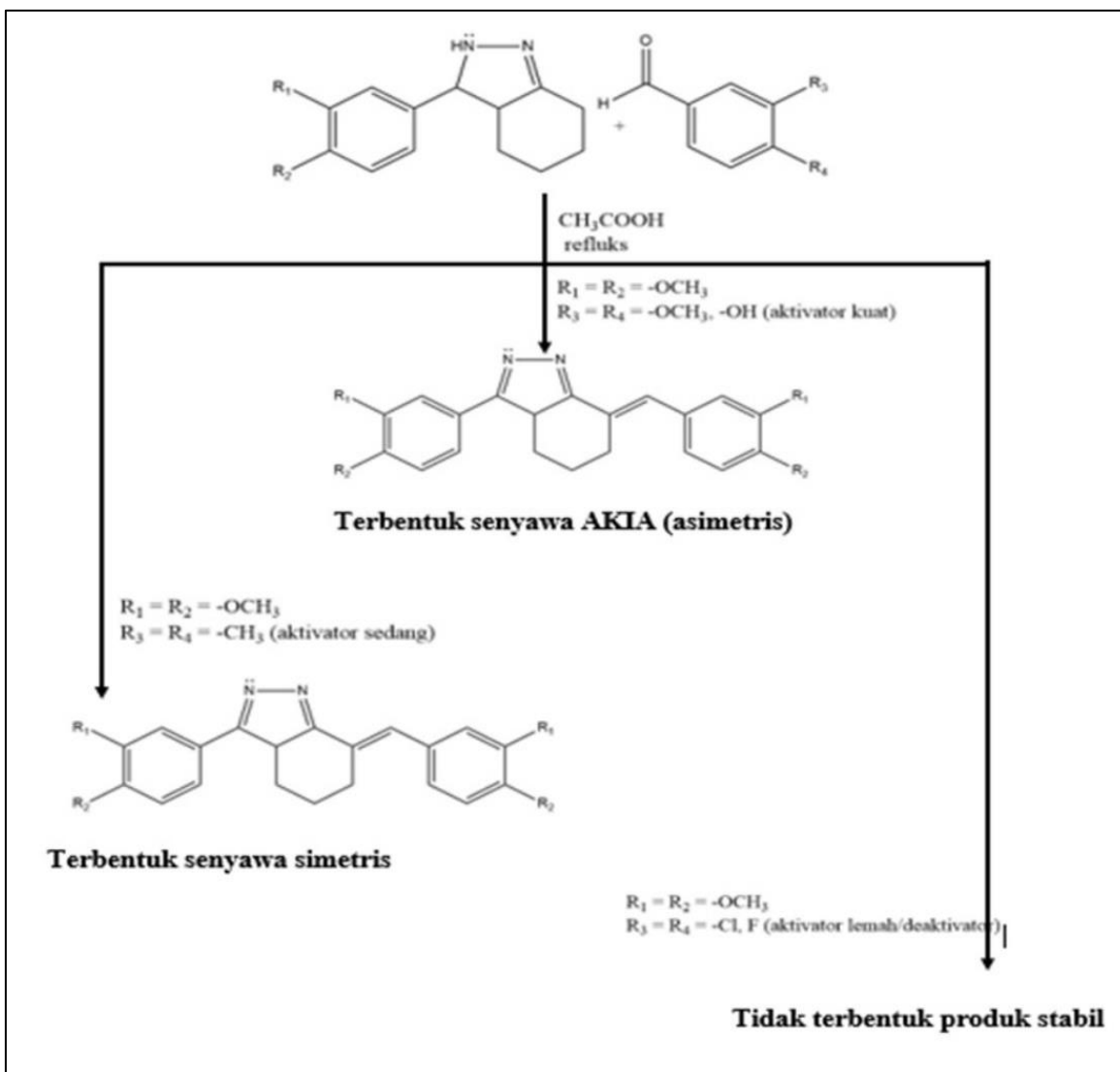
Tabel 4.20 Hasil HR-MS senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D

Senyawa	m/z found	[M+X] ⁺	[M] perhitungan (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Formula
10A	347,17514	[M+H] ⁺	346,16813	-0,3	-0,8	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₂
10B	393,18003	[M+H] ⁺	392,17361	-0,9	-2,2	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄
10C	409,21152	[M+CH ₃ OH+H] ⁺	376,17896	+0,1	+0,3	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₃
10D	407.19619	[M+H] ⁺	406,18926	-0,3	-0,9	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄



Gambar 4.11 Usulan mekanisme reaksi tahap 3 jalur 2, senyawa 10A - 10D

Berdasarkan hasil penelitian di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa produk senyawa AKI terbentuk jika R substituen pada kedua sisi termasuk aktivator kuat, disimpulkan berdasarkan Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Usulan skema pembentukan senyawa AKI simetris dan asimetris

4.7.3 Sintesis senyawa AKI jalur 3

4.7.3.1 Sintesis tahap 1 jalur 3

Pada sintesis senyawa 2,6-bis((E)-(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon (**5G**) mengadopsi dari Sardjiman (1997), sintesis dilakukan dengan mencampurkan senyawa 4-hidroksibenzaldehida, 0,01 mol, dan sikloheksanon 0,01 mol dipanaskan pada suhu 25-30 °C dengan katalis $\text{HCl}_{(p)}$ 0,2 mL dan direaksikan selama 2 hari. Pada sintesis ini terjadi reaksi kondensasi claisen schmidtz pada suasana asam. Proses pemurnian hasil sintesis dilakukan menggunakan larutan asam asetat glasial : air (1: 1) dingin untuk membuang sisa bahan terutama senyawa aldehyd yang terlarut dalam asam asetat glasial. Produk akan mengendap dan dicuci dengan etanol dingin, kemudian dengan air panas dan

dikeringkan. Untuk mengidentifikasi terbentuknya senyawa 5G dan diuji kemurniannya dianalisis dengan KLT menggunakan fase gerak campuran heksan : etilasetat (2:1), dan diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan FT-IR. Senyawa yang diperoleh mempunyai karakteristik serbuk berwarna kuning dengan rendemen sebesar 86,5 %. Hasil sintesis tahap 1 jalur 3 yaitu foto produk serta KLT pada **Lampiran 6** dan spektrum FTIR senyawa 5G pada **Lampiran 7**.

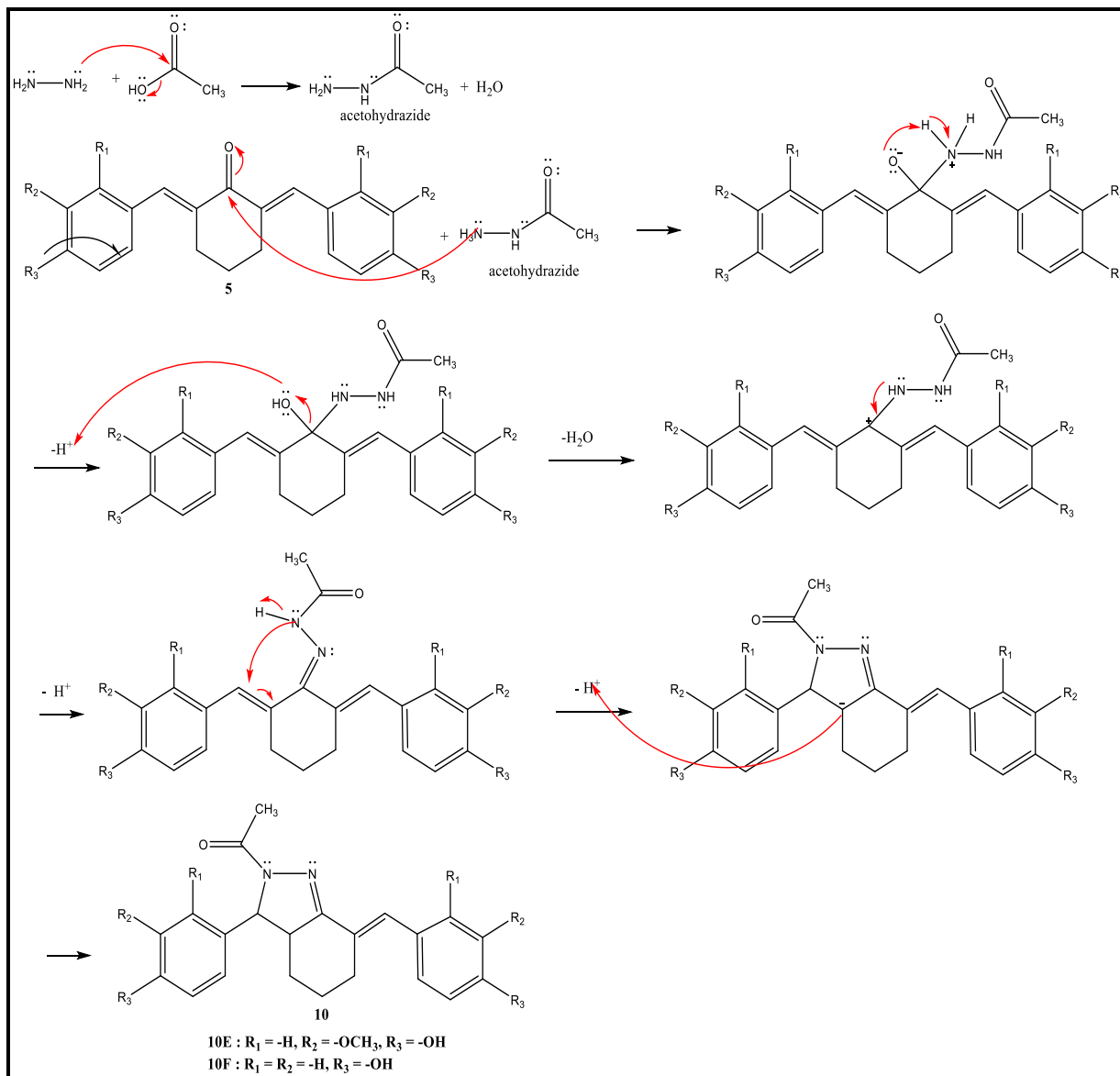
Konfirmasi produk dilakukan identifikasi dengan menggunakan FT-IR menunjukkan beberapa adanya bilangan gelombang untuk gugus fungsi yang khas pada senyawa 2,6-bis((E)-(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon yaitu adanya bilangan gelombang 1649 cm^{-1} yang menunjukkan adanya C=O keton dan bilangan gelombang 3244 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus OH bebas, sesuai dengan bilangan gelombang acuan untuk OH bebas pada kisaran $3200 - 3550\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein, *et al.*, 2005).

4.7.3.2 Sintesis tahap 2 jalur 3

Pada tahap ini dilakukan dengan mengadopsi metode Hayun, 2012. Sintesis tahap 3 dilakukan dengan mereaksikan senyawa AKM simetris yaitu siklovalon {2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenziliden)sikloheksanon} (5F) dan senyawa 2,6-bis((E)-(4-hidroksibenziliden)sikloheksanon (5G) sebanyak 0,01 mol dengan 0,1 mol senyawa Hidrazin mohohidrat dan dalam 20 ml asam asetat glasial. Kemudian campuran tersebut diaduk dengan menggunakan pengaduk magnetik dengan menggunakan refluks pada suhu refluks selama 3 jam. Hasil sintesis ditetaskan ke dalam batu es sampai terbentuk suspensi kemudian suspensi yang terbentuk didiamkan sampai terbentuk endapan. Endapan tersebut dicuci dengan etanol, dan diekstraksi dengan etil asetat.

Pada tahap 2 jalur 3 menghasilkan dua senyawa AKI yaitu (E)-1-(7-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-yl)etanon (10E), dan (E)-1-(7-(4-hidroksibenziliden)-3-(4-hidroksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-yl)etanon (10F). Senyawa yang diperoleh mempunyai karakteristik serbuk berwarna berbeda-beda (kuning). Rendemen produk senyawa 10 E didapat sebesar 23,69 %, dan senyawa 10F sebesar 42,2 % dapat dilihat pada **Lampiran 8**. Hasil sintesis tahap 2 jalur 3 yaitu perbandingan Rf pada **Tabel 4.21** dan foto produk serta KLT pada **Lampiran 6**. Kemurnian senyawa yang telah diperoleh dianalisis dengan melakukan pengamatan titik lebur dapat dilihat pada **Tabel 4.21**.

Selanjutnya dilakukan elusidasi struktur dengan menggunakan instrumen FT-IR (**Tabel 4.22**), $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (**Tabel 4.23**) dan HR-MS (**Tabel 4.24**). Data spektrum lengkap FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, dan HR-MS dapat dilihat pada **Lampiran 8**.



Gambar 4.13 Usulan mekanisme reaksi tahap 2 jalur 3, senyawa **10E** dan **10F**

Tabel 4.21 Rendemen dan Karakteristik Produk Hasil Sintesis Tahap 2 Jalur 3

Senyawa	Rendemen (%)	R _f (Etil Asetat: n-Heksan = 1 : 1)	Jarak Lebur (°C)
10E	23,69	0,21	105 - 107
10F	42,20	0,42	146 - 148

Pada tahap 2 jalur 3, produk senyawa yang terbentuk berbeda dengan senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D, hal ini karena senyawa hidrazin monohidrat yang digunakan bereaksi terlebih dahulu dengan pelarut asam asetat glasial sehingga terbentuk senyawa acetohydrazide. Senyawa acetohydrazide tersebut baru bereaksi dengan senyawa 2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenziliden)sikloheksanon dan 2,6-bis((E)-4-hidroksibenziliden)sikloheksanon menghasilkan (E)-1-(7-(4-hidroksi-3-metoksibenziliden)-3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-il)ethanon (10E), dan (E)-1-(7-(4-hidroksibenziliden)-3-(4-hidroksifenil)-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-yl)etanon (10F). Usulan mekanisme reaksi jalur 2 tahap 3 dapat dilihat pada **Gambar 4.13**.

Tabel 4.22 Data Hasil FTIR senyawa 6 dari tahap 2 jalur 3

Gugus Fungsi	Bilangan Geombang (cm^{-1})	
	10E	10F
OH	3525	3400
H-C= aromatik	3005	3012
C-H alifatik	2945	2943
C=C aromatik	1518	1512
C=N	1597	1579
C-O eter	1161	-
C=O	1637	1647

Pada sintesis tahap 2 jalur 3 dihasilkan 2 senyawa yaitu senyawa 10E, dan 10F, ke dua senyawa tersebut telah terkonfirmasi oleh KLT, FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, dan HR-MS. Berdasarkan hasil KLT, ke empat produk tersebut menunjukkan spot tunggal dan berbeda dari senyawa awal dapat dilihat pada **Tabel 4.18** dan **Gambar L6-f**. Spektrum FTIR senyawa **10E**, dan **10F** menunjukkan beberapa perubahan dari bilangan gelombang senyawa awal yaitu senyawa 2,6-bis((E)-4-hidroksi-3-metoksibenzyliden) sikloheksanon dan 2,6-bis((E)-4-hidroksibenzyliden) sikloheksanon. Spektrum ke dua senyawa tersebut menunjukkan terbentuknya gugus imin (C=N) pada senyawa 10E, dan 10F pada bilangan gelombang 1597 dan 1579 cm^{-1} , sesuai dengan bilangan gelombang pada kisaran 1480-1690 cm^{-1} (Field, 2008).

Senyawa 10E, dan 10F terkonfirmasi $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$ dengan nilai geseran kimia yang khas pada masing-masing produk. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 10E menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat dideteksi dengan baik berdasarkan hasil $^1\text{H-NMR}$ ditunjukkan ada empat puncak yang menunjukkan integrasi

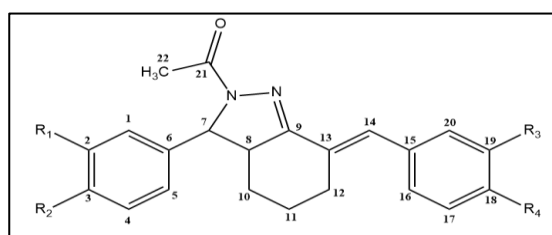
enam proton cincin aromatis pada C-1, C-4, C-5, C-16, C-17, dan C-20 serta satu proton etilenik pada C-14. Atom proton C-1 muncul dengan puncak doublet pada δ 6,75 ppm $J=2,0$ Hz dengan integrasi 0,97. Nilai J coupling sebesar $J=2,0$ Hz pada senyawa atom C-1 menunjukkan ada pengaruh atom tetangga pada posisi meta yaitu atom C-5. Atom proton C-5 muncul dengan puncak doublet doublet pada δ 6,78 ppm $J=2,0; 8,0$ Hz dengan integrasi 1,08. Nilai J coupling sebesar $J=8,0$ Hz pada senyawa atom C-5 menunjukkan ada pengaruh atom tetangga pada posisi orto yaitu atom C-4, dan posisi meta yaitu atom C-1. Atom proton C-4 dan C-20 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,92 ppm $J=1,5$ dengan integrasi 2,06. Atom proton C-17 muncul pada dengan puncak singlet pada δ 6,87 ppm dengan integrasi 1,04. Atom proton C-4 dan C-20 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,92 ppm dengan integrasi 2,06, dan atom C-14 muncul secara singlet dengan puncak bertumpuk pada δ 7,14 ppm dengan integrasi 0,97.

Pada atom C-2, C-3, C-18, dan C-19 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10E sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi dua gugus metoksi pada posisi C-2, dan C-19 serta adanya dua gugus hidroksi pada C-3, dan C-18,. Adanya dua gugus metoksi ditandai dengan adanya puncak atom pada δ 3,89 ppm dengan integrasi sebesar 6,12 menunjukkan adanya perkiraan 6 proton dari OCH_3 pada R_1 , dan R_3 . Adanya gugus metil pada atom C-22 memberikan puncak khas pada δ 2,37 ppm secara singlet dengan integrasi 2,79. Atom C-10 muncul puncak δ 1,27 ppm secara multiplet dengan integrasi 2,56, atom C-11 muncul δ 1,66 dan secara multiplet dengan integrasi 3,01 dan pada δ 1,94 ppm secara multiplet dengan integrasi 0,99. Atom C12 muncul pada δ 1,66 ppm secara multiplet dengan integrasi 3,01. Atom C-8 muncul pada δ 3,06 ppm secara doublet dengan integrasi 1,06, dan atom C -7 muncul pada δ 4,82 ppm secara doublet dengan integrasi 1,00.

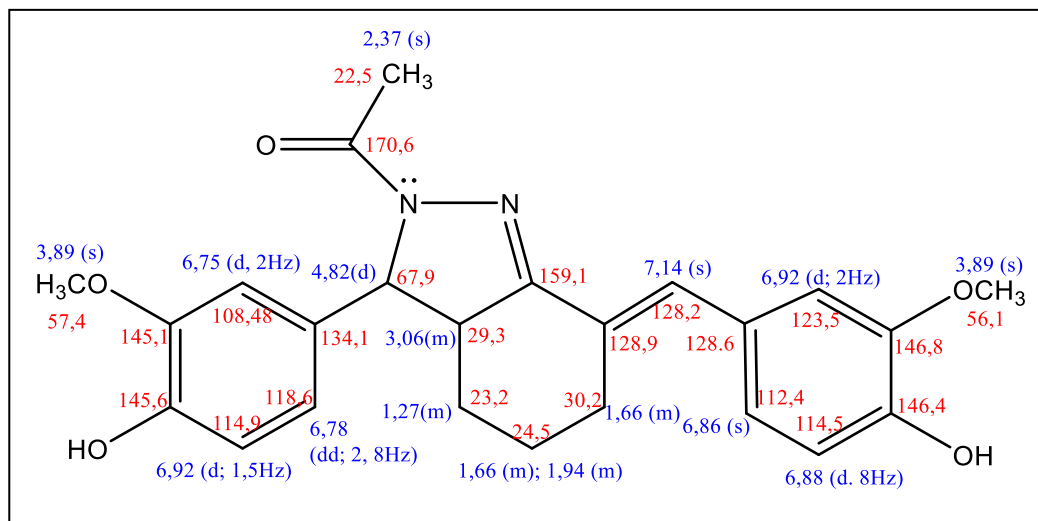
Berdasarkan hasil analisis spektrum ^{13}C -NMR senyawa 10E, terlihat bahwa jumlah atom karbon sesuai dengan jumlah puncak yang muncul. $-\text{CH}_2$ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2008). Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut 23,15 ppm; 24,49 ppm; dan 30,15 ppm. Puncak atom C-22 muncul pada δ 22,49. Puncak atom CH pada C-7 muncul pada δ 67,99 ppm, dan atom CH pada C-8 muncul pada δ 29,26 ppm. Puncak atom dari dua substituen $-\text{OCH}_3$ pada dua cincin benzena muncul dua puncak yaitu pada δ 56,08 ppm; dan 57,43 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Untuk atom C penyusun cincin aromatik

akan muncul pada δ 110-155 ppm (Field, 2008), hasil analisis ^{13}C -NMR menunjukkan jika puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut berjumlah 10 karbon sekitar δ 108,48-134,11 ppm. Puncak atom C-2, C-3, C-18, dan C-19 pada dua benzena yang bersebelahan dengan $-\text{OCH}_3$ dan $-\text{OH}$ muncul pada δ 145,06 ppm; 145,61 ppm; 146,38 ppm dan 146,82 ppm. Atom C-9 yang merupakan atom $\text{C}=\text{N}$ muncul pada δ 159,08 ppm; dan adanya gugus $-\text{C}=\text{O}$ pada C-21 muncul pada δ 170,64 ppm.

Tabel 4.23 Data Hasil ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR Produk Tahap 2 Jalur 3 (10E & 10F)

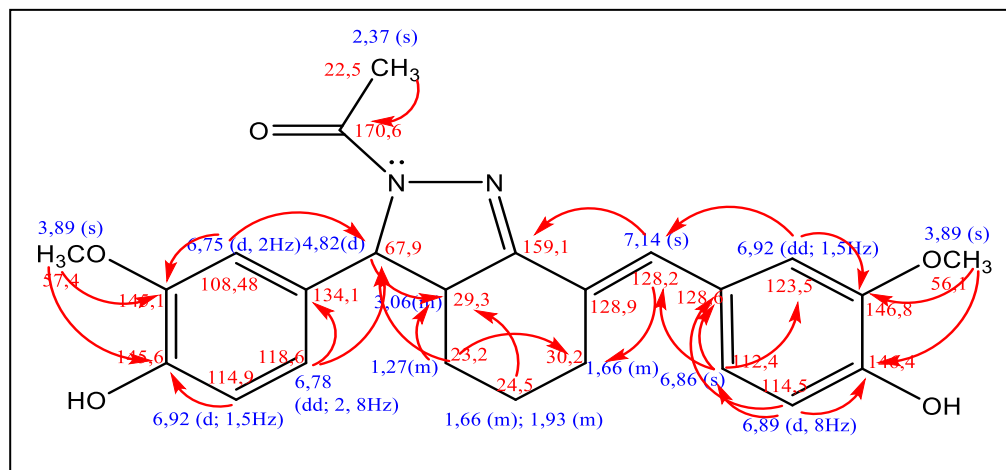


No	Senyawa, δ (ppm), m, J (Hz)			
	10E: $\text{R}_1 = \text{R}_3 = -\text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{R}_4 = -\text{OH}$		10F: $\text{R}_1 = \text{R}_3 = -\text{H}$, $\text{R}_2 = \text{R}_4 = -\text{OH}$	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	6,75; d; 1H; J= 2	108,48	7,05; d; 1H; J= 8,5	126,99
2	-	145,06	7,20; m; 2H; J= 7	130,71
3	-	145,61	-	155,55
4	6,92; d; 2H; J=1,5	114,86	7,20; m; 2H; J= 7	131,36
5	6,78; dd; 1H; J= 2, 8	118,63	7,43; d; 1H; J= 8,5	128,12
6	-	134,11	-	128,88
7	4,82; d; 1H; J=9	67,99	4,77; d; 1H	67,43
8	3,06; d; 1H	29,49	3,01; m; 1H	30,05
9	-	159,08	-	159,97
10	1,27; m; 2H	23,15	1,22; m; 2H	24,67
11	1,66; m; 3H	24,49	1,82; m; 1H	27,20
	1,94; m; 1H		2,14; m; 1H	
12	1,66; m; 3H	30,15	2,73; m; 2H	29,13
13	-	128,98	-	114,16
14	7,14; s; 1H	128,19	6,84; dd; 1H; J = 7	115,20
15	-	128,64	-	121,35
16	6,86; s; 1H	112,38	6,79; dd; 2H; J = 7	115,70
17	6,87; d; 1H; ; J= 8,0	114,46	6,74; dd; 2H; J= 8,5	115,28
18	-	146,38	-	156,63
19	-	146,82	6,74; dd; 2H; J= 8,5	115,20
20	6,92; d; 2H; J=1,5	123,47	6,79; dd; 2H; J = 7	115,63
21	-	170,64	-	170,70
22	2,37; s; 3H	22,49	2,31; s; 3H	29,76
R ₁	3,90; d; 6H	57,43	-	-
R ₂	-	-	-	-
R ₃	3,90; d; 6H	56,08	-	-
R ₄	-	-	-	-



Gambar 4.14 Analisa Korelasi H dan C Hasil HMQC Senyawa 10E

Spektrum HMQC senyawa 10E untuk menentukan korelasi H dan C (**Gambar 4.14**). Hasil HMQC menunjukkan adanya korelasi antara atom proton pada δ 3,89 ppm dengan integrasi sebesar 6,12 pada R₁ dan R₂ memberikan korelasi pada atom karbon pada δ 56,08 ppm; dan 57,43 ppm, hal ini sesuai teori bahwa atom C gugus metoksi muncul pada δ 50-60 ppm (Field, 2008). Adanya gugus metil pada δ 2,37 ppm secara singlet dengan integrasi 2,79 juga berkorelasi pada atom karbon pada δ 22,49. Korelasi atom proton pada δ 145,06 ppm; 145,61 ppm; 146,38 ppm, 146,82 ppm, 159,08, dan 170,64 tidak ditemukan korelasi dengan puncak H sehingga menunjukkan bahwa atom tersebut merupakan suatu C kuarternar. Dengan cara yang sama, semua korelasi dihubungkan dan diperoleh dugaan struktur seperti pada **Gambar 4.14**. Untuk memastikan posisi masing-masing gugus fungsi seperti CH₃, dan OCH₃ maka bisa ditentukan dengan mengukur HMBC dapat dilihat pada **Gambar 4.15**, yaitu dengan adanya korelasi jarak jauh (*long range coupling*) sampai dengan 3 ikatan, yang ditandai dengan tanda panah merah. Secara ringkas bisa dilihat pada gambar struktur di bawah ini pada **Gambar 4.15**.

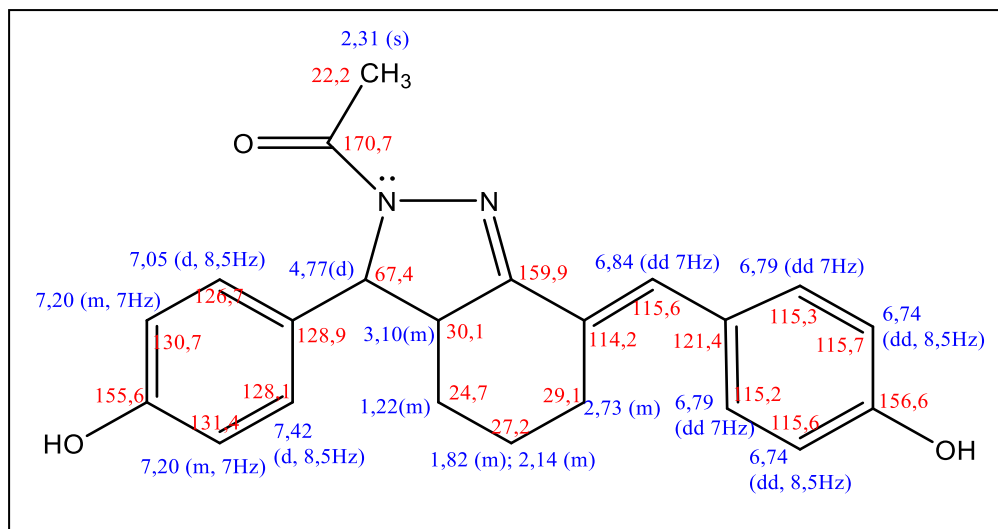


Gambar 4.15 Analisa Korelasi H dan C Hasil HMBC Senyawa 10E

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 10F menunjukkan adanya keberadaan dua gugus benzena dapat dideteksi dengan baik berdasarkan hasil $^1\text{H-NMR}$ ditunjukkan ada delapan puncak yang menunjukkan integrasi delapan proton cincin aromatis pada C-1, C-2, C-4, C-5, C-16, C-17, C-19, dan C-20 serta satu proton etilenik pada C-14. Atom proton C1 muncul pada dengan puncak doublet pada δ 7,05 ppm $J=8,5$ Hz dengan integrasi 1,24. Atom proton C5 muncul pada dengan puncak doublet pada δ 7,42 ppm $J=8,5$ Hz dengan integrasi 1,00. Atom proton C-16, dan C-20 muncul dengan puncak doublet tidak sempurna pada δ 6,79 ppm $J=7$ Hz dengan integrasi 1,98. Atom C-17, dan C-19 muncul secara doublet doublet dengan puncak bertumpuk pada δ 6,74 ppm $J=8,5$ Hz dengan integrasi 2,02. Atom proton C-2, dan C-4 muncul secara multiplet dengan puncak bertumpuk pada δ 7,20 ppm $J=7$ Hz dengan integrasi 2,13 dan atom proton C-14 muncul pada dengan puncak singlet pada δ 6,910 ppm dengan integrasi 0,39. Atom C-5 muncul secara doublet doublet pada δ 6,84 ppm $J=7$ Hz dengan integrasi 1,29.

Pada atom proton C-3, dan C-18 merupakan atom karbon kuartener pada senyawa 10F sehingga tidak muncul puncak, karena adanya substitusi dua gugus hidroksi pada C-3, dan C-18,. Adanya gugus metil pada atom C-22 memberikan puncak khas pada δ 2,31 ppm secara singlet dengan integrasi 3,02. Atom C-10 muncul puncak δ 2,71 ppm secara multiplet dengan integrasi 2,25. Atom C-11 muncul δ 1,206 ppm secara multiplet dengan integrasi 1,46. Atom proton C-11 muncul pada δ 1,82 ppm secara multiplet dengan integrasi 0,82; dan pada δ 2,14 ppm secara multiplet dengan integrasi 0,64. Atom C-12 muncul puncak δ 1,22 ppm secara multiplet dengan integrasi 2,48. Atom C-7 muncul pada

δ 4,77 ppm secara doublet dengan integrasi 0,44, dan atom C8 muncul pada δ 3,10 ppm secara multiplet dengan integrasi 1,56.

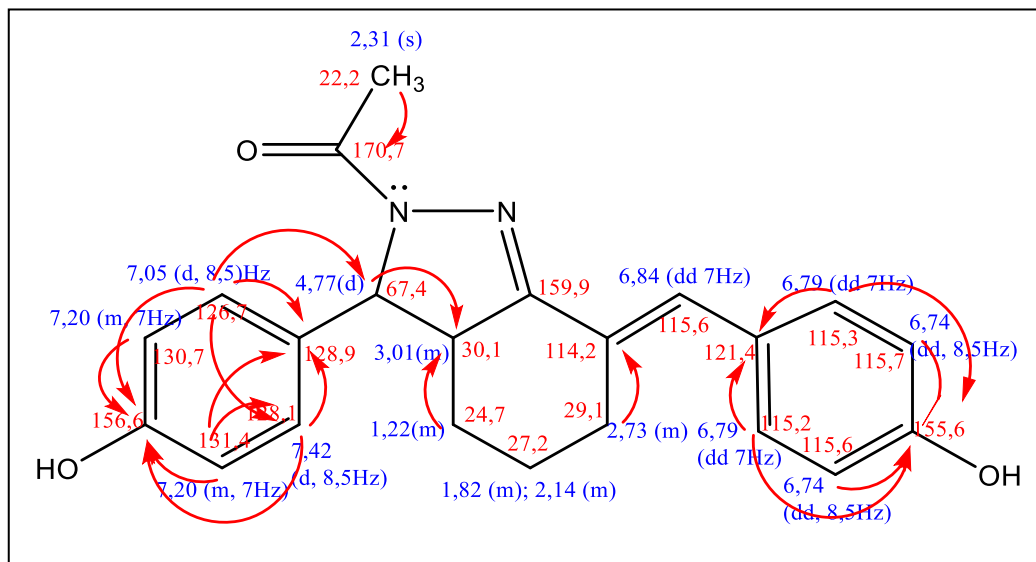


Gambar 4.16 Analisa Korelasi H dan C Hasil HMQC Senyawa 10F

Berdasarkan hasil analisis spektrum ^{13}C -NMR senyawa 10F menunjukkan bahwa jumlah atom karbon sesuai pada daerah aromatik. Jumlah puncak untuk setiap karbon penyusun cincin aromatik berada pada daerah tersebut berjumlah 12 karbon sekitar δ 114,16-131,36 ppm. Puncak atom C-22 muncul pada δ 22,24. Puncak atom CH pada C-7 muncul pada δ 67,43 ppm, dan atom CH pada C-8 muncul pada δ 30,05 ppm. Puncak atom C-3, dan C-18 pada dua benzena yang bersebelahan dengan -OH muncul pada δ 156,63 ppm; dan 155,61 ppm. Hasil analisis ^{13}C -NMR Atom C-9 yang merupakan atom C=N muncul pada δ 159,97 ppm; dan adanya gugus -C=O pada C-21 muncul pada δ 170,70 ppm. Atom C-10, C-11, dan C-12 muncul berturut-turut pada δ 24,67; 27,20; 29,13 ppm, sesuai dengan acuan bahwa atom karbon -CH₂ muncul pada daerah δ 20-45 ppm (Field, 2008).

Spektrum HMQC senyawa 10F untuk menentukan korelasi H dan C (**Gambar 4.16**). Hasil HMQC menunjukkan adanya korelasi antara atom proton gugus metil pada δ 2,31 ppm juga berkorelasi pada atom karbon pada δ 22,24. Korelasi atom proton pada δ 156,63 ppm; 155,61 ppm; δ 159,97 ppm; dan δ 170,70 ppm tidak ditemukan korelasi dengan puncak H sehingga menunjukkan bahwa atom tersebut merupakan suatu C kuarternar. Dengan cara yang sama, semua korelasi dihubungkan dan diperoleh dugaan struktur seperti pada **Gambar 4.17**. Untuk memastikan posisi masing-masing gugus fungsi seperti CH₃, dan OCH₃ maka bisa ditentukan dengan mengukur HMBC (**Gambar**

4.18), yaitu dengan adanya korelasi jarak jauh (*long range coupling*) sampai dengan 3 ikatan, yang ditandai dengan tanda panah merah. Secara ringkas bisa dilihat pada gambar struktur di bawah ini (**Gambar 4.17**).



Gambar 4.17 Analisa Korelasi H dan C Hasil HMBC Senyawa 10F

Berdasarkan hasil HMQC dan HMBC senyawa 10E, dan 10F dapat dilihat korelasi antara atom proton dengan atom karbon dan juga sampai dengan 3 ikatan. Dari korelasi tersebut menunjukkan adanya spot-spot korelasi pada spektrum datanya tidak berhubungan pada spektrum senyawa 10E, dan 10F, hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa 10E, dan 10F agak kurang murni akan terutama pada korelasi daerah alifatis, tetapi tidak dengan daerah aromatis. Hal tersebut kemungkinan disebabkan adanya pengotor dari pelarut yang digunakan seperti etilasetat, dan metanol. Pada senyawa 10E, dan 10F terdapat 2 atom C kiral yaitu pada posisi C-7, dan C-8. Pada senyawa 10E atom proton C -7 muncul pada δ 4,82 ppm dan berkorelasi dengan atom karbon pada δ 67,99 ppm, dan atom C-8 muncul pada δ 3,06 ppm dan berkorelasi dengan atom karbon pada δ 29,26 ppm. Pada senyawa 10F atom proton C-7 muncul pada δ 4,77 ppm dan berkorelasi dengan atom karbon pada δ 67,43 ppm, dan atom C-8 muncul pada δ 3,06 ppm dan berkorelasi dengan atom karbon pada δ 30,05 ppm. Pada atom C-7, dan C-8 keduanya terlihat adanya nilai pergeseran kimia yang berdekatan akan tetapi pada korelasinya dengan atom karbon tidak dominan, sehingga dapat diduga bahwa pengotor pada kedua senyawa merupakan isomernya tetapi dalam jumlah sangat kecil.

Analisis HR-MS yang digunakan untuk memprediksi berat molekul adalah dengan metode ESI mode (+). Hasil analisis HR-MS senyawa 10E, dan 10F menunjukkan formula molekul $C_{24}H_{26}N_2O_5$ dan $C_{22}H_{22}N_2O_3$ dengan berat molekul perhitungan masing-masing 422,18417; dan 362,16304 Da sedangkan m/z yang diperoleh 423,19312 Da ($[M+H]^+$); dan 363,17051 Da ($[M+H]^+$). Berat Molekul perhitungan dengan m/z yang diperoleh dari spektrum HRMS dilihat perbedaannya sehingga diperoleh *mass error*. Senyawa dikatakan memiliki struktur yang sama dengan yang diharapkan jika memiliki *mass error* dibawah 5 ppm (Bristow. & Webb, 2003) atau dibawah 0,001 Da (Brenton & Godfrey, 2010). Berdasarkan **Tabel 4.24** dapat dilihat bahwa *mass error*nya berada dibawah 5 ppm dan juga di bawah 0,001 Da sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa tersebut sesuai dengan yang direncanakan. Berdasarkan data hasil interpretasi spektra HRMS, FT-IR, 1H -NMR, dan ^{13}C -NMR, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D sesuai dengan yang diharapkan. Berdasarkan data hasil interpretasi spektra HR-MS, FT-IR, 1H NMR, dan ^{13}C -NMR, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa 10A, 10B, 10C, dan 10D sesuai dengan yang diharapkan

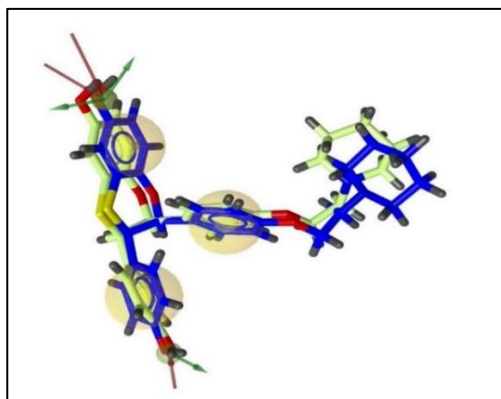
Tabel 4.24 Hasil HRMS Produk Tahap 2 Jalur 3 (10E, dan 10F)

Senyawa	m/z found	[M+X] ⁺	[M] perhitungan (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Formula
10E	423.19312	[M+H] ⁺	422,18417	-0,1	-0,3	$C_{24}H_{26}N_2O_5$
10F	363.17051	[M+H] ⁺	362,16304	+0,2	+0,5	$C_{22}H_{22}N_2O_3$

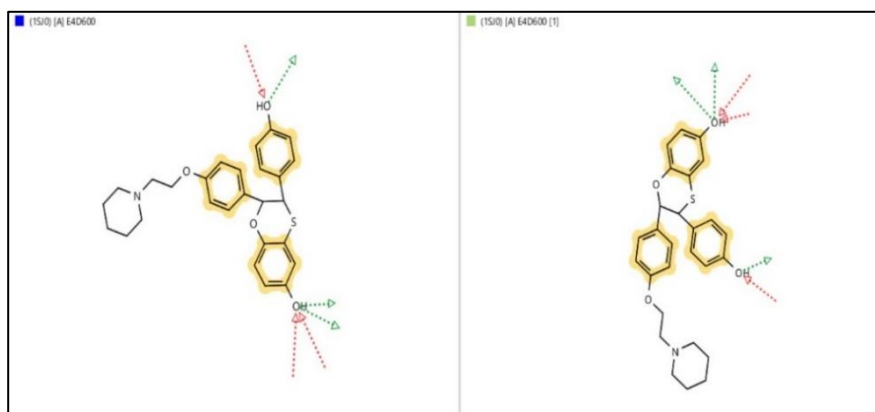
4.8 Konfirmasi senyawa 10A-10F dengan Penambatan Molekul senyawa 10A-10F dengan Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout 4.4 terhadap ER- α

4.8.1 Validasi dengan metode *Redocking*

Sebelum melakukan simulasi penambatan molekul, dilakukan validasi metode penambatan dengan mengekstraksi ligan ko-kristal (E4D600) dari struktur kristalografi ER α menjadi ligan *copy* dan menambatkannya ke sisi aktifnya untuk memverifikasi bahwa program penambatan dapat mereproduksi konformasi bioaktif antagonis E4D600. Konformasi ligan dengan penambatan terbaik yang ditunjukkan pada **Gambar 4.18** dan **Gambar 4.19** memiliki nilai RMSD sebesar 0,940 Å dibandingkan dengan konformasi yang diperoleh ligan ko-kristal pada reseptor.



Gambar 4.18 Visualisasi Superpose ligan ko-kristal (biru) dengan Ligan *Copy* Menggunakan Autodock 4.2 terintegrasi dengan LigandScout 4.4.



Gambar 4.19 Visualisasi Superpose pada struktur 2D antara ligan ko-kristal (biru) pada sebelah kiri dengan Ligan *Copy* sbelah kanan.

4.8.2 Penambatan molekuler senyawa hasil sintesis 10A-10F, kurkumin, tamoksifen, 4-OH-tamoksifen, dan doxorubicin

Penambatan molekul merupakan suatu metode simulasi untuk memprediksikan interaksi antara ligan dan enzim (reseptor). Reseptor yang digunakan harus sudah tervalidasi dengan nilai RMSD < 2.0 Å. Penambatan molekul senyawa 10A – 10F terpilih pada sisi aktif reseptor 1SJ0 menggunakan program Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout 4.4 dengan parameter pelaksanaan running Genetic Algoritma (GA) sebanyak 100 kali, jumlah generasi algoritma 27.000, jumlah evaluasi energi 2.500.000, dan populasi 150. Hasil penambatan molekuler sebagaimana pada **Tabel 4.25**.

Tabel 4.25. Nilai ΔG dan jumlah *cluster*-nya pada 6 senyawa AKI terhadap reseptor estrogen α (PDB: 1SJ0) dengan pelaksanaan *running Genetic Algoritma* (GA) sebanyak 100 kali

No	Nama Senyawa (Kode)	Energi Ikatan ΔG (kkal/mol)	Jumlah <i>cluster</i>
1	10A	-8,92	7
2	10B	-8,49	10
3	10C	-8,74	3
4	10D	-8,61	5
5	10E	-8,77	18
6	10F	-9,60	3
7	Kurkumin	-8,16	23
8	Tamoksifen	-8,33	5
9	Doxorubicin	-10,64	32
10	4-OH-Tamoksifen	-8,84	7

Pada penambatan molekuler tiap ligan dilakukan *running* sebanyak 100 kali, dan didapatkan *cluster* yang menyatakan kelompok konformasi molekul yang sama, dan nilai ΔG didapatkan rerata nilai energi dari konformasi kelompok *cluster* yang terbaik (Shityakov & Förster, 2014; Atkovska et al., 2014). Hasil penambatan molekul dari senyawa 10A– 10F terpilih menunjukkan ke-enam senyawa hasil sintesis memiliki nilai ΔG (-8,49 sampai dengan -9,60 kkal/mol) lebih baik dari ΔG kurkumin dan tamoksifen yaitu -8,16, kkal/mol dan -8,33 kkal/mol, sehingga ke-enam senyawa tersebut berpotensi memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7. Oleh karena itu, ke enam senyawa tersebut dilanjutkan pada pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 serta sel Vero sebagai sel normal untuk menilai indeks selektivitasnya. Nilai energi bebas paling besar dihasilkan oleh senyawa 10B dengan nilai ΔG sebesar -8,49 kkal/mol dan nilai nilai energi bebas paling kecil diberikan pada senyawa 10F dengan nilai ΔG sebesar -9,60 kkal/mol.

4.8.3 Visualisasi Hasil penambatan molekul Senyawa AKI

Interaksi reseptor 1SJ0 dengan ligan senyawa hasil sintesis yang terbentuk setelah proses penambatan dapat divisualisasikan dengan program Autodock 4.2 terintegrasi LigandScout untuk dilihat interaksinya berupa fitur farmakofor yang terbentuk dan residu asam amino yang terlibat interaksi antara reseptor 1SJ0 dengan ligan yang merupakan 6 senyawa hasil sintesis. Hasil visualisasi interaksi fitur-fitur farmakofor dengan reseptor 1SJ0 dapat dilihat pada **Tabel 4.26**.

Hasil visualisasi di atas menunjukkan jenis fitur-fitur farmakofor yang berpengaruh terhadap interaksi senyawa ligan terhadap hidrogen 1SJ0. Fitur-fitur kimia yang berperan pada senyawa 10A, 10C, dan 10D yaitu interaksi hidrofobik dan HBA yaitu akseptor ikatan hidrogen. Pada senyawa 10B sama seperti pada senyawa tamoksifen, fitur kimia yang berperan interaksi hidrofobik saja. Pada senyawa 10E, dan 10F memiliki kesamaan fitur kimia yang berperan interaksi hidrofobik dan HBD yaitu donor ikatan hidrogen. Senyawa kurkumin, dan doxorubicin menunjukkan interaksi 3 fitur kimia meliputi interaksi hidrofobik, HBD yaitu donor ikatan hidrogen, dan HBA yaitu akseptor ikatan hidrogen.

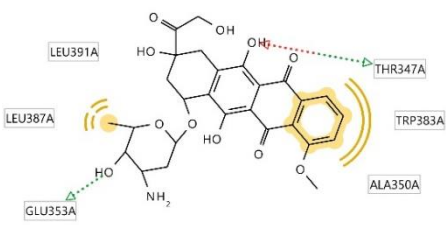
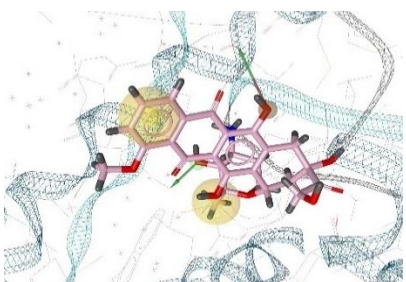
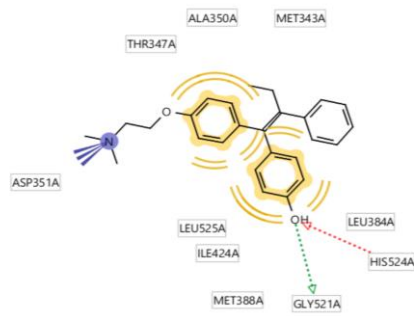
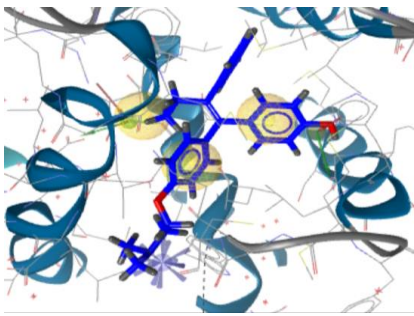
Tabel 4.26. Hasil Visualisasi 2D dan 3D 10A-10F, kurkumin, tamoksifen, 4-OH tamoksifen, dan doxorubicin pada reseptor 1SJ0

Senyawa	Visualisasi 2D	Visualisasi 3D
10A		
10B		
10C		

Tabel 4.26 Lanjutan

Senyawa	Visualisasi 2D	Visualisasi 3D
10D		
10E		
10F		
Kurkumin		
Tamoksifen		

Tabel 4.26 Lanjutan

Senyawa	Visualisasi 2D	Visualisasi 3D
Doxorubicin		
4-OH-Tamoksifen		

Tabel 4.27 Kontak residu senyawa 10A-10F, Kurkumin, Tamoksifen, dan Doxorubicin

Kontak Residu	Nama Senyawa									
	10A	10B	10C	10D	10E	10F	Kur*	Doks*	Tam*	4OHT*
Trp 383A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Ala 350A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Thr 347A	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Leu 525A	√	√	√	√	√	√			√	√
Met 388A	√	√	√	√					√	√
Leu 391A					√	√	√	√	√	√
Phe 404A	√		√	√	√	√			√	√
Leu 428A									√	√
Leu 387A						√	√	√	√	√
Ile 424A	√	√	√	√					√	√
Met 343A	√	√	√	√					√	√
Met 421A	√	√	√	√					√	√
Leu 3410A	√		√	√	√	√			√	√
Leu 384A		√			√	√				√
Glu 353A					√	√		√		
Leu 349A					√	√				
Phe 425A		√								
Cys 530A					√	√				
Asp351A										√
Gly521A										√
His524A										√
HOH							√			
1005A										

Kur = Kurkumin, Doks = Doksorubicin, Tam = Tamoksifen, 4OHT = 4-hidroksi-Tamoksifen

Pada **Tabel 4.27** menunjukkan kontak residu asam amino pada reseptor 1SJ0 yang berinteraksi dengan senyawa 10A – 10F yang sama dengan tamoksifen, kurkumin, dan doksorubicin adalah Thr 347A, Trp 383A, dan Ala 350A. Senyawa 10A – 10D memiliki kesamaan jumlah kontak residu yaitu sebanyak 10 kontak residu. Sedangkan senyawa 10E sebanyak 11 kontak residu dan senyawa 10F memiliki 12 kontak residu. Senyawa tamoksifen memiliki kontak residu paling banyak yaitu 13 kontak residu, sedangkan senyawa doksorubicin memiliki 6 kontak residu, dan senyawa kurkumin memiliki kontak residu paling sedikit yaitu sebanyak 5 kontak residu.

4.8.4 Analisis Prediksi ADMET, Solubilitas, Profil Farmakokinetik, dan *Drug-Likeness*

Hasil analisis Prediksi ADMET, Solubilitas, Profil Farmakokinetik, dan *Drug-Likeness* senyawa 10A – 10F, tamoksifen, kurkumin, dan doksorubicin, menggunakan Predictor ADMET dapat dilihat pada **Tabel 4.28**. Predictor ADMET adalah program komputer yang dirancang untuk memperkirakan parameter farmakokinetik/sifat senyawa mirip obat dari struktur molekulnya yang disebut ADMET yang mengacu pada Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi / Eliminasi, dan Toksisitas (Singh *et al.*, 2013). Profil farmakokinetik yang lebih baik secara eksklusif penting untuk senyawa baru yang harus diperiksa dalam proses penemuan senyawa obat / mirip obat. Oleh karena itu, sangat penting untuk mengevaluasi profil ADMET senyawa baru maupun senyawa hasil pengembangan yang mempunyai potensi. Oleh karena itu dilakukan prediksi sifat ADMET dari senyawa yang hasil sintesis (10A-10F), dan juga kurkumin sebagai senyawa *lead* menggunakan perangkat lunak *online* swissADME (Daina *et al.*, 2017). Lipinski dkk. (1997) mengusulkan empat sifat ADMET yang disebut "Aturan Lima". Aturan lima ini adalah autentik dan "filter berbasis aturan yang paling terkenal" dari keserupaan obat yang digunakan untuk memeriksa apakah suatu senyawa diserap dengan baik secara oral atau tidak. Aturan lima meliputi; Berat molekul ($MW \leq 500$), Koefisien partisi oktanol / air ($i\text{LOGP} = A \log P \leq 5$), Jumlah donor ikatan hidrogen ($\text{HBD} \leq 5$), dan Jumlah akseptor ikatan hidrogen ($\text{HBA} \leq 10$).

Berdasarkan Aturan Lima, sebuah molekul hanya dapat aktif / menyerap secara oral jika tidak melanggar dua atau lebih aturan di atas. Namun, beberapa produk alami yang rumit tidak sesuai dengan aturan. Untuk itu, banyak aturan / filter kemiripan obat lain yang sama-sama disebut sebagai "Aturan Lima" (Ghose *et al.*, 1999; Bhal *et al.*, 2007). Hopkins pada tahun 2012 mengembangkan konsep QED (*Quantitative Estimate*

of Druglikeness) (Bickerton *et al.*, 2012) yang menghasilkan delapan sifat fisikokimia, yang meliputi empat aturan lima (MW, iLOGP, HBA dan HBD) dan empat parameter lainnya seperti luas permukaan kutub molekular (TPSA), jumlah ikatan yang dapat diputar (nROTB), jumlah cincin aromatik (nAROM), dan jumlah peringatan untuk substruktur yang tidak diinginkan (Peringatan yaitu PAINS #alert dan Brenk #alert) menggunakan 771 obat oral yang dipasarkan (Bickerton *et al.*, 2012). Konsep QED adalah aturan yang paling fleksibel dan diadopsi daripada aturan yang menyerupai obat biasa. **Tabel 4.28** menunjukkan beberapa sifat / parameter ADMET dan rentangnya yang dapat diterima. Untuk mengevaluasi sifat farmakokinetik dari senyawa yang dirancang, struktur 2D dari senyawa digambar MarvinSketch. Setiap struktur diimpor dan struktur smile (.smi) dimasukkan di antarmuka situs web (<http://swissadme.ch/>). Studi desain obat SwissADME dijalankan dan sifat / parameter ADMET dihasilkan (Mishra, dan Dahima, 2019)

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa ke-enam senyawa hasil sintesis, kurkumin, dan tamoksifen memenuhi aturan lima Lipinski. Pada senyawa doksorubicin, tidak memenuhi 2 syarat aturan Lipinski yaitu: berat molekul (BM), dan HBD. Berat molekul senyawa doksorubicin > 500 g/mol yaitu 543,52 g/mol, dan HBD > 10 yaitu 12. Karakter hidrofilik atau hidrofobik obat merupakan faktor penting yang mempengaruhi absorpsi dan dalam teori, berat molekul obat tidak penting. Namun, dalam prakteknya, obat memiliki BM kurang dari 500 adalah karena senyawa dengan berat molekul tinggi lebih mungkin untuk memiliki sejumlah besar kelompok fungsional polar, dan absorpsi obat menjadi terbatas. Gugus polar yang tidak memasuki kriteria lipinski biasanya tidak aktif secara oral dan harus diadministrasikan secara injeksi (Patrick, 2001). Nilai log P berkaitan dengan lipofilisitas atau hidrofobitas, yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, lipid, minyak, dan pelarut non polar. Lipofilisitas dinyatakan sebagai rasio kelarutan oktanol dan air yang muncul dalam beberapa bentuk pada setiap analisis fisika-kimia terkait dengan absorpsi. Pada hidrogen donor dan akseptor juga ditentukan nilainya karena jika terlalu banyak kelompok hidrogen donor dan akseptor dapat menghambat permeabilitas melintasi membran bilayer. Kemampuan hidrogen donor dapat dihitung secara tidak langsung oleh koefisien partisi antara hidrogen (Lipinski 1997).

Koefisien partisi antara n-oktanol dan air ($\log P_{o/w}$) adalah deskriptor klasik untuk Lipofilisitas. Parameter ini merupakan sifat fisikokimia penting pada penemuan prediksi sifat farmakokinetika obat. Banyak metode komputasi untuk estimasi $\log P_{o/w}$ dikembangkan dengan kinerja beragam pada berbagai perangkat kimia. Metode umum adalah dengan menggunakan beberapa prediktor untuk memilih metode yang paling akurat untuk seri kimia tertentu seperti iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, dan SILICOSIT atau untuk menghasilkan estimasi konsensus $\log P_{o/w}$ (Daina, Michielin, & Zoete, 2017). Berdasarkan prediksi konsensus $\log P_{o/w}$ menunjukkan keenam senyawa memenuhi syarat sama seperti kurkumin, dan doxorubicin, kecuali nilai Log P senyawa Tamoksifen yaitu memiliki nilai Log P lebih dari 5 yaitu 5,77.

Kelarutan senyawa dalam air merupakan sifat utama yang mempengaruhi penyerapan obat dalam saluran cerna (Ali, Badawy, Shah, Rehman, & El, 2017). Prediksi kelarutan juga dilakukan dengan SwissADME secara *online*. Dalam hal itu, SwissADME memberikan akses ke lima model prediksi yang tersedia secara bebas; yaitu XLOGP3, metode atomistik termasuk faktor korektif dan perpustakaan berbasis pengetahuan; WLOGP, implementasi kami sendiri dari metode atomistik murni berdasarkan sistem fragmen Wildman dan Crippen; MLOGP, tipe metode topologis yang mengandalkan hubungan linier dengan 13 deskriptor molekuler yang diimplementasikan dari data referensi; SILICOS-IT, sebuah metode hybrid yang mengandalkan 27 fragmen dan 7 penjelas topologi dan iLOGP, metode berbasis fisika mengandalkan energi bebas solvasi dalam n-oktanol dan air yang dihitung dengan model Generalized-Born dan model area permukaan yang dapat diakses pelarut (GB / SA). iLOGP dibandingkan dengan dua set obat atau eksternal seperti obat dan melakukan sama atau lebih baik dari enam prediktor mapan. Log konsensus $P_{o/w}$ adalah rata-rata aritmatika dari nilai-nilai yang diprediksi oleh lima metode yang diusulkan. Kelas solubilitas atau skala Log S dikategorikan sebagai berikut: tidak larut < -10 < kurang larut < -6 < cukup larut < -4 < larut < -2 sangat larut < 0 < sangat mudah larut.

Hasil prediksi pada **Tabel 4.29** menunjukkan kelas kelarutan enam senyawa mempunyai kelarutan yang sama kelompok yaitu kelas kelarutan cukup larut dengan kisaran nilai Log S sebesar -4,35, sampai -5,32 berdasarkan ESOL dan nilai Log S sebesar -4,60 sampai -5,73 berdasarkan Ali. Tamoksifen menunjukkan hasil prediksi kelas

solubilitas kurang larut , sedangkan kurkumin, dan doxorubicin kelas solubilitas larut berdasarkan ESOL maupun Ali.

Tabel 4.28. Hasil Prediksi rediksi ADMET, Solubilitas, Profil Farmakokinetik, dan *Drug-Likeness* senyawa 10A-10F, kurkumin, Tamoksifen, dan Doksorubicin

Prediksi SwissADME	Nama Senyawa						
	10A	10B	10C	10D	10E	10F	Dox*
Sifat Fisiko-Kimia							
Berat Molekul (g/mol)	346,42	392,45	376,45	406,47	422,47	362,42	543,52
Jml atom berat	26	29	28	30	31	27	39
Jml arom. Atom berat	12	12	12	12	12	12	12
Fraksi Csp3	0,27	0,30	0,30	0,33	0,33	0,27	0,44
Jml rotatable bond	4	5	5	6	5	3	5
HBA	4	6	5	6	6	4	12
HBD	0	1	0	0	2	2	6
Refraktivitas Molar/RM	112,64	121,15	119,13	125,62	126,30	133,32	132,66
TPSA (Å)	43,18	72,64	52,41	61,64	91,59	73,13	206,07
Lipofilisitas (Log Po/w)							
iLOGP	3,49	3,34	3,63	3,72	3,77	2,77	2,16
XLOGP3	4,77	4,38	4,74	4,71	3,34	3,39	1,27
WLOGP	3,88	3,59	3,88	3,89	3,06	3,05	-0,32
MLOGP	3,29	2,40	2,95	2,61	2,22	2,87	-2,10
SILICOS-IT	5,85	5,42	5,90	5,96	3,70	3,58	1,17
Konsensus Log Po/w	4,25	3,83	4,22	4,18	3,22	3,13	0,44
Solubilitas dalam air (Log S)							
ESOL	-5,07	-5,01	-5,15	-5,23	-4,52	-4,35	-3,91
Solubilitas - (mg/ml)	2,95e ⁻⁰³	3,85e ⁻⁰³	2,68e ⁻⁰³	2,41e ⁻⁰³	1,28e ⁻⁰²	1,61e ⁻⁰²	6,72e ⁻⁰²
- (mol/l)	8,50e ⁻⁰⁶	9,80e ⁻⁰⁶	7,12e ⁻⁰⁶	5,92e ⁻⁰⁶	1302e ⁻⁰⁵	4,43e ⁻⁰⁵	1,24e ⁻⁰⁴
Kelas	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Larut
Ali	-5,41	-5,62	-5,57	-5,73	-4,94	-4,60	-5,20
Solubilitas - (mg/ml)	1,19e ⁻⁰³	9,38e ⁻⁰⁴	1,01e ⁻⁰⁴	7,51e ⁻⁰⁴	4,84e ⁻⁰³	9,00e ⁻⁰³	3,46e ⁻⁰³
- (mol/l)	3,01e ⁻⁰⁶	2,39e ⁻⁰⁶	2,69e ⁻⁰⁶	1,85e ⁻⁰⁶	1,15e ⁻⁰⁵	2,48e ⁻⁰⁵	6,36e ⁻⁰⁶
Kelas	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut
ESOL	-6,94	-6,46	-7,04	-7,15	-5,14	-4,93	-3,46
Solubilitas - (mg/ml)	4,00e ⁻⁰⁵	1,37e ⁻⁰⁴	3,40e ⁻⁰⁵	2,09e ⁻⁰⁵	3,09e ⁻⁰³	4,26e ⁻⁰³	1,87e ⁻⁰¹
- (mol/l)	1,15e ⁻⁰⁷	3,50e ⁻⁰⁷	9,04e ⁻⁰⁸	7,13e ⁻⁰⁸	7,31e ⁻⁰⁶	1,17e ⁻⁰⁵	3,44e ⁻⁰⁴
Kelas	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Cukup larut	Cukup larut	Larut

Tabel 4.28 Lanjutan

Prediksi SwissADME	Nama Senyawa						
	10A	10B	10C	10D	10E	10F	Dox*
Sifat Fisiko-Kimia							
Farmakokinetik							
Absorpsi GI	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Rendah
Permeasi BBB	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Substrat P-gp	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Ya
Inhibitor CYP1A2	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Inhibitor CYP2C19	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Tidak
Inhibitor CYP2C9	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak
Inhibitor CYP2D6	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak
Inhibitor CYP3A4	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak
Drug-likeness							
Lipinski	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (3)
(Pelanggaran)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	
Ghose	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak (2)
(Pelanggaran)						(1)	
Veber	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (1)
Egan	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (1)
(Pelanggaran)							
Muegge	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (3)
(Pelanggaran)							
Bioavailabilitas	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,17
Kimia Medisinal							
PAINS (<i>alert</i>)	0	0	0	0	0	0	1
Brenk (<i>alert</i>)	0	0	0	0	0	0	1
<i>Lead-likeness</i>	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
(Pelanggaran)	(1)	(2)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)

Prediksi sifat farmakokinetik dan *drug-likeness* dari 6 senyawa dilakukan oleh versi *online* SwissADME dan data ditunjukkan pada **Tabel 4.28**. Menurut sifat farmakokinetik, semua senyawa menunjukkan absorpsi pada gastrointestinal (GI) yang tinggi kecuali senyawa tamoksifen, dan doxorubicin yang memiliki penyerapan yang rendah. Senyawa hasil sintesis memiliki permeabilitas BBB kecuali senyawa 10E sama seperti pada kurkumin, tamoksifen dan doxorubicin. Terdapat dua senyawa hasil sintesis merupakan substrat P-gp yaitu senyawa 10E, 10F sama seperti senyawa kurkumin, dan doxorubicin. P-glycoprotein (P-gp) adalah anggota dari superfamili transporter *ATP binding cassette* (ABC), yang menentukan berbagai penyerapan dan penembusan obat (Wang, Li, Yang, & Yang, 2005). Hasil prediksi senyawa hasil sintesis pada penghambatan terhadap isomer Cytochrome P450 (CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, dan CYP3A4) menghasilkan senyawa 10A, 10C, dan 10D menunjukkan penghambatan pada CYP1A2, senyawa 10B tidak menunjukkan penghambatan, senyawa 10E menunjukkan

penghambatan pada enzim CYP1A2 dan CYP2C19, dan senyawa 10F tidak menunjukkan penghambatan kecuali enzim CYP2C9. Pada hasil prediksi menunjukkan bahwa kurkumin memiliki kemampuan absorpsi pada GI yang tinggi, akan tetapi hasil penelitian telah menunjukkan bahwa kurkumin memiliki stabilitas yang rendah dalam larutan air pada pH fisiologis dan mudah terdegradasi. Kurkumin dalam buffer fosfat pada pH 7,4, sekitar 90% kurkumin terdegradasi dalam 30 menit (Shen, Liu, An, & Ji, 2016).

Prediksi *drug-likeness* juga dilakukan tergantung pada aturan Lipinski, Ghose dan Veber yang dipilih dan skor ketersediaan hayati. Aturan Lima dari Lipinski menyatakan bahwa penyerapan atau permeasi suatu molekul lebih mungkin ketika berat molekul di bawah 500 g / mol, nilai log P lebih rendah dari 5, dan molekul memiliki paling banyak 5 H-donor dan 10 H atom -aseptor. Ghose filter (Amgen) mendefinisikan kendala kemiripan obat sebagai berikut: log P yang dihitung adalah antara -0,4 dan 5,6, berat molekul antara 160 dan 480, refraksi molar antara 40 dan 130, dan jumlah total atom antara 20 dan 70. Veber (GSK), mendefinisikan aturan kendala kemiripan obat sebagai jumlah rotatable bound $Nrotb \leq 10$ dan $TSA \leq 140$. Penapisan enam senyawa hasil sintesis semua memenuhi syarat Lipinski, sehingga menunjukkan keenam senyawa tersebut berpotensi memiliki kriteria penilaian keserupaan dengan obat (*drug-likeness*). Menurut proses skrining enam senyawa hasil sintesis dengan aturan Ghose, aturan Veber, Egan (Pharmacia), aturan Muegge (Bayer) menunjukkan bahwa semua senyawa memenuhi syarat. Prediksi *drug-likeness* juga dilakukan dengan melihat nilai bioavailabilitas untuk memprediksi kemungkinan suatu senyawa memiliki setidaknya 10% bioavailabilitas oral pada tikus atau permeabilitas Caco-2 yang terukur (Daina, Michielin, & Zoete, 2017). Semua senyawa menunjukkan nilai availabilitas sebesar 0,55.

4.9 Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT

Uji aktivitas dilakukan dengan uji sitotoksisitas dengan MTT. Senyawa hasil sintesis 10A–10F, kurkumin, sebagai senyawa penuntun, tamoksifen, dan doxorubicin sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan pada 3 sel line kanker yaitu kanker payudara MCF-7, kanker serviks HeLa, dan kanker kolorektal WiDr. Ketiga jenis kanker merupakan kanker dengan prevalensi tinggi di Indonesia. Selain itu pada penelitian awal dilakukan penapisan senyawa dengan pemodelan farmakofor dengan menggunakan ER- α . ER- α merupakan faktor kunci dalam perkembangan kanker payudara pada manusia. Ekspresi dan aktivitas ER- α diatur oleh banyak sinyal intraseluler dan ekstraseluler. Pada

penelitian Hong (2017) juga melaporkan bahwa ER- α dan PRB terutama diekspresikan di stroma tetapi tidak di jaringan karsinoma kanker serviks, dan ekspresi mereka sangat berkorelasi. ER- α stroma lebih banyak ditemukan pada tumor stadium awal dibandingkan pada tumor stadium lanjut. Caiazza (2015) menyatakan pensinyalan estrogen memiliki peran anti-tumorigenik dalam mukosa kolon, melalui aktivasi selektif dari pensinyalan pro-apoptosis yang dimediasi oleh ER- β , penghambatan sinyal inflamasi, dan modulasi lingkungan mikro tumor dan mekanisme pengawasan imun yang berbeda. ER- β adalah reseptor estrogen utama yang diekspresikan dalam epitel kolon normal dan maligna, dengan ekspresi ER- α yang terbatas atau tidak teramati pada kolon. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada keterkaitan antara ER- α dengan β -katenin. Kanker kolorektal adalah perwakilan dari kanker manusia yang disebabkan oleh hiperaktivasi pensinyalan Wnt/ β -katenin. Oleh karena itu, senyawa 10A-10F yang telah berhasil disintesis yang mempunyai struktur mirip dengan senyawa desain, dilanjutkan pengujian dengan 3 sel kanker tersebut (Schell *et al.*, 2016; Hong *et al.*, 2017; Caiazza *et al.*, 2016; Gupta, *et al.*, 2016).

Pengujian aktivitas sitotoksik senyawa hasil sintesis dilakukan dengan metode MTT. Metode MTT merupakan metode pengujian viabilitas sel dengan menggunakan garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromida). Garam tetrazolium MTT ini akan direduksi oleh NADH yang dihasilkan oleh sel hidup menjadi formazan yang berwarna ungu. Absorbansi formazan ditentukan dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan berbanding lurus dengan viabilitas sel (sel hidup) (Bahuguna, Khan, Bajpai, & Kang, 2017).

Pengujian aktivitas sitotoksik merupakan uji sitotoksik menggunakan *cell line* tertentu sehingga dapat diperoleh aktivitas secara spesifik pada sel tertentu. Sebelum dilakukan pengujian, sel terlebih dahulu disiapkan. Sel yang disimpan dalam *tank* nitrogen cair diambil dan dihangatkan menggunakan air steril dengan suhu 37 °C. Pada saat pencairan ini usahakan ampul tidak terendam sampai ke tutupnya untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi. Kemudian suspensi sel dipindahkan ke dalam flask kultur dan diisi media. Perkembangan sel diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted* sampai konfluensi 70-80%. Sel tersebut kemudian disubkultur. Media dikeluarkan dari flask dan cuci sel dengan FBS. Sel ini kemudian ditripsinasi. Tripsinasi

ini bertujuan untuk melepaskan sel dari dasar flask sehingga sel tersuspensi dalam flask (Freshney, 2010). Tripsinasi ini dihentikan dengan penambahan penambahan media kultur. Pemisahan sel dan medium dilakukan dengan sentrifugasi. Sel ini kemudian dikultur dan diinkubasi pada inkubator CO₂ sampai mencapai konfluensi 70-80%. Inkubasi dilakukan dalam inkubator CO₂ bertujuan untuk menjaga kestabilan kesetimbangan CO₂ yang terlarut dan ion bikarbonat pada dapar yang digunakan sehingga pH kultur tetap stabil. Setelah mencapai konfluensi, sel dapat digunakan untuk pengujian.

Pengujian aktivitas sitotoksik yaitu penentuan nilai IC₅₀ senyawa 10A – 10F terhadap sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero dengan metode MTT. Setiap sumuran pada 96-well plates diisi dengan 100 µL sel, 3 sumuran tidak diisi sel digunakan sebagai kontrol media. Sel ini diinkubasi terlebih dahulu sampai mencapai konfluensi 50% (24 jam). Larutan induk yang dilarutkan dengan DMSO diencerkan dengan media kultur sehingga diperoleh satu seri konsentrasi larutan uji (6,25, 12,5, 25, 50, 100 dan 200). Sebanyak 100 µL masing-masing larutan uji dalam media tersebut ditambahkan kedalam plate secara triplo dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan inkubator CO₂. Sel diamati setiap 24 jam dengan mikroskop *inverted*. Efek sitotoksitas terjadi setelah inkubasi selama 48 jam yang ditandai dengan adanya perubahan bentuk sel seperti mengerutnya sel. Setelah itu dilakukan penambahan MTT dan inkubasi selama 4 jam. Formazan yang terbentuk dilarutkan dengan etanol dan absorbansinya ditentukan dengan ELISA reader pada pajang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi ini digunakan untuk menghitung nilai persentase viabilitas sel hidup. Nilai ini berguna untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ masing-masing senyawa terhadap masing-masing sel ditentukan dengan menggunakan kurva hubungan log konsentrasi (log C) terhadap persentase inhibisi. Hubungan ini diperoleh dengan menganalisis data konsentrasi dan persentase inhibisi menggunakan *software* Graphpad Prism 8.0. Dengan menggunakan *software* ini dapat diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan konsentrasi yang dapat menghambat 50% dari populasi sel. Hasil Nilai IC₅₀ dapat dilihat pada **Tabel 4.29**. dan **Gambar 4.20**. Data perhitungan lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Tabel 4.29 Nilai IC₅₀ senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero.

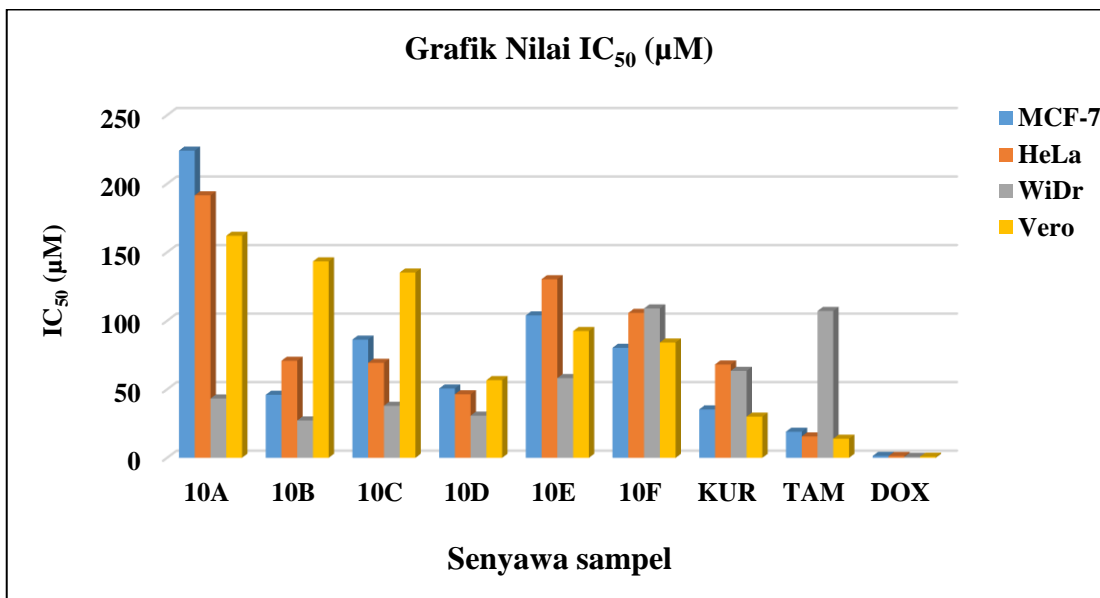
Senyawa	Nilai IC ₅₀ (μM)			
	MCF-7	HeLa	WiDr	Vero
10A	224,10	191,50	43,28	162,00
10B	45,97	70,80	27,20	143,30
10C	86,24	69,30	37,96	135,20
10D	50,56	46,36	30,77	56,68
10E	103,90	130,30	58,19	92,47
10F	80,26	105,70	109,00	84,12
Kurkumin	35,30	68,09	63,41	30,01
Tamoksifen	19,01	15,62	107,10	13,91
Doxorubicin	1,40	1,27	0,66	0,75

Pengujian aktivitas sitotoksik yang dilakukan dengan metode MTT

Pada pengujian aktivitas sitotoksik 4 sel line (MCF-7, HeLa, WiDr, Vero), ditambahkan 3 sampel uji yaitu kurkumin sebagai senyawa *lead compound*, dan 2 senyawa kontrol positif yaitu tamoksifen dan doxorubicin. Senyawa tamoksifen diuji sebagai kontrol positif karena tamoksifen merupakan obat yang umum digunakan pada pengobatan kanker payudara dan pada pembentukan senyawa desain awal menggunakan 1SJ0 sebagai reseptor estrogen alfa (ER- α) pada proses pembentukan model dan skrining senyawa. Reseptor estrogen alfa (ER- α) berperan dalam perkembangan payudara dan aktivasi signal pro-proliferasi pada payudara normal dan payudara yang menderita kanker (Caldon, 2014). Senyawa doxorubicin juga digunakan sebagai kontrol positif karena doxorubicin paling bermanfaat untuk pengobatan kanker secara luas seperti kanker payudara, kanker ovarium, kanker paru-paru, kanker neuroblastoma, leukemia. (Thorn, 2011).

Pada pengujian aktivitas sitotoksik juga menggunakan kurkumin sebagai *lead compound*, tamoksifen dan doxorubicin sebagai kontrol positif. Nilai IC₅₀ kurkumin juga berbeda dengan penelitian terdahulu. Pada penelitian ini nilai IC₅₀ kurkumin diperoleh 35,03 μM. Sedangkan penelitian terdahulu nilai IC₅₀ kurkumin yaitu 70,2 μM, dan 51,05 μM terhadap sel MCF-7 (Li, *et al.*, 2015; Kurnia, *et al.*, 2019). Perbedaan ini kemungkinan terjadi karena adanya perbedaan metode yang digunakan pada saat pengujian MTT. Pengujian dengan laboran yang berbeda juga dapat memberikan hasil yang berbeda. Selain itu faktor resistensi juga mempengaruhi sensitifitas obat terhadap sel. Pengujian aktivitas sitotoksik juga dilakukan terhadap sel normal. Pada penelitian

ini sel normal yang digunakan adalah sel Vero. Hasil pengujian ini digunakan untuk melihat gambaran aktivitas sitotoksik pada sel normal yang selanjutnya digunakan untuk menghitung indeks selektivitas senyawa.



Gambar 4.20 Grafik Nilai IC₅₀ (µM) Senyawa 10A - 0F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, WiDr, dan Vero

Pada **Tabel 4.26** dapat dilihat nilai IC₅₀ senyawa uji terhadap sel kanker MCF- 7 berturut-turut yaitu 224,10; 45,97; 62,02; 39,08; 103,90 dan 80,26 µM untuk senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, dan 10F. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel WiDr. Senyawa 10D memiliki nilai IC₅₀ paling rendah yaitu 39,08 µM. *Lead compound* kurkumin juga memberikan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ yaitu 35,03 µM. Namun nilai IC₅₀ kurkumin tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan senyawa 10D hasil sintesis. Hal tersebut dapat menjelaskan bahwa senyawa 10D hasil sintesis memiliki potensi sitotoksik mendekati kurkumin. Disisi lain, kontrol positif tamoksifen, dan doxorubicin memberikan nilai IC₅₀ yang sangat rendah, yaitu 19,01 dan 1,40 µM. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa kontrol positif memiliki aktivitas yang lebih baik terutama pada senyawa doxorubicin dibanding senyawa hasil sintesis, senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas sitotoksik kategori rendah sampai medium.

Nilai IC₅₀ senyawa uji terhadap sel kanker HeLa berturut-turut yaitu 191,50; 70,80; 69,30; 46,36; 130,30 dan 105,70 µM untuk senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, dan 10F. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut memiliki

aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa. Senyawa 10D memiliki nilai IC_{50} paling rendah yaitu 46,36 μM . *Lead compound* kurkumin juga memberikan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} yaitu 68,09 μM . Namun nilai IC_{50} kurkumin tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa 10D. Hal tersebut dapat menjelaskan bahwa senyawa 10D memiliki potensi sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin. Di sisi lain, kontrol positif tamoksifen, dan doxorubicin memberikan nilai IC_{50} yang sangat rendah, yaitu 15,62 dan 1,27 μM . Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa kontrol positif memiliki aktivitas yang lebih baik terutama pada senyawa doxorubicin dibandingkan senyawa hasil sintesis, senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas sitotoksik kategori rendah sampai medium.

Nilai IC_{50} senyawa uji terhadap sel kanker WiDr berturut-turut yaitu 43,28; 26,61; 37,96; 30,77; 58,19 dan 109,00 μM untuk senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, dan 10F. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel WiDr. Senyawa 10B memiliki nilai IC_{50} paling rendah yaitu 26,61 μM . Senyawa kurkumin dan kontrol positif tamoksifen memberikan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} yaitu 63,41 μM , dan 107,0. Namun nilai IC_{50} kurkumin dan tamoksifen tersebut masih lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, dan 10E. Hal tersebut dapat menjelaskan bahwa senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, dan 10E memiliki potensi sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan kurkumin dan tamoksifen. Di sisi lain, kontrol positif doxorubicin memberikan nilai IC_{50} yang sangat rendah, yaitu 0,66 μM . Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa kontrol positif memiliki aktivitas yang lebih dibandingkan senyawa hasil sintesis, senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas sitotoksik kategori rendah sampai medium. Kurva hubungan % inhibisi dengan log konsentrasi serta perubahan dari morfologi sel kanker (MCF-7, HeLa, WiDr) dan sel normal (Vero) dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Uji sitotoksitas senyawa 10A-10F pada 3 sel line kanker (MCF-7, HeLa, WiDr) menunjukkan aktivitas sitotoksik kategori rendah sampai medium, hal tersebut disebabkan senyawa yang diuji bukan merupakan senyawa yang terpilih dari hasil penapisan senyawa disain dengan pemodelan farmakofor berdasarkan ER- α , hal tersebut dikarenakan ketidakstabilan senyawa disain pada saat disintesis. Namun senyawa hasil sintesis tersebut memiliki kemiripan struktur dengan senyawa disain karena tetap ada gugus indazol. Hasil aktivitas sitotoksik semua sampel mempunyai nilai pola (Gambar

4.19) yang sama antara sel line kanker payudara (MCF-7) dan kanker serviks (HeLa), hal tersebut kemungkinan disebabkan kedua kanker tersebut mempunyai ekspresi terhadap ER- α (Hong *et al.*, 2017; Caiazza *et al.*, 2016; Gupta, *et al.*, 2016). Senyawa doxorubicin memiliki nilai IC sangat berbeda dengan senyawa hasil sintesis karena mekanisme doxorubicin menghambat perkembangan enzim topoisomerase II. Oleh karena itu nilai IC₅₀ senyawa tersebut mempunyai nilai yang sangat jauh berbeda.

Senyawa hasil sintesis yang memiliki aktivitas sitotoksik dengan potensi sitotoksik yang baik mengandung gugus metoksi yaitu senyawa 10B, 10C, dan 10D dengan gugus metoksi berjumlah 3 sampai 4 gugus. Hasil ini sejalan dengan temuan yang dilaporkan penelitian sebelumnya bahwa jumlah dan posisi gugus metoksi mempengaruhi aktivitas sitotoksik (Prasetyaningrum, *et.al.*, 2020; Novilla, *et.al.*, 2019). Penelitian Pawlak (2020) menyatakan bahwa penambahan 2 gugus metoksi pada senyawa yang dikembangkan meningkatkan aktivitas pro apoptosis (Pawlak, *et.al.*, 2020).

4.10 Perbandingan nilai IC₅₀ dengan nilai ΔG (energi ikatan)

Nilai IC₅₀ masing-masing senyawa terhadap masing-masing sel ditentukan dengan menggunakan kurva hubungan log konsentrasi (log C) terhadap persentase inhibisi. Hubungan ini diperoleh dengan menganalisis data *in vitro* pada konsentrasi dan persentase inhibisi menggunakan *software* Graphpad Prism 8.0. Dengan menggunakan *software* ini dapat diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan konsentrasi yang dapat menghambat 50% dari populasi sel. Semakin rendah nilai IC₅₀ maka semakin berpotensi senyawa tersebut dalam penghambatan pertumbuhan sel khususnya sel kanker.

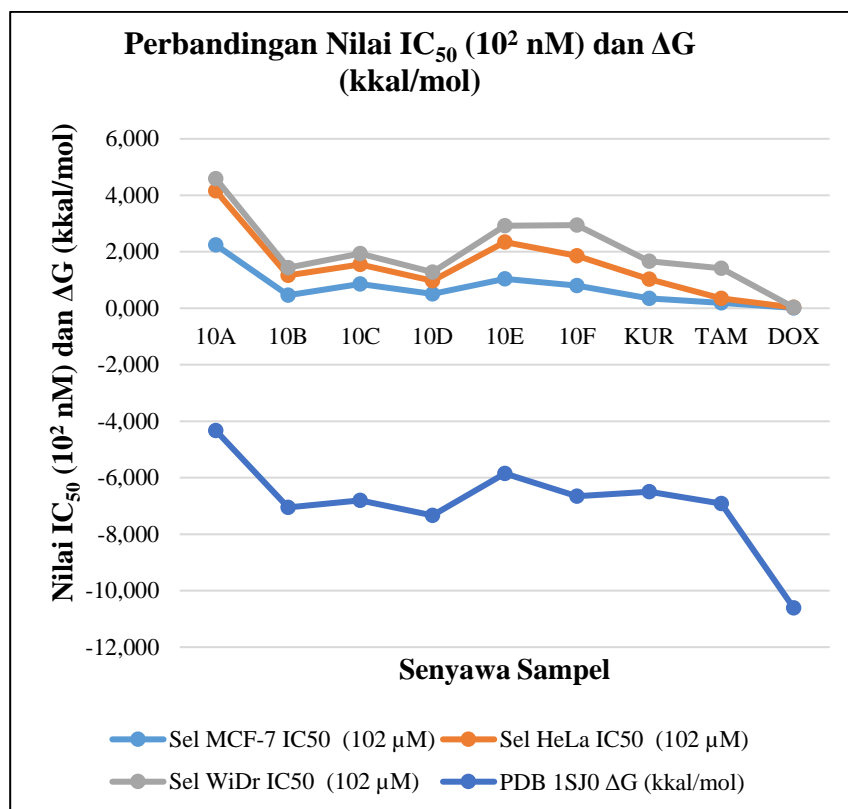
Simulasi penambatan molekular pada dasarnya bertujuan untuk memprediksi modus/cara pengikatan suatu molekul terhadap molekul lain melalui algoritma pencarian konformasi dan untuk memprediksi kekuatan interaksi/afinitas ikatan dua molekul yang dinilai melalui fungsi skoring). Algoritma penambatan molekular melakukan beberapa konformasi ligan biasanya di dalam sisi aktif protein. Konformasi ligan yang dihasilkan suatu program penambatan molekular akan menghasilkan nilai afinitas ikatan yang berbeda-beda, sehingga perlu mengurutkan (ranking) setiap konformasi berdasarkan kekuatan interaksinya menggunakan fungsi skoring. Fungsi skoring digunakan untuk menghitung energi bebas ikatan ligan pada reseptor. Semakin rendah energi ikatan, maka semakin stabil kompleks protein-ligan, yang berarti konformasi tersebut memiliki waktu kontak ligan dengan reseptor lebih lama (Arba, 2019).

Tabel 4.30 Perbandingan nilai IC_{50} ($10^2 \mu M$) dan ΔG PDB 1SJ0 (kkal/mol) senyawa 10A - 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel MCF-7, HeLa, dan WiDr

Senyawa	IC_{50} ($10^2 \mu M$)			ΔG (kkal/mol)
	Sel MCF-7	Sel HeLa	Sel WiDr	PDB 1SJ0
10A	2,241	1,915	0,433	-8,920
10B	0,460	0,708	0,272	-8,490
10C	0,862	0,693	0,380	-8,740
10D	0,506	0,464	0,308	-8,610
10E	1,039	1,303	0,582	-8,770
10F	0,803	1,057	1,090	-9,600
Kurkumin	0,353	0,681	0,634	-8,160
Tamoksifen	0,190	0,156	1,071	-8,330
Doxorubicin	0,014	0,013	0,007	-10,640

Kedua parameter di atas mempunyai nilai yang sejalan untuk menunjukkan kemampuan suatu senyawa mempunyai aktivitas pada penghambatan pertumbuhan sel atau terjadinya interaksi yang stabil antara senyawa dengan reseptor berkaitan dengan suatu efek farmakologi (**Tabel 30**). Pola nilai IC_{50} dengan nilai ΔG sel kanker MCF-7, HeLa dengan energi afinitas ikatan (**Gambar 4.21**) hampir sama, hal tersebut mungkin disebabkan kedua kanker tersebut memiliki ekspresi baik terhadap ER- α sedangkan kalau kanker kolorektal WiDr memiliki ekspresi terbatas ER- α (Hong *et al.*, 2017; Caiazza *et al.*, 2016; Gupta, *et al.*, 2016).

Pada **Gambar 4.21** memperlihatkan bahwa pola grafik antara nilai IC_{50} ($10^2 \mu M$) dan ΔG PDB 1SJ0 (kkal/mol) menghasilkan grafik yang grafik yang sepola kecuali untuk senyawa 10F pada semua sel. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil simulasi penambatan molekuler pada reseptor dapat menggambarkan pola aktivitas penghambatan pertumbuhan sel secara *in vitro*. Adanya perbedaan pola pada senyawa 10F mungkin disebabkan kemurnian senyawa 10F yang perlu ditingkatkan.



Gambar 4.21 Grafik perbandingan nilai IC₅₀ dan ΔG PDB 1SJ0 senyawa 10A-10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, dan WiDr

4.11 Nilai Indeks Selektivitas

Penentuan nilai indeks selektivitas (IS) diperoleh melalui nilai IC₅₀ masing-masing senyawa terhadap sel normal dibandingkan dengan nilai IC₅₀ terhadap sel kanker. Nilai IS menggambarkan selektivitas senyawa terhadap sel kanker. Nilai IS kecil dari 2 menunjukkan senyawa tersebut toksik secara umum. Semakin tinggi nilai IS maka semakin selektif senyawa tersebut (Badisa, *et al.*, 2009). Hasil Nilai IS dapat dilihat pada **Tabel 4.31** dan **Gambar 4.22**.

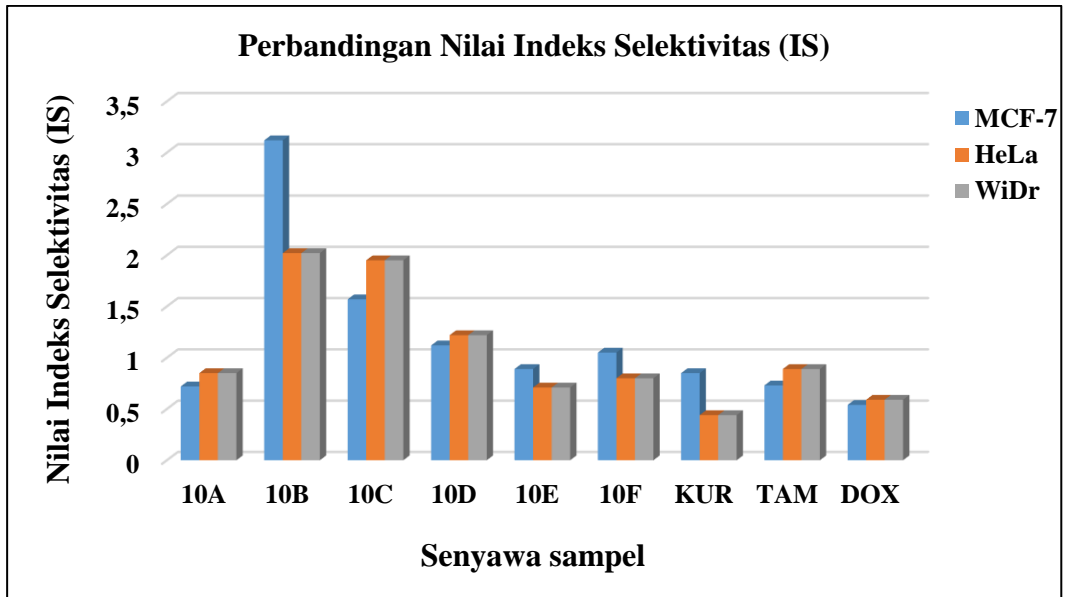
Pada sel kanker MCF-7 didapatkan nilai indeks selektivitas (IS) senyawa 10A -10 F berkisar 0,72 – 3,12 . Senyawa 10B menunjukkan hasil selektivitas terhadap sel normal Vero dengan nilai IS > 2.00 yaitu 3,12. Semakin tinggi nilai IS maka senyawa tersebut lebih aktif terhadap sel kanker dibandingkan dengan sel normal Vero.

Tabel 4.31 Nilai IS senyawa 10A -10F, tamoksifen, dan doxorubicin terhadap sel Vero.

Senyawa	Indeks Selektivitas		
	MCF-7	HeLa	WiDr
10A	0,72	0,85	3,74
10B	3,12	2,02	5,27
10C	1,57	1,95	4,39
10D	1,12	1,22	0,97
10E	0,89	0,71	0,85
10F	1,05	0,80	1,33
Kurkumin	0,85	0,44	0,28
Tamoksifen	0,73	0,89	0,13
Doxorubicin	0,54	0,59	1,14

Pada sel kanker HeLa didapatkan nilai indeks selektivitas (IS) senyawa 10A -10 F berkisar 0,71 – 2,02 Hasil indeks selektivitas (IS) senyawa uji pada selektivitas terhadap sel normal Vero menunjukkan bahwa senyawa 10B menunjukkan hasil nilai IS > 2.00 yaitu 2,02, sedangkan baik senyawa kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin mempunyai nilai IS < 2,00 secara berurutan yaitu: 0,44; 0,89; dan 0,59. Semakin tinggi nilai IS maka senyawa tersebut lebih aktif terhadap sel kanker HeLa dibandingkan dengan sel normal Vero.

Pada sel kanker WiDr didapatkan nilai indeks selektivitas (IS) senyawa 10A -10 F berkisar 0,85 – 5,27. Hasil indeks selektivitas (IS) terhadap sel normal Vero menunjukkan bahwa senyawa 10A, 10B dan 10C menunjukkan hasil nilai IS > 2.00 yaitu 3,74; 5,27; dan 4,39, sedangkan pada senyawa kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin mempunyai nilai IS < 2,00 secara berturut-turut yaitu: 0,28; 0,13; dan 1,14.. Oleh karena itu menunjukkan bahwa dengan lebih tingginya nilai IS senyawa 10A, 10B, dan 10C dibandingkan senyawa kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin maka senyawa 10A, 10B, dan 10C lebih selektif terhadap sel kanker WiDr dibandingkan dengan sel normal Vero.



Gambar 4.22 Grafik Nilai IS Senyawa 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10F, kurkumin, tamoksifen, dan doxorubicin pada Sel MCF-7, HeLa, dan WiDr terhadap sel Vero

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Metode *in silico* dengan model farmakofor berbasis ligan dan dilanjutkan metode penambatan molekular terhadap reseptor estrogen α dapat digunakan untuk menskrining senyawa 186 rancangan senyawa AKMA dan AKI. Hasil pemodelan farmakofor dipilih model 2 untuk menskrining dari 186 senyawa menjadi 14 senyawa. Empat belas senyawa terpilih dilanjutkan dengan penambatan molekular didapatkan nilai energi bebas ΔG pada 10 senyawa terbaik yaitu senyawa: 6A6, 6B1, 6B2, 6B3, 6B4 6B7, 6B8, 6B9, 6B10, dan 6B11.

Pada tahap sintesis senyawa AKI, senyawa terbentuk stabil melalui pembentukan senyawa heksahidro-2H-indazol. Senyawa AKI telah dapat disintesis sebanyak 6 senyawa yaitu 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, dan 10F dengan rendemen 61,0 %, 35,20 %, 74,34, 56,13 %, 23,69 %, dan 42,20 % .

Hasil pengujian aktivitas sitotoksik 6 senyawa AKI menunjukkan bahwa beberapa senyawa AKI berpotensi terhadap 3 sel kanker yaitu: MCF-7, HeLa, dan WiDr. Pada sel kanker MCF-7 yaitu senyawa 10B; pada sel kanker HeLa yaitu senyawa 10D; pada sel kanker WiDr yaitu senyawa 10B. Senyawa hasil sintesis yang menunjukkan aktivitas lebih baik dari senyawa kurkumin sebagai *lead compound* adalah senyawa 10D terhadap sel kanker HeLa, dan senyawa 10B pada sel kanker WiDr.

Nilai selektivitas terhadap sel normal Vero, beberapa senyawa hasil sintesis menunjukkan lebih selektif dibandingkan senyawa kurkumin, dan kontrol positif (tamoksifen, dan doxorubicin) dengan nilai IS $>2,00$ yaitu senyawa 10B pada sel kanker MCF-7, dan senyawa 10B pada sel kanker HeLa; senyawa 10A, 10B, dan 10C lebih selektif terhadap sel kanker WiDr.

5.2 Saran

Senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas sitotoksik kategori rendah sampai medium, sehingga perlunya pengembangan lebih lanjut senyawa ini untuk menemukan senyawa yang lebih aktif.

DAFTAR REFERENSI

- Ali, A., Badawy, M. E. I., Shah, R., Rehman, W., & El, Y. (2017). Synthesis, Characterization and In-Silico ADMET Screening of Mono- and Di- Hydrazides and Hydrazones, *Der Chemica Sinica*, 8(4), 446–460.
- American Cancer Society. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. *Cancer Facts & Figures*, 1–44.
- Ammerman N.C., Beier-Sexton M., Azad A.F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current Protocols in Microbiology*. Nov; Appendix 4:Appendix 4E.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., Aggarwal, B. B., Anand, P., Kunnumakkara, A. B., & Newman, R. A. (2007). Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises reviews Bioavailability of Curcumin : Problems and Promises. *Molecular Pharmacology*, 4(11), 807–818.
- Anonim. (2011). MTT Cell Proliferation Assay ATCC® 30-1010K, Instruction Guide. American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108 USA.
- Arba, M. (2019). Buku Ajar Farmasi Komputasi. Yogyakarta: Deepublish.
- Arfeen, M., Bhagat, S., Patel, R., Prasad, S., & Roy, I. (2016). Design , synthesis and biological evaluation of 5-benziliden-2- iminothiazolidin-4-ones as selective GSK-3 b penghambats. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 121, 727–736.
- Atkovska K, Samsonov SA, Paszkowski-Rogacz M, Pisabarro MT. (2014). Multipose Binding in Molecular Docking. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2): 2622-2645.
- Badisa, R.B., Ayuk-Takem, L. T., Ikediobi, C. O., & Walker, E. H.(2006). Selective Anticancer Activity of Pure Licamichauxiioic-B Acid in Cultured Cell Lines. *Pharmaceutical Biology*, 44 (2), 141–145
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT Assay to Evaluate Cytotoxic Potentialof a Drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 115-118.
- Bala, S., Sharma, N., Kajal, A., Kamboj, S., & Saini, V. (2014). Mannich Bases: An Important Pharmacophore in Present Scenario. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 1–15.
- Bandgar, B. P., & Hote, B. S. (2012). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogues as anti-inflammatory, anti-cancer and anti-oxidant agents,

Medicinal Chemistry Research, 21(10), 3006–3014.

- Banik, U., Parasuraman, S., Adhikary, A. K., & Othman, N. H. (2017). Curcumin: The spicy modulator of breast carcinogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–16.
- Bayomi, S. M., El-kashef, H. A., El-ashmawy, M. B., Nasr, M. N. A., El-sherbeny, M. A., Abdel-aziz, N. I., El-Sayed, M.A., Suddek, G.M., El-Messer, S. M., Ghaly, M. A. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and biological evaluation of new curcumin analogues as antioxidant and antitumor agents: Molecular modeling study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 101, 584–594.
- Bayomi, S. M., El-kashef, H. A., El-ashmawy, M. B., Nasr, N. A., El-sherbeny, M. A., & Badria, A. (2013). Synthesis and biological evaluation of new curcumin derivatives as antioxidant and antitumor agents, *Medicinal Chemistry Research*, 22(3), 1147–1162.
- Brenton, A. G., & Godfrey, A. R. (2010). Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21 (11): 1821-1835.
- Bristow, A. W.T., & Webb, K. S. (2003). Intercomparison study on accurate mass measurement of small molecules in mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14 (10): 1086-1098.
- Borhani, D. W., & Shaw, D. E. (2012). The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(1), 15–26.
- Bourgoin-Voillard, S., Gallo, D., Laios, I., Cleeren, A., Bali, L. El, Jacquot, Y., Leclercq, G. (2010). Capacity of type I and II ligands to confer to estrogen receptor alpha an appropriate conformation for the recruitment of coactivators containing a LxxLL motif-Relationship with the regulation of receptor level and ERE-dependent transcription in MCF-7 cel. *Biochemical Pharmacology*, 79(5), 746–757.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Chen, J., & Lai, L. (2006). Pocket v . 2: Further Developments on Receptor-Based

- Pharmacophore Modeling. *Society*, 2684–2691.
- Caldon, C. E. (2014). Estrogen Signaling and the DNA Damage Response in Hormone Dependent Breast Cancers. *Frontiers in Oncology*, 4(May), 1–9.
- Caiazza, F., Ryan, E. J., Doherty, G., Winter, D. C., & Sheahan, K. (2015). Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Frontiers in oncology*, 5, 19.
- Carey, Sundberg. (2007). *Advanced organic chemistry (5th ed.) - Part B: Reactions and Synthesis*. New York: Springer publishing.
- Comsa, S., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35, 3147- 3154.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics , drug- likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Nature Publishing Group*, (March), 1–13.
- Darvas, F., Dorman, G., Urge, L., Szabo, I., Ronai, Z., & Sasvari-szekely, M. (2001). Combinatorial chemistry . Facing the challenge of chemical genomics, 73(9), 1487–1498.
- de Kloe, G. E., Bailey, D., Leurs, R., & de Esch, I. J. P. (2009). Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*, 14(13–14), 630–646.
- Duddeck, H., Dietrich, W., & Toth, G. (1998). *Structure Elucidation by Modern NMR: A Workbook* (3rd ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Elhaj, B. M., Ahmed, S., Garawi, M. A., & Ali, H. (2018). Linking Aromatic Hydroxy Metabolic Functionalization of Drug Molecules to Structure and Pharmacologic Activity. *Molecules*, 23(9), 2119.
- Fix, L. N., Shah, M., Efferth, T., Farwell, M. a, & Zhang, B. (2010). MicroRNA expression profile of MCF-7 human breast cancer cells and the effect of green tea polyphenon-60. *Cancer Genomics & Proteomics*, 7(5), 261–277.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cell : A Manual of Basic Technique and Spesialized Application 6 th ed.* John Wiley and Sons Inc Publication, New York, USA.
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170.

- Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., & Tatchell, A.R. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* (5th ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Gao, Y., Huang, E., Zhang, H., Wang, J., Wu, N., Chen, X., Wang, N., Wen, S., Nan, G., Deng, F., Liao, Z., Wu, D., Zhang, B., Zhang, J., Haydon, R.C., Luu, H.H., Shi, L.L., He, T.C. (2013). Crosstalk between Wnt/ β -catenin and estrogen receptor signaling synergistically promotes osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *PLoS One*, 8(12), e82436.
- Garrepalli, S., Swarnalatha, K., Sravani Lenkala, N., Reddy, P., and Reddy, A.S., (2014). Synthesis and antibacterial activity of Quinazoline derivatives, *Journal of Pharmacy Research*, 8(4), 533-537.
- Gupta, N., Schmitt, F., Grebhardt, S., & Mayer, D. (2011). β -Catenin Is a Positive Regulator of Estrogen Receptor- α Function in Breast Cancer Cells. *Cancers*, 3(3), 2990–3001.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J. *et al.* (2019). Breast cancer. *Nature Review Disease Primers*, 5: 66 .
- Harmita. (2006). Analisis Fisikokimia. Depok: Departemen Farmasi. FMIPA UI.
- Harmita. (2014). Analisis Fisikokimia Potensiometri dan Spektroskopi. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Haryoto, Muhtadi, Indrayudha, P., Azizah, T., dan Suhendi, A. (2013). Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) Terhadap Sel HeLa, T47D, dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, 18, 2.
- Hayun, Isjandarsyah, Untung, J. (2015). Laporan Akhir Riset Pengembangan Kurkumin. DRPM-UI.
- Hejmadi, M. (2010). Introduction to Cancer Biology. Bookboon.com
- Hong, M.K., Wang, J.H., Su, C.C., Li, M.H., Hsu, Y.H., Chu, T.Y. (2017). Expression of Estrogen and Progesterone Receptor in Tumor Stroma Predicts Favorable Prognosis of Cervical Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Gynecology Cancer*, 27(6), 1247-1255.
- Huang, N., Siegel, M. M., Kruppa, G.H., Laukien, F. H. (1999). Automation of a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer for acquisition, analysis, and

- e-mailing of high-resolution exact-mass electrospray ionization mass spectral data, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *10* (11): 1166-1173.
- Huang, N., Shoichet, B. K., & Irwin, J. J. (2006). Benchmarking Sets for Molecular Docking. *Society*, *49*(23), 6789–6801.
- Hunziker, J., Koch, G., & Press, N. J. (2016). Reaction: Synthesis in Drug Discovery, the Short and Long of It. *Chem*, *1*(3), 336–338.
- James, C.D., Morgan, I.M., Bristol, M.L. (2020). The Relationship between Estrogen-Related Signaling and Human Papillomavirus Positive Cancers. *Pathogens*, *9*(5), 403.
- Jiang, S., Zhang, M., Zhang, Y., Zhou, W., Zhu, T., Ruan, Q., Chen, H., Fang, J., Zhou, F., Sun, J., Yang, X. (2019). WNT5B governs the phenotype of basal-like breast cancer by activating WNT signaling. *Cell Communication and Signalling*, *17*(1), 109.
- Jorgensen, W. L. (2004). The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science*, *303*(5665), 1813–1818.
- Jung, Y., Park, J. (2020). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β -catenin and the destruction complex. *Experimental and Molecular Medicine*, *52*, 183–191.
- Kazi, M.M., Trivedi, T.I., Kobawala, T.P., Ghosh, N.R. (2016). The Potential of Wnt Signaling Pathway in Cancer: A Focus on Breast Cancer. *Cancer Translational Medicine*, *2*(2): 55-60
- Kellenberger, E., Rodrigo, J., Muller, P., & Rognan, D. (2004). Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *57*(2), 225–242.
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., Whittall, R. M. (2008). Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *62* (1): 71-81.
- Kemenkes RI, Hari Kanker sedunia 2019. <http://www.depkes.go.id/article/view/19020100003/hari-kanker-sedunia-2019.html>, Diakses pada 21 April 2019
- Khopkar S.M. (2010). Konsep Dasar Kimia Analitik. Jakarta: UI Press
- Kornicka A, Saczewski F, Bednarski PJ, Korcz M, Szumlans P, Romejko E, Sakowicz A, Sitek L, Wojciechowska M. (2017). Synthesis and Preliminary Cytotoxicity Studies

- of 1-[1-(4,5-Dihydrooxazol-2-yl)-1H-indazol-3-yl]-3-phenylurea and 3-phenylthiourea Derivatives. *Medicinal Chemistry*, 13(7), 616-624.
- Kumar P, S., Singh, A., Sharma, S., Mukta, S., & Anupama, M. (2015). *Ligand Based Pharmacophore Modelling, Virtual Screening and Molecular Docking for Identification of Novel CYP51 Penghambats Abstract Dataset collection*, 1(14), 1–10.
- Kumar, R., Shin, W. S., Sunwoo, K., Kim, W. Y., Koo, S., Bhuniya, S., & Kim, J. S. (2015). Small conjugate-based theranostic agents: an encouraging approach for cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 44(19), 6670–6683.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J. C. (2015). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (9th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Kumavat, S. D., Chaudhari, Y. S., Borole, P., Shenghani, K., Duvvuri, P., Bubera, N., & Shah, P. (2013). Characterization and Evaluation of Curcumin - PVP Solid Dispersion by Solvent Evaporation Technique. *International Journal of Pharmaceutical & Research Sciences*, 2(5), 693–706.
- Kurnia, A., Saputri, F.C., and Hayun, H., (2019), Synthesis and anticancer potential of aminometil derivatives of metil-substituted asymmetrical curcumin monocarbonyl, *J Appl Pharm Sci*, 9 (08), 18–24.
- Kwasniewska, A., Postawski, K., Gozdicka-Jozefiak, A., Kwasniewski, W., Grywalska, E., Zdunek, M., Korobowicz, E. (2011). Estrogen and progesterone receptor expression in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinomas. *Oncology Reports*, 26(1), 153-60.
- Landry, J. J. M., et al. (2013). The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes Genomes Genetics*, 8, 1213–1224.
- Li, Q., Chen, J., Luo, S., Xu, J., Huang, Q., & Liu, T. (2015). Synthesis and assessment of the antioxidant and antitumor properties of asymmetric curcumin analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 93, 461–469.
- Li, V. S. et al. (2012). Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 149: 1245–1256.
- Liang, G., Shao, L., Wang, Y., Zhao, C., Chu, Y., Xiao, J., Yang, S. (2009). Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6), 2623–

2631.

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3–25.
- Liu S, Fan W, Gao X, Huang K, Ding C, Ma G, Yan L, Song S. (2019). Estrogen receptor alpha regulates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colon cancer by targeting the NOD-like receptors. *Cell Signal*, 61(9), 86-92.
- Lombardi, A., Vicente, C. M., & Porto, C. S. (2020). Estrogen Receptors Promote Migration, Invasion and Colony Formation of the Androgen-Independent Prostate Cancer Cells PC-3 Through β -Catenin Pathway. *Frontiers in endocrinology*, 11, 184.
- Lone, M. Y., Manhas, A., Athar, M., & Jha, P. C. (2018). Identification of InHApenghambats: A combination of virtual screening, molecular dynamics simulations and quantum chemical studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamic*, 36(11):2951-2965.
- Longo-Sorbello, G. S. A., Saydam, S., Banerjee, D., & Bertino, J. R. (2006). Cytotoxicity and Cell Growth Assays. *Cell Biology*. 8, 315-324.
- Majeed, W., Aslam, B., Javed, I., Khaliq, T., Muhammad, F., Ali, A., Raza, A. (2014). MINI-REVIEW Breast Cancer : Major Risk Factors and Recent Developments in Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 3353–3358.
- Maingi, J.W., Tang, S., Liu, S., Ngenya, W., Bao, E. (2020). Targeting estrogen receptors in colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*, 47(5), 4087-4091.
- Manohar, S. et al. (2013). Synthesis, Antimalarial Activity and Cytotoxic Potential of New Monocarbonyl Analogues of Curcumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 112–116.
- Matthews, J. (2003). Estrogen Signaling: A Subtle Balance Between ER and ER . *Molecular Interventions*, 3(5), 281–292.
- McInnes, C. (2007). Virtual screening strategies in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(5), 494–502.
- Minu, M., Thangadurai. A., Wakode. S.R., Agrawal. S. S., Narasimhan, B. (2009). Synthesis, antimicrobial activity and QSAR studies of new 2,3-disubstituted-3,3a,4,5,6,7-heksahidro-2H-indazols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

- Letters, 19(11), 2960-2964.
- Mirzaei, A., Ghaffari, S. H., Nikbakht, M., Kamranzadeh Foumani, H., Vaezi, M., Mohammadi, S., Ghavamzadeh, A. (2017). OPN b and c Isoforms Doubtless Veto Anti-angiogenesis Effects of Curcumin in Combination with Conventional AML Regiment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(9), 2591–2599.
- Mohd Aluwi, M. F. F., Rullah, K., Yamin, B. M., Leong, S. W., Abdul Bahari, M. N., Lim, S. J., Lam, K. W. (2016). Synthesis of unsymmetrical monocarbonyl curcumin analogues with potent inhibition on prostaglandin E2 production in LPS-induced murine and human macrophages cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(10), 2531–2538.
- Muchtaridi, M., Yusuf, M., Diantini, A., Choi, S. B., Al-Najjar, B. O., Manurung, J. V., Subarnas, A., Achmad, T. H., & Wahab, H. A. (2014). Potential activity of fevicordin-a from *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. seeds as estrogen receptor antagonist based on cytotoxicity and molecular modelling studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7225–7249.
- Muhammad, U., Uzairu, A., Arthur, D. E. (2018). Review on: quantitative structure activity relationship (QSAR) modeling. *Journal of Analytical Pharmaceutical Research*, 7(2):240–24
- Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2012). Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(14), 6582–6594.
- Nájera, Carmen; Sansano, José M; Yus, M. (2015). 1,3-Dipolar Cycloadditions of azomethine imines. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(32), 8596–8636.
- Ohori, H., Yamakoshi, H., Tomizawa, M., Shibuya, M., Kakudo, Y., Takahashi, A., Shibata, H. (2006). Synthesis and biological analysis of new curcumin analogues bearing an enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(10), 2563–2571.
- Ortega, M., Fraile-Martínez, O., Barco, A., Buján, J., García-Honduvilla, N., Coca, S. (2020). Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/mTOR. *Journal of Oncology*. 9. 1-11.
- Ortuso, F., Langer, T., & Alcaro, S. (2006). GBPM: GRID-based pharmacophore model: Concept and application studies to protein-protein recognition. *Bioinformatics*,

- 22(12), 1449–1455.
- Patrick, G.L., (2001). *An Introduction to Medicinal Chemistry*. New York: Oxford University Press.
- Pavia, L. D., Lampman, G. M., Kriz, G. S. (2000). *Introduction To Spectroscopy: A guide for Student of Organic Chemistry* (3rd ed.). Washington DC: Thomson learning Inc.
- Pawlak, A., Henklewska, M., Hernández-Suárez, B., Łużny, M., Kozłowska, E., Obmińska-Mrukowicz, B., Janeczko, T. (2020). Chalcone Methoxy Derivatives Exhibit Antiproliferative and Proapoptotic Activity on Canine Lymphoma and Leukemia Cells. *Molecules*, 25(19):4362.
- Plescica, S., Raffa, D., Plescica, F., & Casula, G. (2010). Synthesis and biological evaluation of new indazol derivatives, *ARKIVOC Archive for Organic Chemistry*, 10, 163–177.
- Prasad S., Tyagi A.K, Aggarwal B.B.. (2014). Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Research and Treatment*. 46(1):2-18.
- Prasetyaningrum, P. W., Bahtiar, A., & Hayun, H. (2018). Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Novel Asymmetrical Mono-Carbonyl Analogs of Curcumin. *Scientia Pharmaceutica*, 86(25).
- Qingyong Li, J. C. (2015). Synthesis and assessment of the antioxidant and antitumor properties of asymmetric curcumin analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 461e469.
- Rahman, A. F. M. M., Ali, R., Jahng, Y., & Kadi, A. A. (2012). A facile solvent free claisen-schmidt reaction: Synthesis of α,α' -bis-(Substituted-benziliden)cycloalkanones and α,α' -bis-(Substituted-alkylidene)cycloalkanones. *Molecules*, 17(1), 571–583.
- Rainey, N., Motte, L., Aggarwal, B. B., & Petit, P. X. (2015). Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. *Cell Death and Disease*, 6(12), e2003-3.
- Rajsekhar, P. B., Arvind Bharani, R. S., Jini Angel, K., Ramachandran, M., & Rajsekhar, S. P. V. (2015). Curcumin nanoparticles: A therapeutic review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(5), 1180–1185.

- Riss, T. L., Moravec, R.A., Niles, A.L., et al. (2016). Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research Therapy*, 10(4),853-8.
- Roman, G. (2015). Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 743–816.
- Sardjiman (2000). Synthesis of Some New Series of Curcumin Analogues, Anti-Oxidative, Anti Inflammatory, Anti-Bacterial Acitivities and Qualitative StructureActivity-Relationship, Disertation, Gadjah Mada University.
- Sardjiman, SS; ReksHADiproDjol, MS; Hakiml, L; der Goot, H van; Timmermanz, H. (1997). 1,T+Difenil-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure-activity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32, 625–630.
- Sastrohamidjojo, H. (2001). Spektroskopi. Yogyakarta: Liberty
- Schell, M.J., Yang M., Teer J.K., Lo F.Y., Madan A., Coppola D., Monteiro A.N., Nebozhyn M.V., Yue B, Loboda A., Bien-Willner G.A., Greenawalt D.M., Yeatman T.J.. (2016). A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC. *Nature Communication*. 15 (7):11743
- Senthilraja, P., Kathiresan, K., (2015,) In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5 (3): 080-084
- Shen, L., Liu, C., An, C., & Ji, H. (2016). How does curcumin work with poor bioavailability? Clues from experimental and theoretical studies. *Nature Publishing Group*, 2, 1–10.
- Shityakov, S., & Förster, C. (2014). In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry : AABC*, 7, 23–36.
- Solano, L.N., Nelson, G.L., Ronayne, C.T. *et al.* (2020). Synthesis, in vitro, and in vivo evaluation of novel *N*-phenylindazolyl diarylureas as potential anti-cancer

- agents. *Scientific Reports*, *10*, 17969.
- Sporn, M.B., Lippman, S.M. (2003). *Agents for Chemoprevention and Their Mechanism of Action. Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition*. Hamilton (ON): BC Decker
- Sreenivasulu, R., Sujitha, P., Jadav, S.S. *et al.* (2017). Synthesis, antitumor evaluation, and molecular docking studies of indole–indazolyl hydrazide–hydrazone derivatives. *Monatsh Chemie*, *148*, 305–314.
- Shetty, D., Kim, Y. J., Shim, H., & Snyder, J. P. (2015). Eliminating the Heart from the Curcumin Molecule: Monocarbonyl Curcumin Mimics (MACs). *Molecules*, *20*(1): 249–292.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., & Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds (7th ed.)*. New York: John Wiley & Sons.
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2014). Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*, *66*(1), 334–395.
- Subramaniapillai, S. G. (2013). Mannich reaction: A versatile and convenient approach to bioactive skeletons. *Journal of Chemical Sciences*, *125*(3), 467–482.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. *0*, 1-41.
- Talevi, A. (2018). Computer-aided drug design: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1762*(5), 1–19.
- Thirupalu Reddy, M., Hanuman Reddy, V., Chenna Krishna Reddy, R., Krishna Reddy, V., & Rami Reddy, Y. V. (2014). Synthesis and molecular docking studies of new substituted indazol derivatives for anti-breast cancer activity. *Der Pharma Chemica*, *6*(6), 411–417.
- Thomas, C., & Gustafsson, J. Å. (2011). The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, *11*(8), 597–608.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, *21*(7), 440–446.

- Tiwari, A., Saraf, S., Verma, A., Panda, P. K., & Jain, S. K. (2018). Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight. *World journal of gastroenterology*, *24*(39), 4428–4435.
- Ubeyitogullari, A., Ciftci, O.N. (2019). A novel and green nanoparticle formation approach to forming low-crystallinity curcumin nanoparticles to improve curcumin's bioaccessibility. *Scientific Reports*, *9*, 19112.
- Union, I., Pure, O. F., & Chemistry, A. (1998). Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry, *Pure and Applied Chemistry*, *70*(5), 1129–1143.
- Untung, J., Iskandarsyah, I., & Hayun, H. (2017). 2-[(2,6-Dimetilmorpholin-4-yl)metil]-4-[(E)-2-{3-[(E)-2-{3-[(2,6-dimetilmorpholin-4-yl)metil]-4-hidroksi-5-metoksifenil}ethenyl]-1H -pyrazol-5-yl}ethenyl]-6-metoksiphenol. *Molbank*, *3*, M949.
- Weber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y, Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, *6*, *45*(12), 2615-23.
- Wang J.Y., Wang X., Wang X.J., Zheng B.Z., Wang Y., Wang X., Liang B. (2018). Curcumin inhibits the growth via Wnt/ β -catenin pathway in non-small-cell lung cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *22*(21):7492-7499.
- Wang, Y., Li, Y., Yang, S., & Yang, L. (2005). Classification of Substrates and Penghambats of P-Glycoprotein Using Unsupervised Machine Learning Approach, *Journal of Chemical Information and Modeling*, *45*(3), 750–757.
- Wasi, A., Sharma, B. K., Gupta, A. K., & Intodia, K. (2013). Ecofriendly synthesis of some bioactive pyrazoline and isoxazoline derivatives from α , β -unsaturated sikloheksanon. *International Journal of Chemical Science*, *11*(4), 1621–1635.
- Watts, Denise Watson. (2010). HeLa Cancer Cells Killed Henrietta Lacks. Then They Made Her Immortal. *The Virginian- Pilot* .
- Wilken, R., Veena, M. S., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2011). Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, *10*, 1–19.
- Wolber, G., & Langer, T. (2005). LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of Chemical*

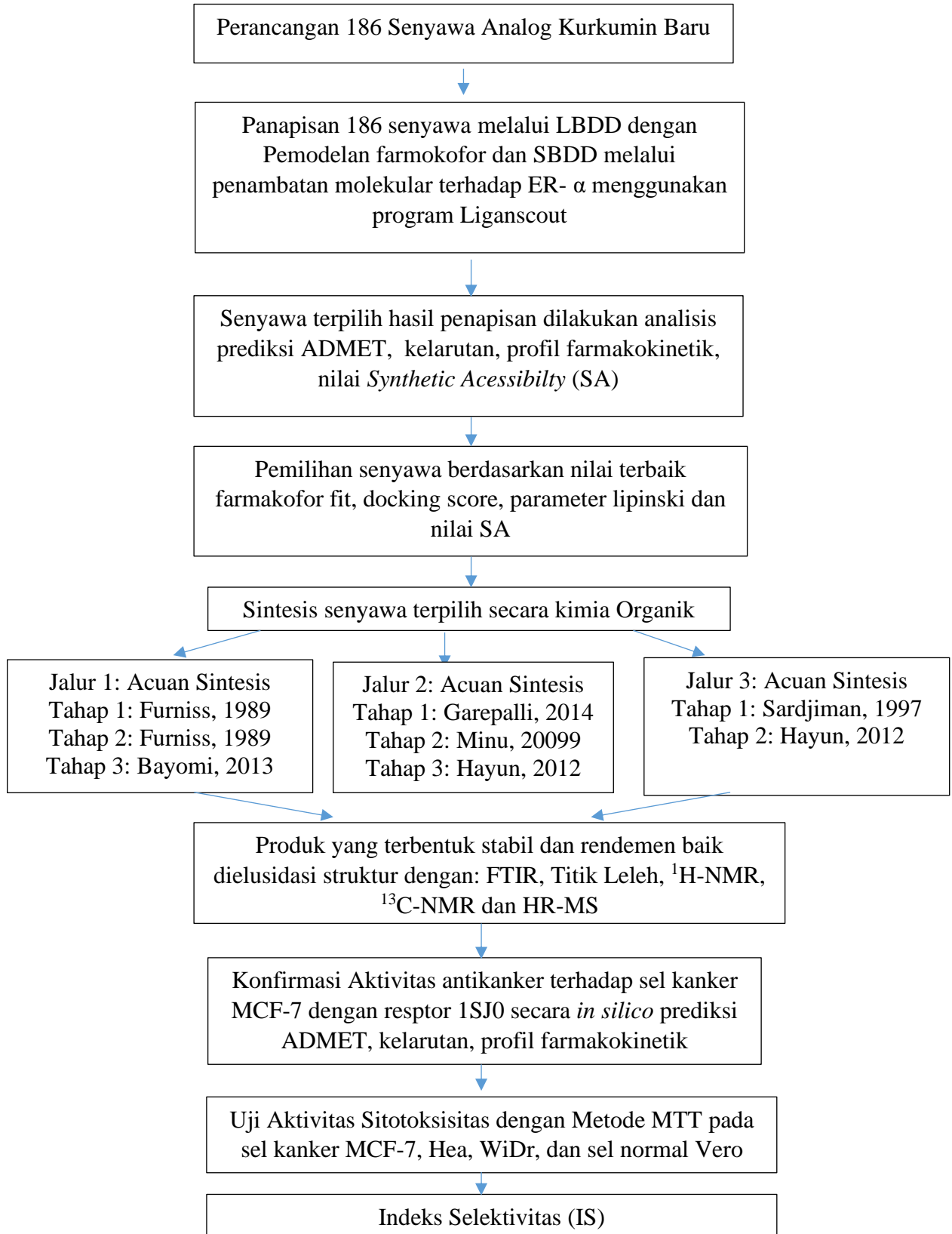
Information and Modeling, 45(1), 160–169.

- Wood, Jhon, et al, Inventor; Indazol penghambats of the Wnt pathway and therapeutic uses thereof, U.S. Patent, 8,822.478. September, 2, 2014
- Wolber G. (2008). Efficient 3D pharmacophore alignment as a tool for structure-based modeling and scoring. *Chemistry Central Journal*, 2(Suppl 1), P49. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-2-S1-P49>
- Yin, P., Wang, W., Zhang, Z., Bai, Y., Gao, J., & Zhao, C. (2018). Wnt signaling in human and mouse breast cancer: Focusing on Wnt ligands, receptors and antagonists. *Cancer science*, 109(11), 3368–3375.
- Yang, S. Y. (2010). Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, 15(11–12), 444–450.
- Yang, M., Wang, M., Li, X., Xie, Y., Xia, X., Tian, J., Zhang, K., & Tang, A. (2018). Wnt signaling in cervical cancer?. *Journal of Cancer*, 9(7), 1277–1286.
- Yerdelen, K. O., Gul, H. I., Sakagami, H., & Umemura, N. (2014). Synthesis and biological evaluation of 1, 5-bis (4-hidroksi-3- metoksifenil) penta-1, 4-dien-3-one and its aminometil derivatives, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(3), 1–6.
- Yi, Y., Fang, Y., Wu, K., Liu, Y., & Zhang, W. (2020). Comprehensive gene and pathway analysis of cervical cancer progression. *Oncology Letters*, 19, 3316–3332.
- Yim, S.-K., Yun, C.-H., Ahn, T.-H., Jung, H.-C., & Pan, J.-G. (2005). A Continuous Spectrophotometric Assay for NADPH-cytochrome P450 Reductase Activity Using 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium Bromide. *BMB Reports*, 38(3), 366–369.
- Yin, S., Zheng, X., Yao, X., Wang, Y., & Liao, D. (2013). Synthesis and Anticancer Activity of Mono-Carbonyl Analogues of Curcumin. *Journal of Cancer Therapy*, 4, 113–123.
- Youssef KM, El-Sherbeny MA, El-Shafie FS, Farag HA, Al-Deeb OA, Awadalla SA. (2004). Synthesis of curcumin analogues as potential antioxidant, cancer chemopreventive agents. *Archiv Der Pharmazie (Weinheim)*. 337(1), 42-54.
- Zhang, S.G.; Liang, C.G.; Zhang, W.H. (2018). Recent Advances in Indazol-Containing Derivatives: Synthesis and Biological Perspectives. *Molecules*, 23, 2783

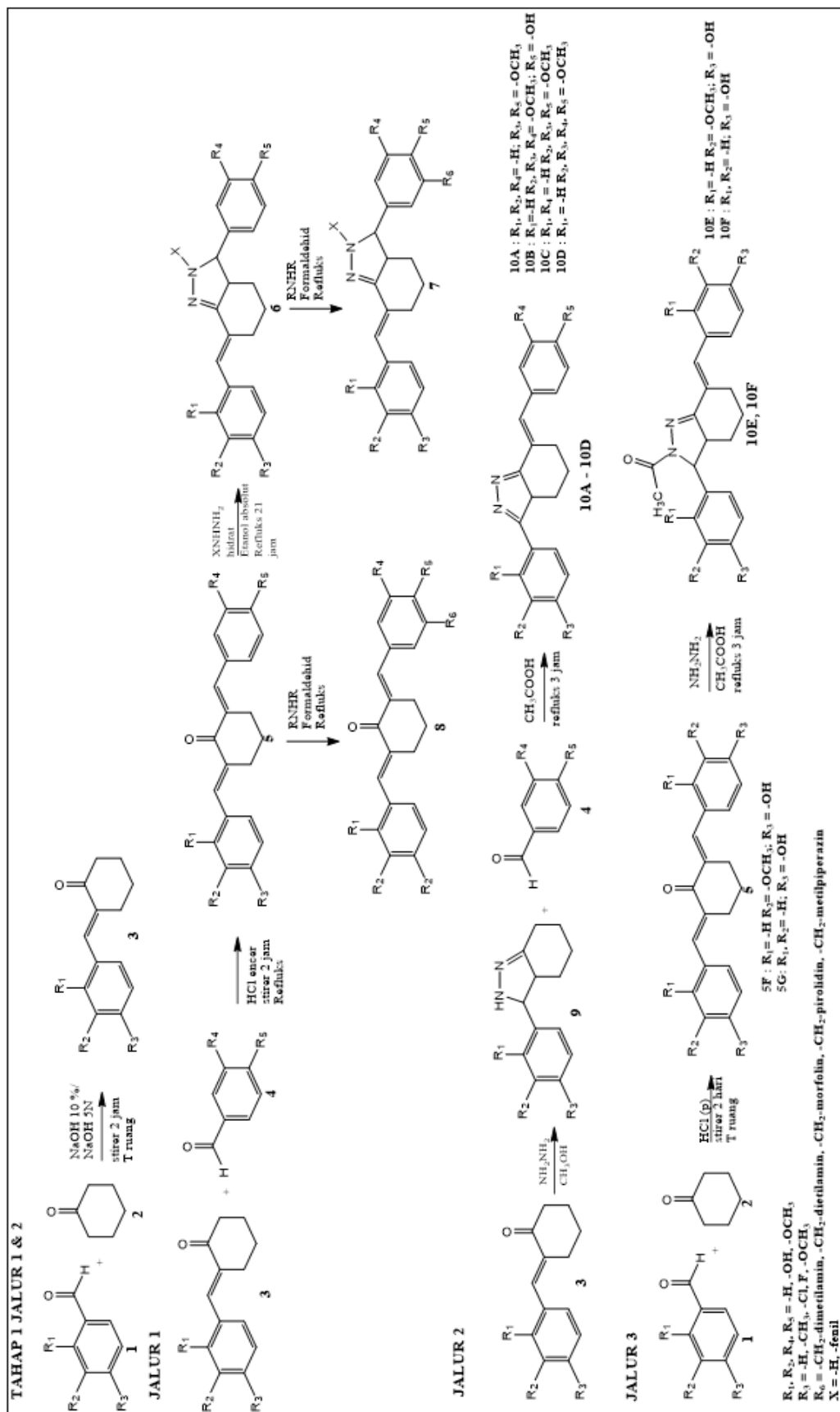
- Zhang, Y. et al. (2014a). Synthesis and Evaluation of a Series of Novel Asymmetrical Curcumin Analogs for the Treatment of Inflammation. *Molecules*, *19*, 7287-7307.
- Zhang, Y. et al., (2014b). Discovery and Evaluation of Novel Anti-inflammatory Derivatives of Natural Bioactive Curcumin. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 2161–2171.
- Zhang, Y., Zhao, L., Wu, J., Jiang, X., Dong, L., Xu, F. Liang, G. (2014). Synthesis and evaluation of a series of novel asymmetrical curcumin analogs for the treatment of inflammation. *Molecules*, *19*(6), 7287–7307.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Lengkap



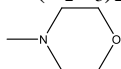
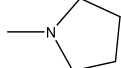
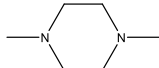
Lampiran 2. Rancangan desain struktur dan sintesis senyawa



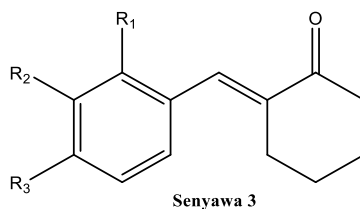
Lampiran 3. Desain senyawa AKMA dan AKI

Gambar L-1. Skema Rancangan sintesis AKI

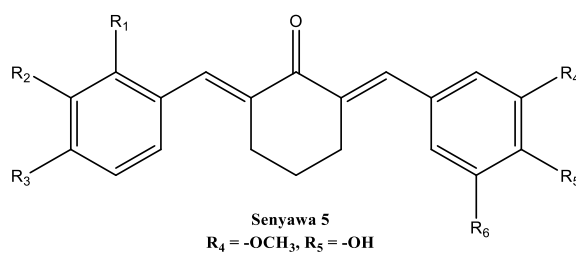
Kode senyawa basa mannich

Kode basa mannich	Senyawa basa mannich	Struktur
A	Dimetil Amin	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
B	Dietil Amin	$-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
C	Morfolin	
D	Pirolidin	
E	N-metil piperazin	

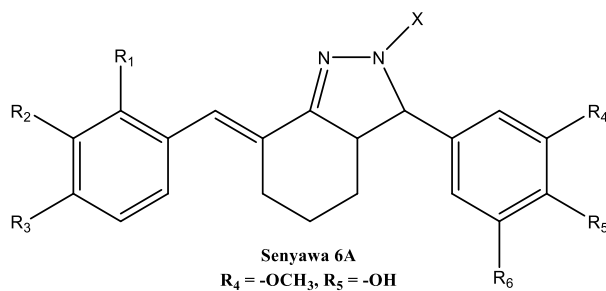
Tabel L-3. Desain 186 struktur senyawa AKMA dan AKI



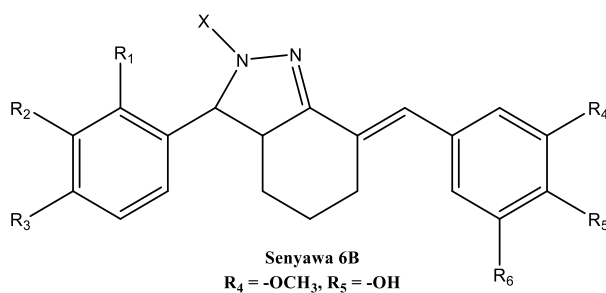
No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃
1	3A	-H	-H	-H
2	3B	-H	-H	-CH ₃
3	3C	-H	-H	-Cl
4	3D	-H	-H	-F
5	3E	-H	-H	-OCH ₃
6	3F	-OCH ₃	-H	-OCH ₃



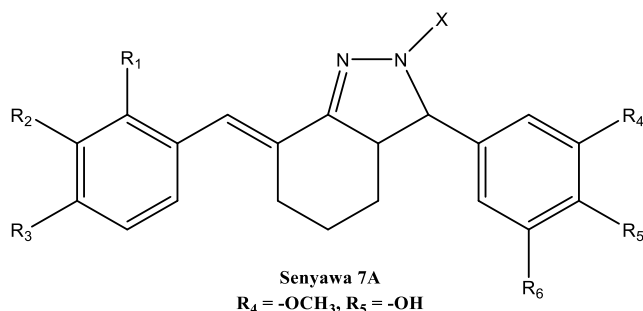
No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆
7	5A	-H	-H	-H	-H
8	5B	-H	-H	-CH ₃	-H
9	5C	-H	-H	-Cl	-H
10	5D	-H	-H	-F	-H
11	5E	-H	-H	-OCH ₃	-H
12	5F	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H



No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
13	6A1	-H	-H	-H	-H	-H
14	6A 2	-H	-H	-CH ₃	-H	-H
15	6A 3	-H	-H	-Cl	-H	-H
16	6A 4	-H	-H	-F	-H	-H
17	6A 5	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H
18	6A 6	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H
19	6A 7	-H	-H	-H	-H	-fenil
20	6A 8	-H	-H	-CH ₃	-H	-fenil
21	6A 9	-H	-H	-Cl	-H	-fenil
22	6A 10	-H	-H	-F	-H	-fenil
23	6A 11	-H	-H	-OCH ₃	-H	-fenil
24	6A 12	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-fenil



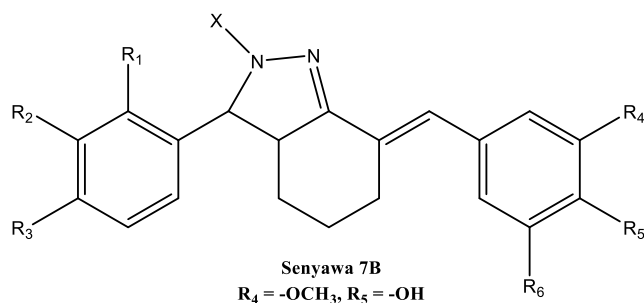
No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
25	6B1	-H	-H	-H	-H	-H
26	6B 2	-H	-H	-CH ₃	-H	-H
27	6B 3	-H	-H	-Cl	-H	-H
28	6B 4	-H	-H	-F	-H	-H
29	6B 5	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H
30	6B 6	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H
31	6B 7	-H	-H	-H	-H	-fenil
32	6B 8	-H	-H	-CH ₃	-H	-fenil
33	6B 9	-H	-H	-Cl	-H	-fenil
34	6B 10	-H	-H	-F	-H	-fenil
35	6B 11	-H	-H	-OCH ₃	-H	-fenil
36	6B 12	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-fenil



No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
37	7A1A	-H	-H	-H	-CH ₂ -(A)	-H
38	7A1B	-H	-H	-H	-CH ₂ -(B)	-H
39	7A1C	-H	-H	-H	-CH ₂ -(C)	-H
40	7A1D	-H	-H	-H	-CH ₂ -(D)	-H
41	7A1E	-H	-H	-H	-CH ₂ -(E)	-H
42	7A2A	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
43	7A2B	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(B)	-H
44	7A2C	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
45	7A2D	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
46	7A2E	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
47	7A3A	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(A)	-H
48	7A3B	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(B)	-H
49	7A3C	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(C)	-H
50	7A3D	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(D)	-H
51	7A3E	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(E)	-H
52	7A4A	-H	-H	-F	-CH ₂ -(A)	-H
53	7A4B	-H	-H	-F	-CH ₂ -(B)	-H
54	7A4C	-H	-H	-F	-CH ₂ -(C)	-H
55	7A4D	-H	-H	-F	-CH ₂ -(D)	-H
56	7A4E	-H	-H	-F	-CH ₂ -(E)	-H
57	7A5A	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
58	7A5B	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-H
59	7A5C	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
60	7A5D	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
61	7A5E	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
62	7A6A	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
63	7A6B	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-H
64	7A6C	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
65	7A6D	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
66	7A6E	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
67	7A7A	-H	-H	-H	-CH ₂ -(A)	-fenil
68	7A7B	-H	-H	-H	-CH ₂ -(B)	-fenil
69	7A7C	-H	-H	-H	-CH ₂ -(C)	-fenil
70	7A7D	-H	-H	-H	-CH ₂ -(D)	-fenil
71	7A7E	-H	-H	-H	-CH ₂ -(E)	-fenil
72	7A8A	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
73	7A8B	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
74	7A8C	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
75	7A8D	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
76	7A8E	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil
77	7A9A	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(A)	-fenil
78	7A9B	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(B)	-fenil
79	7A9C	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(C)	-fenil
80	7A9D	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(D)	-fenil

Kode Senyawa 7A. Lanjutan

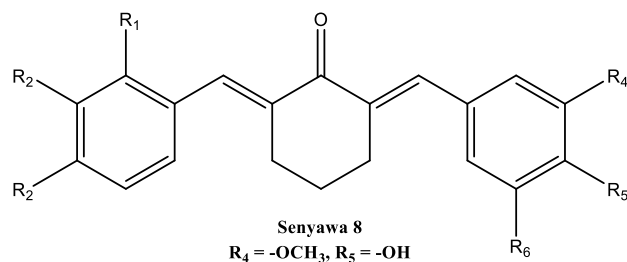
No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
81	7A9E	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(E)	-fenil
82	7A10A	-H	-H	-F	-CH ₂ -(A)	-fenil
83	7A10B	-H	-H	-F	-CH ₂ -(B)	-fenil
84	7A10C	-H	-H	-F	-CH ₂ -(C)	-fenil
85	7A10D	-H	-H	-F	-CH ₂ -(D)	-fenil
86	7A10E	-H	-H	-F	-CH ₂ -(E)	-fenil
87	7A11A	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
88	7A11B	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
89	7A11C	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
90	7A11D	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
91	7A11E	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil
92	7A12A	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
93	7A12B	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
94	7A12C	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
95	7A12D	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
96	7A12E	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil



No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
97	7B1A	-H	-H	-H	-CH ₂ -(A)	-H
98	7B1B	-H	-H	-H	-CH ₂ -(B)	-H
99	7B1C	-H	-H	-H	-CH ₂ -(C)	-H
100	7B1D	-H	-H	-H	-CH ₂ -(D)	-H
101	7B1E	-H	-H	-H	-CH ₂ -(E)	-H
102	7B2A	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
103	7B2B	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(B)	-H
104	7B2C	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
105	7B2D	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
106	7B2E	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
107	7B3A	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(A)	-H
108	7B3B	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(B)	-H
109	7B3C	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(C)	-H
110	7B3D	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(D)	-H
111	7B3E	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(E)	-H
112	7B4A	-H	-H	-F	-CH ₂ -(A)	-H
113	7B4B	-H	-H	-F	-CH ₂ -(B)	-H
114	7B4C	-H	-H	-F	-CH ₂ -(C)	-H
115	7B4D	-H	-H	-F	-CH ₂ -(D)	-H
116	7B4E	-H	-H	-F	-CH ₂ -(E)	-H
117	7B5A	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
118	7B5B	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-H

Kode Senyawa 7B. Lanjutan

No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	X
119	7B5C	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
120	7B5D	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
121	7B5E	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
122	7B6A	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-H
123	7B6B	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-H
124	7B6C	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-H
125	7B6D	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-H
126	7B6E	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-H
127	7B7A	-H	-H	-H	-CH ₂ -(A)	-fenil
128	7B7B	-H	-H	-H	-CH ₂ -(B)	-fenil
129	7B7C	-H	-H	-H	-CH ₂ -(C)	-fenil
130	7B7D	-H	-H	-H	-CH ₂ -(D)	-fenil
131	7B7E	-H	-H	-H	-CH ₂ -(E)	-fenil
132	7B8A	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
133	7B8B	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
134	7B8C	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
135	7B8D	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
136	7B8E	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil
137	7B9A	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(A)	-fenil
138	7B9B	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(B)	-fenil
139	7B9C	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(C)	-fenil
140	7B9D	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(D)	-fenil
141	7B9E	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(E)	-fenil
142	7B10A	-H	-H	-F	-CH ₂ -(A)	-fenil
143	7B10B	-H	-H	-F	-CH ₂ -(B)	-fenil
144	7B10C	-H	-H	-F	-CH ₂ -(C)	-fenil
145	7B10D	-H	-H	-F	-CH ₂ -(D)	-fenil
146	7B10E	-H	-H	-F	-CH ₂ -(E)	-fenil
147	7B11A	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
148	7B11B	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
149	7B11C	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
150	7B11D	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
151	7B11E	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil
152	7B12A	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)	-fenil
153	7B12B	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)	-fenil
154	7B12C	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)	-fenil
155	7B12D	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)	-fenil
156	7B12E	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)	-fenil



No	Kode Senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆
157	8A	-H	-H	-H	-CH ₂ -(A)
158	8B	-H	-H	-H	-CH ₂ -(B)
159	8C	-H	-H	-H	-CH ₂ -(C)
160	8D	-H	-H	-H	-CH ₂ -(D)
161	8E	-H	-H	-H	-CH ₂ -(E)
162	8F	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(A)
163	8G	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(B)
164	8H	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(C)
165	8I	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(D)
166	8J	-H	-H	-CH ₃	-CH ₂ -(E)
167	8K	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(A)
168	8L	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(B)
169	8M	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(C)
170	8N	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(D)
171	8O	-H	-H	-Cl	-CH ₂ -(E)
172	8P	-H	-H	-F	-CH ₂ -(A)
173	8Q	-H	-H	-F	-CH ₂ -(B)
174	8R	-H	-H	-F	-CH ₂ -(C)
175	8S	-H	-H	-F	-CH ₂ -(D)
176	8T	-H	-H	-F	-CH ₂ -(E)
177	8U	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)
178	8V	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)
179	8W	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)
180	8X	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)
181	8Y	-H	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)
182	8Z	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(A)
183	8AA	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(B)
184	8AB	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(C)
185	8AC	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(D)
186	8AD	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₂ -(E)

Lampiran 4. Data set penghambat ER- α Table L4.a. Empat senyawa ligan nativ ER- α

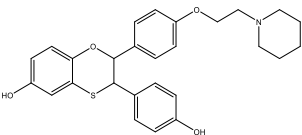
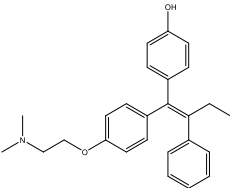
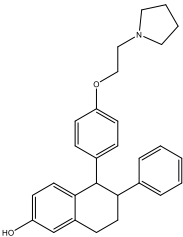
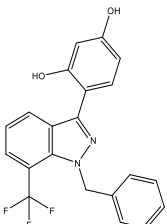
No	Nama Ligan Nativ	PDB ID	RumusMolekul	Berat Molekul
1	E4D600	1SJ0	$C_{27} H_{29} N_1 O_4 S_1$	463.60
				
2	OHT201	2OUZ	$C_{26} H_{30} N_1 O_2$	388.53
				
3	C3D999	2P7Z	$C_{28} H_{31} N_1 O_2$	413.56
				
4	KN01	3OS8	$C_{21} H_{15} N_2 O_2 F_3$	384.36
				

Table L4.b. Data 30 Senyawa penghambat ER- α

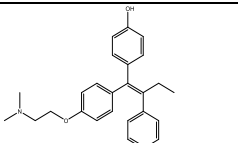
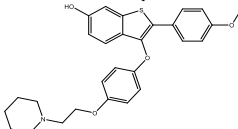
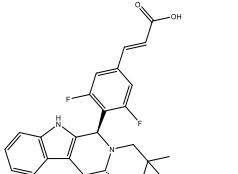
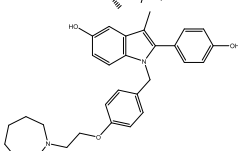
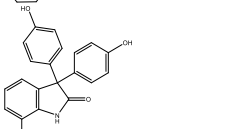
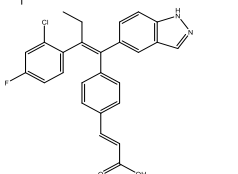
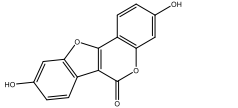
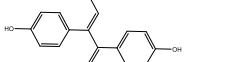
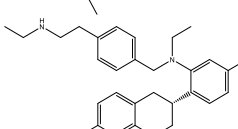
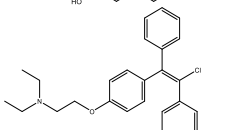
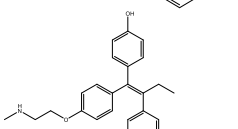
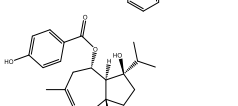
No	Senyawa penghambat ER- α	Struktur	Pubchem CID	Rumus Molekul	Berat Molekul	pIC ₅₀
1	4-OH-Tamoksifene		449459	<u>C₂₆H₂₉NO₂</u>	387.5	9,30
2	Arzoxifene		179337	C ₂₈ H ₂₉ NO ₄ S	475.6	7,67
3	AZD9496		86287635	C ₂₅ H ₂₅ F ₃ N ₂ O ₂	442.5	9,86
4	Bazedoxifene		154257	<u>C₃₀H₃₄N₂O₃</u>	470.6	9,22
5	BHPI		3860640	C ₂₁ H ₁₇ NO ₃	331.4	7,57
6	Brilanestrant/GDC-0810		56941241	<u>C₂₆H₂₀ClFN₂O₂</u>	446.9	8,21
7	Coumestrol		5281707	C ₁₅ H ₈ O ₅	268.22	7,96
8	Dienestrol		667476	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	266.3	7,82
9	Elacestrant		23642301	C ₃₀ H ₃₈ N ₂ O ₂	458.6	7,32
10	Enclomiphene		1548953	C ₂₆ H ₂₈ ClNO	406	7,11
11	Endoxifen		10090750	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	373.5	7,82
12	Ferutinin		354654	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.5	7,48

Table L4.b Lanjutan

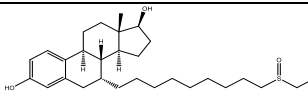
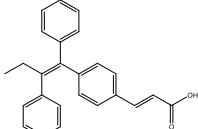
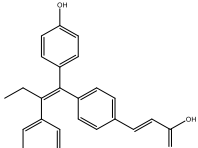
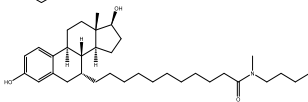
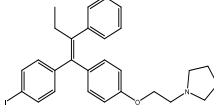
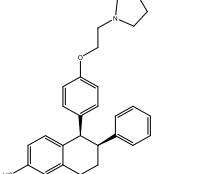
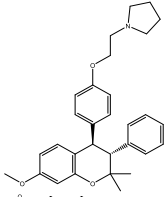
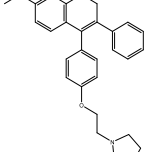
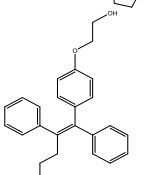
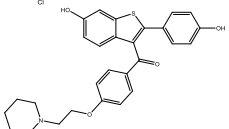
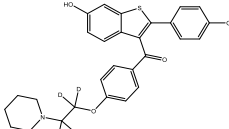
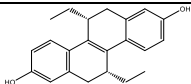
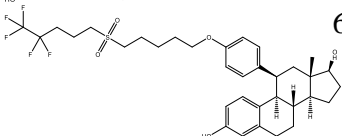
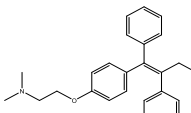
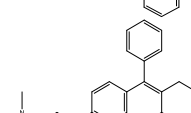
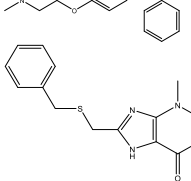
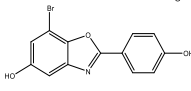
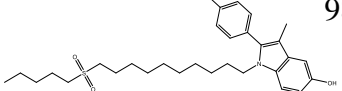
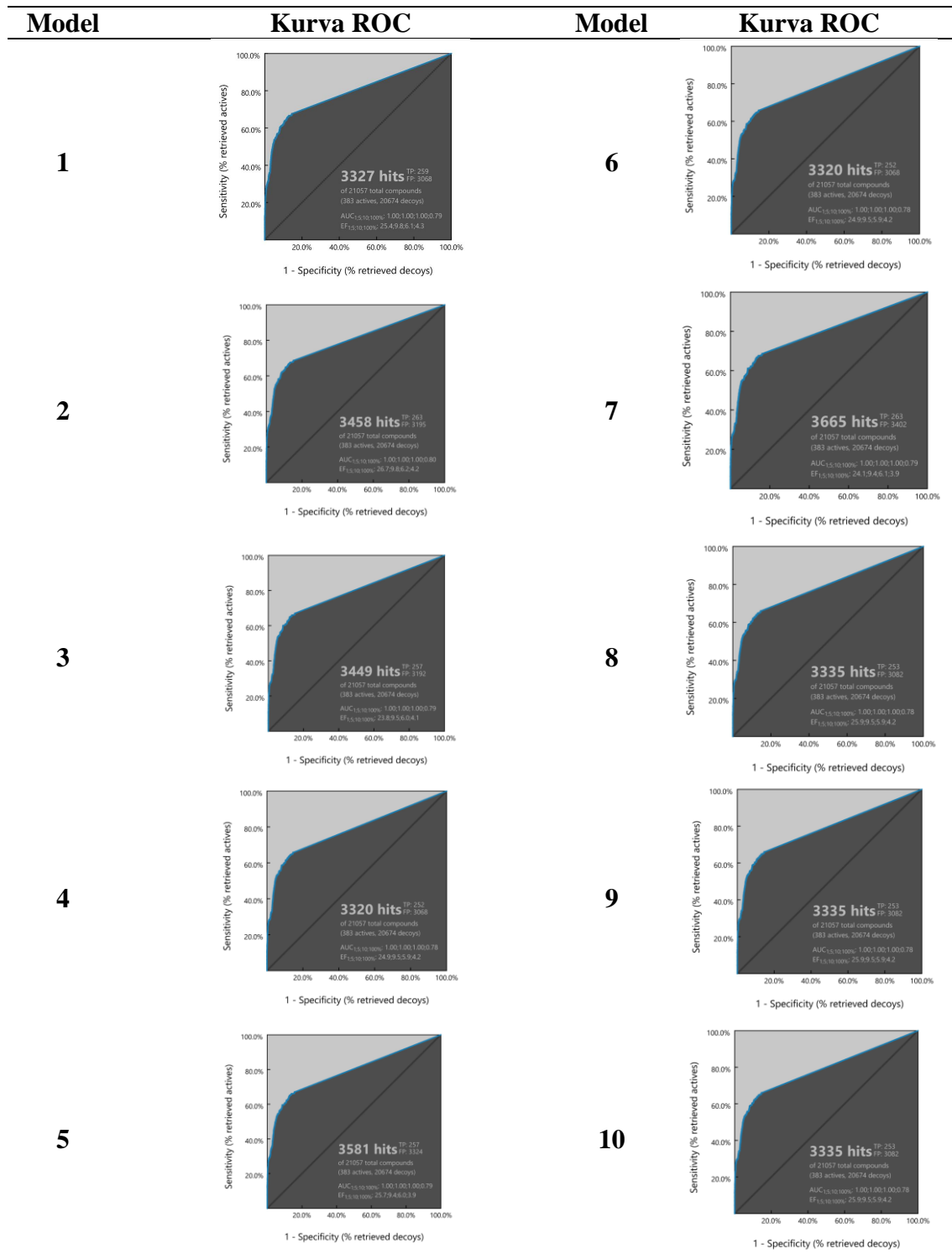
No	Senyawa penghambat ER- α	Struktur	Pubchem CID	Rumus Molekul	Berat Molekul	pIC ₅₀
13	Fulvestran = Faslodex		104741	C ₃₂ H ₄₇ F ₅ O ₃ S	606.8	9,09
14	GW 5638		5288494	C ₂₅ H ₂₂ O ₂	354.4	8,49
15	GW 7604		9799518	C ₂₅ H ₂₂ O ₃	370.4	6,89
16	ICI-164384		104772	C ₃₄ H ₅₅ NO ₃	525.8	8,52
17	Idoxifene		3034011	C ₂₈ H ₃₀ INO	523.4	6,47
18	Lasofoxifene		3081919	C ₃₂ H ₃₇ NO ₈	563.6	8,82
19	Levormeloxifene		35805	C ₃₀ H ₃₅ NO ₃	457.6	8,14
20	Nafoxidine		4416	C ₂₉ H ₃₁ NO ₂	425.6	5,13
21	Ospemiphene		3036505	C ₂₄ H ₂₃ ClO ₂	378.9	6,10
22	Raloxifene		5035	C ₂₈ H ₂₇ NO ₄ S	473.6	8,40
23	Raloxifene d4		25217190	C ₂₈ H ₂₇ NO ₄ S	477.6	9,43

Table L4.b. Lanjutan

No	Senyawa penghambat ER- α	Struktur	Pubchem CID	Rumus Molekul	Berat Molekul	pIC ₅₀
24	(R,R)-THC		446849	C ₂₂ H ₂₄ O ₂	320.4	4,98
25	RU58668		6918261	C ₃₄ H ₄₃ F ₅ O ₅ S	658.8	4,40
26	Tamoksifene		2733526	C ₂₆ H ₂₉ NO	371.5	6,76
27	Toremifene		3005573	C ₂₆ H ₂₈ ClNO	406	6,00
28	TPBM		262425	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₂ S	316.4	5,30
29	WAY 200070		13541837 3	C ₁₃ H ₈ BrNO ₃	306.11	7,20
30	ZK 164015		9806489	C ₃₀ H ₄₃ NO ₄ S	513.7	4,60

Lampiran 5 Kurva ROC 10 Model



Lampiran 6. Prediksi ADMET, kelarutan, profil farmakokinetika, *drug-likeness*, dan nilai *synthetic accessibility* dengan SwissADME

Prediksi SwissADME	Nama Senyawa												
	6A6	6B1	6B2	6B3	6B4	6B7	6B8	6B9	6B10	6B11	Tam*	Kur*	4HT*
Sifat Fisiko-Kimia													
Berat Molekul (g/mol)	394,46	334,41	348,44	368,86	352,40	410,15	424,53	444,95	428,50	440,53	371,51	368,38	387,51
Jml atom berat	29	25	26	26	26	31	32	32	32	33	28	27	29
Jml arom. Atom berat	12	12	12	12	12	18	18	18	18	18	18	12	18
Fraksi Csp3	0,35	0,29	0,32	0,29	0,29	0,22	0,25	0,22	0,22	0,25	0,23	0,14	0,23
Jml rotatable bond/Nrotb	5	3	3	3	3	4	4	4	4	5	8	8	8
Jml akseptor ikatan H/HBA	5	3	3	3	4	3	3	3	4	4	2	6	3
Jml donor ikatan H/HBD	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	2	1
Refraktivitas Molar/RM	120,66	107,88	112,84	112,89	107,83	133,02	137,96	138,03	132,97	139,51	119,72	102,80	121,75
TPSA (Å)	72,31	53,85	53,85	53,85	53,85	45,06	45,06	45,06	45,06	54,29	12,47	93,06	32,70
Lipofilisitas (Log Po/w)													
iLOGP	3,56	3,09	3,16	3,41	2,98	3,45	3,86	3,94	3,77	4,34	4,64	3,27	4,29
XLOGP3	4,29	4,34	4,71	4,97	4,45	6,04	6,41	6,67	6,14	6,01	7,14	3,20	6,79
WLOGP	3,11	3,09	3,40	3,74	3,65	5,01	5,32	5,66	5,57	5,02	6,00	3,15	5,70
MLOGP	2,48	3,15	3,37	3,64	3,53	4,45	4,65	4,92	4,82	4,09	5,10	1,47	4,49
SILICOS-IT	4,35	4,25	4,76	4,88	4,66	5,23	5,75	5,86	5,64	5,29	5,99	4,04	5,51
Konsensus Log Po/w	3,56	3,59	3,88	4,13	3,85	4,64	5,20	5,41	5,19	4,95	5,77	3,03	5,36
Solubilitas dalam air (Log S)													
ESOL	-4,96	-4,80	-5,11	-5,40	-4,97	-6,36	-6,66	-6,95	-6,52	-6,43	-6,59	-3,94	-6,45
Solubilitas - (mg/ml)	4,28e-03	5,24e-03	2,70e-03	1,46e-03	3,76e-03	1,81e-04	9,23e-05	4,96e-05	1,30e-04	1,63e-04	9,56e-05	4,22e-02	1,37e-04
- (mol/l)	1,08e-06	1,57e-05	7,74e-06	3,97e-06	1,07e-05	4,41e-07	2,17e-07	1,11e-07	3,04e-07	3,70e-07	2,57e-07	1,15e-04	3,54e-07
Kelas	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Larut	Kurang Larut
Ali	-5,52	-5,19	-5,57	-5,84	-5,30	-6,77	-7,15	-7,42	-6,87	-6,93	-7,22	-4,83	-7,28
Solubilitas - (mg/ml)	1,19e-03	2,18e-03	9,39e-04	5,34e-04	1,77e-03	7,05e-05	3,01e-05	1,70e-05	5,79e-05	5,20e-05	2,23e-05	5,50e-03	2,02e-05
- (mol/l)	3,01e-06	6,52e-06	2,69e-06	1,45e-06	5,01e-06	1,72e-07	7,09e-06	3,81e-08	1,35e-07	1,18e-07	5,99e-08	1,49e-05	5,20e-08
Kelas	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Cukup larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Cukup larut	Kurang larut
ESOL	-6,24	-6,03	-6,41	-6,62	-6,30	-7,77	-8,15	-8,36	-8,04	-7,87	-8,92	-4,45	-8,33
Solubilitas - (mg/ml)	2,26e-04	3,11e-04	1,36e-04	8,79e-05	1,77e-04	6,91e-06	3,01e-06	1,95e-06	3,94e-06	5,89e-06	4,48e-07	1,31e-02	1,81e-06
- (mol/l)	5,73e-07	9,31e-07	3,90e-07	2,83e-07	5,04e-07	1,68e-08	7,10e-09	4,39e-09	9,18e-09	1,34e-08	1,21e-09	3,56e-05	4,67e-09






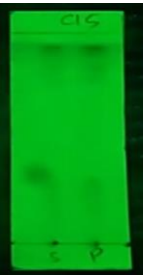



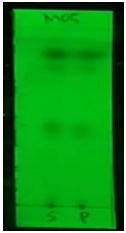
Lampiran 6. Lanjutan

Prediksi SwissADME	Nama Senyawa													4HT*
	6A6	6B1	6B2	6B3	6B4	6B7	6B8	6B9	6B10	6B11	Tam*	Kur*		
Kelas	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	Kurang larut	
Farmakokinetik														
Absorpsi GI	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Tinggi	Rendah	Tinggi	Tinggi	
Permeasi BBB	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Ya	
Substrat P-gp	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	
Inhibitor CYP1A2	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	
Inhibitor CYP2C19	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	
Inhibitor CYP2C9	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	
Inhibitor CYP2D6	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	
Inhibitor CYP3A4	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Ya	Ya	
Drug-likeness														
Lipinski (Pelanggaran)	Ya (0)	Ya (0)	Ya (0)	Ya (0)	Ya (0)	Ya (1)	Ya (1)	Ya (1)	Ya (1)	Ya (0)	Ya (1)	Ya (0)	Ya (1)	
Ghose (Pelanggaran)	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (1)	Ya	Tidak (1)	
Veber	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	
Egan (Pelanggaran)	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (1)	Ya	Ya	
Muegge (Pelanggaran)	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak	Ya	Tidak (1)	
Nilai Bioavailabilitas	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	
Kimia Medisinal														
PAINS (alert)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Brenk (alert)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	
Lead-likeness (Pelanggaran)	Tidak (2)	Tidak (1)	Tidak (1)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (2)	Tidak (3)	Tidak (2)	Tidak (3)	
SA/Synthetic accessibility	4,60	4,26	4,37	4,24	4,23	4,52	4,64	4,51	4,53	4,67	3,01	2,97	3,05	











Keterangan : Tam = Tamoksifen, Kur = kurkumin, 4HT = 4-Hidroksi -Tamoksifen

Lampiran 7. Hasil sintesis berupa gambar produk dan KLT

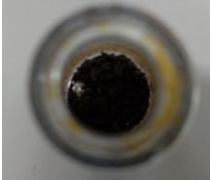
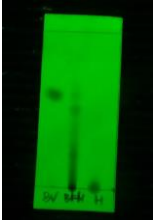



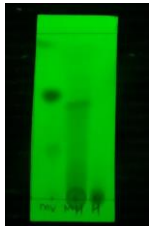
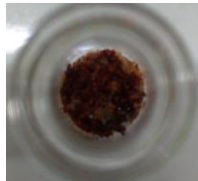
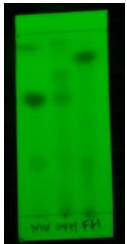
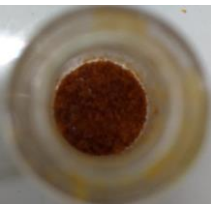
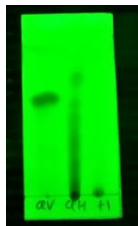
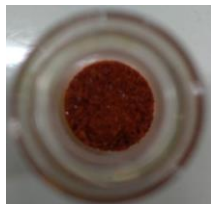
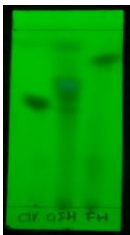

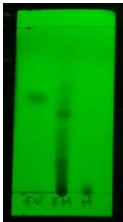

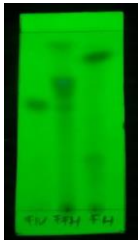
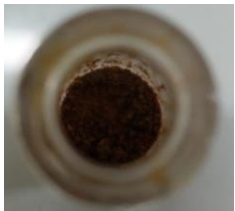
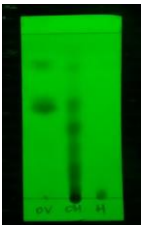
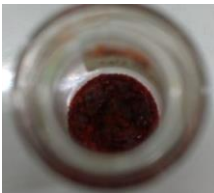
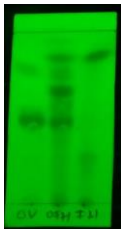
Tabel L7.a. Hasil Sintesis tahap 1 jalur 1 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dan pembandingan

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
3A		
3B		
3C		
3D		
3E		




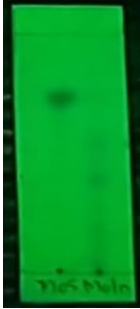



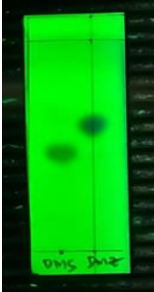

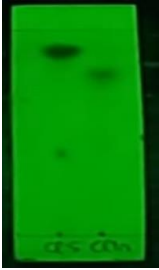

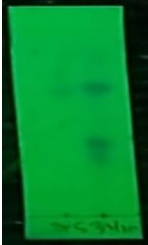


Tabel L7.b. Hasil Sintesis tahap 2 jalur 1 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dan pembanding

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
5A		
5B		
5C		
5D		
5E		








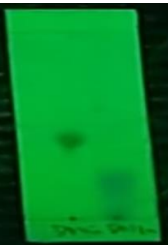

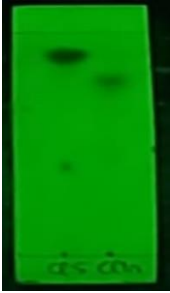

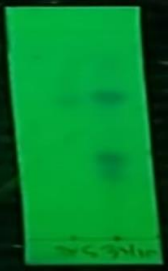


Tabel L7.c. Hasil Sintesis tahap 3 jalur 1 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dan pembanding

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT	Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
6A1/6B1			6.A7/6B7		
6A2/6B2			6A8/6B8		
6A3/6B3			6A9/6B9		
6A4/6B4			6A10/6B10		
6A5/6B5			6A11/6B11		

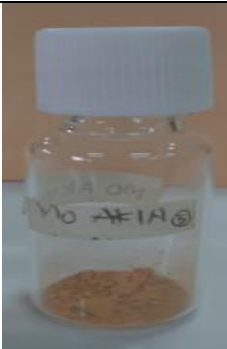

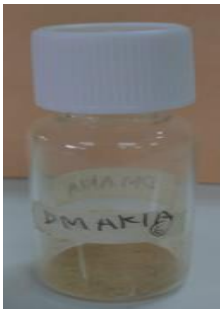
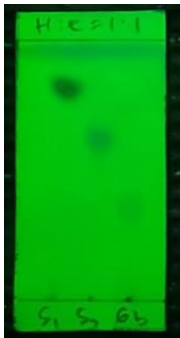

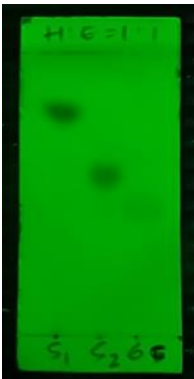

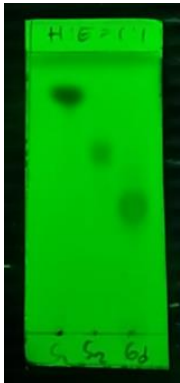
Tabel L7.d. Hasil Sintesis tahap 1 jalur 2 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dengan senyawa pemula menggunakan eluen (heksan : etil asetat = 2 : 1)

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT	Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
3A			3E		
3B			3F		
3C			3G		
3D					


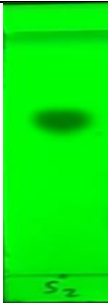
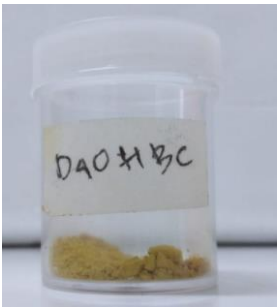
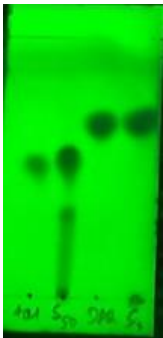
Tabel L7.e. Hasil Sintesis tahap 2 jalur 2 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dengan senyawa pemula menggunakan eluen (heksan : etil asetat = 2 : 1)

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT	Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
9A			9E		
9B			9F		
9C			9G		
9D					



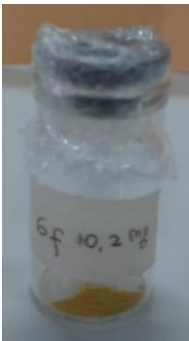
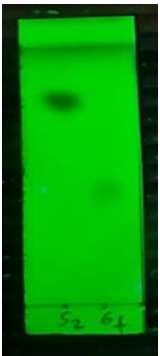
Gambar L7.f. Hasil Sintesis tahap 3 jalur 2 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dengan senyawa pemula menggunakan eluen (heksan : etil asetat = 1 : 1)

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
10A		
10B		
10C		
10D		

Tabel L7.g. Hasil Sintesis tahap 1 jalur 3 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dengan senyawa pemula menggunakan eluen (heksan : etil asetat = 2 : 1)

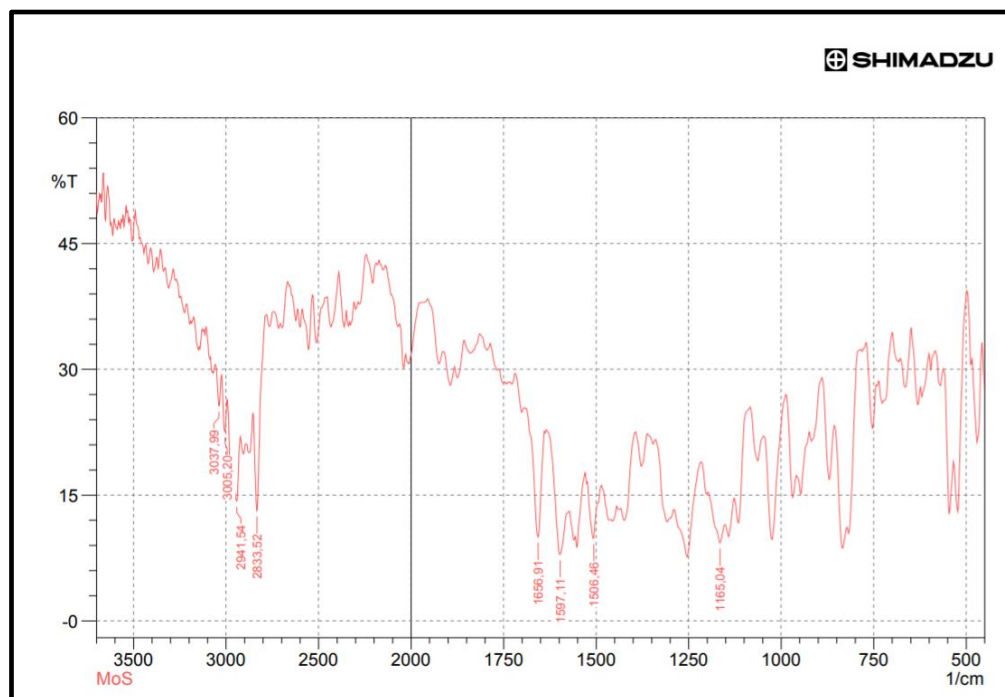
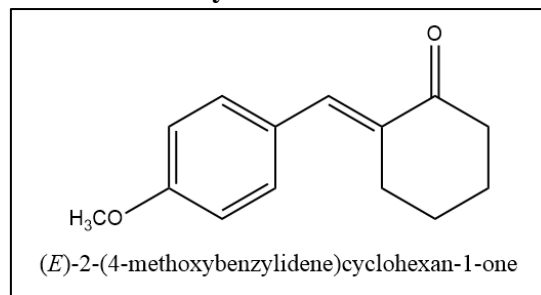
Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
5F (Siklovalon)		
5G (D4OHBS)		

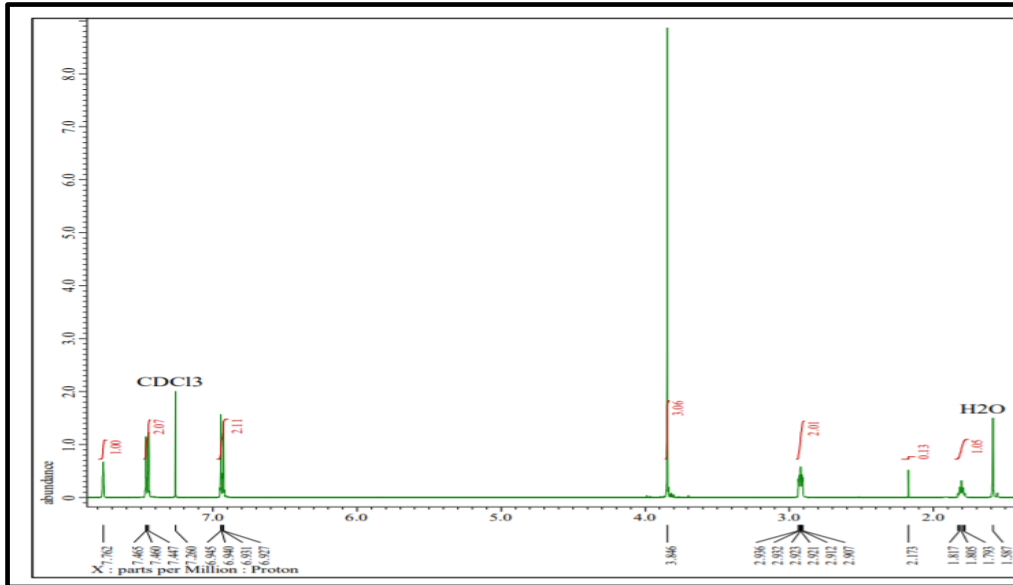
Tabel L7.h. Hasil Sintesis tahap 1 jalur 3 berupa foto produk dan perbandingan KLT hasil sintesis dengan senyawa pemula menggunakan eluen (heksan : etil asetat = 2 : 1)

Senyawa	Foto produk	Hasil KLT
10E		
10F		

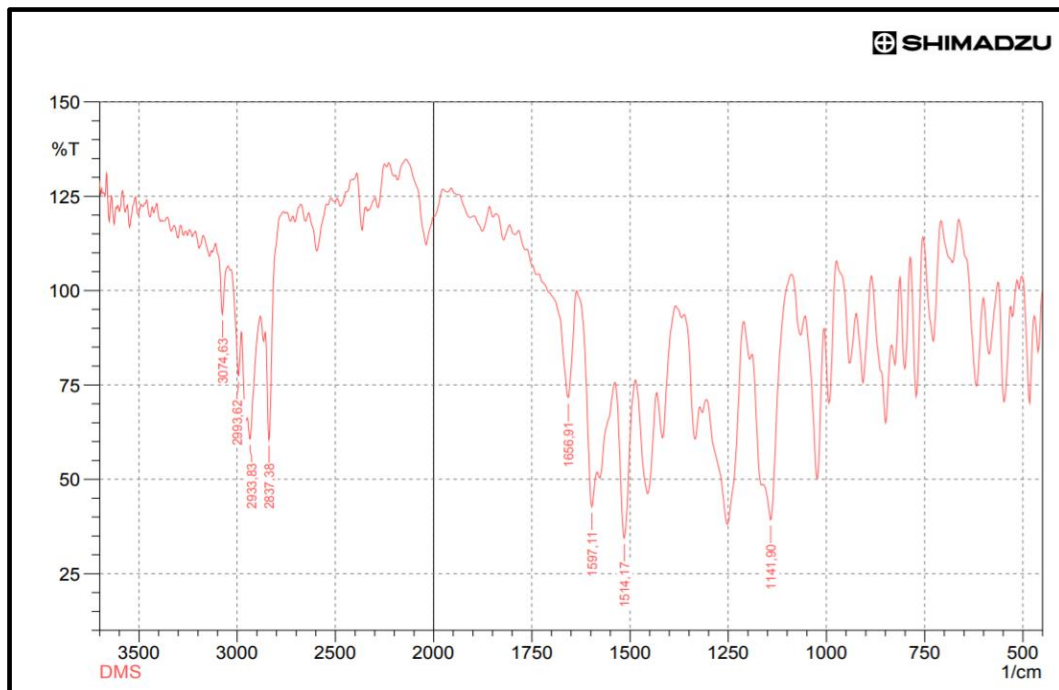
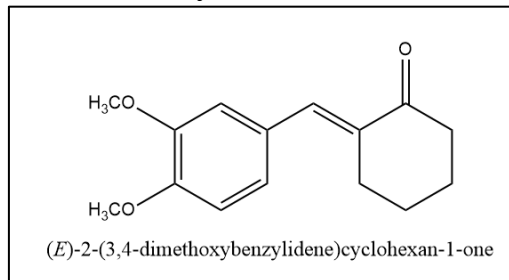
Lampiran 8. spektrum FTIR, HNMR, CNMR, MS senyawa 3E, 3F, 4E, 4F, 5G, 10A10A, 10B10B, 10C10C, 10D10D, 10E10E, 10F10F

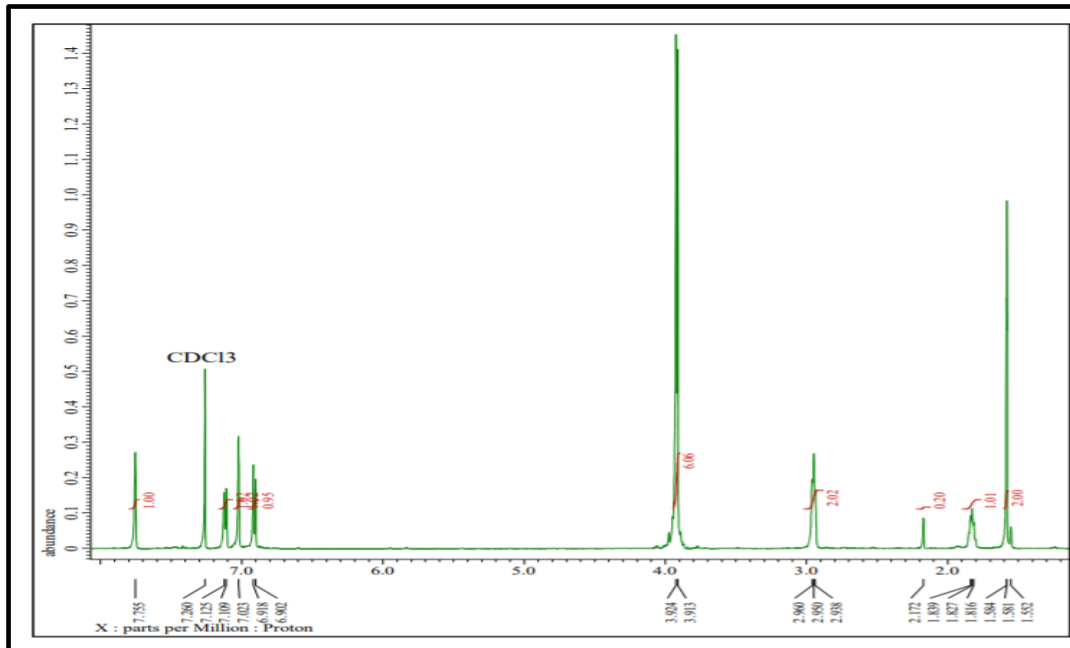
1. Data Spektrum FTIR dan HNMR Senyawa 3E



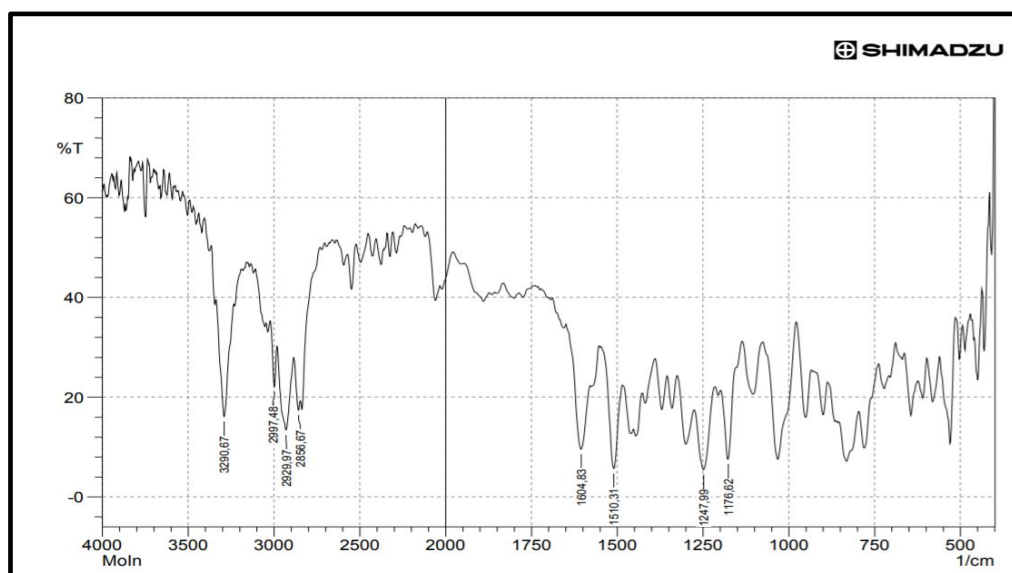
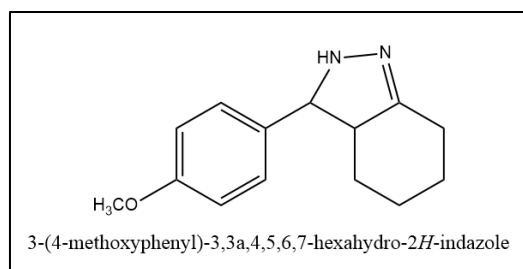


2. Data Spektrum FTIR dan HNMR Senyawa 3F

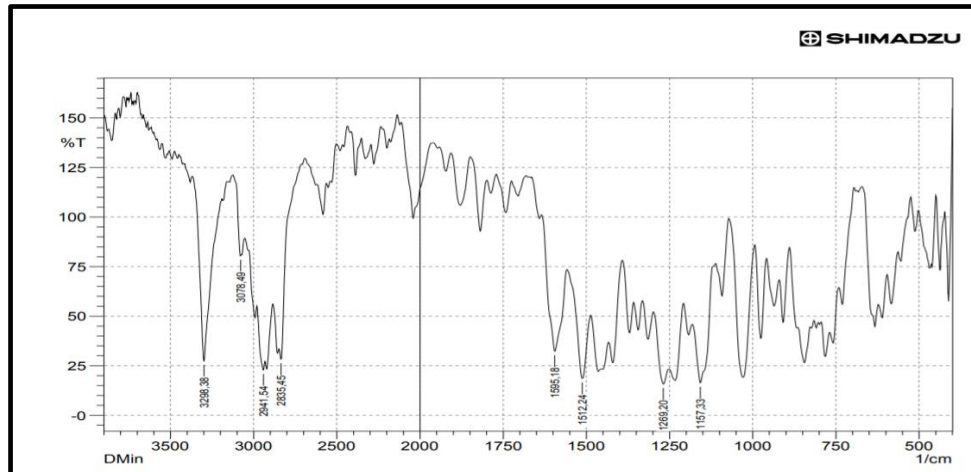
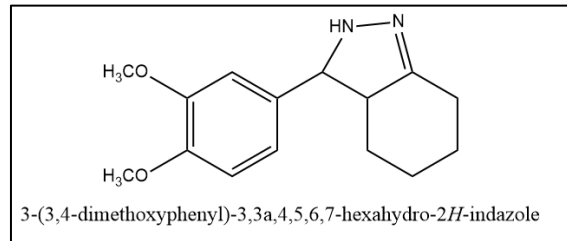




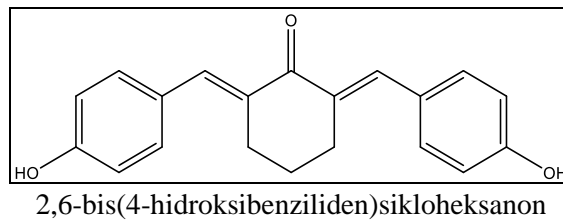
3. Data Spektrum FTIR Senyawa 4E



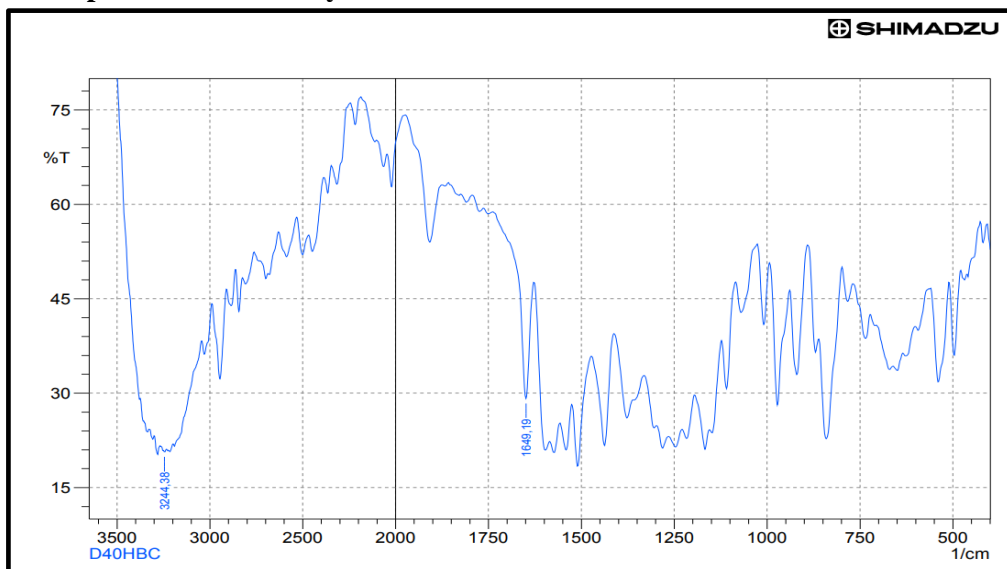
4. Data Spektrum FTIR Senyawa 4F



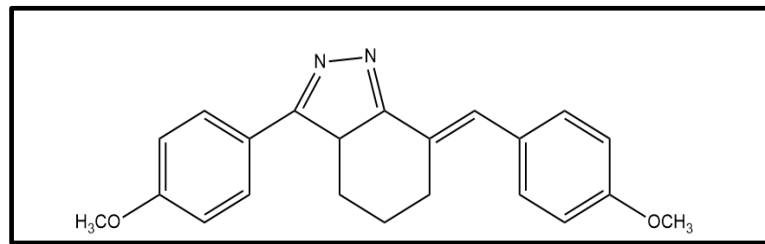
5. Data Spektrum Senyawa 5G



Data Spektrum FTIR Senyawa 5G

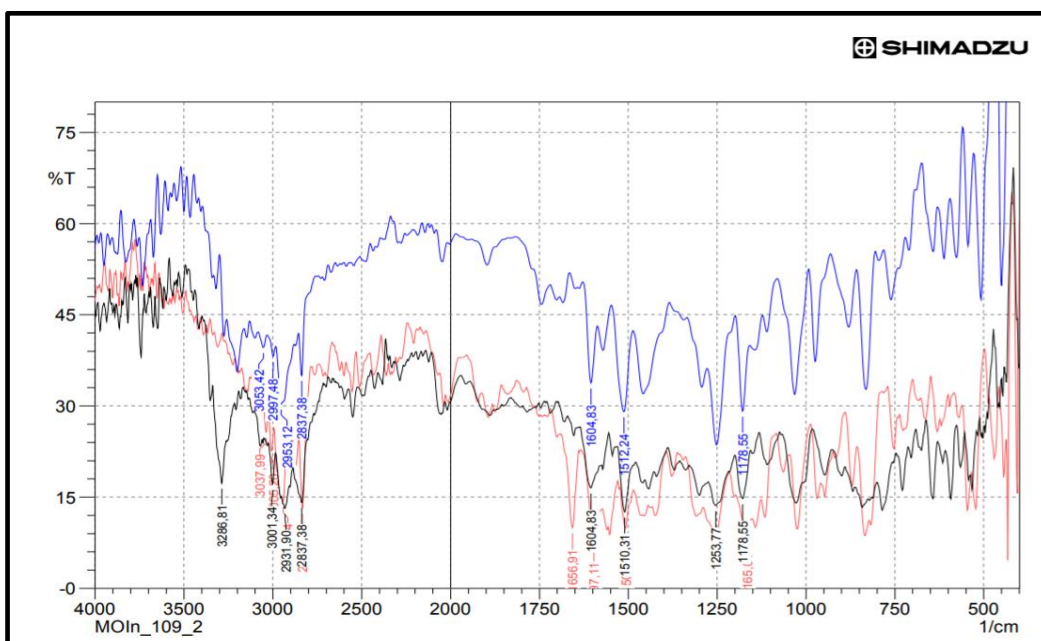
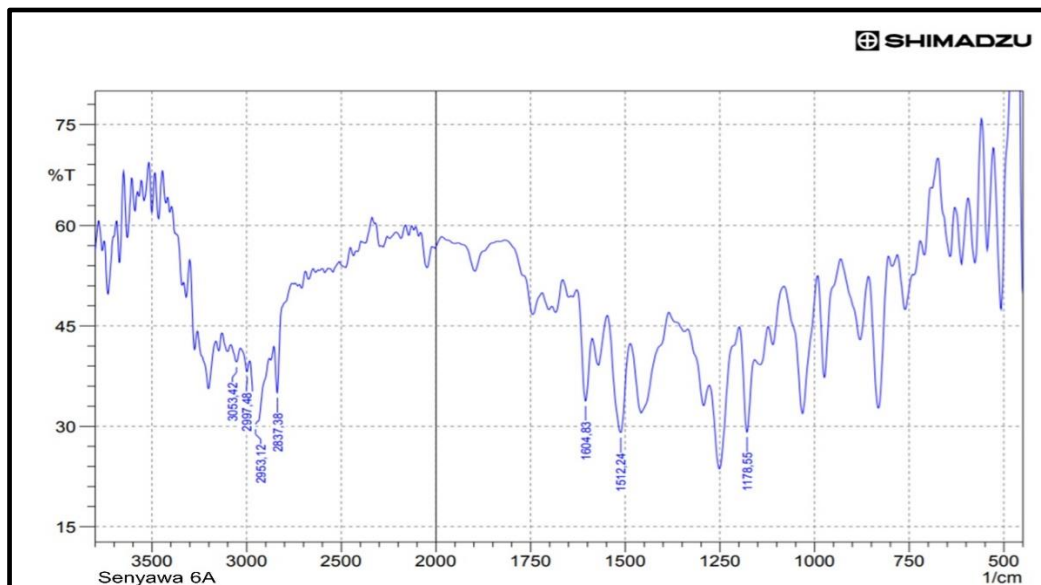


6. Data Spektrum Senyawa 10A

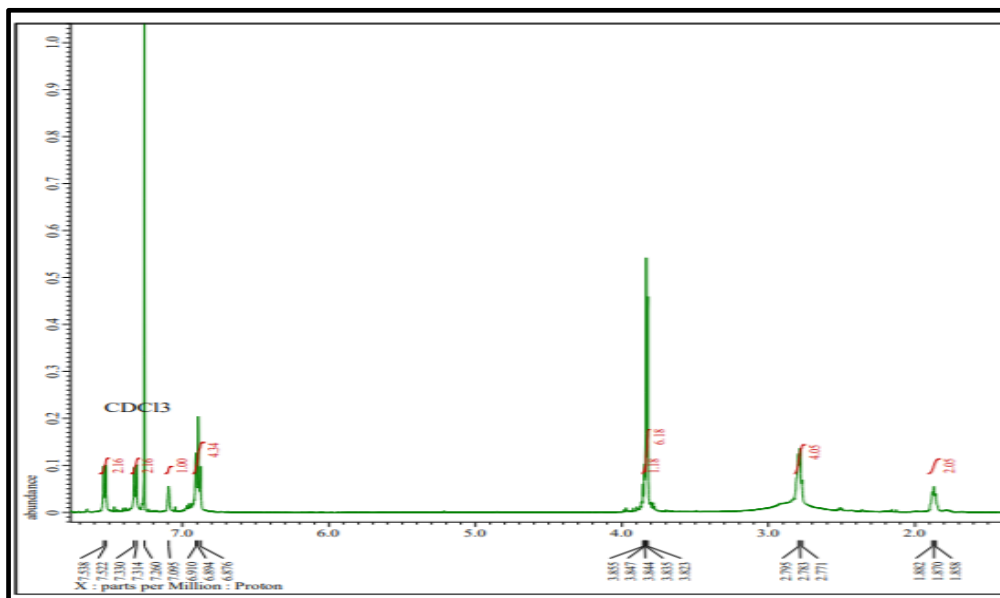


(7E)-3-(4-metoksifenil)-7-[(4-metoksifenil)metiliden]-4,5,6,7-tetrahydro-3aH-indazol

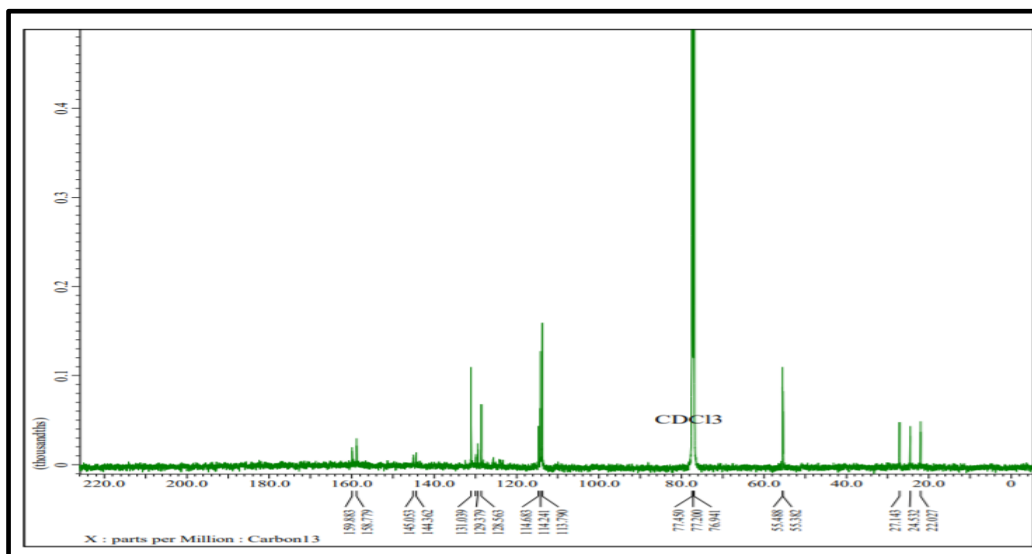
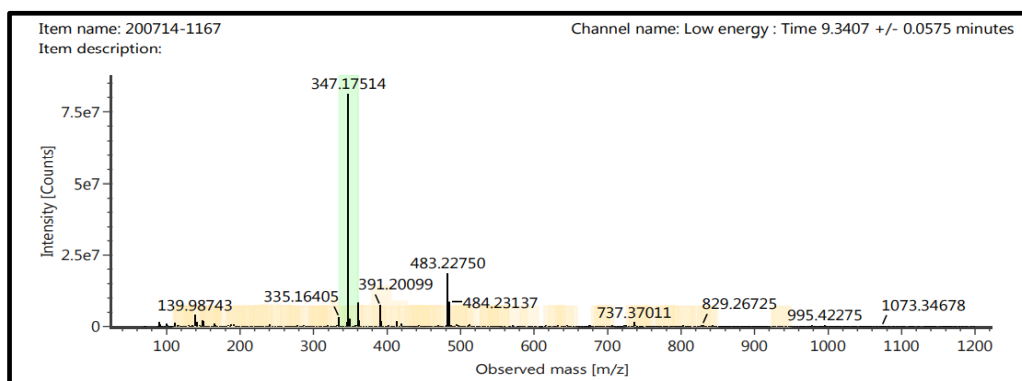
a. Spektrum FTIR {Overlay 3E (merah), 4E (hitam), 10A (Biru)}



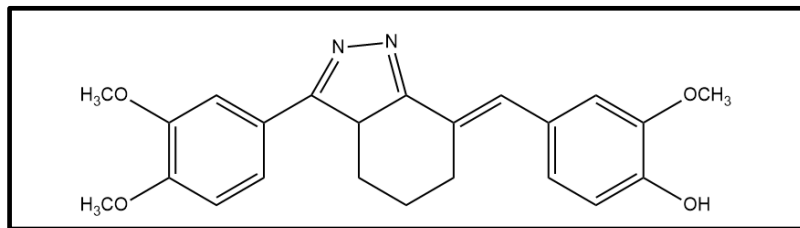
b. Spektrum HNMR senyawa 10A



c. Spektrum CNMR senyawa 10A

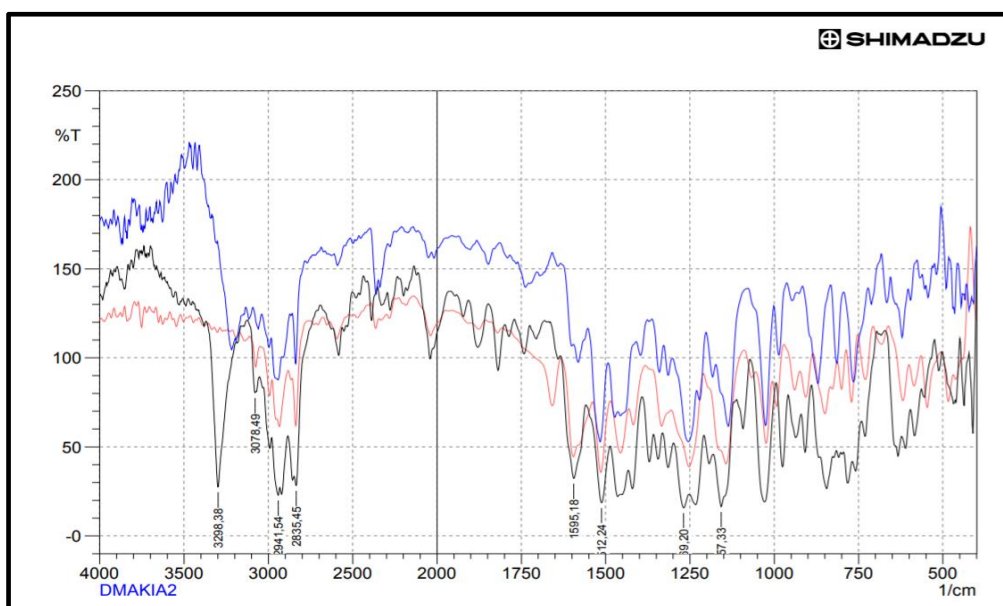
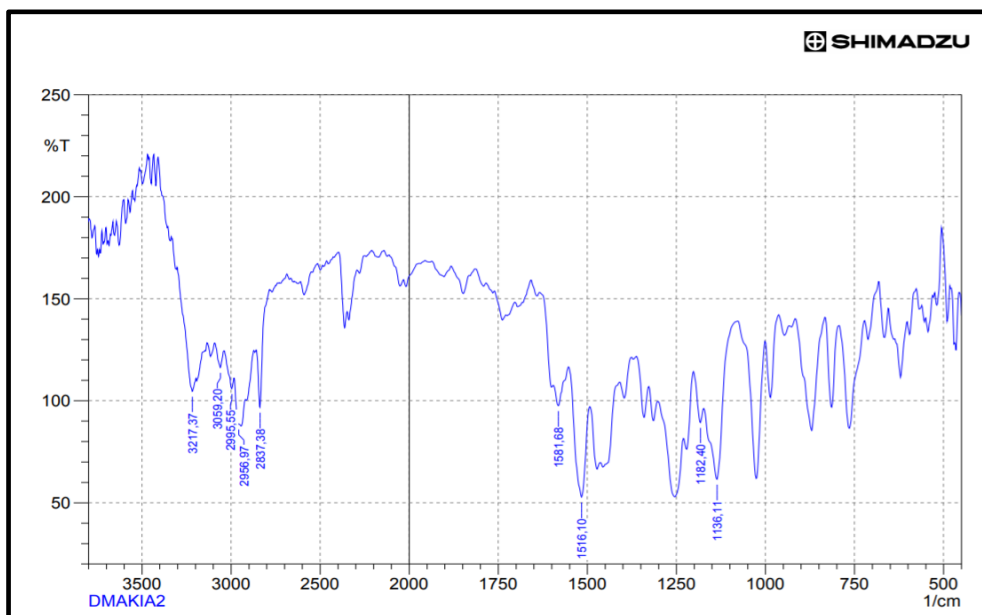
HRMS (M + H)⁺ senyawa 10A

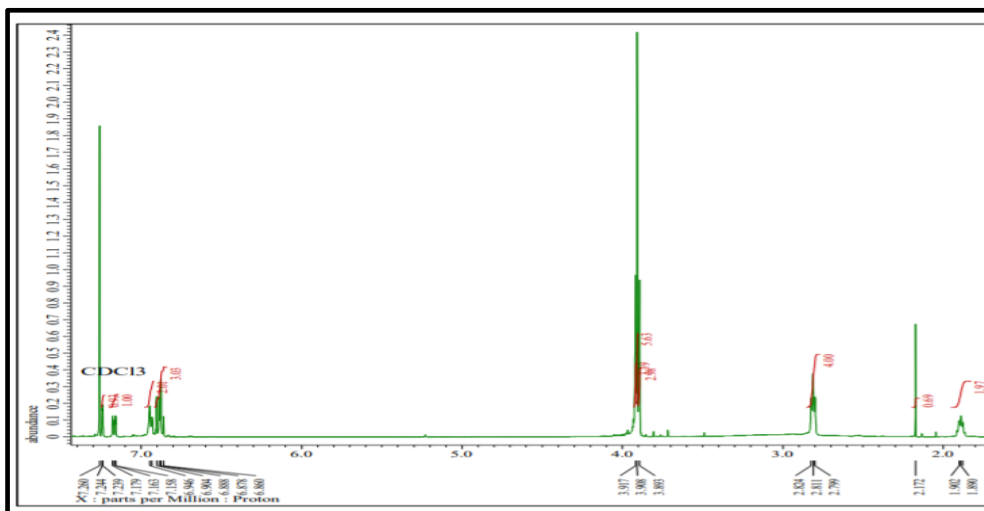
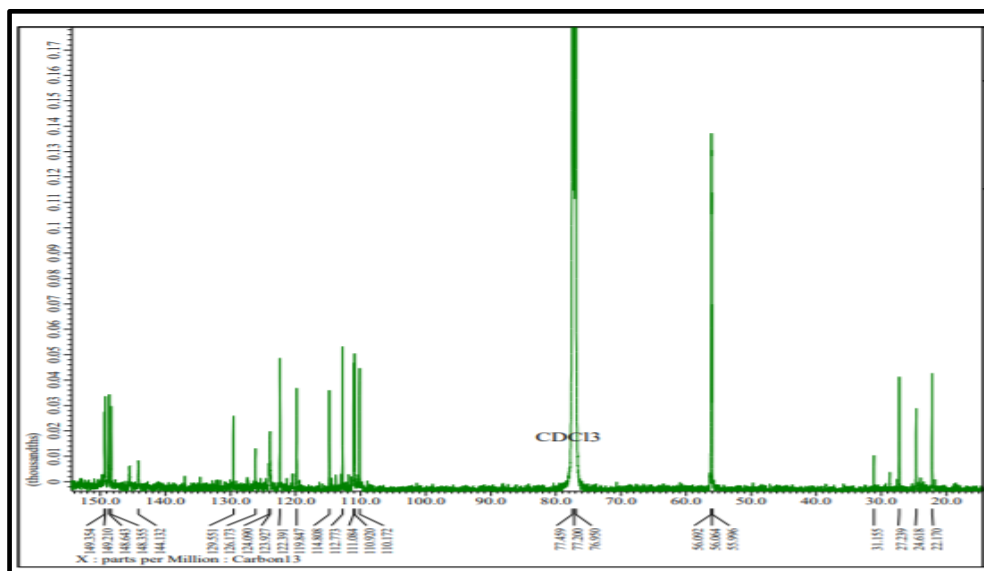
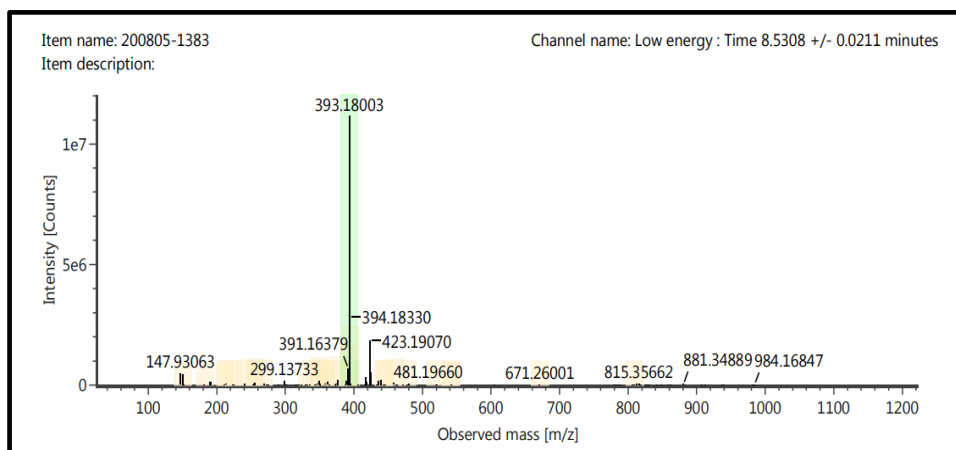
7. Data Spektrum Senyawa 10B



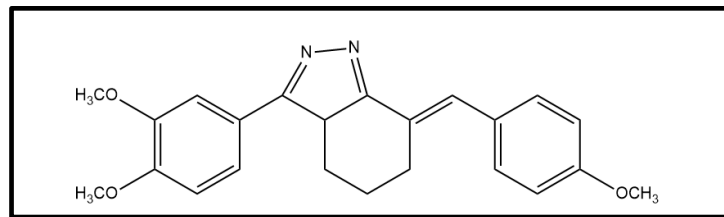
5-([(7E)-3--(3, 4-dimetoksifenil)-4,5,6,7-tetrahydro-3aH-indazol-7-iliden]metil)-2-metoksifenol

a. Data FTIR {Overlay 3f (merah), 4f (hitam), 10B (Biru)}



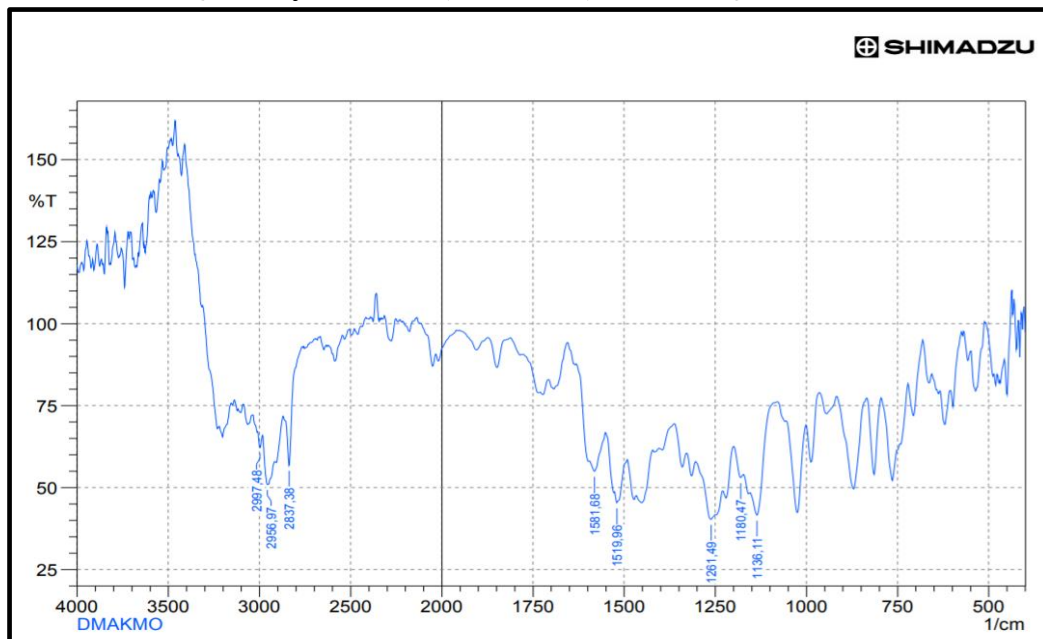
b. Spektrum HNMR senyawa 10B**c. Spektrum CNMR senyawa 10B****HRMS (M + H)⁺ senyawa 10B**

8. Data Spektrum Senyawa 10C

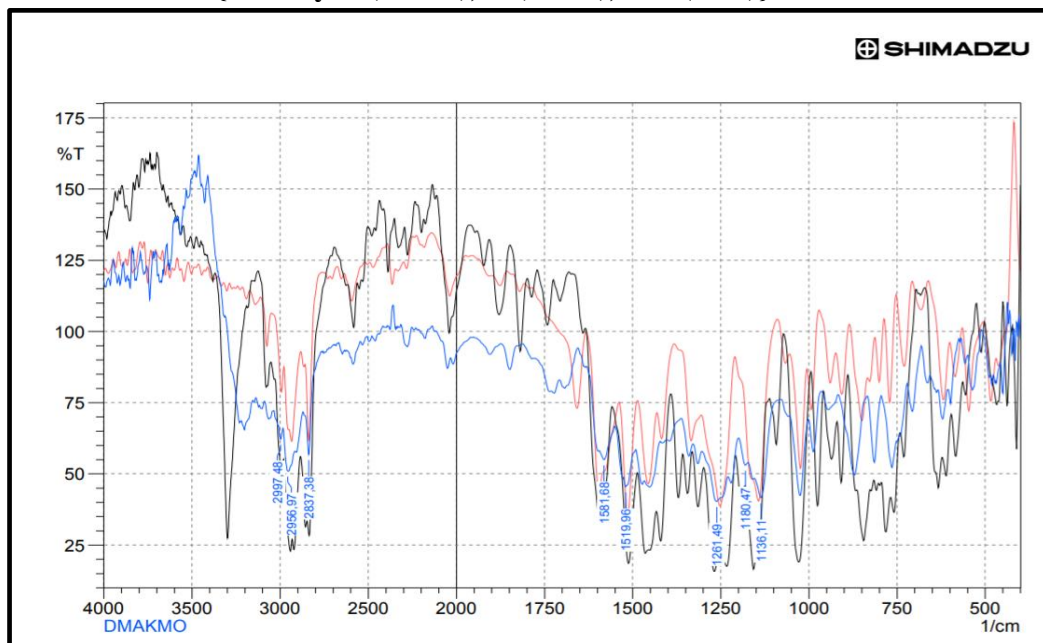


(7E)-3-(3, 4-dimetoksifenil)-7-[(4-metoksifenil)metiliden]-4,5,6,7-tetrahidro-3aH-indazol

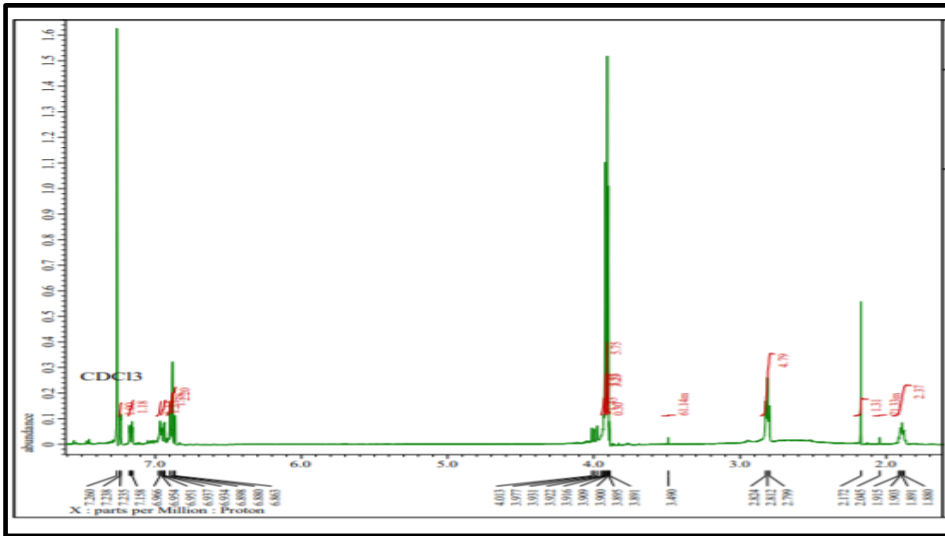
a. Data FTIR {Overlay 3f (merah), 4f (hitam), 10B (Biru)}



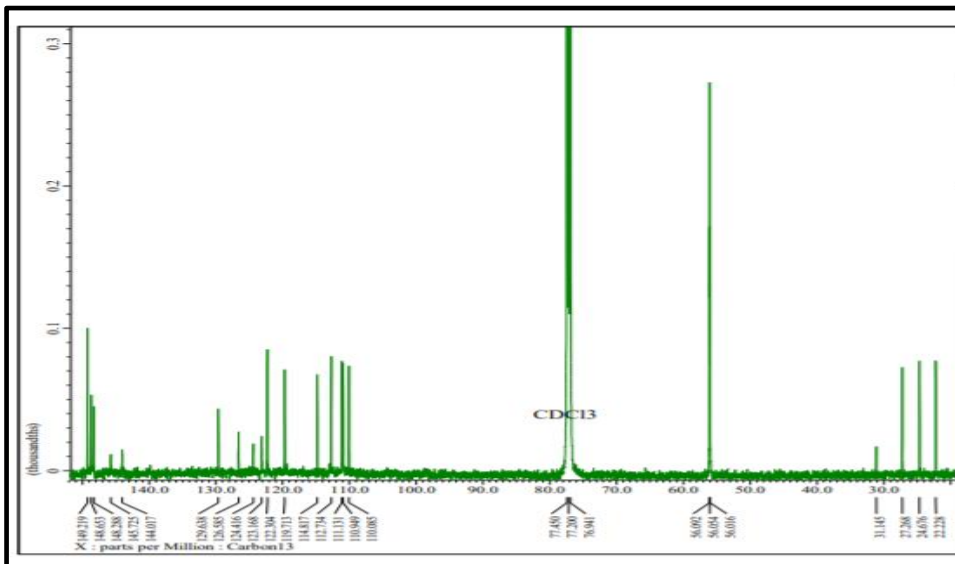
b. DATA FTIR {Overlay 3f (merah), 4f (hitam), 10C (Biru)}



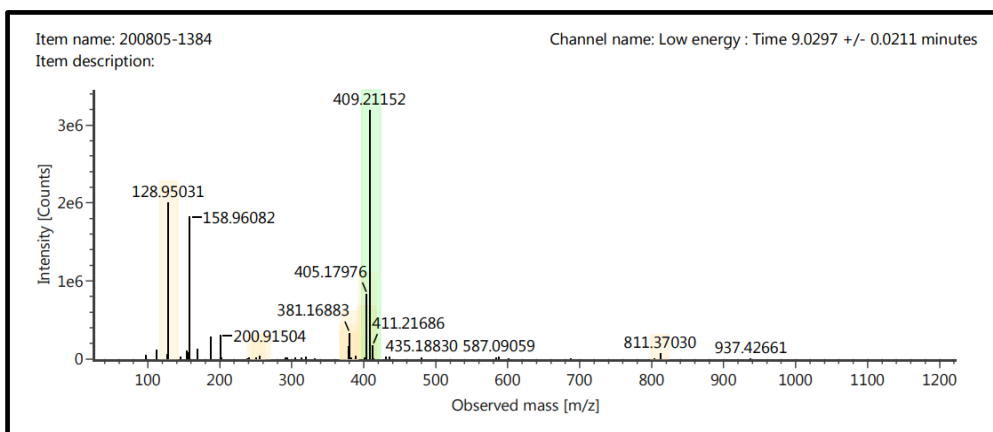
c. Spektrum HNMR senyawa 10C



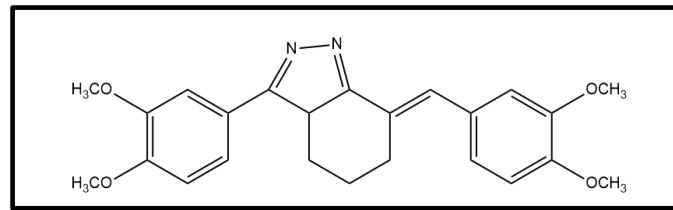
d. Spektrum CNMR senyawa 10C



e. HRMS senyawa 10C

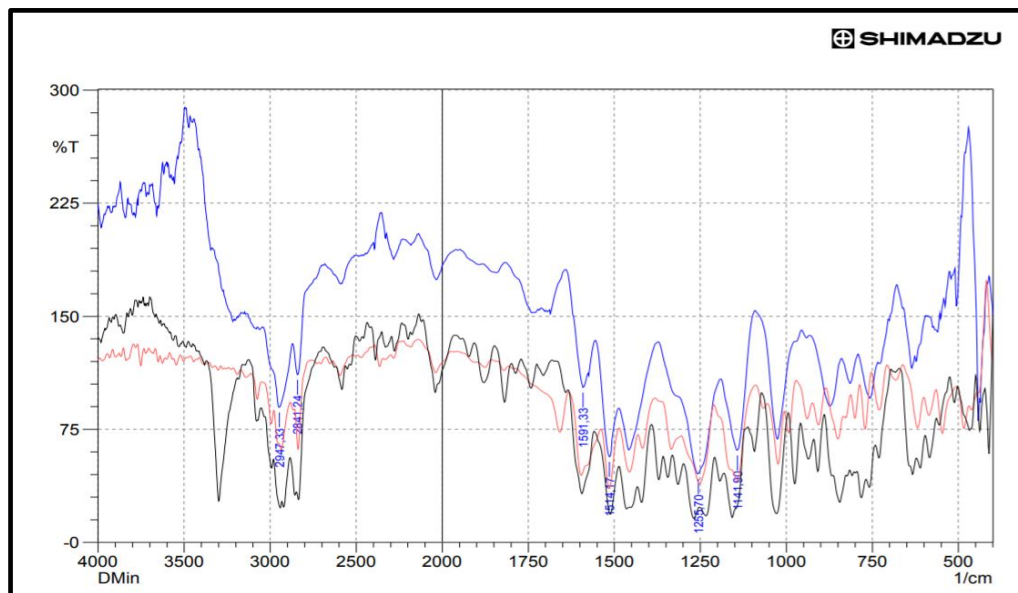
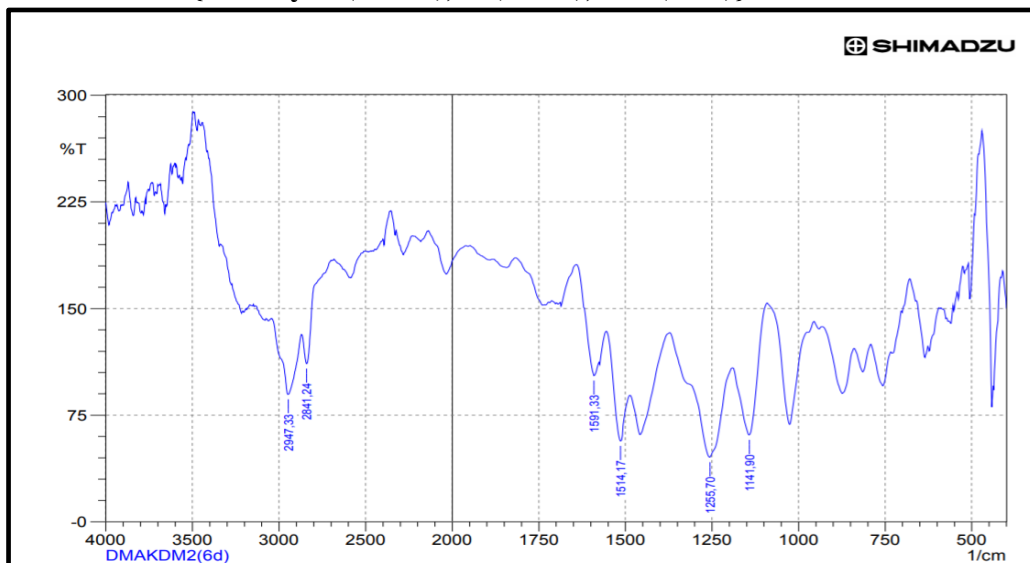


9. Data Spektrum Senyawa 10D

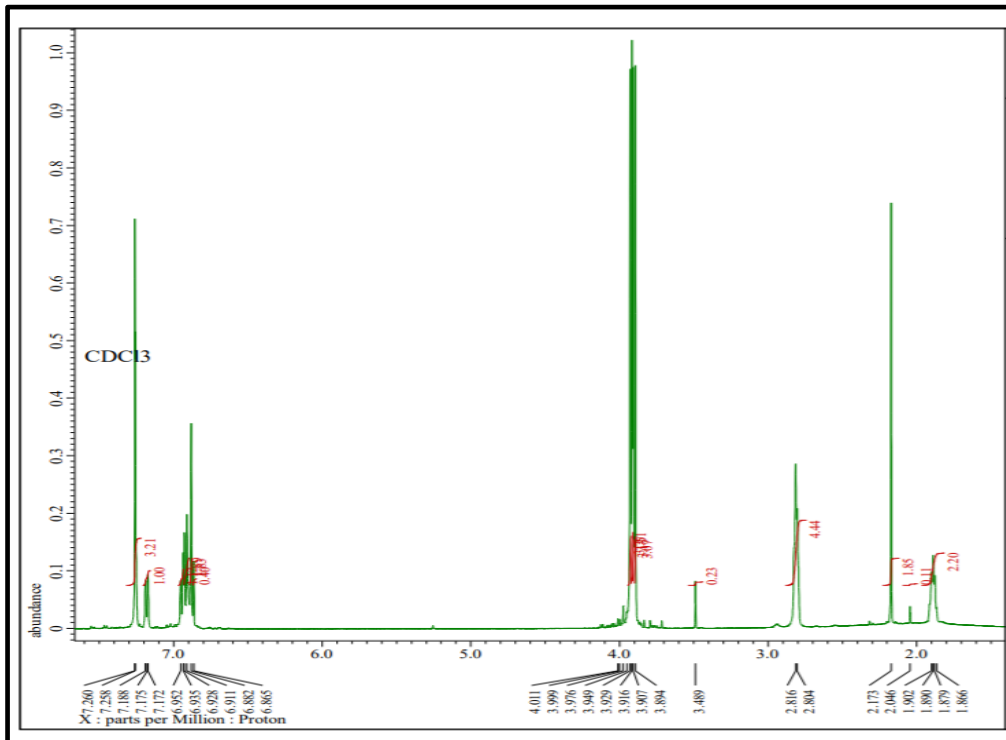


(7E)-3-(3,4-dimetoksifenil)-7-[(3,4-dimetoksifenil)metiliden]-4,5,6,7-tetrahidro-3aH-indazol

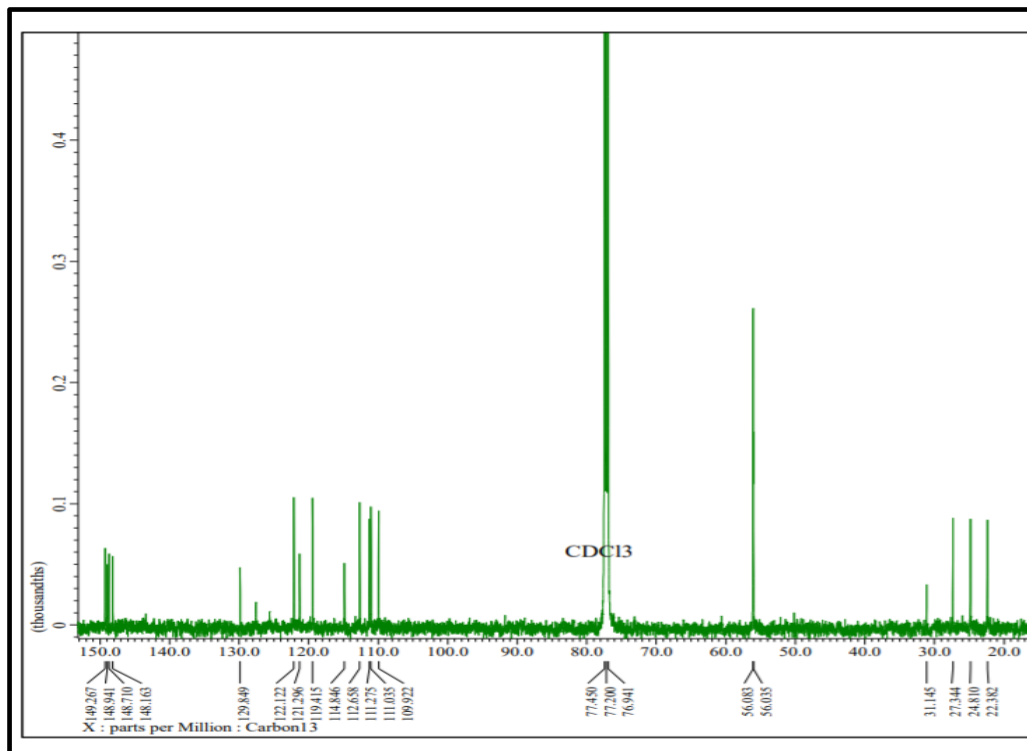
a. DATA FTIR {Overlay 3f (merah), 4f (hitam), 10D (Biru)}

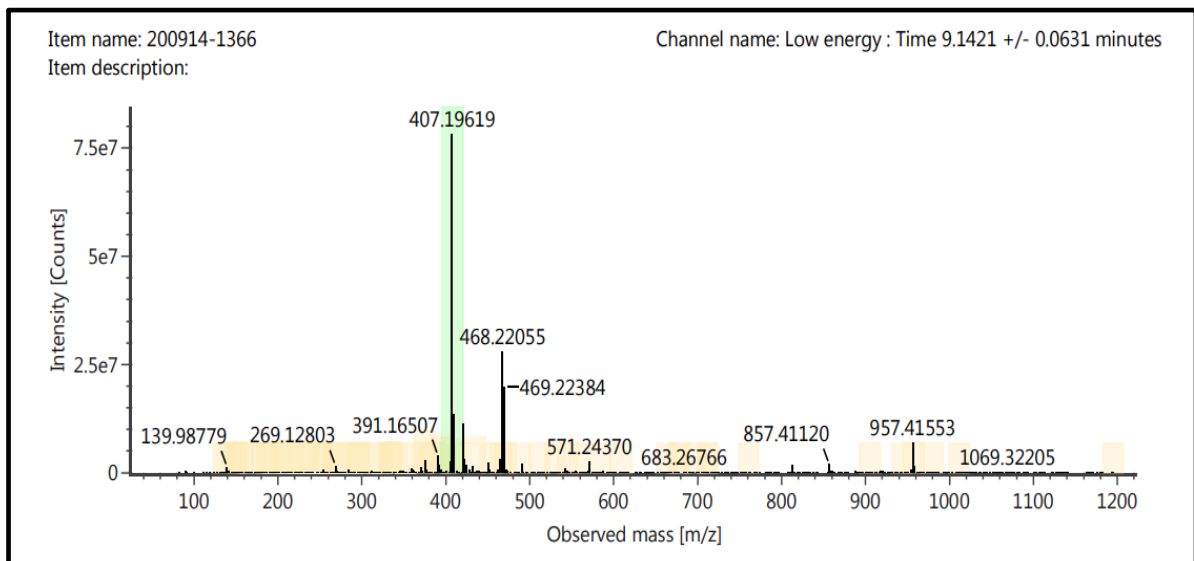


b. HNMR DMAKDM senyawa 10D

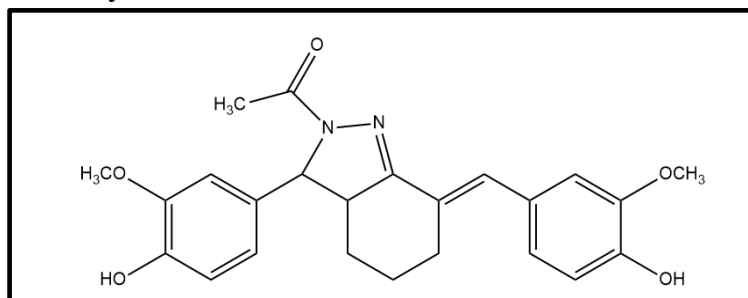


c. CNMR DMAKDM senyawa 10D



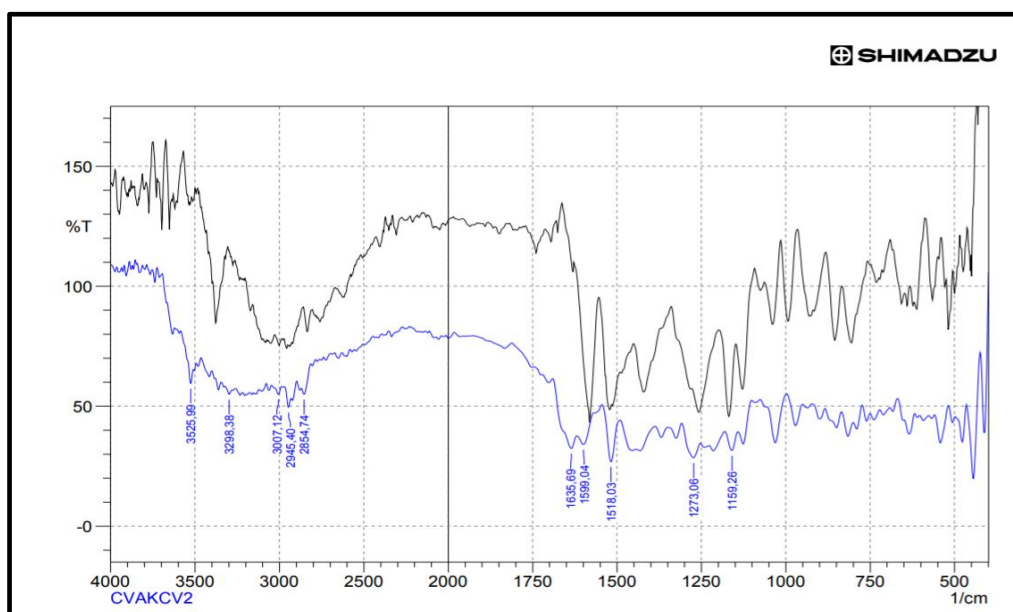
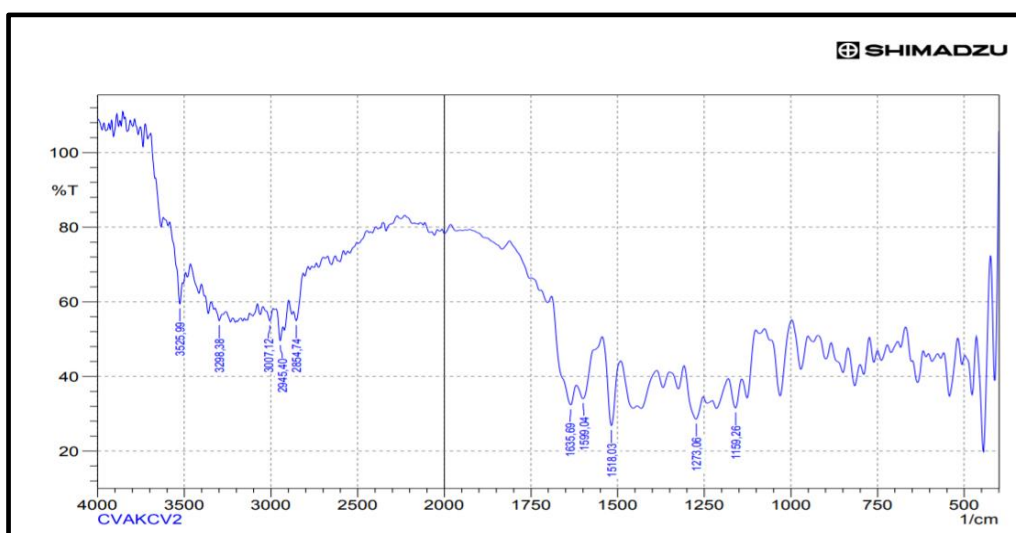
HRMS (M+H) senyawa 10D

10. Data Spektrum Senyawa 10E

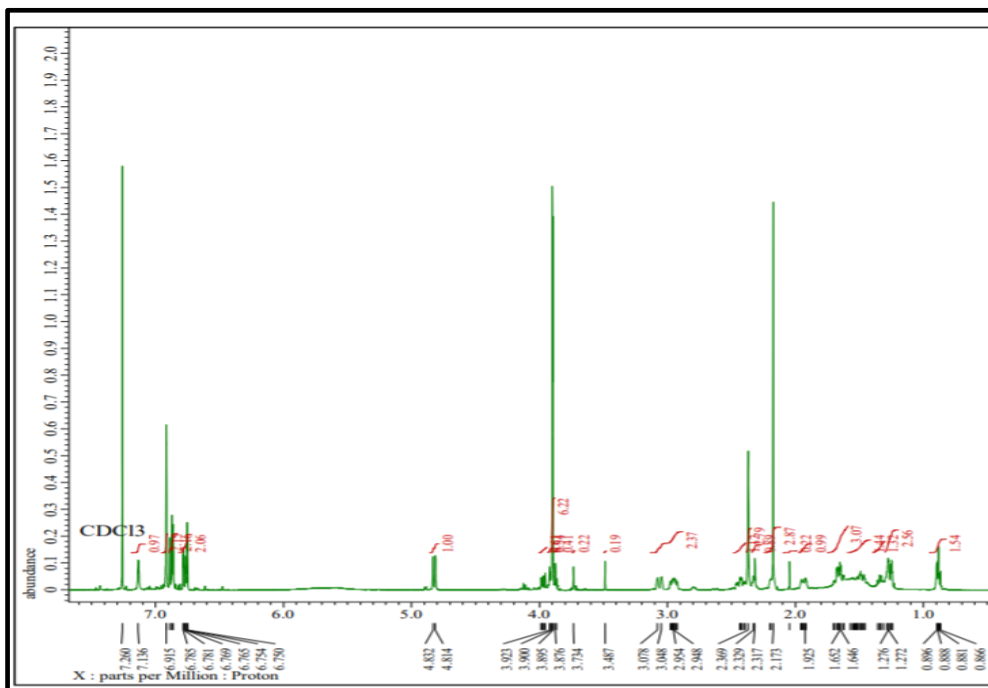


1-([(7E)-3--(4-hidroksi, 3-metoksifenil)- 7-[(4-hidroksi, 3-metoksifenil)metiliden]3, 3a, 4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-il)-etanon

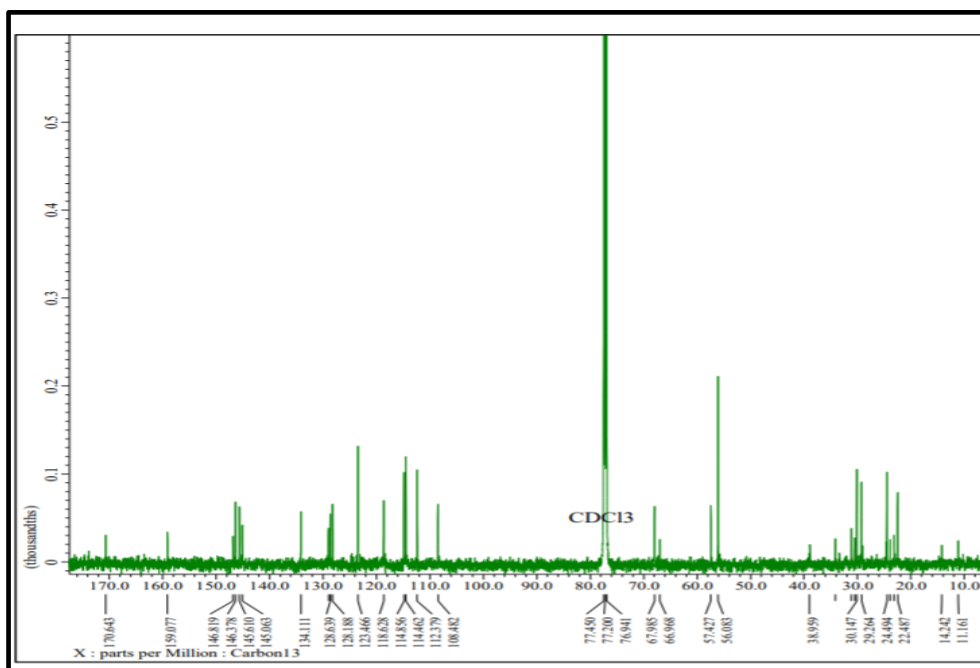
a. DATA FTIR senyawa 10E



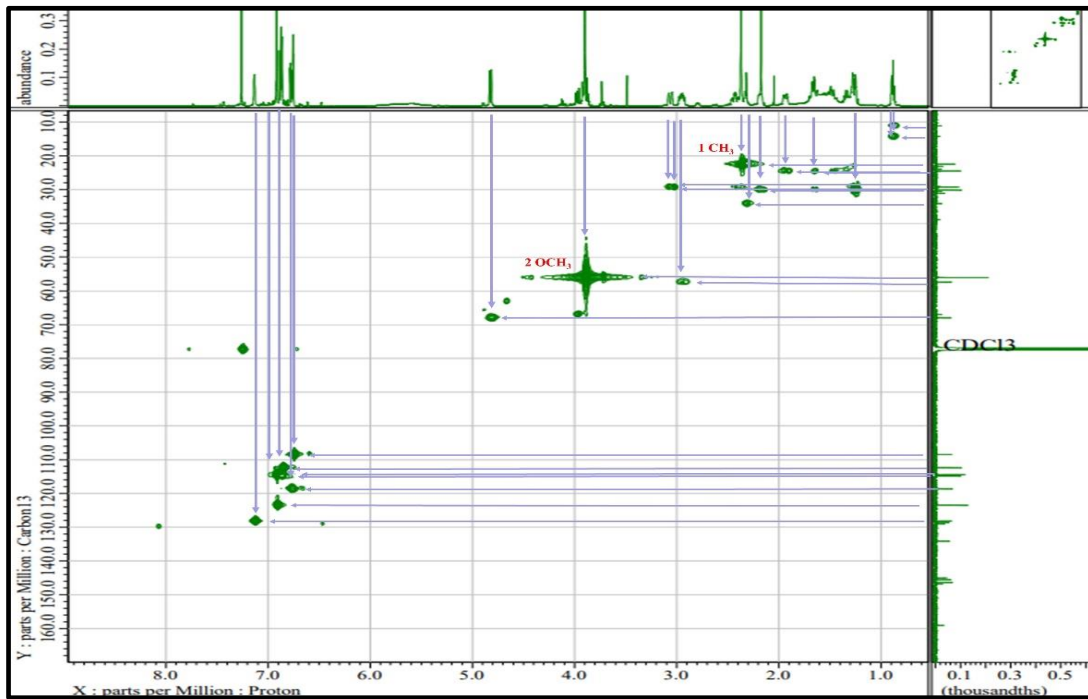
b. Spektrum HNMR senyawa 10E



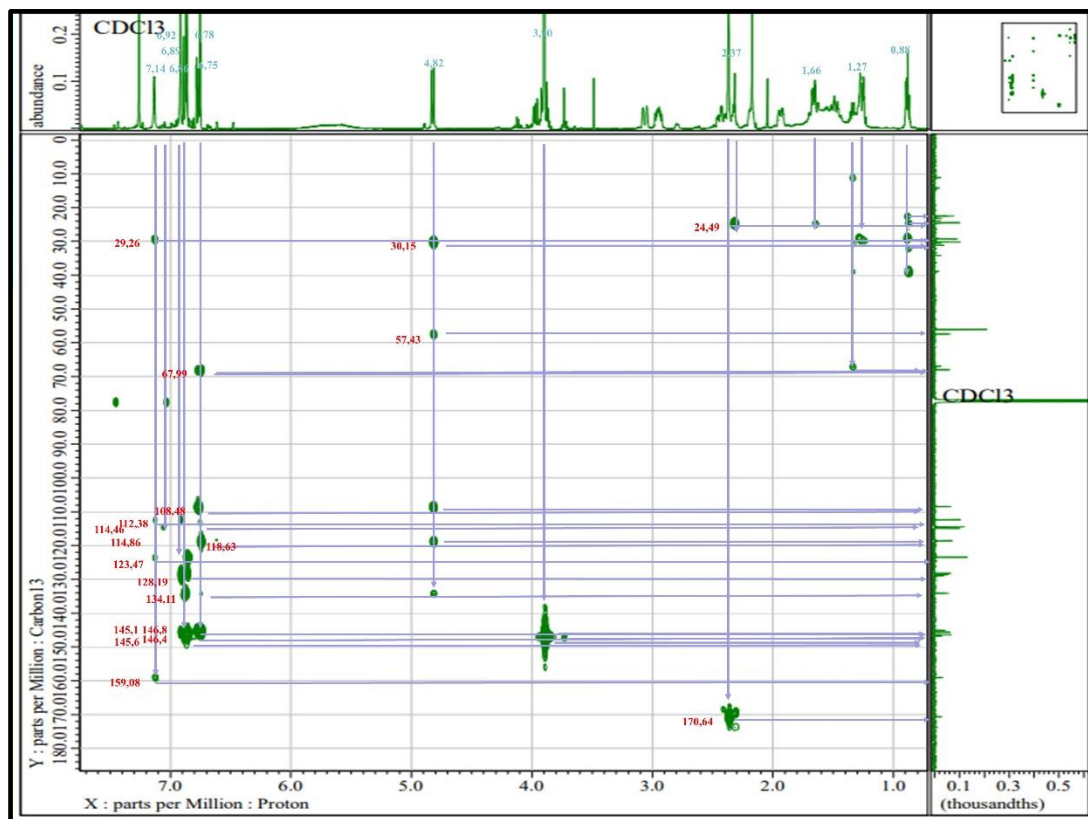
c. Spektrum CNMR senyawa 10E

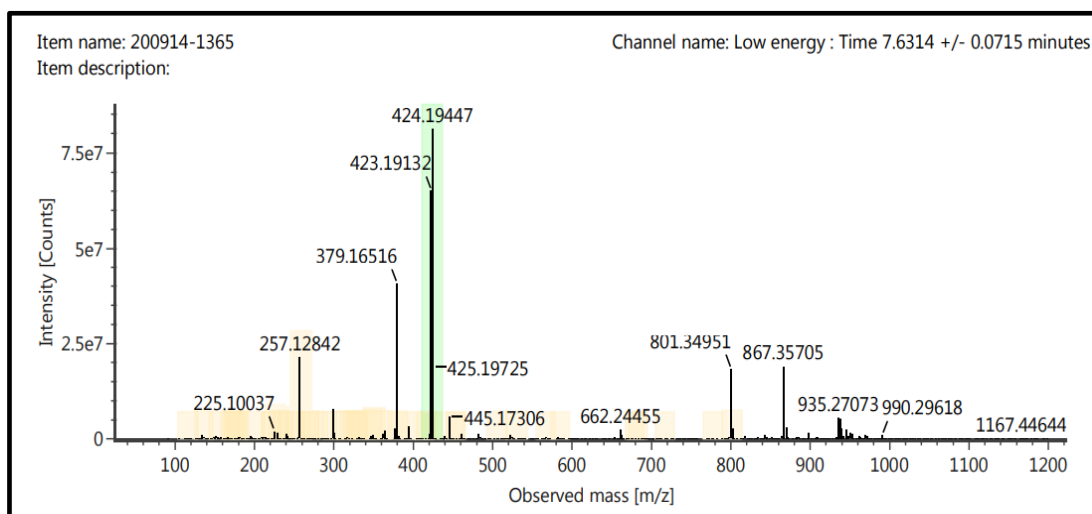


d. HMQC senyawa 10E

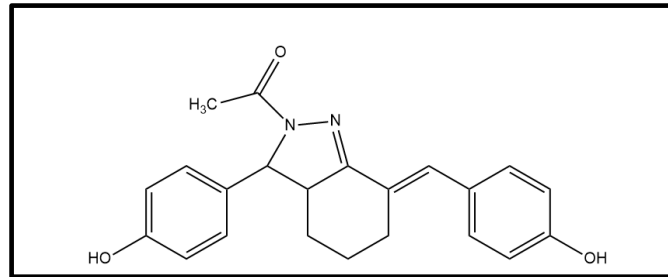


e. HMBC senyawa 10E



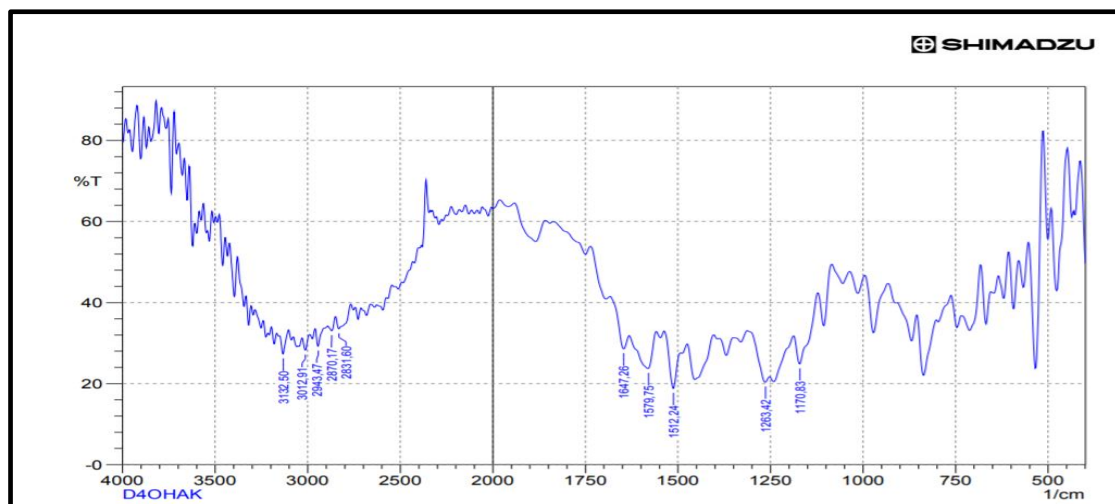
f. HRMS (M+H) senyawa 10E

11. Data Spektrum Senyawa 10F

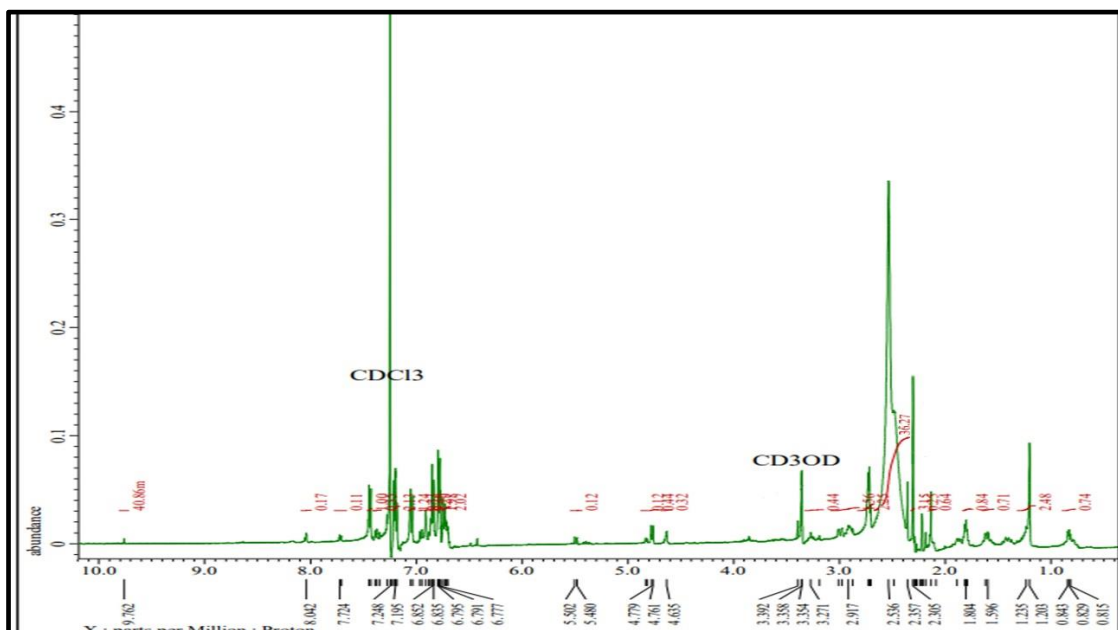


1-((7E)-3-(4-hidroksifenil)-7-[(4-hidroksi, hidroksiyfenil)metiliden]3, 3a, 4,5,6,7-heksahidro-2H-indazol-2-yl)-etan-1-one

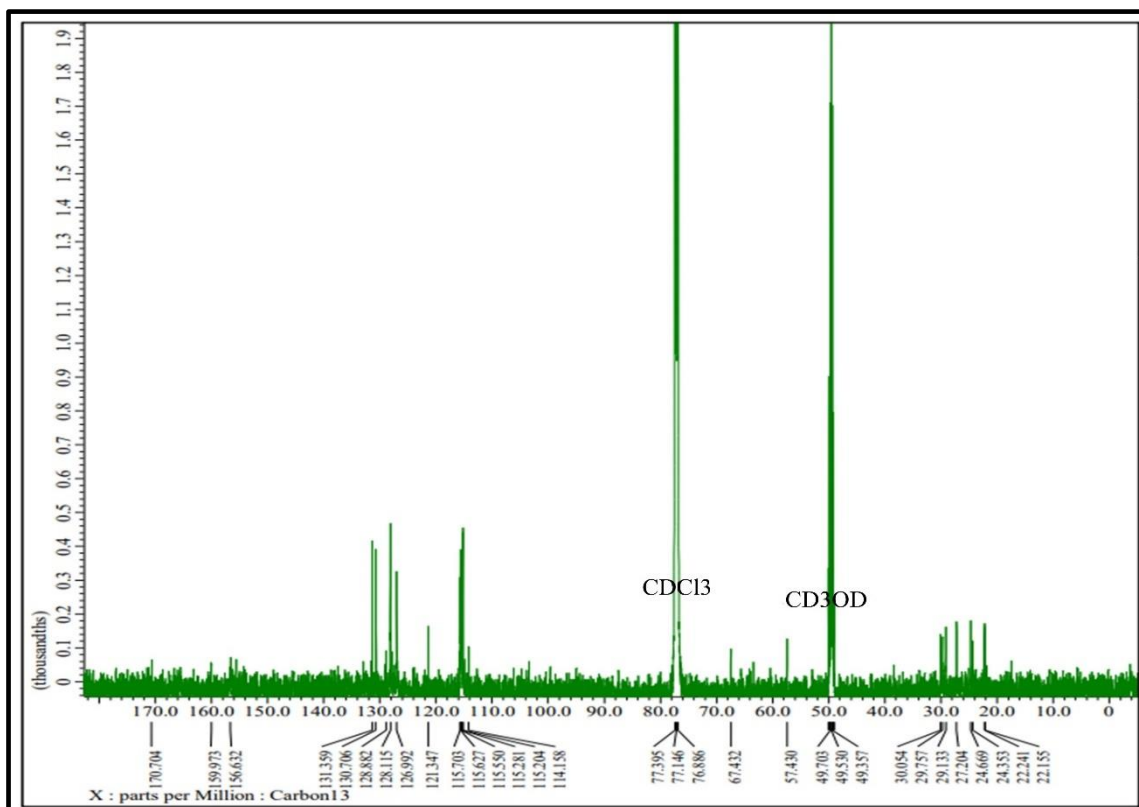
a. DATA FTIR senyawa 10F



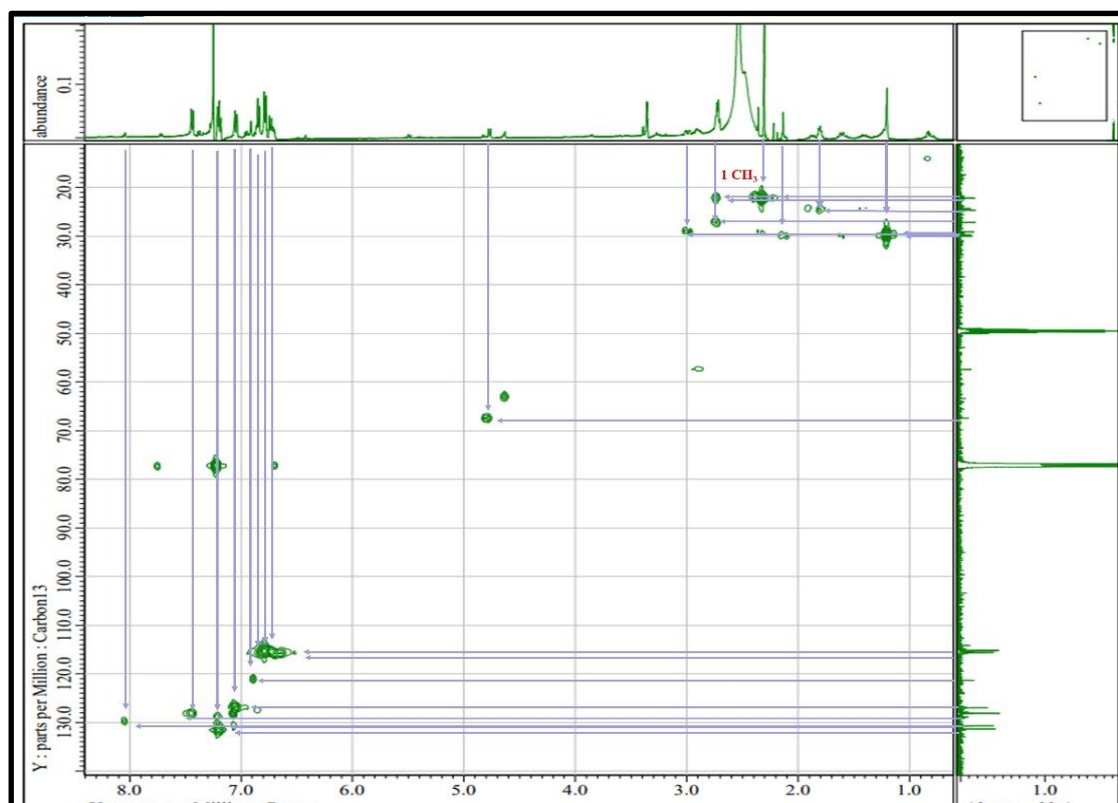
b. HNMR Senyawa 10F



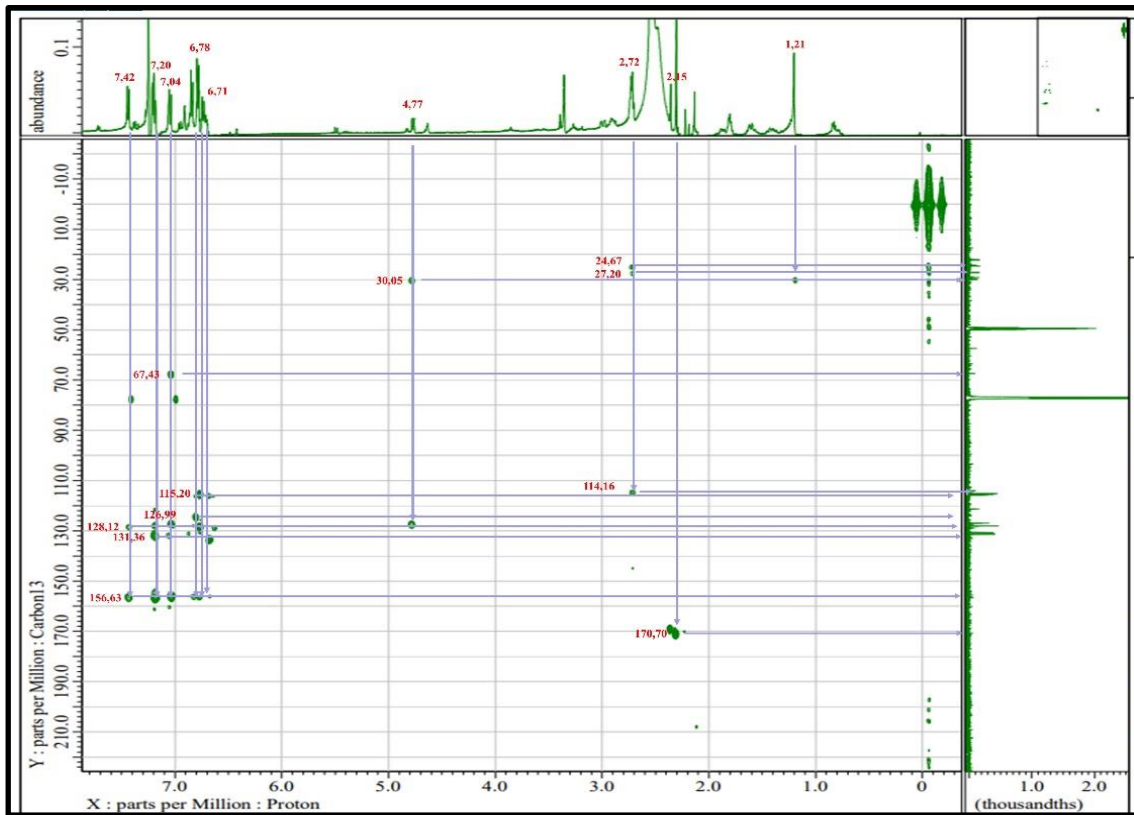
c. CNMR Senyawa 10F



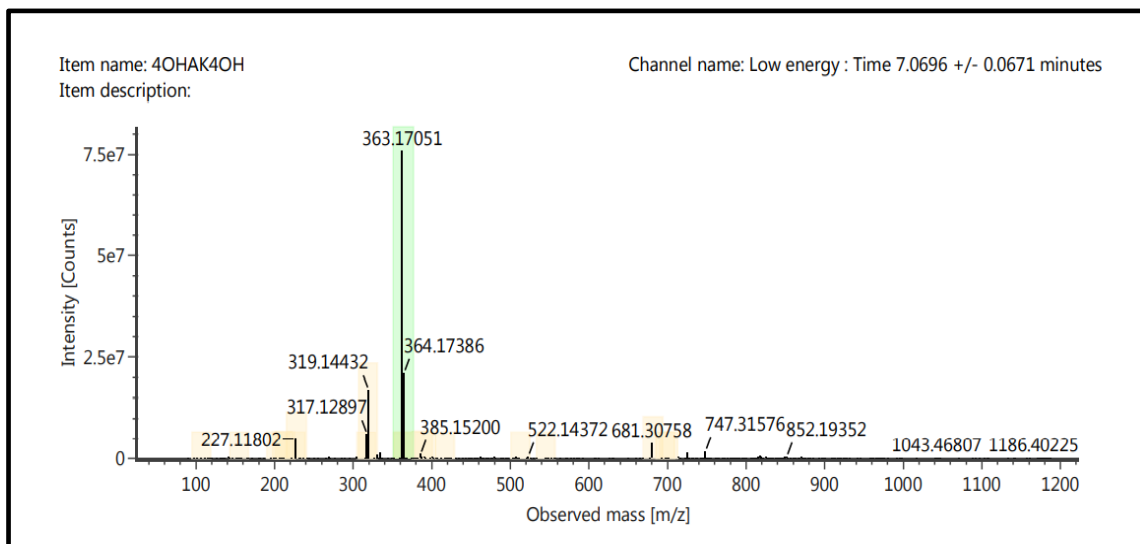
d. HMQC senyawa 10F



e. HMBC senyawa 10F



f. HRMS (M+H) senyawa 10F



Lampiran 9. Perhitungan Rendemen Senyawa AKI (10A – 10F)a) Senyawa **10A**

- Massa **10A** *crude* yang diperoleh = 132 mg
- Massa **10A** yang seharusnya diperoleh = 173 mg
- Massa **10A** murni yang diperoleh = 106 mg
- *Yield 10A crude* = $\frac{122 \text{ mg}}{173 \text{ mg}} \times 100\% = 70,5\%$
- *Yield 10A* murni = $\frac{106 \text{ mg}}{173 \text{ mg}} \times 100\% = 61,2\%$

b) Senyawa **10B**

- Massa **10B** *crude* yang diperoleh = 110 mg
- Massa **10B** yang seharusnya diperoleh = 196 mg
- Massa **10B** murni yang diperoleh = 69 mg
- *Yield 10B crude* = $\frac{110 \text{ mg}}{196 \text{ mg}} \times 100\% = 56,1\%$
- *Yield 10B* murni = $\frac{69 \text{ mg}}{196 \text{ g}} \times 100\% = 35,2\%$

c) Senyawa **10C**

- Massa **10C** *crude* yang diperoleh = 152 mg
- Massa **10C** yang seharusnya diperoleh = 188 mg
- Massa **10C** murni yang diperoleh = 140 mg
- *Yield 10C crude* = $\frac{152 \text{ mg}}{188 \text{ mg}} \times 100\% = 80,8\%$
- *Yield 10C* murni = $\frac{140 \text{ mg}}{188 \text{ mg}} \times 100\% = 74,3 \%$

d) Senyawa **10D**

- Massa **10D** *crude* yang diperoleh = 136 mg
- Massa **10D** yang seharusnya diperoleh = 203 mg
- Massa **10D** murni yang diperoleh = 114 g
- *Yield 10D crude* = $\frac{1,13 \text{ g}}{1,69 \text{ g}} \times 100\% = 66,9\%$
- *Yield 10D* murni = $\frac{114 \text{ mg}}{203 \text{ mg}} \times 100\% = 56,1 \%$

e) Senyawa **10E**

- Massa **10E** *crude* yang diperoleh = 211 mg
- Massa **10E** yang seharusnya diperoleh = 211 mg

– Massa **5e** murni yang diperoleh = 50 mg

– *Yield 5e crude* = $\frac{120 \text{ mg}}{211 \text{ mg}} \times 100\% = 56,6\%$

– *Yield 5e* murni = $\frac{50 \text{ mg}}{211 \text{ mg}} \times 100\% = 23,7 \%$

f) Senyawa **10F**

– Massa **5f** *crude* yang diperoleh = 129 mg

– Massa **5f** yang seharusnya diperoleh = 181 mg

– Massa **5f** murni yang diperoleh = 76 mg

– *Yield 5f crude* = $\frac{129 \text{ mg}}{181 \text{ mg}} \times 100\% = 71,0\%$

– *Yield 5f* murni = $\frac{0,78 \text{ g}}{181 \text{ mg}} \times 100\% = 42,2\%$

Lampiran 10. Data perhitungan penentuan IC₅₀

Tabel L10 a Data perhitungan penentuan IC₅₀ senyawa 10A – 10F, kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel kanker MCF-

7

Senyawa	kons (µg/mL)	kons (nM)	logC	Absorbansi			% Viabilitas						% Inhibisi				IC ₅₀ (nM)
				A1	A2	A3	V1	V2	V3	rata-rata	SD	I1	I2	I3	rata-rata	SD	
10A	6,250	18,055	1,257	0,986	1,050	1,044	85,458	91,833	91,235	89,509	3,521	14,542	8,167	8,765	10,491	3,521	224,1
	12,500	36,110	1,558	1,037	1,036	92,530	90,538	90,438	91,169	1,180	7,470	9,462	9,562	8,831	1,180		
	25,000	72,219	1,859	0,888	0,958	75,697	78,486	82,669	78,951	3,509	24,303	21,514	17,331	21,049	3,509		
	50,000	144,439	2,160	0,860	0,843	72,908	71,215	78,685	74,270	3,917	27,092	28,785	21,315	25,730	3,917		
	100,000	288,877	2,461	0,615	0,637	48,506	50,697	42,331	47,178	4,338	51,494	49,303	57,669	52,822	4,338		
200,000	577,754	2,762	0,310	0,334	18,127	20,518	17,629	18,758	1,544	81,873	79,482	82,371	81,242	1,544			
10B	6,250	15,937	1,202	0,989	0,923	1,023	85,757	79,183	89,143	84,695	5,064	14,243	20,817	10,857	15,305	5,064	45,97
	12,500	31,874	1,503	0,755	0,884	62,450	75,299	71,414	69,721	6,590	37,550	24,701	28,586	30,279	6,590		
	25,000	63,747	1,804	0,772	0,728	64,143	63,645	59,761	62,517	2,399	35,857	36,355	40,239	37,483	2,399		
	50,000	127,494	2,105	0,727	0,683	59,661	55,279	46,614	53,851	6,640	40,339	44,721	53,386	46,149	6,640		
	100,000	254,989	2,407	0,637	0,617	50,697	48,705	47,510	48,971	1,610	49,303	51,295	52,490	51,029	1,610		
200,000	509,978	2,708	0,605	0,707	47,510	57,669	52,988	52,722	5,085	52,490	42,331	47,012	47,278	5,085			
10C	6,250	16,614	1,220	0,779	0,835	0,741	64,841	70,418	61,056	65,438	4,710	35,159	29,582	38,944	34,562	4,710	86,24
	12,500	33,229	1,522	0,781	0,747	0,803	65,040	61,653	67,231	64,641	2,810	34,960	38,347	32,769	35,559	2,810	
	25,000	66,458	1,823	0,673	0,643	0,595	54,283	51,295	46,514	50,697	3,919	45,717	48,705	53,486	49,303	3,919	
	50,000	132,915	2,124	0,665	0,589	0,644	53,486	45,916	51,394	50,266	3,909	46,514	54,084	48,606	49,734	3,909	
	100,000	265,831	2,425	0,559	0,585	0,582	42,928	45,518	45,219	44,555	1,417	57,072	54,482	54,781	55,445	1,417	
200,000	531,662	2,726	0,521	0,534	0,53	39,143	40,438	40,040	39,874	0,663	60,857	59,562	59,960	60,126	0,663		

Tabel L10 a . Lanjutan

10D	6,250	15,387	1,187	0,957	0,913	0,972	83,082	78,651	84,592	82,108	3,088	16,918	21,349	15,408	17,892	3,088
	12,500	30,774	1,488	0,875	0,811	0,839	74,824	68,379	71,198	71,467	3,231	25,176	31,621	28,802	28,533	3,231
	25,000	61,548	1,789	0,659	0,699	0,677	53,072	57,100	54,884	55,018	2,017	46,928	42,900	45,116	44,982	2,017
	50,000	123,095	2,090	0,648	0,625	0,639	51,964	49,648	51,057	50,890	1,167	48,036	50,352	48,943	49,110	1,167
	100,000	246,191	2,391	0,623	0,590	0,614	49,446	46,123	48,540	48,036	1,718	50,554	53,877	51,460	51,964	1,718
	200,000	492,382	2,692	0,603	0,588	0,467	47,432	45,921	33,736	42,363	7,509	52,568	54,079	66,264	57,637	7,509
10E	6,250	14,804	1,170	1,148	1,030	1,100	102,316	90,433	97,482	96,744	5,976	-2,316	9,567	2,518	3,256	5,976
	12,500	29,608	1,471	1,065	1,010	1,045	93,958	88,419	91,944	91,440	2,804	6,042	11,581	8,056	8,560	2,804
	25,000	59,216	1,772	0,770	0,794	0,796	64,250	66,667	66,868	65,928	1,457	35,730	33,333	33,132	34,072	1,457
	50,000	118,432	2,073	0,602	0,681	0,649	47,331	55,287	52,064	51,561	4,002	52,669	44,713	47,936	48,439	4,002
	100,000	236,864	2,374	0,185	0,172	0,163	5,337	4,028	3,122	4,162	1,114	94,663	95,972	96,878	95,838	1,114
	200,000	473,727	2,676	0,121	0,118	0,119	-1,108	-1,410	-1,309	-1,276	0,154	101,108	101,410	101,309	101,276	0,154
10F	6,250	17,257	1,237	0,963	1,023	1,043	83,686	89,728	91,742	88,385	4,193	16,314	10,272	8,258	11,615	4,193
	12,500	34,515	1,538	0,980	1,041	0,943	85,398	91,541	81,672	86,203	4,984	14,602	8,459	18,328	13,797	4,984
	25,000	69,030	1,839	0,834	0,802	0,765	70,695	67,472	63,746	67,304	3,477	29,305	32,528	36,254	32,696	3,477
	50,000	138,059	2,140	0,136	0,135	0,138	0,403	0,302	0,604	0,436	0,154	99,597	99,698	99,396	99,564	0,154
	100,000	276,119	2,441	0,128	0,127	0,121	-0,403	-0,504	-1,108	-0,671	0,381	100,403	100,504	101,108	100,671	0,381
	200,000	552,238	2,742	0,126	0,129	0,134	-0,604	-0,302	0,201	-0,235	0,407	100,604	100,302	99,799	100,235	0,407

Tabel L10 a . Lanjutan

Kurkumin	6,250	15,387	1,187	1,152	1,089	1,184	99,610	93,470	102,729	98,603	4,711	0,390	6,530	-2,729	1,397	4,711
	12,500	30,774	1,488	0,731	0,698	0,681	58,577	55,361	53,704	55,880	2,478	41,423	44,639	46,296	44,120	2,478
	25,000	61,548	1,789	0,281	0,225	0,446	14,717	9,259	30,799	18,259	11,198	85,283	90,741	69,201	81,741	11,198
	50,000	123,095	2,090	0,149	0,146	0,155	1,852	1,559	2,437	1,949	0,447	98,148	98,441	97,563	98,051	0,447
	100,000	246,191	2,391	0,131	0,129	0,126	0,097	-0,097	-0,390	-0,130	0,245	99,903	100,097	100,390	100,130	0,245
	200,000	492,382	2,692	0,133	0,126	0,136	0,292	-0,390	0,585	0,162	0,500	99,708	100,390	99,415	99,838	0,500
tamoxifen	0,313	0,841	-0,075	1,349	1,368	1,425	94,946	96,423	100,855	97,408	3,076	5,054	3,577	-0,855	2,592	3,076
	0,625	1,682	0,226	1,311	1,263	1,249	91,991	88,258	87,170	89,139	2,529	8,009	11,742	12,830	10,861	2,529
	1,250	3,365	0,527	1,296	1,252	1,303	90,824	87,403	91,369	89,865	2,150	9,176	12,597	8,631	10,135	2,150
	2,500	6,729	0,828	1,391	1,388	1,438	98,212	97,978	101,866	99,352	2,181	1,788	2,022	-1,866	0,648	2,181
	5,000	13,458	1,129	1,545	1,347	1,333	110,187	94,790	93,701	99,559	9,220	-10,187	5,210	6,299	0,441	9,220
	10,000	26,917	1,430	0,16	0,154	0,154	2,488	2,022	2,022	2,177	0,269	97,512	97,978	97,978	97,823	0,269
																19,01
doxorubicin	0,063	0,115	-0,939	1,035	1,051	1,048	88,379	89,941	89,648	89,323	0,831	11,621	10,059	10,352	10,677	0,831
	0,125	0,230	-0,638	1,003	0,945	0,88	85,254	79,590	73,242	79,362	6,009	14,746	20,410	26,758	20,638	6,009
	0,250	0,460	-0,337	0,946	0,923	0,969	79,688	77,441	81,934	79,688	2,246	20,313	22,559	18,066	20,313	2,246
	0,500	0,920	-0,036	0,887	0,841	0,9	73,926	69,434	75,195	72,852	3,027	26,074	30,566	24,805	27,148	3,027
	1,000	1,840	0,265	0,586	0,543	0,557	44,531	40,332	41,699	42,188	2,142	55,469	59,668	58,301	57,813	2,142
	2,000	3,680	0,566	0,28	0,304	0,305	14,648	16,992	17,090	16,243	1,382	85,352	83,008	82,910	83,757	1,382
																1,40

Tabel L.10. b Data perhitungan penentuan IC₅₀ senyawa 10A – 10F, kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel kanker HeLa

Senyawa	kons (µg/mL)	kons (nM)	logC	Absorbansi			% Viabilitas					% Inhibisi				IC ₅₀ (nM)
				A1	A2	A3	V1	V2	V3	rata-rata	SD	I1	I2	I3	rata-rata	
10A	6,250	18,055	1,257	1,44	1,437	1,409	74,582	74,409	72,795	73,929	0,985	25,418	25,591	27,205	26,071	0,985
	12,500	36,110	1,558	1,460	1,374	1,270	75,735	70,778	64,784	70,432	5,484	24,265	29,222	35,216	29,568	5,484
	25,000	72,219	1,859	1,323	1,346	1,333	67,839	69,164	68,415	68,473	0,665	32,161	30,836	31,585	31,527	0,665
	50,000	144,439	2,160	1,189	1,176	1,134	60,115	59,366	56,945	58,809	1,657	39,885	40,634	43,055	41,191	1,657
	100,000	288,877	2,461	0,890	0,921	0,856	42,882	44,669	40,922	42,824	1,874	57,118	55,331	59,078	57,176	1,874
	200,000	577,754	2,762	0,643	0,649	0,643	28,646	28,991	28,646	28,761	0,200	71,354	71,009	71,354	71,239	0,200
10B	6,250	15,937	1,202	1,184	1,123	1,269	59,827	56,311	64,726	60,288	4,226	40,173	43,689	35,274	39,712	4,226
	12,500	31,874	1,503	1,080	1,092	1,166	53,833	54,524	58,790	55,716	2,685	46,167	45,476	41,210	44,284	2,685
	25,000	63,747	1,804	1,051	1,038	0,997	52,161	51,412	49,049	50,874	1,624	47,839	48,588	50,951	49,126	1,624
	50,000	127,494	2,105	0,906	0,974	0,941	43,804	47,723	45,821	45,783	1,960	56,196	52,277	54,179	54,217	1,960
	100,000	254,989	2,407	0,875	0,805	0,818	42,017	37,983	38,732	39,577	2,146	57,983	62,017	61,268	60,423	2,146
	200,000	509,978	2,708	0,826	0,852	0,865	39,193	40,692	41,441	40,442	1,145	60,807	59,308	58,559	59,558	1,145
10C	6,250	16,614	1,220	1,219	1,251	1,154	61,844	63,689	58,098	61,210	2,849	38,156	36,311	41,902	38,790	2,849
	12,500	33,229	1,522	1,085	1,134	1,160	54,121	56,945	58,444	56,503	2,195	45,879	43,055	41,556	43,497	2,195
	25,000	66,458	1,823	0,954	0,972	0,977	46,571	47,608	47,896	47,358	0,697	53,429	52,392	52,104	52,642	0,697
	50,000	132,915	2,124	0,892	0,945	0,850	42,997	46,052	40,576	43,208	2,744	57,003	53,948	59,424	56,792	2,744
	100,000	265,831	2,425	0,919	0,888	0,900	44,533	42,767	43,458	43,593	0,901	55,447	57,233	56,542	56,407	0,901
	200,000	531,662	2,726	0,749	0,806	0,830	34,755	38,040	39,424	37,406	2,398	65,245	61,960	60,576	62,594	2,398

Tabel L.10. b Lanjutan

10D	6,250	15,387	1,187	1,226	1,234	1,245	65,473	65,935	66,570	65,993	0,551	34,527	34,065	33,430	34,007	0,551
	12,500	30,774	1,488	1,146	1,120	1,108	60,855	59,353	58,661	59,623	1,122	39,145	40,647	41,339	40,377	1,122
	25,000	61,548	1,789	1,041	1,039	1,046	54,792	54,677	55,081	54,850	0,208	45,208	45,323	44,919	45,150	0,208
	50,000	123,095	2,090	0,982	0,972	0,967	51,386	50,808	50,520	50,905	0,441	48,614	49,192	49,480	49,095	0,441
	100,000	246,191	2,391	0,934	0,918	0,935	48,614	47,691	48,672	48,326	0,551	51,386	52,309	51,328	51,674	0,551
	200,000	492,382	2,692	0,961	0,981	0,892	50,173	51,328	46,189	49,230	2,696	49,827	48,672	53,811	50,770	2,696
																46,36
10E	6,250	14,804	1,170	1,834	2,026	1,905	100,577	111,663	104,677	105,639	5,605	-0,577	-11,663	-4,677	-5,639	5,605
	12,500	29,608	1,471	1,850	1,776	1,691	101,501	97,229	92,321	97,017	4,594	-1,501	2,771	7,679	2,983	4,594
	25,000	59,216	1,772	1,560	1,610	1,622	84,758	87,644	88,337	86,913	1,899	15,242	12,356	11,663	13,087	1,899
	50,000	118,432	2,073	1,363	1,265	1,206	73,383	67,725	64,319	68,476	4,579	26,617	32,275	35,681	31,524	4,579
	100,000	236,864	2,374	0,309	0,347	0,367	12,529	14,723	15,878	14,376	1,701	87,471	85,277	84,122	85,624	1,701
	200,000	473,727	2,676	0,149	0,155	0,155	3,291	3,637	3,637	3,522	0,200	96,709	96,363	96,363	96,478	0,200
																130,3
10F	6,250	17,257	1,237	1,775	1,781	1,920	97,171	97,517	105,543	100,077	4,737	2,829	2,483	-5,543	-0,077	4,737
	12,500	34,515	1,538	1,949	1,666	1,843	107,217	90,878	101,097	99,731	8,255	-7,217	9,122	-1,097	0,269	8,255
	25,000	69,030	1,839	1,643	1,607	1,664	89,550	87,471	90,762	89,261	1,664	10,450	12,529	9,238	10,739	1,664
	50,000	138,059	2,140	0,491	0,509	0,514	23,037	24,076	24,365	23,826	0,698	76,963	75,924	75,635	76,174	0,698
	100,000	276,119	2,441	0,159	0,162	0,162	3,868	4,042	4,042	3,984	0,100	96,132	95,958	95,958	96,016	0,100
	200,000	552,238	2,742	0,147	0,141	0,146	3,176	2,829	3,118	3,041	0,186	96,824	97,171	96,882	96,959	0,186
																105,7

Tabel L.10. b Lanjutan

Kurkumin	6,250	15,387	1,187	1,825	1,817	1,837	94,060	93,624	94,714	94,133	0,549	5,940	6,376	5,286	5,867	0,549
	12,500	30,774	1,488	1,099	1,405	1,451	54,496	71,172	73,678	66,449	10,427	45,504	28,828	26,322	33,551	10,427
	25,000	61,548	1,789	1,307	1,165	1,246	65,831	58,093	62,507	62,144	3,882	34,169	41,907	37,493	37,856	3,882
	50,000	123,095	2,090	0,514	0,526	0,533	22,616	23,270	23,651	23,179	0,524	77,384	76,730	76,349	76,821	0,524
	100,000	246,191	2,391	0,155	0,154	0,154	3,052	2,997	2,997	3,015	0,031	96,948	97,003	97,003	96,985	0,031
	200,000	492,382	2,692	0,172	0,173	0,17	3,978	4,033	3,869	3,960	0,083	96,022	95,967	96,131	96,040	0,083
tamoxifen	0,313	0,841	-0,075	2,144	2,008	1,777	111,444	104,033	91,444	102,307	10,111	-11,444	-4,033	8,556	-2,307	10,111
	0,625	1,682	0,226	1,897	1,712	1,726	97,984	87,902	88,665	91,517	5,613	2,016	12,098	11,335	8,483	5,613
	1,250	3,365	0,527	1,919	1,781	1,749	99,183	91,662	89,918	93,588	4,923	0,817	8,338	10,082	6,412	4,923
	2,500	6,729	0,828	1,833	1,911	1,672	94,496	98,747	85,722	92,988	6,642	5,504	1,253	14,278	7,012	6,642
	5,000	13,458	1,129	1,637	1,628	1,740	83,815	83,324	89,428	85,522	3,391	16,185	16,676	10,572	14,478	3,391
	10,000	26,917	1,430	0,556	0,591	0,613	24,905	26,812	28,011	26,576	1,567	75,095	73,188	71,989	73,424	1,567
doxorubicin	0,063	0,115	-0,939	1,235	1,247	1,356	84,580	85,496	93,817	87,964	5,089	15,420	14,504	6,183	12,036	5,089
	0,125	0,230	-0,638	1,095	1,266	1,386	73,893	86,947	96,107	85,649	11,164	26,107	13,053	3,893	14,351	11,164
	0,250	0,460	-0,337	1,472	1,390	1,438	102,672	96,412	100,076	99,720	3,145	-2,672	3,588	-0,076	0,280	3,145
	0,500	0,920	-0,036	1,149	1,123	1,017	78,015	76,031	67,939	73,995	5,338	21,985	23,969	32,061	26,005	5,338
	1,000	1,840	0,265	0,690	0,767	0,805	42,977	48,855	51,756	47,863	4,473	57,023	51,145	48,244	52,137	4,473
	2,000	3,680	0,566	0,494	0,374	0,438	28,015	18,855	23,740	23,537	4,584	71,985	81,145	76,260	76,463	4,584

Tabel L10. c. Data perhitungan penentuan IC₅₀ senyawa 10A – 10F, kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel kanker WiDr

Senyawa	kons (µg/mL)	kons (µM)	logC	Absorbansi			% Viabilitas						% Inhibisi				IC ₅₀ (µM)
				A1	A2	A3	V1	V2	V3	rata-rata	SD	I1	I2	I3	rata-rata	SD	
10A	6,250	18,055	1,257	1,221	1,059	1,120	112,075	94,292	100,988	102,452	8,981	-12,075	5,708	-0,988	-2,452	8,981	
	12,500	36,110	1,558	0,781	0,824	0,674	63,776	68,496	52,031	61,434	8,479	36,224	31,504	47,969	38,566	8,479	
	25,000	72,219	1,859	0,778	0,856	0,798	63,447	72,009	65,642	67,033	4,447	36,553	27,991	34,358	32,967	4,447	
	50,000	144,439	2,160	0,733	0,733	0,693	58,507	58,507	54,116	57,044	2,535	41,493	41,493	45,884	42,956	2,535	
	100,000	288,877	2,461	0,671	0,521	0,581	51,701	35,236	41,822	42,920	8,287	48,299	64,764	58,178	57,080	8,287	
	200,000	577,754	2,762	0,574	0,594	0,613	41,054	43,249	45,335	43,213	2,141	58,946	56,751	54,665	56,787	2,141	
10B	6,250	15,937	1,202	1,065	1,052	1,050	94,951	93,524	93,304	93,926	0,894	5,049	6,476	6,696	6,074	0,894	
	12,500	31,874	1,503	0,688	0,681	0,648	53,568	52,799	49,177	51,848	2,345	46,432	47,201	50,823	48,152	2,345	
	25,000	63,747	1,804	0,632	0,692	0,632	47,420	54,007	47,420	49,616	3,803	52,580	45,993	52,580	50,384	3,803	
	50,000	127,494	2,105	0,694	0,593	0,608	54,226	43,139	44,786	47,384	5,983	45,774	56,861	55,214	52,616	5,983	
	100,000	254,989	2,407	0,623	0,590	0,594	46,432	42,810	43,249	44,164	1,977	53,568	57,190	56,751	55,836	1,977	
	200,000	509,978	2,708	0,540	0,556	0,539	37,322	39,078	37,212	37,870	1,047	62,678	60,922	62,788	62,130	1,047	
10C	6,250	16,614	1,220	0,764	0,832	0,821	61,910	69,374	68,167	66,484	4,007	38,090	30,626	31,833	33,516	4,007	
	12,500	33,229	1,522	0,588	0,552	0,829	42,591	38,639	69,045	50,091	16,533	57,409	61,361	30,955	49,909	16,533	
	25,000	66,458	1,823	0,619	0,659	0,619	45,993	50,384	45,993	47,457	2,535	54,007	49,616	54,007	52,543	2,535	
	50,000	132,915	2,124	0,628	0,596	0,587	46,981	43,469	42,481	44,310	2,365	53,019	56,531	57,519	55,690	2,365	
	100,000	265,831	2,425	0,612	0,555	0,605	45,225	38,968	44,457	42,883	3,412	54,775	61,032	55,543	57,117	3,412	
	200,000	531,662	2,726	0,608	0,546	0,528	44,786	37,980	36,004	39,590	4,607	55,214	62,020	63,996	60,410	4,607	

Tabel L10. c Lanjutan

10D	6,250	15,387	1,187	0,760	0,797	0,790	64,082	68,301	67,503	66,629	2,241	35,918	31,699	32,497	33,371	2,241
	12,500	30,774	1,488	0,576	0,667	0,607	43,101	53,478	46,636	47,739	5,275	56,899	46,522	53,364	52,261	5,275
	25,000	61,548	1,789	0,648	0,614	0,633	51,311	47,434	49,601	49,449	1,943	48,689	52,566	50,399	50,551	1,943
	50,000	123,095	2,090	0,612	0,612	0,623	47,206	47,206	48,461	47,624	0,724	52,794	52,794	51,539	52,376	0,724
	100,000	246,191	2,391	0,523	0,529	0,533	37,058	37,742	38,198	37,666	0,574	62,942	62,258	61,802	62,334	0,574
	200,000	492,382	2,692	0,522	0,578	0,575	36,944	43,330	42,987	41,087	3,592	63,056	56,670	57,013	58,913	3,592
10E	6,250	14,804	1,170	1,133	1,206	1,067	106,613	114,937	99,088	106,880	7,928	-6,613	-14,937	0,912	-6,880	7,928
	12,500	29,608	1,471	0,750	0,706	0,691	62,942	57,925	56,214	59,027	3,497	37,058	42,075	43,786	40,973	3,497
	25,000	59,216	1,772	0,699	0,714	0,735	57,127	58,837	61,231	59,065	2,062	42,873	41,163	38,769	40,935	2,062
	50,000	118,432	2,073	0,629	0,728	0,580	49,145	60,433	43,558	51,045	8,597	50,855	39,567	56,442	48,955	8,597
	100,000	236,864	2,374	0,335	0,330	0,344	15,621	15,051	16,648	15,773	0,809	84,379	84,949	83,352	84,227	0,809
	200,000	473,727	2,676	0,267	0,273	0,284	7,868	8,552	9,806	8,742	0,983	92,132	91,448	90,194	91,258	0,983
10F	6,250	17,257	1,237	1,004	0,994	1,024	91,904	90,764	94,185	92,284	1,742	8,096	9,236	5,815	7,716	1,742
	12,500	34,515	1,538	0,769	0,823	0,713	65,108	71,266	58,723	65,032	6,272	34,892	28,734	41,277	34,968	6,272
	25,000	69,030	1,839	0,699	0,699	0,810	57,127	69,783	65,336	64,082	6,421	42,873	30,217	34,664	35,918	6,421
	50,000	138,059	2,140	0,641	0,717	0,688	50,513	59,179	55,872	55,188	4,373	49,487	40,821	44,128	44,812	4,373
	100,000	276,119	2,441	0,440	0,422	0,339	27,594	25,542	16,078	23,071	6,143	72,406	74,458	83,922	76,929	6,143
	200,000	552,238	2,742	0,279	0,276	0,280	9,236	8,894	9,350	9,160	0,237	90,764	91,106	90,650	90,840	0,237

Tabel L10. c Lanjutan

Kurkumin	6,250	15,387	1,187	0,871	0,865	0,903	65,127	64,466	68,647	66,080	2,247	34,873	35,534	31,353	33,920	2,247
	12,500	30,774	1,488	0,634	0,714	0,704	39,054	47,855	46,755	44,534	4,795	60,946	52,145	53,245	55,446	4,795
	25,000	61,548	1,789	0,695	0,703	0,659	45,765	46,645	41,804	44,738	2,578	54,235	53,355	58,196	55,262	2,578
	50,000	123,095	2,090	0,297	0,289	0,304	1,980	1,100	2,750	1,944	0,826	98,020	98,900	97,250	98,056	0,826
	100,000	246,191	2,391	0,285	0,266	0,272	0,660	-1,430	-0,770	-0,513	1,068	99,340	101,430	100,770	100,513	1,068
	200,000	492,382	2,692	0,279	0,277	0,274	0,000	-0,220	-0,550	-0,257	0,277	100,000	100,220	100,550	100,257	0,277
tamoxifen	0,313	0,841	-0,075	1,134	1,149	1,140	94,059	95,710	94,719	94,829	0,831	5,941	4,290	5,281	5,171	0,831
	0,625	1,682	0,226	1,305	1,508	1,412	112,871	135,204	124,642	124,239	11,172	-12,871	-35,204	-24,642	-24,239	11,172
	1,250	3,365	0,527	1,262	1,202	1,152	108,141	101,540	96,040	101,907	6,059	-8,141	-1,540	3,960	-1,907	6,059
	2,500	6,729	0,828	1,030	1,149	1,241	84,818	95,710	105,831	95,433	10,508	15,182	4,290	-5,831	4,547	10,508
	5,000	13,458	1,129	1,459	1,608	1,660	129,813	146,205	151,925	142,648	11,477	-29,813	-46,205	-51,925	-42,648	11,477
	10,000	26,917	1,430	1,099	1,089	0,953	90,209	89,109	74,147	84,488	8,972	9,791	10,891	25,853	15,512	8,972
doxorubicin	0,063	0,115	-0,939	0,991	0,900	1,074	78,328	68,317	87,459	78,034	9,574	21,672	31,683	12,541	21,966	9,574
	0,125	0,230	-0,638	1,383	1,359	1,398	121,452	118,812	123,102	121,122	2,164	-21,452	-18,812	-23,102	-21,122	2,164
	0,250	0,460	-0,337	0,984	0,924	0,937	77,558	70,957	72,387	73,634	3,472	22,442	29,043	27,613	26,366	3,472
	0,500	0,920	-0,036	1,082	0,909	0,942	88,339	69,307	72,937	76,861	10,104	11,661	30,693	27,063	23,139	10,104
	1,000	1,840	0,265	0,838	0,889	0,758	63,696	67,107	52,695	61,166	7,532	36,304	32,893	47,305	38,834	7,532
	2,000	3,680	0,566	0,547	0,550	0,536	29,483	29,813	28,273	29,190	0,811	70,517	70,187	71,727	70,810	0,811

Tabel L10. d. Data perhitungan penentuan IC₅₀ senyawa 10A – 10F, kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel normal Vero

Senyawa	kons ($\mu\text{g/mL}$)	kons (μM)	logC	Absorbansi			% Viabilitas						% Inhibisi				IC ₅₀ (μM)
				A1	A2	A3	V1	V2	V3	rata-rata	SD	II	I2	I3	rata-rata	SD	
10A	6,250	18,055	1,257	1,201	1,206	1,221	86,122	86,803	88,844	87,256	1,416	13,878	13,197	11,156	12,744	1,416	102,00
	12,500	36,110	1,558	1,160	1,174	1,174	80,544	79,592	82,449	80,862	1,455	19,456	20,408	17,551	19,138	1,455	
	25,000	72,219	1,859	1,066	1,071	1,084	67,755	68,435	70,204	68,798	1,264	32,245	31,565	29,796	31,202	1,264	
	50,000	144,439	2,160	0,985	1,014	1,027	56,735	60,680	62,449	59,955	2,925	43,265	39,320	37,551	40,045	2,925	
	100,000	288,877	2,461	0,990	0,937	0,973	57,415	50,204	55,102	54,240	3,682	42,585	49,796	44,898	45,760	3,682	
200,000	577,754	2,762	0,775	0,774	0,774	28,163	28,027	28,027	28,073	0,079	71,837	71,973	71,973	71,927	0,079		
10B	6,250	15,937	1,202	1,044	1,080	1,015	64,762	69,660	60,816	65,079	4,430	35,238	30,340	39,184	34,921	4,430	143,30
	12,500	31,874	1,503	1,067	1,038	1,068	67,891	63,946	68,027	66,621	2,318	32,109	36,054	31,973	33,379	2,318	
	25,000	63,747	1,804	0,959	0,978	1,001	53,197	55,782	58,912	55,964	2,861	46,803	44,218	41,088	44,036	2,861	
	50,000	127,494	2,105	0,951	0,955	0,962	52,109	52,633	53,605	52,789	0,758	47,891	47,347	46,395	47,211	0,758	
	100,000	254,989	2,407	0,935	0,875	0,878	49,932	41,769	42,177	44,626	4,600	50,068	58,231	57,823	55,374	4,600	
200,000	509,978	2,708	0,817	0,809	0,805	33,878	32,789	32,245	32,971	0,831	66,122	67,211	67,755	67,029	0,831		
10C	6,250	16,614	1,220	1,090	1,123	1,132	71,020	75,510	76,735	74,422	3,009	28,980	24,490	23,265	25,578	3,009	135,20
	12,500	33,229	1,522	1,068	1,098	1,144	68,027	72,109	78,367	72,834	5,208	31,973	27,891	21,633	27,166	5,208	
	25,000	66,458	1,823	0,978	1,000	1,047	55,782	58,776	65,170	59,909	4,795	44,218	41,224	34,830	40,091	4,795	
	50,000	132,915	2,124	0,957	0,919	0,925	52,925	47,755	48,571	49,751	2,779	47,075	52,245	51,429	50,249	2,779	
	100,000	265,831	2,425	0,918	0,926	0,882	47,619	48,707	42,721	46,349	3,189	52,381	51,293	57,279	53,651	3,189	
200,000	531,662	2,726	0,805	0,751	0,773	32,245	24,898	27,891	28,345	3,694	67,755	75,102	72,109	71,655	3,694		

Tabel L.10. d Lanjutan


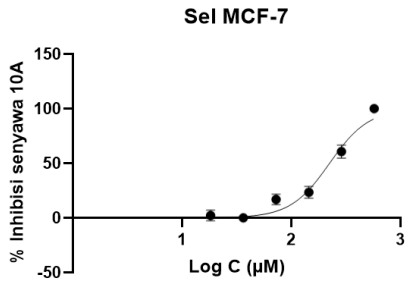
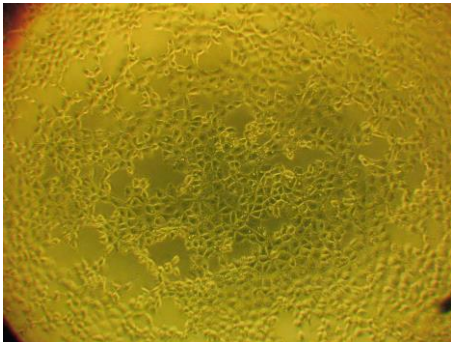
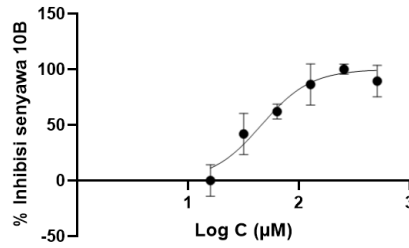
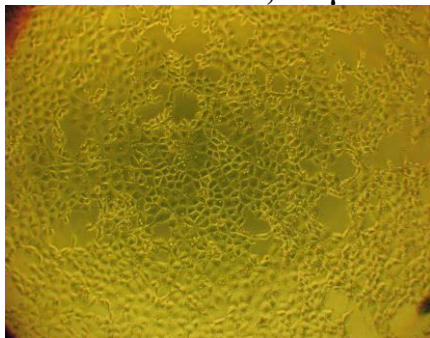
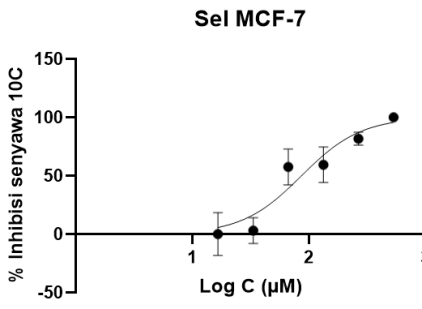
10D	6,250	15,387	1,187	1,061	1,058	1,060	60,853	60,477	60,728	60,686	0,192	39,147	39,523	39,272	39,314	0,192
	12,500	30,774	1,488	1,043	1,040	0,974	58,595	58,218	49,937	55,583	4,893	41,405	41,782	50,063	44,417	4,893
	25,000	61,548	1,789	0,929	0,948	0,923	44,291	46,675	43,538	44,835	1,638	55,709	53,325	56,462	55,165	1,638
	50,000	123,095	2,090	0,886	0,936	0,879	38,896	45,169	38,018	40,694	3,900	61,104	54,831	61,982	59,306	3,900
	100,000	246,191	2,391	0,883	0,850	0,888	38,519	34,379	39,147	37,348	2,591	61,481	65,621	60,853	62,652	2,591
	200,000	492,382	2,692	0,877	0,847	0,838	37,767	34,003	32,873	34,881	2,562	62,233	65,997	67,127	65,119	2,562
																56,68
10E	6,250	14,804	1,170	1,142	1,056	0,997	71,016	60,226	52,823	61,355	9,149	28,984	39,774	47,177	38,645	9,149
	12,500	29,608	1,471	0,982	1,015	0,991	50,941	55,082	52,070	52,698	2,140	49,059	44,918	47,930	47,302	2,140
	25,000	59,216	1,772	0,824	0,878	0,932	31,117	37,892	44,668	37,892	6,775	68,883	62,108	55,332	62,108	6,775
	50,000	118,432	2,073	0,824	0,789	0,861	31,117	26,725	35,759	31,200	4,518	68,883	73,275	64,241	68,800	4,518
	100,000	236,864	2,374	0,568	0,542	0,530	-1,004	-4,266	-3,262	-2,844	1,671	101,004	104,266	103,262	102,844	1,671
	200,000	473,727	2,676	0,549	0,549	0,549	-3,388	-1,380	-3,388	-2,719	1,159	103,388	101,380	103,388	102,719	1,159
																92,47
10F	6,250	17,257	1,237	1,331	1,275	1,322	94,730	87,704	93,601	92,012	3,773	5,270	12,296	6,399	7,988	3,773
	12,500	34,515	1,538	1,233	1,157	1,265	82,434	72,898	86,449	80,594	6,960	17,566	27,102	13,551	19,406	6,960
	25,000	69,030	1,839	1,136	1,089	1,078	70,263	64,366	62,986	65,872	3,865	29,737	35,634	37,014	34,128	3,865
	50,000	138,059	2,140	0,596	0,626	0,532	2,509	6,274	-5,521	1,087	6,024	97,491	93,726	105,521	98,913	6,024
	100,000	276,119	2,441	0,518	0,535	0,538	-7,277	-5,144	-4,768	-5,730	1,353	107,277	105,144	104,768	105,730	1,353
	200,000	552,238	2,742	0,532	0,526	0,554	-5,521	-6,274	-2,760	-4,852	1,850	105,521	106,274	102,760	104,852	1,850
																94,99

Tabel L10. d Lanjutan

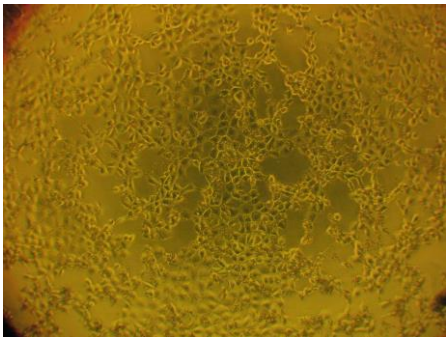
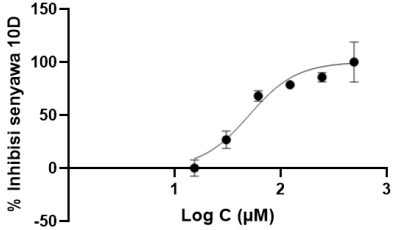

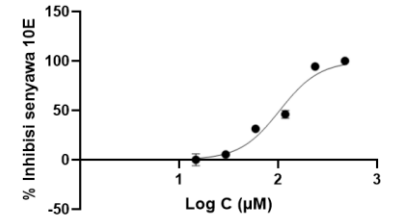
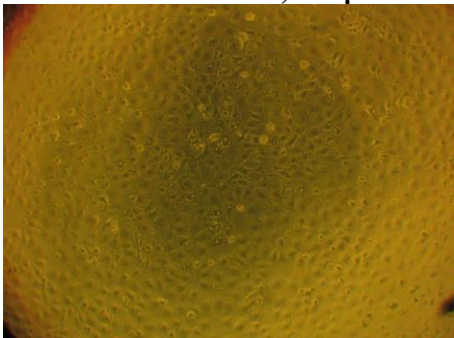
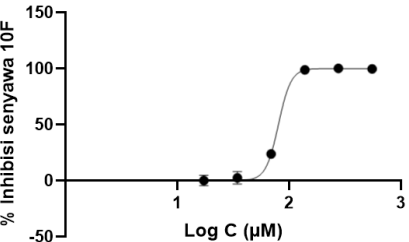
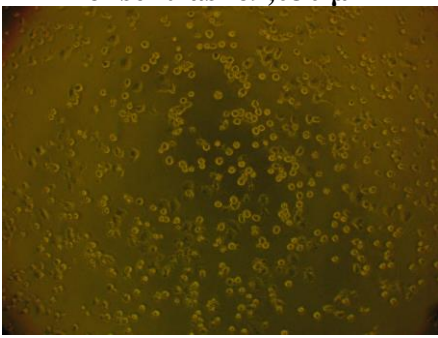
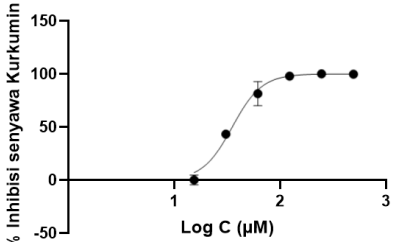
	6,250	15,387	1,187	1,259	1,238	1,257	69,780	67,576	69,570	68,975	1,216	30,220	32,424	30,430	31,025	1,216
	12,500	30,774	1,488	0,960	0,819	0,849	38,405	23,610	26,758	29,591	7,794	61,595	76,390	73,242	70,409	7,794
Kurkumin	25,000	61,548	1,789	0,587	0,574	0,565	-0,735	-2,099	-3,043	-1,959	1,161	100,735	102,099	103,043	101,959	1,161
	50,000	123,095	2,090	0,557	0,571	0,550	-3,882	-2,413	-4,617	-3,638	1,122	103,882	102,413	104,617	103,638	1,122
	100,000	246,191	2,391	0,578	0,557	0,562	-1,679	-3,882	-3,358	-2,973	1,151	101,679	103,882	103,358	102,973	1,151
	200,000	492,382	2,692	0,577	0,576	0,569	-1,784	-1,889	-2,623	-2,099	0,457	101,784	101,889	102,623	102,099	0,457
																30,01
	0,313	0,841	-0,075	1,474	1,471	1,464	92,340	92,025	91,291	91,885	0,538	7,660	7,975	8,709	8,115	0,538
	0,625	1,682	0,226	1,537	1,556	1,514	98,951	100,944	96,537	98,811	2,207	1,049	-0,944	3,463	1,189	2,207
tamoxifen	1,250	3,365	0,527	1,514	1,503	1,516	96,537	95,383	96,747	96,222	0,735	3,463	4,617	3,253	3,778	0,735
	2,500	6,729	0,828	1,612	1,691	1,647	106,821	115,110	110,493	110,808	4,154	-6,821	-15,110	-10,493	-10,808	4,154
	5,000	13,458	1,129	1,476	1,493	1,473	92,550	94,334	92,235	93,040	1,132	7,450	5,666	7,765	6,960	1,132
	10,000	26,917	1,430	0,890	0,955	0,934	42,419	48,116	46,275	45,603	2,907	57,581	51,884	53,725	54,397	2,907
																13,91
	0,063	0,115	-0,939	1,372	1,425	1,430	81,637	87,198	87,723	85,519	3,373	18,363	12,802	12,277	14,481	3,373
	0,125	0,230	-0,638	1,424	1,427	1,420	87,093	87,408	86,674	87,058	0,369	12,907	12,592	13,326	12,942	0,369
doxorubicin	0,250	0,460	-0,337	1,363	1,386	1,348	80,693	83,106	79,119	80,972	2,008	19,307	16,894	20,881	19,028	2,008
	0,500	0,920	-0,036	1,321	1,201	1,324	76,285	63,694	76,600	72,193	7,362	23,715	36,306	23,400	27,807	7,362
	1,000	1,840	0,265	1,222	1,081	1,249	65,897	51,102	68,730	61,910	9,467	34,103	48,898	31,270	38,090	9,467
	2,000	3,680	0,566	1,207	1,149	1,226	64,323	58,237	66,317	62,959	4,209	35,677	41,763	33,683	37,041	4,209
																0,75

Lampiran 11. Data morfologi sel kanker dan sel normal beserta kurva hubungan % Inhibisi dan Log C penentuan IC₅₀

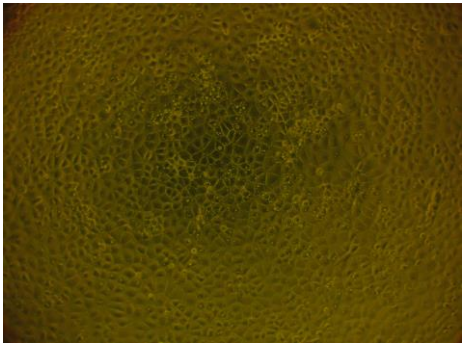
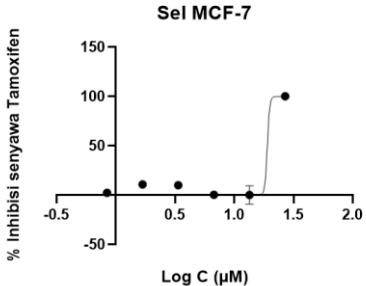
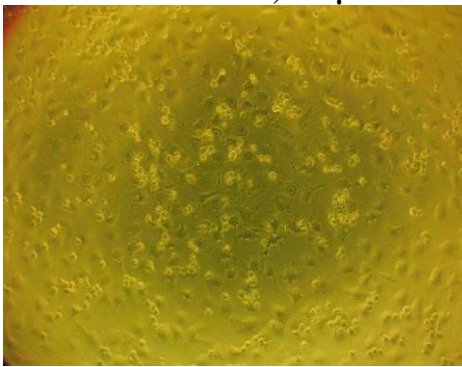
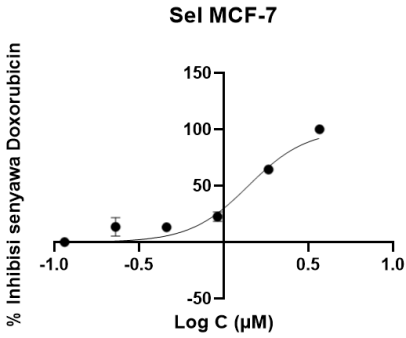
Tabel L11. a Kurva hubungan persentase inhibisi senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel MCF-7 dan morfologi sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin pada konsentrasi mendekati IC₅₀ senyawa.

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
10A	 Konsentrasi 288,877 μM	 Sel MCF-7 IC ₅₀ = 224,10 μM
10B	 Konsentrasi 63,747 μM	 Sel MCF-7 IC ₅₀ = 45,97 μM
10C	 Konsentrasi 61,548 μM	 Sel MCF-7 IC ₅₀ = 62,02 μM


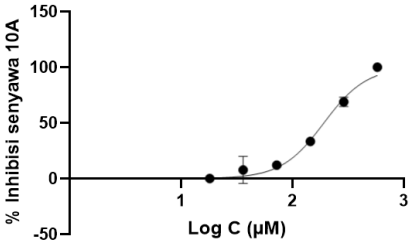

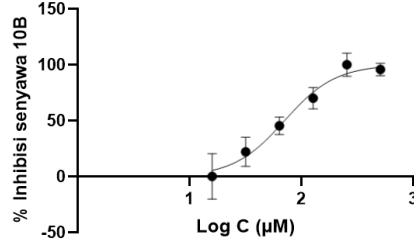

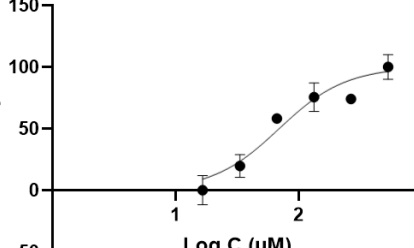

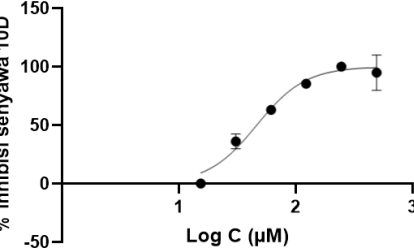
Tabel L11.a Lanjutan

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
10D	 Konsentrasi 30,774 μM	<p>Sel MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 50,56 μM</p>
10E	 Konsentrasi 118,432 μM	<p>Sel MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 103,9 μM</p>
10F	 Konsentrasi 69,030 μM	<p>Sel MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 80,26 μM</p>
Kurkumin	 Konsentrasi 30,74 μM	<p>Sel MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 35,30 μM</p>


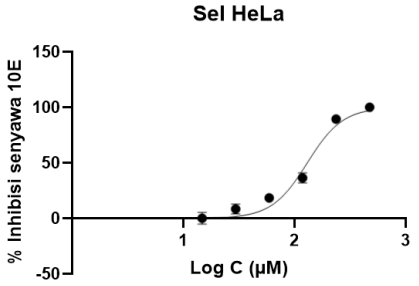

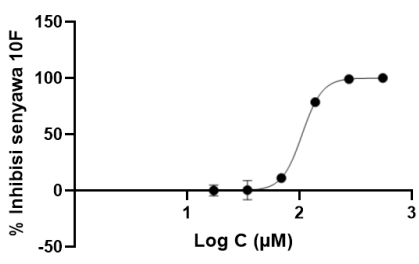

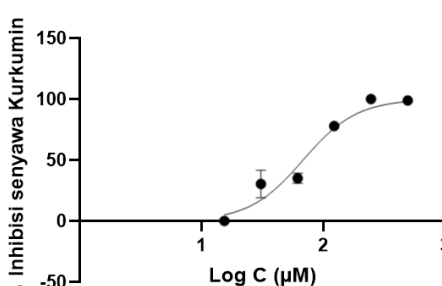
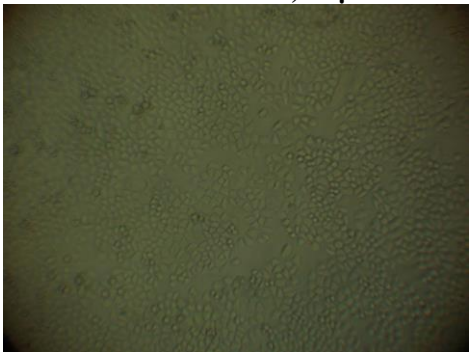
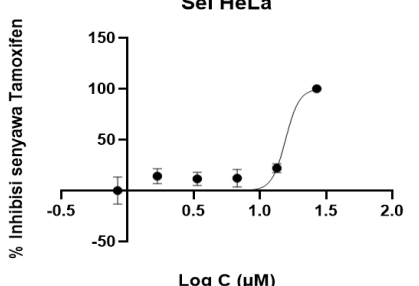
Tabel L11.a Lanjutan

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
<p>Tamoksifen</p>  <p>Konsentrasi 13,458 μM</p>		<p>Sei MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 19,01 μM</p>
<p>Doxorubicin</p>  <p>Konsentrasi 1,840 μM</p>		<p>Sei MCF-7</p>  <p>IC₅₀ = 1,399 μM</p>


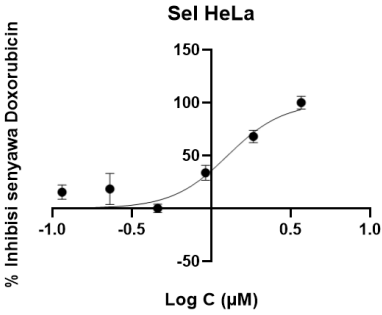
Tabel L11. b Kurva hubungan persentase inhibisi senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel HeLa dan morfologi sel HeLa dengan perlakuan senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin pada konsentrasi mendekati IC_{50} senyawa.

Senyawa	IC_{50}	Kurva
10A	 Konsentrasi 144,439 μM	<p>Sel HeLa</p>  <p>$IC_{50} = 191,50 \mu\text{M}$</p>
10B	 Konsentrasi 63,747 μM	<p>Sel HeLa</p>  <p>$IC_{50} = 70,80 \mu\text{M}$</p>
10C	 Konsentrasi 66,458 μM	<p>Sel HeLa</p>  <p>$IC_{50} = 69,30 \mu\text{M}$</p>
10D	 Konsentrasi 61,548 μM	<p>Sel HeLa</p>  <p>$IC_{50} = 46,36 \mu\text{M}$</p>

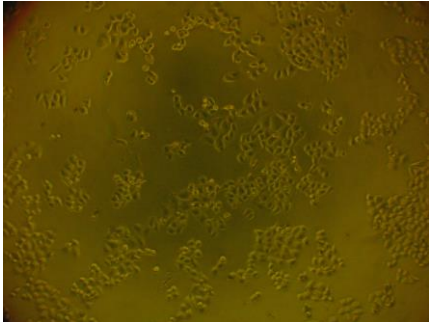
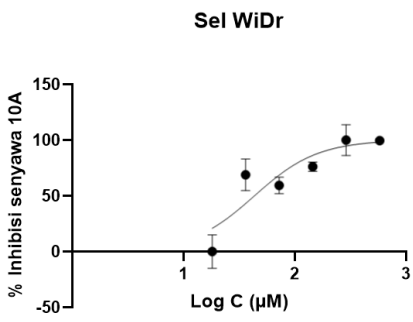
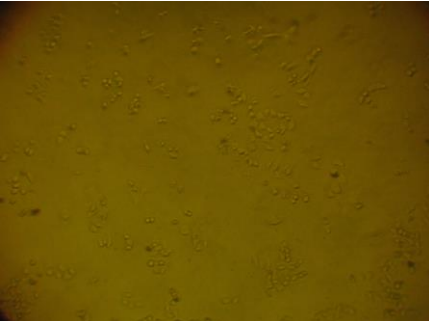
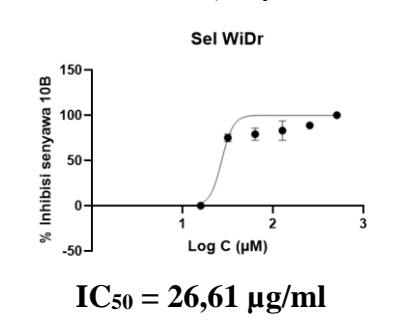
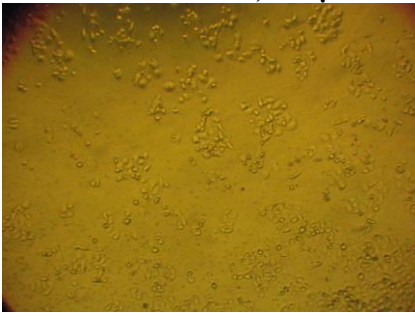
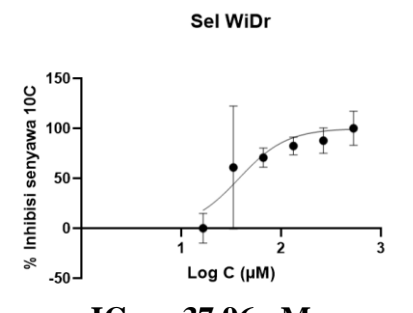
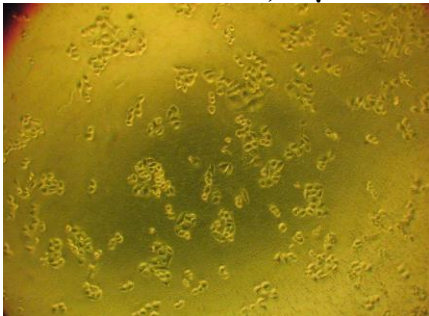
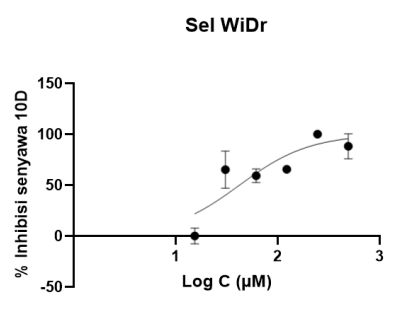
Tabel L11.b Lanjutan

Senyawa	IC ₅₀	Kurva
10E		<p>Sel HeLa</p>  <p>IC₅₀ = 130,30 μM</p>
10F		<p>Sel HeLa</p>  <p>IC₅₀ = 105,70 μg/ml</p>
Kurkumin		<p>Sel HeLa</p>  <p>IC₅₀ = 68,09 μM</p>
Tamoksifen		<p>Sel HeLa</p>  <p>IC₅₀ = 15,62 μM</p>


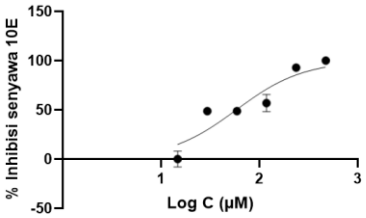
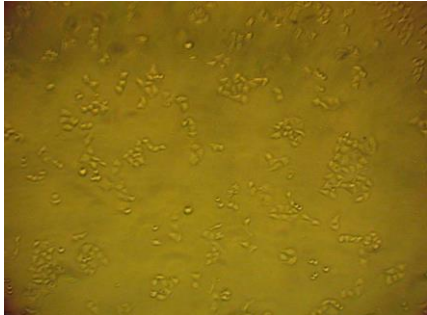
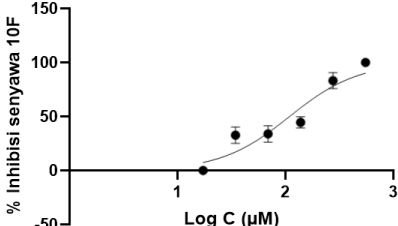
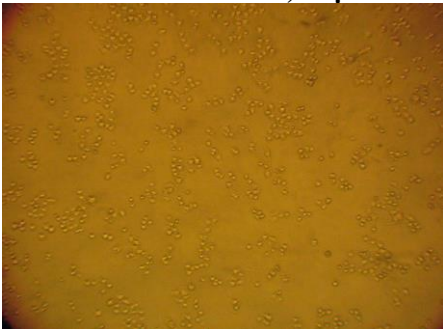
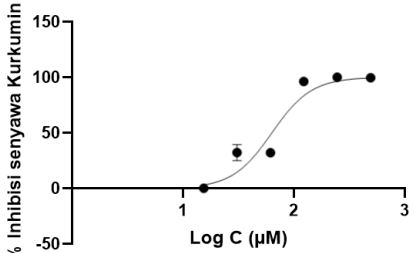

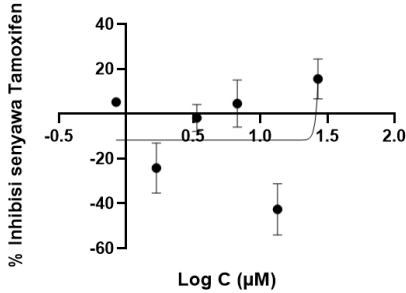
Tabel L11.b Lanjutan

Senyawa	IC ₅₀	Kurva
Doxorubicin	 Konsentrasi 0,920 μM	 <p data-bbox="1182 383 1273 405">Sel HeLa</p> <p data-bbox="1018 405 1038 674">% Inhibisi senyawa Doxorubicin</p> <p data-bbox="1182 667 1278 689">Log C (μM)</p> <p data-bbox="1098 707 1321 734">IC₅₀ = 1,267 μM</p>

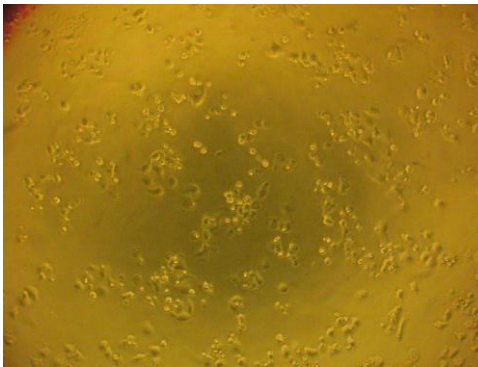
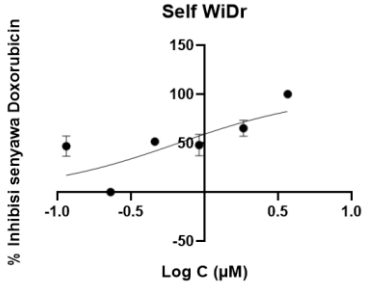
Tabel L11. c Kurva hubungan persentase inhibisi senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel WiDr dan morfologi sel WiDr dengan perlakuan senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin pada konsentrasi mendekati IC_{50} senyawa.

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
10A	 Konsentrasi 36,11 μ M	 Sel WiDr $IC_{50} = 43,28 \mu$ M
10B	 Konsentrasi 31,874 μ M	 Sel WiDr $IC_{50} = 26,61 \mu$ g/ml
10C	 Konsentrasi 33,29 μ M	 Sel WiDr $IC_{50} = 37,96 \mu$ M
10D	 Konsentrasi 6,25 μ M	 Sel WiDr $IC_{50} = 30,774 \mu$ M

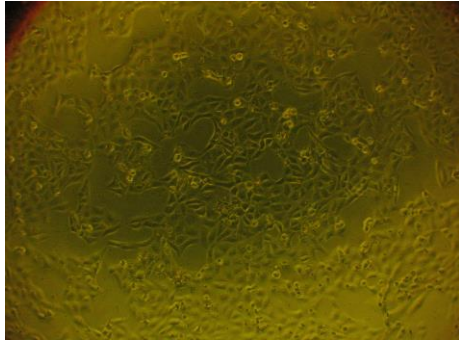
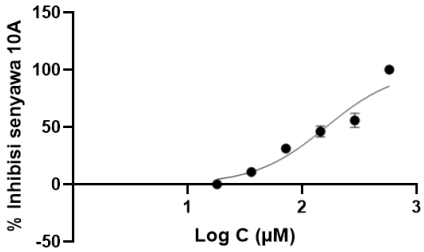
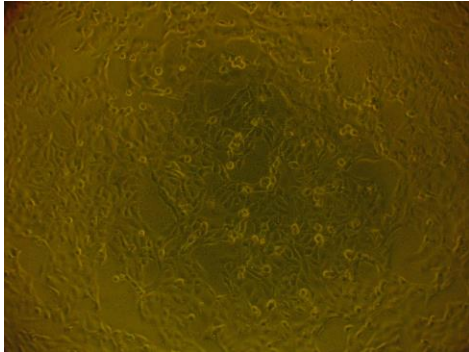
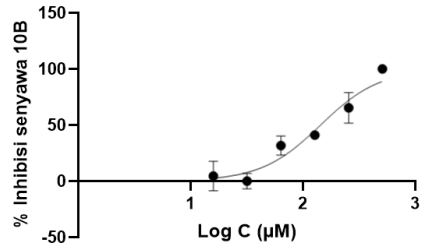
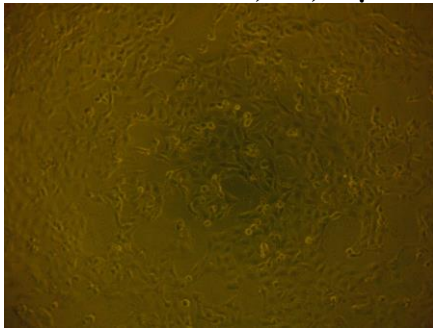
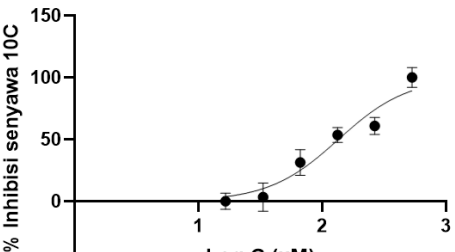
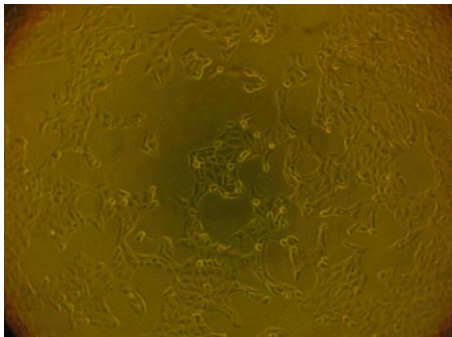
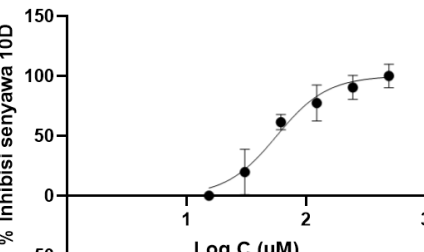
Tabel L11.c Lanjutan

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
10E	 Konsentrasi 12,50 µM	<p>Sel WiDr</p>  $IC_{50} = 58,19 \mu M$
10F	 Konsentrasi 138,06 µM	<p>Sel WiDr</p>  $IC_{50} = 109,00 \mu M$
Kurkumin	 Konsentrasi 61,548 µM	<p>Sel WiDr</p>  $IC_{50} = 63,41 \mu M$
Tamoksifen	 Konsentrasi 26,917 µM	<p>Sel WiDr</p>  $IC_{50} = 107,1 \mu M$

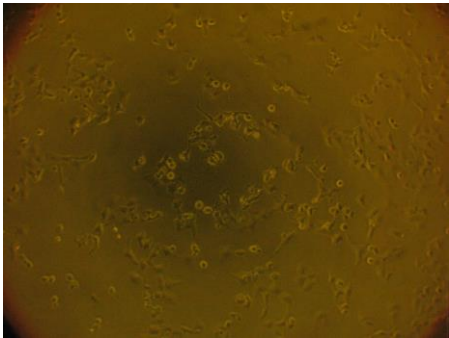
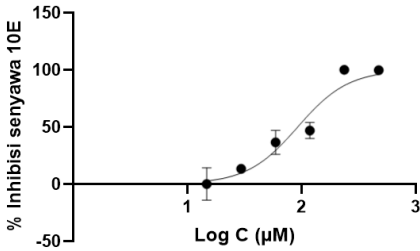
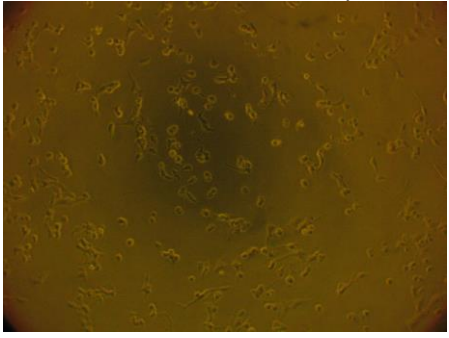
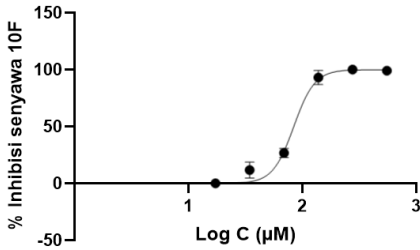
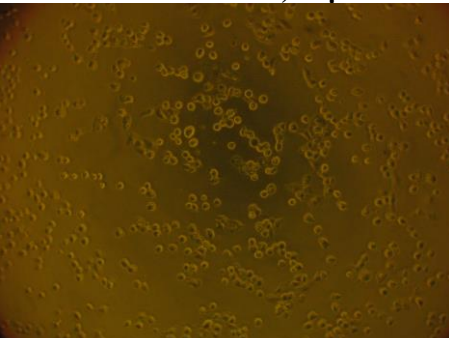
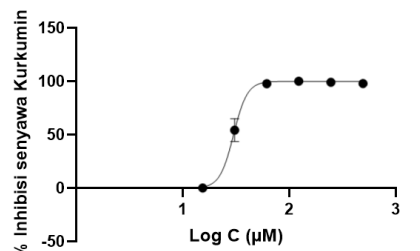
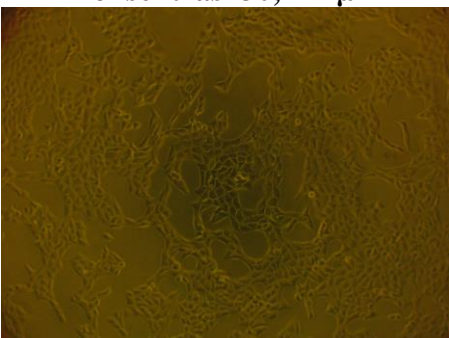
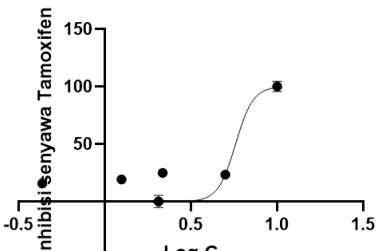
Tabel L11.c Lanjutan

Senyawa	Morfologi sel	Kurva
Doxorubicin		 <p data-bbox="1061 689 1300 725">IC₅₀ = 0,662 µM</p>

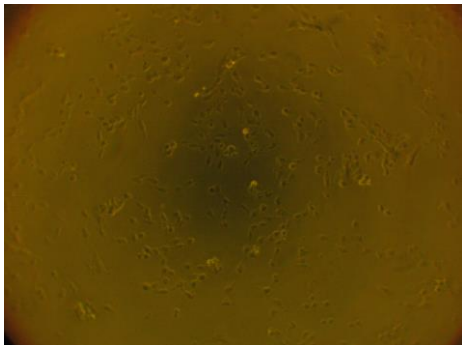
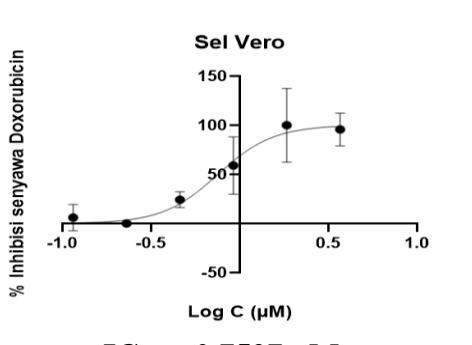
Tabel L11. d Kurva hubungan persentase inhibisi senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin terhadap sel Vero dan morfologi sel Vero dengan perlakuan senyawa 10A – 10F, Kurkumin, tamoksifen, doxorubicin pada konsentrasi mendekati IC_{50} senyawa.

Senyawa	Morfologi Sel	Kurva
10A	 Konsentrasi 144,39 μM	<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 162,0 \mu\text{M}$</p>
10B	 Konsentrasi 127,494,00 μM	<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 143,30 \mu\text{M}$</p>
10C	 Konsentrasi 132,915 μM	<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 135,20 \mu\text{M}$</p>
10D	 Konsentrasi 61,548 μM	<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 56,68 \mu\text{M}$</p>

Tabel L11.d Lanjutan

Senyawa	Morfologi Sel	Kurva
10E		<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 92,47 \mu M$</p>
10F		<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 84,12 \mu M$</p>
Kurkumin		<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 30,01 \mu M$</p>
Tamoksifen		<p>Sel Vero</p>  <p>$IC_{50} = 13,91 \mu M$</p>

Tabel L11.d Lanjutan

Senyawa	Morfologi Sel	Kurva
Doxorubicin		 <p data-bbox="970 360 1453 703">Sel Vero</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">% Inhibisi senyawa Doxorubicin</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">150</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">100</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">50</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">-50</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">-1.0 -0.5 0.5 1.0</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">Log C (μM)</p> <p data-bbox="970 360 1453 703">IC₅₀ = 0,7527 μM</p>

Konsentrasi 0,920 μM **IC₅₀ = 0,7527 μM**

