

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.

Secara epidemiologi kanker servik memiliki daya sebar geografis yang luas. Kanker servik berkembang di servik wanita dan diakibatkan oleh penyakit menular seksual seperti papilloma yang ditularkan oleh Human Papilloma Virus. Penularan bersama HPV semakin cepat di negara berkembang karena faktor kesehatan dan ekonomi yang kurang memadai⁽¹⁾. Didunia terdapat 529,409 kasus baru dan 274,883 meninggal di tahun 2008, bahkan 86% berada di negara berkembang salah satunya di Indonesia. Kanker servik menyerang pada usia produktif sehingga dapat mempengaruhi produktivitas ekonomi⁽²⁾.

Indonesia adalah negara dengan biodiversitas kedua tertinggi didunia. Sehingga memiliki biodiversitas yang tinggi juga. Perusakan alam di negara tropis dan berkembang seperti Indonesia sangatlah tinggi. Maka harus dilakukan inventarisasi dari biodiversitas makhluk hidup dan molekuler yang cepat. Sehingga penelitian terhadap produk kimia bahan alam mutlak harus mendapat perhatian politik, edukasi, finansial yang besar dan memadai. Sehingga inventarisasi dapat melaju jauh sebelum terjadi perusakan alam⁽³⁾.

Ketersediaan bahan baku yang murah dan efektif menjadi dasar di dalam pengembangan obat baru. Maka di dalam penelitian ini, peneliti berusaha menempatkan turunan metil sinamat sebagai fokus pengembangan obat baru. Pengembangan obat metil sinamat didukung dengan penapisan secara virtual guna mempersingkat waktu, keuangan, sehingga lebih efisien. Di sisi lain pembuatan turunan metil sinamat diharapkan menggunakan bahan baku alam dan lokal sehingga menjadi tidak ketergantungan terhadap impor⁽⁴⁾.

Beberapa penelitian pendahuluan yang memiliki aktivitas anti sel HeLa dan HDAC(Histone Deacetylase). Inhibitor secara virtual dari turunan metil sinamat sebagai turunan metil sinamat^(51,52,53)

Turunan Metil Sinamat dapat menjadi molekul dasar untuk mengembangkan HDAC inhibitor. Struktur Inhibitor diharapkan memiliki kemampuan berikatan Zn⁽⁵⁴⁾. Beberapa senyawa dengan gugus fungsional amite dapat digunakan sebagai HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor⁽⁵⁵⁾.

1.2 Rumusan Masalah.

- a. Mencari molekul turunan metil sinamat.
- b. Memprediksi molekul dari turunan metil sinamat yang dapat menghambat HDAC(Histone Deacetylase) secara in silico .
- c. Mengetahui turunan metil sinamat sebagai anti Proliferasi.

1.3 Batasan Penelitian.

- a. Sintesis turunan metil sinamat dengan metode amidasi menggunakan DCC(Dicyclohexylcarbodiimide)
- b. Penapisan turunan metil sinamat sebagai anti Proliferasi.
- c. Penghambat HDAC 2(Histone Deacetylase) secara docking in silico dengan ligan LLX [N-(2-aminophenyl) benzamide].

1.4 Manfaat Penelitian.

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah molekul baru turunan metil sinamat yang dapat menghambat proses epigenetik [HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor secara in silico] dengan jalur sintesis yang mudah dan ramah lingkungan serta dapat mencegah kanker servik.

1.5 Tujuan Penelitian.

Diharapkan molekul baru dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi obat epigenetik, penyakit degeneratif dan kanker servik.

BAB II

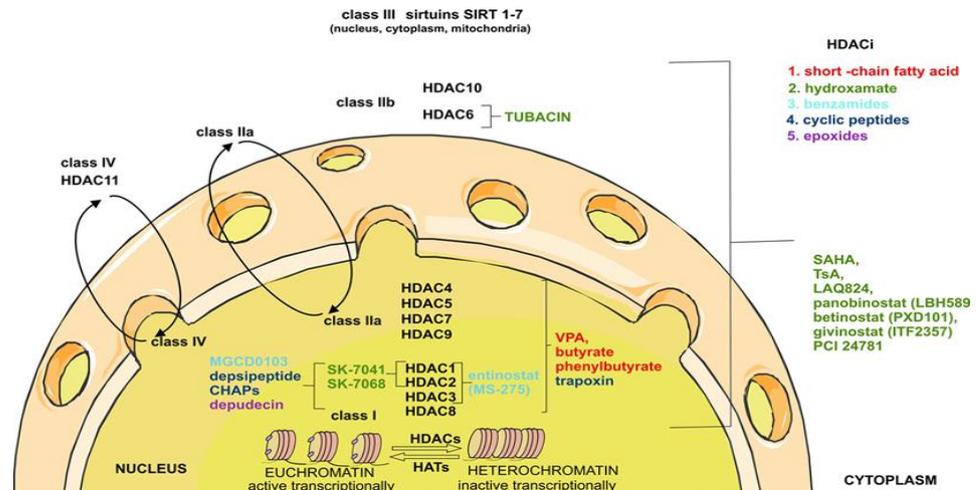
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Histon Deasetilase [HDAC] (Histone Deacetylase) dan Kanker.

Materi genetik di dalam nucleus sel dibalut dengan kromatin. Kromatin berfungsi dalam proses transkripsi, DNA Replikasi, Repair, Damage dan Apoptosis⁽¹⁾ Struktur kromatin sangat menentukan keberhasilan dalam transkripsi dan ekspresi gen⁽²⁾ Banyak faktor yang dapat mempengaruhi kromatin seperti faktor genetik dan epigenetik. Epigenetik memiliki hubungan dengan kerusakan gen akibat termetilisasinya histon yang terdapat dikromatin⁽³⁾. Epigenetik sendiri adalah suatu peristiwa dimana berubahnya fungsi gen secara hereditas tetapi tidak merubah urutan dan komposisi nukleotida⁽¹⁰⁾. Faktor Epigenetik sangat mempengaruhi ekspresi suatu gen⁽¹²⁾.

2.1.1 Mekanisme Biologi Molekular HDAC(Histone Deacetylase).

Histon Deasetilase (HDACs) (Histone Deacetylase) adalah suatu enzim yang penting dalam pengaturan transkripsi gen⁽¹³⁾. Golongan HDAC(Histone Deacetylase) dibedakan menjadi dua yaitu Zn-dependent (Class I and Class II) dan NAD-dependent (Class III) enzim. Zn-dependent menjadi fokus penelitian karena fungsi asetilasi dan regulasi dari siklus sel, cdk inhibitor p21, p53.⁽¹⁴⁾ Karena memiliki efek yang luas dalam pengaturan dan pengendalian sel maka HDAC(Histone Deacetylase) sangat penting menjadi target perancangan obat baru kanker⁽¹⁵⁾. HDAC(Histone Deacetylase) enzim membuang acetyl group dari histone dengan cara mengubah residu histidin, aspartat masing masing dua dan satu residu tirosin yang sangat diperlukan untuk ikatan dengan ion Zn^{2+} ⁽¹⁶⁾



Gambar 1 : Mekanisme HDAC(Histone Deacetylase) dan golongan

Gambar di atas menunjukkan beberapa golongan dari HDCA dan mekanisme kerja di dalam nukleus dengan benang kromatin. Mekanisme kematian sel kanker karena anti-HDAC(Histone Deacetylase) ⁽¹⁶⁾.

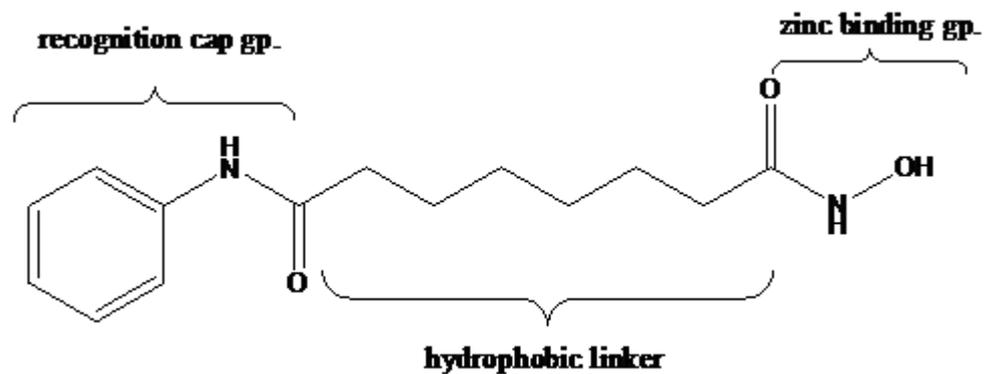
- a. Bekerja pada Death receptor (extrinsic) melalui proses apoptosis.
- b. Bekerja pada Mitochondrial (intrinsic) melalui proses apoptosis.
- c. Menghambat angiogenesis (pembuluh darah).
- d. Menghentikan proses reaktif oksigen species (ROS).
- e. Autophagy dan lain-lain.

2.1.2 Interaksi Kanker Servik dan HDAC(Histone Deacetylase).

Kanker servik secara molekular bertalian dengan aktivitas dan ekspresi dari gen p21WAF1 dan p27KIP1 pada galur sel ,dapat dilihat dari western blot. Aktivitas gen p21WAF1 dan p27KIP1 menyebabkan aktivitas berlebihan dari histon karena mengalami asetilisasi sehingga tidak dapat mengendalikan sel dengan baik ^(17a,b). Peristiwa tersebut mengawali pertumbuhan sel ke arah kanker pada umumnya dan servik pada khususnya. Sel di servik termasuk aktif dalam pembelahan maka erat kaitannya dengan HDAC(Histone Deacetylase) ^(18a,b).

2.1.3 Interaksi HDAC(Histone Deacetylase) dan Turunan asam sinamat.

Mekanisme kerja HDCA Inhibitor secara kimia adalah berinteraksi dengan sistem farmakopor⁽¹⁹⁾. Adapun farmakopor yang dapat berinteraksi jika memiliki tiga bagian aktif yaitu 1.Zinc-binding region 2.Regio Hydrophobik 3.Regio Penutup⁽²⁰⁾



Gambar 2: Struktur Penghambat HDAC(Histone Deacetylase)

Beberapa bahan alam dapat berikatan dengan HDCA dan menghambat reaksi enzimatik tersebut seperti : Trikosantin,Hydroxamat ,Varinostat, M-Carboxycinnamic acid bishydroxamate,Belinostat, Panobinosat,asam sinamat hydrosamat^(21a,b,c). Interaksi terjadi di daerah aktif tempat terjadinya ikatan dengan residu asam amino. Demikian juga interaksi dengan logam Zinc dan daerah penutup mempererat ikatan yang terjadi^(22a,b).

2.2 Penapisan in silico.

Pengembangan suatu molekul baru yang memiliki keaktifan tertentu bukan suatu hal yang mudah dan murah. Di dalam suatu pengembangan molekul baru memerlukan waktu yang lama, dengan dampak negatif yang membahayakan keselamatan manusia.

2.2.1 Model Molekul.

Model molekul adalah suatu cara untuk memvisualisasikan konsep sains. Di dalam penapisan senyawa diperlukan^(23a) :

1. Model molekul adalah suatu bentuk molekul yang dihasilkan oleh diagram dan persamaan matematika yang apabila disusun secara geometris dengan koordinat yang diperoleh dari data-data fisik dan kimia suatu molekul.

Pemodelan suatu molekul dihasilkan oleh gambar tiga dimensi dari suatu permukaan dengan cara X-ray kristalografi dan didata , diolah oleh komputer.

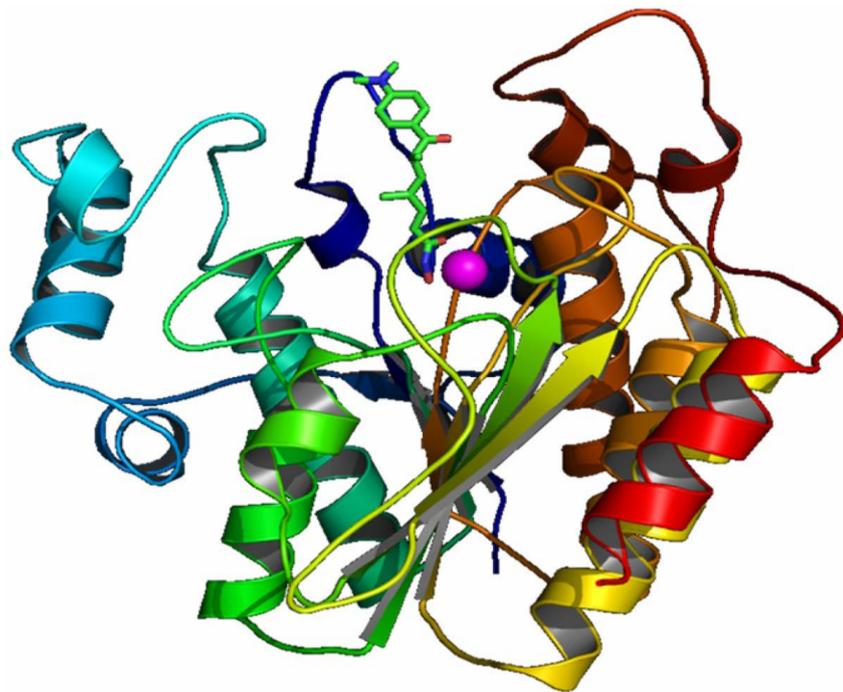
2. Molekul mekanika adalah suatu cara untuk penapisan molekul dengan dasar posisi relatif dari inti atom, dengan gaya mekanikanya di dalam suatu struktur molekul. Beberapa faktor yang menentukan mekanika molekul adalah :
 - a. Energi ikatan.
 - b. Etorsion adalah suatu hambatan bagi sebuah atom untuk berputar dengan menghasilkan suatu sudut putar dan dihitung energi minimum.
 - c. Jarak 2 atom adalah energi yang dihasilkan minimum di antara jarak 2 buah atom.
 - d. Energi kolombik adalah suatu perhitungan energi pada dua buah atom dengan melihat muatan elektrik yang dihasilkan.
3. Dinamika molekul adalah suatu gerak, sifat dari suatu molekul yang ada di alam bebas dan mempengaruhi struktur molekul itu sendiri. Dinamika molekul dapat berubah-ubah sesuai dengan tingkat energi kinertik, termodinamik dan waktu.
4. Mekanika Kuantum Molekul. Mekanika kuantum lebih memandang molekul dilihat dari pergerakan gelombang yang dihasilkan oleh tingkat energi suatu atom dalam suatu molekul. Sehingga di dalam penerapan dapat diketahui ikatan yang mungkin antara molekul dengan tempat aktif.
5. Docking adalah suatu metode dengan model 3D untuk menampilkan perbedaan pandangan dari suatu molekul. Dengan menggunakan metode docking dapat dilihat konformasi, ligan dan tempat aktif.
6. Farmakopores adalah suatu cara untuk melihat ligan dan reseptor. Farmakofor digunakan untuk mencari data guna melihat molekul yang memiliki kemiripan farmakofor.
7. Struktur Protein Modeling adalah suatu model yang disimulasikan dengan model protein.
8. QSAR 3D adalah suatu gambaran 3 arah dari gerak asli sebuah molekul. Qsar digunakan untuk mendesain suatu molekul dengan melihat elektrostatik⁽¹¹⁾.

Keuntungan dan kerugian menggunakan metode laboratorium kering atau in silico. Keuntungan dengan menggunakan metode penapisan secara in silico adalah struktur dan target aktif tidak diperlukan. Parameter yang dihasilkan

adalah suatu perhitungan matematis dengan besaran angka. Dapat dilihat dengan jelas gambaran suatu molekul. Keaktifan molekul dapat diprediksi. Kekurangan menggunakan metode tersebut adalah keterbatasan model, banyak faktor lain yang belum diketahui dan belum ditemukan^(23b).

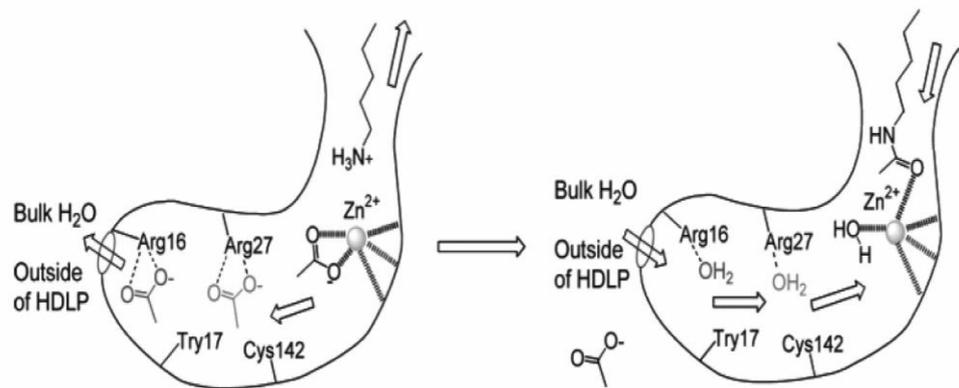
2.2.2 Penapisan dan Permodelan HDAC(Histone Deacetylase) Golongan II.

HDAC(Histone Deacetylase) memiliki ukuran (2.0 Å resolution),struktur X-ray , 11 Å berbentuk lorong yang dalam guna mengikat molekul TSA dan SAHA,sebagai contoh (gambar 1).

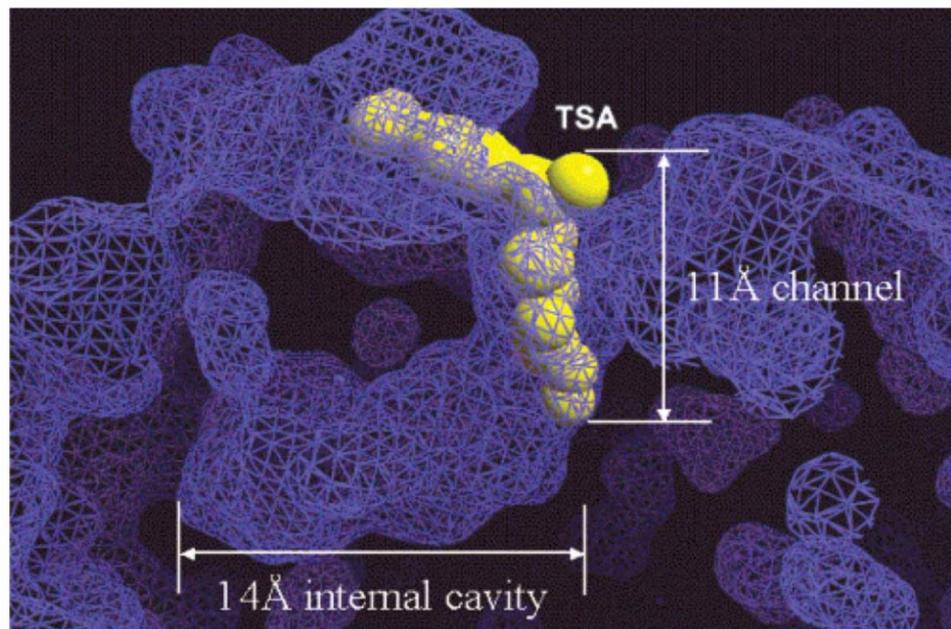


Gambar 3 TSA (Tongkat hijau) di dalam tempat aktif HDAC(Histone Deacetylase) protein. Zn bola magenta .

Rantai panjang mengandung banyak asam amino lisin sebagai rantai yang bersifat hidropobik untuk tempat melekatnya TSA dan SAHA. Sedangkan bagian asam hidrosamik berikatan dengan molekul Zn[II] dibagian tengah^(24a,b).Di bawah rongga bawah terdapat celah 14 Å dengan asam amino di sekelilingnya seperti Arginin, Tyrosin dan Cystein residu (gmb 2 dan 3)⁽²⁵⁾. Dalam permodelan virtual interaksi antar molekul penghambat dan HDCA menjadi acuan keefektifan kerja molekul penghambat tersebut⁽²⁶⁾.



Gambar 4 Celah dengan ukuran 14 Å sebagai tempat reaksi yang aktif untuk mengeluarkan molekul air .



Gambar 5. Permukaan celah 11 Å dan celah 14 Å di dalam rongga HDCA protein.
Molekul TSA berwarna kuning..

Di dalam celah tersebut interaksi molekul akan lebih stabil sehingga memperoleh daya kerja penghambat HDCA yang tinggi⁽²⁷⁾. Dengan celah yang relatif sempit pergerakan molekul dapat lebih lambat sehingga tingkat energi tidak besar yang dapat menimbulkan efektivitas HDAC berkurang sehingga dapat mencegah proses epigenetic⁽²⁸⁾.

2.3 SINTESIS

Sintesis adalah suatu proses dalam pembentukan suatu molekul. Sintesis dibedakan menjadi sintesis secara enzymatic atau biosintesis dan sintesis secara kimia. Dalam sintesis kimia dikenal beberapa jenis sintesis seperti retrosintesis. Sintesis dapat diarahkan supaya molekul memiliki struktur yang stabil dan memiliki kelebihan secara farmakologi dan mengurangi efek toksikologis.

2.3.1. Metil Sinamat.

Metil sinamat digunakan sebagai materi awal dalam sintesis. Metil sinamat diperoleh dari ekstrak rimpang lengkuas. Metil sinamat adalah suatu metil ester dari asam sinamat. Memiliki bentuk fisik tembus pandang sampai berwarna putih dan berupa padatan dengan bau yang cukup menyengat. Di alam banyak terdapat pada tanaman yang terakumulasi di buah seperti strawberi, rimpang seperti: lengkuas dan lain-lain. Penggunaan metil sinamat sebagai wewangian dan penyedap⁽²⁹⁾.

2.3.2 Asam Sinamat.

Asam sinamat diperoleh dari esterifikasi metil sinamat. Asam sinamat memiliki bentuk fisik kristal berwarna putih yang larut di dalam air. Asam sinamat digunakan dalam industri farmasi dan kosmetik serta makanan. Asam sinamat merupakan bagian dari biosintesis sikamat dan penilpropanoid yang di rubah dengan enzim penilalanin ammonia liase⁽³⁰⁾. Asam sinamat larut di dalam benzen, dietil eter dan aseton, hexan. Asam sinamat dapat diperoleh dengan sintesis secara alami melalui biosintesis dan sintesis kimia melalui kondensasi klaisen.

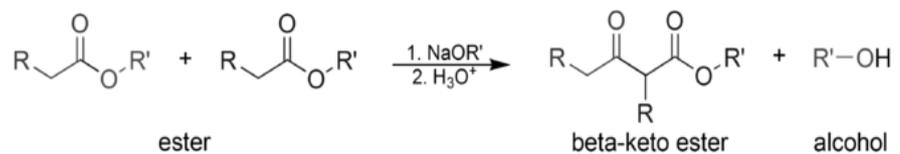
2.3.2.1 Biosintesis Asam Sinamat.

Di alam asam sinamat diperoleh dengan jalur asam sikamat. Phenilpropanoid disintesis di dalam tanaman dari asam amino Phenilalanin memiliki 6 rantai karbon. Termasuk kelompok aromatik phenil dengan 3 karbon propen sebagai ekornya. Asam sinamat merupakan hasil sintesis pertama. Phenil alanin sebagai molekul awal

dalam proses biosintesis yang di rubah oleh enzim phenil alanin ammonia liase⁽³⁰⁾.

2.3.2.2 Sintesis Secara Kimia.

Secara kimia asam sinamat disintesis sesuai cara Rainer Ludwig Claisen (1851–1930) dengan mereaksikan aldehida aromatik dengan ester. Reaksi tersebut dikenal dengan reaksi Kondensasi Claisen. Mekanisme reaksi dengan pembentukan ikatan karbon dan karbon dengan komposisi kedua duanya ester atau salah satunya ester atau karbonil dengan kondisi basa kuat yang berakibat terbentuknya beta-keto ester⁽³¹⁾.



2.3.3 Amidasi Turunan Asam Sinamat dengan Amin.

Proses amidasi adalah suatu reaksi penambahan gugus aktif amin dengan pengantian atom nitrogen pada gugus karbonil dengan struktur R–CO–NR'R". Amin merupakan senyawa organik dan memiliki gugus fungsional yang mengandung atom Nitrogen. Amin adalah turunan ammonia dengan salah satu atom hidrogen diganti dengan alkil atau aril⁽³²⁾

a. Pengolongan Amin.

Amin digolongkan menjadi amin alifatik yaitu amin yang tidak memiliki lingkaran dan amin lingkar atau cincin aromatik yang mempunyai bentuk siklik. Cincin aromatik menurunkan tingkat kebasaan. Kehadiran amin dapat meningkatkan kereaktifan cincin aromatik⁽³³⁾

Pengolongan amin menjadi 4 sub golongan :

1. Amin Primer yaitu apabila ada 3 atom hydrogen dalam ammonia diganti dengan satu alkil atau aromatik seperti metilamin dan etanolamin.
2. Amin Sekunder jika terjadi penggantian dua molekul alil atau aril atau keduanya yang berikatan dengan molekul N ,contoh dimetilamin dan metiletanolamin.

3. Amin Tersier jika ketiga tiga atom hidrogen digantikan seperti trifhenilamin.
4. Amin lingkaran jika memiliki suatu cincin azidin atau piperidin seperti N-phenilpiperidin dan N-metilpiperidin.

b. Ikatan Hidrogen.

Sangat mempengaruhi amin primer dan sekunder. Titik didih menjadi lebih tinggi, menjadikan amin alifatik mudah larut dalam air juga dipengaruhi jumlah atom karbon, sehingga dapat larut dari pelarut organik seperti aseton⁽³⁴⁾.

c. Kiralitas.

Mempengaruhi tingkat energi dan aktivitas optik⁽³⁴⁾.

d. Tingkat Kebasaan.

Amin bersifat basa dan kebasaaan tersebut mengikuti aturan, sebagai berikut⁽³⁴⁾:

1. Grup pengganti.
2. Kesesuaian bangun dan ikatan dengan nitrogen.
3. Kelarutan dan pelepasan proton.

e. Esterifikasi Asam Karboksilat.

Reaksi esterifikasi dengan metoda Fischer memiliki prinsip mencampurkan asam karboksilat dengan alkohol⁽³⁵⁾:



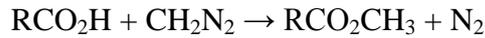
Reaksi lambat karena tidak terdapat katalis. Reaksi esterifikasi adalah reaksi yang reversible. Esterifikasi dapat dihasilkan hasil yang memadai dengan mengikuti aturan Le Chatelier's sebagai berikut :

- Dengan alkohol secara berlebihan.
- Dengan zat yang menyerap air seperti asam sulfat yang dapat berfungsi juga sebagai katalis.
- Membuang air dengan penyulingan pada keadaan azeotrop dengan mencampurkan toluen.

Reagent yang digunakan untuk membuang air adalah campuran alkohol dan asam karboksilat. Selain metoda di atas untuk mengurangi air digunakan metoda Mitsunobu yaitu dengan campuran alkohol dan asam karboksilat

$$\text{RCO}_2\text{H} + \text{R}'\text{OH} + \text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3 + \text{R}_2\text{N}_2 \rightarrow \text{RCO}_2\text{R}' + \text{OP}(\text{C}_6\text{H}_5)_3 + \text{R}_2\text{N}_2\text{H}_2$$

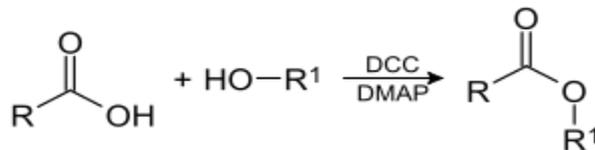
Asam Karboksilat dapat diesterifikasi dengan diazometana



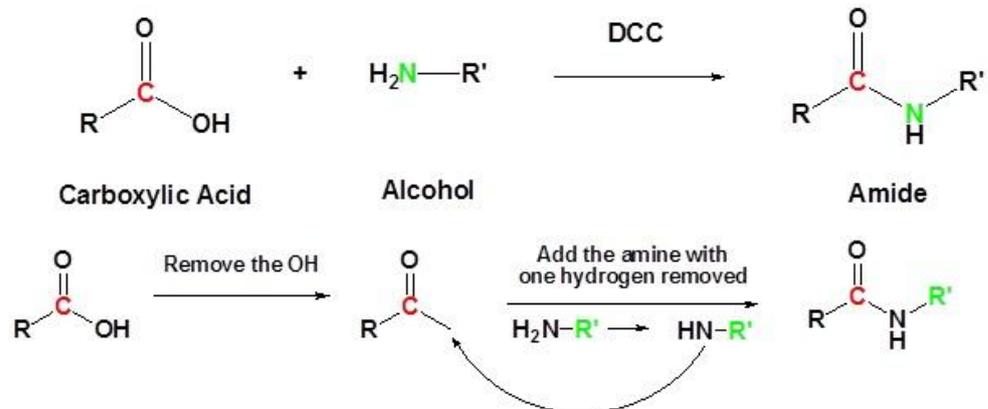
Dengan diazometana, dengan campuran asam karboksilat dapat dirubah menjadi metil ester. Tetapi metode ini hanya digunakan dengan keadaan khusus karena mahal ,khususnya dalam skala industri.

f. Esterifikasi Steglich.

Pertama kali di perkenalkan oleh Woifgang Steglich. Pembentukan ester dalam kondisi temperatur sedang atau ruang. Menggunakan DCC (dicyclohexylcarbodiimide) untuk mengaktifasi asam karboksilat ,berguna dalam reaksi coupling atau penggabungan dan DMAP (4-dimethylaminopyridine) sebagai katalis untuk memindahkan gugus akil. ⁽³⁶⁾⁽⁹⁾

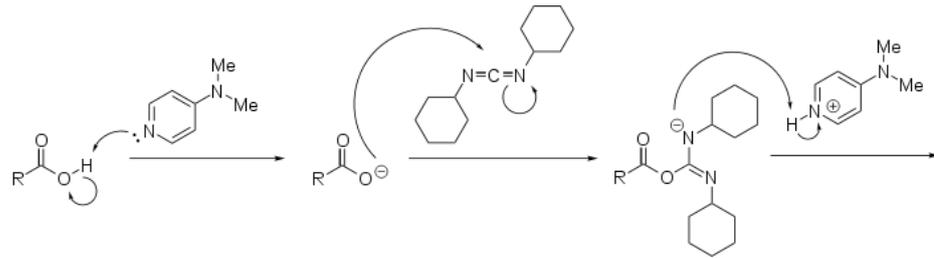


Dasar Reaksi

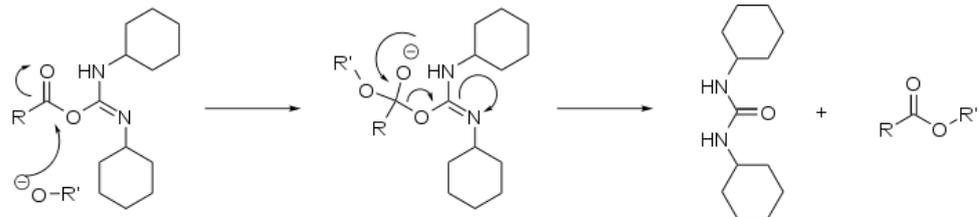


Pelarut yang sesuai adalah diclorometan. Karena reaksi berjalan dalam temperatur menengah maka dihasilkan rbdemen yang baik. Mekanisme reaksi Steglich sebagai berikut :

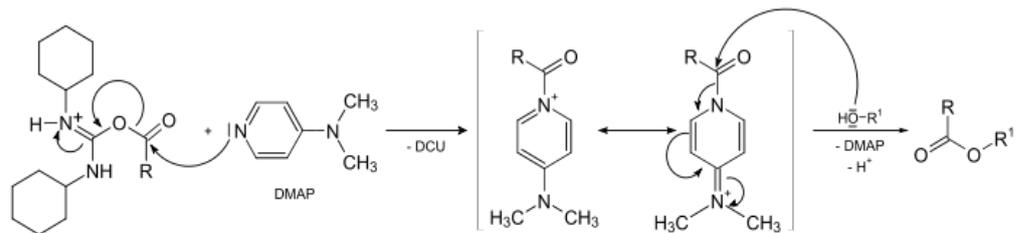
Asam karboksilat bereaksi dengan DCC (dicyclohexylcarbodiimide) membentuk O-acyl isourea, yang mana lebih reaktif dari pada di asam bebas.



Alkohol menyerang produk intermediet sehingga terbentuk DCU dan ester



Dengan amin reaksi tidak bermasalah karena lebih Nukleofilik. Jika esterifikasi lambat maka rantai samping terbentuk. Pembentukan baik untuk berikatan dengan alkohol. Untuk menekan reaksi diperlukan DMAP.



2.3.4 Dietilamin.

Adalah golongan Amin Sekunder dengan komposisi molekul $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$. Memiliki sifat mudah terbakar, basa yang kuat dalam bentuk cair, tidak berwarna kecuali ada pengotor akan menjadi kecoklatan. Tidak bercampur dengan air, mudah menguap. Dibuat dengan campuran Etanol dan Amonia. Digunakan dalam industri farmasi. Korosif terhadap logam dan iritan terhadap kulit. ⁽³⁷⁾

1. Reagen Untuk Amidasi.

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide [DCC] digunakan dalam reaksi penggabungan asam amino pada pembuatan peptide secara sintesis dan mengaktifkan gugus karbonil sehingga terjadi reaksi penggabungan. larut dalam diklorometan, tetrahidrofur, aceonitril dan dimetilformamid tetapi tidak larut dalam air. ^[37]

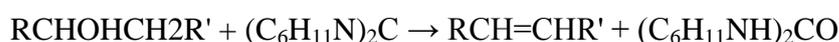
2. Oksidasi Moffatt

Campuran dari DCC (dicyclohexylcarbodiimide) dan dimetil sulfoxid (DMSO) dinamakan efek Pfitzner-Moffatt oksidasi. Prosedur ini digunakan untuk mengoksidasi alkohol, keton, dan aldehida. Pada asam karboksilat reaksi tersebut menjadi reaksi intermedit. ^[37].

3. Dehidrasi

Alkohol dapat di dehidrasi dengan DCC(dicyclohexylcarbodiimide). Reaksi diawali dengan pembentukan ^[37]

O-acylurea intermedit ketika di hidrogenisasi membentuk alken:



2.3.5 Dimetilaminopiridin (DMAP) .

Suatu keturunan piridin dengan rumus molekul $(CH_3)_2NC_5H_4N$. Secara fisik tidak berwarna. Berguna dalam katalisis yang bersifat nukleofilik dalam esterifikasi dengan anhidrida, steglich dan lain-lain. ⁽³⁸⁾

2.4 METODE PEMISAHAN DAN PEMURNIAN

Pemisahan dan pemurnian diperlukan setelah hasil suatu sintesis zat kimia. Pemurnian dan pemisahan untuk mendapatkan suatu isolat murni dan jumlah rendemen yang memadai. Metode pemisahan dan pemurnian dipengaruhi oleh faktor pemilihan peralatan, metode, kolom, pelarut, detektor, dan lain-lain. ⁽³⁹⁾.

1. Kromatografi.

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu di antaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Pada proses sintesis derivat metil sinamat digunakan proses pemurnian kromatografi :

- 1) Kromatografi Lapis Tipis dan preparatif.

Pada kromatografi lapis tipis, zat penyerap merupakan lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapisi dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka dan pemisahan yang tercapai dapat didasarkan pada adsorpsi, partisi, atau kombinasi kedua efek, tergantung dari jenis zat penyangga, cara pembuatan, dan jenis pelarut yang digunakan.

2) Kromatografi kolom.

Prinsip kerja kromatografi kolom yaitu dengan fase diam dalam kolom dengan menggunakan silika gel dan fase gerak dengan hexan dan asetilasetat, dengan terlebih dahulu dicoba kepolarannya dengan zat yang akan kita peroleh.

2.5 ELUSIDASI TURUNAN METIL SINAMAT.

Hasil turunan metil sinamat setelah disintesis secara kimia, harus dielusidasi untuk menetapkan struktur molekul baru yang terbentuk. Beberapa metode untuk penentuan struktur didasarkan pada karakter molekul secara struktur fisik seperti stereotipe, ikatan, elektromagnetik, dan serapan panjang gelombang. Secara kimia dapat diamati dengan beberapa pereaksi kimia dan terbentuknya fragmentasi. Peralatan yang digunakan adalah sebagai berikut⁽³⁹⁾ :

1. Spektroskopi UV-Visibel

Spektroskopi ini didasarkan pada serapan sinar UV tampak yang menyebabkan terjadinya transisi di antara tingkat energi elektronik molekul. Penyerapan sinar UV tampak oleh suatu molekul akan menyebabkan transisi di antara tingkat energi elektronik dari molekul. Kegunaan spektrometri UV tampak adalah untuk identifikasi jumlah ikatan rangkap / konjugasi aromatik. Misalnya : untuk membedakan diena terkonjugasi & tidak, diena konjugasi & triena terkonjugasi dan sebagainya.⁽¹²⁾

2. Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi inframerah / infrared [IR] berkaitan dengan vibrasi molekul.

Aplikasi Spektroskopi Inframerah

- a. Penentuan identitas dengan menggunakan sidik jari [*finger print*].
- b. Identifikasi Gugus Fungsi.

Untuk identifikasi gugus fungsi digunakan tabel-tabel / grafik-grafik korelasi. Cara mendapatkan tabel/grafik korelasi adalah sebagai berikut. Beberapa aturan berikut merupakan pegangan umum dalam identifikasi gugus fungsi.

1.) Dicari pada daerah di atas 1400 cm^{-1} dan di bawah 900 cm^{-1} .

Frekuensi vibrasi gugus lebih berharga daripada pita-pita adsorpsi tunggal

Contoh :

Jika terdapat $\nu_{\text{C=O}}$, masih belum dapat ditentukan sampel berasal dari kelompok senyawa apa, karena gugus C=O mungkin berasal dari keton, aldehida, ester, amida atau asam karboksilat. C=O ester $[\text{RCOOR}] \rightarrow$ selain $\nu_{\text{C=O}}$ harus ada $\nu_{\text{C-O}}$

C=O amida $[\text{RCONH}_2] \rightarrow$ selain $\nu_{\text{C=O}}$ harus ada $\nu_{\text{C-N}}$ dan $\nu_{\text{C-H}}$ [bending]

2.) Tidak adanya adsorpsi karakteristik lebih berharga daripada adanya adsorpsi karakteristik tersebut.

Contohnya, jika ada $\nu_{\text{C=O}}$ pasti bukan dari kelompok keton/aldehida/ester/amida/asam karboksilat. Sebaliknya ada $\nu_{\text{C=O}}$ belum dapat disimpulkan dari kelompok apa.

3.) Senyawa-senyawa dengan lebih dari satu gugus fungsi, biasanya gugus fungsi ini akan memperlihatkan pita adsorpsinya sendiri-sendiri [karakteristik], kecuali ada interaksi dari gugus-gugus fungsi tersebut.

4.) Tabel/grafik korelasi dibuat tanpa memperhatikan pengaruh / karakteristik – karakteristik aneh/tidak lazim dalam senyawa tersebut.⁽¹³⁾

3. Spektroskopi Massa.

Molekul di kenai dengan ion penghantam sehingga terfragmentasi dan fragmen fragmen tersebut dianalisis sehingga berat molekul diketahui

4. Spektroskopi Resonansi Magnet Inti [NMR]

Aplikasi NMR antara lain untuk:

- a) Penentuan struktur senyawa organik,
- b) Elusidasi mekanisme reaksi,
- c) Elusidasi aspek-aspek stereokimia dalam senyawa organik.

Dengan NMR, dapat diketahui sifat-sifat magnet dari inti atom-atom yang ada dalam senyawa sehingga dapat memberikan informasi dalam penentuan struktur senyawa tersebut. Resonansi Magnet Inti yang dikenal ada dua macam, yaitu

Resonansi Magnet Inti Atom Hidrogen [H-NMR] dan Resonansi Magnet Inti Atom Karbon [^{13}C -NMR].

Terjadinya Resonansi.

Jika ada benda bermuatan bergerak, akan timbul medan magnet. Inti atom dan elektron juga merupakan benda bermuatan sehingga jika bergerak juga akan menimbulkan medan magnet. Perputaran [*spinning*] inti pada sumbunya akan menghasilkan dipol magnet sepanjang sumbu tersebut. Masing-masing inti mempunyai bilangan spin inti [I]. Besar nilai I merupakan fungsi dari bilangan massa inti.⁽¹⁴⁾

Pengaruh Medan Magnet dari Luar.

Apabila suatu inti menerima medan magnet seragam dari luar, akan terjadi sejumlah orientasi yang banyaknya tergantung pada bilangan spin I.

Pergeseran Kimia [Chemical Shift]

Pergeseran kimia ialah perbedaan frekuensi resonansi suatu jenis proton terhadap proton standar. Pengukuran pergeseran kimia tidak pernah dilakukan secara absolut, tetapi dilakukan relatif terhadap proton standar, yaitu proton tetrametil silan [TMS = Si (CH₃)₄].

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pergeseran Kimia

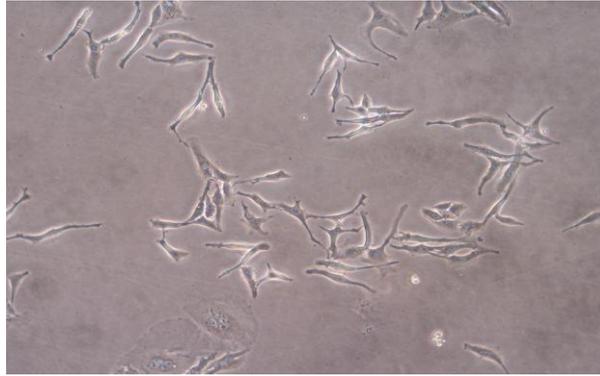
Pergeseran kimia dipengaruhi oleh : 1) Faktor intramolekul, yang meliputi : (a) Efek induksi, (b) Van der Waals *Deshielding*, dan (c) Anisotropi ikatan kimia ; 2) Faktor Konsentrasi, pelarut, dan suhu ; serta 3) Faktor intermolekul, terutama ikatan hidrogen.

2.6 UJI AKTIFITAS.

1. Uji anti-Proliferasi dengan Kultur Sel HeLa

Kultur Sel Hela

sel Hela diperoleh dari Institut Pertanian Bogor, Bogor, Jawa Barat, Indonesia . Sel induk yang rutin dikultur dalam medium DMEM ditambah dengan 10% serum janin sapi, 100 unit / ml pencillin dan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin pada 370 C inkubator mengandung CO₂ 5%.⁽⁴⁰⁾



Gambar 6. Tinjauan, dari sebagian dari spesimen biopsi yang diambil dari leher rahim dari Ms Henrietta Lacks.

Epitel skuamosa di bagian kanan atas tampak normal. Bagian dari epitel di kiri atas mengandung karsinoma in situ, ditunjukkan dalam B. Bagian dari spesimen di pameran kiri bawah infiltrasi karsinoma, ditunjukkan dalam C. B, Karsinoma in situ dengan reaksi sel inflamasi dalam stroma. C, Infiltrasi karsinoma. D, Infiltrasi karsinoma menunjukkan pleomorfisme ditandai sel-sel ganas (hematoxylin-eosin, perbesaran asli 5 [A], 64 [B dan C], 100 [D]).

2.7 KORELASI HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor dan Anti- Proliferasi pada HeLa sel dari TURUNAN METIL SINAMAT [HIPOTESIS].

Hasil sintesis diuji coba secara in silico sebagai penghambat HDAC(Histone Deacetylase) serta untuk anti Proliferasi dengan galur sel HeLa.

1. Zat X dirancang sebagai penghambat dan anti tumor servik pada target HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor Secara in Silico dan kultur sel HeLa.
2. Apabila penapisan in silico mendapat hasil yang positif, maka Zat X merupakan calon untuk penghambat HDAC(Histone Deacetylase) pada proses epigenetik.
3. Zat X yang terbentuk diuji secara in vitro dengan galur sel HeLa.
4. Apabila kedua uji tersebut positif maka dapat disimpulkan:

Zat X memiliki aktivitas mencegah proses epigenetik yang melalui jalur HDAC(Histone Deacetylase) dan galur sel kanker servik HeLa.

BAB III

RANCANGAN PENELITIAN

3.1 Prinsip penelitian.

Rancangan dalam penelitian menggunakan metode eksperimen, karena memerlukan kondisi buatan guna mendapatkan hasil penelitian. Pada penelitian akan dilakukan tahapan sebagai berikut⁽⁴¹⁾ :

- Pada tahap kedua penelitian diarahkan kepada sintesis turunan metil sinamat. Dimulai dengan molekul awal metil sinamat dengan reaksi esterifikasi dihasilkan asam sinamat yang selanjutnya di amidasi dengan dimetilamin.
- Turunan metil sinamat yang terbentuk selanjutnya diuji keaktifannya dengan sel HeLa yaitu galur sel kanker serviks.
- Apabila memiliki keaktifan yang memadai sebagai anti kanker [IC50] maka molekul tersebut dielusidasi untuk menentukan struktur bangunnya.
- Bagian penapisan *in silico*. Pada bagian ini dilakukan beberapa pekerjaan seperti mendapatkan target molekul yang sesuai pada proses epigenetik dan Tumor. Dilakukan dengan alat bantu program komputerisasi kimia guna mengetahui kemungkinan kandidat sebuah molekul yang memiliki keaktifan anti HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor dan anti sel HeLa.

3.2 Rancangan Sintesis Turunan Metil Sinamat

Sintesis dirancang dengan dua tahap reaksi yaitu reaksi hidrolisis dengan bantuan NaOH dan menghasilkan asam sinamat.

Rancangan tahapan berikutnya adalah reaksi amidasi dengan menggunakan DCC(dicyclohexylcarbodiimide) sebagai katalis dan DMAP sebagai prekursor. Dengan rancangan reaksi berikut

Untuk senyawa amit menggunakan diletil amid.

3.3 Pengujian bioaktifitas senyawa

- Penapisan in silico dilakukan dengan metode software yang ada dengan data data molekul yang ada dan di ujikan secara siliko di komputer.
- Pengujian sampel dilakukan di lab kultur jaringan mamalia untuk uji coba anti Proliferasi dengan mencari konsentrsi hambatan atom IC50
- Pengujian toxisitas dengan metode BLST

3.4 Tempat Penelitian

Penelitian sintesis derivat metil sinamat dilakukan di laboratorium Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong, Tangerang, Provinsi Banten. Penapisan virtual di laboratorium Bioinformatika fakultas MIPA Jurusan Farmasi Universitas Indonesia, Depok, Provinsi Jawa Barat. Penelitian aktivitas terhadap sel HeLa dilakukan di Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat.

BAB IV

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan secara In Silico/Dry Laboratory pada pengerjaan virtual docking. Pada sintesis, uji keaktifan dilakukan di dalam wet laboratory. Peralatan dan bahan pada laboratorium kering berupa perangkat komputer sedangkan pada laboratorium basah menggunakan standar prosedur yang berlaku. Untuk hewan uji dilaksanakan dengan ketentuan sesuai etika biomedik yang berlaku dimana memperlakukan hewan uji secara baik dan benar serta beretika.

4.1 Peralatan dan Alat.

- Perangkat komputer dengan program molecular docking.[Autodoc]
- Perangkat sintesis kimia organik.
- Kromatografi lapis tipis dan preparatif.
- Kromatografi Kolom.
- Spektrofotometer UV-Vis.
- Spektrofotometer IR.
- Spektrofotometer Masa LC-MS : Mariner Biospectrometry
- NMR.Jeol 500 MHz
- Perangkat laboratorium kultur jaringan mamalia dengan biosafety level 3.
- Lampu Ultraviolet 265

4.2 Bahan :

- HCl (teknis)
- NaOH (teknis)
- Ethanol(teknis)
- Metil Sinamat
- Dietilamin. (PA, Merck)
- DCC(Dicyclohexylcarbodiimide). (PA, Merck)
- DMAP(Dimethylaminopyridine) . (PA, Merck)
- Butanol(teknis)
- Piridin. (PA, Merck)
- Galur Sel HeLa
- Media kultur jaringan mamalia

4.3 Cara kerja

1. Sintesis Derivat Metil sinamat⁽⁴³⁾.

- a. Tahap pertama adalah reaksi hidrolisis. Ke dalam labu 250ml di masukkan metil sinamat kemudian tambahkan MM NaoH dan pelarut ethanol panaskan pada 55 °C selama 4 jam. Lakukan proses penetralan dengan HCl 1N sampai netral murnikan dengan butanol .Lakukan prosedur a di dalam lemari asam.
- b. Tahap reaksi kedua amidasi hasil reaksi hidrolisis berupa asam sinamat diletakkan dalam labu 150ml tambahkan dietil amin,DCC, DMAP, dan Piridin.Panaskan dalam suhu 55 derajat setelah 4 jam terbentuklah senyawa dari golongan amid. Lakukan prosedur b dalam lemari asam.
- c. Isolat murni dilakukan ELUSIDASI dengan peralatan [UV, IR, MS, dan NMR]. Elusidasi dilakukan guna menentukan struktur molekul turunan metil sinamat.

2. Penapisan in Silico HDAC (Histone Deacetylase) inhibitor

Mengumpulkan Homo sapiens Kelas II urutan HDAC (Histone Deacetylase) dan struktur 3D-nya.⁽⁴²⁾ Mengumpulkan Kelas Homo sapiens II urutan HDAC (Histone Deacetylase) dilakukan dengan men-download dari database protein di situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Kelas Homo sapiens II HDAC(Histone Deacetylase) 3D struktur kristal yang didownload dari situs database PDB struktural (<http://www.rcsb.org/pdb>). Urutan dianalisis untuk menentukan apakah ada urutan yang baru akurat atau tidak. Urutan konservasi di kelas situs Homo sapiens II HDAC(Histone Deacetylase) katalitik CLUSTALW urutan beberapa penyelarasan dari Homo sapiens Kelas II dikumpulkan urutan HDAC(Histone Deacetylase) dilakukan. Hasil keselarasan dianalisis dengan BioEdit, dalam rangka untuk mendapatkan situs katalitik yang ada. Informasi kawasan konservasi adalah hasil dari Kelas keselarasan Homo sapiens II HDAC(Histone Deacetylase) urutan dengan urutan 3D struktur. Urutan untuk pemodelan akan menjadi salah satu yang mirip dengan struktur kristal dari Homo sapiens Kelas II HDAC(Histone Deacetylase). Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya, yang menggunakan Kelas II HDAC(Histone Deacetylase) Homo sapiens Jika hasil dari sequence alignment

adalah sama dengan yang sebelumnya, Kelas II HDAC(Histone Deacetylase) Homo sapiens struktur akan dihasilkan dari itu, tanpa perlu melakukan proses lain pemodelan homologi.

Rancangan Turunan Metil Sinamat.

Studi awal dari SAR. Struktur LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide). dan dimodifikasi LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide). dirancang dengan menggunakan ChemSketch 12,0 software. Berbagai LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide). Modifikasi yang digunakan. Output dari ChemSketch 12,0 dalam format mol. Ini berfungsi sebagai masukan untuk docking simulasi dengan kelas II HDAC(Histone Deacetylase) dari Homo sapiens, dan untuk menguji farmakologi dan atribut toksisitas. Ligan yang disimpan dalam format Molfile MDL. Kemudian, mereka dikonversi ke format pdb dengan menggunakan OpenBabel 2.2.3 atau perangkat lunak Vegazz.⁽⁴²⁾

Persiapan docking kelas II HDAC(Histone Deacetylase) Homo sapiens.

Kelas II HDAC(Histone Deacetylase) Homo sapiens struktur file disiapkan dalam format pdb. Kemudian, variasinya: HDAC 2, yang dimuat dengan Alat AutoDock, dan hidrogen kutub ditambahkan ke masing-masing HDAC(Histone Deacetylase) tersebut. Selain ini berguna untuk memberikan biaya parsial / biaya Gasteiger kepada enzim. Kemudian, disimpan dalam format pdbqt. Kemudian, anka Zn kelas Homo sapiens HDAC(Histone Deacetylase) II dikonversi 0-2 dengan menggunakan script python. Kemudian, molekul telah disesuaikan sebagai makromolekul untuk proses docking.⁽⁴²⁾ Molekul yang akan di dockingkan adalah DES [N,N Dietl sinamamida].

Persiapan file kelas HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor II Homo sapiens.

Penghambat atau ligan dalam format pdb yang dimuat dengan perangkat lunak Alat . Kemudian, torsi ligan tersebut disesuaikan berdasarkan jumlah total obligasi dibalik. Ligan yang disimpan dalam format pdbqt.⁽⁴²⁾

Grid kotak persiapan.

Langkah-langkah persiapan yang dimulai oleh menggunakan file pdb dari Homo sapiens Kelas II HDAC(Histone Deacetylase) sebagai reseptor, dan LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide).dengan modifikasi berbagai ligan. Kotak Grid adalah penentuan wilayah koordinat untuk proses docking. Hal ini dikonfigurasi dalam

Alat AutoDock. Kotak kotak ukuran untuk docking HDAC 2.. Hasil docking model terbaik kemudian diambil. Kotak grid disimpan dalam kotak parameter format file (GPF).⁽⁴²⁾

Docking simulasi.

Proses ini dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan 4.2 AutoDock. Data berikut ini diperlukan untuk melakukan docking: enzim file dalam format pdbqt, ligan dalam format pdbqt, file GPF, file DPF. Algoritma yang digunakan adalah Algoritma Genetika Lamarck (LGA) dengan ukuran populasi 150, energi evaluasi $2,5 \times 10^6$ dan pencarian berjalan dari 100 kali dalam rmsd dari 1,5.⁽⁴²⁾

Analisis dan visualisasi hasil simulasi docking

Hasil docking AutoDock 4.2 dalam format file log docking (dlg). Kemudian, dengan menggunakan script python, hasil docking dikonversi ke format pdb. Dari 100-model hasil, satu model terbaik dijemput, berdasarkan data energi ikatan bebas, untuk menganalisis interaksi.⁽⁴²⁾

Penapisan Obat

Hal ini dilakukan untuk menentukan, apakah inhibitor telah memenuhi persyaratan sebagai calon obat berdasarkan Peraturan Lipinski tentang Five. Hal ini dilakukan dengan menggunakan Filter Lipinski, Molinspiration, Osiris Properti Explorer, Toxtree v2.1.0 dan software Lazar.⁽⁴²⁾

Molinspiration dan Lipinski Filter yang digunakan untuk menganalisis atribut molekul, seperti Log P, jumlah donor ikatan hidrogen, jumlah akseptor ikatan hidrogen, dan massa molekul obat. Selain itu, Osiris Property Explorer, Toxtree v2.1.0, dan Lazar dihitung atribut berbagai obat-obatan, seperti keracunan, rupa narkoba, dan skor narkoba.

Untuk menggunakan Filter Lipinski, ligan dalam format pdb harus diupload ke situs web perangkat lunak analisis. Hal yang sama berlaku untuk Molinspiration, Lazar, dan Toxtree v2.1.0, karena ligan dalam format tersenyum harus diupload ke situs Web mereka. Namun, untuk menggunakan Osiris Property Explorer, ligan dapat ditarik secara offline.

3. Uji HeLa sel.

Kultur Sel Hela.

Metode proliferasi assay-XTT Pengantar:(XTT) dirancang untuk kualifikasi non-radioaktif, spektrofotometri sel proliferasi dan kelangsungan hidup pada populasi sel menggunakan format 96-well-plate. Hal ini dapat digunakan untuk: ⁽⁴⁰⁾

1. Pengukuran proliferasi sel dalam melihat faktor pertumbuhan, sitokin, mitogens, dan nutrisi.
2. Analisis senyawa sitotoksik dan sitostatik, seperti obat anti-kanker dan senyawa lainnya.
3. Penilaian pertumbuhan-hambatan antibodi dan mediator fisiologis.

Pengujian didasarkan pada pembelahan XTT garam tetrazolium dengan adanya elektron- kopling reagen, menghasilkan garam formazan larut. Konversi ini hanya terjadi pada sel-sel yang normal. Sel tumbuh dalam 96-well-plate kultur jaringan diinkubasi dengan campuran pelabelan XTT selama 2 jam.

PROTOKOL

Bahan	Reagen	Peralatan
Galur Sel Hela	Kendali RPMI 1640 media	96-well kultur jaringan plate
	Hidrogen peroksida (H ₂ O ₂) Peroksida konsentrasi: 3% dan 1,5%	Pipet saluran tunggal
	XTT-(2,3-bis [metoksi-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolin-5-carboxyanilide	LABSYSTEMS Multiskan MCC/340

Tabel 1 : Uji Sel He La

Persiapan Penggantian Sel:

1. Buatlah larutan tripsin pada suhu 37 ° C di pemanas air.
2. Buka laminar air dan meja kerja dibersihkan dengan etanol 70%.
3. Keluarkan media lama dari plate menggunakan tips biru bersih atau pipet plastik.

4. Tambahkan PBS (3 ml) ke plate kultur jaringan, berhati-hatilah untuk tidak mengganggu lapisan atas sel. Bilas sel kocok perlahan plate bolak-balik. Bilas dengan PBS dan dibuang.
5. Tambahkan 1 ml larutan tripsin ke sel dan batu piring untuk memastikan bahwa seluruh monolayer ditutupi dengan solusi tripsin. Meninggalkan sel pada 37 ° C dalam incubator untuk maksimum 2 menit (sekitar 75% sel bulat bentuk, memantau morfologi sel dengan menggunakan mikroskop cahaya).
6. Buanglah tripsin sangat lembut dan tambahkan 2 ml media segar ke sel dengan pipet secara perlahan dari bawah sampai merendam seluruh sel.
7. Siapkan media baru dan tambahkan media segar (10 ml).
8. Pindahkan 1 ml sel yang dilarutkan kembali ke plate baru yang berisi media (tetap 1 ml dan larutkan kembali sel yang akan digunakan dalam bagian berikutnya).
9. Tempatkan sel yang telah disubkultur ke inkubator.

Persiapan Sel:

Plate dengan sel disiapkan pada hari sebelum percobaan. Suspensi single sel yang diperoleh dengan trypsinisasi yang baik untuk setiap sumur (sel / baik). Plate dimasukkan ke inkubator, di mana sel-sel disimpan selama 24 jam dalam kondisi kultur standar ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5,0\%$).

Persiapan Uji Kematian Sel:

1. Siapkan berbagai konsentrasi hidrogen peroksida dan tambahkan 100 ml campuran untuk masing-masing dengan baik. Periksa tata letak.
2. Meletakkan plate ke inkubator dan kultur untuk 0,5 jam ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5,0\%$).
3. Siapkan 2,5 ml larutan diaktifkan-XTT dan menambahkan 50 ml diaktifkan- XTT solusi untuk masing-masing dengan baik (kondisi gelap!). Persiapan diaktifkan- XTT dengan larutan XTT reagen alikuot pada 37 ° C. pusingkan perlahan sampai larutan rata tercampur. Tambahkan 25 ml reagen aktivasi sampai 2,5 ml XTT reagen-> Langkah ini harus dilakukan dalam kegelapan:

- a. Kembalikan piring dengan kultur inkubator sel untuk 2 (dalam kegelapan)
- b. Setelah inkubasi ini efek sitotoksik peroksida akan diperiksa dengan pemindai MCC/340 pada panjang gelombang 450 nm dan pada 692 nm.

4.4 Analisis Data pada Inhibitor Concentration 50

Pada analisis data Inhibitor Concentration [IC50] untuk Uji anti kanker dengan HeLa Sel perhitungan dengan probit analisis. Prinsip IC50 adalah dosis respon dimana zat aktif yang dimetabolis sesuai efek letalitas dan juga konsentrasi. Grafik hubungan dosis respon dibuat dengan analisis probit .⁽⁴³⁾

Analisis data pendukung dengan Brine Shrimp Lethality Test atau Uji Toksisitas dengan Udang Renik *Artemia salina*. Hasil dianalisis juga dengan Probit analisis

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

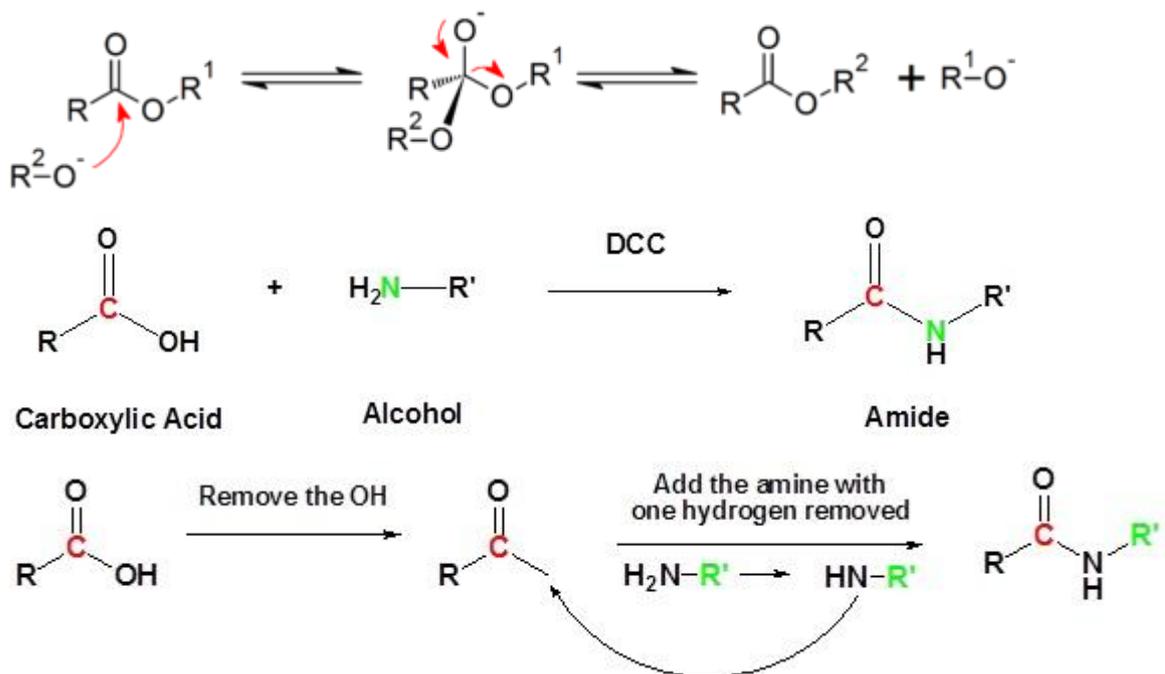
5.1 Hasil Reaksi Derivat Metil Sinamat.

Metil trans sinamat adalah suatu metil ester dari asam sinamat. Diperoleh dengan cara mengextrak dari tanaman lengkuas [*Apina galangal*]. Reaksi diawali dengan langkah Hidrolisis Ester dan amidasi.

Langkah Pertama – Hidrolisis Ester

Proses penggantian gugus organik R'' dari suatu ester dengan gugus organik R' dari Alkohol, reaksi tersebut selalu dikatalisis oleh asam atau basa. Pada reaksi di bawah digunakan NaOH 2M sehingga kondisi menjadi basa kuat sebagai katalis. Basa yang kuat akan mengisir proton dari Alkohol sehingga lebih nukleofilik. Mekanisme reaksi terjadi pada gugus karbon karbonil pada Metil trans Sinamat dengan serangan nukleofilik sehingga terbentuklah suatu Alkoksida [R²O⁻]. Etanol yang digunakan dalam proses di bawah akan berkonjugasi juga dalam kondisi basa menjadikan molekul oksigen menjadi negative [RO⁻] sehingga terbentuk intermediate tetrahedral. Selanjutnya terbentuklah suatu bentuk transesterifikasi [RCOOR₂] yaitu Asam Sinamat. ⁽³⁶⁾

Reaksi Dasar Transesterifikasi



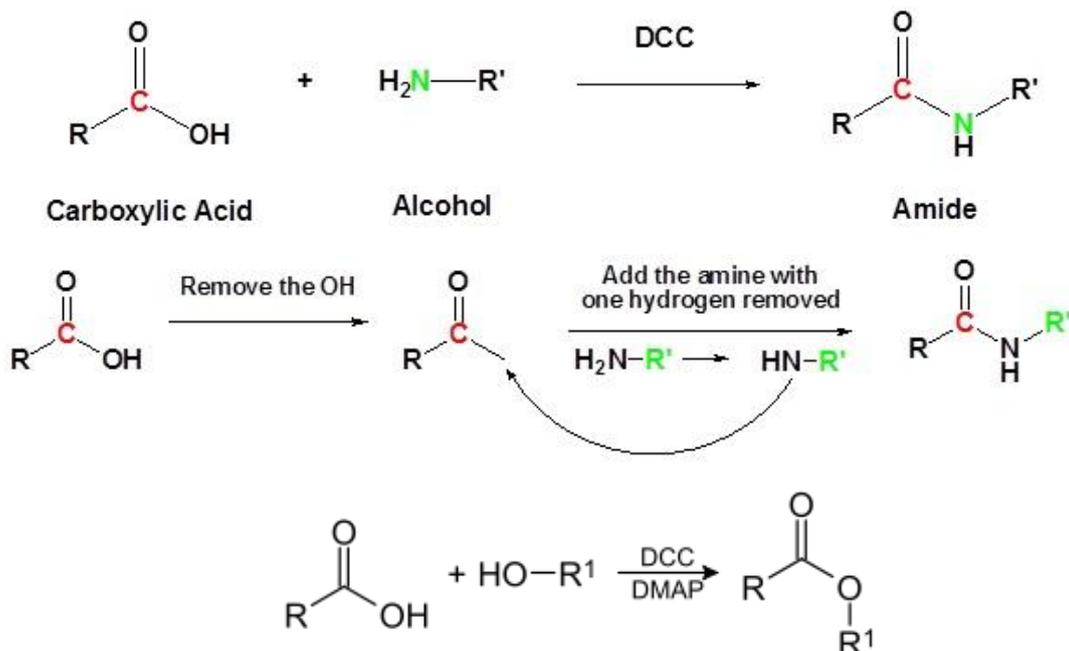
Reaksi Transesterifikasi pada Metil Trans Sinamat

Setelah melalui proses penetralan dengan HCl 1 N sampai netral dan dicuci dengan Butanol dihasilkan rendemen 80%. Bentuk Kristal yang terbentuk berwarna putih.

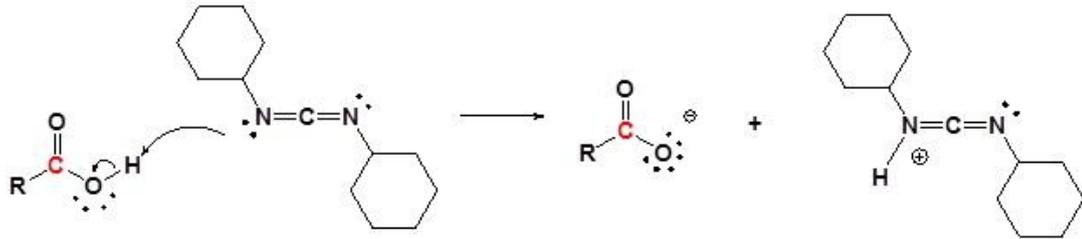
Langkah Kedua – Amidasi

Asam sinamat [Starting Material] yang terbentuk pada langkah pertama selanjutnya dilakukan reaksi Amidasi. $RC(=O)NR_2$. Reaksi tersebut berdasarkan reaksi esterifikasi yang telah dimodifikasi oleh Steglich dengan cara Coupling atau penggabungan antar molekul, dalam reaksi ini menggabungkan asam sinamat dengan dietilamin. Reaksi Steglich menggunakan DCC [Dicyclohexylcarbodiimide]. Sebagai Katalisator Penggunaan metode Steglich dengan suhu $60\text{ }^\circ\text{C}$ dengan lama reaksi 4 jam dalam kondisi suhu stabil dan diaduk secara sinambung. Reaksi sesuai persamaan di bawah ini ⁽³⁶⁾:

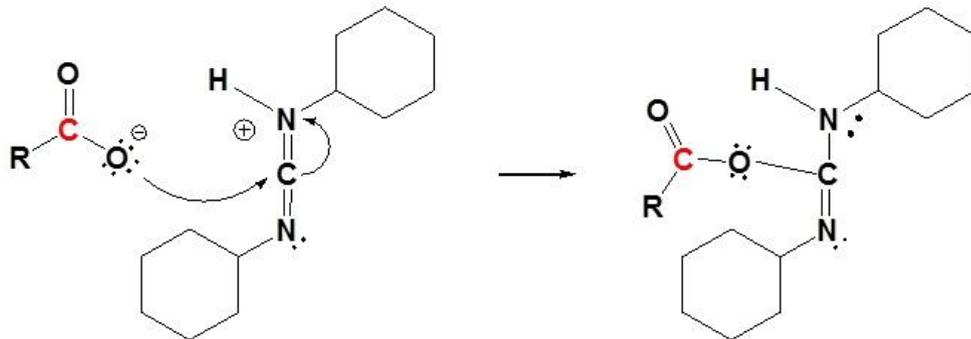
Dasar Reaksi



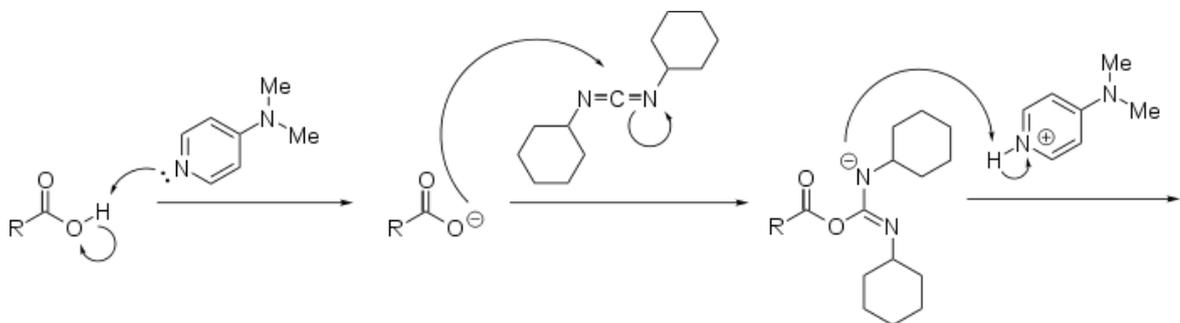
Deprotonisasi



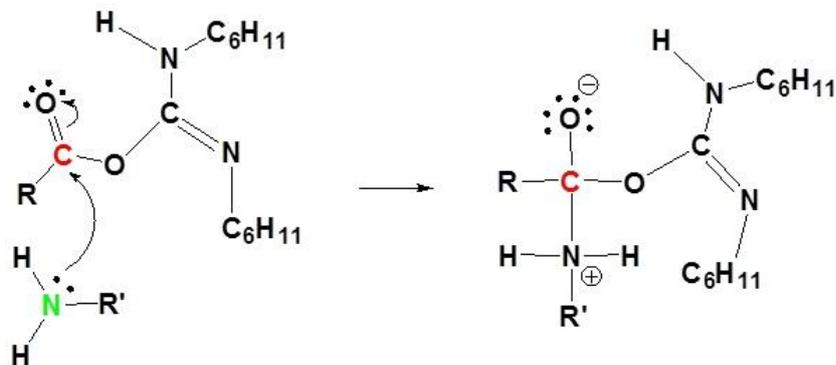
Reaksi Nucleophilic berikatan dengan carbokylate



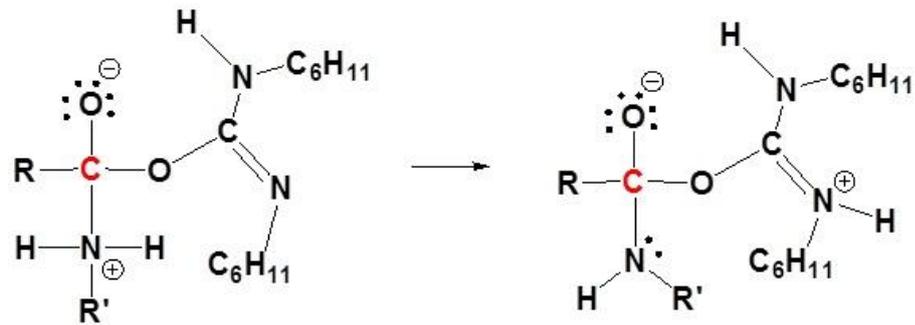
Asam Karboksilat – Asam Sinamat bereaksi dengan DCC [Dicyclohexylcarbodiimide] dan membentuk O-acyl isourea



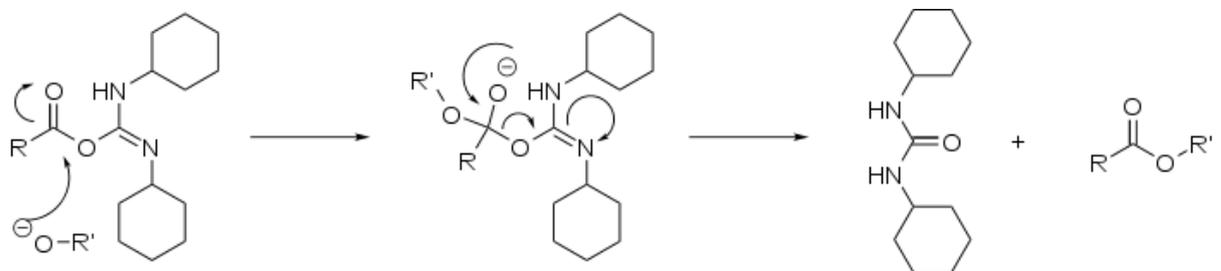
Nucleophilic membentuk amine



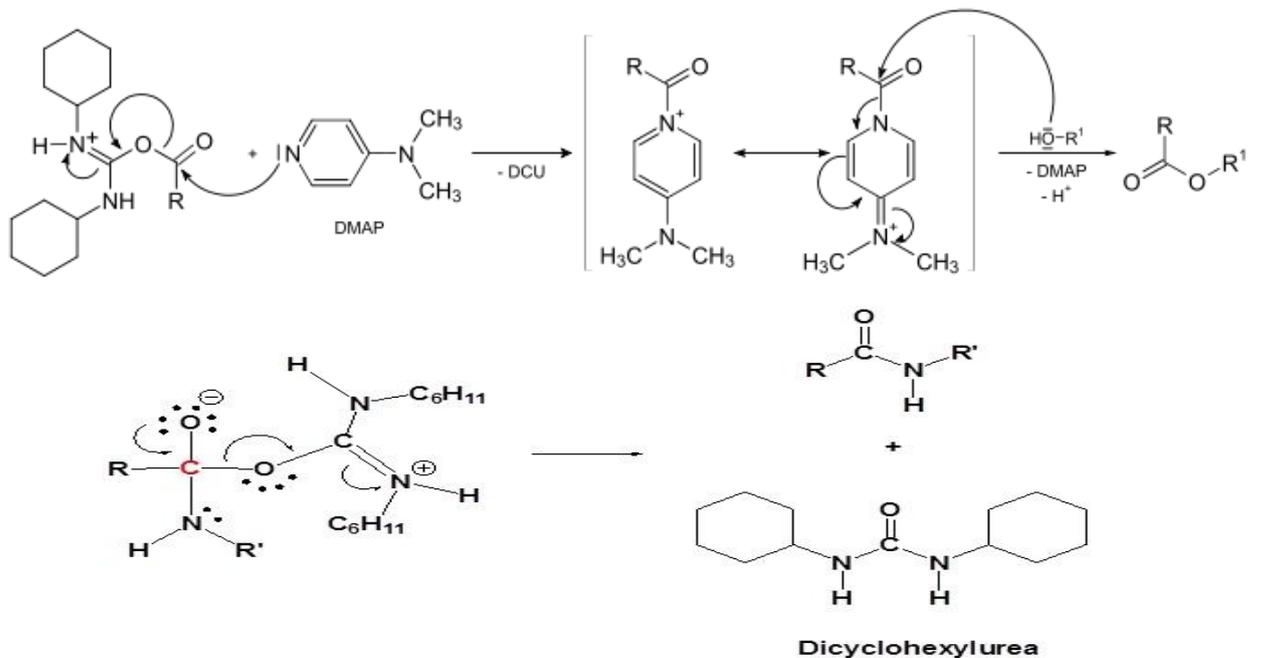
Proton transfer



Selanjutnya alcohol menyerang intermediate sehingga terbentuk DCU [Dicyclohexylurea] dan ester



Penambahan Dietilamin akan membentuk reaksi penggabungan ,sehingga terbentuk senyawa baru N.N-dietilsinnamamide.DMAP [4-Dimethylaminopyridine] sebagai precursor sehingga diperlukan untuk pemindah gugus acil



Leaving group dikeluarkan

Selanjutnya senyawa yang terbentuk dipisahkan dengan kromatografi kolom Si 60, dengan pelarut Hexan : Etilasetat 9:1 dan selanjutnya di pisahkan kembali dengan Kromatografi lapis tipis preparative dengan pelarut Hexan : Etilasetat 9 : 1. Setiap pengerjaan di teliti tingkat kemurniannya pada Kromatografi lapis tipis Si 60 pada panjang gelombang 264. Hasil yang didapatkan adalah 40%.

5.2 Elusidasi Struktur Derivat Metil Sinamat.

Data hasil dari ^1H NMR and ^{13}C NMR data [tabel 1 dan gambar] di bawah. [data terlampir]

Pada data spektra ^1H NMR dari *N,N*-diethylcinnamamide, terdapat dua metil signal δH 1.24 (6H, *t*) dan empat protons δH 3.91(4H, *m*) juga terdapat di antara -N grup, satu proton δH 6.34 (1H, *d*) dan satu proton δH 7.48 (1H, *d*), tampak juga sinyal olefin. Aromatik proton δH 7.48 (2H, *d*), δH 7.34 (2H, *t*), δH 7.36 (1H, *t*).

Pada data spektra ^{13}C NMR untuk *N,N*-diethylcinnamamide, terdapat dua metil signal 14.32, 48.54, satu amide signal 165.05, olefin signal 121.25, 140.91, dan aromatik signal 129.72, 128.97, 127.91, dan 135.10. Dengan adanya sinyal di area 128 – 129 menandakan adanya sebuah cincin aromatic.

Position	¹ H	¹³ C
1		165.05
2	6.34	121.25
3	7.48	140.91
4		135.10
5	7.48	127.91
5'	7.48	127.91
6	7.34	128.97
6'	7.34	128.97
7	7.36	129.72
8	3.91	48.54
8'	3.91	48.54
9	1.24	14.32
9'	1.24	14.32

Tabel 2. *Data* ¹H NMR (500 MHz) dan ¹³C NMR untuk *N,N*-diethylcinnamamide dalam pelarut CDCl₃

Pergeseran Amida 165.05 δ terbentuk dalam senyawa baru. Proton tidak nampak karena posisi N tidak berikatan dengan H melainkan O dan 2 atom C. Keterkaitan dengan Carbon dalam gugusan karbonil menjadikan N sangat terlindungi dalam pergeseran atom pada C-NMR. Molekul baru yang terbentuk diperkirakan memiliki cincin aromatik [Ar-H] dan ikatan rangkap dua, karena pergeseran proton berkisar di antara 6 – 8 δ pada H-NMR. Pada letak 5,5' duplet, 6,6',7 triplet. Kondisi itu terbentuk karena elektron phi terdelokasi di sekitar cincin aromatik [magnetic anisotropi], sehingga putaran medan listrik membentuk arus yang kuat. Sehingga berlawanan dengan medan di dalam cincin sehingga memaksa proton beresonansi. Pada C-NMR senyawa aromatik dengan pergeseran karbon sp², planar berkisar di antara 100 – 160 ppm. Pada olefilik juga berbentuk aromatik planar. Dugaan gugus metil pada 1,24 δ berbentuk triplet, memiliki pergeseran yang kecil karena adanya faktor induksi yaitu kerapatan elektron proton metil. Bentuk pergeseran Karbon sp². Metil membentuk garpu.

Data Spektroskopi Massa [data terlampir]

Spektroskopi Massa. Berat molekul dari senyawa *N,N*-diethylcinnamamide adalah 203 dengan rumus molekul C₁₃H₁₇NO. Angka resolusi tinggi EAB untuk ion positif MS (FAB) [M+H]⁺ 204.26. Secara teoritis nilai *N,N*-diethylcinnamamide ion positif untuk C₁₃H₁₇NO adalah 204.13.

Data kimia Fisik senyawa baru - N,N-Diethylcinnamamide

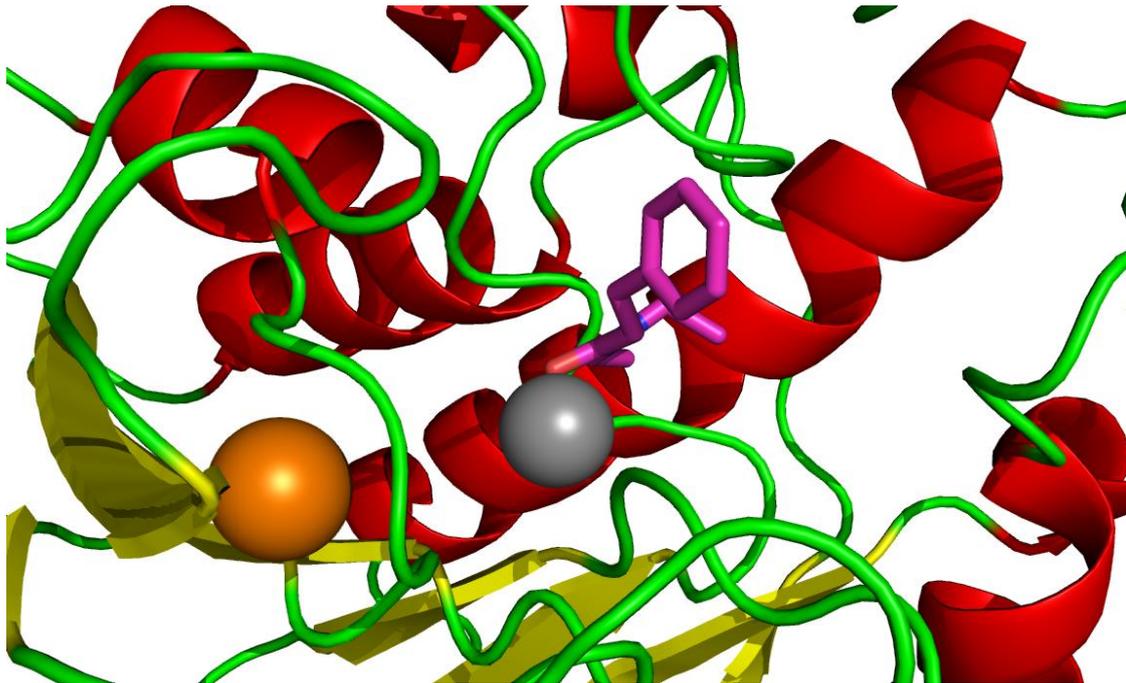


Nama senyawa [IUPAC]	: (E)-N,N-diethyl-3-phenylprop-2-enamide
Nama	: N,N-Diethylcinnamamide
Titik didih	: 594.19 [k]
Titik Lebur	: 339,51 [k]
Suhu Kritik	: 811,59 [k]
Kritikal Volume	: 659,5 [cm ³ /mol]
Energy Gibbs	: 233,07 [kj/mol]
XLog P3	: 2,43
Henry's Law	: 7,04
Rumus molekul	: C ₁₃ H ₁₇ NO
Berat Molekul	: 203.28018 [g/mol]

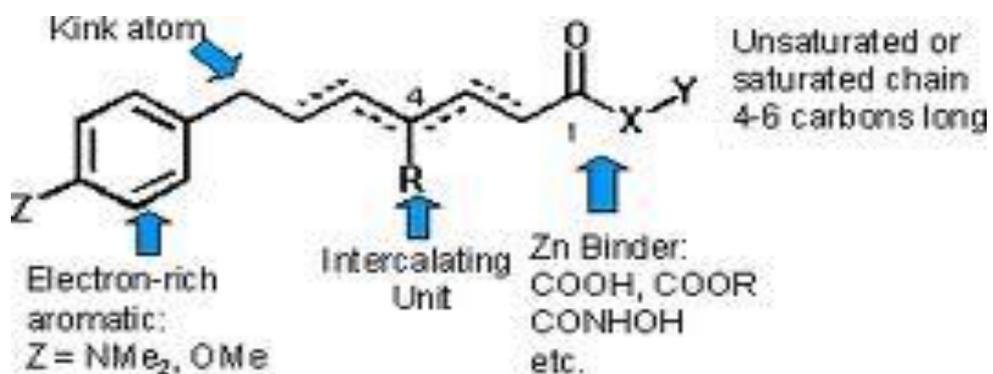
5.3 Penapisan Turunan Metil Sinamat Secara in Siliko.

Hasil Virtual Docking [penambatan molekul]

Sampel	: N.N dietilsinamamida [DES]
Metoda	: Molecular Docking [Penambatan Molekul]
Target	: Histon Deasetilase tipe 2 [HDAC2] (Histone Deacetylase), struktur diperoleh dari Protein Data Bank [pdbID 3MAX], resolusi 2.05 Angstrom
Ligan	: LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide).



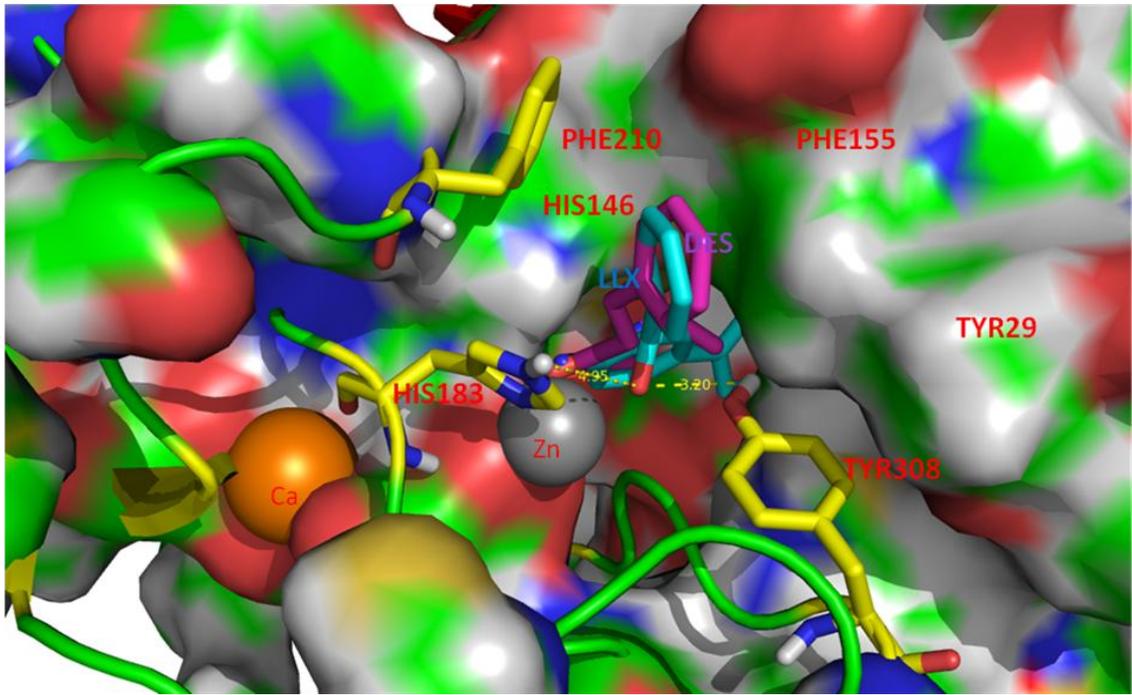
Gambar 7 Gambar menunjukkan DES warna ungu berikatan dengan molekul Zn pengikatan oleh Amide memberikan posisi yang mirip dengan LLX dekat dengan atom Zn.



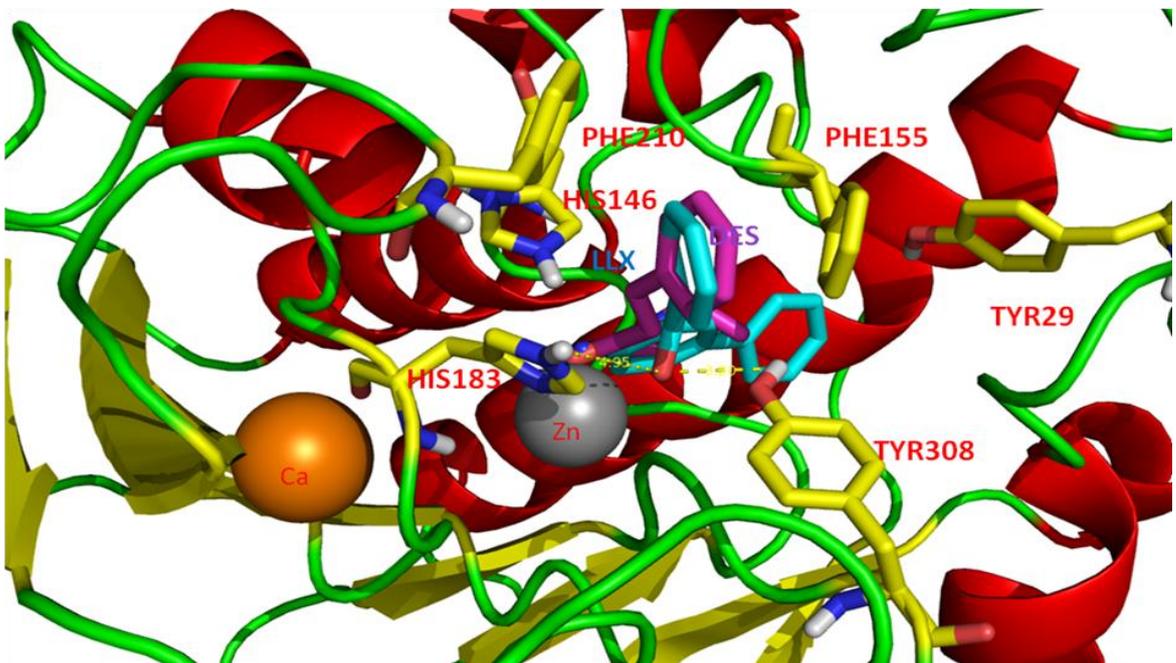
Sebagai pembanding dapat dilihat gambar molekul yang memiliki bagian yang aktif pada HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor. Hasil docking dietilsinamamida [DES] pada HDAC2(Histone Deacetylase) memberikan energi ikatan sebesar -7,66 kkal/mol. Nilai ikatan G harus berada pada nilai yang rendah untuk menjadikan struktur lebih stabil. $\Delta\Delta G = -RT \ln K$. Binding energi ikatan bebas merujuk pada perubahan energi bebas untuk reaksi berikut:

Protein (dalam air) + ligan (dalam air) ----> kompleks protein-ligan (dalam air)
Salah satu faktor yang sangat mempengaruhi prediksi ikatan energi bebas adalah ionisasi keadaan kelompok fungsional pada ligan dan pada tempat pengikatan di mana

perhitungan dilakukan. Sehingga molkul DES yang terbentuk diperkirakan akan stabil berikatan dengan HDAC(Histone Deacetylase) sebagai inhibitor. Kantong hidrofobik terbentuk dari beberapa residu asam amino Histidin 183, Fhenilalanin 210, Fhenilalanin 155, Histidin146. Logaritma dari rasio konsentrasi zat terlarut tidak-terionisasi dalam pelarut disebut log P. Hidrofobisitas diwakili oleh LogP. Koefisien partisi adalah rasio konsentrasi senyawa dalam dua fase dari dua campuran yang tidak bercampur dengan pelarut pada koefisien equilibrium. Artition berguna dalam memperkirakan distribusi obat dalam tubuh. Obat yang bersifat hidrofobik dengan partisi koefisien tinggi secara kusus didistribusikan ke kompartemen hidrofobik seperti lapisan lemak sel. Sementara obat hidrofilik (koefisien partisi rendah) secara kusus adalah ditemukan dalam kompartemen hidrofilik seperti serum darah. Pembentukan kantung hidofobik memungkinkan DES dapat berikatan dengan komponen lemak dan dapat menembus lapisan lemak sehingga menuju enzyme HDAC(Histone Deacetylase) yang ada di dalam sel, guna menghambat kerja HDAC(Histone Deacetylase) sehingga proses epigenetic dapat dihambat Interaksi cincin aromatik pada LLX maupun DES, dengan Phenilalanin155 membentuk *pi-pi*[π π] *stacking* [Tersusun] *pi-pi Stacking* mengacu pada gaya pengikatan, interaksi antara noncovalent cincin aromatik.⁽⁴⁴⁾ Kegunan pi pi Stacking adalah meningkatkan afinitas pengikatan inhibitor molekul kecil ke saku enzim yang mengandung residu aromatik. Analisis asam amino aromatik fenilalanin, tirosin, histidin, dan triptofan menunjukkan bahwa dimer dari rantai samping memiliki banyak interaksi menstabilkan kemungkinan pada jarak yang lebih jauh dari rata-rata jarak radius van der Waals.⁽⁴⁵⁾Terjadinya pi pi stacking karena bentuk geometri molekul. Pi pi stacking lazim dalam struktur kristal protein, dan juga berkontribusi terhadap interaksi antara molekul kecil dan protein. Akibatnya, pi-pi dan interaksi kation-pi merupakan faktor penting dalam desain obat rasional ⁽⁴⁶⁾



Gambar 8: Hasil Docking 1: DES [ungu],LLX [biru muda],residu asam amino His 183,Phe 210,Phe155, His146 [kuning]



Gambar 9: Hasil Docking 2

Dengan kehadiran molekul N,N dietilsinamamida [DES] pada Histidin 183, Fhenilalanin 210, Fhenilalanin 155, Histidin 146 diduga efek katalisis enzyme HDAC(Histone Deacetylase) akan terhambat. Sehingga proses epigenetik kemungkinan dapat dicegah.

5.4 Uji Toksisitas dan Sitotosik dengan *Artemia salina* [BSLT].

Hasil uji BSLT pada senyawa N,N dietilsinamamida [DES] memiliki aktifitas LC50 sebesar 104.71 ug/ml sehingga DES dapat dikatakan memiliki keaktifan Toksitas akut yang signifikan. Menurut metode BSLT tersebut. Suatu senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika mempunyai harga LC 50 kurang dari 1000 µg/ml. 23 LC 50 [*Lethal Concentration* 50] merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50 % hewan percobaan yaitu larva *Artemia salina* Leach.

No	Sampel	C,ppm	Log K	Hidup Awal			Hidup Akhir			Mati	Hidup	AM	AH	Mortalitas	LC-50
1	EX	10	1	10	10	10	10	8	9	3	27	3	51	5.56	104.71
		100	2	10	10	10	6	8	8	8	22	11	24	31.43	
		500	2.7	10	10	10	1	0	1	28	2	39	2	95.12	
		1000	3	10	10	10	0	0	0	30	0	69	0	100	

Tabel 3 Uji BSLT

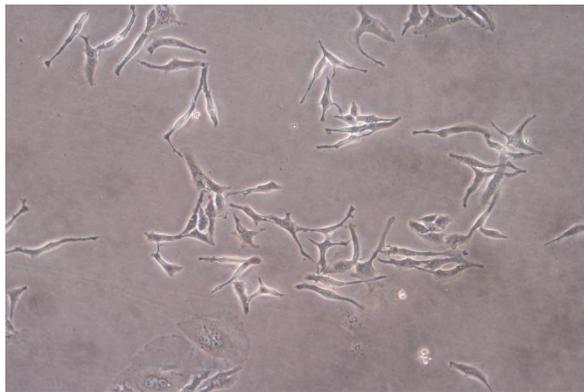
Toksitas akut menurut penelitian Salosa⁽⁴⁷⁾ memiliki hubungan dengan tingkat sitotoksitas senyawa tersebut. Hasil uji senyawa DES diperkirakan memiliki aktifitas sitotoksik. Metabolisma ,DNA dan RNA Polymerase *Artemia salina* mirip dengan mamalia⁽¹⁾. Karena kemiripan metabolisme dan komponen genetik maka dapat menjadi acuan dalam tes sitotoksik. Meskipun tidak semua senyawa.⁽¹⁾ Senyawa N,N dietilsinamamida dapat diajukan untuk uji terhadap galur sel kanker karena LC50 104.70 yaitu memiliki aktifitas akut toksik.

Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa N,N dietilsinamamida yang dapat menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai racun perut. karena itu, bila senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanan sehingga larva mati kelaparan.⁽⁴⁸⁾ Keuntungan lain dengan BSLT adalah jumlah sampel 0,6 mg relative kecil.

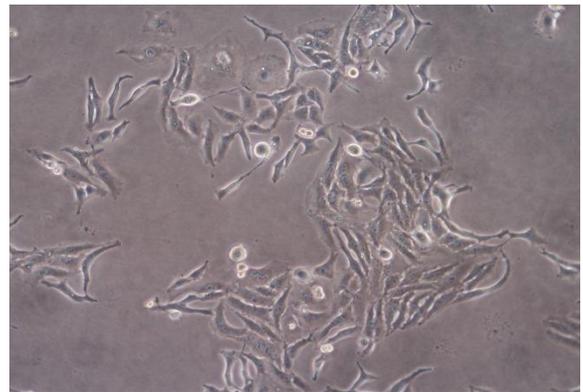
5.5 Uji Aktivitas pada Galur sel HeLa

Hasil uji anti Proliferasi menunjukkan inhibisi yang signifikan sebagai zat Sitotoksik, pada sel HeLa, sehingga memungkinkan N. N dietilsinmamamida sebagai Anti Proliferasi.

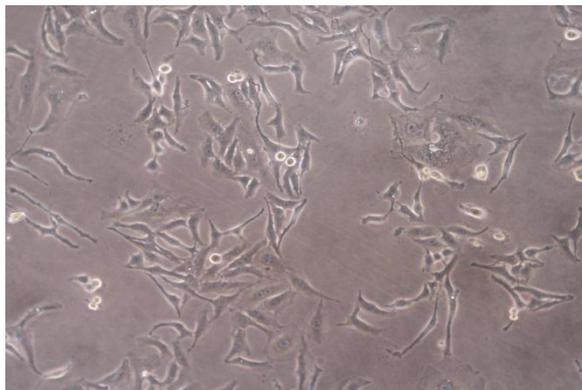
Gambar 10: He La



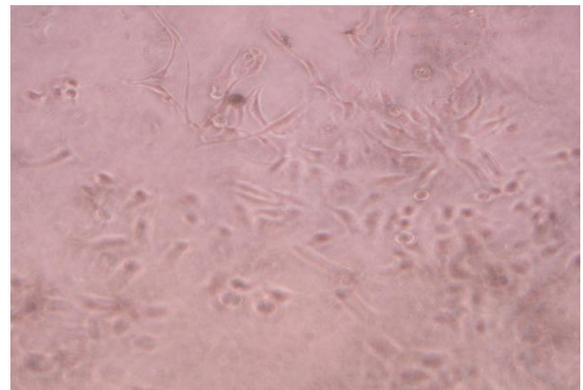
HeLa Sel 24 Jam



HeLa Sel Inhibisi 10 – 30 %



HeLa Sel 10 – 20 %



HeLa Sel Inhibisi Di Atas 40 – 50 %



HeLa Inhibisi Di Atas 50 %

Tabel 4: Inhibisi Respon sel He La

Konsentrasi [ppm]	%inhibisi
10	21.2
50	36.1
100	41.7
Cell control	0.0

Sebagian besar kanker servik disebabkan oleh carcinogen biologic Human Papilloma Virus [HPV]. Apabila penghambatan Histone Deasetilasi [HDACi] (Histone Deacetylase) dapat menghentikan proses transformasi oncoproteins HPV yang berisiko tinggi dengan menginduksi siklus sel di dalam fase transisi G1 ke S dan apoptosis berikutnya, kemungkinan memiliki implikasi penting untuk pengobatan kanker serviks.⁽⁴⁹⁾ DNMT3B sangat penting untuk kelangsungan hidup sel kanker serviks. DNMT3B yang dapat diatur di bawah pengendalian HDAC(Histone Deacetylase) inhibitor mungkin memainkan peran penting dalam toksisitas inhibitor HDAC(Histone Deacetylase) pada sel kanker serviks.⁽⁵⁰⁾

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan.

1. Molekul hasil sintesis turunan asam sinamat adalah N,N Dimetilsinamamid, yang memiliki cincin aromatik dan gugus fungsional Amida. Metode Sintesis dengan esterifikasi menurut Steglich, reaksi penggabungan dengan karbondiimide [DCC] (dicyclohexylcarbodiimide).
2. Memiliki aktivitas yang menghambat Enzim Histon Deasetilasi [HDAC2] (Histone Deacetylase) secara Virtual Docking dengan Ligan LLX [N-(2-aminophenyl) benzamide].
3. Toksisitas akut LC50 104.71 ug/ml sehingga diperkirakan memiliki aktivitas sebagai sitotoksik.
4. Inhibisi yang signifikan terhadap sel kanker galur HeLa [servik], sehingga diperkirakan dapat digunakan pula sebagai penghambat 'dalam HDAC2(Histone Deacetylase) sehingga mengurangi resiko Epigenetik yang berasal dari kanker servik.

6.2 Saran

1. Perlu diadakan kajian lanjut dengan Validasi secara in vitro pada Uji HDAC2(Histone Deacetylase) untuk senyawa N,N Dimetilsinamamid.
2. Menguji hubungan secara molekuler antara N,N Dimetilsinamamid sebagai anti kanker servik dan Epigenetik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pandey S, Mishra M, Chandrawati (2012). Human Papillomavirus screening in North Indian women. *Asian Pac J Cancer Prev*,13, 2643-6.
2. Zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cervical cancer. *Nat Rev*, **2**, 342-50.
3. Zubi, Teresa (2006-08-25). The Wallacea Line 2006-10-12.
4. P. De1, M. Baltas, and F. Bedos-Belval. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents- A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, *18*, 1672-1703.
5. Holbert MA, Marmorstein R. Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15(6):673–680.
6. Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 2000;34:77–137.
7. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;403(6765):41–45.
8. Wu C, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* 2001;293(5532):1103–1105.
9. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: Translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006;174(3):341–34
10. Chen YD, Jiang YJ, Zhou JW, Yu QS, You QD. Identification of ligand features essential for HDACs inhibitors by pharmacophore modeling. *J. Mol. Graph. Model* 2008;26:1160-1168.
11. Khochbin S, Matthias P. Selective histone deacetylase inhibitors. Part 2: Alignment-independent GRIND 3-D QSAR, homology and docking studies. *Eur. J. Med. Chem* 2008;43:621–632.
12. Zhang Y, Gilquin B, Khochbin S, Matthias P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J. Biol. Chem* 2006;281:2401–2404.
13. Bayle, JH and Crabtree, GR (1997), “Protein acetylation: more than chromatin modification to regulate transcription”, *Chem Biol*, Vol.4, 885-888.
14. Cheng, HL; Gu, Y; Mostoslavsky, R; Saito, S *et al.* (2003), “Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1) -deficient mice”, *Proc Natl Acad Sci*, Vol.100, 10794-10799.

15. Ruijter, AJM; Van Gennip, AH; Caron, HN; Kemp, S *et al.* (2003), “Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family”, *Biochem J*, Vol. 370,737–749.
16. Finnin, MS; Donigian, JR; Cohen, A; Richon, VM *et al.* (1999), “Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors”, *Nature*, Vol.401, 188–193.
- 17a. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, **10**,32-42.
- 17b. Gui CY, Ngo L, Xu WS, et al (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 1241–6.
- 18a. Takai N, Narahara H (2010a). Histone deacetylase inhibitor therapy in epithelial ovarian cancer. *J Oncol*.
- 18b. Takai N, Narahara H (2010b). Preclinical studies of chemotherapy using histone deacetylase inhibitors in endometrial cancer. *Obstet Gynecol Int*
19. Anton, VB; Sujith, VW and Mary Kay HP (2007), “Structural requirements of HDAC inhibitors: SAHA analogs functionalized adjacent to the hydroxamic acid”, *Bioorganik Chemistry and Organik letters*, Vol.17, 2216-2219.
20. Miller, TA; Witter, DJ; Belvedere, S *et al* (2003), “Histone deacetylase inhibitors”, *J MedChem*, Vol.46, 5097 – 5116.
- 21a. Yoshida, M; Kijima, M; Akita, M; Beppu, T (1990), “Potent and specific inhibition of Mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A”, *J Biol chem*, Vol. 265, 17174 – 17179.
- 21b. Duvic, M; Talpur, R; Ni, X *et al.* (2007), “Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)”, *Blood*, Vol.109, 31 –39.
- 21c. Jose,B; Oniki, Y; Kato, T; Nishino, N *et al.* (2004), “Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones”, *Bioorg Med Chem Lett*, Vol.14, 5343 – 5346.
- 22a. Haggarty, SJ; Koeller, KM; Wong, JC;Grozinger CM *et al.*(2003), “Domain selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)- mediated tubulin deacetylation”, *Proc Natl Acad Sci*, Vol.100, 4389 – 4394.

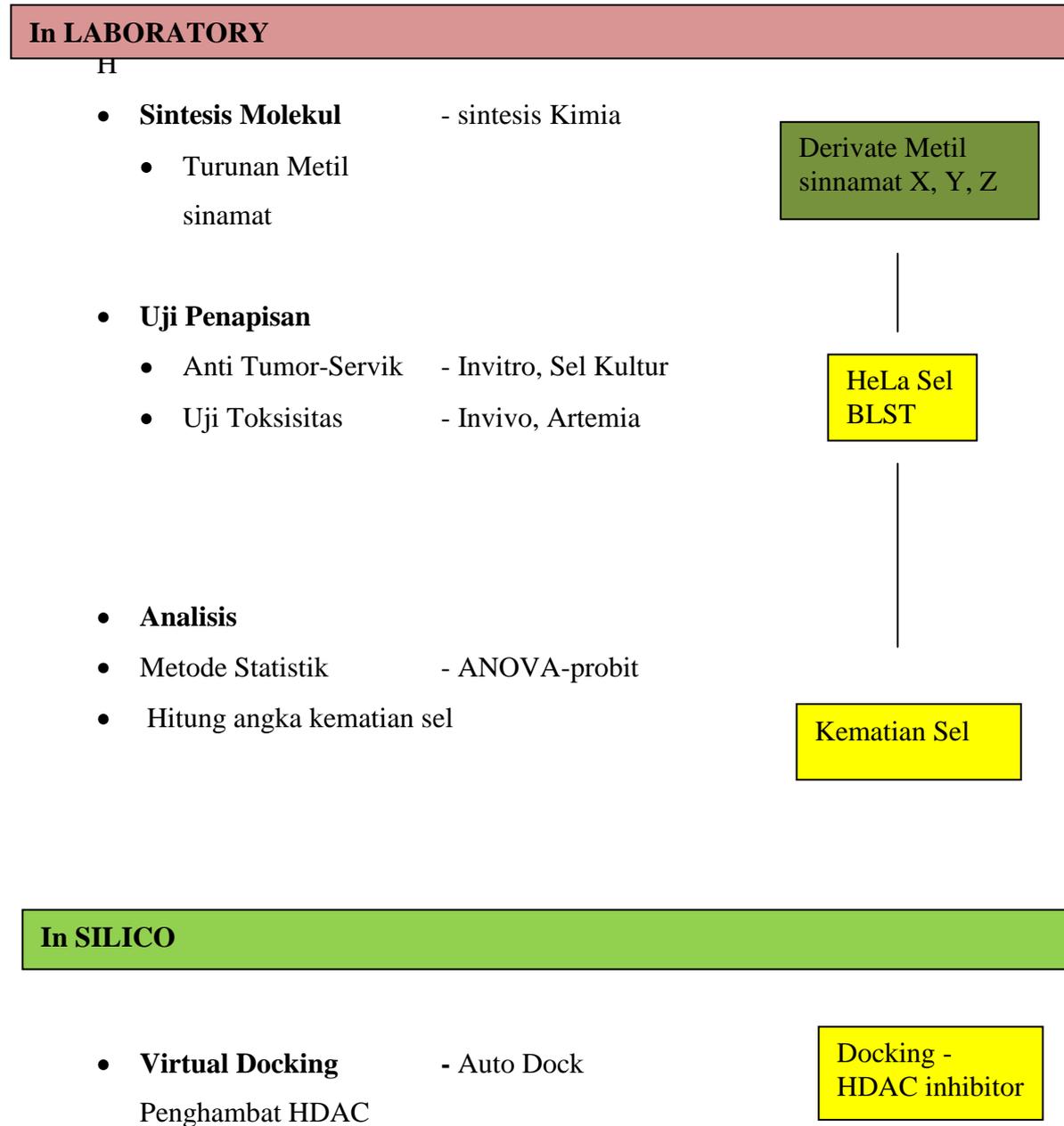
- 22b. Karagiannis, TC; Osta, A (2007), "Will broad-spectrum histone deacetylase inhibitors be superseded by more specific compounds", *Leukemia*, Vol.21, 61 –65.
23. Foye et al, *Medicinal Chemistry*, 10ed, 2012
- 24a. Schafer S, Saunders L, Eliseeva E, Velena A, Jung M, Schwienhorst A, Strasser A, Dickmanns A, Ficner R, Schlimme S, Sippl W, Verdin E, Jung M. Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs). *Bioorg. Med. Chem* 2008;16:2011–2033
- 24b. Zhang Y, Gilquin B, Khochbin S, Matthias P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J. Biol. Chem* 2006;281:2401–2404.
25. Zou H, Wu Y, Navre M, Sang BC. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2006;341:45–50.
26. Kozikowski AP, Tapadar S, Luchini DN, Kim KH, Billadeau DD. Use of the nitrile oxide cycloaddition (NOC) reaction for molecular probe generation: a new class of enzyme selective histone deacetylase inhibitors (HDACIs) showing picomolar activity at HDAC6. *J. Med. Chem* 2008;51:4370–4373.
27. Estiu G, Greenberg E, Harrison CB, Kwiatkowski NP, Mazitschek R, Bradner JE, Wiest O. Structural origin of selectivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem* 2008;51:2898–2906.
28. Chen YD, Jiang YJ, Zhou JW, Yu QS, You QD. Identification of ligand features essential for HDACs inhibitors by pharmacophore modeling. *J. Mol. Graph. Model* 2008;26:1160–1168.
29. Williams, N.H.; Whitten, W.M. (1983). "Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade". *Biol. Bull.* 164 (3): 355–395
30. Vogt Thomas. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, Vol 3 No 1, Pp 2–20 Jan 2010
31. Hauser, C. R.; Hudson, B. E. Jr. (1942). The Acetoacetic Ester Condensation and Certain Related Reactions, *Organik Reactions* 1
32. Direct Synthesis of Amides from Alcohols and Amines with Liberation of H₂
Chidambaram Gunanathan, Yehoshoa Ben-David, David Milstein *Science* 10 August 2007: Vol. 317. no. 5839, pp. 790 – 792
33. McMurry, John E. (1992), *Organik Chemistry* (3rd ed.), Belmont: Wadsworth
34. March, Jerry (1992), *Advanced Organik Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (4th ed.), New York: Wiley

35. Roger J. Williams, Alton Gabriel, Roy C. Andrews "The Relation Between the Hydrolysis Equilibrium Constant of Esters and the Strengths of the Corresponding Acids" *J. Am. Chem. Soc.*, 1928, volume 50, 1267
36. B. Neises, W. Steglich (1978). "Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids". *Angew. Chem. Int. Ed.* 17 (7): 522–524
37. Corbin D.R.; Schwarz S.; Sonnichsen G.C. (1997). "Methylamines synthesis: A review". *Catalysis Today* 37 (2): 71–102
38. Donald J Berry, Charles V Digiovanna, Stephanie S Metrick and Ramiah Murugan (2001). Catalysis by 4-dialkylaminopyridines. *Arkivoc*: 201–226.
39. Zang et al., Artificial Intelligence in Chemistry: Structure Elucidation and Simulation of Organic Reactions. Zdzislaw Hippe. Elsevier Science Ltd (June 1991)
40. Cell Line Designation – HeLa ATCC[®] Catalog No. CCL-2[™], 2008
41. Kumar, Ranjit, 2005, *Research Methodology-A Step-by-Step Guide for Beginners*, (2nd.ed.), Singapore, Pearson Education.
42. Difai Wang (2009). Computational Studies on the Histone Deacetylases and the Design of Selective Histone Deacetylase Inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2009 ; 9(3): 241–256.]
43. James Folzman, 1993, *Biostatistics: Experimental Design and Statistical Inference*, Oxford University Press, USA; 1 edition
44. Sinnokrot, MO; Valeev, EF; Sherrill, CD (2002). "Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: The benzene dimer". *J. Am. Chem. Soc.* 124 (36): 10887–10893.
45. McGaughey, GB; Gagné, M; Rappé, AK (1998). "Pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins". *J. Biol. Chem.* 273 (25): 15458–15463. *Chem. Phys. Lett.* 78 (3): 421–423. 1981.
46. Hunter, Christopher A.; Sanders, Jeremy K. M. (1990). "The nature of . pi-. pi. Interactions". *J. Am. Chem. Soc.* 112 (14): 5525–5534.
47. Solana et al, . Microwell Cytotoxicity test using *Artemia salina* (Brine Shrimo), *Planta Medica* 1993.
48. Nguyen HH, Widodo S. *Momordica* L. In: Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia 12. De Padua L. S. N. Bunyapraphatsana and R. H.M. J. Lemmens (eds.). Pudoc Scientific Publisher. Wageningen, the Netherland; 1999. p.353-359.
49. Patrick Finzer, Christian Kuntzen, Ubaldo Soto, Harald zur Hausen and Frank Roe. *Oncogene* .Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in

- cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. (2001) 20, 4768 – 4776.
50. LIU Ning, ZHAO Li-jun, LI Xiao-ping, Wang Jian -liu, CHAI Guo-lin and WEI Li-hui. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B. *Chinese Medical Journal* 2012;125(18):3273-3278.
 51. Dianjun Chen, et al. *Arkivoc* 2003 (xii) 56-63. The cinnamate-based aminohalogenation provides an easy access to anti methyl 3-aryl-N-p-tosyl- and N-o-nosyl-aziridine-2-carboxylates.
 52. Jeremy Kapteyn, et al. *Plant Cell*, Vol. 19: 3212–3229, October 2007, www.plantcell.org^a 2007 American Society of Plant Biologists. Evolution of Cinnamate/p-Coumarate Carboxyl Methyltransferases and Their Role in the Biosynthesis of Methylcinnamate.
 53. M.; Bhalla, K, et al. A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12(15), 4628-4635.
 54. Di Marco S. et al. Crystal structure of a eukaryotic Zn-Dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2004;101:15064–15069.
 55. Verdin E, Jung M, et al. Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs). *Bioorg. Med. Chem* 2008;16:2011–2033.
 56. Peter Eichhorn and Thomas P. Knepper, Electro spray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY J. Mass Spectrom.* 2001; 36: 677–684

Lampiran 1

SKEMA ALUR KERJA
Permodelan, Penapisan, Uji Turunan Metil sinamat



*International Conference: Research and Application
on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM)
June, 22nd-23rd 2012 Surakarta Indonesia*

Synthesis of A Candidate Anti-Cancer Inhibitor Compound:

N,N-Diethylcinnamamide

Teni Ernawati^{1*}, Eddy purwoto B Tjoa², Lia Meilawati and Puspa Dewi Lotulung¹,
LBS, Kardono¹

¹*Research Center for Chemistry-Indonesian Institutes of Sciences (LIPI)*

Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan 15314

²*Faculty of Pharmaceutical, Pancasila University*

Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

Corresponding author, email: teni001@lipi.go.id

Abstract

*Methyl trans-cinnamate is a natural substance. It has been isolated from *Alpinia malaccensis* with high yield. The success in isolating chemical compounds from Indonesian natural products inspires us to create and develop compounds of methyl trans-cinnamate derivatives as raw materials for medicine. Creation and development of medicinal raw materials of nature-based materials is done by synthesizing the compound of methyl trans-cinnamate derivative compounds into compounds that have bioactivity. Bioactivity of compounds of methyl trans-cinnamate derivatives is expected to have potential as anti-cancer. Chemical methods used in synthesizing the chemical of methyl trans-cinnamate derivatives are tailored to its targeted bioactivity. In this paper, we investigated a potential anti-cancer inhibitor with a method of amidation reaction of methyl trans-cinnamate derivative compound. Here, we use a two-stage reaction. The first, we have hydrolyzed methyl trans-cinnamate, then we use amidation reaction with diethyl amine. The compound of N,N-diethylcinnamamide showed a toxicity with BSLT assay with $LC_{50} = 104.71 \mu\text{g/mL}$.*

Keywords: *methyl trans-cinnamate, cinnamic acid, synthesis, diethylamine, amidation, N,N-diethylcinnamamide*

Synthesis Cytotoxic and HDAC Inhibitor in Silico of N,N-Diethylcinnamide

Eddy Tjoa^{2*}, Teni Ernawati¹, Arry Yanuar*, LBS, Kardono¹

¹Research Center for Chemistry-Indonesian Institutes of Sciences (LIPI)

Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan 15314

²Faculty of Pharmacy, Pancasila University

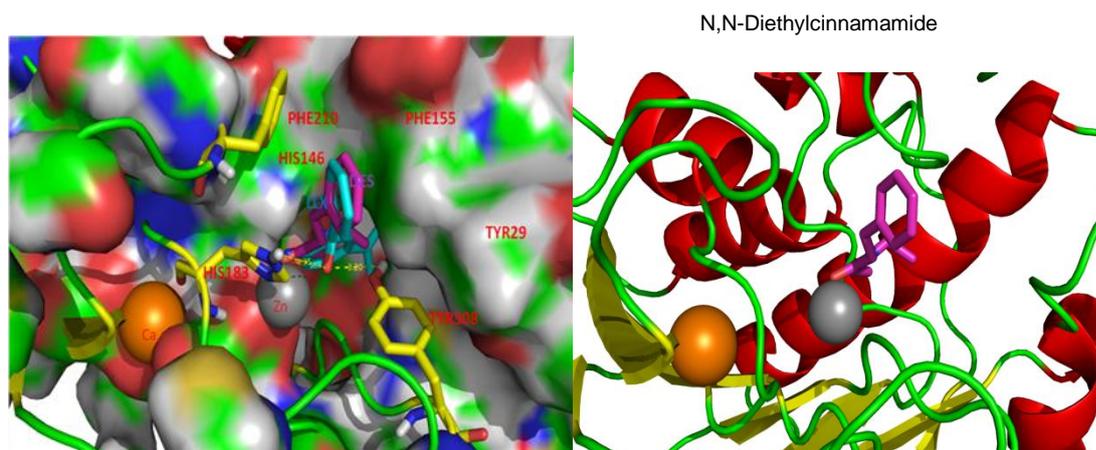
Jl. SrengsengSawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, *Faculty of Pharmacy, University of Indonesia, Depok Indonesia

^{2*} Corresponding author, email: eddytjoa2001@yahoo.com

Abstract

Methyl trans-cinnamate is a natural substance. It has been isolated from Alpinia malaccensis with high yield. The success in isolating chemical compounds from Indonesian natural products inspires us to create and develop compounds of methyl trans-cinnamate derivatives as raw materials for medicine. Creation and development of medicinal raw materials of nature-based materials is done by synthesizing the compound of methyl trans-cinnamate derivative compounds into compounds that have bioactivity. Bioactivity of compounds of methyl trans-cinnamate derivatives is expected to have potential as anti-cancer. Chemical methods used in synthesizing the chemical of methyl trans-cinnamate derivatives are tailored to its targeted bioactivity. In this paper, we investigated a potential anti-cancer inhibitor with a method of amidation reaction of methyl trans-cinnamate derivative compound. Here, we use a two-stage reaction. The first, we have hydrolyzed methyl trans-cinnamate, then we use amidation reaction with diethyl amine. The compound of N,N-diethylcinnamide showed a toxicity with BSLT assay with $LC_{50} = 104.71 \mu\text{g/mL}$. Virtual molecular docking performed in comparison LLX and HDAC2 with positive results.

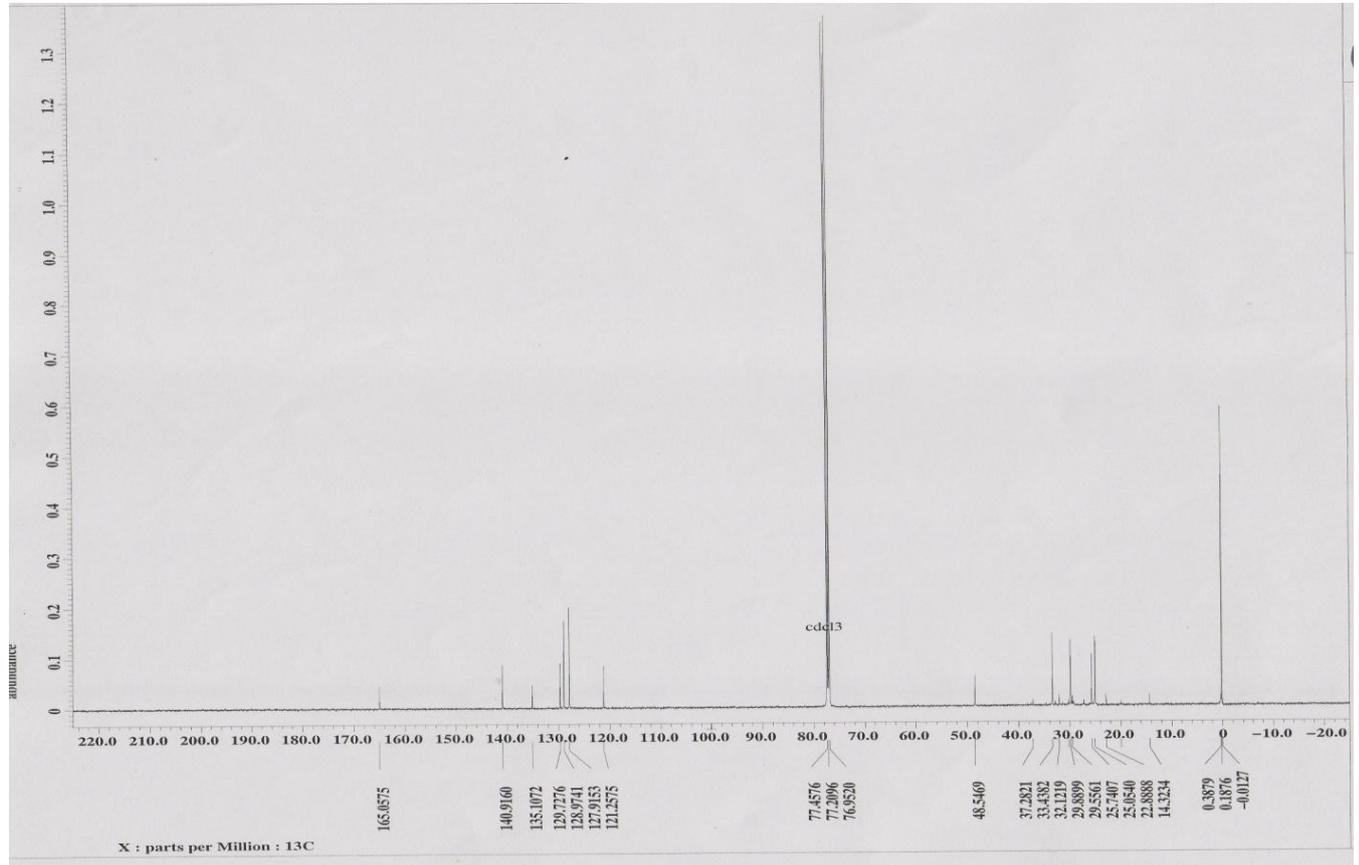
Keywords: methyl trans-cinnamate, cinnamic acid, synthesis, diethylamine, amidation, N,N-diethylcinnamide, HDAC inhibitors
Synthesis Reaction



Interaction phi-phi Stacking and Zinc with N,N-Diethylcinnamide

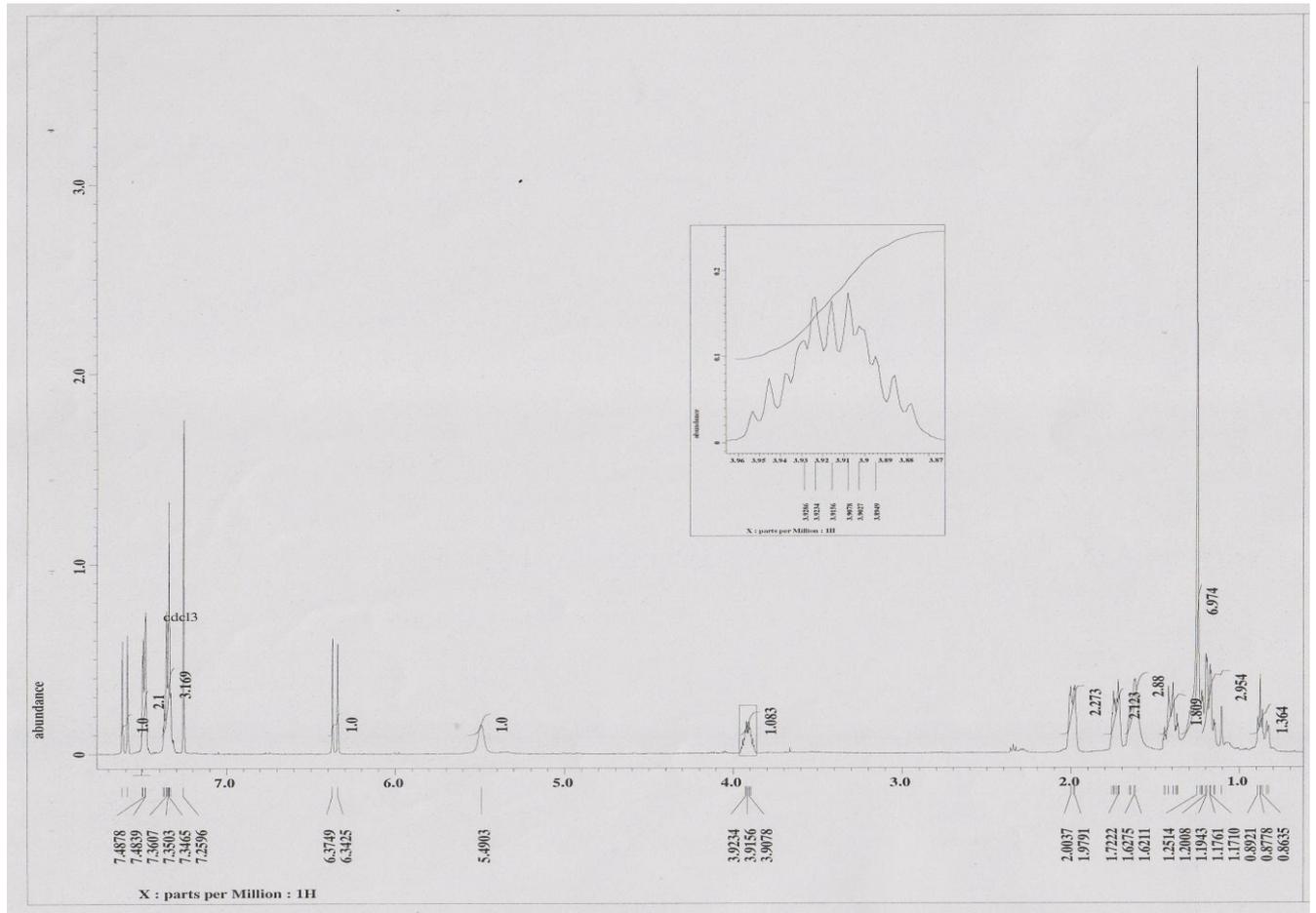
Lampiran 3

DATA C-NMR CINAMAMIDE



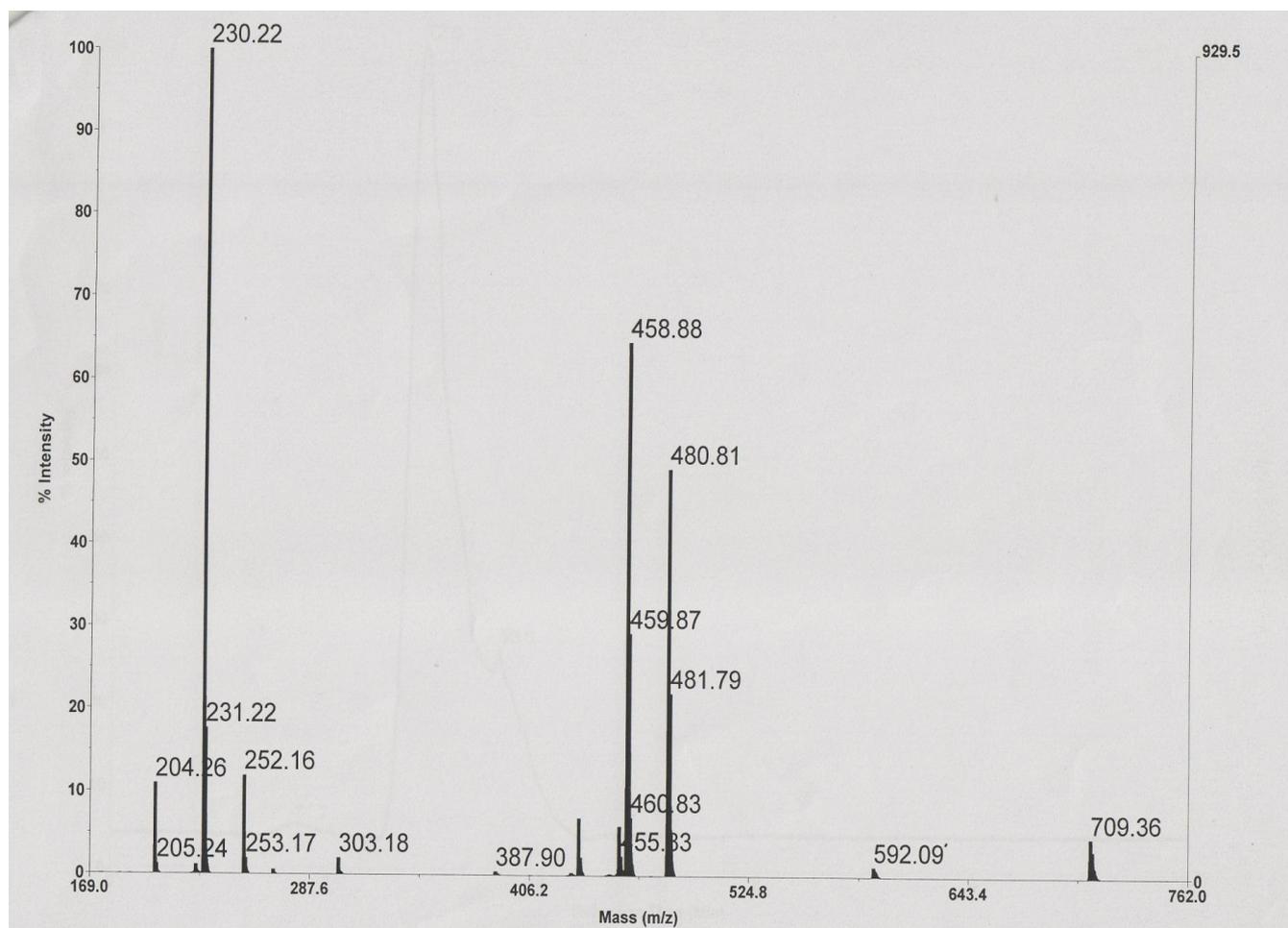
Lampiran 4

DATA H-NMR CINAMAMIDE



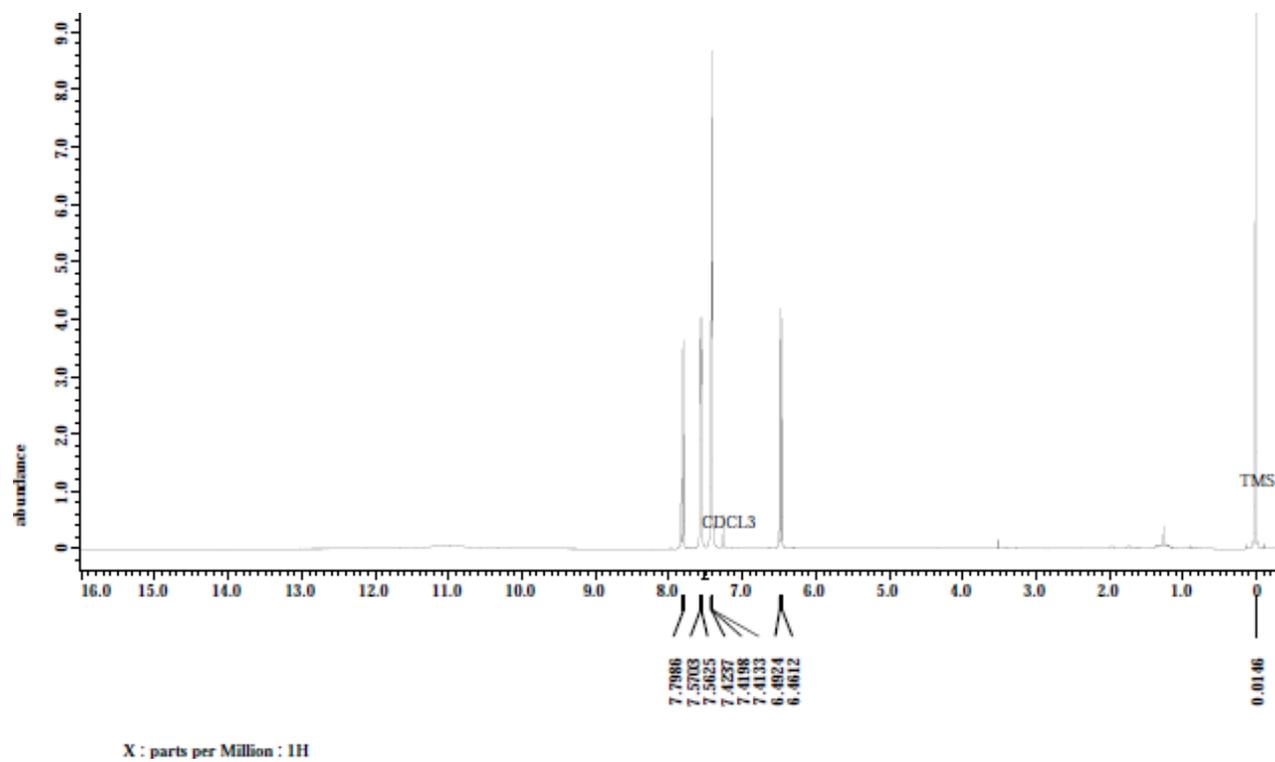
Lampiran 5

DATA LC-MS CINAMAMIDE



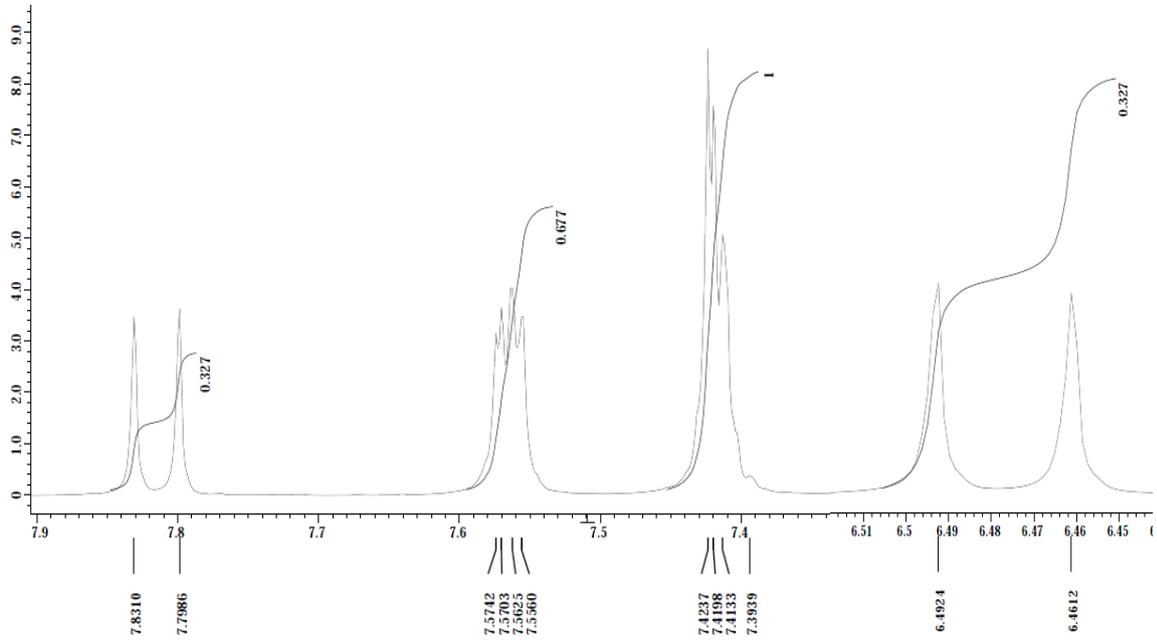
Lampiran 6

DATA H-NMR ASAM SINAMAT



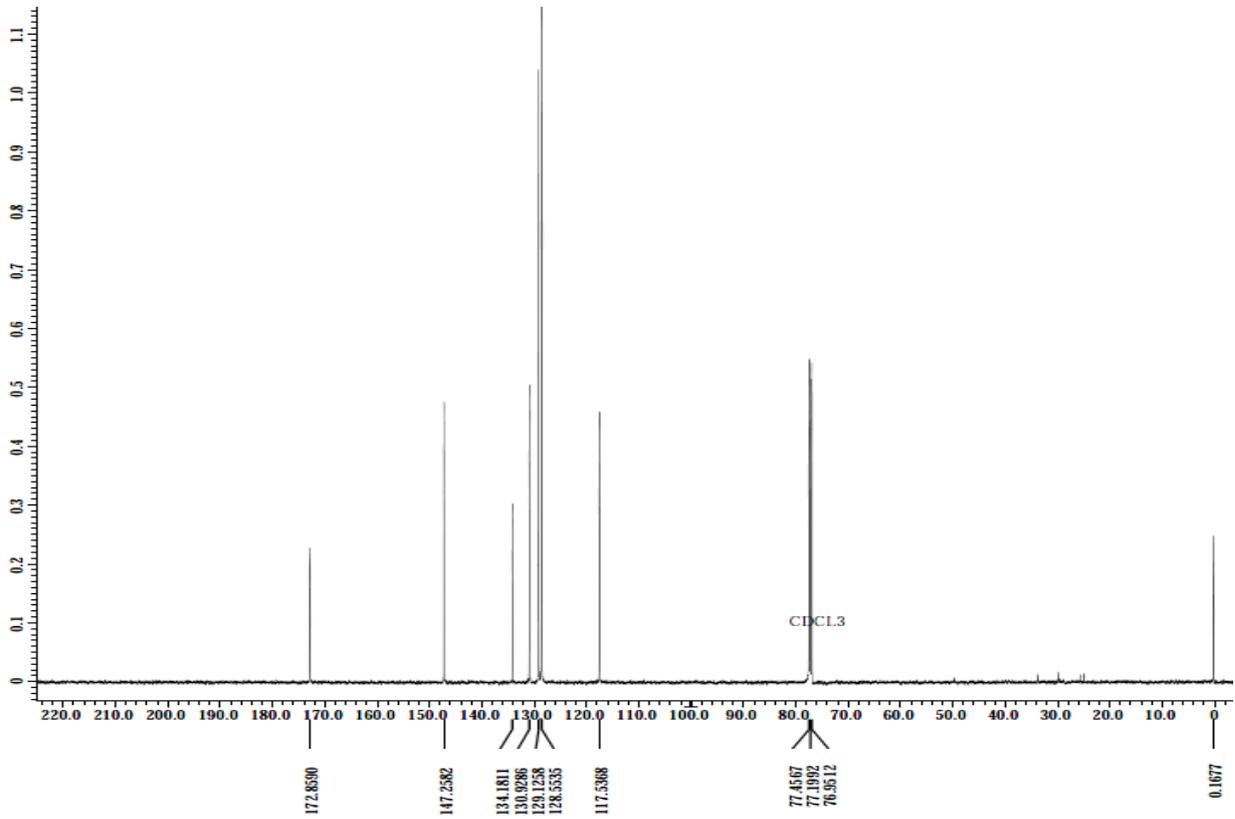
Lampiran 7

DATA H-NMR ASAM SINAMAT



Lampiran 8

DATA C-NMR ASAM SINAMAT



Lampiran 9

DATA LC-MS ASAM SINAMAT

