



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN BIOAKTIVITAS
4-[(*E*)-2-(4-OKSO-3-FENILKUIAZOLIN-2-IL)ETENIL]
BENZENSULFONAMIDA DAN ANALOGNYA SEBAGAI
INHIBITOR SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2) SELEKTIF**

DISERTASI

**HAYUN
NPM 0906598455**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM DOKTOR ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS DAN BIOAKTIVITAS
4-[(*E*)-2-(4-OKSO-3-FENILKUIAZOLIN-2-IL)ETENIL]
BENZENSULFONAMIDA DAN ANALOGNYA SEBAGAI
INHIBITOR SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2) SELEKTIF**

DISERTASI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Doktor Ilmu Kimia**

**HAYUN
NPM 0906598455**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM DOKTOR ILMU KIMIA
DEPOK**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

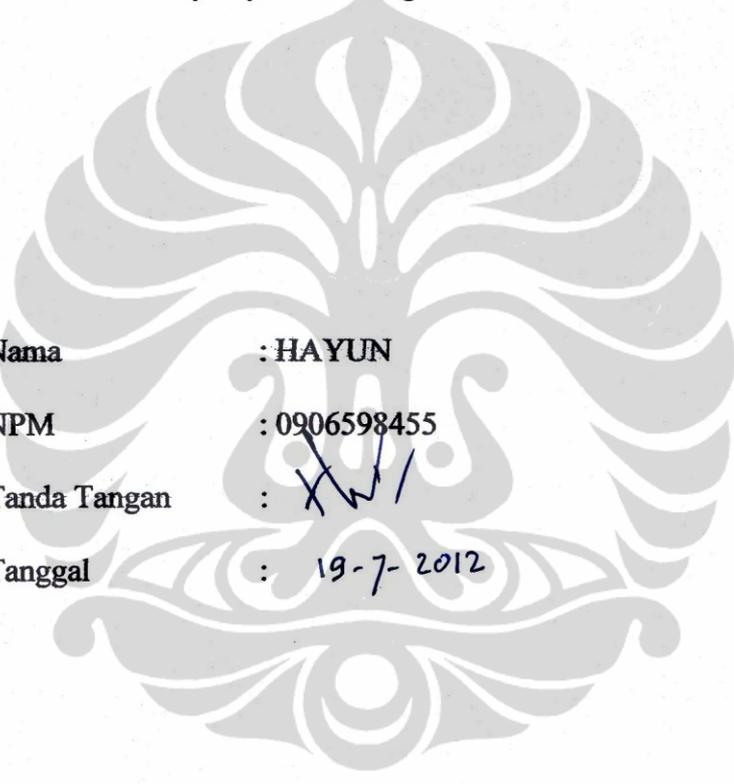
Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa disertasi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.



PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : HAYUN
NPM : 0906598455
Tanda Tangan : 
Tanggal : 19-7-2012

JUDUL : Sintesis dan Bioaktivitas 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan Analognya sebagai Inhibitor Siklooksigenase-2 (COX-2) Selektif.

Nama : Hayun

NPM : 0906598455

MENYETUJUI:



Prof. Dr. Sumi Hudiyono PWS
Promotor



Dr. Sc. Muhammad Hanafi
Kopromotor



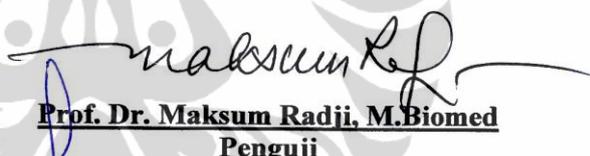
Dr. Arry Yanuar, M.Si.
Kopromotor



Dr. Emil Budianto
Penguji



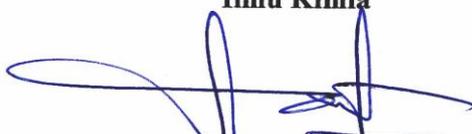
Dr. Endang Saepudin
Penguji



Prof. Dr. Maksum Radji, M.Biomed
Penguji

Prof Dr. L. Broto S. Kardono
Penguji

**Ketua Program Studi Pasca Sarjana
Ilmu Kimia**



Dr. Endang Saepudin
NIP. 195712251986021002

**Ketua Program Pasca Sarjana
Dekan Fakultas MIPA**



Dr. Adi Basukriadi, M.Sc
NIP. 195804231985031003

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Penulisan disertasi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor Ilmu Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan, dorongan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk dapat menyelesaikan disertasi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS, selaku promotor, dan Dr. Sc. Muhammad Hanafi serta Dr. Arry Yanuar, M.Si., selaku ko-promotor yang telah menyediakan waktu dan pikiran untuk memberikan arahan dan bantuan kepada saya dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan disertasi ini;
- 2) Dr. Endang Saepudin, selaku Ketua Program Pasca Sarjana Ilmu Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, dan selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan kesempatan, bantuan dan arahan selama saya menempuh pendidikan doktor ini;
- 3) Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, khususnya Laboratorium NMR dan LC-MS, yang telah memberikan bantuan dalam usaha memperoleh data spektroskopi NMR dan spektra massa (MS) senyawa hasil sintesis;
- 4) Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, khususnya Bapak Prof. Dr. Yana Maolana Syah, yang telah memberikan bantuan dalam usaha memperoleh data spektra massa resolusi tinggi (HRMS) senyawa hasil sintesis;
- 5) i-DNA Biotechnology Company, Singapura, yang telah memberikan bantuan dalam pengadaan kit uji skrining inhibitor COX, dan Elizabeth Meade, PhD serta Michelle Jedele yang telah memberikan bantuan dalam memperoleh data aktivitas senyawa uji hasil sintesis;

- 6) Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan Dekan Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada saya untuk mengikuti pendidikan doktor, dan memberikan fasilitas yang diperlukan untuk melakukan penelitian;
- 7) Direktorat Riset dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Indonesia (DRPM-UI) yang telah memberikan dana penelitian melalui skema Hibah Riset Pascasarjana Universitas Indonesia tahun anggaran 2011, dan Direktorat Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian melalui skema Hibah Riset Madya Universitas Indonesia tahun anggaran 2012, sehingga penelitian disertasi ini dapat diselesaikan dengan lancar;
- 8) Isteri dan anak-anak saya atas dukungan moral dan pengertiannya;
- 9) Rekan-rekan dosen Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, atas dukungan dan bantuannya.
- 10) Laboran/Analisis serta teknisi Laboratorium di lingkungan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, serta mahasiswa-mahasiswa yang saya bimbing dalam penelitian skripsi (Arif, Rio, Harry, Widya, Titik dan Aditya), yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Akhir kata, saya berharap Allah Subhanahu Wa Ta'ala berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga disertasi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang pengembangan dan penemuan obat.

Penulis

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

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

Nama : Hayun
NPM : 0906598455
Program Studi : Doktor Ilmu Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Disertasi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya berjudul:

Sintesis dan Bioaktivitas

4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan Analognya sebagai Inhibitor Siklooksigenase-2 (COX-2) Selektif

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 mempublikasikan 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:19-7-2012.....

Yang menyatakan,



(Hayun)

ABSTRAK

Nama : Hayun
Program Studi : Doktor Ilmu Kimia
Judul : Sintesis dan Bioaktivitas 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan Analognya sebagai Inhibitor Siklooksigenase-2 (COX-2) Selektif.

Turunan 4(3H)-kuinazolin-4-on dilaporkan mempunyai aktivitas inhibisi COX-2 dan antiinflamasi. Sebagai upaya optimisasi aktivitasnya, pada penelitian ini, 32 senyawa 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon tersubstitusi sulfonamida telah didisain dan diskriminasi secara virtual. Hasil studi menunjukkan bahwa senyawa turunan 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon mempunyai gugus *p*-benzensulfonamida pada C-2 dan cincin fenil pada N-3 mempunyai afinitas pengikatan sepadan hingga lebih tinggi dibandingkan ligan acuan SC-558 dengan orientasi pose penambatan yang serupa. Atas dasar hasil tersebut, 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan lima analognya disintesis dan diuji aktivitas inhibisinya pada COX-1 dan COX-2 secara *in vitro*. Sintesis dilakukan melalui empat tahap. Tahap 1, sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on dari asam antranilat. Tahap 2, sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya dari 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on dan anilin/anilin tersubstitusi. Tahap 3a, sintesis 4-sianobenzensulfonamida dari 4-aminobenzensulfonamida. Tahap 3b, sintesis 4-formilbenzensulfonamida dari 4-sianobenzensulfonamida. Tahap 4, sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya dari 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon/analognya dengan 4-formilbenzensulfonamida. Struktur senyawa hasil sintesis dikonfirmasi menggunakan spektra UV-Vis, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, LC-MS-ESI+ dan HRMS-ESI+ dan bioaktivitas diuji menggunakan kit uji skrining inhibitor COX. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (**2a-f**) berhasil disintesis, diperoleh murni dan struktur molekulnya sesuai dengan yang diharapkan. Senyawa **2a** hanya aktif menginhibisi COX-1, senyawa **2e** dan **2f** hanya aktif menginhibisi COX-2, sedangkan senyawa **2b**, **2c** dan **2d** aktif menginhibisi COX-1 dan COX-2. Hasil ini menunjukkan bahwa gugus fungsi pada posisi *para* N3-fenil meningkatkan aktivitas inhibisi senyawa tersebut pada COX-2. Senyawa **2d** menunjukkan aktivitas inhibisi terbesar pada COX-1 (43,7% pada konsentrasi 100 μM), dan senyawa **2c** menunjukkan aktivitas inhibisi terbesar pada COX-2 (47,1% pada konsentrasi 20 μM). Hasil studi pemodelan molekul menunjukkan bahwa adanya gugus fungsi pada posisi *para* cincin N3-fenil meningkatkan afinitas pengikatan pada COX-2 dan mendekatkan jarak antara oksigen karbonil 4(3H)-kuinazolinon dengan OH Ser530.

Kata Kunci : 4(3H)-kuinazolinon, benzensulfonamida, inhibitor COX-2, pemodelan molekul.
xvi+204 halaman ; 106 gambar; 26 tabel.
Daftar Pustaka : 109 (1942-2012)

ABSTRACT

Name : Hayun
Program Study : Doctor of Chemistry
Title : Synthesis and Bioaktivty of 4-[(*E*)-2-(4-Oxo-3-phenylquinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide and Analogs as Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitor

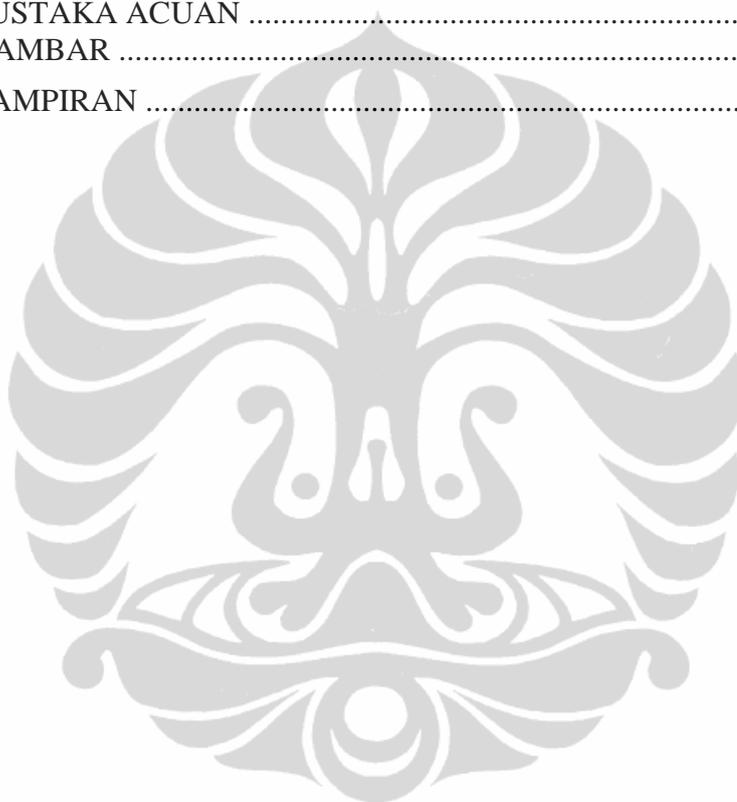
Some of 4(3H)-quinazolinone derivatives reported to have COX-2 inhibition and anti-inflammatory agent. As aims to optimize their activity, in this research, 32 sulfonamide-substituted 4(3H)-quinazolinone derivatives have been designed and screened virtually. The results show that 2,3-disubstituted-4(3H)-quinazolinones possessing *p*-benzenesulfonamide moiety at C-2 and phenyl ring at N-3 had equal to higher binding affinity than that of reference ligand SC-558 with similar docking orientation pose. Then, 4-[(*E*)-2-(4-Oxo-3-phenylquinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide and analogs were synthesized and evaluated their COX-1 and COX-2 inhibitory activity. The synthesis of titled compounds are performed via four steps. Step 1, synthesize 2-methyl-3,1-benzoxazin-one from antranilic acid. Step 2, synthesize 2-methyl-3-phenyl-4(3H)-quinazolinone and analogs from 2-methyl-3,1-benzoxazin-one and aniline/substituted aniline. Step 3a, synthesize 4-cyanobenzenesulfonamide from 4-aminobenzenesulfonamide. Step 3b, synthesize 4-formylbenzenesulfonamide from 4-cyanobenzene sulfonamide. Step 4, synthesize 4-[(*E*)-2-(4-oxo-3-phenylquinazolin-2-yl)ethenyl] benzenesulfonamide and analogs from 2-methyl-3-phenyl-4(3H)-quinazolinone/ analogs and 4-formylbenzenesulfonamide. Structures of the synthesized compounds were confirmed using UV-Vis, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, LC-MS-ES+ and HR-MS-ESI+ spectral data and their biological activity were investigated using COX inhibitor screening assay kit. The results show that 4-[(*E*)-2-(4-oxo-3-phenylquinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide and analogs (**2a-f**) were successfully synthesized, were sufficiently pure and structurally confirmed. Compound **2a** inhibits only to the activity of COX-1, compound **2e** and **2f** inhibit only to the activity of COX-2 and compound **2b**, **2c** and **2d** inhibit to the activity of COX-1 and COX-2. The results indicate that the substituent at *para* position of N3-phenyl of the compound enhances COX-2 inhibitory potency. Compound **2d** shows the highest inhibition activity to COX-1 (43,7% at 100 μM concentration) and compound **2c** shows the highest inhibition activity to COX-2 (47,1 % at 20 μM concentration). Results of molecular docking studies show that the presence of substituent at *para* position of N3-phenyl ring enhances the binding affinity toward COX-2 enzyme and brings the distance between O atom of carbonyl 4(3H)-quinazolinone closer to OH of Ser530.

Key Words : 4(3H)-quinazolinone, benzenesulfonamide, COX-2 inhibitor, molecular modelling.
xv+204 pages ; 106 pictures; 26 tables
Daftar Pustaka : 109 (1942-2012)

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iv
PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Hipotesis	5
1.3. Tujuan dan Kegunaan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Enzim Siklooksigenase	6
2.2. Inflamasi	13
2.3. Dasar Struktural Obat AINS sebagai Inhibitor COX-2	20
2.4. Penemuan dan Pengembangan Obat	25
2.5. Senyawa 4(3H)-Kuinaolinon	40
2.6. Rancangan sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinaolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (2a-f).....	50
2.7. Penentuan Struktur Molekul Senyawa Hasil Sintesis ...	52
2.8. Uji aktivitas Inhibitor Siklooksigenase	54
BAB III METODE PENELITIAN	59
3.1. Bagan Penelitian	59
3.2. Bahan-bahan dan Peralatan	60
3.3. Cara Kerja	61
3.3.1. Perancangan dan Pemilihan Senyawa	61
3.3.2. Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinaolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (2a-f) ..	63
3.3.3. Uji Aktivitas sebagai Inhibitor Siklooksigenase-1 dan -2.....	69
3.3.4. Studi Pemodelan Molekul	72
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	73
4.1. Perancangan dan Pemilihan Senyawa	73
4.2. Sintesis 2-Metil-3,1-benzoksazin-4-on (5)	79
4.3. Sintesis 2-Metil-3-fenil-4(3H)-kuinaolinon dan analognya (3a-f).....	82
4.4. Sintesis 4-Formilbenzensulfonamida (4)	93

4.5.Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida dan analognya (2a-f)	100
4.6.Uji Aktivitas Inhibisi 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida dan analognya (2a-f) pada COX-1 dan COX-2.....	116
4.7.Studi Pemodelan Molekul	125
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	129
5.1.Kesimpulan	129
5.2. Saran	130
PUSTAKA ACUAN	131
GAMBAR	141
LAMPIRAN	198



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Penambahan reagen-reagen pereaksian COX	70
Tabel 3.2.	Penambahan reagen-reagen EIA	71
Tabel 4.1.	Struktur Kimia Turunan 2,3-Diaril-4(3H)-Kuiazolinon Tersubstitusi Gugus Sulfonamida yang Diskrining Aktivitasnya secara Virtual sebagai Inhibitor Siklooksigenase-2 (COX-2)	74
Tabel 4.2.	Sifat fisika-kimia dan Hasil-Hasil Penambatan Molekul Senyawa 2,3-Disubstitusi-4(3H)-Kuiazolinon yang mempunyai Gugus Benzensulfonamid, SC-558 and Selekoksisib	75
Tabel 4.3.	Kondisi dan Hasil Sintesis Senyawa 3a-f dalam Pelarut Asam Asetat Glisial dan Suhu Refluks 125 °C	83
Tabel 4.4.	Data Spektra FT-IR Senyawa 3a-f	85
Tabel 4.5.	Data ¹ H-NMR Senyawa 3a	86
Tabel 4.6.	Data ¹³ C-NMR Senyawa 3a	87
Tabel 4.7.	Korelasi proton dan karbon hasil analisis HMQC dan Korelasi proton dengan karbon 2-3 ikatan hasil analisis HMBC senyawa 3a	88
Tabel 4.8.	Data Spektra ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa 3a, 3b, 3c, 3d, 3e dan 3f	90
Tabel 4.9.	Data FT-IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa 9	96
Tabel 4.10.	Data FT-IR, ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa 4	99
Tabel 4.11.	Hasil sintesis senyawa 2a-f dalam pelarut asam asetat glasial, refluks 4 jam, suhu 100 °C, dan katalis natrium asetat anhidrat	102
Tabel 4.12.	Data Spektra LC-MS, HR-MS, UV-Vis, dan FT-IR Senyawa 2a	106
Tabel 4.13.	Data Spektra ¹ H-NMR Senyawa 2a	107
Tabel 4.14.	Data Spektra ¹³ C-NMR Senyawa 2a	108
Tabel 4.15.	Korelasi proton dengan karbon hasil analisis HMQC dan Korelasi proton dengan karbon 2-3 ikatan hasil analisis HMBC senyawa 2a	109
Tabel 4.16.	Data Spektra LC-MC, HR-MS, UV-Vis, dan FT-IR Senyawa 2a, 2b, 2c, 2d, 2e dan 2f	111
Tabel 4.17.	Data Spektra ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa 2a, 2b, 2c, 2d, 2e dan 2f	112
Tabel 4.18.	Perbandingan massa eksperimental dengan massa hitungan senyawa 2a, 2b, 2c, 2d, 2e dan 2f hasil analisis HR-MS	114
Tabel 4.19.	Inhibisi COX-1 oleh senyawa inhibitor COX-1 spesifik SC- 560	118
Tabel 4.20.	Inhibisi COX-2 oleh senyawa inhibitor spesifik COX-2 DuP-697	118
Tabel 4.21.	Inhibisi COX-1 oleh senyawa 2a-f , Selecoxib dan Aspirin ..	120
Tabel 4.22.	Inhibisi COX-2 oleh senyawa 2a-f , Selecoxib dan Aspirin ..	122

Tabel 4.23.	Perbandingan Persen (%) Inhibisi Senyawa 2a-f pada COX-1 dan COX-2	125
Tabel 4.24.	Aktivitas Inhibisi, Sifat Fisika-Kimia dan Hasil Penambatan Molekul Senyawa 2a-f	126



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Struktur kimia senyawa SC-558 (1) dan 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (2a-f).	3
Gambar 1.2.	Analisis retrosintetik 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida.	4
Gambar 2.1.	Skema biokonversi prostaglandin/kelompok asam lemak turunan asam prostanoat.	7
Gambar 2.2.	Diagram enzim prostaglandin sintase (PGHS)	10
Gambar 2.3.	Representasi struktural dimer <i>murine</i> PGHS (COX-2).....	11
Gambar 2.4.	Katalisis oleh peroksidase dan siklooksigenase. PPIX = protoporfirin IX; AA = asam arakidonat.	12
Gambar 2.5.	Struktur kimia beberapa obat AINS	14
Gambar 2.6.	Contoh struktur kimia inhibitor COX-2 selektif	16
Gambar 2.7.	Skema reaksi asetilasi residu serin oleh aspirin.	18
Gambar 2.8.	Penggambaran pita struktur kristal dari sisi aktif PGHS-1 yang terasetilasi oleh aspirin.	18
Gambar 2.9.	Mekanisme inhibisi COX	19
Gambar 2.10.	Pengikatan flurbiprofen pada sisi aktif <i>ovine</i> COX-1 (A) dan Pengikatan indometasin pada sisi aktif <i>murine</i> COX-2 (B)	21
Gambar 2.11.	Pengikatan SC-558 pada sisi aktif <i>murine</i> COX-2	23
Gambar 2.12.	Diagram skematik perbedaan loka pengikatan obat-obat AINS pada COX-1 dan COX-2.....	24
Gambar 2.13.	Tahapan proses pengembangan obat, tanpa bantuan metoda komputasi dan dengan bantuan metoda komputasi	27
Gambar 2.14.	Struktur kimia kuinazolina (27), 2(1H)-kuinazolinon (28) dan 4(3H)-kuinazolinon (29).	40
Gambar 2.15.	Skema reaksi kondensasi 2-metil-4(3H)-kuinazolinon (30) dengan benzaldehida (31).	42
Gambar 2.16.	Skema reaksi sintesis 4(3H)-kuinazolinon dari asam antranilat dan amida.....	43
Gambar 2.17.	Skema reaksi preparasi 3-amino-2-metil-4(3H)-kuinazolinon.	44
Gambar 2.18.	Skema reaksi kondensasi 4(H)-3,1-benzoksazin-4-on dengan amina primer.	44
Gambar 2.19.	Skema reaksi sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (asetilantranil) (5).....	46
Gambar 2.20.	Reaksi asetilantranil dengan senyawa anilin.....	47
Gambar 2.21	Skema reaksi sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzene sulfonamida dan analognya (2a-f).	51
Gambar 2.22.	Skema reaksi sintesis 4-formilbenzensulfonamida (40). ...	52

Gambar 2.23.	Reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis AChE.....	57
Gambar 3.1.	Bagan penelitian disertasi	59
Gambar 4.1.	Orientasi pose penambatan (a) SC-558, (b) senyawa VS-3d dan (c) senyawa VS-7d (ball & stick) pada sisi aktif dari COX-2.	77
Gambar 4.2.	Skema reaksi sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (5)...	79
Gambar 4.3.	Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa 5 , diamati di bawah sinar UV 256 nm.....	80
Gambar 4.4.	Kurva densitas kromatogram KLT senyawa 5	80
Gambar 4.5.	Spektra serapan UV-Vis bercak senyawa 5	81
Gambar 4.6.	Spektra FT-IR senyawa 5 dalam KBr.....	141
Gambar 4.7.	Spektra FT-IR Asam Antranilat dalam KBr.....	141
Gambar 4.8.	Skema reaksi sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (3a-f).....	82
Gambar 4.9.	Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa 3a-f diamati di bawah sinar UV 254 nm.	84
Gambar 4.10.	Spektrum FT-IR senyawa 3a dalam KBr.....	142
Gambar 4.11.	Spektrum FT-IR senyawa 3b dalam KBr.....	142
Gambar 4.12.	Spektrum FT-IR senyawa 3c dalam KBr.....	143
Gambar 4.13.	Spektrum FT-IR senyawa 3d dalam KBr.....	143
Gambar 4.14.	Spektrum FT-IR senyawa 3e dalam KBr.....	144
Gambar 4.15.	Spektrum FT-IR senyawa 3f dalam KBr.....	144
Gambar 4.16.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3a dalam CDCl ₃ pada 500 MHz.	145
Gambar 4.17.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 3a dalam CDCl ₃ pada 125 MHz.	146
Gambar 4.18a- 4.18d.	Spektrum HMQC senyawa 3a	147- 148
Gambar 4.19a- 4.18f.	Spektrum HMBC senyawa 3a	149- 151
Gambar 4.20.	Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa 3a .	88
Gambar 4.21.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3b dalam CDCl ₃ pada 500 MHz.	152
Gambar 4.22.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3c dalam CDCl ₃ pada 500 MHz	153
Gambar 4.23.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3d dalam CDCl ₃ pada 500 MHz	154
Gambar 4.24.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3e dalam CDCl ₃ pada 500 MHz	155
Gambar 4.25.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 3f dalam CDCl ₃ pada 500 MHz.	156
Gambar 4.26.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 3b dalam CDCl ₃ pada 125 MHz.	157
Gambar 4.27.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 3c dalam CDCl ₃ pada 125 MHz	158
Gambar 4.28.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 3d dalam CDCl ₃ pada 125 MHz	159

Gambar 4.29.	Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 3e dalam CDCl_3 pada 125 MHz	160
Gambar 4.30.	Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 3f dalam CDCl_3 pada 125 MHz.	161
Gambar 4.31.	Mekanisme reaksi pembentukkan 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon (3)	92
Gambar 4.32.	Mekanisme pembentukkan senyawa arilnitril.	93
Gambar 4.33.	Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa 9 diamati di bawah sinar UV 254 nm.	95
Gambar 4.34.	Spektrum FT-IR senyawa 9 dalam KBr.	162
Gambar 4.35.	Spektrum ^1H -NMR senyawa 9 dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz.	163
Gambar 4.36.	Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 9 dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz.	164
Gambar 4.37.	Skema reaksi sintesis arilaldehid dari arilnitril.	97
Gambar 4.38.	Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa 4 diamati di bawah sinar UV 254 nm.	98
Gambar 4.39.	Spektrum FT-IR senyawa 4 dalam KBr.	165
Gambar 4.40.	Spektrum ^1H -NMR senyawa 4 dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz.	166
Gambar 4.41.	Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 4 dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz.	167
Gambar 4.42.	Skema reaksi sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensensulfonamida (2a).	100
Gambar 4.40.	Usulan mekanisme reaksi kondensasi 2-metil-4(3H)-kuinazolinon dengan aldehida (benzaldehida), menghasilkan senyawa 2-stiril-4(3H)-kuinazolinon.	101
Gambar 4.44.	Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa 2a-f diamati di bawah sinar UV 254 nm.	103
Gambar 4.45.	Kromatogram LC dengan detektor massa dan Spektrum massa LC-ESI+ (B) senyawa 2a	168
Gambar 4.46.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi (HR-MS ESI+) senyawa 2a	168
Gambar 4.47.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2a dalam asetonitril...	169
Gambar 4.48	Spektrum FT-IR senyawa 2a dalam KBr	169
Gambar 4.49.	Spektrum ^1H -NMR senyawa 2a dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz.	170
Gambar 4.50.	Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 2a dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz.	171
Gambar 4.51a-4.51d	Spektrum HMQC senyawa 2a	172-173
Gambar 4.52a-4.15g	Spektrum HMBC senyawa 2a	174-177
Gambar 4.53	Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa 2a ...	110

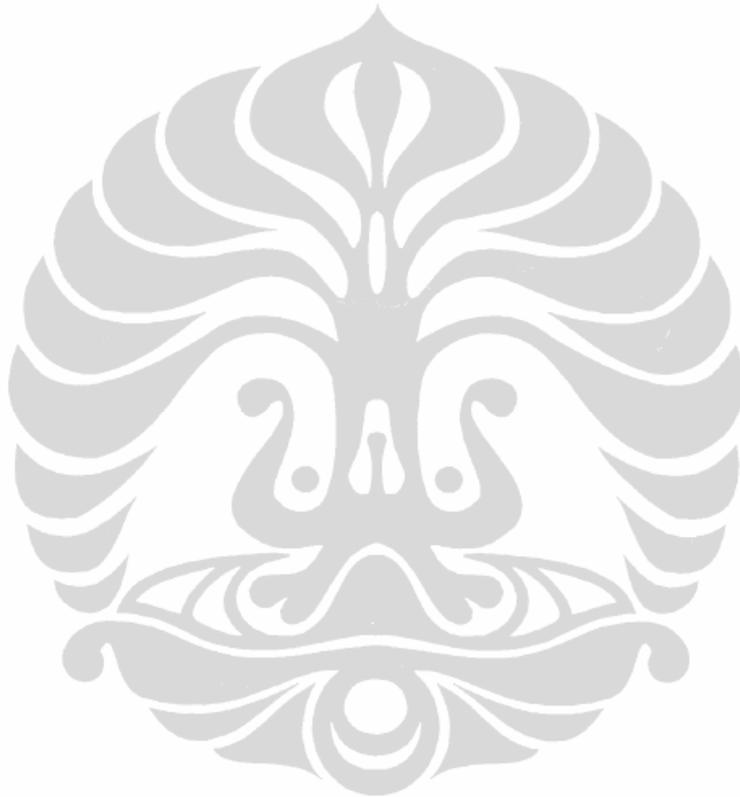
Gambar 4.54.	Kromatogram dengan detektor massa dan Spektrum Massa ESI+ senyawa 2b	178
Gambar 4.55.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2b	178
Gambar 4.56.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2b dalam asetonitril. ...	179
Gambar 4.57.	Spektrum FT-IR senyawa 2b dalam KBr.	179
Gambar 4.58.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 2b dalam (CD ₃) ₂ SO pada 500 MHz.	180
Gambar 4.59.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 2b dalam (CD ₃) ₂ SO pada 125 MHz.	181
Gambar 4.60.	Kromatogram dengan detektor massa dan Spektrum Massa ESI+ senyawa 2c	182
Gambar 4.61.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2c	182
Gambar 4.62.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2c dalam asetonitril. ...	183
Gambar 4.63.	Spektrum FT-IR senyawa 2c dalam KBr	183
Gambar 4.64.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 2c dalam (CD ₃) ₂ SO pada 500 MHz.	184
Gambar 4.65	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 2c dalam (CD ₃) ₂ SO pada 125 MHz.	185
Gambar 4.66.	Kromatogram dengan detektor massa dan Spektrum Massa ESI+ senyawa 2d	186
Gambar 4.67.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2d	186
Gambar 4.68.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2d dalam asetonitril. ...	187
Gambar 4.69.	Spektrum FT-IR senyawa 2d dalam KBr	187
Gambar 4.70.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 2d dalam (CD ₃) ₂ SO pada 500 MHz	188
Gambar 4.71.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 2d dalam (CD ₃) ₂ SO pada 125 MHz	189
Gambar 4.72.	Kromatogram dengan detektor massa dan Spektrum Massa ESI+ senyawa 2e hasil sintesis.	190
Gambar 4.73.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2e	190
Gambar 4.74.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2e dalam asetonitril.	191
Gambar 4.75.	Spektrum FT-IR senyawa 2e dalam KBr	191
Gambar 4.76.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 2e dalam (CD ₃) ₂ SO pada 500 MHz	192
Gambar 4.77.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 2e dalam (CD ₃) ₂ SO pada 125 MHz.	193
Gambar 4.78.	Kromatogram dengan detektor massa dan Spektrum Massa ESI+ senyawa 2f	194
Gambar 4.79.	Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2f	194
Gambar 4.80.	Spektrum UV-Vis larutan senyawa 2f dalam asetonitril.	195
Gambar 4.81.	Spektrum FT-IR senyawa 2f dalam KBr.	195
Gambar 4.82.	Spektrum ¹ H-NMR senyawa 2f dalam (CD ₃) ₂ SO pada 500 MHz.	196
Gambar 4.83.	Spektrum ¹³ C-NMR senyawa 2f dalam (CD ₃) ₂ SO pada 125 MHz.	197

Gambar 4.84.	Perbandingan persen (%) inhibisi senyawa 2a-f , selekoksib dan Aspirin pada COX-1.	119
Gambar 4.85.	Perbandingan persen (%) inhibisi senyawa 2a-f , selekoksib dan aspirin pada COX-2.	121
Gambar 4.86.	Orientasi pose penambatan senyawa 2c (ball & stick) pada sisi aktif dari COX-2.	127



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Pembuatan Tembaga (I) sianida [Cu(I)CN]	198
Lampiran 2.	Daftar reagen yang digunakan untuk uji skrining inhibitor siklooksigenase (COX)	199
Lampiran 3.	Penentuan Persen (%) Inhibisi dan IC ₅₀	200
Lampiran 4.	Daftar Publikasi Terkait Disertasi	204



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Obat anti-inflamasi nonsteroid (AINS) merupakan obat yang paling banyak digunakan untuk terapi nyeri, inflamasi, rheumatoid arthritis dan osteoarthritis. Mekanisme aksi obat AINS adalah melalui penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (COX). Enzim ini berperan dalam mengkatalisis biosintesis prostaglandin (PG), prostasiklin dan tromboksan. Selain menunjukkan efek anti-inflamasi, obat ini juga menunjukkan efek kemoprotektif pada profilaksis kanker kolorektal dan payudara. (Smith, Garavito & DeWit, 1996; Ashok, Dash, Rohan, Sprafka & Terry, 2011; Warner & Mitchell, 2002; Rao & Knaus, 2008).

Penelitian dan pengembangan obat AINS sudah dilakukan lebih dari satu abad, namun hingga kini belum dapat menemukan obat AINS yang ideal. Obat AINS klasik sering menimbulkan efek yang tidak diinginkan seperti pendarahan lambung dan kerusakan renal. Efek yang tidak diinginkan tersebut timbul karena obat AINS klasik menghambat aktivitas enzim COX-1. Obat AINS baru golongan inhibitor COX-2 selektif (“coxib”) mempunyai toksisitas gastrointestinal dan renal lebih rendah, namun selektivitas yang terlalu tinggi dapat meningkatkan risiko terhadap kardiovaskular (Segev & Katz, 2004; Coruzzi, Venturi & Spaggiari, 2007; Funk & FitzGerald, 2007). Kondisi di atas menunjukkan bahwa masih sangat diperlukan penemuan obat AINS atau inhibitor COX-2 baru yang mempunyai efek terapeutik dan tolerabilitas lebih baik.

Beberapa senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon dilaporkan mempunyai aktivitas anti-inflamasi dan inhibitor COX-2, namun aktivitasnya lemah (Hitkari, Bhalla, Saxena, Verma, Gupta, & Shanker, 1995; Mohamed, Kamel, Abotaleb, Nofal & Ahmed, 2009). Dalam rangka mengembangkan molekul turunan 4(3H)-kuinazolinon menjadi senyawa inhibitor COX-2 yang

lebih poten, maka struktur molekul senyawa tersebut perlu dimodifikasi. Ada beberapa pendekatan untuk melakukan modifikasi struktur, diantaranya adalah mengacu pada struktur molekul obat yang sudah ada.

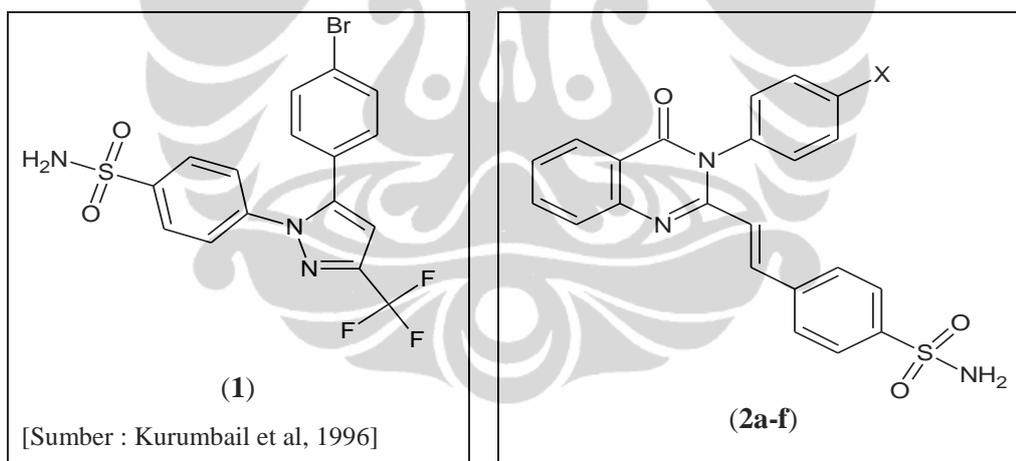
Kebanyakan struktur senyawa inhibitor COX-2 selektif merupakan diarilheterosiklik. Hasil beberapa studi hubungan struktur-aktivitas pada kelas diarilheterosiklik menunjukkan bahwa gugus fungsi sulfonamida atau metilsulfon pada posisi *para* dari salah satu cincin arilnya dibutuhkan untuk menghasilkan potensi dan selektivitas inhibisi COX-2 yang optimum (Kurumbail et al., 1996; Rao & Knaus, 2008; Zargi, Rao & Knaus, 2007). Struktur cincin heterosiklik sentral yang digunakan pada senyawa itu bervariasi, antara lain: pirazol, 5H-furan-2-on, isoksazol, tiofen, piridin, piran-2-on (Rao & Knaus, 2008; Flower, 2003; Rao, Uddin & Knaus, 2004).

Berdasarkan hasil studi kepustakaan, senyawa 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon yang tersubstitusi gugus sulfonamida pada salah satu cincin arilnya, belum diketahui aktivitasnya. Untuk memprediksi senyawa-senyawa turunan 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon tersubstitusi gugus sulfonamida yang berpotensi mempunyai aktivitas sebagai inhibitor COX-2, maka pada penelitian ini senyawa-senyawa tersebut diskriming secara *virtual* menggunakan metode penambatan molekul. Metode ini dapat mensimulasi bagaimana interaksi senyawa tertentu dengan protein target, sehingga selain dapat digunakan untuk memprediksi apakah suatu senyawa berpotensi mempunyai aktivitas atau tidak, juga dapat digunakan untuk membangun hipotesis mengenai struktur dan sifat-sifat kimia yang dibutuhkan untuk aktivitas obat itu (Schneider & Bohm, 2002; Introduction, 2005; Kolb, Ferreira, Irwin & Shoichet, 2009; Nogrady & Weaver, 2005).

Hasil skrining *virtual* terhadap senyawa-senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon tersubstitusi sulfonamida, menggunakan metode penambatan molekul, biomolekul target enzim COX-2 (PDB ID : 6COX) dan ligan acuan SC-558 (**1**) (Gambar 1) menunjukkan bahwa semua senyawa-senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon yang pada C-2 tersubstitusi *p*-benzensulfonamida dan pada N-3 tersubstitusi cincin aril, dapat berikatan dengan COX-2 dengan afinitas pengikatan yang sepadan hingga lebih tinggi dibandingkan ligan

acuan **1**, dengan orientasi pengikatan yang serupa. Senyawa-senyawa tersebut juga mempunyai sifat-sifat fisika-kimia yang memungkinkan dapat aktif *per oral* sesuai kriteria “Aturan lima Lipinski” (Hayun, Yanuar, Hanafi dan Hudiyono, 2011).

Salah satu senyawa yang diprediksi akan mempunyai aktivitas sebagai inhibitor COX-2 adalah 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida (**2a**) {Gambar 1.1; kode senyawa **VS-7d** pada Tabel 4.1 dan Tabel 4.2.). Berdasarkan hasil telaah kebaruan (*novelty*), dengan cara mengunggah struktur molekul senyawa ini ke pangkalan data (*database*) “ZINC” (<http://zinc.docking.org/>) (Irwin and Shoichet, 2005) dan ChemSpider (<http://chemspider.com/>), penelusuran kepustakaan dan informasi paten, menunjukkan bahwa senyawa **2a** belum pernah disintesis dan diteliti oleh peneliti sebelumnya dan belum termasuk senyawa yang telah dipatenkan oleh Elliot, Welch, dan Chenard (2001).

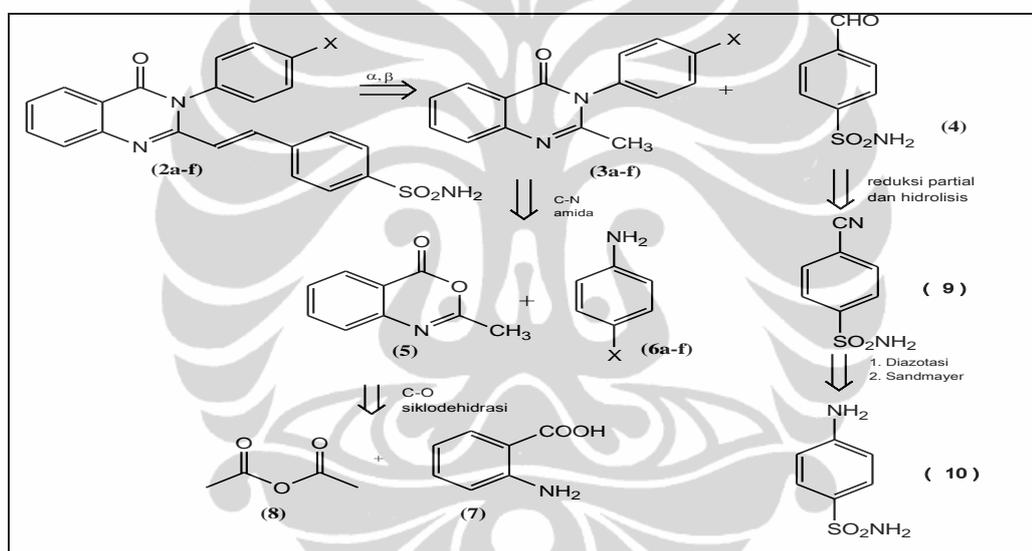


Gambar 1.1. Struktur kimia senyawa SC-558 (**1**) dan 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida; X = H, CH₃, OCH₃, Cl, Br, COOC₂H₅ (**2a-f**).

Untuk membuktikan prediksi aktivitas senyawa **2a** di atas, maka senyawa **2a** perlu disintesis dan diuji aktivitasnya. Perbedaan struktur dan sifat fisika-kimia molekul ligan berpengaruh pada aktivitas biologisnya. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh tersebut, selain perlu disintesis senyawa **2a**, juga perlu disintesis beberapa analognya. Pemilihan senyawa-senyawa

analog didasarkan pada variasi sifat-sifat fisika-kimia yang akan dimiliki oleh senyawa analog tersebut.

Berdasarkan analisis retrosintetik (Waren, 1982) dan sejumlah informasi kepustakaan menunjukkan bahwa metode sintesis, bahan-bahan pemula, reagen-reagen kimia dan pelarut yang diperlukan tersedia, sehingga senyawa **2a** dan analognya dapat disintesis (Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979; Suthakaran, Kavimani, Venkappayya, Sakina & Suganthi, 2008; Connolly, Cusack, O'Sullivan & Guiry, 2005; Gupta, Kashaw, Jatav & Mishra, 2008; Varma, Bahadur & Agnihotri, 1981). Analisis retrosintetik senyawa **2a-f** dapat dilihat pada Gambar 1.2.



Gambar 1.2. Analisis retrosintetik 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzenesulfonamida dan analognya (**2a-f**). **3a-f**: 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya; **4**: 4-formilbenzenesulfonamida; **5**: 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on; **6a-f**: anilin dan analognya; **7**: asam antranilat; **8**: anhidrida asetat; **9**: 4-sianobenzenesulfonamida; **10**: 4-aminobenzenesulfonamida.

Atas dasar pertimbangan-pertimbangan di atas, maka penulis melakukan penelitian mengenai sintesis dan bioaktivitas 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzenesulfonamida dan analognya (**2a-f**) sebagai inhibitor COX-2 selektif.

1.2. Hipotesis

- 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya dapat dibuat dengan cara sintesis kimia organik.
- 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya dapat menghambat aktivitas enzim COX-2 secara selektif. Potensi dan selektivitasnya sebagai inhibitor COX-2 beragam.
- Faktor struktural/sifat fisika-kimia senyawa yang diperkirakan berpengaruh pada potensi dan selektivitasnya dapat diketahui melalui studi pemodelan molekul.

1.3. Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- Mendapatkan senyawa diarilheterosiklik baru turunan 4(3H)-kuinazolinon yaitu 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (**2a-f**) dengan cara sintesis kimia organik.
- Mengetahui potensi dan selektivitas senyawa **2a-f** dalam menghambat aktivitas COX-1 dan COX-2 *in vitro*.
- Mengetahui faktor struktural/sifat fisika-kimia senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida yang berpengaruh pada potensi dan selektivitas sebagai inhibitor COX-2 .

Penelitian ini bermanfaat untuk:

- Memperkaya ilmu pengetahuan dalam bidang perancangan, sintesis dan uji bioaktivitas senyawa kimia organik, khususnya untuk obat inhibitor COX-2 selektif.
- Menyusun strategi pengembangan lebih lanjut senyawa diarilheterosiklik turunan 4(3H)-kuinazolinon untuk dikembangkan sebagai obat anti-inflamasi yang diharapkan mempunyai efek terapeutik dan tolerabilitas lebih baik atau sebagai obat untuk terapi keadaan patologis lain yang disebabkan aktivasi COX-2 berlebihan seperti kanker kolon.

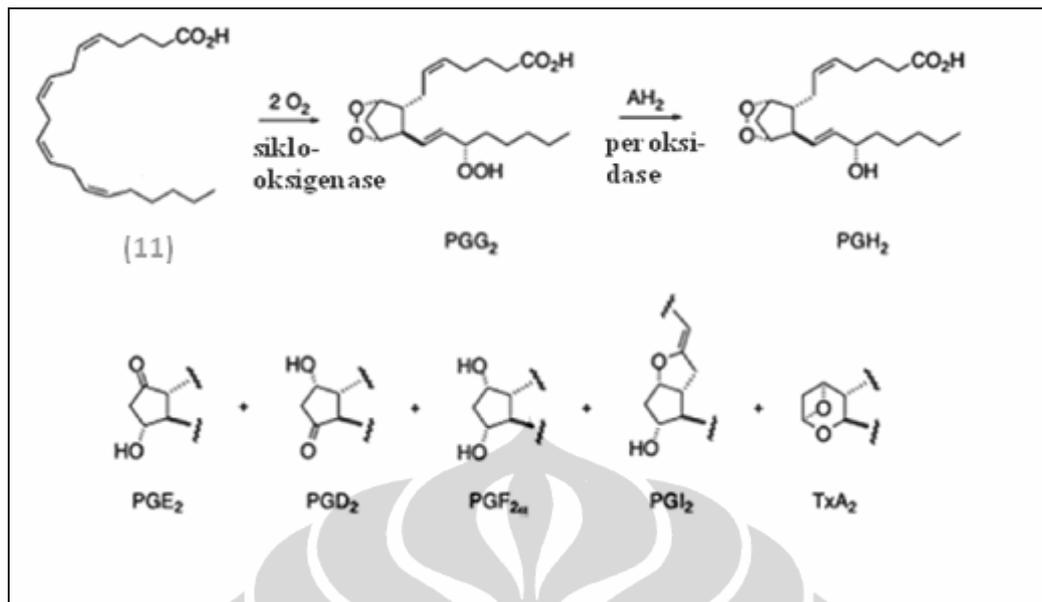
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Siklooksigenase

Siklooksigenase (COX) (EC 1.14.99.1) merupakan enzim kunci yang mengkonversi asam arakidonat (**11**) menjadi sejumlah senyawa prostaglandin (PG). Peran ini pertama kali ditemukan oleh Vane pada tahun 1971. Vane mempublikasikan penemuannya bahwa obat AINS menekan inflamasi terutama karena kemampuannya menghambat aktivitas enzim COX. Penghambatan ini membatasi produksi senyawa PG pro peradangan di sekitar luka. Setelah penemuan ini, obat AINS digunakan oleh para peneliti untuk membedah peran kritis baik enzim COX maupun senyawa-senyawa yang diderivasi melalui jalur ini pada keadaan fisiologik normal dan abnormal (Dubois et al., 1998).

Asam arakidonat dilepaskan dari bentuk esternya oleh enzim-enzim lipolitik, kemudian dikonversi menjadi prekursor senyawa-senyawa PG oleh prostaglandin sintase. Prostaglandin sintase atau prostaglandin H sintase (PGHS) adalah protein yang menempel pada membran terutama pada retikulum endoplasma lunak jaringan-jaringan mamalia. Prostaglandin sintase terdiri dari dua komponen yaitu enzim siklooksigenase dan enzim hidroperoksidase. Enzim siklooksigenase mengintroduksi empat atom oksigen pada asam arakidonat menjadi prostaglandin G_2 (PGG_2). Tahapan ini diikuti dengan reduksi dua elektron oleh enzim hidroperoksidase menjadi PGH_2 . PGH_2 kemudian dikonversi menjadi bermacam-macam prostaglandin antara lain PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, prostasiklin (PGI_2) dan tromboksan A_2 (TXA_2). PG yang dihasilkan bergantung enzim pengkonversi berikutnya yang terdapat pada sel-sel tertentu. Sebagai contoh sel-sel endothelial terutama menghasilkan PGI_2 , sedangkan sel-sel platelet terutama menghasilkan TXA_2 (Blobaum dan Marnett, 2006). Skema biosintesis prostaglandin dapat dilihat pada Gambar 2.1.



[Sumber : Blobaum dan Marnett, 2006]

Gambar 2.1. Skema biokonversi prostaglandin/kelompok asam lemak turunan asam prostanat. Telah diolah kembali

2.1.1. Peran Senyawa Prostaglandin

Senyawa-senyawa PG tersebar luas diberbagai jaringan mamalia. Selain berperan sentral dalam proses inflamasi, juga berperan dalam pengaturan respon-respon fisiologik kritis lainnya seperti fungsi ginjal, fungsi saraf dan otak, fungsi ovarium dan uterus, metabolisme tulang, pengendalian kanker dan lain-lain. Inhibisi sintesis PG menghasilkan efek yang bermanfaat untuk pengobatan, tetapi bersamaan dengan itu dapat menghasilkan efek-efek yang tidak diinginkan a.l. :

- a) Pada loka inflamasi, PGE₂ yang diproduksi dapat mengsensitisasi ujung-ujung saraf nyeri dan meningkatkan aliran darah, yang meningkatkan perasaan sakit dan menyebabkan pembengkakan dan kemerahan jaringan. Oleh karena itu, inhibisi pembentukan PGE₂ melalui inhibisi COX lokal dapat menerangkan efek antiinflamasi obat-obat AINS.
- b) PGI₂ dan PGE₂ berperan dalam proteksi lambung dan inhibisi pembentukan mereka dapat menerangkan toksisitas gastrointestinal yang berhubungan dengan penggunaan dosis tinggi dan jangka panjang obat AINS.

c) PGI₂ berperan sebagai vasodilator dan anti-agregator, sebaliknya TXA₂ berperan menginduksi agregasi platelet. Inhibisi COX pada platelet dapat menerangkan kemampuan aspirin mengurangi pembekuan darah. Pengurangan PGI₂ dan kenaikan TXA₂ dapat meningkatkan viskositas darah dan penyempitan vaskular.

Perbedaan efek PG disebabkan oleh perbedaan struktur kimia, keanekaragaman reseptor dan pengaturan sintesis PG oleh pengaruh-pengaruh lokal (Warner and Mitchell, 2002; Dubois et al, 1998).

2.1.2. Isoform Siklooksigenase (COX)

Pada awal tahun 1990-an ditemukan adanya dua isoform COX yang strukturnya mirip. Isozim yang telah dikenal lebih dulu kemudian diberi nama COX-1, sedangkan isozim yang baru diberi nama COX-2. COX-1 terdapat pada kebanyakan jaringan mamalia, sedangkan COX-2 biasanya tidak terdeteksi pada keadaan istirahat, namun dengan cepat diinduksi oleh mediator-mediator inflamasi seperti lipopolisakarida (LPS), interleukin-1 (IL-1), tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) pada berbagai sel dan jaringan seperti endothelium vaskular, osteoklast, sel-sel endothelial synovial rheumatoid, monosit-monosit dan makrofag-makrofag. Hal ini memunculkan teori bahwa isoenzim COX-1 memproduksi senyawa PG yang berfungsi sebagai penjaga-rumah, termasuk pertahanan mukosa gastrik dan homeostasis renal, sedangkan COX-2 mensintesis senyawa PG yang bertanggung jawab terhadap terjadinya inflamasi dan nyeri (Warner & Mitchell, 2002; Rao & Knaus, 2008). Penelitian peran COX-2 pada penyakit memberi kesan bahwa aktivasi kronik pada enzim ini menyebabkan patologi kolon, karena ada bukti bahwa inhibisi COX-2 dapat membatasi perkembangan kanker kolon (Goodsell, 2000; Dubois et al., 1998).

Pada tahun 2002 isozim COX yang ketiga diintroduksi dan diberi nama COX-3. Isozim ini merupakan varian dari COX-1 yang dapat diinhibisi secara selektif oleh asetaminofen dan obat-obat analgesik/antipiretika lainnya. Dengan demikian, inhibisi COX-3 merupakan mekanisme sentral utama yang mengakibatkan obat dapat mengurangi rasa nyeri dan demam (Warner dan

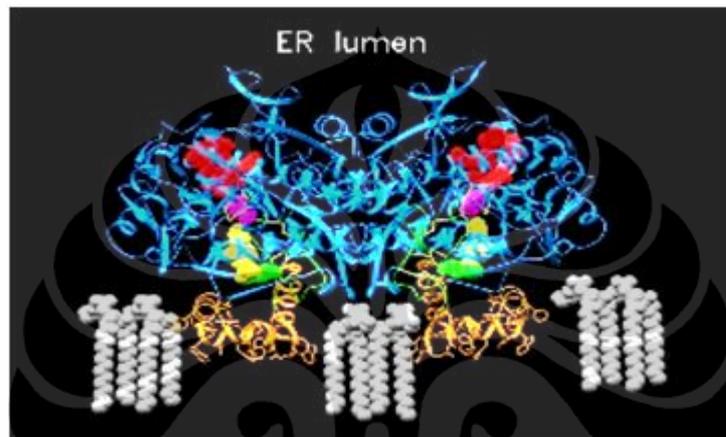
Mitchell, 2002). Namun kemudian diketahui bahwa pengkodean protein COX-3 sangat berbeda urutan asam aminonya dibandingkan COX-1 dan COX-2 rodent dan manusia. Selain itu aktivitas COX-nya lemah, sehingga meniadakan perannya dalam menyebabkan nyeri dan demam. Oleh karena itu, relevansi COX-3 sebagai target obat dipertanyakan (Simmons, Chandrasekharan, Hu, Roos & Tomsik, 2005; Rao dan Knaus, 2008).

2.1.3. Struktur Enzim Siklooksigenase

COX-1 dan COX-2 merupakan enzim homodimer. Dimerisasi diperlukan untuk integritas struktural dan aktivitas katalitik. COX-1 biri-biri (*ovine*) merupakan salah satu protein membran pertama yang dikristalisasi dan strukturnya diketahui. Dewasa ini tersedia beberapa struktur kristal COX, termasuk beberapa diantaranya berikatan dengan inhibitor. Unit kristal COX-1/flurbiprofen terlihat terdiri dari dua monomer yang identik yang memperlihatkan kontak yang ekstensif. Tiap subunit memiliki dua sisi aktif yang terpisah, yaitu sisi aktif COX dan hidroperoksidase. Gabungan keduanya disebut prostaglandin H sintase (PGHS). Tiap subunit mempunyai pegangan yang ditutupi dengan asam-asam amino hidrofobik. Pegangan ini menjangkarkan (menempelkan) enzim pada membran retikulum endoplasma (Bruce, 1998; Blobaum and Marnett, 2007). Gambar 2.2 menunjukkan bagaimana unit lipatan kedua enzim PGHS berinteraksi dengan lipid bilayer.

Setiap subunit monomer dari struktur dimer prostaglandin sintase berisi 576-587 asam amino, yang hampir 40% diantaranya merupakan residu α -helikal dan tidak berisi sama sekali residu lembaran β -berlipat. Pada setiap subunit monomer terdapat tiga unit lipatan berbeda yang ditemukan dalam molekul ini (Gambar 2.3). Unit lipatan pertama (33-72 residu) adalah domain yang kompak yang dipegangi bersama oleh tiga ikatan-ikatan disulfida intra-domain. Domain ini bertanggung jawab untuk memulai dan mempertahankan interaksi protein-protein (*Epidermal Growth Factor-Like Domain*). Unit lipatan kedua (residu 73-116) berisi empat α -helikal yang dipercaya membentuk motif untuk penyusupan ke dalam lipid bilayer (*membrane binding domain*). Unit lipatan ketiga (residu 117-580) merupakan domain

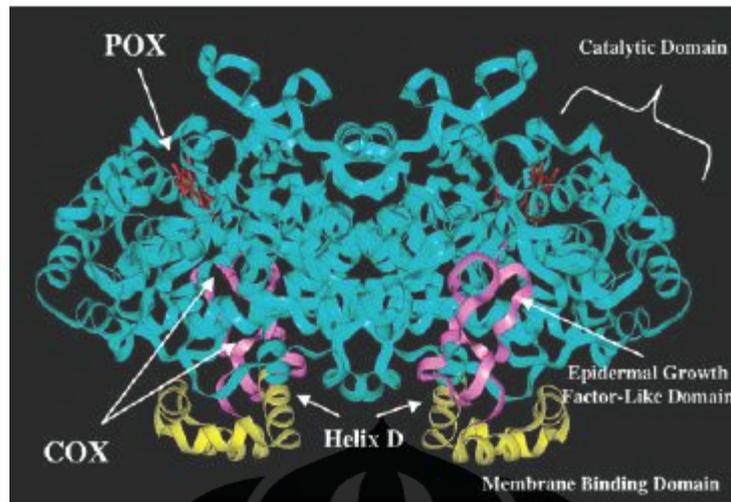
katalitik (*catalytic domain*). Ini merupakan unit lipatan yang paling luas dan berisi sisi aktif COX dan peroksidase. Akses ke dalam kanal COX hidrofobik diperoleh dari sisi dalam bilayer melalui jalan masuk yang dibentuk oleh empat helik amfipatik(helix D). Asam arakidonat adalah hidrofobik dan dianggap dapat memperoleh akses langsung ke kanal COX dari sisi dalam dari bilayer (Kurumbail et al., 1996; Bruce, 1998).



[Sumber: Bruce, 1998]

Gambar 2.2. Diagram enzim prostaglandin sintase (PGHS)

Sisi aktif COX, yang melakukan reaksi pertama pada sintesis PG, ditemukan masuk dalam kantung terkubur dalam protein yang dapat dicapai melalui kanal yang terbuka, berbentuk seperti corong yang mengarahkan asam arakidonat keluar dari membran dan masuk ke dalam sisi aktif enzim. Sisi aktif peroksidase pada bagian atas permukaan enzim, yang merubah peroksida pada molekul PGG₂ menjadi gugus hidroksi, dengan menggunakan gugus heme untuk memulai reaksi kimia (Goodsell, 2001; Blobaum and Marnett, 2007).

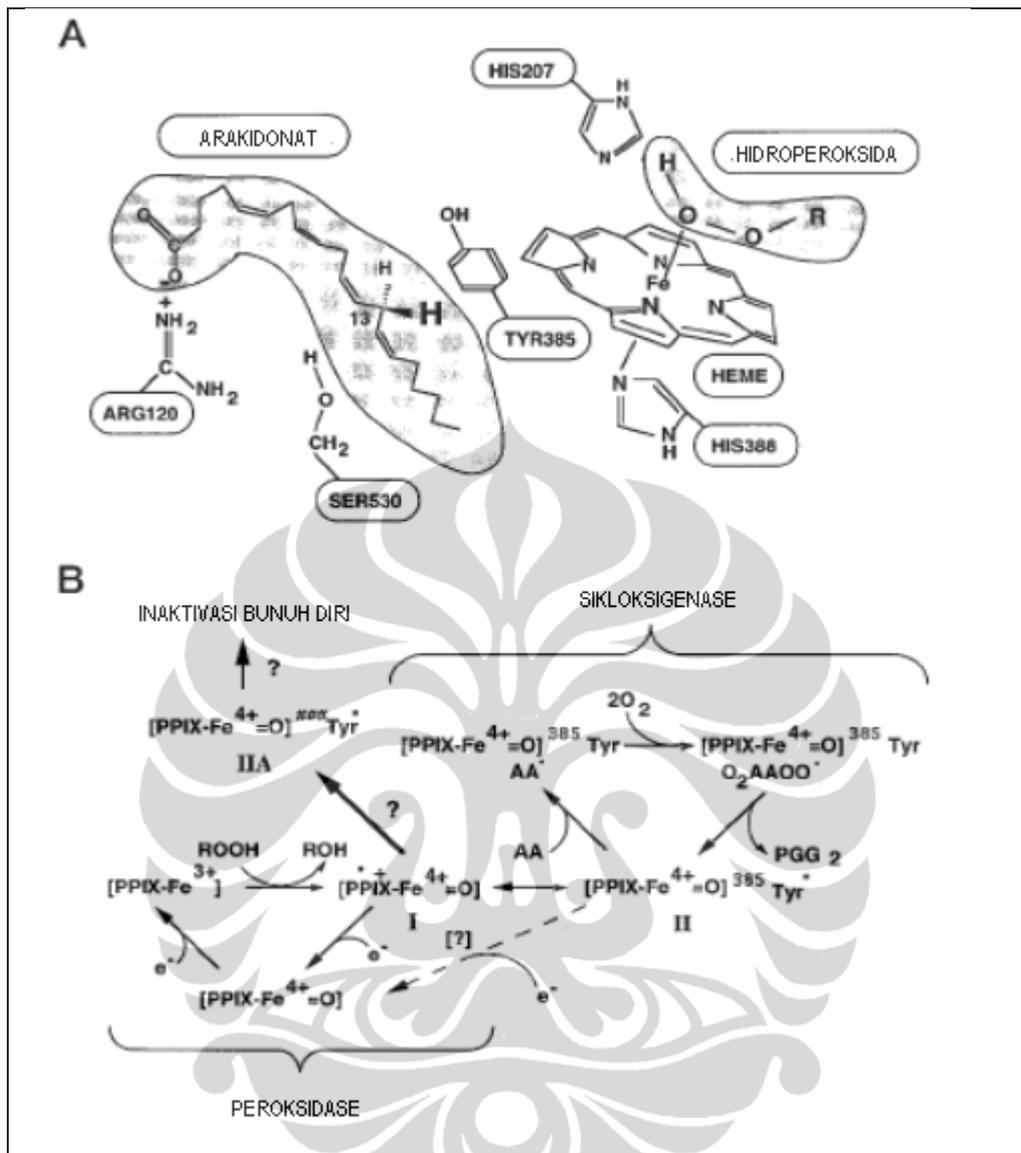


[Sumber: Kurumbail et al., 1996]

Gambar 2.3. Representasi struktural dimer *murine* PGHS (COX-2)

2.1.4. Mekanisme katalisis enzim siklooksigenase

Berdasarkan kajian kombinasi kimia protein klasik, spektroskopi UV-visibel dan epr, dan kristalografi sinar X, sisi aktif prostaglandin sintase-1 (*ovine* prostaglandin sintase-1) digambarkan sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 2.4.A (Smith, Garavito, & DeWit, 1996). Sisi aktif COX adalah kanal yang dihubungkan dengan residu-residu hidrofobik dan menjorok ke arah pusat domain globular utama dari enzim. Peran COX dan peroksidase diperlihatkan pada Gambar 2.4.B. Reaksi COX merupakan kebutuhan mutlak untuk peroksidase. Awalnya, baik alkil peroksida maupun peroksinitrit yang diturunkan dari kondensasi nitrat oksida (NO) dan superoksida, mengoksidasi gugus heme pada sisi aktif peroksidase. Gugus heme teroksidasi kemudian mengoksidasi Tyr-385 disebelahnya yang terletak pada sisi aktif COX. Radikal tirosil yang dihasilkan mengambil (13-pro *S*)-hidrogen dari asam arakidonat. Residu sisi aktif lainnya adalah Arg-120 (Gambar 2.4.A). Residu ini berinteraksi dengan gugus karboksilat dari asam arakidonat dan obat-obat AINS pada umumnya. Tyr-385 terletak berseberangan dengan kanal dari Arg-120 dan menentukan stereospesifitas prostaglandin sintase terhadap obat-obat AINS.



[Sumber: Smith, Garavito & DeWit, 1996]

Gambar 2.4. Katalisis oleh peroksidase dan sikloooksigenase. PPIX = protoporfirin IX; AA = asam arakidonat. Telah diolah kembali

2.2. Inflamasi

2.2.1. Proses Inflamasi

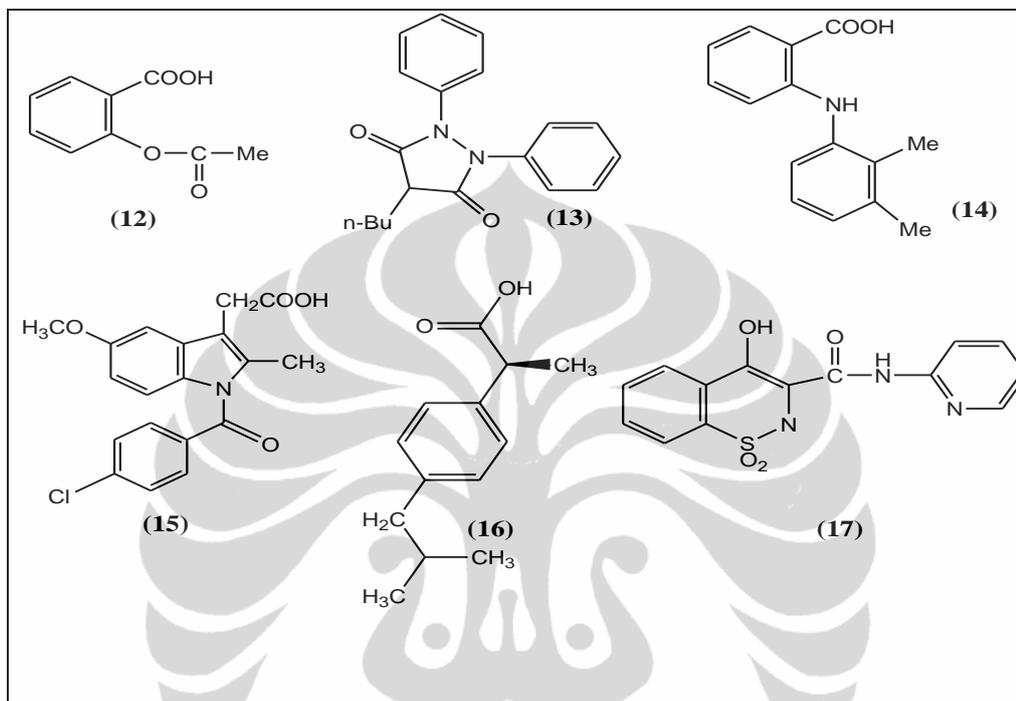
Inflamasi adalah mekanisme pertahanan diri tubuh dalam merespon berbagai infeksi atau perangsangan metabolik. Manifestasi inflamasi pada jaringan adalah panas, merah, bengkak dan nyeri. Secara singkat urutan kejadian awal pada inflamasi adalah sebagai berikut : diawali jaringan terluka, mediator inflamasi dilepaskan, terjadi vasodilatasi, permeabilitas vaskular meningkat, eksudasi, emigrasi leukosit, kemotaksis dan fagositosis dari stimulus, kemudian diikuti perbaikan/penyembuhan, namun dalam kasus stimulasi yang terus menerus akan terjadi inflamasi kronik dan degeneratif. Penyebab terjadinya inflamasi kronik adalah penyakit reumatik: gout, reumatoid arthritis, lupus eritematosus sistemik dan osteoarthritis (Wolff, 1981).

Mediator yang berperan dalam proses inflamasi pada akhir-akhir ini lebih diarahkan pada keluarga prostaglandin dan leukotrien. Salah satu strategi terapi inflamasi adalah menghambat pembentukan prostaglandin melalui penghambatan enzim COX (Gringauz, 1997). Prevalensi penyakit reumatik meningkat sejalan dengan peningkatan usia. Pada tahun 2005 prevalensi penyakit ini pada penduduk usia 65 tahun ke atas di negara-negara maju 41-53% (Mariler and Eggimann, 2005).

2.2.2. Obat Anti-inflamasi nonsteroid (AINS)

Obat antiinflamasi menghambat respon inflamasi, tetapi obat ini tidak menyembuhkan dan tidak menghilangkan penyebab penyakit itu sendiri. Perkembangan obat antiinflamasi diawali dengan penemuan senyawa salisilat (aspirin) (12) pada akhir abad XIX, senyawa turunan pirazolon (fenilbutazon) (13) tahun 1940-an dan kostikosteroid tahun 1950-an. Kemudian diikuti usaha menemukan senyawa nonsteroid (AINS) yang kuat yang tidak mempunyai efek samping kostikosteroid (misalnya osteoporosis, ulserogenisitas dan retensi garam dalam tubuh). Pada tahun 1960-an ditemukan turunan fenamat (asam mefenamat) (14), dan turunan aril asetat (indometasin) (15). Pada tahun 1970-an ditemukan generasi asam-asam aril

yang lain (*S*-(+)-ibuprofen) (16), dan diikuti penemuan turunan sulfonamidoheterosiklik (piroksikam) (17) pada akhir tahun 1970-an sampai 1980-an (Foye, 1996). Struktur kimia beberapa obat AINS dapat dilihat pada Gambar 2.5.



[Sumber: Foye, 1996]

Gambar 2.5. Struktur kimia beberapa obat AINS.

Sampai akhir tahun 1980-an penelitian pengembangan obat antiinflamasi sudah mendekati satu abad, namun belum ditemukan obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) yang ideal. Obat AINS mempunyai efek yang tidak diinginkan berspektrum luas, yang diakibatkan inhibisi sintesis prostaglandin (PG) di jaringan-jaringan dimana PG bertanggungjawab untuk homeostasis fisiologik, seperti reaksi alergi, pendarahan gastrik, dan berpotensi ulseragenik.

Penemuan isoenzim COX-2 dan munculnya teori bahwa isoenzim COX-1 memproduksi PG yang berfungsi sebagai penjaga-rumah, sedangkan COX-2 mensintesis PG yang bertanggung jawab terhadap terjadinya

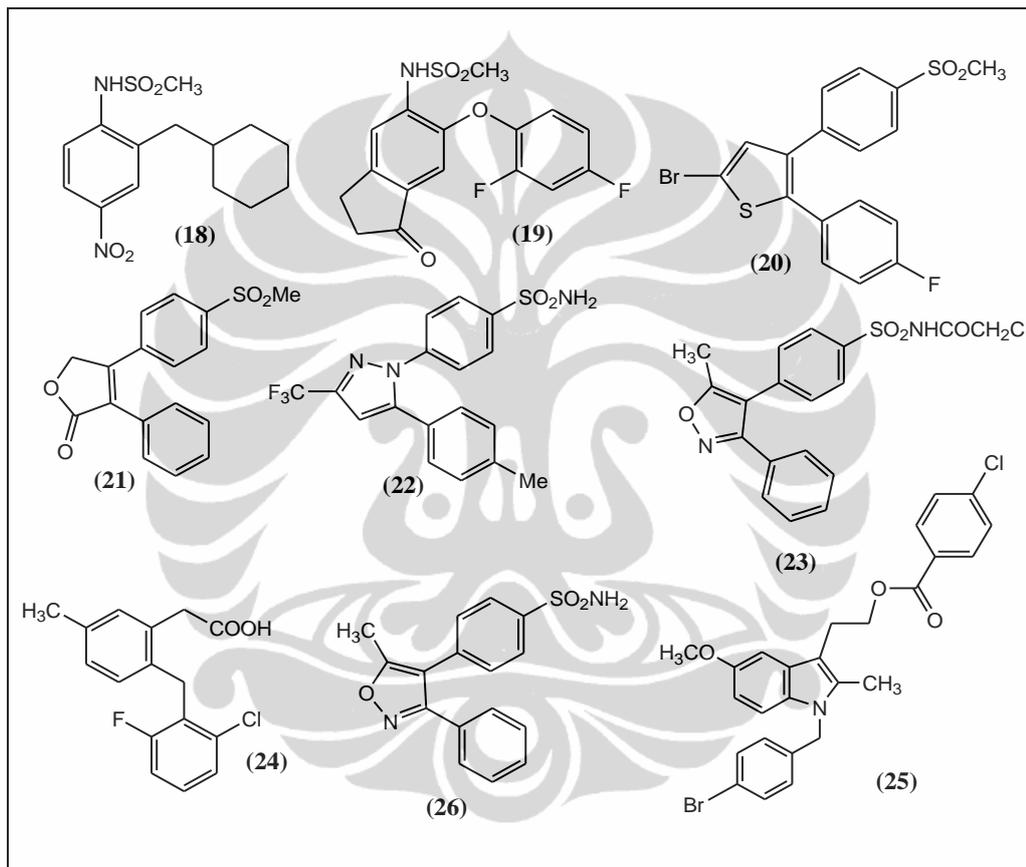
inflamasi dan nyeri, mendorong kecenderungan pengembangan obat anti-inflamasi pada penemuan inhibitor COX-2 selektivitas tinggi secara ekstensif oleh sejumlah perusahaan farmasi.

Pengembangan ini bertujuan untuk menemukan obat AINS yang toksisitas gastroinstestinalnya jauh berkurang. Penelitian-penelitian selama lima tahun terakhir ini, telah menemukan tiga kelas utama senyawa yang memenuhi kriteria inhibitor COX-2 selektif, yaitu : (a) sulfonamida asam seperti NS-398 (**18**) dan flosulide (**19**); (b) diarilheterosiklik seperti DuP-697 (**20**), rofekoksib (**21**), selekoksib (**22**) dan parekoksib (**23**), dan (c) senyawa hasil modifikasi obat AINS klasik seperti limirakoksib (**24**) dan turunan indometasin (**25**) (Sekhar, Kishor, Sunita, Premkumar, & Reddy, 2008).

Setidaknya 6 (enam) obat inhibitor COX-2 selektif (dikenal sebagai “coxib”) telah dipasarkan sebagai obat AINS dengan keberhasilan luar biasa, antara lain senyawa **21**, **22** dan valdecoxib (**26**). Namun dewasa ini ada bukti yang meyakinkan bahwa inhibitor COX-2 selektif yang tinggi seperti senyawa **21** dan **26** dapat merubah keseimbangan COX *pathway* yang menghasilkan penurunan kadar prostasiklin (PGI₂) yang berperan sebagai vasodilator dan anti-agregator, relatif terhadap peningkatan kadar protrombotik tromboksan A₂ (TXA₂). Hal ini mengakibatkan peningkatan kejadian akibat trombotik kardiovaskular seperti infark miokard (Bing and Lomnicka, 2002; Mukherjee, Nissen, & Topol, 2001; Segev & Katz, 2004; Ouellet, Riendeau, & Percival, 2001). Rofecoxib (30 September 2004) dan valdecoxib (7 April 2005) ditarik dari peredaran (Coruzzi, Venturi, & Spaggiari, 2007). Struktur kimia beberapa inhibitor COX-2 selektif dapat dilihat pada Gambar 2.6.

Kelompok senyawa inhibitor COX-2 selektif yang paling banyak adalah turunan diarilheterosiklik. Hasil studi hubungan struktur-aktivitas (SAR) kelompok senyawa diarilheterosiklik menunjukkan bahwa gugus sulfonamida (SO₂NH₂) atau metansulfonil (SO₂CH₃) pada posisi *para* dari salah satu cincin arilnya dibutuhkan untuk menghasilkan inhibitor COX-2 yang optimum selektivitas dan potensinya (Coruzzi, Venturi, & Spaggiari, 2007). Gugus farmakofor lainnya yang dapat menggantikan gugus

sulfonamida adalah gugus sulfonazida (SO_2N_3) (Uddin, Rao, & Knaus, 2003), dan gugus N-asetilsulfonamida ($\text{SO}_2\text{NHCOCH}_3$). Gugus N-asetilsulfonamida dapat juga berperan sebagai prodrug gugus farmakofor SO_2NH_2 . Berbeda dengan gugus asetoksi pada aspirin yang mengasetilasi gugus Ser530, gugus $\text{SO}_2\text{NHCOCH}_3$ potensial untuk mengasetilasi gugus NH_2 yang terdapat pada Gln192 atau Arg513 pada kantung samping dari enzim COX-2 (Zargi, Rao, & Knaus, 2007).



[Sumber: Flower, 2003; Coruzzi, Venturi, & Spaggiari, 2007]

Gambar 2.6. Contoh struktur kimia inhibitor COX-2 selektif.

2.2.3. Mekanisme aksi obat AINS

Mekanisme aksi obat ini ditemukan pada tahun 1971. Vane mempublikasikan hasil penelitiannya bahwa obat AINS menekan inflamasi terutama karena kemampuannya menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX). Penghambatan ini membatasi produksi senyawa-senyawa prostaglandin pro peradangan disekitar luka. Aksi penghambatan inhibitor COX terhadap aktivitas COX terjadi melalui :

a. Inhibisi reversibel kompetitif.

Asam-asam lemak tidak jenuh, yang mempunyai afinitas pengikatan mirip dengan AA (10^{-6} M), akan berikatan dengan enzim dan menghambat pembentukan PG, tetapi kemudian akan digeser oleh pemberian AA berlebih. Asam-asam aril dan heteroaril asetat menginhibisi COX dengan cara tersebut. Sebagai contoh : ibuprofen (**16**) mempunyai tetapan pengikatan 5×10^{-6} M.

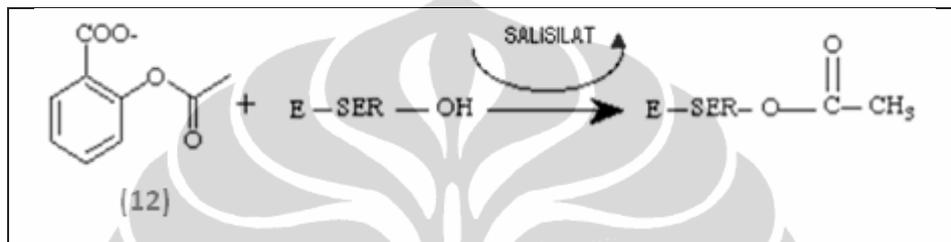
Hasil penelitian sejumlah peneliti menunjukkan bahwa afinitas pengikatan senyawa tipe ini lebih dipengaruhi oleh sifat hidrofobik dari molekulnya dibandingkan sifat ioniknya. Sejumlah besar obat AINS menunjukkan inhibisi konversi AA menjadi PGE_2 pada percobaan in vivo pada range 0,1-10 μ g/mL. Aktivitas ini paralel dengan potensi senyawa itu menunjukkan aktivitasnya pada uji edema kaki tikus (Goodsell, 2001, Bruce, 1998).

Berdasarkan hasil penelitian kinetika inhibisi selektif pada COX oleh Gierse dan kawan-kawan (Smith, Garavito, & DeWit, 1996), terdapat tiga mode inhibisi reversibel kompetitif, yaitu “inhibisi kompetitif sederhana” (pada S (+)-ibuprofen), “*time dependent*” dengan pengikatan lemah (pada naproksen dan oksikam), dan “*time dependent*” dengan pengikatan kuat (pada indometasin).

b. Inhibisi Irreversibel “*time-dependent*”.

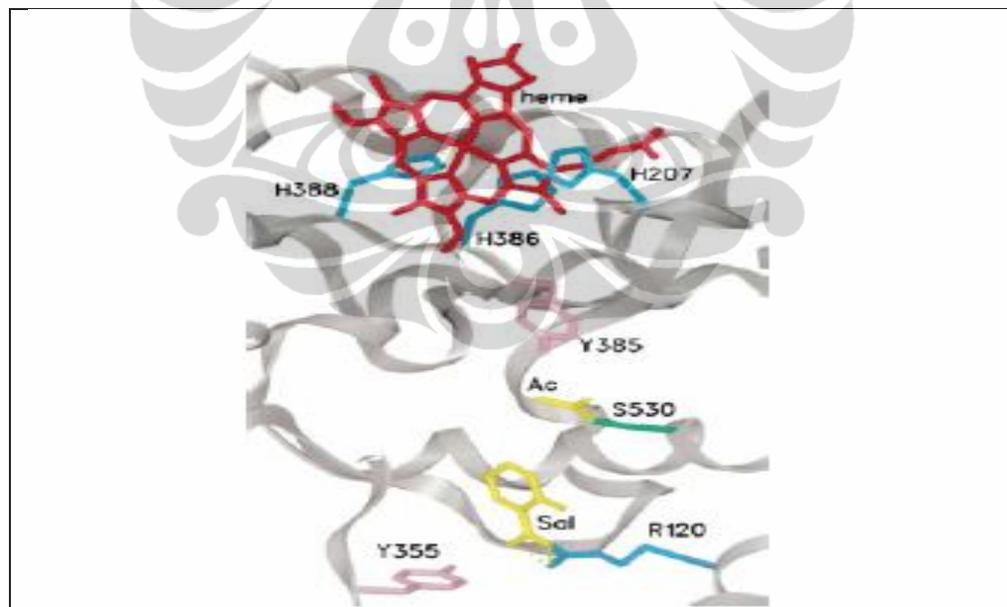
Aspirin (**12**) akan mengasetilasi gugus OH residu Ser530 pada sisi aktif COX (Gambar 2.7 dan 2.8). Analisis kristalografik sinar-X enzim yang terasetilasi aspirin dan studi protein mutan dimana Ser-530 telah disubstitusi

dengan residu lain menegaskan bahwa bila Ser-530 diasetilasi aspirin, gugus asetil menjorok ke sisi aktif COX dan mengganggu pengikatan asam arakidonat. Ikatan ini bersifat permanen sehingga menginaktifkan enzim. Enzim tidak berfungsi dan sintesis prostaglandin tidak akan kembali ke keadaan normal sampai prostaglandin sintase dibuat kembali. Hal ini menyebabkan aspek farmakodinamik aspirin sangat berbeda. Efeknya dapat bertahan lama bahkan sampai sesudah obat bersih dari serum dan jaringan (Smith, Garavito, & DeWit, 1996; Goodsell, 2001, Bruce, 1998).



[Sumber: Bruce, 1998]

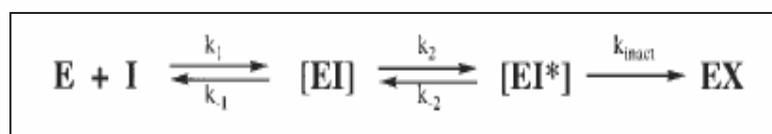
Gambar 2.7. Skema reaksi asetilasi residu serin oleh aspirin. Telah diolah kembali



[Sumber: Smith, Garavito, & DeWit, 1996]

Gambar 2.8. Penggambaran pita struktur kristal dari sisi aktif PGHS-1 yang terasetilasi oleh aspirin.

Berdasarkan data struktural menunjukkan bahwa inhibitor-inhibitor COX-1 menghambat enzim secara kompetitif reversibel, sedangkan inhibitor-inhibitor COX-2 menghambat secara irreversibel *time-dependent*. Inhibisi irreversibel ini sebagian sebagai hasil pengikatan gugus sulfonamida (atau sejenisnya) pada kantung samping enzim COX-2 (Flower, 2003). Berdasarkan perbandingan data kinetika yang diperoleh selama inhibisi *steady-state* dan *time-dependent* COX-1 dan COX-2 oleh seri diarilheterosiklik, memperlihatkan bukti adanya model kinetika tiga tahap selama inhibisi. Proses kinetika pertama diinterpretasikan sebagai pengikatan inhibitor-enzim orde kedua didekat kanal hidrofobik yang terbuka yang mudah dimasuki pelarut, umumnya dirujuk sebagai daerah lobi. Proses kinetika kedua diinterpretasikan bersesuaian dengan translokasi inhibitor sepanjang kanal dan berikutnya berikatan dengan sisi aktif COX. Kedua proses ini umumnya terjadi pada COX-1 dan COX-2 selama inhibisi dengan kebanyakan obat-obat AINS. Bergantung besarnya kecepatan konstan relatif masing-masing tahap agak sulit dibedakan, seperti diamati pada valdecoxib. Proses kinetika ketiga diinterpretasikan, yang memperlihatkan irreversibel, hanya diamati selama inhibisi COX-2 oleh diarilheterosiklik yang mempunyai gugus fenilsulfonamida atau fenilsulfon. Proses ini diinterpretasikan sebagai pembentukan ikatan kompleks enzim-inhibitor yang kuat, yang melibatkan optimisasi perubahan-perubahan konformasi inhibitor dan protein dalam sisi aktif dan kantung samping (Gambar 2.9) (Walker et al., 2010).



[Sumber: Walker et al., 2001]

Gambar 2.9. Mekanisme inhibisi COX tiga tahap.

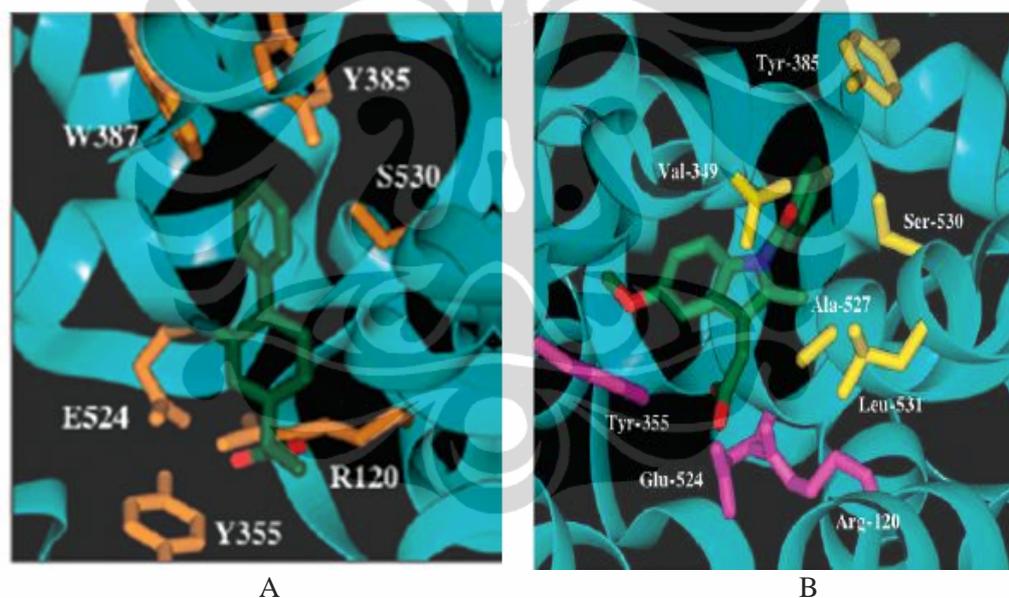
2.3. Dasar Struktural Obat AINS sebagai Inhibitor COX-2

Enzim COX-1 dan COX-2 63% identik dan 77% memiliki kemiripan dalam hal asam aminonya (Bruce, 1998; Picot, Loll, & Garavito, 1994). Pada COX-1, Arg120 dan Tyr355 memiliki peran krusial. Arg120 berinteraksi dengan gugus karboksil baik substrat maupun inhibitor, sedangkan Tyr355 menentukan stereospesifitas pengikatan obat-obat AINS (Flower, 2003). Senyawa inhibitor COX non selektif seperti flurbiprofen, berikatan pada sepanjang kanal hidrofobik yang panjang dari enzim dan mengeluarkan substrat dari sisi aktif COX (Kurumbail et al., 1996).

Loka pengikatan flurbiprofen pada COX-1 dan COX-2 identik. Gugus karboksilat dari obat membentuk jembatan garam dengan gugus guanidin dari Arg120 dan ikatan hidrogen dengan Tyr355. Cincin aril distal-nya membentuk interaksi van der Waals dengan atom-atom rantai utama dari Gly526 dan Ala527, dan berbenturan kuat dengan Tyr385, yang aktif pada katalisis atau inaktivasi bunuh diri enzim. Cincin aril distal dari flurbiprofen juga berinteraksi dengan Ser530, residu yang secara selektif diasetilasi oleh aspirin. Cincin fluorofenil dari inhibitor membuat kontak lebih sedikit dengan atom-atom protein pada COX-2, dan terbentuk interaksi van der Waals dengan Val349 dan rantai utama dari Ala527. Pada COX-1, fluor berinteraksi dengan rantai samping Ile523, tetapi interaksi semacam itu tidak teramati pada COX-2, yang mempunyai valin pada posisi yang bersesuaian. Gugus metil- α dari stereoisomer-S berjarak $3,4 \text{ \AA}$ dari Leu359, sedangkan pada stereoisomer-R, akan ada hambatan sterik dari inhibitor dengan Tyr355. Pengikatan flurbiprofen pada sisi aktif COX-1 dapat dilihat pada Gambar 2.10.A.

Indometasin (7), suatu inhibitor nonselektif klasik, berikatan dengan kuat pada sisi aktif COX (Kurumbail et al., 1996). Indometasin berpenetrasi lebih jauh ke dalam kanal hidrofobik. Atom klorin-nya berinteraksi dengan Leu384, memakai konformasi rantai samping yang berbeda. Gugus benzoil menduduki lingkungan yang mirip dengan cincin fenil distal dari flurbiprofen, dan distabilisasi oleh interaksi hidrofobik dengan Leu384,

Phe381, Tyr385 dan Trp387. Oksigen dari benzoil berinteraksi dengan rantai samping hidroksil dari Ser530 ($3,6\text{\AA}$) dan dengan rantai samping Val349. Cincin benzoil dapat memakai baik konformasi cis maupun trans terhadap cincin indol. Gugus karboksilat membentuk jembatan garam dengan Arg120, dan cincin indol berinteraksi dengan Val349 dan Ser353. Kontak tambahan dibuat dengan Tyr355, Val523 dan Ala527. Cincin enam anggota dari indol berinteraksi kuat dengan atom-atom rantai utama Leu352 dan Ser353, menghasilkan pergantian tempat segmen peptida 353-356 sejauh $0,75\text{\AA}$ karena kelenturan glisin pada 354. Gugus metoksi indometasin sedikit menjorok ke celah yang terbentuk pada COX-2 berbatasan dengan Ser353, Tyr355 dan Val523. Pengikatan indometasin pada sisi aktif COX dapat dilihat pada Gambar 2.10.B.



[Sumber: Blobaum and Marnette, 2007]

Gambar 2.10. A. Pengikatan flurbiprofen pada sisi aktif *ovine* COX-1. B. Pengikatan indometasin pada sisi aktif *murine* COX-2.

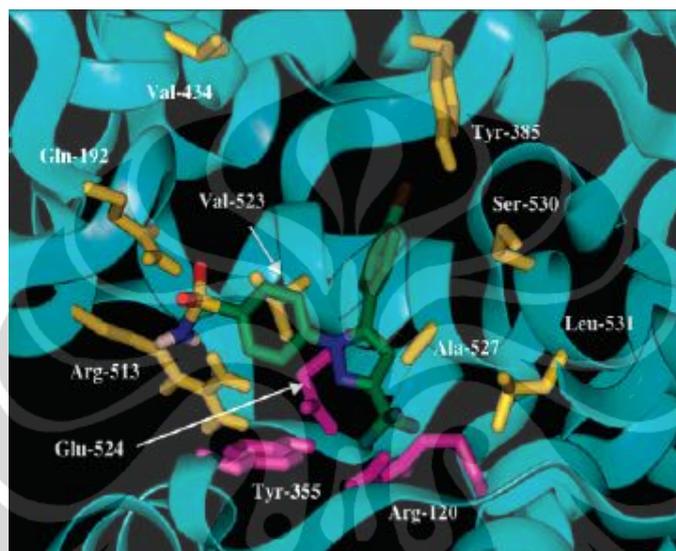
Berdasarkan struktur kristal COX-2 yang berinteraksi dengan berbagai inhibitor, dapat dibuat kesimpulan bahwa konformasi dan perubahan-perubahan lain diperlukan pada inhibitor untuk dapat secara selektif

menginhibisi COX-2 (Kurumbail et al., 1996; Flower, 2003). Struktur COX-2 memperlihatkan kemiripan yang besar dengan struktur COX-1, namun penelitian lebih mendalam pada struktur katalitik menunjukkan bahwa kanal pengikatan kedua enzim itu sangat berbeda. Perubahan asam amino tunggal, dari isoleusin (Ile) yang lebih *bulky* pada COX-1 ke valin pada posisi 523 pada COX-2 (ekivalen dengan posisi 509 pada COX-1), dan perubahan-perubahan konformasi yang terjadi menghasilkan peningkatan jalan masuk ke “kantong samping (side pocket)” yang memungkinkan pengikatan inhibitor COX-2 spesifik dengan menyediakan loka penambatan residu fenilsulfonamida dari obat seperti pada SC-558 (1).

SC-558 merupakan senyawa diariheterosiklik inhibitor COX-2 yang lebih selektif 1900 kali lipat dibanding pada COX-1. SC-558 mempunyai cincin heterosklik sentral pirazol dan gugus sulfonamida pada salah satu cincin arilnya. Seperti flurbiprofen dan indometasin, SC-558 berikatan dengan sisi aktif COX. Cincin bromofenil berikatan dengan celah hidrofobik yang terbentuk oleh Phe381, Leu384, Tyr385, Trp387, Phe513 dan Ser530, dengan kontribusi dari atom-atom tulang punggung dari Gly526 dan Ala527. Gugus trifluorometil diikat pada kantong yang berdekatan yang terbentuk oleh Met113, Val116, Val349, Tyr355, Leu359 dan Leu531. Dua gambaran pengikatan SC-558 ini secara kasar ekivalen dengan pengikatan flurbiprofen dan indometasin pada COX-2. Cincin fenil distal dari flurbiprofen tumpang tindih dengan cincin bromofenil dari SC-558; pirazol dari SC-558 menumpuk di atas fluorofenil dari flurbiprofen. Gugus karboksilat flurbiprofen dan gugus trifluorometil dari SC-558 berikatan pada celah yang sama (Kurumbail et al., 1996). Pengikatan SC-558 pada sisi aktif COX-2 dapat dilihat pada Gambar 2.11.

Pada COX-2, kanal yang mengarah dari membran ke sisi aktif COX, bercabang pada loka pengikatan SC558. Ini tidak teramati pada struktur COX-1. Kanal cabang ini mengakomodasi seluruh gugus fenilsulfonamida dari SC558. Cincin fenil dikelilingi oleh residu hidrofobik Leu352, Tyr355, Phe518, Val523 dan tulang punggung Ser353. Di luar kantong hidrofobik ini, gugus sulfonamida melebar ke daerah permukaan COX-2 yang relatif polar.

Sulfonamida berinteraksi dengan His90, Gln192 dan Arg153. Data sinar-X tidak memperlihatkan definisi unik dari konformasi sulfonamida, tetapi konformasi yang dipilih secara kimia beralasan. Satu atom oksigen membentuk ikatan hidrogen dengan His90; oksigen yang lain membentuk ikatan hidrogen dengan Arg513. Nitrogen amida membentuk ikatan hidrogen dengan oksigen karbonil dari Phe518 (Kurumbail et al., 1996).



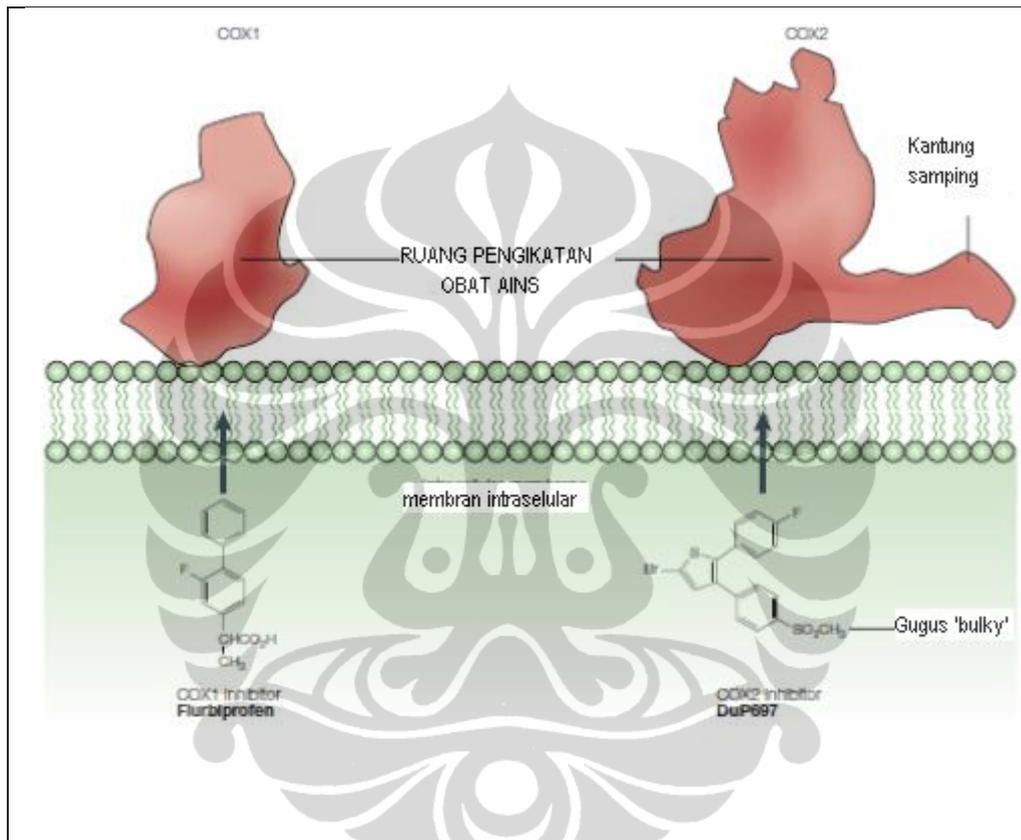
[Sumber: Kurumbail et al., 1996; Blobaum and Marnette, 2007]

Gambar 2.11. Pengikatan SC-558 pada sisi aktif *murine* COX-2.

Selektivitas SC-558 kelihatannya sebagai hasil dari gugus fenilsulfonamida, yang berikatan pada kantung yang lebih terbatas pada COX-1. Pada COX-1, kantung cabang tertutup dari kanal utama yang mengarah ke sisi aktif COX. Pada COX-2, kantung cabang lebih mudah dimasuki, khususnya karena penggantian isoleusin ke valin pada posisi 523. Diagram skematik sisi aktif COX-1 dan COX-2 dapat dilihat pada Gambar 2.12.

Rantai samping valin yang ukurannya lebih kecil berpasangan dengan Tyr355 yang mengalami perubahan-perubahan konformasi dan membuka segmen hidrofobik dari kantung baru tersebut. Kantung baru terdiri dari Leu352, Ser353, Tyr355, Phe518 dan Val523. Kantung baru itu juga

bertambah panjang karena pergerakan segmen peptida Leu352 sampai Tyr355 sejauh $0,7\text{\AA}$ relatif terhadap yang diamati pada kompleks flurbiprofen. Kantung yang mirip sama terdapat pada COX-1, tetapi tidak dapat dimasuki karena isoleusin pada 523 yang lebih *bulky*, yang ditunjukkan sebelumnya bahwa profil inhibisi COX-2 manusia diubah secara dramatis oleh mutasi asam amino tunggal (Kurumbail et al., 1996).



[Sumber: Flower, 2003]

Gambar 2.12. Diagram skematik perbedaan loka pengikatan obat-obat AINS pada COX-1 dan COX-2. Telah diolah kembali.

Masuknya gugus fenilsulfonamida ke dalam kantung baru pada COX-2 difasilitasi oleh penggantian isoleusin menjadi valin yang lain. Rantai samping dari residu hidrofobik 434 yang berhadapan dengan Phe518 membentuk pintu masuk molekul yang memanjang ke kantung hidrofobik baru itu; pada COX-1, pintu masuk ini tertutup karena rantai samping

isoleusin yang lebih besar. Pada COX-2, dengan rantai samping yang lebih kecil pada 434, pintu masuk milik ruang itu terbuka, mengizinkan masuknya gugus sulfonamida. Jadi identitas dari asam amino pada 434 juga muncul untuk memberikan kontribusi terhadap selektivitas pada pengikatan inhibitor. Dekat permukaan protein, inhibitor berinteraksi dengan His90, Gln192 dan Arg513. His90 dan Gln192 terdapat pada dua isoform. Arg513 pada COX-2 digantikan histidin pada COX-1. Cincin imidazol histidin pada posisi ini tidak cukup panjang untuk dapat berinteraksi langsung dengan gugus sulfonamida. Oleh karena itu jenis residu pada posisi 513 adalah kontributor ketiga untuk spesifisitas COX-2. Residu lain pada kantung ini yang mungkin berkontribusi pada spesifisitas terletak pada 516. Pada COX-2 residu itu adalah alanin, tapi pada COX-1 adalah serin (Kurumbail et al., 1996).

Gugus guanidinium pada Arg120 yang mengstabilkan karboksilat pada obat-obat AINS klasik, merupakan residu bermuatan kecil dalam kanal hidrofobik COX. Namun pada struktur SC-558, yang tidak mempunyai gugus karboksilat, maka tidak ada interaksi muatan-muatan antara inhibitor dengan Arg120. Ketiadaan gugus karboksilat pada SC-558 bisa merupakan komponen yang bermakna untuk selektivitas pada COX-2. Usaha-usaha untuk memperbaiki potensi terhadap COX-2 dengan menambahkan gugus asam pada pirazol dari seri diariheterosiklik menghasilkan selektivitas yang buruk (Kurumbail et al., 1996).

2.4. Penemuan dan Pengembangan Obat.

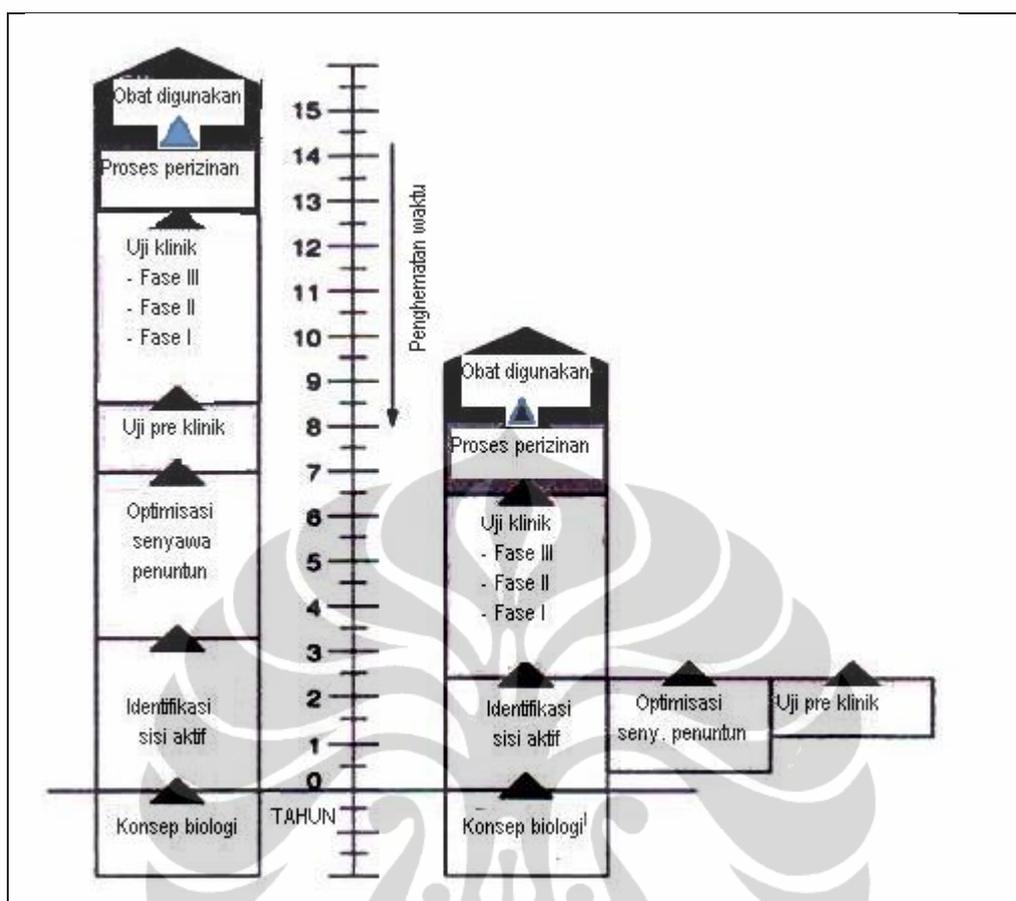
Proses penemuan dan pengembangan obat merupakan proses yang lama dan mahal. Dewasa ini diperkirakan untuk merancang obat baru hingga diterima dan diizinkan untuk digunakan di klinik memerlukan waktu 12-15 tahun dan biaya hingga 1,9 milyar dollar Amerika Serikat. Ada dua fase utama dalam menciptakan obat baru, yaitu fase penemuan dan fase uji klinik. Penemuan obat baru umumnya dimulai dengan identifikasi biomolekul target yang potensial bernilai terapeutik (misalnya: enzim) melalui studi biologis.

Tahap berikutnya adalah: perancangan dan identifikasi senyawa penuntun (termasuk identifikasi sisi aktifnya); sintesis dan uji bioaktivitas awal senyawa penuntun; optimisasi senyawa penuntun untuk fase farmakodinamik; optimisasi untuk fase farmakokinetika dan farmasetika; dan uji preklinik.

Uji preklinik meliputi 5 atau 6 tipe uji yang dilakukan pada hewan coba, yaitu toksisitas akut, toksisitas subakut, toksisitas kronik, potensial mutagenik, potensial karsinogenik, dan efek teratogenik. Sasaran sampai dengan selesainya uji preklinik adalah menemukan senyawa calon obat yang siap diuji klinik pada manusia dengan kriteria, berikatan secara selektif pada target biomolekul, dan mempengaruhi aktivitas target biomolekul tersebut sebagai reseptor atau enzim. Tahap terakhir adalah uji klinik analog senyawa penuntun yang telah dioptimisasi (Introduction, 2005; Nogrady & Weaver, 2005; Jorgensen, 2004). Tahapan proses dan waktu yang diperlukan dapat dilihat pada Gambar 2.13.

. Tampak pada gambar bahwa dengan adanya bantuan metoda komputasi proses pengembangan obat dapat dipersingkat waktunya. Pada proses pengembangan obat secara konvensional, yang bisa dilakukan adalah mensintesis senyawa penuntun dan kemudian menguji aktivitasnya. Jika menunjukkan aktivitas biologis yang potensial, dilanjutkan mengoptimisasi senyawa penuntun melalui sintesis turunan, atau analognya, kemudian diikuti dengan uji aktivitas dan studi hubungan kuantitatif struktur aktivitas (HKSA). Hasil studi HKSA dijadikan dasar modikasi berikutnya, dan diuji kembali aktivitasnya.

Pada proses pengembangan obat dengan menggunakan bantuan metode komputasi, tahapan proses perancangan dan atau identifikasi senyawa penuntun, dan optimisasi senyawa penuntun dilakukan secara bersamaan, serta proses uji pre klinik, dapat dilakukan pada waktu yang hampir bersamaan. Hal ini karena, dengan bantuan metode komputasi jumlah senyawa yang diusulkan untuk disintesis akan jauh lebih sedikit dibandingkan dengan pada pengembangan obat secara konvensional.



[Sumber: Nogrady & Weaver, 2005]

Gambar 2.13. Tahapan proses pengembangan obat, tanpa bantuan metoda komputasi (kiri), dan dengan bantuan metoda komputasi (kanan). Telah diolah kembali

2.4.1. Identifikasi Senyawa Penuntun

Senyawa penuntun (*lead compound*) adalah senyawa yang strukturnya dijadikan acuan untuk merancang dan mengoptimisasi struktur molekul obat dengan aktivitas biologis yang diinginkan. Kriteria senyawa penuntun : senyawa mempunyai aktivitas biologis. Aktivitas biologis dapat berupa aksi terapeutik, toksik atau regulator fisiologik.

Ada beberapa pendekatan untuk mengidentifikasi/memperkenalkan senyawa penuntun, antara lain : 1) penemuan tidak terduga dan pengembangan intuisi, contoh : benzodiazepin; 2) studi proses dasar kehidupan, contoh : hormonoid ; 3) isolasi senyawa bahan alam, contoh :

kinin; 4) perancangan obat secara rasional , contoh : simetidin; 5) program skrining, contoh : fenitoin; dan 6) genomik/proteomik (Nogrody & Weaver, 2005).

2.4.2. Program Skrining

Dewasa ini tersedia perpustakaan-perputakaan senyawa yang bisa menyimpan jutaan senyawa sintetik dan alami, antara lain “*Ligand ZINC database*”. ZINC merupakan *database* bebas non komersial untuk skrining *virtual*, siap ditambahkan, format 3D, tersedia di URL <http://zinc.docking.org/>. ZINC menyimpan lebih dari 13 juta senyawa yang yang bisa dibeli. Perusahaan farmasi besar juga mempunyai perpustakaan senyawa yang disintesis sendiri.

Perpustakaan senyawa bisa dijadikan sumber untuk menemukan senyawa penuntun. Caranya adalah dengan melakukan pengujian aktivitas senyawa-senyawa dari perpustakaan senyawa yang dipilih secara acak. Berbagai cara uji yang dapat memberikan hasil yang cepat telah dikembangkan dalam kurun waktu 10-20 tahun belakangan ini. Cara uji itu biasa disebut *high-throughput screening* (HTS) (Nogrody & Weaver, 2005). Tipe-tipe dasar HTS antar lain: uji aktivitas pelat mikro, uji difusi gel, dan uji seleksi afinitas pada protein target.

Senyawa-senyawa yang dalam proses skrining menunjukkan aktivitas baik (“*hits*”), dilakukan pengujian lebih lanjut untuk memperoleh beberapa senyawa yang memberikan harapan besar untuk menjadi calon obat (“*lead compound*” atau senyawa penuntun). Struktur senyawa penuntun ini kemudian diperbaiki dan dimodifikasi agar diperoleh senyawa yang dapat berinteraksi dengan protein target lebih baik dan lebih kecil efek sampingnya.

HTS dapat melakukan pengujian ratusan ribu senyawa per hari pada protein target uji, telah menghasilkan identifikasi senyawa penuntun lebih berhasil dan mengurangi biaya penelitian dan pengembangan obat. Tetapi penggunaan HTS masih juga terlalu mahal, karena biaya pengadaan fasilitas HTS dan pengadaan senyawa uji yang besar. Tambahan lagi dalam beberapa

hal HTS gagal menemukan senyawa penuntun, padahal metode komputasi dilaporkan berhasil. Kombinasi dari biaya besar dan kekurangberhasilan dalam menemukan senyawa penuntun, mengakibatkan metoda ini tidak disukai lagi (Introduction, 2005; Jorgensen, 2004).

2.4.3. Metode Komputasi

Metode komputasi dapat digunakan untuk memprediksi atau mensimulasi bagaimana interaksi senyawa tertentu dengan protein target yang diberikan, membantu dalam membangun hipotesis mengenai sifat-sifat kimia yang dibutuhkan untuk aktivitas obat, menyaring dan merencanakan modifikasi senyawa calon obat. Metode komputasi dapat juga digunakan untuk pengujian berulang secara otomatis seperti pencarian senyawa dari *database* senyawa yang besar. Metode komputasi untuk mengskrinng senyawa-senyawa *virtual* dalam *database*, dengan tujuan mengidentifikasi senyawa penuntun diberi istilah Skrinng *Virtual* (*Virtual Screening*, VS). VS kini banyak digunakan dalam penelitian penemuan molekul, sebagai alternatif dari percobaan di laboratorium atau HTS (Schneider & Bohm, 2002; Introduction, 2005; Kolb, Ferreira, Irwin & Shoichet, 2009).

Keuntungan-keuntungan utama VS dibandingkan percobaan laboratorium (*wet-lab*) :

- a) Biaya lebih ringan, karena tidak harus membeli atau mensintesis senyawa uji
- b) Memungkinkan menyelidiki senyawa-senyawa yang baru dirancang dan belum disintesis.
- c) Mengurangi jumlah senyawa yang akan diuji di laboratorium.
- d) Jumlah senyawa yang tersedia untuk VS jauh lebih besar dibandingkan jumlah senyawa yang tersedia untuk uji laboratorium (Introduction, 2005; Stouten & Kroemer, 2007)

Metode komputasi memerlukan senyawa-senyawa yang telah dikenal dan ditentukan aktivitasnya (senyawa acuan) dan struktur dari biomolekul target. Bila struktur tidak diketahui, data aktivitas dapat digunakan untuk membangun model farmakofor untuk posisi-posisi kunci utama seperti ikatan hidrogen, dan gugus-gugus hidrofobik. Model farmakofor itu dapat digunakan sebagai *template* untuk memilih senyawa-senyawa yang paling mempunyai harapan besar menjadi calon obat dari perpustakaan senyawa. Metode komputasi dapat menayangkan struktur senyawa model yang mempunyai aktivitas biologis secara tiga dimensi (3D) dan melakukan komparasi dengan senyawa-senyawa dari perpustakaan senyawa (Jorgensen, 2004).

Struktur protein target dapat dimodelkan dari data struktur kristalnya maupun hasil analisis spektroskopi resonansi magnetik inti maupun genomika (bioinformatika). Struktur protein hasil kristalografi dapat diakses di www.pdb.org. Bila model struktur protein target sudah diketahui, metode skrining *virtual* yang paling banyak digunakan adalah penambatan molekul (*molecular docking*). Metode penambatan molekul dilakukan dengan mengambil struktur-struktur molekul-kecil dari *database* senyawa-senyawa yang ada (atau bisa juga membuatnya), dan menambatkan molekul kecil itu kedalam loka pengikatan protein target (Introduction, 2005; Jorgensen, 2004; Schneider & Bohm, 2002). Senyawa-senyawa hipotetik dapat juga diprediksi toksisitasnya secara *in silico* dengan cara melihat interaksinya dengan enzim-enzim yang bertanggung jawab pada metabolisme obat. Dari beberapa langkah *in silico* tersebut, dapat diusulkan beberapa senyawa analog dari senyawa baru yang memang potensial untuk disintesis dan dikembangkan (Moitessier, Englebienne, Lee, Lawandi & Corbeil, 2008).

Dewasa ini terdapat lebih dari 60 perangkat lunak penambatan molekul, namun belum ada yang menunjukkan kelebihan dalam segala hal. Umumnya, program melakukan pencarian senyawa dengan konformasi ruang yang memadai dan menghasilkan pose-pose pengikatan yang betul, namun fungsi skor-nya masih memerlukan perbaikan. Dengan demikian, secara umum penilaian yang benar-benar objektif sulit direalisasikan dalam

membandingkan program satu dengan yang lain, karena adanya favoritisme, pemilihan data uji yang bias, dan perbedaan tingkat kemahiran penggunaan program yang berbeda. Beberapa yang telah dipakai secara luas adalah : DOCK, FlexX, Glide dan Gold, (Jorgensen, 2004; Moitessier, Englebienne, Lee, Lawandi & Corbeil, 2008, Stouten & Kroemer, 2007).

PLANTS (Protein-Ligand ANT System) merupakan perangkat lunak penambatan molekul yang dapat diunduh dari tautan: <http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/plants.php> secara gratis. Perangkat lunak telah divalidasi dan nilai secara internal mempunyai kinerja yang lebih kurang setara dengan GOLD (Korb, Stutzle & Exner, 2007; Korb, Stutzle & Exner, 2009). Kelebihannya, menggunakannya sederhana dan mudah. Kekurangannya, PLANTS tidak menyediakan fungsi preparasi protein, ligan maupun visualisasi. PLANTS juga tidak memiliki versi Windows dan sampai saat ini hanya tersedia versi LINUX. Untuk menjalankan PLANTS bagi pengguna Windows, diperlukan perangkat lunak tambahan, yaitu : Co-PendriveLinux-KDE (hibrid LINUX di Windows) yang dapat diunduh dari tautan: <http://www.pendrivelinux.com/run-pendrivelinux-2009-in-windows/>, YASARA (untuk preparasi protein target, visualisasi dan analisis hasil simulasi penambatan) (<http://www.yasara.org/viewdl.htm>), dan MarvinSketch (untuk preparasi ligan) (<http://www.chemaxon.com/marvin/download-user.html/>) (Istyastono, 2009). Pemanfaatan kombinasi MarvinSketch untuk preparasi ligan, YASARA untuk preparasi protein target dan PLANTS untuk simulasi penambatan ligan S-558 pada COX-2 menghasilkan pose pengikatan yang akurat (Prasojo, Hartanto, Yuniarti, Ikawati & Istyastono, 2010).

Setiap perangkat lunak/program penambatan molekul terdiri dari dua komponen utama yang komplementer : (1) suatu metoda untuk menjelajahi ruang konformasional dari ligan dan/atau protein target, dan (2) suatu fungsi pemberi skor {*scoring function* (SF)}, untuk mengevaluasi mode-mode pengikatan yang ditawarkan berkaitan dengan *pose* (orientasi interaksi) dari ligan. Suatu SF, pertama, memberikan skor terbaik pada *pose* ‘terbetul’ (yaitu pose asli yang diamati dalam struktur kristal), sehingga mengarahkan algoritma sampling konformasional. Aspek pertama ini sangat menentukan

prediksi mode pengikatan yang akurat. Kedua, pose-pose penambatan dari senyawa-senyawa aktif tinggi harus diberi atribut dengan skor-skor yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang tidak berikatan atau buruk pengikatannya. Aspek kedua ini sangat penting untuk optimisasi senyawa penuntun dan skrining *virtual* (Jorgensen, 2004; Moitessier, Englebienne, Lee, Lawandi & Corbeil, 2008; Korb, Stutzle & Exner, 2009).

2.4.4. Sintesis dan Uji Bioaktivitas Senyawa Penuntun

2.4.4.1. Sintesis Senyawa Penuntun

Jalur sintetik untuk pembuatan molekul target berdasarkan berbagai jalur sintesis kimia organik yang tersedia untuk memperoleh molekul target dari senyawa-senyawa pemula yang tersedia. Sintesis organik dapat secara linier maupun konvergen. Jalur sintesis yang dipilih hendaknya dengan tahapan yang sependek mungkin, dengan metoda-metoda yang menghasilkan produk tinggi dan produk samping yang rendah.

Jalur sintesis untuk pengembangan molekul-molekul obat, harus dapat menciptakan suatu molekul yang mempunyai gugus-gugus fungsi pada posisi yang benar dalam ruang tiga dimensi, karena ini akan memungkinkan penciptaan fragmen bioforik fungsional seperti farmakofor. Ada 10 jenis reaksi umum yang tersedia untuk sintesis molekul organik, yaitu : substitusi nukleofilik alifatik; substitusi elektrofilik aromatik; substitusi elektrofilik alifatik; substitusi nukleofilik aromatik; substitusi radikal bebas; adisi pada ikatan rangkap karbon-karbon; adisi pada ikatan rangkap karbon-heteroatom; reaksi-reaksi eliminasi, reaksi-reaksi penyusunan ulang; dan reaksi oksidasi-reduksi (Nogrody & Weaver, 2005).

Sintesis molekul obat yang rumit dari senyawa-senyawa pemula yang sederhana memerlukan pendekatan yang teliti dan sistematis. Pendekatan sinton memenuhi kriteria ini. Pendekatan ini didasarkan atas anggapan bahwa bergerak ke arah belakang dari molekul target menuju senyawa-senyawa pemula mudah dilakukan. Proses-proses pemikiran ke arah belakang disebut analisis retrosintetik. Dalam analisis retrosintetik digunakan prosedur

diskoneksi, untuk memotong molekul target menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil sampai ditemukan senyawa pemula yang tersedia. Fragmen yang dihasilkan dari proses koneksi disebut sinton. Pada koneksi, jika suatu ikatan diputus dan pasangan elektron diberikan pada salah satu fragmen, maka akan menghasilkan sinton bermuatan positif dan sinton bermuatan negatif. Langkah berikutnya adalah mendapatkan senyawa pemula yang sudah tersedia dan dapat secara nyata digunakan sebagai sumber sinton tersebut. Kadang-kadang, sebelum proses koneksi, satu gugus fungsi diubah dulu menjadi gugus fungsi yang secara sintetik setara melalui proses interkonversi gugus fungsi (IGF). IGF ini dapat menghasilkan molekul yang lebih mudah didiskoneksi dan demikian lebih mudah disintesis (Nogrady & Weaver, 2005; Warren, 1982).

2.4.4.2. Uji Bioaktivitas Senyawa Penuntun

Idealnya, cara uji dapat dilaksanakan dengan mudah, cepat, efektif, dan efisien. Namun yang lebih penting lagi, model biologis yang digunakan hendaknya secara akurat mencerminkan penyakit pada manusia yang dijadikan tujuan pengobatan. Cara-cara untuk menguji aktivitas biologis secara umum dapat dikategorikan sebagai berikut:

a) *In vitro*:

- uji menggunakan “tabung uji” yang dilakukan tanpa hewan coba utuh.
- Studi pengikatan (misalnya : studi menggunakan ligan radioaktif)
- Studi uji fungsional (misalnya : uji efek pada aktivitas enzim)

b) *In vivo* : uji yang dilakukan dengan hewan utuh (Nogrady & Weaver, 2005).

2.4.5. Optimisasi senyawa penuntun

Paradigma penemuan obat pada kebanyakan program penelitian dewasa ini adalah untuk terapi per oral, meskipun kebanyakan teknik-teknik HTS cenderung bergeser mengarah pada senyawa-senyawa yang tidak sesuai untuk absorpsi. Hal ini karena “hits” cenderung lebih lipofil dan mempunyai jumlah donor dan akseptor ikatan hidrogen serta volume molekul

yang lebih besar (Faller, 2008). Untuk menghindari permasalahan ADME dalam pengembangan obat, strategi yang telah dikembangkan dewasa ini adalah optimisasi senyawa penuntun secara bersamaan antara untuk potensi dan ADME pada saat modifikasi kimia molekul. Aktivitas obat berhubungan dengan ketersediaan-hayatnya, sehingga suatu senyawa penuntun harus memenuhi syarat ketersediaan-hayati ini.

Lipinski et al. (1997), memperkenalkan suatu petunjuk untuk memprediksi apakah molekul dapat memenuhi ketersediaan hayati per oral atau tidak. Petunjuk ini disusun berdasarkan pengamatan bahwa kebanyakan senyawa obat adalah molekul-molekul yang relatif kecil dan lipofilik. Pada petunjuk ini diuraikan sifat-sifat molekul yang penting untuk farmakokinetika obat dalam tubuh manusia, yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME). Petunjuk ini dikenal dengan nama “Aturan lima Lipinski (*Lipinski's rule of fives*)”. Aturan ini memprediksi bahwa senyawa yang diberikan per oral kemungkinan besar absorpsi atau permeasinya akan buruk bila senyawa itu memenuhi kriteria berikut ini :

- a) Berat molekul lebih dari 500 Da
- b) Lipofilisitasnya tinggi (LogP lebih dari 5). P adalah koefisien partisi sistem oktanol/air hitungan.
- c) Terdapat lebih dari 5 donor ikatan hidrogen (misalnya NH dan OH)
- d) Terdapat lebih dari 10 akseptor ikatan hidrogen (misalnya -O- dan -N-).

Semua angka dalam aturan ini merupakan kelipatan lima. Inilah asal nama aturan ini (Lipinski, 1997; Thomas, 2007).

Optimisasi senyawa penuntun untuk meningkatkan potensi dilakukan dengan cara:

- a) Mensintesis analog-analog senyawa penuntun. Ini dimaksudkan menyelidiki keragaman struktur dari senyawa penuntun. Analog-analog senyawa penuntun yang akan disintesis dievaluasi terlebih dahulu kesesuaian sifat-sifatnya dengan kriteria aturan lima Lipinski.
- b) Melakukan studi hubungan struktur-aktivitas secara kuantitatif (HKSA). Studi HKSA dilakukan untuk mengkorelasi keragaman struktural senyawa penuntun dengan bioaktivitasnya.

2.4.6. Sintesis analog senyawa penuntun

Prinsip yang mengarahkan optimisasi senyawa penuntun dengan memodifikasi atau mensintesis analog-analog dari senyawa penuntun adalah bahwa modifikasi struktur akan menyebabkan perubahan sifat fisika-kimia senyawa penuntun. Sifat fisika kimia merupakan salah satu faktor yang menentukan kemampuan senyawa melewati membran biologis. Perubahan sifat fisika-kimia akan menyebabkan perubahan jumlah senyawa yang sampai ke reseptor/protein target, dan perubahan kekuatan interaksi obat dengan biomolekul target tersebut, yang pada akhirnya akan berpengaruh pada aktivitas biologisnya (Craig, 1994; Foye, 1995; Sardjoko, 1993).

Perubahan yang kecil pada struktur molekul umumnya akan menyebabkan perubahan efek biologis minor. Hal ini benar pada seri yang hubungannya sangat dekat, namun tidak selalu demikian. Sebagai contoh, adisi dua atom hidrogen yang tampaknya tidak bermakna pada ikatan rangkap Δ^8 alkaloid ergot menghilangkan aktivitas uterotoniknya, tetapi penggantian gugus N-CH₃ dengan gugus fenetil pada morfin meningkatkan aktivitas analgetiknya hampir 10 kali lipat. Perpanjangan rantai samping dietazin dengan hanya satu atom karbon menuntun penemuan tidak terduga klorpromazin dan bidang psikofarmakologi modern (Nogrady & Weaver, 2005).

2.4.7. Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA)

Tujuan dari analisis hubungan kuantitatif struktur aktivitas (HKSA) adalah untuk meningkatkan probabilitas mendapatkan senyawa aktif diantara senyawa-senyawa yang akhirnya disintesis. Ada tiga klasifikasi utama metode HKSA, yaitu :

- a) HKSA-1D, misalnya analisis Hansch
- b) HKSA-2D, misalnya analisis pengenalan pola (*pattern recognition analysis*)
- c) HKSA-3D, misalnya analisis medan molekular komparatif (*comparative molecular field analysis*) (Nogrady & Weaver, 2005).

HKSA-ID-Analysis Model Hansch

Analisis Hansch mempertimbangkan baik aspek-aspek fisika-kimia yang mempengaruhi distribusi obat dari tempat pemberian sampai ke tempat terjadinya efek maupun interaksi obat-reseptor. Pada analisis HKSA pada sekelompok obat yang strukturnya analog dan aksinya dengan mekanisme yang sama, tiga parameter memainkan peran utama, yaitu :

- a) Tetapan Hidrofobisitas gugus fungsi, π .
- b) Tetapan Elektronik gugus fungsi Hammett, σ
- c) Efek-efek Sterik, yang digambarkan dengan nilai E_s Taft

Tetapan σ dan π gugus fungsi sering bermanfaat apabila mengkorelasi aktivitas biologis dalam prosedur statistik yang dikenal dengan analisis regresi multivariat. Korelasi yang dihasilkan dapat linier maupun parabolik. Hubungan linier dituliskan dengan persamaan :

$$\log 1/C = a\pi + bE_s + c\sigma + d$$

Sedangkan hubungan parabolik sesuai dengan persamaan :

$$\log 1/C = -a\pi^2 + b\pi + cE_s + d\sigma + e$$

C adalah konsentrasi obat untuk efek biologis standar yang dipilih, dan a, b, c, d dan e adalah koefisien-koefisien regresi yang akan ditentukan dengan analisis regresi. Koefisien a, b, c, d, dan e dicocokkan terhadap kurva dengan prosedur kuadrat terkecil (least-squares), menggunakan metode regresi. Besarnya kecocokan persamaan dinilai dengan koefisien korelasi r atau koefisien multipel regresi r^2 , yang proporsional dengan varians. Semakin besar jumlah senyawa yang diikuti dalam analisis, nilai koefisien korelasi semakin baik. Kurva yang dihasilkan dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas biologis senyawa yang belum diuji, bahkan belum disintesis (Nogrady & Weaver, 2005; Sardjoko, 1993).

Analisis regresi efek berbagai gugus fungsi pada molekul menggunakan pendekatan Hansch sangat berguna, menghemat waktu dan usaha dalam sintesis dan uji aktivitas obat baru. Namun, ada beberapa kesulitan dan perangkap dalam menggunakan metoda Hansch. Pertama, untuk menghasilkan koefisien korelasi yang baik membutuhkan jumlah senyawa yang relatif banyak. Kedua, mode aksi obat bisa berubah untuk obat-obat

dalam seri yang tampaknya kontinyu. Metode Hansch tidak mengantisipasi perubahan seperti ini. Masalah lain adalah bahwa sistem biologis sering terlalu kasar sebagai model untuk penerapan metode Hansch, atau efek-efek elektronik dalam molekul obat tidak cukup dipahami dan tepat, dan metode ini memerlukan waktu dan biaya yang banyak.

Walaupun demikian, analisis Hansch telah merevolusi optimisasi molekul obat dan secara langsung menuntun dua strategi lain, yaitu metode Free-Wilson dan metode Topliss.

Metode Free-Wilson. Metode ini juga menganggap bahwa aktivitas biologis dapat digambarkan dengan sifat aditif dari gugus-gugus fungsi dalam struktur molekul induknya. Metode ini telah dimodifikasi oleh Fujita-Ban. Hubungan aktivitas dengan struktur molekul ditulis dalam persamaan :

$$\text{Log } 1/C = \sum a_i X_i + \mu_0$$

C adalah konsentrasi untuk efek terstandar, a_i , adalah kontribusi gugus fungsi dari gugus fungsi ke i pada aktivitas farmakologi molekul tersubstitusi, X adalah satu bila gugus fungsi i ada, dan nol bila tidak ada, dan $\mu_0 = 1/C$ untuk senyawa induk. Analisis regresi digunakan untuk menentukan a_i dan μ . Hasilnya adalah suatu matriks data yang menunjukkan kontribusi masing-masing gugus fungsi pada masing-masing posisinya terhadap keseluruhan efek biologis molekul. Persamaan Free-Wilson sangat mirip dengan persamaan linier Hansch, dan hasil dari kedua analisis tersebut dapat dibandingkan. Namun, metode Free-Wilson tidak dapat memprediksi aktivitas senyawa yang gugus fungsinya belum masuk dalam matriks. Akibatnya metode ini pemakaiannya terbatas hanya pada seri obat dimana sudah tersedia banyak analog yang dekat tetapi data fisika-kimianya kurang (Nogrady & Weaver, 2005; Sardjoko, 1993).

Metode Topliss. Metode ini lebih cepat dan mudah untuk digunakan dibandingkan metode Hansch. Skema Topliss adalah metode empirik yang mana setiap senyawa dievaluasi sebelum suatu analog direncanakan, dan

dibandingkan dalam hal sifat fisika-kimianya dengan analog-analog yang direncanakan (Nogrady & Weaver, 2005; Sardjoko, 1993).

HKSA-2D – Analisis Pengenalan Pola.

Tahap pertama dalam melakukan HKSA-2D adalah memilih *training set*. Ini adalah sederet molekul-molekul yang beragam dalam hal struktur dan bioaktivitasnya. Idealnya, senyawa yang tersedia mencakup spektrum penuh bioaktivitas, dari yang aktif (penuh, partial, mencakup 1000 kali lipat rentang dalam afinitas pengikatan reseptor) sampai ke yang inaktif. Semakin banyak molekul semakin baik, tetapi sebagai tahap awal sudah cukup layak dengan menggunakan lebih kurang 10 molekul. Tidak perlu semua molekul yang tersedia digunakan, molekul tersisa disimpan dulu dan nanti akan digunakan *test set* yang digunakan untuk validasi prediksi algoritma yang dikembangkan melalui studi pada *training set* (Nogrady & Weaver, 2005).

Kemudian, setiap molekul *training set*, disamping aktivitas farmakologi, dikarakterisasi dengan seri deskriptor berikut :

- a) Deskriptor Geometrik (panjang ikatan, sudut ikatan, torsi sudut, jarak interatom)
- b) Deskriptor Elektronik {densitas muatan pada atom-atom individual, energi orbital molekul yang tertinggi yang diduduki (HOMO), energi orbital yang terendah yang tidak diduduki (LUMO), dipol molekuler}
- c) Deskriptor Topologik {indeks teori grafik, indeks ad hoc (jumlah cincin dalam molekul, jumlah cincin aromatik dalam molekul)}
- d) Deskriptor Fisika-Kimia {koefisien partisi oktanol-air ($\log P$ atau $\log P^2$), jumlah ikatan hidrogen (jumlah loka donor ikatan hidrogen, jumlah loka akseptor ikatan hidrogen)} (Introduction, 2005; Nogrady & Weaver, 2005).

HKSA-3D – Analisis Medan Molekular Komparatif.

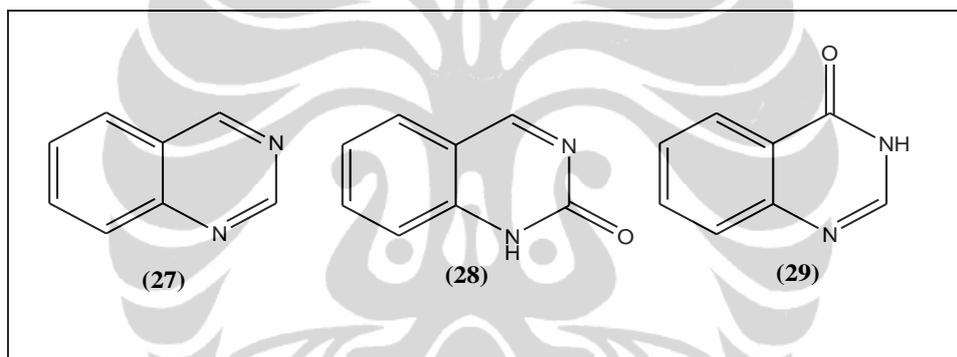
HKSA-3D mulai dengan seri senyawa yang diketahui struktur dan aktivitas biologinya. Tahap pertama adalah mensejajarkan struktur molekul. Ini dikerjakan dengan algoritma penyejajaran yang merotasi dan mentranslasi

molekul dalam ruang koordinat Cartesian sehingga satu molekul sejajar dengan yang lain. Pekerjaan mulai dengan analog-analog yang paling rigid dan kemudian dilanjutkan ke molekul yang fleksibel secara konformasional yang sejajar dengan molekul yang lebih rigid. Hasil akhir adalah bahwa semua molekul akhirnya sejajar, masing-masing diatas dari yang lain.

Setelah molekul-molekul *training set* sejajar, medan molekuler disekeliling tiap molekul dihitung berdasarkan kisi titik-titik dalam ruang. Berbagai medan molekuler disusun sebagai deskriptor medan yang mencerminkan sifat-sifat seperti faktor sterik atau potensial elektrostatik. Titik-titik medan kemudian dicocokkan untuk memprediksi bioaktivitas. Algoritma kuadrat-terkecil partial (*partial least-squares algorithm (PLS)*) digunakan untuk bentuk kecocokkan ini. Berdasarkan atas perhitungan PLS, dua buah informasi dideduksi untuk setiap bagian ruang dalam medan molekuler mengenai molekul tersebut: informasi pertama menyatakan apakah bagian dari ruang tersebut berkorelasi dengan aktivitas biologis; informasi kedua menentukan apakah gugus fungsi pada molekul dalam bagian ruang tersebut hendaknya bulki, aromatik, pendonor elektron, penarik elektron, dan sebagainya. Prediksi dari perhitungan medan molekuler ini kemudian divalidasi dengan menerapkannya pada satu set senyawa uji (Introduction, 2005; Nogrady & Weaver, 2005).

2.5. Senyawa 4(3H)-Kuinazolinon

Kuinazolina (**27**) adalah senyawa bisiklik menyatu yang sebelumnya diketahui sebagai benzo-1,3-diazina. Nama lainnya adalah fenmiazina dan 5,6-universal. Salah satu turunan sistem kuinazolina yang sudah diketahui sejauh ini adalah keto-kuinazolin atau kuinazolon. Bergantung posisi gugus keto atau okso, senyawa ini diklasifikasikan ke dalam dua tipe: 2(1H)-kuinazolinon atau 1,2-dihidro-2-oksokuinazolina (**28**), dan 4(3H)-kuinazolinon atau 3,4-dihidro-4-okso-kuinazolina (**29**) (Gambar 2.14). Sistem ini memperlihatkan tautomerisasi laktam-laktim dan mengalami reaksi-reaksi penggantian gugus OH (Meiyyanathan, 2006).



[Sumber: O'Neil et al., 2006]

Gambar 2.14. Struktur kimia kuinazolina (**27**), 2(1H)-kuinazolinon (**28**) dan 4(3H)-kuinazolinon (**29**). Telah diolah kembali

2.5.1. Reaktivitas 4(3H)-kuinazolinon

Reaksi-reaksi yang dihubungkan dengan sifat tautomerik alami dari kuinazolinon sangat kompleks dan umumnya tidak dapat diduga. Sambungan amida pada kuinazolinon hendaknya tidak dilihat apakah utamanya sebagai bentuk keto atau enol, tetapi sebagai tautomer keto-enol, karena memperlihatkan reaksi-reaksi yang karakteristik dari kedua bentuk tersebut.

Kuinazolinon selalu mempunyai kristal padat dengan titik leleh yang tinggi, tidak larut dalam air dan kebanyakan pelarut organik tetapi larut dalam larutan alkali dalam air. Umumnya tidak larut dalam asam-asam encer tetapi

kadang-kadang larut dalam asam-asam pekat. 4(3H)-Kuiazolinon sederhana, meskipun tidak larut dalam asam-asam encer, larut dalam asam klorida 6N. 4(3H)-Kuiazolinon membentuk monohidroklorida yang stabil, kloroplatinat, kloroaurat dan pikrat, serta garam-garam logam perak, merkuri, seng, tembaga, natrium dan kalium (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.1. *Kestabilan sistem cincin*

Sistem cincin pada kuiazolinon sangat stabil dari reaksi-reaksi oksidasi, reduksi, hidrolisis dan perlakuan-perlakuan yang dirancang untuk memecah cincin. Tidak ada laporan degradasi kuiazolinon dengan oksidasi kimia sederhana (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.2. *Aromatisasi*

Bila 4(3H)-kuiazolinon sederhana (**29**) dan tersubstitusi pada posisi 2 dipanaskan dengan sejumlah ekuivalen fosfor pentaklorida dalam fosfor oksiklorida diperoleh 4-klorokuiazolin. Bila pada posisi 3 senyawa (**29**) terdapat gugus metil, tautomeri biasa akan terhambat. Pada klorinasi, gugus metil ini akan hilang diperoleh 4-klorokuiazolina (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.3. *Alkilasi*

Posisi alkilasi kuiazolinon mirip dengan semua sistem heterosiklik nitrogen aromatik dimana gugus hidroksil didapatkan pada orto atau para terhadap posisi nitrogen. Senyawa semacam itu ada dalam campuran tautomerik, kedua struktur itu dapat saling tukar melalui pergeseran satu proton dan sepasang elektron. Dalam larutan alkali ion-ion dari senyawa semacam itu terdapat sebagai hibrid resonansi dari kedua bentuk utama itu, yang berbeda hanya dengan posisi dari dua pasang elektron. Jadi dalam alkilasi, seperti halnya pada turunan piridin, pirimidin dan heterosiklik yang mirip, pemasukkan gugus bisa jadi berikatan juga pada atom nitrogen. Agen pengalkil dan kondisi alkilasi merupakan faktor yang menentukan jalannya alkilasi (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.4. Reduksi

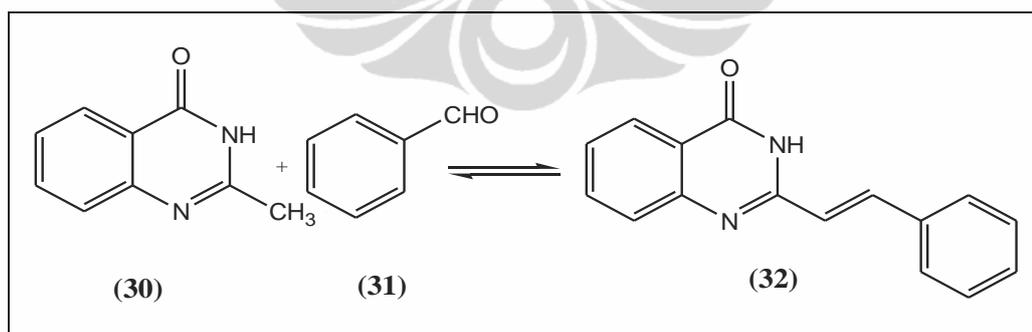
2,3-Dihidro-3-metil-4(1H)-kuinazolinon dapat diperoleh pada reduksi 3-metil-4(3H)-kuinazolinon dengan Litium Aluminium Hidrida (LiAlH_4) dalam benzen (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.5. Nitirasi

4(3H)-kuinazolinon (**29**) pada pendidihan dengan asam nitrat mengalami substitusi menghasilkan 6-nitro-4(3H)-kuinazolinon. Pada nitirasi lebih lanjut dapat diamati bahwa gugus nitro masuk pada posisi-8 menghasilkan turunan 6,8-dinitro. 4(3H)-Kuinaolinon tersubstitusi pada posisi-2, pada kondisi seperti di atas, juga mempunyai sifat yang sama (Meiyyanathan, 2006).

2.5.1.6. Reaktivitas gugus 2-metil.

Gugus metil pada posisi-2 dari 4(3H)-kuinazolinon bersifat sangat reaktif karena tersambung pada karbon azometina. 2-Metil-4(3H)-kuinazolinon (**30**) dan aldehida aromatik (**31**) dalam asam asetat glasial mengalami kondensasi menghasilkan senyawa stiril yaitu 2-stiril-4(3H)-quinazolinon (**32**) (Meiyyanathan, 2006; Varma, Bahadur & Agnilhotri, 1981) (Gambar 2.15).



[Sumber: Connolly, Cusack, O'Sullivan, Guiry, 2005]

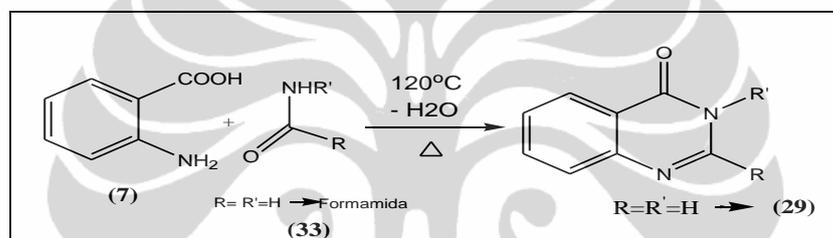
Gambar 2.15. Skema reaksi kondensasi 2-metil-4(3H)-kuinazolinon (**30**) dengan benzaldehida (**31**). Telah diolah kembali.

2.5.2. Metoda-metoda sintesis senyawa 4(3H)-kuinazolinon dan turunannya.

Kebanyakan metoda-metoda yang digunakan untuk sintesis 4(3H)-kuinazolinon menggunakan asam antranilat atau turunan fungsionalnya sebagai bahan pemula. Metoda-metoda itu antara lain:

2.5.2.1. Kondensasi asam antranilat dengan amida.

Bila asam antranilat (**7**) dipanaskan dalam wadah terbuka dengan amida (**33**) berlebih pada 120°C, air akan dilepaskan dan diperoleh 4(3H)-kuinazolinon (**29**) mendekati perubahan kuantitatif (90%) (Gambar 2.16) (Meiyyanathan, 2006). Metode sintesis ini ditemukan oleh Stefan Niementowski pada tahun 1895 (Wiklund, 2004)



[Sumber : Wiklund, 2004]

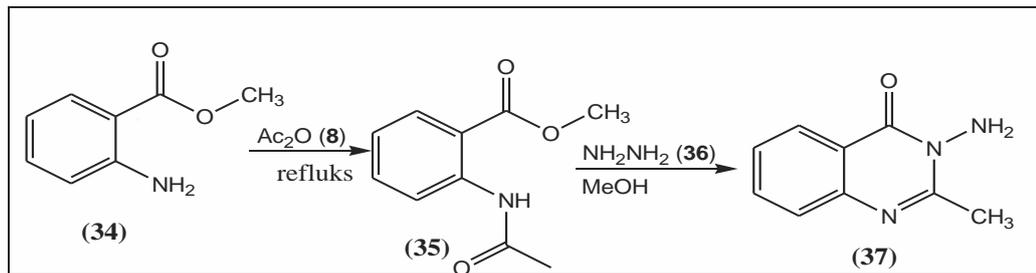
Gambar 2.16. Skema reaksi sintesis 4(3H)-kuinazolinon dari asam antranilat dan amida. Telah diolah kembali.

2.5.2.2. Kondensasi asetanilida dengan uretan

Sejumlah usaha telah dilakukan untuk mengkondensasi turunan uretan dengan anilin untuk mendapatkan 4(3H)-kuinazolinon secara langsung. Uretan dan asetanilida dipanaskan selama 3 jam dengan fosfor pentaoksida dalam toluen, menghasilkan 2-metil-4(3H)-kuinazolinon (**30**) (Meiyyanathan, 2006).

2.5.2.3. Kondensasi metil-2-asetamidobenzoat dengan amina.

Bila campuran metil 2-aminobenzoat (**34**) dan anhidrida asetat (**8**) direfluks selama 2 jam akan diperoleh metil 2-asetamidobenzoat (**35**), dan kemudian senyawa ini direaksikan dengan hidrazina hidrat (**36**) akan membentuk 3-amino-2-metil-4(3H)-kuinazolinon (**37**) (Gambar 2.17) (Revanasiddappa, Prasad, Kumar, & Jayalakshmi, 2010).

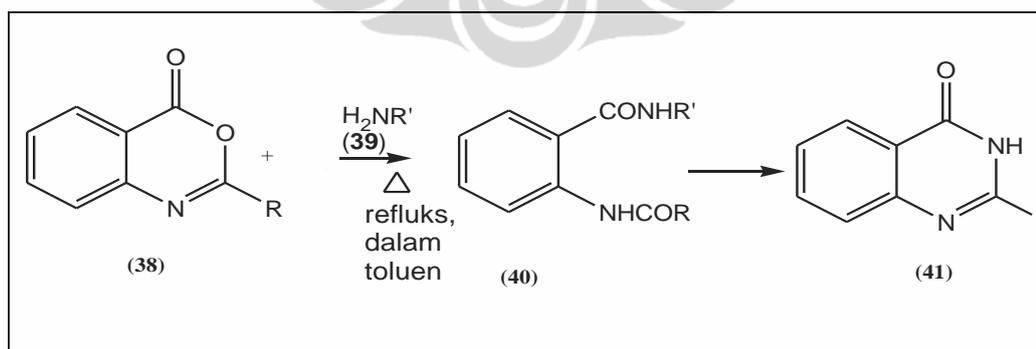


[Sumber: Revanasiddappa, Prasad, Kumar, & Jayalakshmi, 2010]

Gambar 2.17. Skema reaksi preparasi 3-amino-2-metil-4(3H)-kuinazolinon.

2.5.2.4. Kondensasi 3,1-benzoksazin-4-on dengan amonia atau amina tersubstitusi.

4(3H)-Kuinaolinon dapat juga disintesis langsung dari 3,1-benzoksazin-4-on yang sesuai dengan cara memanaskannya bersama amonia atau amina tersubstitusi. Penerapan metode ini pertama kali dilaporkan oleh Heller, Bogert dan kawan-kawan pada tahun 1905, bahwa reaksi antara benzoksazinon (38) dengan amina primer (39) menghasilkan o-asilamidobenzamid (40) dan senyawa 4(3H)-kuinaolinon (41), sebagai produk utama (Gambar 2.18). Senyawa 41 diperkirakan dibentuk dari senyawa 40 selama berlangsungnya reaksi, yang umumnya dilakukan pada suhu refluks dalam pelarut seperti toluen (Errede, 1976).



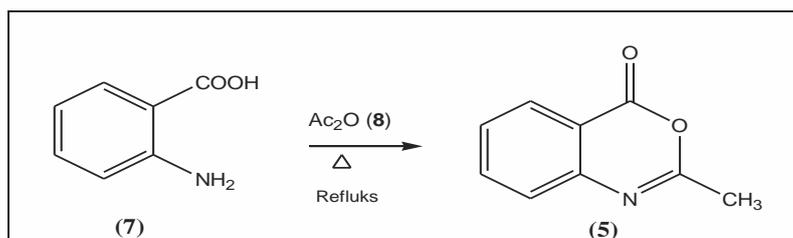
[Sumber: Errede, 1976]

Gambar 2.18. Skema reaksi kondensasi 4(H)-3,1-benzoksazin-4-on dengan amina primer.

Fusi 4H-3,1-benzoksazin-4-on dengan amina dapat dilakukan tanpa pelarut maupun pemanasan pada suhu refluks dalam pelarut tertentu. Beberapa contoh sintesis senyawa turunan 4(3H)-quinazolinon dengan melakukan fusi 4H-3,1-benzoksazin-4-on atau turunannya dengan senyawa amina tanpa pelarut adalah: sintesis 2-metil/2-fenil-4(3H)-3,1-kuinazolinon yang mengandung gugus heterosiklik pada posisi 3, sintesis R(R*,R*)-3-[2-hidroksi-1-(hidroksimetil)-2-(4-nitrofenil-etil)]-4(3H)-kuinazolinon, sintesis 6,8-dibromo-2-fenil-3-(4-asetilfenil)-4(3H)-quinazolinon dan sintesis 2,6,8-tersubstitusi-3-amino-4-oksokuinazolin-3(4H)-on (Eid et al, 1979; Tonkikh et al, 2000; Mosaad et al, 2010; Raghavendra, Thampi dan Gurubasavarajaswamy, 2008). Beberapa contoh sintesis senyawa turunan 4(3H)-quinazolinon dengan melakukan fusi 4H-3,1-benzoksazin-4-on atau turunannya dengan senyawa amina menggunakan pelarut adalah: sintesis 2-fenil-3-tersubstitusi-4(3H)-kuinazolinon (pelarut piridin), sintesis turunan tioglikosida yang mengandung kuinazolinon (pelarut benzen), sintesis etil-(6-bromo-3,4-dihidro-2-fenil-4-oksokuinazoli-3-il)asetat (pelarut piridin), sintesis beberapa 4(3H)-kuinazolinon dan analog baru (pelarut asam asetat glasial), dan sintesis kuinazolin-4-on turunan obat sulfa (pelarut metanol) (Selvam et al, 2008; Huang et al, 2009; Rajveer et al, 2010; Suthakaran, Kavimani, Venkappayya, Sakina & Suganthi, 2008; Chandra, Garg & Kumar, 2009).

2.5.3. Sintesis dan sifat-sifat 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (5)

2-Metil-3,1-benzoksazin-4-on (5) diberi nama trivial asetilantranil. Nama ini diberikan untuk menekankan bahwa senyawa anhidrida itu diperoleh dengan mudah dari asam antranilat (7) dengan siklodehidrasi dalam anhidrida asetat (8) pada suhu refluks (Errede, 1976; Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979; Shukla, Singh & Parmar, 1967; Connolly, Cusack, O'Sullivan & Guiry, 2005) (Gambar 2.19).



[Sumber: Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979]

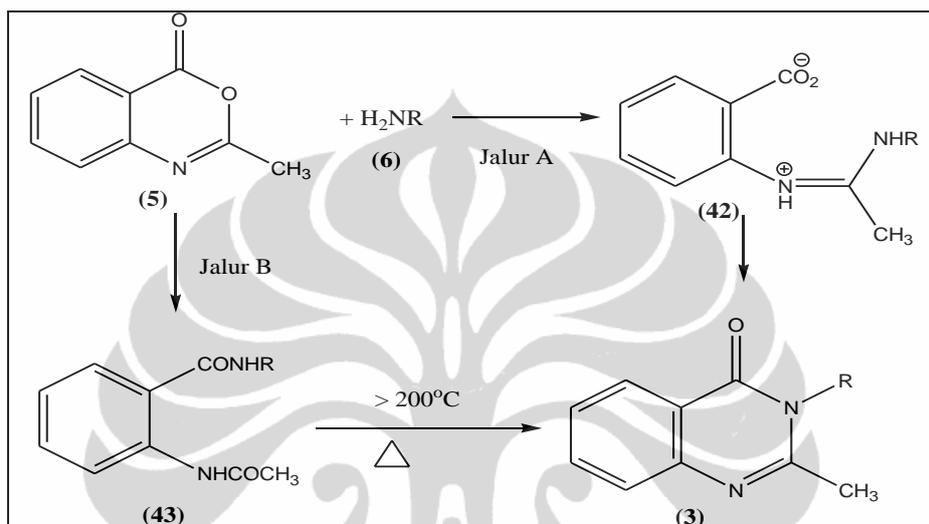
Gambar 2.19. Skema reaksi sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (asetilantranil) (5). Telah diolah kembali.

Asetilantranil dapat juga disintesis dengan mereaksikan asam antranilat dengan asetilklorida dalam pelarut piridin (Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers, & El-Hawary, 1979; Nagase et al., 2008). Jika anhidrida asetat/asetilklorida diganti dengan benzoilklorida atau kloroasetilklorida, maka dihasilkan 2-fenil-3,1-benzoksazin-4-on atau 2-klorometil-3,1-benzoksazin-4-on (Suthakaran, Kavimani, Venkappayya, Sakina & Suganthi, 2008; Kohli, Hashim, Vishal, Sharma & Singh, 2009; Rajveer, Kumaraswamy, Sudharshini & Rathinraj, 2010; Beena and Akelesh, 2010).

Asetilantranil bersifat semi asam anhidrida. Senyawa ini mengalami beberapa reaksi seperti asam anhidrida sebenarnya, tapi dengan kecepatan lebih lambat. Asetilantranil sensitif terhadap kelembaban dan higroskopis (Khajavi, Montazari & Hosseini, 1997). Hidrolisis asetilantranil (5) menghasilkan asam N-asetilantranilat (asam o-asetamidobenzoat). Kecepatan hidrolisis asetilantranil dalam pelarut organik meningkat secara linier dengan meningkatnya konsentrasi air. Tetap kecepatan hidrolisis asetilantranil oleh air dalam benzen hampir sama dengan dalam air pH 6,8. Tetap kecepatan hidrolisis asetilantranil oleh sejumlah stokiometrik air dalam pelarut-pelarut organik akseptor proton menurun dari benzen > DMSO > aseton > DMF > piridin, sedangkan dalam pelarut donor proton menurun dari benzen > kloroform > asetonitril (Errede, McBrady & Tiers, 1980).

Reaksi asetilantranil (5) dengan alkohol menghasilkan ester yang sesuai. Dalam pH netral atau asam menghasilkan N-(2-karboksifenil)imidat, sedangkan dalam pH basa menghasilkan ester o-asetilamidobenzoat (Errede,

Ashley, McBrady & Yarian, 1982). Reaksi antara asetilantranil (**5**) dengan senyawa anilin (**6**) menghasilkan senyawa antara asetamidin yang sesuai (**42**), kecuali asam antranilat menghasilkan o-asetamanidobenzamida (**43**). Senyawa asetamidin (**37**) dapat dengan mudah diubah menjadi senyawa N-fenil-2-metil-4(3H)-kuinazolinon (**3**) dengan cara pemanasan pada suhu lebih kurang 130°C (Gambar 2.20).



[Sumber : Errede & McBrady, 1977]

Gambar 2.20. Reaksi asetilantranil dengan senyawa anilin. Telah diolah kembali.

Asetilantranil (**5**) dengan senyawa amina alifatik dalam pelarut toluen bereaksi melalui jalur A, kecuali jika terdapat halangan sterik reaksi berlangsung melalui jalur B yang lambat. Reaksi asam antranilat dengan asetilantranil juga melalui jalur B, namun bukan karena gangguan oleh adanya gugus fungsi yang besar pada posisi orto, juga bukan karena penurunan reaktivitas anilin karena efek penarik elektron karena keelektronegatifan gugus asam karboksilat, tetapi karena gugus karboksilat dengan gugus amina pada asam antranilat dalam pelarut nonpolar membentuk ikatan hidrogen intramolekul menghasilkan cincin enam anggota yang kaku. Dalam bentuk ini, molekul asam antranilat mirip secara geometrik, meskipun tidak secara elektronik, dengan amina sekunder heterosiklik yang memperlihatkan halangan sterik pada reaksi ini. Dalam pelarut polar seperti

asam asetat, asam antranilat bereaksi dengan asetilantranil melalui jalur A menghasilkan N-(2-karboksifenil)-2-metil-4(3H)-kuinazolinon (Errede & McBrady, 1977).

2.5.4. Aktivitas biologis senyawa 4(3H)-kuinazolinon

Kerangka 4(3H)-kuinazolinon merupakan heterosiklik yang sering ditemukan dalam literatur-literatur kimia medisinal. 4(3H)-Kuinazolinon banyak digunakan sebagai molekul penuntun untuk merancang senyawa-senyawa potensial bioaktif. Beberapa aktivitas biologis yang telah ditemukan adalah :

a) Anti-inflamasi

Senyawa-senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon menunjukkan aktivitas inhibitor COX-2 atau anti-inflamasi yang sedang. Senyawa-senyawa tersebut antara lain : 6,8-dibromo-2-fenil-3-{4-[(E)-3-(naft-2-il)-akriloil]-fenil}-3H-kuinazolin-4-on (Mosaad, Kamel, Kassem, Aabotaleb, Nofal & Ahmed, 2009), dan 2-(4-nitrofenil)-3-(4-tolil)-4(3H)-kuinazolinon (Yadav, Shirude, Parmar, Bataraman & Giridhar, 2006).

b) Depresan susunan saraf pusat/sedativa-hipnotika

Senyawa turunan 2-(fluorometil)-3-aril-4(3H)-kuinazolinon dan 3-[5-tersubstitusi 1,3,4-thiadoazol-2-il]-2-stiril kuinazolin-4(3H)-on menunjukkan aktivitas depresan susunan saraf pusat (Tani, Yamada, Oine, Ochiai, Ishida, & Inoue, 1979; Jatav, Mishra, Kashaw & Stables, 2008),).

c) Antihistamina H₂

Beberapa turunan 4-kuinazolinon menunjukkan aktivitas antagonis-H₂, dan satu diantaranya, 2-[3-{3-(1-piperidinilmetil)fenoksi}propilamino]-4(3H)-kuinazolinon, menunjukkan aktivitas antisekretori paling poten (Ogawa, Yoshida, Aratani, Koshinaka, Kato, & Ito, 1988).

d) Antikonvulsi

Beberapa senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon yang strukturnya mempunyai kaitan dengan 2-metil-3-o-tolil-4(3H)-kuinazolinon (metakualon), telah diseintesis dan diuji aktivitas antikonvulsinya. Hasil pengujian menunjuk kan bahwa 2-[2-okso-2-(4-piridil)etil]-3-aril-4(3H)-

kuinazolinon yang mempunyai gugus fungsi tunggal pada posisi orto pada gugus 3-fenil menunjukkan aktivitas antikonvulsi paling menjanjikan. (Wolfe, Rathman, Sloovi, Campbell, & Greenwood, 1990).

e) Neuroprotektif

Senyawa turunan 3-fenil/heteroaril-2-[(E)-stiril/feniletetil/heteroaril etetil]kuinazolin-4-on, dan turunan 3-fenil/heteroaril-2-(fenil/heteroariletetil)kuinazolin-4-on merupakan antagonis reseptor asam α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat (AMPA). Reseptor ini merupakan subspecies reseptor glutamat, yang diidentifikasi mampu berikatan dengan AMPA, yang berperan sebagai reseptor neurotransmitter pasca-sinaps. Stimulasi berlebihan atau tidak tepat reseptor-reseptor asam amino menyebabkan kerusakan sel saraf. Antagonis reseptor AMPA dipercaya bermanfa'at untuk pengobatan kerusakan ini dan/atau untuk mengurangi jumlah kerusakan sel-sel saraf (Elliot, Welch, & Chenard, 2001),

f) Antihipertensi

Senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon yaitu 2-[(2-hidroksifenil)amino]-4(3H)-kuinazolinon menunjukkan aktivitas antihipertensi (Hussain, Chiu, Price, Timmermans, & Shefter, 1988)

g) Antibakteri

Senyawa-senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon menunjukkan aktivitas antibakteri. Senyawa-senyawa itu antara lain: R(R*,R*)-3-[2-hidroksi-1-(hidroksimetil)2-(4-nitrofenil)-etil]-4(3H)-kuinazolinon, 3-[3'-kloro-4'-(p-hidroksi, m-metoksifenil)-2'-okso-azetidil]-2-fenilkuinazolin-4(3H)-on, 2-(1H-piperazin-tersubstitusi-1-il)-N-(4-okso-kuinazolin-tersubstitusi-4(3H)-il)-asetamida, 3-[5-(4-feniltersubstitusi)-1.3.4-oksadiazol-2-il]-2-stirilkuinazolin-4(3H)-on, 3-(2-(4Z)-4-benzilidena-tersubstitusi-4,5-dihidro-5-okso-2-fenilimidazol-1-il)etil)-6,8-dibromo-2-kuinazolin-tersubstitusi-4(3H)-on (Eid, Aboul-Enein, el-Difrawy, Bibers, & El-Hawary, 1976; Beena & Akelesh, 2010; Raghavendra, Thampi, & Gurubasavarajaswamy, 2008; Gupta, Kashaw, Jatav & Mishra, 2008; Suthakaran, Kavimani, Venkaiaiah, & Suganthi, 2008).

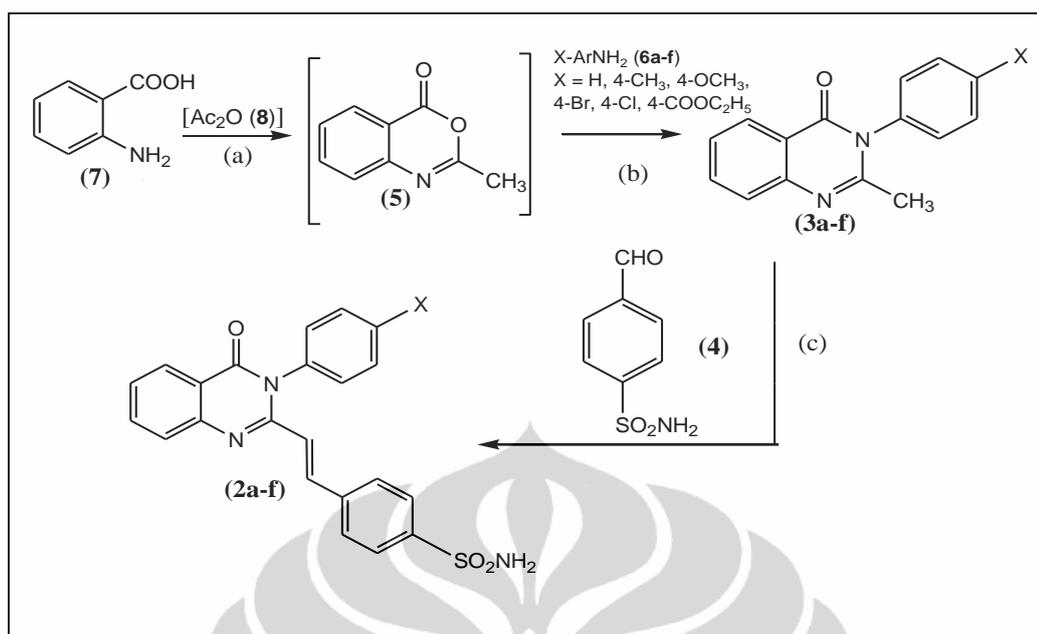
h) Antihiperlipidemika

Senyawa 2-metil-4(3H)-kuinazolinon dan turunannya yaitu 6,8-dibromo-2-metil-4(3H)-kuinazolinon dan 6-iodo-2-metil-4(3H)-kuinazolinon menunjukkan aktivitas antihiperlipidemia (Refaie, Esmat, Gawad, Ibrahim, & Mohamed, 2005).

2.6. Rancangan sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida dan analognya

Sintesis senyawa **2a-f** dirancang berdasarkan analisis retrosintetik pada Gambar 1.2 dan sejumlah informasi kepustakaan. Diskoneksi dari senyawa **2a-f** dihasilkan pereaksi 2-metil-3-fenil-2-(4(3H)-kuinazolinon dan analognya (**3a-f**) dan p-formilbensulfonamida (**4**). Diskoneksi senyawa **3a-f** dihasilkan 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (asetilantranil) (**5**) dan senyawa anilin (**6a-f**). Diskoneksi dari senyawa **5** dihasilkan asam antranilat (**7**) dan anhidrida asetat (**8**). Diskoneksi senyawa **4** dihasilkan p-sianobensulfonamida (**9**), selanjutnya diskoneksi senyawa **9** dihasilkan p-aminobensulfonamida (**10**). Skema sintesis senyawa **2a-f** dapat dilihat pada Gambar 2.21.

2-Metil-3,1-benzoksazin-4-on (**5**) disintesis melalui reaksi siklodehidrasi asam antranilat (**7**) dalam anhidrida asetat (**8**) pada suhu refluks. 2-metil-3-fenil-2-metil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (**3a-f**) disintesis dengan mengkondensasi 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (**5**) dengan anilin atau turunannya (**33a-f**). Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida dan analognya (**2a-f**) dilakukan dengan mengkondensasi senyawa **39a-f** dengan p-formilbensulfonamida (**4**) dalam asam asetat glasial (Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979; Suthakaran, Kavimani, Venkappayya, Sakina, dan Suganthi, 2008; Connolly, Cusack, O'Sullivan, Guiry, 2005; Gupta, Kashaw, Jatav, Mishra, 2008; Varma, Bahadur, Agnihotri, 1981).



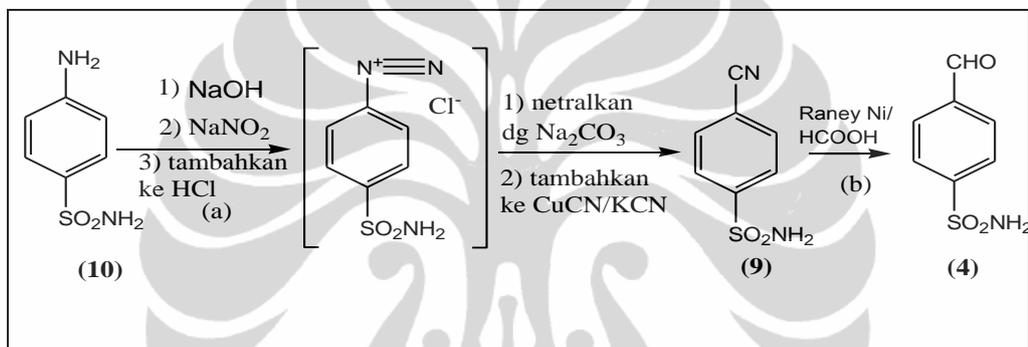
Gambar 2.21. Skema reaksi sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzene sulfonamida dan analognya (**2a-f**). **2a** : X = H; **2b** : X = CH₃; **2c** : X = OCH₃; **2d** : X = Br; **2e** : X = Cl dan **2f** : X = (C=O)OC₂H₅. Kondisi : (a) Refluks 125°C, 1-2 jam; (b) refluks dalam asam asetat glasial suhu 125°C, 5-7 jam; (c) AcOH, Na Asetat anhidrat, refluks 100°C, 4 jam.

2.6.1. Sintesis 4-Formilbenzensulfonamida

4-Formilbenzensulfonamida (**4**) harus dibuat lebih dahulu melalui sintesis kimia karena tidak tersedia di pasaran. Sintesis senyawa aldehida aromatik dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain oksidasi selektif gugus metil dari senyawa toluen (Furniss, 1989), mereaksikan benzilhalida dengan heksamina dalam asam asetat 50% (reaksi Sommelet) (Furniss, 1989), dan reduksi partial 4-sianobenzensulfonamida (**9**) dengan Raney-nikel yang diikuti hidrolisis (Es dan Staskun, 1988; Yang, Lin, Hsu & Yang, 2002). Metode dari Es dan Staskun, 1988, memberikan hasil yang memadai dibandingkan metode yang disebutkan lebih dulu.

Pada sintesis senyawa **4** diperlukan material pemula senyawa **9**. Senyawa **9** disintesis dengan mereaksikan garam diazonium dengan CuCN (reaksi Sandmeyer) (Hickinbottom, 1957). 4-Aminobenzensulfonamida (**10**) dilarutkan dalam larutan NaOH, dicampur dengan larutan natrium nitrit, dan

kemudian ditambahkan ke dalam HCl pada suhu 0°C sedikit demi sedikit sehingga terbentuk garam diazonium. Setelah itu, garam diazonium dinetralkan secara hati-hati dan direaksikan dengan larutan CuCN dalam KCN. Penetralkan garam diazonium dimaksudkan untuk menghindari terbentuknya gas HCN yang sangat beracun (Furnis, et al., 1989). Senyawa 4-sianobenzensulfonamida (9) yang diperoleh kemudian direduksi dengan Raney nikel dalam asam formiat 75% pada suhu refluks (Es dan Staskun, 1988). Skema reaksi pembuatan 4-sulfonamidabenzaldehida dapat dilihat pada Gambar 2.23.



[Sumber: Hickinbottom, 1957 dan Es dan Staskun, 1988]

Gambar 2.22. Skema reaksi sintesis 4-formilbenzensulfonamida (4). Kondisi: (a) suhu 0°C; (b) refluks 115°C, 1 jam. Telah diolah kembali

2.7. Penentuan Struktur Molekul Senyawa Hasil Sintesis

Penentuan struktur molekul senyawa hasil sintesis dilakukan untuk memastikan bahwa struktur molekul senyawa target dari setiap tahap sintesis sesuai dengan yang diinginkan. Penentuan struktur molekul dilakukan berdasarkan data spektrum inframerah (IR), spektrum massa (MS), spektrum resonansi magnetik inti proton (¹H-NMR), spektrum resonansi magnetik inti karbon 13 (¹³C-NMR), dan spektrum resonansi magnetik inti dua dimensi (NMR-2D).

Penentuan struktur molekul diawali dengan penentuan rumus molekul senyawa (*molecular formula*), yang akan memberikan informasi tentang jumlah dan jenis atom-atom, dan indeks defisiensi hidrogen (IDH) (\approx jumlah cincin, ikatan rangkap dua dan ikatan rangkap tiga). Penentuan rumus molekul dimulai dengan cara pengenalan puncak ion molekul dari data spektrum massa resolusi tinggi (HR-MS). Dalam HR-MS puncak tertinggi m/z (kecuali untuk puncak-puncak isotopnya) adalah puncak ion molekul. Puncak ini cukup kuat sehingga kekuatan puncak isotop dapat ditentukan secara teliti dan keberadaan dan jumlah atom-atom S, Br, dan Cl dapat diketahui pasti. Pola fragmentasi dari MS perlu dilihat juga untuk framen-fragmen yang dapat dikenali. Bila puncak ion molekul nilainya ganjil, menunjukkan adanya jumlah atom N yang ganjil. Bila puncak ion molekul nilainya genap, menunjukkan adanya jumlah atom N yang genap atau tidak terdapat atom N. Kesulitan sering muncul akibat keragu-raguan dalam memilih ion molekul, namun dapat diatasi dengan penggunaan ionisasi kimia sebagai tambahan yang rutin pada tumbukan elektron (*electron impac*) (EI).

Langkah berikutnya adalah penyelidikan spektrum IR untuk mengidentifikasi adanya gugus-gugus fungsi yang khas dan sudah dikenal, misalnya : C-H stretching alifatik/aromatik, karbonil, O-H dan/atau N-H, adanya ikatan rangkap dan lain-lain. Data informasi dari spektrum IR ini, diselidiki lebih lanjut melalui penyelidikan spektrum proton NMR. Bila memungkinkan, jumlah total proton dan rasio jumlah proton pada tiap kelompok pergeseran kimia ditentukan berdasarkan data integrasinya. Kemudian diperhatikan pola kopling orde pertama dan pergeseran kimia yang khas. Selanjutnya diperhatikan spektra $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, ditentukan jumlah karbon dan proton yang tampak dan jumlah gugus-gugus CH_3 , CH_2 , CH , dan C tidak berikatan dengan H. Ketidakesuaian antara integrasi proton dan jumlah proton yang ada dalam spektra $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ menunjukkan proton pada heteroatom. Tumpang-tindih serapan proton biasa terjadi, tetapi dengan instrumen beresolusi tinggi kejadian itu pada puncak-puncak ^{13}C nonekivalen jarang sekali terjadi.

Kemudian rumus-rumus molekul yang sesuai dengan data-data yang telah diperoleh ditulis, dan dipilih rumus molekul-rumus molekul yang paling sesuai dari daftar rumus molekul yang bisa ditemukan pada buku-buku teks, spektrometri sebagai pembanding. Selanjutnya dihitung IDH untuk tiap rumus molekul. Adanya unsur-unsur yang simetri akan memunculkan ketidaktepatan dan tumpang tindih puncak yang akan mengakibatkan ketidaksesuaian antara rumus molekul dan jumlah ^1H dan ^{13}C yang tampak pada spektrum. Tetapi informasi ini juga berkontribusi pada pemahaman struktur molekul.

Setelah rumus molekul dapat diperoleh, IDH pada rumus molekul itu dihitung dan gugus-gugus fungsi dalam spektrum IR, semua proton dalam $^1\text{H-NMR}$, dan semua karbon dalam $^{13}\text{C/DEPT NMR}$ ditetapkan. Kemudian $\Delta\nu/J$ dihitung atau diperkirakan dan diberi penjelasan tentang multiplisitas, ditetapkan semua korelasi-korelasi pada spektra 2-D, ditunjukkan bagaimana EI spektrum massa mendukung struktur, dan dipertimbangkan kemungkinan adanya isomer. Langkah-langkah tersebut tidak perlu berurutan (Silverstein, Webster & Kiemle, 2005).

2.8. Uji Aktivitas Inhibisi pada Enzim Siklooksigenase (COX)

Ada beberapa cara uji aktivitas inhibisi pada enzim COX, antara lain:

a) Mengukur intensitas fluoresensi produk samping malondialdehid (MDA)

Konversi asam arakidonat menjadi PG oleh enzim siklooksigenase menghasilkan produk samping malondialdehid (MDA) yang dapat diukur intensitas fluoresensinya. Siklooksigenase diperoleh dari keping darah segar manusia. Plasma kaya keping darah ditambah senyawa uji, diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, lalu ditambah natrium arakidonat, dan diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pereaksi asam tiobarbiturat dan diinkubasi pada 80°C selama 15 menit. Setelah didinginkan, campuran disentrifugasi pada 4°C , 3000 rpm selama 15 menit, dan supernatan diukur intensitas fluoresensinya menggunakan spektrofлуorometer pada panjang

gelombang eksitasi 534 nm dan emisi 554 nm (Nurrochmad, Supardjan, & Sardjiman, 1998). Cara uji ini menentukan aktivitas inhibisi senyawa uji pada COX-1 dan COX-2 total.

b) Mengukur perubahan kromogen N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamin (TMPD)

Aktivitas siklooksigenase ditentukan dengan mengukur perubahan kromogen N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamin (TMPD) selama reduksi PGG₂ menjadi PGH₂ secara spektrofotometri. Siklooksigenase (COX-1 dan -2) diperoleh dari plasenta biri-biri (*ovine*). Campuran reaksi yang berisi hematin dan fenol dalam dapar Tris-HCl (100 μM, pH 8,1) (sebagai kofaktor), enzim, larutan senyawa uji atau pelarutnya saja (misalnya DMSO), diinkubasi selama 1-10 menit pada suhu 37°C; kemudian ditambahkan larutan segar asam arakidonat dan TMPD dan perubahan warna yang terjadi diukur serapannya pada 590 nm selama 30 detik. Kecepatan reaksi awal (linier selama 1 k. 15 detik) diukur, dan kecepatan oksidasi nonspesifik pada saat enzim tidak ada dikurangkan sebelum perhitungan persentase hambatan. Metode ini tidak dapat diterapkan pada senyawa uji yang mempunyai aktivitas antioksidan. (Colorimetric COX, 2010; Fernandez de Arriba et al., 1999).

c) Menggunakan Darah Manusia Keseluruhan (Whole Human Blood Assay)

Inhibisi COX-2 yang mengkatalisis produksi PGE₂ ditentukan dengan cara sebagai berikut. Sampel-sampel darah manusia segar dari sukarelawan-sukarelawan dikumpulkan dalam tabung-tabung berisi heparin (20 U/ml). Sukarelawan tidak meminum obat AINS selama 14 hari sebelum pengambilan darah. Untuk menentukan aktivitas COX-2, sebanyak 500 μl darah terheparinasi diinkubasi bersama 5 μl larutan senyawa uji dengan berbagai konsentrasi (misalnya, 5 sampai 20 μM) atau pelarut senyawa uji (misalnya DMSO) atau larutan baku pembanding (misalnya, celecoxib 10 μM), dengan ditambahkan atau tidak ditambahkan lipopolisakarida (LPS) (berasal dari E-coli 026:B6) (10 μg/ml) pada suhu 37°C selama 24 jam

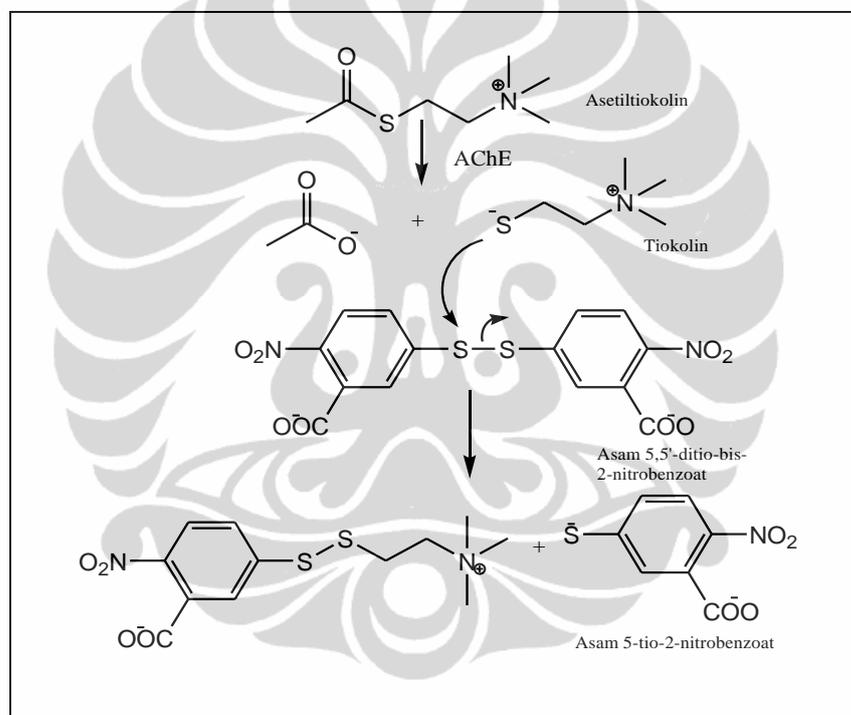
dengan penggojokan yang lembut untuk menginduksi ekspresi COX-2. Reaksi dihentikan dengan merendam tabung-tabung uji dalam air dingin. Plasma dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C, 13000 rpm selama 10 menit. Sampel-sampel disimpan pada suhu -20°C sampai kadar PGE₂ diukur menggunakan kit ELISA spesifik (Fernandez de Arriba et al., 1999; Hassanein, Khalifa, El-Samaloty, El-Rahim, Tha & Ismail, 2008). Cara uji ini menentukan aktivitas penghambatan senyawa uji spesifik pada COX-2.

d) Menggunakan Enzim Imunoesei (*Enzyme Immunoassay*, EIA)

Siklooksigenase (COX) mengkatalisis langkah pertama biosintesis asam arakidonat menjadi PGH₂. Uji skrining inhibitor COX dilakukan secara langsung dengan mengukur PGF_{2α}, dengan cara mereduksi PGH₂ asal COX yang dihasilkan dalam reaksi COX menggunakan stano klorida (SnCl₂). Produk prostanoid ini diukur melalui enzim imunoesei (EIA), menggunakan antiserum yang dapat berikatan dengan kebanyakan senyawa-senyawa PG. Dengan demikian cara ini lebih akurat dan dapat dipercaya dibandingkan pengukuran yang didasarkan inhibisi peroksidase (COX Inhibitor, 2011).

Pengukuran ini didasarkan pada kompetisi antara PG dan konjugat PG-asetilkolinesterase (AChE) (traser-PG) untuk berikatan dengan antiserum-PG yang jumlahnya dibatasi. Karena konsentrasi traser-PG dibuat tetap, sedangkan PG bervariasi, maka jumlah traser-PG yang dapat diikat oleh antiserum-PG adalah berbanding terbalik dengan konsentrasi PG di dalam sumur uji. Kompleks antiserum-PG (baik bebas maupun traser) ini kemudian berikatan dengan “*mouse monoclonal anti-rabbit antibody*” yang sebelumnya telah dimasukkan ke dalam sumur uji. Setelah itu, sumur uji dicuci untuk menghilangkan reagen yang tidak berikatan. Kemudian reagen Ellman’s yang berisi asetiltiokolin (substrat untuk AChE) dan asam 5,5’-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) ditambahkan ke sumur uji. Asetilkolin akan dihidrolisis oleh asetilkolinesterase pada traser-PG yang berikatan pada sumur uji, menghasilkan tiokolin dan asam asetat. Tiokolin kemudian bereaksi dengan 5,5’-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) menghasilkan asam 5-tio-2-nitrobenzoat yang berwarna kuning yang terang, yang menyerap cahaya sinar tampak dengan

kuat pada λ 412 nm ($\epsilon = 13.600$). Intensitas warna (besarnya serapan) diukur secara spektrofotometri. Besarnya serapan ini sebanding dengan jumlah traser-PG yang berikatan pada sumur uji, dan berbanding terbalik dengan jumlah PG yang ada dalam sumur reaksi selama inkubasi. Sehingga semakin besar aktivitas inhibitor COX, semakin kecil PG yang diproduksi, maka semakin banyak traser-PG yang diikat pada sumur uji, dan semakin besar intensitas warnanya (COX Inhibitor, 2011; Rao, Uddin, & Knaus, 2005). Skema reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis AChE dapat dilihat pada Gambar 2.24.



[Sumber : COX Inhibitor, 2011]

Gambar 2.23. Reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis AChE. Telah diolah kembali

Uji skrining inhibitor COX menggunakan kit nomor katalog 560131 dari Cayman Chemical Company (*Cayman's COX Inhibitor Screening Assay Kit, catalog No. 560131*) mencakup baik enzim COX-1 (*ovine*) maupun

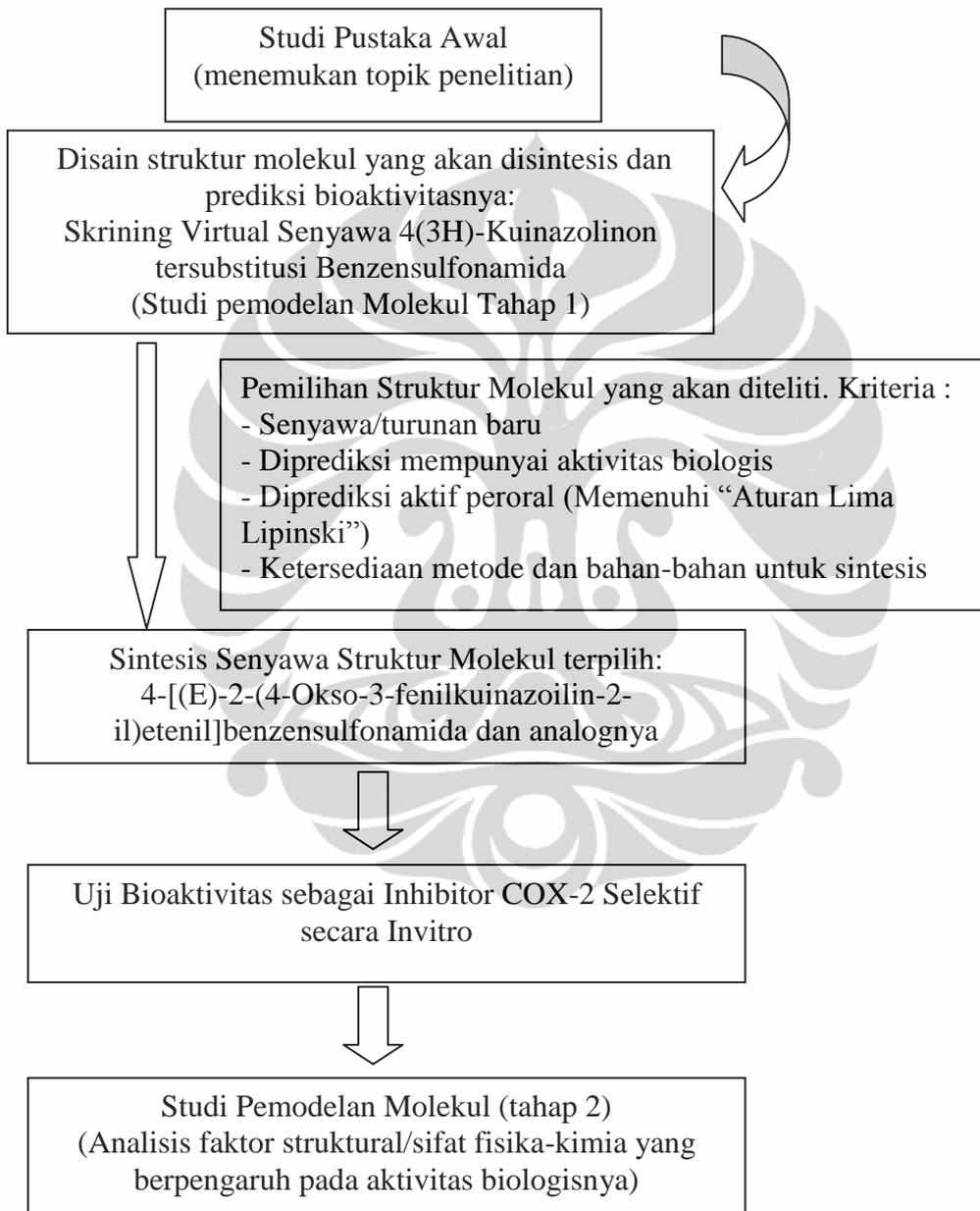
COX-2 (*human recombinant*), sehingga kit uji tersebut dapat digunakan untuk melakukan skrining inhibitor-inhibitor isozim spesifik (COX Inhibitor, 2011).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bagan Penelitian



Gambar 3.1. Bagan penelitian disertasi

3.2. Bahan-bahan dan Peralatan

3.2.1. Bahan-bahan

Bahan untuk pemodelan molekul: struktur kristal COX-2 (PDB ID: 6COX) diunduh dari tautan: <http://pdb.org>.

Bahan-bahan yang digunakan untuk sintesis adalah: asam antranilat pro sintesis (Merck), anhidrida asetat (Ajak Chemicals), anilin (Kanto), p-toluidin (Sigma-Aldrich), p-anisidin (Sigma-Aldrich), p-bromoanilin (Merck), p-kloroanilin (Sigma-Aldrich), ester etil p-aminobenzoat (Merck), asam asetat glasial (Merck), 4-aminobenzensulfonamida (Merck), natrium nitrit (Merck), tembaga (II) sulfat anhidrat (Merck), Kalium Disulfid (Merck), Kalium Sianida (Merck), natrium hidroksida (Merck), asam klorida (Merck), natrium karbonat anhidrat (Malinckrodt), Raney-Nikel (Sigma-Aldrich), asam format (Merck), natrium asetat anhidrat (Merck), heksana (Malinckrodt), sikloheksana (Merck), etilasetat (Merck), etanol 95% (Malinckrodt), kloroform (Merck), karbon aktif (Merck), lempeng KLT (Merck), KBr pro IR (Merck), aquadest, aquabidest.

Bahan-bahan untuk uji aktivitas penghambatan COX: kit uji skrining inhibitor COX (nomor katalog 560131; Cayman Chemical) dan "UltraPure" water (Cayman Chemical), DuP-697 (Cayman Chemical); SC-560 (Cayman Chemical), selekoksib (Pfizer), dan aspirin (Cayman Chemical).

3.2.2. Alat-alat

Alat-alat untuk pemodelan molekul: komputer dilengkapi dengan perangkat lunak penambatan molekul PLANTS, perangkat lunak untuk penyiapan ligan MarvinSketch, dan perangkat lunak untuk visualisasi hasil penambatan dan evaluasi pose penambatan YASARA.

Alat-alat yang digunakan sintesis dan uji aktivitas senyawa uji adalah alat gelas, timbangan analitik dan non analitik, kertas saring, waterbath, termometer, pelat pemanas, pengaduk magnetik, evaporator vakum putar

(IKA Labortechnik), oven vakum (Salvis), bejana KLT mini, UV-cabinet (Camag), alat penentuan titik lebur (Stuart Scientific), spektrofotometer FTIR (8400S, Shimadzu), spektrometer NMR (JEOL JNM 500), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Spektrometri Massa (HPLC-MS) (Hitachi L 6200-Mariner Biospectrometry) dan Spektrometer Massa Resolusi Tinggi (HR-MS) (Waters LCT Premier XE).

Alat-alat untuk uji aktivitas: lemari pendingin -80°C, lemari pendingin -20°C, lemari pendingin 4°C, mikropipet, tabung uji gelas (13 mm x 100 mm), tabung mikro dan plate reader (Biotek).

3.3. Cara kerja

3.3.1. Perancangan dan Pemilihan Senyawa

3.3.1.1. Perancangan senyawa

Struktur molekul 32 senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon tersubsitusi dua cincin benzen pada C-2 dan N-3, digambar dan dipreparasi untuk penambatan molekul menggunakan perangkat lunak Chemaxon's Marvin (<http://www.chemaxon.com>). Cincin benzen tersebut terikat langsung atau dipisahkan oleh satu atom karbon atau nitrogen, atau beberapa atom karbon atau atom karbon dan atom nitrogen. Satu dari dua cincin benzen tersebut mempunyai gugus fungsi sulfonamida. Daftar senyawa-senyawa yang dirancang dan kemudian diskринing secara virtual dapat dilihat pada Tabel 4.1. Sepuluh struktur konformasi (konformer) yang berbeda dari spesies molekul-molekul ligan yang paling banyak (*major species*) pada pH 7,4 disiapkan dan diubah ke dalam format SYBYL mol2.

3.3.1.2. Skrining "Aturan lima Lipinski"

Sifat-sifat molekul ligan yang meliputi: berat molekul, lipofilisitas, jumlah donor ikatan hidrogen dan jumlah akseptor ikatan hidrogen, dihitung menggunakan perangkat lunak Chemaxon's Marvin. Kemudian sifat-sifat

itu dibandingkan ketentuan dalam “Aturan lima Lipinski” (Lipinski, Lombardo, Dominy & Feeney, 1997).

3.3.1.3. *Penyiapan Struktur Protein Target*

Struktur kristal *murine* COX-2 dengan inhibitor SC-558 terikat kompleks (kode PDB: 6COX, <http://www.pdb.org>) dipilih sebagai model protein target dalam studi skrining virtual ini. Kemudian menggunakan perangkat lunak YASARA (Krieger, Koraimann, Vriend, 2002) rantai A dari COX-2 tersebut diekstraksi, dan kedalam rantai A struktur enzim itu ditambahkan atom-atom hidrogen. Setelah itu struktur enzim disiapkan sesuai protokol, dimana sejumlah penghalang secara bertahap dihilangkan, dan kemudian diubah ke dalam format SYBYL mol2.

3.3.1.4. *Penambatan Molekul*

Penambatan protein target dengan ligan dilakukan menggunakan perangkat lunak penambatan PLANTS v1.1 (<http://www.tcd.-uni-konstanz.de/research/plants.php>) dan dilaksanakan sesuai protokol yang disediakan (Korb, Stutzle, & Exner, 2009). Algoritma penambatan PLANTS didasarkan pada kelas algoritma optimisasi stokastik yang diberi nama *ant colony optimization* (ACO) dengan fungsi skoring empirik (PLANTS_{CHEMPLP}). PLANTS akan meng-input 10 konformer untuk setiap ligan dan setiap konformer menghasilkan 10 pose penambatan, sehingga akan diperoleh 100 pose penambatan. Kemudian skor terbaik dari setiap konformer dipilih. Pose penambatan konformer dengan skor tertinggi (skor PLANTS_{CHEMPLP} paling rendah) divisualisasi menggunakan YASARA dan dievaluasi kesesuaian pose penambatan ligan yang diskruining dengan pose penambatan ligan SC-558 (acuan).

Sebelum digunakan untuk melakukan skrining, protokol penambatan divalidasi dengan melakukan penambatan ulang ligan SC-558 ke dalam kantung pengikatannya dalam struktur kristal COX-2. Protokol dinilai baik bila urutan pertama (skor tertinggi) dari 10 konformer ligan SC-558 yang

ditambahkan ulang berorientasi sama dengan ligan acuan dalam loka pengikatannya dengan $RMSD \leq 2.0$.

3.3.1.5. Pemilihan senyawa yang disintesis dan kemudian diuji aktivitasnya

Senyawa yang memenuhi kriteria di bawah ini, dipilih untuk disintesis dan diuji aktivitasnya. Untuk mengetahui pengaruh penambahan gugusan pada senyawa terpilih pada aktivitasnya, maka disintesis dan diuji aktivitasnya lima senyawa analog dari senyawa terpilih tersebut. Kriteria tersebut sebagai berikut:

- Mempunyai sifat fisika-kimia yang memenuhi “Aturan Lima Lipinski”,
- Afinitas pengikatannya pada COX-2 mendekati ligan acuan dengan pose pengikatan dan interaksi pengikatan yang sesuai dengan pose pengikatan ligan SC-558
- Merupakan senyawa baru, dan
- Metode sintesis tersedia, dan bahan pemula, serta reagen lain yang dibutuhkan dapat diperoleh.

3.3.2. Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (2a-f)

Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzen sulfonamida dan lima analognya (Gambar 1.1) terpilih untuk disintesis dan diuji aktivitasnya. Sintesis senyawa ini dilakukan melalui empat tahap. Tahap-tahap sintesis adalah sebagai berikut :

- a) Sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (**5**) dari asam antranilat (**7**)
- b) Sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (**3a-f**) dari senyawa **5** dan anilin/analognya (**6a-f**).
- c) Sintesis 4-sianobenzenensulfonamida (**9**) dari 4-aminobenzenesulfonamida (**10**) dan sintesis 4-formilbenzenesulfonamida (**4**) dari senyawa **9**.
- d) Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzenesulfonamida dan analognya (**2a-f**) dari senyawa **3a-f** dan senyawa **4**.

3.3.2.1. Sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (5).

Senyawa **5** disintesis dengan cara merefluks asam antranilat dalam anhidrida asetat (Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979; Shukla, Singh & Parmar, 1967). Campuran asam antranilat (**7**) (50 mmol; 8,56 g) dan anhidrida asetat (Ac_2O) (200 mmol; 20,4 g; 19 ml), refluks (125 °C) selama 1 jam. Reaksi dilakukan dalam labu leher tiga kering yang dilengkapi dengan kondensor refluks dan tabung pelindung berisi CaCl_2 anhidrat, serta dialiri gas nitrogen. Pemanasan dilakukan menggunakan tangas minyak. Kelebihan asam asetat diuapkan dengan evaporator putar vakum suhu < 65 °C di atas pengangas minyak, dan dinginkan. Massa padat yang diperoleh direkristalisasi dari heksan, dan kristal yang didapat dikeringkan dalam oven vakum suhu < 50 °C lebih kurang 1 jam. Persen (%) hasil dihitung, kristal yang diperoleh diuji kemurniannya secara kromatografi lapisan tipis (KLT) menggunakan fase gerak campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1), ditentukan jarak leburnya, dan diidentifikasi gugus-gugus fungsional yang terbentuk menggunakan FT-IR.

2-Metil-3,1-benzoksazin-4-on bersifat higroskopis dan tidak stabil terhadap kelembaban (Khajavi, Montazari & Hosseini, 1997) oleh karena itu senyawa ini segera digunakan untuk sintesis tahap berikutnya.

3.3.2.2. Sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (3a-f).

Senyawa **3a-f** disintesis mengacu pada cara sintesis senyawa 4(3H)-kuinazolinon yang digunakan oleh Jatav, Mishra, Kashaw, dan Stables (2008); Suthakaran, Kavimani, Venkappayya, Sakina dan Suganthi (2008); Shukla, Singh dan Parmar (1967) dan Elliot, Welch dan Chenard (2001).

Larutan 20 mmol (3,2 g) 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (**5**) dan 20 mol anilin atau analognya (anilin p-tersubstitusi) (**6a-f**) dalam 15 ml asam asetat glacial direfluks pada suhu 125 °C di atas tangas minyak selama 5-7 jam. Kemudian didinginkan, isi labu reaksi dituang ke dalam beaker berisi butiran es, diaduk-aduk sehingga terbentuk suspensi kasar dan disaring padatan yang diperoleh dengan corong *Buchner*, serta dicuci dengan air dingin. Produk dikeringkan di dalam oven vakum 100 °C, dan direkristalisasi

dari etanol atau pelarut lain yang sesuai. 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, 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.

3.3.2.3. Sintesis 4-formilbenzensulfonamida (4)

Dilakukan melalui dua tahap: 1) sintesis 4-sianobenzensulfonamida (9) dari 4-aminobenzensulfonamida (10), dan 2) sintesis 4-formilbenzensulfonamida (4) dari senyawa 9.

1) Sintesis 4-sianobenzensulfonamida dari 4-aminobenzensulfonamida.

Sintesis senyawa 9 dilakukan berdasarkan prinsip reaksi Sandmeyer, mengacu pada cara sintesis *p*-toluonitril. Senyawa aminobenzen didiazotasi dan larutan diazonium direaksikan dengan tembaga (I) sianida dalam larutan kalium sianida (Hickinbottom, 1957). Garam diazonium dari senyawa 10 disintesis mengacu pada cara sintesis garam diazonium dari senyawa turunan aminobenzen yang tidak larut dalam asam. (Cheronis, 1942).

Larutan 4-aminobenzensulfonamida (10) (40 mmol, 6,9 g) dalam 60 ml NaOH 1M dicampur dengan larutan natrium nitrit (NaNO₂) (44 mmol, 3,06 g) dalam 15 ml aquadest, dan didinginkan diatas air es (Larutan A). Larutan asam klorida pekat dalam air (1:3) sebanyak 80 ml disiapkan dalam gelas beaker 500 ml, didinginkan diatas penangas es-garam dapur hingga suhu < 0°C, dan diletakkan diatas pengaduk magnetik. Kemudian larutan A ditambahkan sedikit demi sedikit (0,5-1 ml per penambahan) dalam waktu 2,5-3 jam ke dalam larutan asam klorida 3 M dengan pengadukan hati-hati. Suhu reaksi dipertahankan tetap pada 0°C (±2°C) dan dibiarkan sekitar 15 menit untuk menyempurnakan reaksi. Kemudian larutan garam diazonium klorida yang dihasilkan secara hati-hati dinetralkan dengan larutan 20%

natrium karbonat anhidrat (lebih kurang diperlukan 30 ml), pH diamati dengan indikator universal, dan suhu larutan reaksi dipertahankan $< 3^{\circ}\text{C}$.

Kalium sianida (KCN) 9,7 g dilarutkan dalam 24 ml aquadest, ditambahkan ke dalam beaker 500 ml berisi 4,05 g tembaga (I) sianida [Cu(I)CN], diaduk hingga larut, dan didinginkan diatas penangas es-garam dapur hingga suhu $< 0^{\circ}\text{C}$. Kemudian larutan diazonium netral ini sedikit demi sedikit dan hati-hati ditambahkan ke dalam larutan Cu(I)CN/KCN. Reaksi dilakukan dalam lemari asam dan dipertahankan suhu reaksi tetap pada 0°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Setelah penambahan larutan diazonium selesai, larutan reaksi dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah itu suhu dinaikkan secara bertahap (l.k. $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) hingga suhu 50°C . Busa segera hilang, dan larutan reaksi segera didinginkan diatas penangas es selama l.k 1 jam sehingga terbentuk endapan berwarna jingga tua. Endapan disaring dengan corong Buchner, dicuci dengan air dingin dan dikeringkan dalam oven vakum 75°C selama 1 jam dan ditimbang. Kristal kasar kemudian direkristalisasi dari air panas (80°C), dan dikeringkan kristal yang diperoleh dalam oven vakum 75°C selama 1 jam, dihitung persen (%) hasil yang diperoleh, kemurniannya diuji secara KLT menggunakan fase gerak campuran etilasetat dan sikloheksana (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 DMSO-d₆ dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.

Catatan : Cu(I)CN diperoleh dengan mereaksikan tembaga (II) sulfat anhidrat, natrium disulfid dan kalium sianida (Furniss, *et al.*, 1989). Cara dan hasil sintesis diuraikan dalam **lampiran 1** .

2) Sintesis 4-formilbenzensulfonamida dari 4-sianobenzensulfonamida.

Sintesis senyawa **4** dilakukan mengacu cara yang dilaporkan oleh Es dan Staskun, 1988, dengan sedikit modifikasi pada penyaring yang digunakan, yaitu penyaring “Hyflo Supercel” diganti *sinterglass* no. 4.

Campuran 4-sianobenzensulfonamida (**9**) (30 mmol, 5,46 g), asam formiat (HCOOH) 75% (82 ml) dan serbuk Raney Nikel (5,46 g) direfluks selama 1 jam sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik, diatas tangas minyak suhu 115°C. Setelah itu, campuran reaksi didinginkan, dan disaring menggunakan *sinterglass* no. 4, dicuci dengan etanol 95% dua kali 20 ml, dan filtrat yang diperoleh dicampurkan. Pelarut diuapkan menggunakan evaporator putar vakum hingga habis, residu dilarutkan dalam air mendidih 55 ml, partikel tak larut dipisahkan dengan penyaringan menggunakan *glasswool*, dan filtrat didinginkan di atas air es sambil dikocok kuat hingga diperoleh kristal. Kristal disaring dengan corong *Buchner*, dicuci dengan sedikit air dingin, dikeringkan dalam oven vakum 50°C dan ditimbang

Produk kasar kemudian dimurnikan dengan cara berikut: produk dilarutkan dalam 90 ml etanol 95% panas, ditambahkan 1,9 g serbuk arang aktif, diaduk dan didiamkan selama 1 jam dengan sesekali dikocok. Setelah itu, larutan ini disaring menggunakan *sinterglass* no. 4, dicuci dengan etanol 95% dua kali 6 ml, dan diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator putar vakum. Kemudian, residu yang diperoleh dilarutkan dalam 27,5 ml air mendidih, disaring melalui melalui *glasswool*, dan filtrat didinginkan dalam air es sambil dikocok kuat hingga terbentuk kristal. Kristal yang diperoleh disaring menggunakan corong *Buchner*, dicuci dengan sedikit air dingin dan dikeringkan dalam oven vakum 50°C. Kemudian persen (%) hasil yang diperoleh dihitung, kemurniannya diuji secara KLT menggunakan fase gerak campuran etilasetat dan sikloheksana (1:1), 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 DMSO-d₆ dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal.

3.3.2.4. Sintesis 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan analognya (2a-f)

Sintesis senyawa **2af** dilakukan dengan mengacu pada cara sintesis 2-[(E)-stiril]kuinazolin-4-on. Senyawa stiril ini disintesis dengan mengkondensasi 2-metil-4(3H)-kuinazolinon dengan benzaldehid (Varma, Bahadur & Agnilhotri, 1981; Connolly, Cusack, O'Sullivan, Guiry, 2005).

Campuran 4 mmol 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon atau analognya (**3a-f**), 4,4 mmol (0,8 g) 4-formilbenzensulfonamida (**4**), 1 gram natrium asetat anhidrat dan 6 mL asam asetat glasial dalam labu leher tiga 10 ml, dipanaskan diatas penangas minyak hingga larut dan direfluks pada suhu 100°C. Proses reaksi diamati melalui metoda KLT. Setelah reaksi selesai atau tidak ada kemajuan reaksi lagi, reaksi dihentikan, dan campuran reaksi dituang ke dalam air dingin, diaduk-aduk sambil dihangatkan hingga membentuk suspensi kasar, disaring dengan corong Buchner selagi masih hangat dan dicuci dengan air dingin. Produk kasar yang diperoleh dikeringkan dalam oven vakum 80°C dan dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. Kristal yang diperoleh dikeringkan dalam oven vakum suhu 80°C, dihitung persen (%) hasil yang diperoleh, diuji kemurnian dengan metoda KLT menggunakan fase gerak yang sesuai, ditentukan jarak leburnya (hasil tidak dikoreksi), dan diidentifikasi dengan menggunakan FT-IR, UV-Vis., ¹H-NMR, ¹³C-NMR, LC-MS dan HR-MS. Untuk mengetahui jumlah hasil reaksi (%), produk kasar dianalisis secara KLT-densitometri.

Spektra FT-IR direkam dalam KBr. Spektra UV-Vis direkam dalam pelarut asetonitril. Spektra NMR direkam dalam pelarut DMSO-d₆ dengan tetrametilsilan (TMS) sebagai acuan internal. Spektra massa ditentukan dua kali. Pertama, menggunakan LC-MS yang dilengkapi *interface* spektrometer massa q-TOF, sumber ionisasi elektropray ion positif (ESI+), mode sken dari m/z 100-1200, suhu 140°C, kolom Supelco (5µ C18, 250 x 2 mm i.d.), fase gerak campuran asetonitril-air (95:5) dengan kecepatan alir 1 ml/menit (isokratik, temperatur ruangan). Kedua, menggunakan spektrometer massa resolusi tinggi (HR-MS) menggunakan metode ESI-TOF, ionisasi ion positif.

3.3.3. Uji aktivitas inhibisi pada enzim siklooksigenase (COX) -1 dan -2.

Kemampuan senyawa **2a-f** menginhibisi aktivitas COX-1 dan COX-2 dalam mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin H₂ (PGH₂), diuji dengan menggunakan kit uji skrining inhibitor COX (kit nomor katalog 560131, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Pengujian dilaksanakan mengikuti instruksi kerja dari pembuat kit tersebut. Reagen-reagen yang digunakan dapat dilihat pada **lampiran 2**. Kit distandarisasi dulu dengan senyawa inhibitor spesifik DuP-697 dan SC-560, masing-masing untuk COX-2 dan COX-1 (COX Inhibitor, 2011).

Prinsip reaksi adalah sebagai berikut:



Reaksi terkatalisis COX segera dihentikan dengan penambahan HCl 1M. PGH₂ yang terbentuk kemudian direduksi menjadi PGF_{2α} dengan penambahan SnCl₂. Prostaglandin yang dihasilkan dianalisis kadarnya dengan metode enzim immunoesai (EIA).

Konsentrasi akhir asam arakidonat (substrat) pada percobaan ini adalah 100 μM. Larutan uji (inhibitor) dibuat dengan melarutkan zat uji dalam DMSO. Pengujian inhibisi pada COX-1 diawali dengan konsentrasi akhir 100 μM, sedangkan inhibisi pada COX-2 diawali dengan konsentrasi akhir 10 μM. Konsentrasi yang lain diatur sedemikian rupa dengan mempertimbangkan % inhibisi senyawa uji pada konsentrasi tersebut. Konsentrasi selekoksib dan aspirin (senyawa pembanding) untuk COX-1: 100, 50, 10 dan 1 μM (selekoksib); 10, 1, 0,1 dan 0,01 μM (aspirin). Sedangkan konsentrasi selekoksib dan aspirin untuk COX-2: 1, 0,1, 0,01 dan 0,001 μM (selekoksib); 10, 1, 0,1, 0,01 μM (aspirin). Konsentrasi ini merujuk pada nilai IC₅₀ kedua senyawa tersebut (Zargi, Rao, & Knaus ,2007; Rao, Uddin & Knaus, 2004).

3.3.3.1 Pereaksian COX

Peraksian COX dilakukan dalam tabung uji pada suhu 37°C. Penambahan reagen-reagen dalam pereaksian COX adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Penambahan reagen-reagen pereaksian COX

Reagen	Penambahan Volume (µl) pada tiap Tabung		
	<i>Background</i> (BC)	Aktivitas inisial 100% (IA 100%)	Inhibitor
Dapar reaksi	970	950	950
Hem	10	10	10
Enzim COX-1/COX-2	10 (inaktif)	10 (aktif)	10 (aktif)
Larutan inibitor	-	-	20
Pelarut inhibitor	-	20	-
Dipusarkan (<i>vortex</i>) dan diinkubasi selama 10 menit			
Asam arakodonat	10	10	10
Dipusarkan (<i>vortex</i>) dan diinkubasi selama 2 menit			
HCl 1M	50	50	10
Tabung-tabung uji diangkat dari penangas air			
SnCl ₂ jenuh	100	100	100
Dipusarkan (<i>vortex</i>) dan diinkubasi selama 5 menit			
Selanjutnya kadar PG ditentukan secara EIA			

Keterangan:

Dapar reaksi yang mengandung Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 5 mM EDTA dan 2 mM fenol.

3.3.3.1 Pelaksanaan EIA

Sebelum pengukuran konsentrasi PG dilakukan, larutan standar PG S1-S8 (konsentrasi 2000 s/d 15,6 pg/ml) disiapkan dengan cara pengenceran bertingkat dari PG standar terliofiliasi (konsentrasi 10 ng/ml). Selain itu,

larutan-larutan hasil reaksi COX, disentrifugasi, dan supernatan diencerkan dengan dapar EIA.. Sampel BC diencerkan 100 kali, sedangkan untuk sampel IA 100% dan sampel-sampel inhibitor diencerkan 2000 dan 4000 atau 8000 dan 16000 kali, disesuaikan dengan konsentrasi PG yang terbentuk.

Pengukuran dilakukan dalam lempeng berisi 96 sumur uji yang telah berisi antibodi monoklonal (IgG). Setiap lempeng berisi dua sumur blangko (Blk), dua sumur pengikatan non spesifik (NSB), dua sumur pengikatan maksimum (B_0), satu sumur Aktivitas Total (TA), 16 sumur larutan baku (Std) prostaglandin [delapan konsentrasi (S1-S8) masing-masing dua sumur], tiga sumur sampel *background* (BC), tiga sumur sampel aktivitas inisial 100% (IA100%) untuk tiap pengenceran, dan sumur-sumur sampel inhibitor (tiga sumur untuk tiap pengenceran). Penambahan reagen-reagen pada tiap sumur adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2. Penambahan reagen-reagen EIA

Sumur Uji	Volume (μ l)			
	Dapar EIA	Std/Sampel	Traser-PG	Antiserum-PG
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 ^{*)}	-
NSB	100	-	50	-
B_0	50	-	50	50
Std/Sampel	-	50	50	50

Keterangan:

Std = larutan standar PG (S1-S8)

Sampel = Enceran larutan hasil reaksi (BC/IA 100%/Inhibitor)

^{*)} ditambahkan pada saat pengembangan, setelah ditambahkan pereaksi Elman.

Setelah penambahan reagen-reagen EIA, lempeng ditutup dengan plastik penutup lempeng dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu kamar di atas *shaker orbital*. Kompleks antiserum-PG - traser-PG dan antiserum-PG - PGs akan berikatan dengan IgG yang terdapat pada sumur uji. Lempeng

sumur uji kemudian dicuci lima kali dengan dapar cuci untuk menghilangkan semua reagen yang tidak berikatan dengan IgG dan kemudian ditambahkan reagen Elman's [berisi asetiltiokolin dan 5,5'-ditio-bis-(asam 2-nitrobenzoat)], dilakukan pengadukan menggunakan orbital shaker dalam ruang gelap suhu 37°C (dalam plate reader). Kemudian, serapan (intensitas warna) sumur uji diukur menggunakan spektrofotometri (plate reader) pada λ 414 nm setiap 15 menit, sampai diperoleh serapan sumur B₀ terkoresksi 0,3-1.0 A.U. (umumnya 60 menit).

Konsentrasi PG yang terdapat pada sumur-sumur IA 100%, BC dan inhibitor menggunakan kurva standar PG yang diperoleh, dan kemudian dihitung persen (%) inhibisi setiap senyawa uji terhadap aktivitas COX.

3.3.4. Studi Pemodelan Molekul

Studi pemodelan molekul ini merupakan studi penambatan molekul tahap 2. Molekul ligan yang ditambahkan adalah molekul senyawa yang telah disintesis dan diuji aktivitasnya sebagai inhibitor COX-2 selektif. Tujuan studi ini adalah untuk mengetahui hubungan antara aktivitas dengan besarnya afinitas pengikatan, dan faktor-faktor struktural dan atau sifat-sifat fisika kimia yang diperkirakan mempengaruhi aktivitasnya tersebut.

Penambatan molekul dilakukan menggunakan perangkat lunak PLANTS v1.1. Cara kerja studi ini mengikuti cara kerja penambatan molekul untuk skrining virtual pada butir 3.3.1.1 sampai dengan butir 3.3.1.4.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Perancangan dan Pemilihan Senyawa

Tiga puluh dua senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon tersubsitusi sulfonamida yang didisain dan diskriming secara virtual sebagai inhibitor COX-2 dapat dilihat pada Tabel 4.1. Senyawa-senyawa tersebut mempunyai berat molekul antara 377,08 sampai 448,12, log P hitungan (ClogP) antara 2,33-3,62, jumlah donor ikatan hidrogen 1 atau 2 dan jumlah akseptor ikatan hidrogen antara 4-6 (Tabel 4.2). Nilai sifat-sifat fisika-kimia 32 senyawa (ligan) tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai-nilai pada “Aturan lima Lipinski” sehingga diprediksi dapat aktif per oral. Aturan ini memprediksi bahwa senyawa yang memenuhi kriteria di bawah ini, jika diberikan per oral kemungkinan besar absorpsi atau permeasinya akan buruk sehingga diprediksi tidak dapat aktif peroral (Lipinski, Lombardo, Dominy & Feeney, 1997):

- e) Berat molekul lebih dari 500 Da
- f) Lipofilisitasnya (LogP) lebih dari 5.
- g) Terdapat lebih dari 5 donor ikatan hidrogen (misalnya NH dan OH)
- h) Terdapat lebih dari 10 akseptor ikatan hidrogen (misalnya –O- dan –N-).

Nilai skor interaksi protein-ligan yang diperoleh selama penambatan (skor total PLANTS_{CHEMPLP}) dan pose penambatan yang diperoleh dari visualisasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Secara umum, skor yang diperoleh antara -61,491 to -101,373, kecuali senyawa **VS-7c** (-13,576). Sebagai perbandingan, skor PLANTS_{CHEMPLP} yang diperoleh SC-558 (ligan acuan) dan selekoksib masing-masing adalah -75,3077 dan -67,7373. Semua ligan dapat tertambat ke dalam kantung pengikatan. Hal ini menunjukkan bahwa semua ligan dapat berikatan dengan COX-2. Namun, hanya 16 dari ligan-ligan itu (50,0%) yang tertambat dengan pose yang sesuai dengan pose penambatan SC-558.

Tabel 4.1. Struktur kimia turunan 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon tersubstitusi gugus sulfonamida yang diskринing secara *virtual* sebagai inhibitor siklooksigenase-2 (COX-2).

Struktur Kimia	Kode senyawa	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	VS-1a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-1b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-1c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS1d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-2a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-2b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-2c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-2d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-3a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-3b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-3c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-3d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-4a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-4b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-4c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-4d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-5a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-5b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-5c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-5d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-6a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-6b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-6c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-6d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-7a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-7b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-7c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-7d	H	H	H	SO ₂ NH ₂
	VS-8a	SO ₂ NH ₂	H	H	H
	VS-8b	H	SO ₂ NH ₂	H	H
	VS-8c	H	H	SO ₂ NH ₂	H
	VS-8d	H	H	H	SO ₂ NH ₂

Tabel 4.2. Sifat fisika-kimia dan hasil-hasil penambatan molekul senyawa 2,3-disubstitusi-4(3H)-kuinazolinon yang mempunyai gugus benzen-sulfonamida, SC-558 dan selekoksib.

Kode Senyawa	Sifat-sifat Fisika-kimia				Skor ²⁾	Pose ³⁾
	BM	H-D	H-A	ClogP ¹⁾		
VS-1a	377.08	1	4	3.12	-77.3232	✖
VS-1b					-70.9226	✖
VS-1c					-76.0898	✓
VS1d					-78.676	✓
VS-2a	391.10	1	4	3.18	-89.2743	✖
VS-2b					-91.1331	✖
VS-2c					-92.1175	✓
VS-2d					-79.6776	✓
VS-3a	392.09	1	6	3.34	-88.5913	✖
VS-3b					-88.9771	✖
VS-3c					-93.7915	✓
VS-3d					-88.0979	✓
VS-4a	420.09	2	5	2.50	-74.8437	✓
VS-4b					-84.7734	✖
VS-4c					-93.9921	✓
VS-4d					-91.5505	✓
VS-5a	434.10	2	5	2.37	-74.6049	✓
VS-5b					-89.4398	✖
VS-5c					-100.349	✖
VS-5d					-93.5586	✓
VS-6a	448.12	2	5	2.33	-74.4486	✖
VS-6b					-87.6545	✖
VS-6c					-88.9119	✓
VS-6d					-100.129	✓
VS-7a	403.10	1	4	3.62	-85.8609	✖
VS-7b					-80.3884	✖
VS-7c					-13.5760	✖
VS-7d					-61.491	✓
VS-8a	405.11	1	4	3.54	-101.373	✖
VS-8b					-91.1976	✓
VS-8c					-90.4981	✖
VS-8d					-79.3338	✓
SC-558	446.24	1	7	4.16	-75.3077	
Selekoksib	381.37	1	6	3.83	-67.7373	✓

¹⁾Log P Hitungan, dihitung menggunakan perangkat lunak Chemaxon's Marvin. (<http://www.chemaxon.com>).

²⁾Total skor PLANTS_{CHEMPLP} (Korb, O., Stutzle, T., & Exner, T.E. (2009)

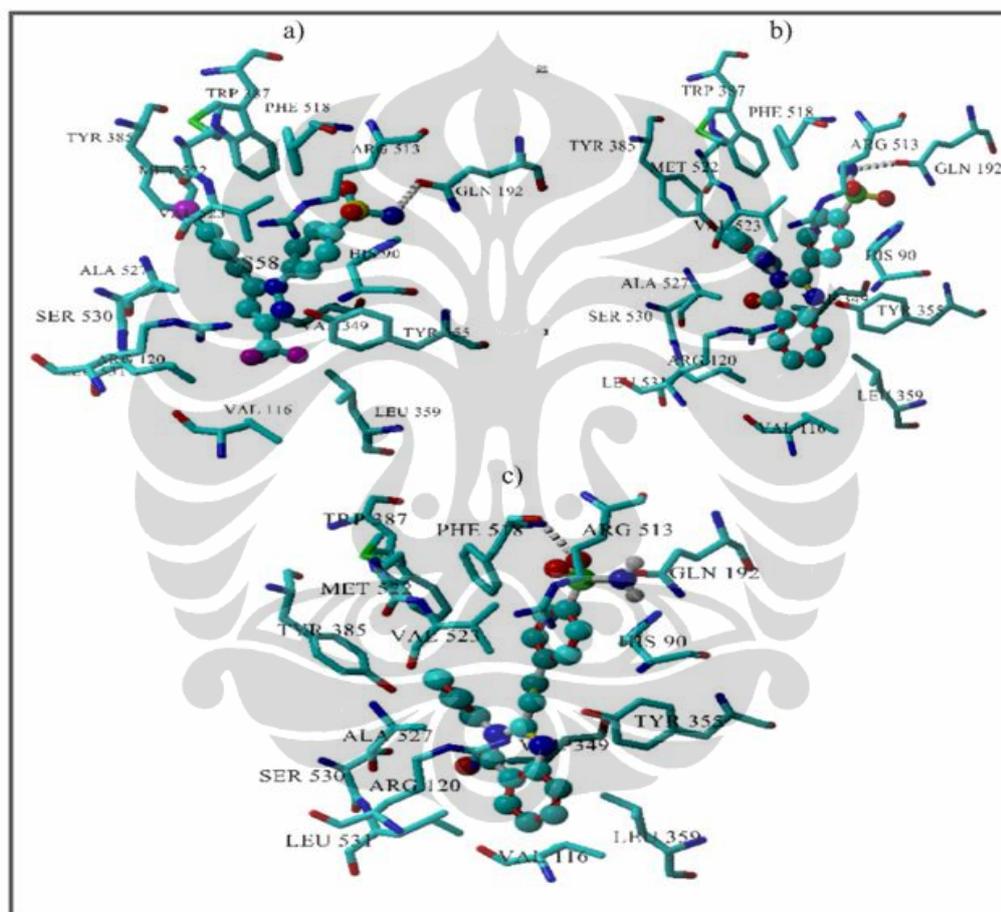
³⁾Dibandingkan dengan pose penambatan ligan acuan, SC-558; ✓ = sesuai; ✖ = tidak sesuai.

Aktivitas inhibisi SC-558 (Gambar 1.1) pada aktivitas COX-2 1.900 kali lipat dibandingkan pada COX-1. Senyawa ini mempunyai cincin sentral pirazol dan satu gugus sulfonamida yang terikat pada salah satu cincin arilnya (Kurumbail, *et al.*, 1996). Struktur kristal COX-2 yang mengikat SC-558 (S-58 pada YASARA) memperlihatkan bahwa cincin bromofenil dari SC-558 terikat pada ruang hidrofobik yang terbentuk oleh residu Phe381, Tyr385, Trp387, Phe518, Met522, Val523, Ala527 dan Ser530. Gugus trifluorometil dari cincin pirazol berikatan dengan kantung yang dibentuk oleh Met113, Val116, Arg120, Val349, Tyr355, Leu359 dan Leu531. Gugus benzensulfonamida masuk ke dalam ruang yang relatif polar dan berinteraksi dengan His90, Gln192, Leu352 dan Ser353. Satu atom H dari SO₂NH₂ membentuk interaksi ikatan hidrogen dengan oksigen karbonil (OE1) dari Gln192 (jarak \approx 2,1 Å). Atom H yang kedua dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,48 Å dari nitrogen (NE2) dari His90. Jarak antara atom O dari SO₂NH₂ dan gugus NH dari Phe518 adalah sekitar 2,76 Å. Atom O yang kedua dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,15 Å dari gugus NH₂ (gugus guanidin) dari Arg513 (Gambar 4.1.(a)). Interaksi ini sejalan dengan hasil studi yang telah dipublikasi oleh Rowlinsons dan kawan-kawan (2003).

Berdasarkan data pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa semua senyawa turunan 4(3H)-kuinazolinon tersubsitusi gugus *p*-benzensulfonamida pada C-2 and cincin fenil pada N-3, yang terikat langsung maupun tidak langsung pada sistem cincin, berinteraksi dengan enzim COX-2 dengan orientasi pengikatan sesuai dengan SC-558. Sementara itu, senyawa yang mempunyai gugus *m*-benzensulfonamida pada C-2 (62.5%); senyawa yang mempunyai gugus *p*-benzensulfonamida pada N-3 (25.0%); dan senyawa yang mempunyai gugus *m*-benzenesulfonamide pada N-3 (12.5%). Pose penambatan senyawa **VS-3d** dan **VS-7d** dapat dilihat pada gambar 4.1.(b) dan 4.1.(c).

Molekul senyawa **VS-3d** dan **VS-7d** menduduki semua dari tiga kantung COX-2 dan berinteraksi dengan pose pengikatan yang sesuai dengan pose pengikatan SC-558. Gugus fenilamino pada N-3 dan gugus *p*-benzensulfonamida pada C-2 dari cincin kuinazolin-4-on dari senyawa **VS-**

3d, dan cincin fenil tidak tersubstitusi pada N-3 dan gugus *p*-[(*E*)-2-etenil]benzensulfonamida pada C-2 dari cincin kuinazolin-4-on senyawa **VS-7d** masing-masing mempunyai orientasi pengikatan yang sesuai dengan orientasi pengikatan gugus *p*-bromfenil dan gugus *p*-benzensulfonamida dari SC-558. Sedangkan cincin A dari kuinazolin-4-on mempunyai orientasi pengikatan yang sesuai dengan orientasi pengikatan gugus trifluorometil dari cincin pirazol dari SC-558.



Gambar 4.1. Orientasi pose penambatan (a) SC-558, (b) senyawa **VS-3d** dan (c) senyawa **VS-7d** (ball & stick) pada sisi aktif dari COX-2. Semua atom hidrogen dihilangkan agar lebih jelas (Hayun, Yanuar, Hanafi dan Hudiyono, 2011).

Residu-residu asam amino yang berinteraksi dengan gugus SO_2NH_2 dari senyawa **VS-3d** and **VS-7d** hampir sama dengan residu-residu yang berinteraksi dengan SO_2NH_2 dari SC-558. Salah satunya adalah Arg513. Ini

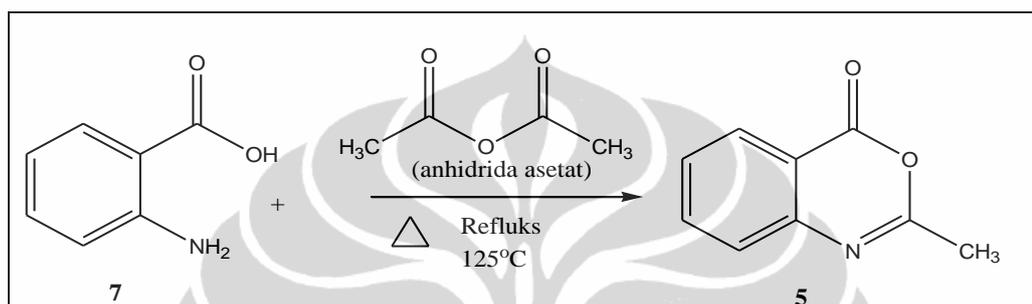
sejalan dengan yang ditemukan oleh Yuniarti dan kawan-kawan (2011). Senyawa **VS-3d** membentuk interaksi ikatan hidrogen antara atom H dari SO₂NH₂ dengan oksigen karbonil (OE1) dari Gln192 (jarak \approx 2,37 Å). Atom H kedua dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,31 Å dari oksigen karbonil dari Phe518. Jarak antara atom O dari gugus SO₂NH₂ dan gugus NH (HE2) dari Gln192 sekitar 3,37 Å. Atom O kedua dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,39 Å dari NH₂ (gugus guanidin) dari Arg513. Senyawa **VS-7d** membentuk interaksi ikatan hidrogen antara atom O dari SO₂NH₂ dengan gugus NH dari Phe518 (jarak \approx 1,53 Å). Atom O kedua dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,61 Å dari gugus NH dari Arg513. Jarak antara atom H dari gugus SO₂NH₂ dan nitrogen (NE2) dari His90 adalah sekitar 2,64 Å. Atom H lainnya dari SO₂NH₂ terletak sekitar 3,71 Å dari oksigen karbonil dari Arg513. Jarak antara atom O dari cincin kuinazolin-4-on (senyawa **VS-3d** dan **VS-7d**) dan gugus OH dari Ser530 masing-masing sekitar 5,27 and 5,12 Å. Interaksi antara ligan dengan Ser530 adalah penting untuk inhibisi COX-2 oleh beberapa senyawa disamping aspirin (Rowlinsons, et al., 2003).

Berdasarkan studi penambatan molekul ini dapat disimpulkan bahwa turunan 2,3-disubstitusi-4(3H)-kuinazolinone yang mempunyai gugus *p*-benzensulfonamida pada C-2 dan cincin fenil pada N-3 mempunyai afinitas yang sepadan atau lebih tinggi dari afinitas pengikatan SC-558 dan menunjukkan orientasi yang sama dengan pose penambatan ligan SC-558. Dengan demikian senyawa-senyawa tersebut patut dipertimbangkan untuk dioptimisasi untuk menemukan inhibitor siklooksigenase-2 baru.

Dalam penelitian disertasi ini dipilih 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida dan lima analognya [senyawa **VS-7d** pada Tabel 4.1. (senyawa **2a-f**, Gambar 1.1)] untuk disintesis dan diuji aktivitasnya. Pemilihan tersebut berdasarkan pertimbangan bahwa senyawa ini memenuhi aspek kebaruan, metode sintesinya tersedia dan bahan pemula serta reagen lain yang dibutuhkan untuk sintesisnya lebih mudah diperoleh.

4.2 Sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (5).

Asam antranilat (7) dalam anhidrida asetat berlebih suhu refluks mengalami siklodehidrasi menghasilkan 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on yang dikenal dengan nama *trivial* asetilantranil (5) (Gambar 4.2). Penggunaan anhidrida asetat berlebih dan pengaliran gas nitrogen dimaksudkan untuk mengatasi kelembaban udara dalam proses reaksi.



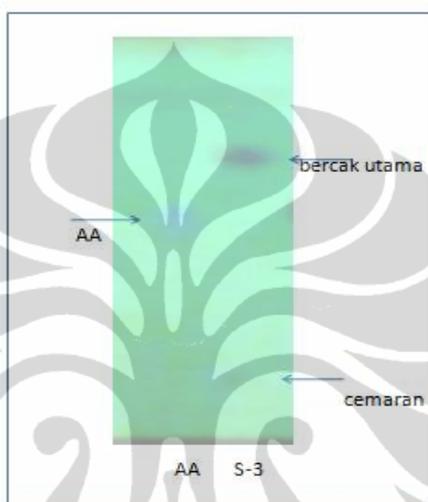
[Sumber : Shukla, Singh & Parmar, 1967; Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979]

Gambar 4.2. Skema reaksi sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (asetil-antranil) (5)

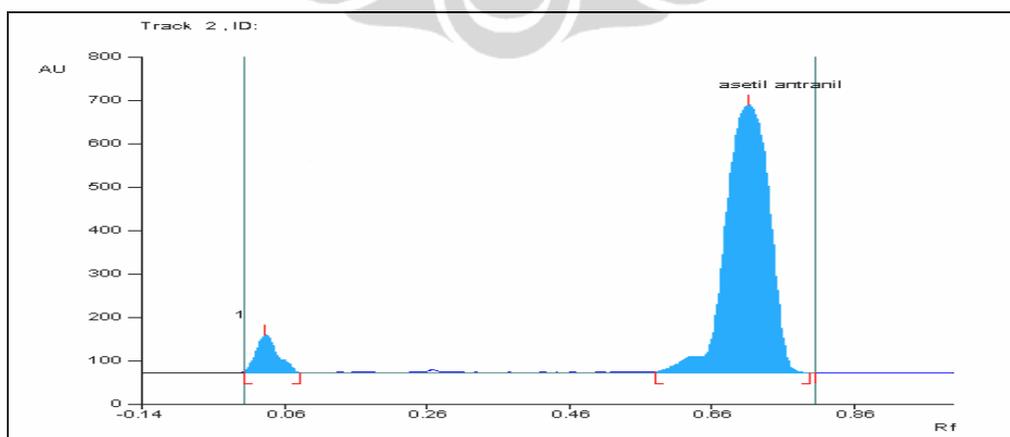
Senyawa 5 hasil sintesis dan kristalisasi dengan heksana berupa kristal putih sebanyak 86,1 % dihitung dari jumlah mol asam antranilat yang digunakan. Kromatogram KLT senyawa 5 terdapat dua bercak, yaitu bercak dengan $R_f = 0,71$ (bercak utama, densitas 93,4 %) dan $R_f = 0,03$ (bercak cecaman, densitas 6,6%). R_f kedua bercak tersebut berbeda dengan bercak asam antranilat ($R_f = 0,56$) (Gambar 4.3 dan 4.4). Data ini menunjukkan bahwa senyawa produk sintesis telah terbentuk, namun belum murni. Spektra UV-Vis bercak senyawa 5 dapat dilihat pada Gambar 4.5. Jarak lebur senyawa 5 = 68-70°C (tidak dikoreksi). Jarak lebur asetilantranil dalam literatur = 78-80°C dan 80-81°C (Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979; Khajavi, Montazari & Hosseini, 1997).

Spektrum FT-IR (dalam KBr) senyawa 5 menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang: 1753 cm^{-1} menunjukkan adanya C=O lakton, 3073 cm^{-1} (C-H aromatik), 2933 cm^{-1} (C-H alifatik), dan 1645 cm^{-1} (C=N)

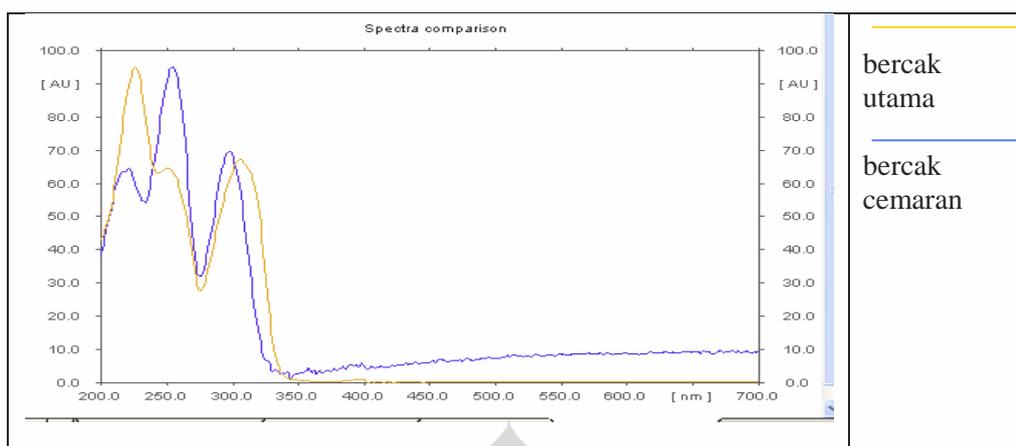
(Gambar 4.6). Gugus-gugus fungsi tersebut sama dengan yang terdapat pada 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on (Khajavi, Montazari & Hosseini, 1997). Gugus OH karboksilat dan NH₂ yang terdapat pada senyawa asal (asam antranilat) tidak terdapat lagi (Gambar 4.7). Hal ini menunjukkan bahwa siklodehidrasi asam antranilat telah terjadi dan menghasilkan senyawa aril-lakton tersubstitusi alkil.



Gambar 4.3. Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa **5** (S-3), diamati di bawah sinar UV 256 nm, menunjukkan masih terdapat cemaran. Bercak utama R_f = 0,71 dan bercak cemaran R_f = 0,03. AA = asam antranilat, R_f = 0,56. Fase gerak : campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1).



Gambar 4.4. Kurva densitas kromatogram KLT senyawa **5** (S-3). Fase gerak : campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1), detektor UV 254 nm.



Gambar 4.5. Spektra serapan UV-Vis bercak senyawa **5**.

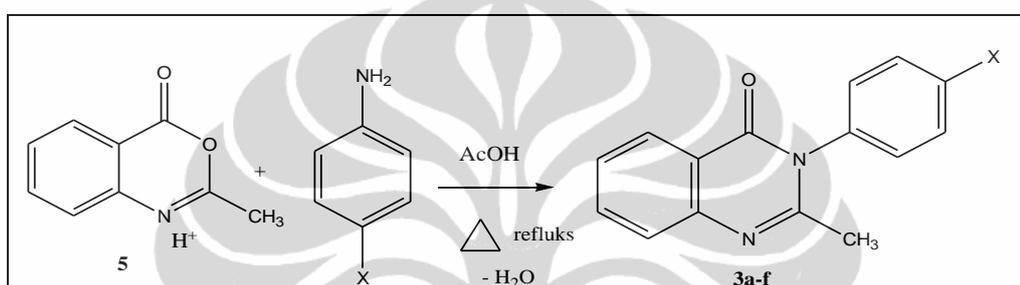
Kemurnian senyawa mengalami penurunan dalam penyimpanan meskipun telah dilakukan upaya-upaya untuk mengatasi terjadinya hidrolisis, seperti penggantian udara dalam vial tempat penyimpanan dengan nitrogen, dan penyimpanan vial tersebut di dalam desikator vakum. Hasil KLT senyawa **5** (S-3) yang telah disimpan, menghasilkan bercak cemaran yang lebih besar (bandingkan bercak S-3 pada Gambar 4.3 dengan pada Gambar 4.9). Hal tersebut sesuai dengan sifat semi asam anhidrida dari asetilantranil. Asetilantranil mengalami beberapa reaksi seperti asam anhidrida sebenarnya, seperti sensitif terhadap kelembaban dan higroskopis, tetapi dengan kecepatan lebih lambat (Khajavi, Montazari & Hosseini, 1997; Erede, McBrady, & Tiers, 1980). Mengingat penelitian mengenai sintesis dan karakterisasi asetilantranil sudah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya, dan kesulitan untuk memperoleh produk murni, maka analisis spektrokopi lainnya untuk identifikasi struktur tidak dilakukan.

Senyawa ini bereaksi dengan senyawa amina aromatik dalam pelarut polar, seperti asam asetat, pada suhu refluks, menghasilkan senyawa 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon (Erede & McBrady, 1977). Jatav, Mishra, Kashaw dan Stables (2008) dan Shukla, Singh dan Parmar (1967) melakukan sintesis turunan 4(3H)-kuinazolinon dari asetilantranil hasil siklodehidrasi asam antranilat dengan anhidrida asetat tanpa diisolasi terlebih dahulu. Pada penelitian ini, produk reaksi siklodehidrasi asam antranilat dengan anhidrida

asetat direkristalisasi dengan heksana. Kristal yang diperoleh, langsung digunakan untuk sintesis senyawa 4(3H)-kuinazolinon.

4.3 Sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (3a-f)

2-Metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (**3a-f**) disintesis dengan merefluks ekimolar 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on dan anilin atau turunannya dalam pelarut asam asetat glasial (Gambar 4.8). Kondisi dan hasil sintesis senyawa **3a-f** dalam asam asetat glasial dapat dilihat pada Tabel 4.3.



[Sumber : Erede & McBrady, 1977, Shukla, Singh & Parmar, 1967; Eid, Eid, Aboul-Enein, El-difrawy, Bibers & El-Hawary, 1979]

Gambar 4.8. Skema reaksi sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (**3a-f**).

Semua senyawa **3a-f** menghasilkan bercak tunggal pada uji KLT (Gambar 4.9) dan jarak lebur yang sempit (1°C) (Tabel 4.3). R_f senyawa **3a-f** berbeda dengan R_f 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on maupun anilin atau analognya yang digunakan sebagai senyawa asal. Hasil ini mengindikasikan bahwa senyawa produk sintesis telah terbentuk dan senyawa tersebut telah diperoleh murni.

Struktur molekul senyawa **3a-f** dikonfirmasi menggunakan spektra FT-IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Khusus untuk senyawa **3a** dikonfirmasi juga dengan spektra NMR-2D (HMQC dan HMBC).

Tabel 4.3. Kondisi dan Hasil Sintesis Senyawa **3a-f** dalam Pelarut Asam Asetat Glasial dan Suhu Refluks 125 °C

Senyawa	Lama Refluks (jam)	Bentuk	Hasil (%) ^{a)}	Jarak Lebur (°C) ^{b)}	Rf (KLT) ^{c)}
3a	6	Kristal putih	70,6	143-144	0,59
3b	6	Kristal putih	70,9	146-147	0,65
3c	5	Kristal putih	76,5	165-166	0,53
3d	7	Kristal putih	63,3	172-173	0,69
3e	7	Kristal putih	48,1	152-153	0,65
3f	7	Kristal putih-krem	40,1	168-169	0,63

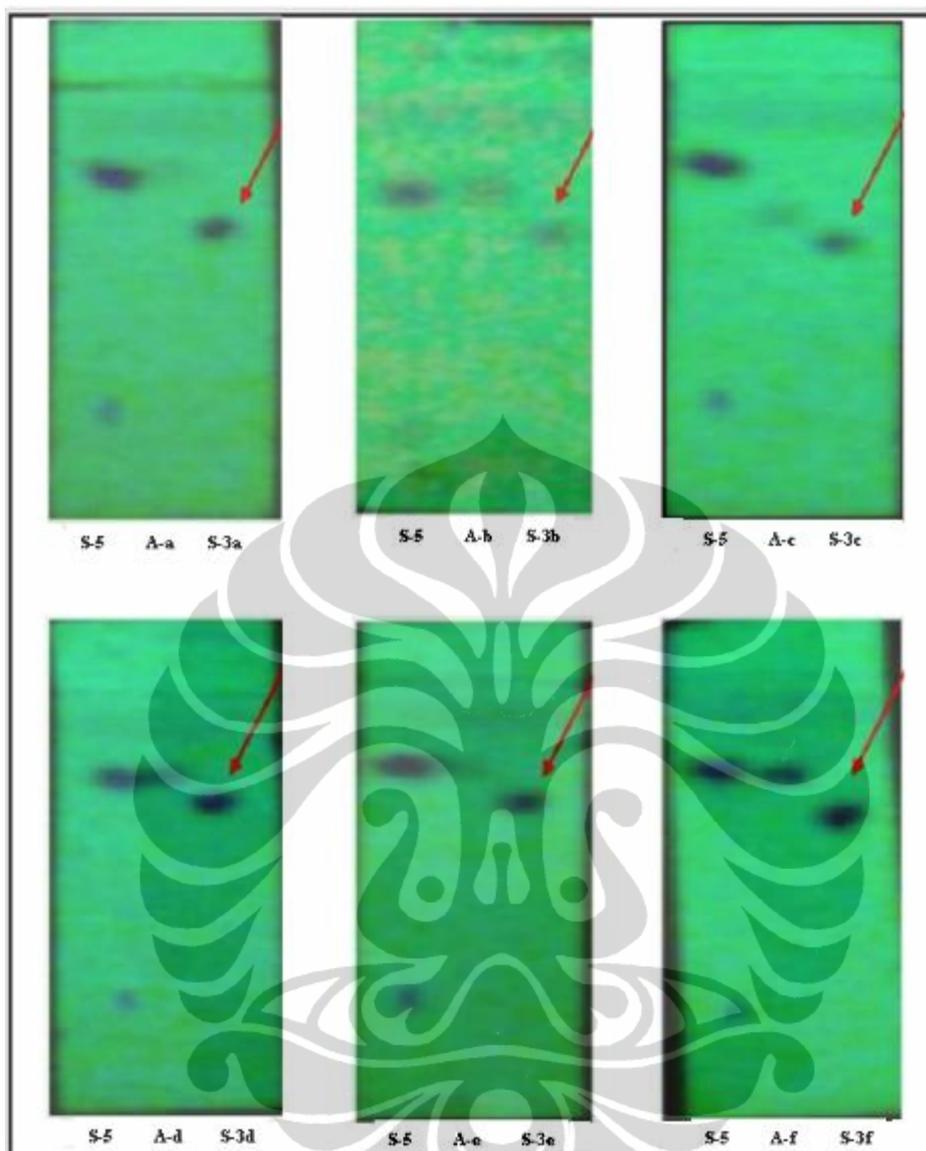
Keterangan:

^{a)} produk murni, dihitung dari jumlah mol senyawa **5** (hasil sintesis baru \approx 93%) yang digunakan.

^{b)} tidak dikoreksi.

^{c)} Fase gerak : Campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1).

Spektra FT-IR senyawa **3a-f** dapat dilihat pada Gambar 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 dan 4.15, sedangkan data spektra tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.4. Spektra FT-IR senyawa **3a-f** menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang 1680-1686 cm^{-1} , menunjukkan adanya C=O laktam, 3024-3093 cm^{-1} (C-H aromatik), 2924-2995 cm^{-1} (C-H alifatik), 1603-1609 cm^{-1} (C=N). Gugus lakton (1753 cm^{-1}) dari 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on tidak terdapat lagi. Pada spektra FT-IR senyawa-senyawa analognya teridentifikasi gugus fungsi yang spesifik untuk analog yang bersangkutan. Pada senyawa **3c**: puncak pada 1273 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi C-O-C aril alkil eter, pada senyawa **3d**: 694 cm^{-1} (C-Br), pada senyawa **3e**: 696 cm^{-1} (C-Cl) dan pada senyawa **3f** : 1709 cm^{-1} (C=O ester).



Gambar 4.9. Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa **3a-f**, (S-5a-f) menghasilkan bercak tunggal (tanda panah), diamati di bawah sinar UV 254 nm. Nilai-nilai Rf dapat dilihat pada Tabel 4.3. S-5 = senyawa **5** (2-metil-3,1-benzoksazin-4-on). A-a = anilin, A-b, A-c, A-d, A-e dan A-f = anilin tersubstitusi p-CH₃, p-OCH₃, p-Br, p-Cl dan p-COOC₂H₅. Fase gerak : campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1).

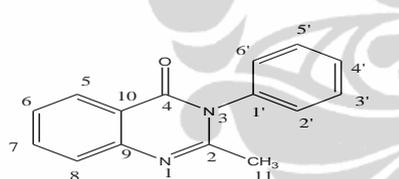
Tabel 4.4. Data spektra FT-IR senyawa **3a-f** dalam KBr

Senyawa	$\bar{\nu}$ (Cm ⁻¹)	Gugusfungsi/ikatan
3a	3082	C-H Ar
	2931	C-H Al
	1682	C=O laktam
	1609	C=N
3b	3047	C-H Ar
	2922	C-H Al
	1686	C=O laktam
	1608	C=N
3c	3064-3084	C-H Ar
	2995	C-H Al
	2835	OC-H
	1680	C=O laktam
	1609	C=N
	1273	C-O-C aril alkil eter
3d	3024-3078	C-H Ar
	2928-2972	C-H Al
	1682	C=O laktam
	1603	C=N
	694	C-Br
3e	3093	C-H Ar
	2924-2983	C-H Al
	1688	C=O laktam
	1605	C=N
	696	C-Cl
3f	3072-3101	C-H Ar
	2939-2984	C-H Al
	1709	C=O ester
	1697	C=O laktam
	1605	C=N

Spektra ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa **3a** dapat dilihat pada Gambar 4.16 dan 4.17, sedangkan data spektra tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.5. dan 4.6. Pada spektra ¹H-NMR senyawa **3a** terdapat puncak pada sekitar δ 2,25 (s, 3H) menunjukkan adanya gugus metil (C-11); δ 7,68 ppm (d, $J=7,8$ Hz, 1H) dan 8,27 ppm (d, $J=7,8$ Hz, 1H) menunjukkan masing-masing terdapat 1 proton aromatik yang bertetangga dengan 1 proton aromatik lainnya. Kedua proton tersebut bertetangga dengan gugus fungsi

yang bersifat elektronegatif. Gugus fungsi yang bertetangga dengan proton pada δ 8,27 ppm lebih bersifat elektronegatif dibandingkan gugus fungsi yang bertetangga dengan proton pada δ 7,68 ppm (H pada C-5 dan C-8). Puncak pada δ 7,47 ppm (t, $J=7,1$ Hz, 1H) dan 7,77 ppm (t, $J=8,1$ Hz, 1H) menunjukkan masing-masing terdapat 1 proton aromatik yang bertetangga dengan 2 proton aromatik lainnya (H pada C-6 dan C-7). Puncak pada δ 7,27 ppm (d, $J=7,8$ Hz, 2H). Data ini menunjukkan bahwa pada senyawa-senyawa itu terdapat 2 proton yang setiap proton bertetangga dengan 1 proton aromatik lainnya (1 H pada C-2' dan C-6'). Puncak proton pada δ 7,56 ppm (t, $J=7,1$ Hz, 2H) menunjukkan adanya 2 proton aromatik yang setiap proton bertetangga dengan 2 proton aromatik lainnya (1H pada C-3' dan C-5'). Puncak pada δ 7,51 ppm (t, $J=6,5$ Hz, 1H) menunjukkan adanya 1 proton aromatik yang bertetangga dengan 2 proton aromatik lainnya (H pada C-4').

Tabel 4.5. Data spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3a** dalam CDCl_3 .

Struktur senyawa 3a ¹⁾	δ (ppm), m, J (Hz)	No. ²⁾
 <p style="text-align: center;">$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$</p>	8,27, d, $J=7,8$	5
	7,47, t, $J=7,8$	6
	7,77, t, $J=7,8$	7
	7,68, d, $J=7,8$	8
	2,25, s, 3H	11
	7,27, d, $J=7,1$, 2H	2', 6'
	7,56, t, $J=7,1$, 2H	3', 5'
	7,51, t, $J=7,1$	4'

Keterangan:

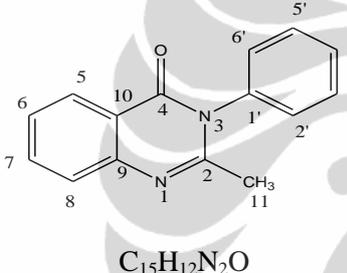
1) Struktur molekul yang diharapkan

2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan

Pada spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **3a** terdapat puncak pada δ 162,47 ppm yang menunjukkan pada senyawa tersebut terdapat amida (C-4), δ 154,39 ppm yang menunjukkan adanya karbon ($\text{C}=\text{N}$)-N (C-2), δ 24,6 ppm (karbon metil C-11) dan puncak-puncak pada δ 120,99-147,69 ppm (karbon aromatik). Puncak pada δ 128,22 ppm dan 130,19 ppm mempunyai intensitas

yang lebih tinggi dibandingkan puncak lainnya. Atom C yang letaknya simetris pada spektra akan muncul pada δ (ppm) yang sama, namun dengan intensitas yang lebih tinggi meskipun kurang kuantitatif (Silverstein, et al., 2005). Dengan demikian kedua puncak itu diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C, sehingga jumlah atom C senyawa **3a** adalah 15.

Tabel 4.6. Data spektra ^{13}C -NMR senyawa **3a** dalam CDCl_3 .

Struktur senyawa 3a ¹⁾	δ (ppm)	Keterangan	Nomor ²⁾
 <p>$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$</p>	162,47	(C=O)-N	4
	154,39	(C=N ⁻)-N	2
	147,69	C Aromatik	
	137,97		
	134,77		
	130,19		
	129,47		
	128,22		
	127,24		
	126,97		
	126,83		
	120,99		
	24,58	CH_3	11

Keterangan:

- 1) Struktur molekul yang diharapkan
- 2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan

Korelasi proton-karbon dan karbon-karbon lainnya pada struktur senyawa **3a** diperoleh dengan melakukan interpretasi terhadap spektra HMQC dan HMBC. Spektra HMQC senyawa **3a** dan spektra ekspansinya dapat dilihat pada Gambar 4.18a-4.18d, sedangkan spektra HMBC senyawa **3a** dan spektra ekspansinya dapat dilihat pada dan 4.19a-4.19e. Pada spektra HMQC senyawa **3a**, proton doublet pada 8,27 ppm berkorelasi dengan karbon pada 127,26 ppm dan proton triplet pada 7,77 ppm berkorelasi dengan karbon pada 134,77 ppm. Korelasi proton dengan karbon pada senyawa **3a** selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7. Pada spektra HMBC, proton singlet pada 2,25 ppm berkorelasi dengan karbon pada 154,39 ppm,

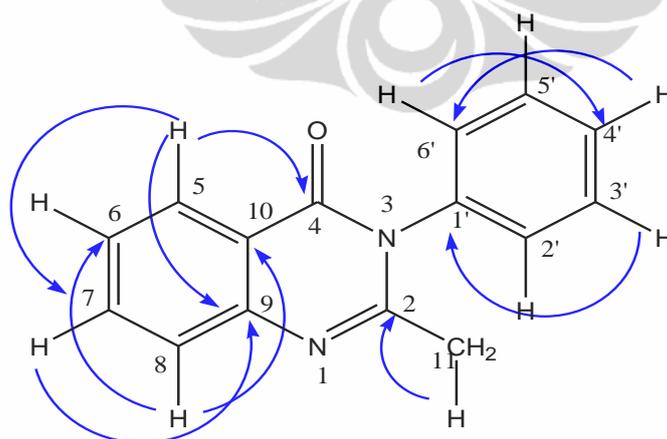
sedangkan proton doublet pada 8,27 ppm berkorelasi dengan karbon pada 162,27 ppm, 134,77 ppm dan 147,69 ppm. Korelasi proton-karbon 2-3 ikatan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7. Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa **3a** dapat dilihat pada Gambar 4.20.

Tabel 4.7. Korelasi proton dengan karbon hasil analisis spektra HMQC (Gambar 4.18a-4.18d) dan Korelasi proton dengan karbon 2-3 ikatan hasil analisis spektra HMBC (Gambar 4.19a-4.19e) senyawa **3a**

Korelasi proton-karbon (HMQC), δ (ppm)			Karbon-karbon yang berkorelasi 2-3 ikatan dengan H (HMBC), δ (ppm) (nomor) ²⁾		
No. ¹⁾	¹ H	¹³ C			
5	8,27, d, $J=7,8$	127,26	162,27	134,77 (7)	147,69 (9)
7	7,77, t, $J=7,8$	134,77	147,69 (9)	127,26 (5)	
8	7,68, d, $J=7,8$	126,83	126,97 (6)	120,99 (10)	
6	7,47, t, $J=7,8$	126,97	126,83 (8)	120,99 (10)	
3' dan 5'	7,56, t, $J=7,1$	130,19	138,97 (1')		
2' dan 6'	7,27, d, $J=7,8$	128,27	129,47 (4')		
4'	7,51, t, $J=6,5$	129,47	128,27 (2', 6')		
11	2,25, s, 3H	24,58	154,39 (2)		

Keterangan:

- 1) Struktur molekul yang diharapkan
- 2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan



Gambar 4.20. Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa **3a**.

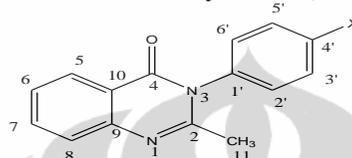
Berdasarkan data hasil interpretasi spektra IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC dan HMBC di atas, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa **3a** sesuai dengan yang diharapkan.

Spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, dan **3f** berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, dan 4.25. Sedangkan spektra $^{13}\text{C-NMR}$ -nya berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30. Data dari spektra-spektra tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.8. Penempatan pergeseran kimia karbon-karbon aromatik senyawa **3b-f** dilakukan berdasarkan pemikiran dengan mengacu pada korelasi proton-karbon dan karbon-karbon senyawa **3a** yang ditentukan berdasarkan analisis HMQC dan HMBC.

Puncak proton pada C-5, C-6, C-7, C-8 dan C-11 senyawa **3a-f** mempunyai geseran kimia yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa proton tersebut terdapat pada lingkungan kimia yang sama. Sedangkan puncak proton pada C-2'/6' dan C-3'/5' pada senyawa **3a-f** berbeda antara satu dengan yang lain. Hal ini disebabkan senyawa **3a-f** mempunyai perbedaan gugus fungsi yang terdapat pada posisi *para* dari cincin fenilnya.

Puncak proton pada δ 7,51 ppm (1H, t, $J = 6,5$) pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3a** menunjukkan bahwa pada posisi *para* cincin fenil terdapat H (senyawa tidak tersubstitusi). Pada senyawa **3b-f** puncak ini tidak ada lagi. Hal ini menunjukkan bahwa pada posisi *para* cincin fenil senyawa **3b-f** terdapat gugus fungsi. Pada senyawa **3b** terdapat puncak pada δ 2,46 ppm (s, 3H) yang menunjukkan adanya gugus metil terikat inti fenil; pada senyawa **3c** terdapat puncak pada δ 3,88 ppm (s, 3H) yang menunjukkan adanya gugus metil yang berikatan dengan atom O; pada senyawa **3f** terdapat puncak pada δ 4,43 ppm (q, $J=7,1$, 2H) yang menunjukkan adanya CH_2 yang berikatan dengan atom O dan bertetangga dengan CH_3 ; dan puncak pada δ 1,43 ppm (t, $J=7,15$, 3H) yang menunjukkan adanya gugus metil yang bertetangga dengan gugus CH_2 .

Tabel 4.8. Data Spektra $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dalam CDCl_3 senyawa **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** dan **3f**.



No. ¹⁾	Senyawa, δ (ppm), m, J (Hz)											
	3a (X=H)		3b (X=CH ₃)		3c (X=OCH ₃)		3d (X=Br)		3e (X=Cl)		3f [X=(C=O)OC ₂ H ₅]	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	154,39	-	154,68	-	154,96	-	153,78	-	153,87	-	153,53
4	-	162,47	-	162,58	-	162,74	-	163,31	-	162,37	-	162,25
5	8,27, d, $J=7,8$	127,24	8,27, d, $J=7,5$	127,28	8,27, d, $J=7,1$	127,30	8,27, d, $J=7,8$	127,27	8,27, d, $J=8,4$	127,23	8,27, d, $J=7,8$	127,24
6	7,47, t, $J=7,8$	126,97	7,46, t, $J=7,5$	126,93	7,46, t, $J=7,1$	126,94	7,48, t, $J=7,8$	127,08	7,48, t, $J=8,4$	127,07	7,48, t, $J=7,8$	127,10
7	7,77, t, $J=7,8$	134,77	7,76, t, $J=7,5$	134,70	7,76, t, $J=7,1$	134,72	7,78, t, $J=7,8$	134,97	7,77, t, $J=8,4$	134,95	7,78, t, $J=7,8$	134,99
8	7,68, d, $J=7,8$	126,83	7,67, d, $J=7,5$	126,74	7,67, d, $J=7,1$	126,75	7,68, d, $J=7,8$	127,03	7,68, d, $J=8,4$	127,01	7,69, d, $J=7,8$	127,05
9	-	147,69	-	147,70	-	147,68	-	147,59	-	147,59	-	147,62
10	-	120,99	-	121,01	-	120,99	-	123,67	-	120,82	-	120,82
11	2,25, s, 3H	24,58	2,25, s, 3H	24,58	2,26, s, 3H	24,62	2,25, s, 3H	24,57	2,25, s, 3H	24,56	2,24, s, 3H	24,51
1'		137,97	-	139,52	-	130,47	-	136,95	-	136,41	-	141,88
2', 6'	7,27, d, $J=7,8$	128,22	7,35, d, $J=8,4$	127,87	7,17, d, $J=9,1$	129,19	7,70, d, $J=8,4$	130,00	7,54, d, $J=8,4$	129,68	7,36, d, $J=8,4$	128,51
3', 5'	7,56, t, $J=7,8$	130,19	7,14, d, $J=8,4$	130,84	7,05, d, $J=9,1$	115,40	7,16, d, $J=8,4$	133,49	7,25, d, $J=8,4$	130,48	8,24, d, $J=8,4$	131,51
4'	7,51, t, $J=6,5$	129,47	-	135,29	-	160,15	-	120,81	-	135,61	-	131,72
X	-	-	2,46, s, 3H	21,44	3,88, s, 3H	55,76	-	-	-	-	-	165,72
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,43, q, $J=7,1$	61,63
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,43, t, $J=7,1$	14,50

Keterangan: ¹⁾ Penomoran mengacu pada struktur molekul senyawa

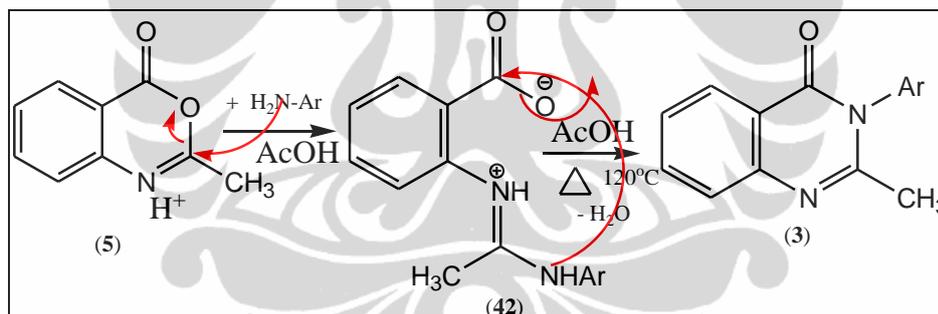
Pada spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** dan **3f** masing-masing terdapat 13, 14, 14, 13, 13, dan 16 puncak karbon (Tabel 4.8). Pada senyawa **3a**, puncak pada δ 128,22 ppm dan 130,19 ppm mempunyai intensitas yang lebih tinggi dibandingkan puncak lainnya. Atom C yang letaknya simetris pada spektra ^{13}C -NMR ^1H dekopling akan muncul pada δ (ppm) yang sama, namun dengan intensitas yang lebih tinggi meskipun kurang kuantitatif (Silverstein, et al., 2005). Dengan demikian kedua puncak itu diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C dan jumlah atom C senyawa **3a** adalah 15. Puncak pada δ 128,22 dan 130,19 ppm menunjukkan atom karbon aromatik (C-2' dan C-6', serta C-3' dan C-5'). Pada senyawa **3b**, **3c**, **3d**, **3e** dan **3f**, puncak yang mempunyai intensitas lebih tinggi masing-masing terdapat pada δ 127,87 dan 130,84 ppm; 129,19 dan 115,40 ppm; 130,00 dan 133,49 ppm; 129,68 dan 130,48 ppm; dan 128,51 dan 131,51 ppm. Dengan demikian jumlah atom C pada senyawa **3b**, **3c**, **3d**, **3e** dan **3f** berturut-turut adalah 16, 16, 15, 15, dan 18.

Pada senyawa **3a-f** terdapat puncak pada sekitar δ (ppm) yang satu dengan yang lain hampir sama yaitu pada sekitar δ 162 ppm yang menunjukkan pada senyawa tersebut terdapat amida (karbon C-4), pada sekitar δ 154 ppm yang menunjukkan adanya karbon ($\text{C}=\text{N}$)-N (karbon C-2), pada sekitar δ 147,6 ppm (karbon C-9 aromatik), 127 ppm (karbon C-10 aromatik), pada sekitar δ 127 ppm, 128 ppm, 133 ppm dan 121 ppm (karbon C-5, C-6, C-7, C-8 aromatik), pada δ 24,6 ppm (karbon metil C-11) dan pada δ 135-140 (karbon aromatik berikatan dengan N-(C=O)-, C-1'). Selain itu terdapat puncak yang pada senyawa **3a** dan analognya muncul pada δ (ppm) yang berbeda. Pada senyawa **3a** terdapat puncak pada δ 129,47 ppm (karbon C-4'), pada senyawa **3b** terdapat puncak pada δ 135,29 ppm (karbon C-4' aromatik) dan 21,44 ppm (karbon metil terikat pada fenil, C-7'), pada senyawa **3c** terdapat puncak pada δ 160,15 ppm (karbon aromatik berikatan dengan O, C-4') dan 55,76 ppm (karbon metil berikatan dengan O), pada senyawa **3d** terdapat puncak pada δ 120,81 ppm (karbon C-4' aromatik berikatan dengan Br), pada senyawa **3e** terdapat puncak pada δ 135,61 ppm (karbon C-4' berikatan dengan Cl) dan pada senyawa **3f** terdapat puncak pada

δ 131,72 ppm (karbon C-4' aromatik berikatan dengan ester), 165,72 ppm (karbon C=O ester, C-7'), 61,63 ppm (karbon berikatan dengan O, C-8') dan 14,50 ppm (atom karbon metil terikat pada alkil, C-9')

Berdasarkan data dan pembahasan spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang diuraikan di atas, disimpulkan bahwa senyawa **3a-f** adalah 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya sebagaimana yang diharapkan yaitu tersubstitusi pada posisi *para* pada cincin N-3 fenil dengan gugus metil (**3b**), metoksi (**3c**), brom (**3d**), klor (**3e**) dan ester etil [$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{C}=\text{O})$] (**3f**).

Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada Gambar 4.31. Asetilantranil (**5**) dengan senyawa anilin ($\text{NH}_2\text{-Ar}$) menghasilkan senyawa antara asetamidin yang sesuai (**42**), yang kemudian dapat dengan mudah diubah menjadi senyawa 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon (**3**) dengan cara pemanasan pada suhu lebih kurang $120\text{-}130^\circ\text{C}$ (Errede, 1980).



[Sumber : Errede, 1980]

Gambar 4.31. Mekanisme reaksi pembentukan 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon (**3**)

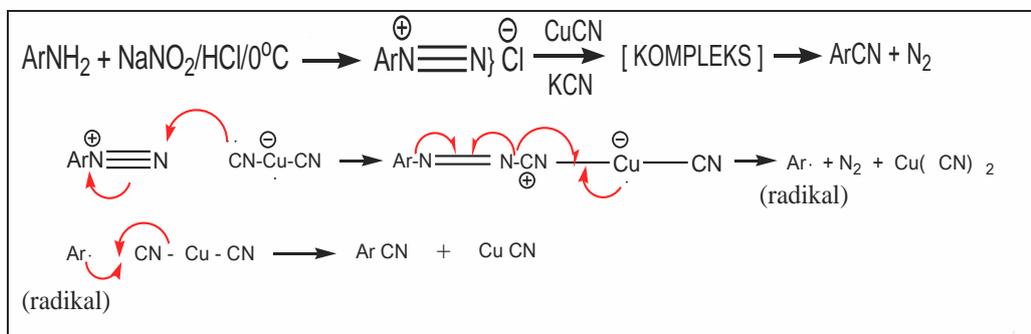
Hasil pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa reaksi antara 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dengan anilin tersubstitusi metil atau metoksi pada posisi *para* memberikan hasil yang lebih besar dibandingkan dengan anilin. Hasil sebaliknya diperoleh dari anilin tersubstitusi gugus klor, brom dan etilkarboksilat (COOC_2H_5). Gugus metil dan metoksi bersifat pendorong elektron dan hal ini menyebabkan reaktivitas nukleofilik gugus amina lebih besar. Sedangkan gugus brom dan klor bersifat penarik elektron dan hal ini

menyebabkan reaktivitas nukleofilik gugus amina menurun. Gugus COOC_2H_5 menyebabkan densitas elektron gugus amina anilin menjadi lebih besar, namun tidak menghasilkan produk yang lebih besar. Hal ini kemungkinan disebabkan gugus ester tersebut sebagian terhidrolisis.

4.4 Sintesis 4-formilbenzensulfonamida (4)

Sintesis 4-formilbenzensulfonamida (4) dilakukan dengan mereduksi 4-siano-benzensulfonamida (9) dengan Raney-nikel dalam asam formiat 75% pada suhu refluks (Es dan Staskun, 1988). Cara ini dipilih setelah melakukan sintesis dengan cara: a) oksidasi *p*-toluensulfonamida dengan kromium (VI) oksida dalam anhidrida asetat dengan mengaplikasikan cara sintesis *p*-nitrobenzaldehida dari *p*-nitrotoluen (Furniss et al., 1989) tidak diperoleh sama sekali senyawa 4, dan b) oksidasi *p*-bromometilbenzensulfonamida dengan heksamina (penerapan metode Sommelet) dengan mengaplikasikan cara sintesis 2-naftaldehida (Furniss, et al., 1989) diperoleh senyawa aldehida (berdasarkan uji identifikasi aril aldehida dan spektrum FT-IR), diperoleh jumlah hasil yang sangat kecil.

Senyawa 9 yang digunakan dalam sintesis senyawa 4 dengan metode Es dan Staskun, 1988, tidak tersedia di pasaran. Oleh karena itu, senyawa 9 disintesis terlebih dahulu dengan mengacu pada prinsip reaksi *Sandmeyer*, yaitu penggantian gugus amina aromatik menjadi nitril melalui pembentukan garam diazonium. Mekanisme reaksi penggantian tersebut tidak diketahui dengan pasti, tetapi dipercaya berlangsung sebagai berikut :



[Sumber : Furniss, et al., 1989]

Gambar 4.32. Mekanisme pembentukan senyawa arilnitril.

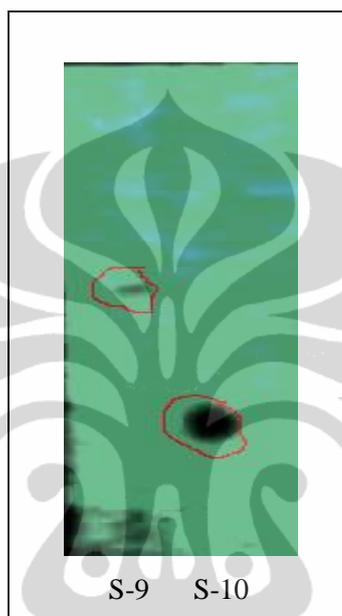
Arilnitril terbentuk apabila kompleks diazonium-tembaga (I) sianida terurai oleh mekanisme radikal. Tembaga mengkatalisis peruraian tersebut karena dapat mengalami interkonversi antara bilangan oksidasi +1 dan +2 sebagai hasil dari transfer elektron (Furniss, *et al.*, 1989).

Garam diazonium merupakan senyawa tidak stabil dan pada pembentuk-kannya memerlukan asam nitrit yang mudah menguap, sehingga suhu larutan reaksi harus suhu dingin ($< 5^{\circ}\text{C}$). Hal ini mengakibatkan reaksi berlangsung lambat, oleh karena itu penambahan senyawa-senyawa yang direaksikan harus sedikit-demi sedikit.

Keberhasilan mengontrol suhu dan laju reaksi menentukan keberhasilan pembentukan garam diazonium klorida. 4-Aminobenzensulfonamida tidak larut dalam asam klorida, tetapi mudah larut dalam natrium hidroksida. Oleh karena itu pada sintesis garam diazonium benzensulfonamida, 4-aminobenzensulfonamida dan natrium nitrit dilarutkan dalam natrium hidroksida dan ditambahkan ke dalam asam klorida dingin sedikit demi sedikit. Bila penambahan larutan campuran natrium nitrit dan 4-aminobenzensulfonamida ke dalam asam klorida terlalu cepat, 4-aminobenzensulfonamida banyak yang akan mengendap yang mengakibatkan garam diazonium klorida yang terbentuk sedikit. Bila suhu dinaikkan, asam nitrit akan menguap dan garam diazonium klorida yang terbentuk akan terhidrolisis membentuk senyawa fenol (Furniss, *et al.*, 1989).

Pada reaksi penggantian gugus diazonium dengan gugus sianida (CN), garam diazonium yang akan ditambahkan ke dalam larutan Cu(I)CN/KCN dinetralkan lebih dahulu dengan larutan natrium karbonat. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari terbentuknya gas sianogen (HCN) yang sangat beracun (Furniss, *et al.* 1989). Penetralkan garam diazonium harus dilakukan sangat hati-hati karena diazonium dalam alkali lebih cepat terhidrolisis. Penambahan diazonium netral ke dalam larutan Cu(I)CN/KCN harus dilakukan sedikit demi sedikit dan pada suhu $< 5^{\circ}\text{C}$. Pada sintesis *p*-toluonitril (Furniss, *et al.*, 1989), penambahan diazonium netral dilakukan pada suhu $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$. Penerapan cara ini pada sintesis *p*-formilbenzensulfonamida tidak menghasilkan produk yang diinginkan.

Senyawa senyawa **9** yang diperoleh berupa serbuk kristal berwarna merah bata muda sebanyak 40,8 - 43,2 % dihitung dari jumlah mol senyawa **10** yang digunakan. Senyawa **9** menunjukkan bercak tunggal pada Rf 0,58 pada uji KLT (Gambar 4.33) dan mempunyai jarak lebur 159-161°C (tidak dikoreksi). Hasil ini menunjukkan senyawa **9** cukup murni.



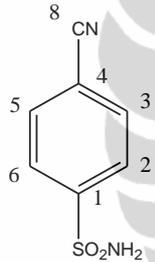
Gambar 4.33. Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa **9** (S-9), diamati di bawah sinar UV 254 nm, menghasilkan bercak tunggal (tanda panah), Rf = 0,58. S-10 = senyawa **10** (4-aminobenzensulfonamida), Rf = 0,23. Fase gerak : campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1).

Struktur molekul senyawa **9** dikonfirmasi berdasarkan data spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang diperoleh. Data dan spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **9** masing-masing dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan Gambar 4.34, 4.35, dan 4.36.

Spektrum FT-IR (dalam KBr) senyawa **9** menunjukkan adanya puncak pada bilangan gelombang 3350, 3255 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus NH_2 sulfonamida, pada 3098 cm^{-1} (C-H Aromatik), 2228 cm^{-1} (CN nitril), 1558 cm^{-1} (C=C Ar), dan 1342, 1153 (O=S=O). Data hasil integrasi spektra $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan pada senyawa **9** mempunyai proton sejumlah 8. Puncak pada δ 8,07 ppm (d, $J = 8,4$, 2H) menunjukkan adanya dua proton

aromatik yang setiap proton bertetangga dengan 1 proton aromatik lainnya (H pada C-2 dan C-6 fenil); puncak pada δ 7,98 ppm (d, $J= 8,4$, 2H) menunjukkan adanya dua proton aromatik yang masing-masing bertetangga dengan satu proton aromatik lainnya (H pada C-3 dan C5 fenil); dan δ 7,66 ppm (s, 2H) menunjukkan adanya dua proton terikat nitrogen (SO_2NH_2).

Tabel 4.9. Data FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa **9**

Struktur Senyawa 9 ¹⁾	Spektra				
	FT-IR (KBr)		No ^{b)}	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d-TMS). δ (ppm), m, J (Hz)	$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d-TMS) δ (ppm),
	$\bar{\nu}$ (Cm^{-1})	Gugus fungsi			
 $\text{C}_7\text{H}_6\text{N SO}_2$	3350, 3255	NH_2 sulfonamida	1	-	147,98
	3098	C-H Ar	2, 6	8,07, d, $J= 8,4$, 2H	126,45
	2228	$\text{C}\equiv\text{N}$ sianida	3, 5	7,98, d, $J= 8,4$, 2H	133,28
	1558	C=C Ar	4	-	114,33
	1342, 1153	O=S=O	7	7,66, s, 2H	-
				8	-

Keterangan:

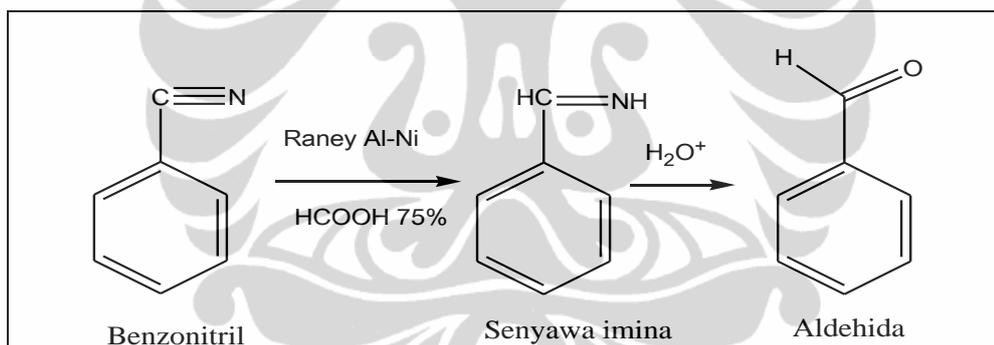
^{a)} Struktur molekul senyawa **9** yang diharapkan

^{b)} Penomoran mengacu pada struktur molekul

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **9** terdapat 5 puncak karbon. Dua puncak tampak jauh lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya, sehingga diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C. Dengan demikian jumlah atom C senyawa hasil sintesis = 7, tiga diantaranya merupakan atom C kuaterner. Puncak-puncak tersebut δ (ppm) : 147,98 (q, karbon aromatik berikatan dengan sulfonamida, C-1), 133,28 (karbon C-3 dan C-5 fenil), 126,45 (karbon C-2 dan C-6 fenil), 117,87 (karbon gugus nitril, CN), dan 114,33 (q, karbon aromatik berikatan dengan nitril, C-4). Berdasarkan data

dan pembahasan spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang diuraikan di atas, disimpulkan bahwa senyawa **9** adalah 4-sianobenzensulfonamida.

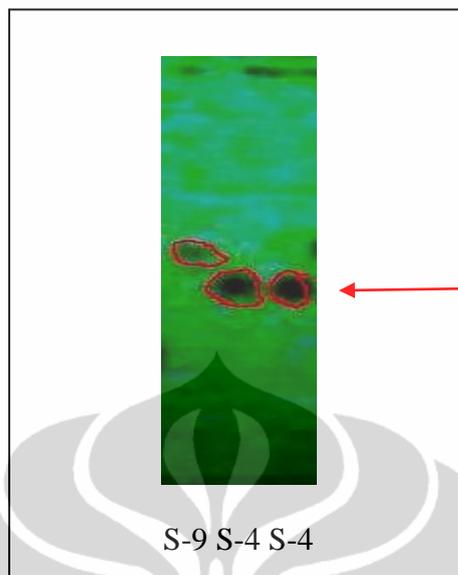
Reaksi pembentukan senyawa aldehyd dari senyawa nitril dilakukan dengan mereduksi gugus nitril (CN) menggunakan reagen aluminium hidrida spesifik yang dapat berhenti sampai menghasilkan senyawa imina saja, karena senyawa imina tersebut dapat dengan mudah terhidrolisis menjadi aldehyd. Diisobutilaluminium hidrida, $\text{Al}(\text{i-Bu})_2\text{H}$ salah satu yang bermanfaat untuk itu. Sementara itu, Raney nikel dan amonia, litium aluminium hidrida atau logam natrium dan alkohol akan mereduksi nitril menjadi amina primer (Allinger, *et al.*, 1976). Namun demikian, Raney nikel dalam asam formiat menunjukkan peran seperti $\text{Al}(\text{i-Bu})_2\text{H}$ (Gambar 4.37). Hasil optimum diperoleh bila jumlah air dalam asam formiat cukup besar. Asam formiat 75% umumnya memberikan hasil terbaik (Es dan Staskun, 1988).



[Sumber: Allinger, *et al.*, 1976 (adaptasi)]

Gambar 4.37. Skema reaksi sintesis arilaldehyd dari arilnitril

Senyawa **4** berupa kristal putih sebanyak 47,5 - 55,3 % dihitung dari jumlah mol 4-sianobenzensulfonamida yang digunakan. Produk yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan dalam literatur (62,9 - 68,8%), hal ini kemungkinan besar disebabkan karena percobaan dilakukan menggunakan bahan-bahan dalam porsi yang lebih kecil (l.k 1/5-nya). Hasil KLT menunjukkan bercak tunggal, $R_f = 0,48$ (Gambar 4.38). Jarak lebur $111-112^\circ\text{C}$ (tidak dikoreksi) (lit. $117-118^\circ\text{C}$).



Gambar 4.38. Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa **4** (S-4), diamati di bawah sinar UV 254 nm, menghasilkan bercak tunggal (tanda panah), $R_f = 0,48$. S-9 = senyawa **9**, $R_f = 0,58$. Fase gerak : campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1).

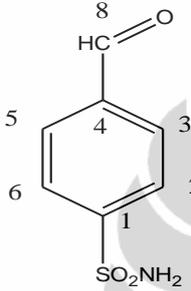
Struktur molekul senyawa **4** dikonfirmasi berdasarkan data spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang diperoleh. Data dan spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **4** masing-masing dapat dilihat pada Tabel 4.10 dan Gambar 4.39, 4.40 dan 4.41.

Spektrum FT-IR (dalam KBr) senyawa **4** menunjukkan adanya gugus-gugus fungsi yang sama dengan yang terdapat pada 4-formilbensulfonamida. Puncak pada 3358 , 3240 cm^{-1} , menunjukkan adanya gugus NH_2 sulfonamida, pada 3095 cm^{-1} (C-H Aromatik), 2818 cm^{-1} (CH aldehida), 1705 cm^{-1} (C=O aldehida), 1558 cm^{-1} (C=C Ar), dan 1378 , 1163 cm^{-1} (O=S=O).

Data integrasi spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **4** menunjukkan terdapat proton sejumlah 7. Puncak pada δ 10,09 ppm (s, 1H) menunjukkan adanya proton aldehida), pada δ 8,09 ppm (d, $J= 8,4\text{ Hz}$, 2H) menunjukkan adanya dua proton aromatik yang setiap proton bertetangga dengan 1 proton aromatik lainnya (H pada C-2 dan C-6 fenil), δ 8,02 ppm (d, $J=7,8\text{ Hz}$, 2H) menunjukkan adanya dua proton aromatik yang setiap proton bertetangga

dengan 1 proton aromatik lainnya (H pada C-3 dan C-5 fenil), dan δ 7,60 ppm (s, 2H) menunjukkan adanya 2 proton berikatan dengan nitrogen (SO_2NH_2).

Tabel 4.10. Data FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa **4**

Struktur Senyawa 4 ¹⁾	Spektra				
	FT-IR (KBr)		No ^{b)}	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d-TMS). δ (ppm), m, J (Hz)	$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d-TMS) δ (ppm),
	$\bar{\nu}$ (Cm^{-1})	Gugus fungsi			
 $\text{C}_7\text{H}_7\text{N SO}_3$	3358, 3242	NH_2 sulfonamida	1	-	148,74
	3095	C-H Ar	2, 6	8,09, d, $J=8,4$, 2H	126,38
	2818	C-H aldehida	3, 5	8,02, d, $J=7,8$, 2H	130,11
	1705	C=O aldehida	4	-	138,09
	1558	C=C Ar	7	7,60, s, 2H	
	1378, 1163	O=S=O	8	10,09, s, 1H	192,62

Keterangan:

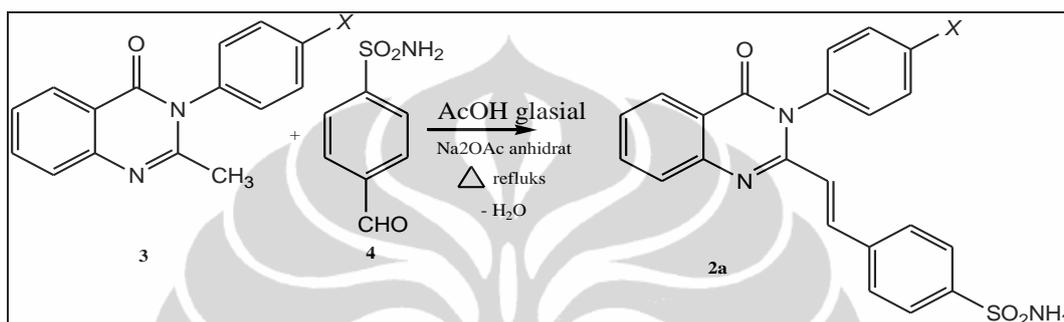
^{a)} Struktur molekul senyawa **4** yang diharapkan

^{b)} Penomoran mengacu pada struktur molekul

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **4** menunjukkan adanya 5 puncak. Dua puncak tampak jauh lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya, sehingga diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C. Dengan demikian jumlah atom C senyawa hasil sintesis = 7, tiga atom C diantaranya merupakan atom C kuartener. Puncak-puncak tersebut δ (ppm) : 192,62 (q, karbon $\text{C}=\text{O}$ aldehida), 148,74 (q, karbon aromatik berikatan dengan sulfonamida, C-1), 138,09 (q, karbon aromatik berikatan dengan $(\text{C}=\text{O})\text{H}$, C-4), 130,11 (karbon C-3 dan C-5 fenil), dan 126,38 (karbon C-2 dan C-6 fenil). Berdasarkan data dan pembahasan spektra FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ di atas, disimpulkan bahwa senyawa **4** adalah 4-formilbensulfonamida.

4.5 Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida (2a-f)

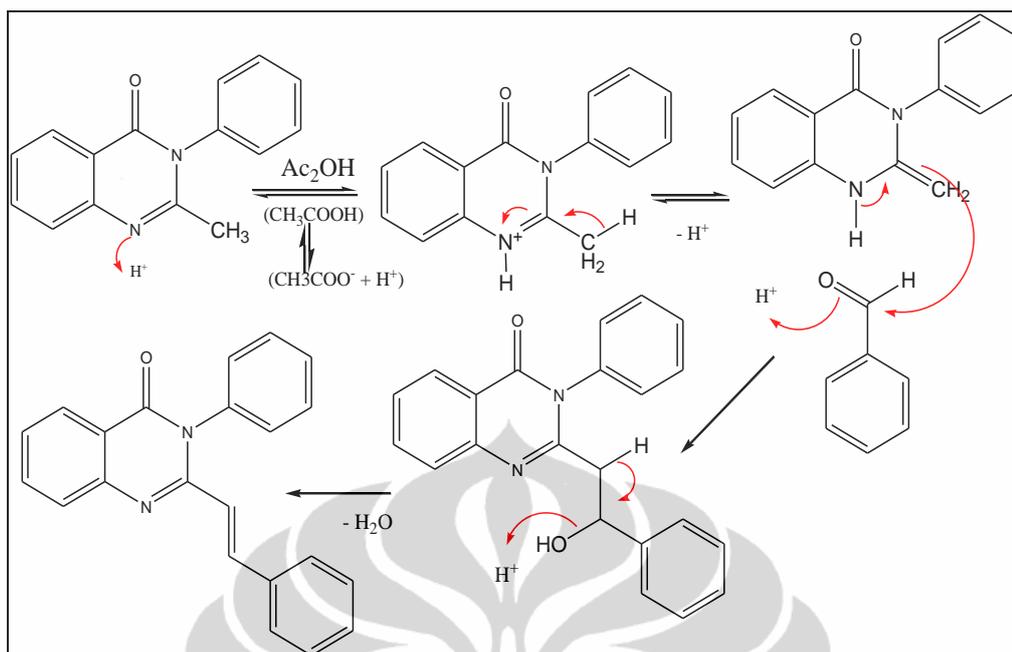
Sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida (2a-f) dilakukan dengan mengkondensasi 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya (3a-f) dengan 4-formilbenzensulfonamida (4) dalam pelarut asetat glasial dan katalis natrium asetat anhidrat (Gambar 4.42).



[Sumber : Adaptasi dari Connolly, Cusack, O'Sullivan, Guiry, 2005]

Gambar 4.42. Skema reaksi sintesis 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida (2a). X = H

Senyawa 2-metil-4(3H)-kuinazolinon dan aldehida (benzaldehida) dalam pelarut yang sesuai, adanya katalis dan *dehydrating agent* akan mengalami kondensasi menghasilkan senyawa 2-stiril-4(3H)-quinazolinon. Hal ini karena gugus metil pada C-2 4(3H)-kuinazolinon cukup reaktif (*acidic*) karena tersambung 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 metil membentuk karbanion. Usulan mekanisme reaksi kondensasi dapat dilihat pada Gambar 4.43.



Gambar 4.43. Usulan mekanisme reaksi kondensasi 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dengan aldehida (benzaldehida), menghasilkan senyawa 2-stiril-4(3H)-kuinazolinon.

Dehydrating agent yang sering digunakan adalah anhidrida asetat (Elliot, Welch & Chenard, 2001). Anhidrida asetat akan bereaksi dengan air yang dilepaskan pada reaksi kondensasi membentuk dua molekul asam asetat, sehingga dapat mempercepat laju reaksi. Namun pada sintesis senyawa **2a-f** ini, anhidrida asetat tidak ditambahkan karena berdasarkan hasil percobaan dengan menambahkan anhidrida asetat, menghasilkan produk dengan gugus sulfonamida terasetilasi.

Kondisi dan hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel 4.11. Semua senyawa hasil sintesis (**2a-f**) menghasilkan bercak tunggal pada uji KLT (Gambar 4.44) dan jarak lebur yang sempit (1°C). Hasil ini mengindikasikan bahwa senyawa **2a-f** cukup murni dan dapat diidentifikasi/dikonfirmasi strukturnya.

Berdasarkan data % hasil reaksi pada Tabel 4.11, menunjukkan bahwa reaksi kondensasi *p*-formilbenzensulfonamida dengan 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dan analognya tersubstitusi metoksi, klor dan brom pada posisi para dari cincin fenil pada N-3 kuinazolinon, memberikan hasil yang

sama memuaskan. Gugus-gugus fungsi tersebut mempunyai sifat elektronik yang berlainan, sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh elektronik yang jelas pada reaksi ini.

Tabel 4.11. Hasil sintesis senyawa **2a-f** dalam pelarut asam asetat glasial, refluks 4 jam^{a)}, suhu 100 °C, dan katalis natrium asetat anhidrat

Senyawa	Rekristalisasi		Bentuk Produk	Rf (KLT)	Jarak Lebur (°C) ^{c)}	% Produk ^{d)}
	Pelarut	Hasil (Yield) (%) ^{b)}				
2a	MeCN/H ₂ O (EtOH) ^{e)}	57,9	Serbuk kuning pucat	0,23 ¹⁾	277-278	85,0
2b	1. THF-EtOH 2. CHCl ₃ ^{f)}	35,8	Serbuk kuning pucat	0,30 ²⁾	244-245	57,1
2c	EtOH	45,5	Serbuk kuning pucat	0,28 ³⁾	228-229	79,1
2d	EtOH	41,2	Serbuk kuning pucat	0,15 ²⁾	211-212	84,5
2e	1. THF/EtOH 2. CHCl ₃ ^{f)}	49,5	Serbuk kuning pucat	0,31 ²⁾	248-249	85,7
2f	THF/EtOH (EtOH) ^{e)}	50,2	Serbuk kuning pucat	0,43 ⁴⁾	239-240	59,7

Keterangan:

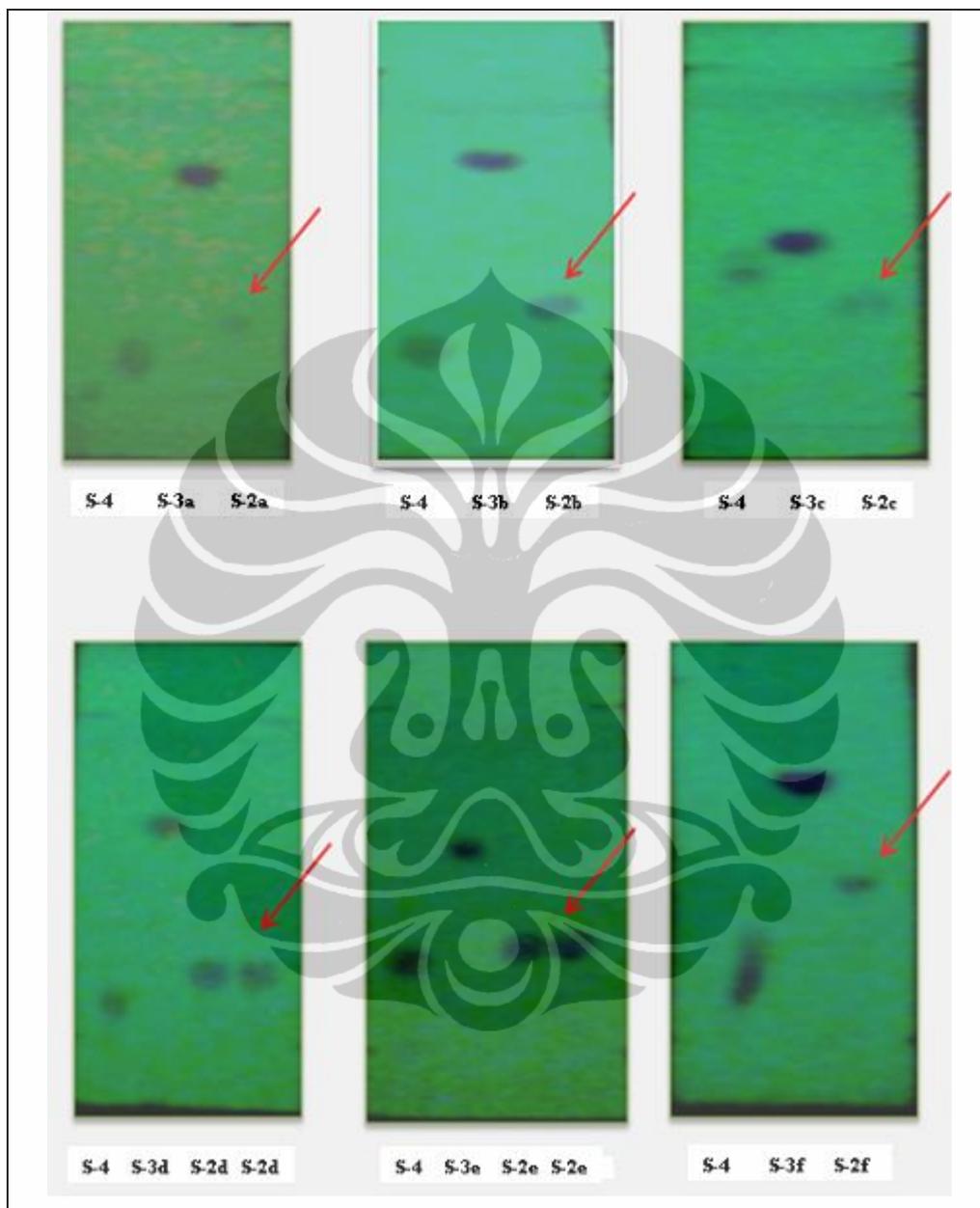
- a) Laju reaksi dimonitor secara KLT setiap 1 jam.
- b) Senyawa murni, dihitung dari jumlah senyawa **3a-f** yang digunakan.
- c) tidak dikoreksi.
- d) Hasil analisis secara KLT Densitometri.
- e) Pelarut untuk mencuci produk hasil rekristalisasi.
- f) Rekristalisasi dua tahap. Tahap 1 dengan pelarut 1; tahap 2 dengan pelarut 2.

Fase gerak :

- 1) Campuran etilasetat, sikloheksan dan NH₄OH (1:1:0,075).
- 2) Campuran etilasetat, sikloheksan dan NH₄OH (1:1:0,01).
- 3) Campuran etilasetat dan sikloheksan (1:1)
- 4) Campuran etilasetat, sikloheksan, asetonitril dan NH₄OH (3:4:1:0,2)

Faktor penyebab diperolehnya hasil yang lebih rendah pada reaksi kondensasi *p*-formilbenzensulfonamida dengan analog 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon tersubsitusi ester etil karboksilat, kemungkinan karena sebagian gugus ester tersebut sebagian terhidrolisis selama refluks. Gugus ester pada lingkungan asam tidak stabil. Pada sintesis 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon teresubsitusi etil karboksilat juga diperoleh hasil yang rendah (Tabel 4.3). Penyebab rendahnya hasil pada reaksi kondensasi *p*-

formilbensulfonamida dengan analog 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon tersubstitusi metil, belum dapat dijelaskan.



Gambar 4.44. Hasil uji kemurnian secara KLT senyawa **2a-f**, diamati di bawah sinar UV 254 nm, menghasilkan bercak tunggal. Nilai R_f dan fase gerak yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Struktur molekul senyawa **2a-f** dikonfirmasi menggunakan spektra UV-Vis, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, LC-MS dan HR-MS. Khusus untuk senyawa **2a** dilengkapi dengan NMR-2D (HMQC dan HMBC). Spektra massa dibuat menggunakan metode ionisasi elektro spray ion positif (ESI+) karena senyawa uji merupakan senyawa nonvolatil dan mudah mengalami protonasi. ESI merupakan metode ionisasi yang lunak. Senyawa uji diionisasi dengan penambahan atau penghilangan proton. Energi ekstra yang tersisa untuk menyebabkan fragmentasi sangat kecil, sehingga ion-ion fragmen yang terbentuk pada umumnya sangat kecil. Mode ESI+ akan menghasilkan ion molekul terprotonasi ($[\text{M}+\text{zH}]^{\text{z}+}$). Pada spektrum m/z, puncak tertinggi m/z adalah puncak ion molekul terprotonasi ($\text{M}+\text{H}^+$). Massa aktual ion molekul dapat diperoleh karena muatan dari ion tersebut diketahui, dengan cara mengurangi nilai ion molekul terprotonasi dengan nilai dari jumlah muatan dikalikan massa proton. Massa proton adalah 1,0079 Da. Nilai massa ion molekul memberi petunjuk jumlah atom nitrogen. Jika ion molekul nilainya ganjil, menunjukkan adanya jumlah atom N ganjil pada molekul senyawa, sedangkan kalau nilainya genap menunjukkan molekul senyawa tidak mempunyai atau mempunyai atom N genap.

Pada spektrum m/z ESI+, juga terlihat puncak m/z ion isotop terprotonasi dari molekul tersebut ($\text{M}+1+\text{H}^+$) dan ($\text{M}+2+\text{H}^+$). Puncak pada m/z " $\text{M}+1+\text{H}^+$ " menunjukkan adanya kontribusi isotop atom karbon dan nitrogen, sedangkan puncak pada m/z " $\text{M}+2+\text{H}^+$ " menunjukkan adanya kontribusi isotop atom klor, brom dan sulfur. Senyawa yang mengandung satu atom klor akan mempunyai puncak ion isotop pada m/z " $\text{M}+2+\text{H}^+$ " sekitar sepertiga dari intensitas puncak ion molekul ($\text{M}+\text{H}^+$) karena adanya ion molekul yang mengandung isotop ^{37}Cl . Senyawa yang mengandung satu atom brom akan mempunyai puncak ion isotop pada m/z " $\text{M}+2+\text{H}^+$ " yang hampir sama dengan intensitas puncak ion molekul ($\text{M}+\text{H}^+$) karena adanya ion molekul yang mengandung isotop ^{81}Br . Intensitas puncak ion isotop senyawa yang mengandung klor dan brom akan meningkat dengan peningkatan jumlah kandungan atom klor dan brom dalam molekulnya.

Spektrometer massa resolusi tinggi dapat mengukur massa akurat

(*accurate mass*), dengan akurasi 5 ppm (± 2 ppm presisi). Data massa akurat dan nilai akurasi yang diperoleh, digunakan untuk menentukan rumus molekul senyawa. Sejumlah calon rumus molekul dengan massa akurat yang mempunyai batas akurasi yang ditentukan akan diperoleh, kemudian dipilih rumus molekul yang paling sesuai dengan memperhatikan kesesuaian dengan “Aturan Nitrogen”, Indeks defisiensi hidrogen (IDH) dan informasi isotop.

Spektrum UV-Vis memberikan informasi adanya gugus kromofor. Semakin besar pergeseran puncak serapan ke arah panjang gelombang yang lebih panjang mengindikasikan semakin banyak ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin benzen. Spektrum IR mengidentifikasi adanya gugus-gugus fungsi yang khas dan sudah dikenal. Data dari spektrum IR ini, diselidiki lebih lanjut melalui penyelidikan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Spektrogram $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ memberikan informasi jumlah dan lingkungan kimia atom H dan C dalam molekul senyawa uji (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005; Kazakevich & LoBrutto, 2007; Ardrey, 2003; Williams & Fleming, 1980; Webb, Bristow, Sargent & Stein, 2004).

Senyawa **2a**

Spektrogram LC-MS ESI+, HR-MS, UV-Vis dan FT-IR senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.45, 4.46, 4.47 dan 4.48. Data LC dan spektrogram tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Kromatogram LC-MS senyawa **2a** menunjukkan adanya satu puncak (waktu retensi 1,5 menit) (Gambar 4.45 A). Data ini mengindikasikan bahwa senyawa **2a** murni. Spektrogram massa LC-MS ESI+ senyawa **2a** menunjukkan puncak tertinggi pada m/z 404,3 ($\text{M}+\text{H}^+$) (Gambar 4.45 B). Spektrogram massa resolusi tinggi (HR-MS) senyawa **2a** menunjukkan puncak tertinggi m/z pada 404,1046 ($\text{M}+\text{H}^+$) (Gambar 4.46). Rumus molekul senyawa senyawa **2a** terprotonasi yang diharapkan adalah $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$. Massa terhitung molekul tersebut adalah 404,1069 Da (kesalahan 5,7 ppm). Hasil tersebut menunjukkan kesesuaian antara massa eksperimental dengan massa terhitung. Berdasarkan data tersebut dapat dipastikan rumus molekul senyawa sesuai dengan yang diharapkan yaitu $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ dengan berat

molekul 403,1046. Berdasarkan rumus molekul tersebut diperoleh DBE senyawa **2a** mempunyai adalah 16. Spektrum UV-Vis senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.47. Pada spektrum ini terdapat puncak-puncak serapan pada λ 338 nm (maks), 312, 293,5 dan 285,5 nm (Gambar 4.47). Data ini menunjukkan pada struktur molekul senyawa **2a** terdapat cincin benzen tersubstitusi dan beberapa ikatan rangkap terkonjugasi. Pada spektrum FT-IR (KBr) senyawa **2a** terdapat puncak pada 3362, 3234 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus NH_2 sulfonamida, pada 3049 cm^{-1} (C-H Ar), 1672 cm^{-1} (C=O laktam), 1556 cm^{-1} (C=C Ar), dan 1340, 1165 cm^{-1} (O=S=O) (Gambar 4.45).

Tabel 4.12. Data LC-MS ESI+, HR-MS, UV-Vis dan FT-IR senyawa **2a**

UV-Vis λ (nm)	MS ES+ m/z (ion, %) ^{a)}		FT-IR (KBr)	
	LC	HR	$\bar{\nu}$ (Cm^{-1})	Gugus fungsi
338	404,3	404,1046	3362; 3234	NH_2 sulfonamida
312	$\text{M}+\text{H}^+$ (100%)	$\text{M}+\text{H}^+$ (100%)	3049	C-H Ar
293,5			1672	C=O laktam
285,5			1556	C=C Ar
			1340; 1165	SO_2 sulfonamida

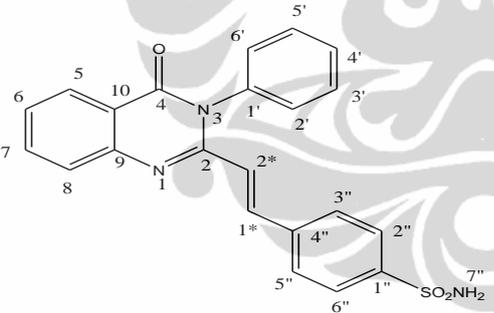
Keterangan:

^{a)} Intensitas (%) ion

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.49 dan data spektrumnya dapat dilihat pada Tabel 4.13. Data integrasi spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2a** menunjukkan bahwa pada senyawa **2a** terdapat proton sejumlah 17. Ini sesuai dengan jumlah H pada rumus molekul senyawa **2a** yang diperoleh dari HR-MS. Puncak pada δ 7,87 ppm dan 6,43 ppm (d, $J=15\text{Hz}$, 1H) menunjukkan adanya masing-masing 1 proton etenil bertetangga dengan 1 proton etenil lainnya pada posisi trans (H pada C-1* dan C-2*). Data ini menunjukkan bahwa kondensasi metil azometina dari 2-metil-3-(4-bromofenil)-4(3H)-kuinazolinon dengan 4-formilbenzenseulfonamida telah terjadi. Puncak pada δ 8,16 ppm (dd, $J=7,1; 1,9$ Hz, 1H) menunjukkan adanya 1 proton aromatik bertetangga dengan 1 proton aromatik posisi orto dan 1 proton aromatik posisi meta (1H dari C-5), 7,88 ppm (td, $J=7,1; 1,9$ Hz, 1H)

menunjukkan adanya 1 proton aromatik bertetangga dengan 2 proton aromatik posisi orto dan 1 proton aromatik posisi meta (1H dari C-7), 7,80 ppm (d, $J=7,8$ Hz, 1H) menunjukkan adanya 1 proton aromatik bertetangga dengan 1 proton aromatik posisi orto (H dari C-8), 7,74 ppm (d, $J=8,4$ Hz, 2H) menunjukkan adanya dua proton aromatik yang setiap proton bertetangga dengan 1 proton aromatik orto (H dari C-2'' dan C-6''), 7,53-7,63 ppm (overlap, m, 6H) merupakan gabungan dari 1 proton pada C-6 kuinazolinon, dua proton dari C-3'' dan C-5'' benzensulfonamida, dua proton dari C-2' dan C-6' fenil, dan 1 proton dari C-4' fenil), 7,45 ppm (d, $J=8,45$ Hz, 2H) menunjukkan adanya dua proton aromatik yang setiap protonnya bertetangga dengan 1 proton aromatik lainnya (H dari C-3' dan C-5'), 7,39 ppm (s, 2H) menunjukkan adanya 2 proton NH₂ (sulfonamida).

Tabel 4.13. Data ¹H-NMR senyawa **2a** dalam DMSO-d₆

Struktur senyawa 2a ¹⁾	δ (ppm), m, J (Hz)	No. ²⁾	
 <p style="text-align: center;">C₂₂H₁₇N₃O₃S, Berat Molekul (M): 403,45</p>	8,16, dd, $J=7,1;1,9$	5	
	7,88, td, $J=7,1;1,9$	7	
	7,53 s/d 7,63	overlap, m, 6H.	6 3'', 5'' 2', 6' 4'
	7,80, d, $J=7,8$	8	
	6,43, d, $J=15$	2*	
	7,87, d, $J=15$	1*	
	7,45 (d, $J=8,4$, 2H)	3', 5'	
	7,74, d, $J=8,4$, 2H)	2'', 6''	
	7,39, s, 2H (NH ₂)	8''	

Keterangan:

- 1) Struktur molekul yang diharapkan
- 2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan

Spektrum ¹³C-NMR senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.50 dan spektrumnya dapat dilihat pada Tabel 4.14. Pada spektrum ¹³C-NMR senyawa **2a** terdapat puncak 18 puncak karbon. Pada δ 161,23 ppm menunjukkan adanya amida (C=O amida/laktam, karbon C-4), δ 151,14 ppm menunjukkan adanya karbon (C=N)-N (karbon C-2), dan δ 147,29 – 120,74 ppm

merupakan karbon-karbon aromatik atau etilenik. Empat puncak tampak jauh lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya, sehingga diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C yaitu pada δ 129,71 ppm, 128,97 ppm, 126,32 ppm dan 127,88 ppm. Dengan demikian jumlah atom C senyawa hasil sintesis = 22. Ini sesuai dengan jumlah C pada rumus molekul senyawa **2a** yang diperoleh dari HR-MS.

Tabel 4.14. Data spektra ^{13}C -NMR senyawa **3a** dalam DMSO-d₆.

Struktur senyawa 2a ¹⁾	δ (ppm)	Keterangan	Nomor ²⁾
<p>$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, Berat Molekul (M): 403,45</p>	161,23	(C=O)-N	4
	151,14	(C=N-)-N	2
	147,29	C Aromatik atau C=C	
	144,53		
	138,02		
	137,10		
	136,82		
	134,88		
	129,71		
	129,30		
	128,97		
	127,88		
	127,32		
	126,95		
	126,51		
	126,32		
122,59			
120,75			

Keterangan:

- 1) Struktur molekul yang diharapkan
- 2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan

Korelasi proton-karbon dan karbon-karbon lainnya pada struktur senyawa **2a** diperoleh dengan melakukan interpretasi terhadap spektra HMQC dan HMBC. Spektra HMQC senyawa **2a** dan spektra ekspansinya dapat dilihat pada Gambar 4.51a-4.51d, sedangkan spektra HMBC senyawa **3a** dan spektra ekspansinya dapat dilihat pada dan 4.52a-4.52g.

Pada spektra HMQC senyawa **2a**, proton doublet-doublet pada 8,16 ppm berkorelasi dengan karbon pada 126,51 ppm dan proton triplet-doublet pada 7,78 ppm berkorelasi dengan karbon pada 134,88 ppm. Korelasi proton dengan karbon pada senyawa **2a** selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.15. Pada spektra HMBC, proton doublet pada 6,43 ppm berkorelasi dengan karbon pada 154,39 ppm dan 138,02 ppm, sedangkan proton doublet pada 8,16 ppm berkorelasi dengan karbon pada 161,23 ppm, 147,29 ppm dan 134,88 ppm. Korelasi proton-karbon 2-3 ikatan selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.15. Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.53.

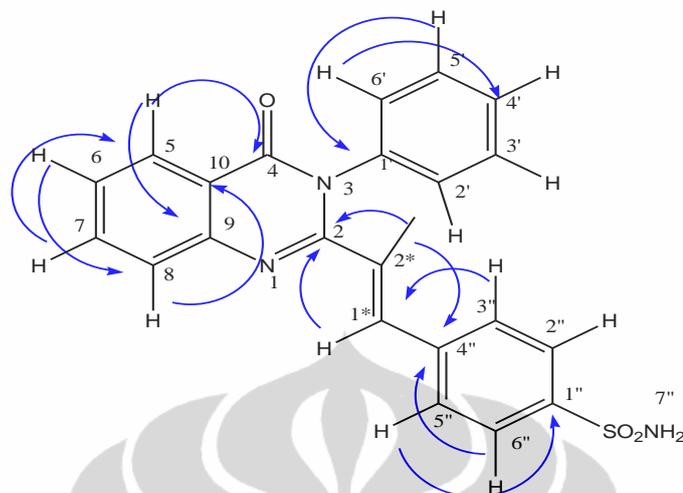
Berdasarkan data hasil interpretasi spektra LC-MS, HR-MS, UV-Vis, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC dan HMBC diatas, dapat disimpulkan bahwa struktur molekul senyawa **2a** sesuai dengan yang diharapkan.

Tabel 4.15. Korelasi proton dengan karbon hasil analisis spektra HMQC (Gambar 4.51a-4.51b) dan Korelasi proton dengan karbon 2-3 ikatan hasil analisis spektra HMBC (Gambar 4.52a-4.52g) senyawa **2a**

Korelasi proton-karbon (HMQC), δ (ppm)			Karbon-karbon yang berkorelasi 2-3 ikatan dengan H (HMBC)		
^1H , J (Hz)	^{13}C	No. ¹⁾	δ (ppm) (nomor) ²⁾		
8,16, dd, $J=7,1;1,9$	126,51	5	161,23 (4)	147,29 (9)	134,88 (7)
7,88, td, $J=7,1;1,9$	134,88	7	147,29 (9)	126,51 (5)	
7,87, d, $J=15$	137,10	1*	151,14 (2)	127,88 (3'', 5'')	122,59 (2*)
7,53	127,32	6	120,75 (10)	126,95 (8)	
7,51	127,88	3'' dan 5''	144,53 (1'')	137,10 (1*)	
7,58	127,71	2' dan 6'	129,30 (4')		
7,54	129,30	4'			
7,80, d, $J=7,8$	126,95	8	120,75 (10)	127,32 (6)	
7,74, d, $J=8,4, 2\text{H}$	126,32	2'' dan 6''	138,02 (4'')		
7,45, d, $J=8,4, 2\text{H}$	128,97	3' dan 5'	129,30 (4')	136,82 (1')	
6,43	122,59	2*	138,02 (4'')	151,14 (2)	

Keterangan:

- 1) Struktur molekul yang diharapkan
- 2) Penomoran mengacu pada struktur molekul yang diharapkan



Gambar 4.53. Hasil interpretasi spektra HMQC dan HMBC senyawa **2a**.

Senyawa **2b-f**

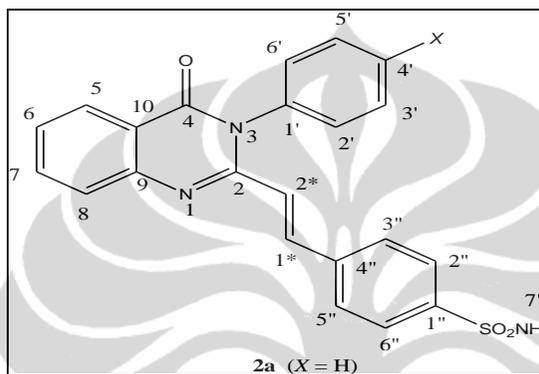
Spektra LC-MS ESI+, HR-MS ESI+, UV-Vis., FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **2b** dapat dilihat pada Gambar 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, dan 4.59; senyawa **2c** (Gambar 4.60, 4.61, 4.62, 4.63, 4.64, dan 4.65); senyawa **2d** (Gambar 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, dan 4.71); senyawa **2e** (Gambar 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, dan 4.77); dan senyawa **2f** (Gambar 4.78, 4.79, 4.80, 4.81, 4.82, dan 4.83). Data spektra LC-MS ESI+, HR-MS ESI+, UV-Vis dan FT-IR senyawa **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e** dan **2f** dapat dilihat pada Tabel 4.16, sedangkan data spektra $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ -nya dapat dilihat pada Tabel 4.17. Penempatan pergeseran kimia karbon-karbon aromatik senyawa tersebut dilakukan berdasarkan pemikiran, dengan mengacu pada korelasi proton-karbon dan karbon-karbon senyawa **2a** yang ditentukan berdasarkan analisis HMQC dan HMBC.

Tabel 4.16. Data spectra LC-MS ESI+, HR-MS ESI+, UV-Vis dan FT-IR senyawa **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e** dan **2f**.

Spektra	Senyawa											
	2a		2b		2c		2d		2e		2f	
LC-MS ESI+ (m/z) (ion, %)	404,30 M+H ⁺ (100%)		418,62 M+H ⁺ (100%)		434,57 M+H ⁺ (100%)		483,90 (M+H ⁺ , 100%)		438,50 M+H ⁺ (100%)		476,29 M+H ⁺ (100%)	
							481,90 (M iso+H ⁺ , 90%) ^{a)}		440,47 (M iso+H ⁺ , 40%) ^{a)}			
HR-MS ESI+ (m/z), (ion, %)	404,1046 (M+H ⁺ , 100%)		418,1237 (M+H ⁺ , 100%)		434,1176 (M+H ⁺ , 100%)		484,1057 (M+H ⁺ , 100%)		438,0674 (M+H ⁺ , 100%)		476,1278 (M+H ⁺ , 100%)	
							482,0164 (M iso+H ⁺ , 95%) ^{a)}		440,0647 (M iso+H ⁺ , 40%) ^{a)}			
UV-Vis, dalam asetonitril (λ, nm)	338		337,5		337,5		326		338		338,5	
	312		312		312		281		312		312	
	293,5		294		294				295		294,5	
	285,5											
FT-IR dalam KBr	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}	(ν, cm ⁻¹)	GF ^{b)}
	3362;3234	NH ₂ ^{c)}	3339;3265	NH ₂ ^{c)}	3365;3246	NH ₂ ^{c)}	3335;3236	NH ₂ ^{c)}	3340;3200	NH ₂ ^{c)}	3331;3219	NH ₂ ^{c)}
	3049	C-H _{Ar}	3063	C-H _{Ar}	3080	C-H _{Ar}	3095	C-H _{Ar}	3066	C-H _{Ar}	3100	C-H _{Ar}
	1672	C=O _{laktam}	2926	C-H _{Al}	2839	C-H _{Al}	1683	C=O _{laktam}	1672	C=O _{laktam}	2960-2989	C-H _{Al}
	1556	C=C _{Ar}	1691	C=O _{laktam}	1675	C=O _{laktam}	1556	C=C _{Ar}	1552	C=C _{Ar}	1701	C=O _{ester}
	1340;1165	SO ₂ ^{c)}	1550	C=C _{Ar}	1555	C=C _{Ar}	1338;1163	SO ₂ ^{c)}	1330;1166	SO ₂ ^{c)}	1654	C=O _{laktam}
			1340;1165	SO ₂ ^{c)}	1338;1163	SO ₂ ^{c)}					1556	C=C _{Ar}
				1250	Eter ^{d)}					1340;1165	SO ₂ ^{c)}	

Keterangan: ^{a)} iso = isotop; ^{b)} GF = gugus fungsi; ^{c)} sulfonamida; ^{d)} Ar-O-Al

Tabel 4.17. Data Spektra $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dalam DMSO-d_6 senyawa **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **2e** dan **2f**.



No. ¹⁾	Senyawa, δ (ppm), m, J (Hz)											
	2a (X = H)		2b (X = CH₃) (⁷)		2c (X = OCH₃) (⁷)		2d (X = Br)		2e (X = Cl)		2f [X = (C=O)OCH₂CH₃] (⁷) (^{2**}, ^{1**})	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	151,14	-	151,28	-	151,55	-	150,88	-	150,94	-	150,62
4	-	161,23	-	161,25	-	161,41	-	161,14	-	161,19	-	161,09
5	8,16, dd, $J=7,1;1,9$	126,51	8,14, dd, $J=7,8;1,9$	127,26	8,14, dd, $J=7,8;1,9$	126,80	8,14, dd, $J=7,8;1,3$	127,30	8,14, dd, $J=7,8;1,3$	133,84	8,15, dd, $J=7,8;1,$	130,54
7	7,88, td, $J=7,1;1,9$	134,88	7,89, td, $J=7,8;1,9$	134,13	7,88, td, $J=7,8;1,9$	134,78	7,89, td, $J=7,8;1,3$	134,90	7,90, td, $J=7,8;1,3$	135,68	7,91, td, $J=7,8;1,9$	134,96
8	7,80, d, $J=7,8$	126,95	7,79, $J=7,8$	126,48	7,77-7,8, overlap dg $2'',6'',d, J=8,4$	127,25	7,78-7,82 overlap dg $2'',6''$ dan $3',5'$	126,48	7,80, d, $J=7,8$	126,48	7,81, d, $J=7,8$	126,99

9	-	147,29	-	147,24	-	147,25	-	147,22	-	147,23	-	147,23	
10	-	120,75	.	120,71	-	120,73	-	120,64	-	120,65	-	120,62	
6	7,53	over- lap, m, 6H.	127,32	7,56, td, $J=7,8;1,3$	126,84	7,55, td, $J=7,8;1,3$	126,49	7,57, t, $J=7,8$	126,92	7,57, t, $J=7,8$	126,92	7,57,t, $J=7,8$	127,33
3'', 5''	7,51		127,88	7,53, d, $J=7,8, 2H$	128,62	7,58, d, $J=8,4, 2H$	129,99	7,63, d, $J=8,5, 2H$	131,25	7,68,d, $J=8,4, 2H$	129,72	7,61, d, $J=8,5, 2H$	129,61
2', 6'	7,58		129,71	7,37, d, $J=7,8, 2H$	126,29	7,39, d, $J=7,2, 2H$	126,30	7,48, d, $J=7,2, 2H$	126,27	7,63,d, $J=7,8, 2H$	126,27	7,66,d, $J=6,5, 2H$	126,24
4'	7,54		129,30	-	134,79	-	159,42	-	122,40	-	127,31	-	126,47
2*	6,43,d, $J=15$	122,59	6,43, d, $J=15,5$	122,65	6,51, d, $J=15,6$	122,67	6,5, d, $J=15$	122,46	6,5, d, $J=15$	122,38	6,45, d, $J=15$	122,26	
1*	7,87, d, $J=15$	137,10	7,89, d, $J=15,5$	137,04	7,9, d, $J=15,6$	136,99	7,9, d, $J=15$	136,11	7,91, d, $J=15$	134,91	7,91, d, $J=15$	137,53	
1'	-	136,82	-	138,04	-	129,17	-	137,41	-	137,41	-	140,99	
3', 5'	7,45, d, $J=8,4, 2H$	128,97	7,34, d, $J=7,8, 2H$	130,15	7,14, d, $J=7,2,$ 2H	114,79	7,78-7,82 overlap dg 2'',6''dan 8	132,66	7,54,d, $J=7,8, 2H$	130,94	8,17,d, $J=8,5, 2H$	130,46	
1''	-	144,53	-	144,49	-	144,49	-	144,55	-	144,56	-	144,56	
2'', 6''	7,74, d, $J=8,4, 2H$	126,32	7,78, $J=7,8, 2H$	127,89	7,77-7,8, ovelap dg 8, d, $J=8,4$	127,92	7,78-7,82 overlap dg 8 dan 3',5'	128,07	7,79, d, $J=8,4, 2H$	128,08	7,76,d, $J=8,5, 2H$	128,10	
4''	-	138,02	-	138,70	-	138,05	-	137,92	-	137,92	-	137,85	
7'' (NH ₂)	7,39, s, 2H	-	7,40, s, 2H	-	7,40, s, 2H	-	7,40, s, 2H	-	7,40, s, 2H	-	7,40, s, 2H	-	
7'	-	-	2,44, s, 3H	20,86	3,86, s, 3H	55,44	-	-	-	-	-	165,11	
1**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,37,t, $J=7,1, 3H$	14,14	
2**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,38,q, $J=7,5, 2H$	61,12	

Keterangan: ¹⁾ Penomoran mengacu pada struktur molekul senyawa

Kromatogram LC-MS senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e**, dan **2f** menunjukkan adanya satu puncak (Gambar 4.54.A, 60A, 66A, 72A, dan 78A). Data ini mengindikasikan bahwa senyawa tersebut murni. Spektrum massa LC-ESI+ senyawa-senyawa tersebut menunjukkan puncak tertinggi pada m/z dengan kelimpahan 100% yang sesuai dengan ion molekul terprotonasi ($M+H^+$) masing-masing (Tabel 4.16). Pada spektrum LC-MS senyawa **2d** dan **2e**, disamping puncak ion molekul terprotonasi, juga terdapat ion molekul dari isotopnya dengan kelimpahan masing-masing 90% dan 40%. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa **2d** dan **2e** tersubstitusi masing-masing dengan satu atom Br dan Cl.

Massa senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e**, dan **2f** hasil analisis spektra massa resolusi tinggi (HR-MS) (Gambar 4.55, 61, 67, 73, dan 79) dibandingkan dengan massa hitungan dapat dilihat pada Tabel 4.18. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa massa eksperimental sesuai dengan massa hitungan. Dengan demikian rumus molekul senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e**, dan **2f** sesuai dengan yang diharapkan (Tabel 4.18).

Tabel 4.18. Perbandingan massa eksperimental dengan massa hitungan senyawa **2a**, **2b**, **2c**, **2d**, **3e**, dan **2f** hasil analisis HR-MS.

Senyawa	RM ^{b)} + H ⁺	Eksperi- mental (m/z) (M+H ⁺)	Massa +H ⁺ Hitungan (Da)	Ke- salah- an (ppm)	RM ^{b)}	DBE ^{c)}
2a	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₃ S	404,1046	404,1069	5,7	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₃ S	16
2b	C ₂₃ H ₂₀ N ₃ O ₃ S	418,1237	418,1225	2,9	C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	16
2c	C ₂₃ H ₂₀ N ₃ O ₄ S	434,1176	434,1175	0,2	C ₂₃ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	16
2d	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₃ SBr	482,0164	482,0174 ^{a)}	2,1	C ₂₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ SBr	16
2e	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₃ SCl	438,0674	438,0679	1,1	C ₂₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ SCl	16
2f	C ₂₅ H ₂₂ N ₃ O ₅ S	476,1278	476,1280	0,4	C ₂₅ H ₂₁ N ₃ O ₅ S	17

Keterangan:

^{a)} mengacu pada isotop ⁷⁹Br

^{b)} RM = Rumus molekul yang diharapkan

^{c)} DBE = Ekuivalen ikatan rangkap

Pada spektrum UV-Vis senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** terdapat beberapa puncak serapan pada λ 294-338,5 nm (Tabel 4.16 dan Gambar 4.56, 4.62, 4.68, 4.74 dan 4.80). Data ini menunjukkan bahwa pada struktur molekul senyawa tersebut terdapat cincin benzen tersubstitusi dan beberapa ikatan rangkap terkonjugasi.

Pada spektrum FT-IR (KBr) senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** terdapat puncak-puncak yang menunjukkan adanya gugus NH₂ sulfonamida, cincin aromatik, C=O laktam), dan O=S=O sulfonamida, alkil (pada **2b**, **2c** dan **2f**), eter aromatik-alifatik (pada **2c**) dan ester (pada **2f**) (Tabel 4.16 dan Gambar 4.57, 4.63, 4.69, 4.75, dan 4.81). Data ini sesuai dengan gugus-gugusan yang terdapat pada struktur yang diharapkan.

Data integrasi spektrum ¹H-NMR senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** menunjukkan pada senyawa tersebut berturut-turut terdapat proton sejumlah 19, 19, 16, 16 dan 21. Ini sesuai dengan jumlah H pada rumus molekul senyawa tersebut yang diperoleh dari HR-MS (Tabel 4.18). Puncak pada δ 7,87-7,91 ppm dan 6,43-6,51 ppm (d, $J=15$ Hz, 1H) menunjukkan adanya 1 proton etenil betetangga dengan 1 proton etenil lainnya pada posisi trans (H dari C-1* dan C-2* trans). Data ini menunjukkan bahwa kondensasi metil azometina dari 2-metil-3-(4-metilfenil)-4(3H)-kuinazolinon atau analognya dengan 4-formilbenzenseulfonamida telah terjadi. Puncak-puncak proton pada spektrum ¹H-NMR senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** kebanyakan sesuai dengan yang terdapat pada spektrum ¹H-NMR senyawa **2a**. Perbedaan geseran kimia terlihat pada puncak proton aromatik C-2'/6' dan C-3'/5'. Hal ini terjadi karena pada posisi para cincin fenil tersebut terdapat perbedaan gugus fungsi. Pada senyawa **2b** tidak terdapat proton C-4 fenil karena pada posisi tersebut terdapat gugus fungsi metil (δ 2,44 ppm, s, 3H). Demikian juga pada senyawa **2c**, **2d**, **3e** dan **2f**, masing-masing disubstitusi metoksi (δ 3,86 ppm, s, 3H), Br, Cl, dan ester etil karboksilat (δ 1,37, t, $J = 7,1$, 3H dan 4,38, q, $J = 7,5$, 2H) (Tabel 4.17, dan Gambar 4.58, 4.64, 4.70, 4.76 dan 4.82).

Pada spektrum ¹³C-NMR senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** masing-masing terdapat 19, 19, 18, 18 dan 21 puncak karbon. Empat puncak tampak

jauh lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya, sehingga diyakini masing-masing merupakan puncak dari 2 atom C. Dengan demikian jumlah atom C senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** masing-masing adalah 23, 23, 22, 22, 25. Ini sesuai dengan jumlah C pada rumus molekul senyawa tersebut yang diperoleh dari HR-MS (Tabel 4.18). Puncak pada δ 161 ppm menunjukkan adanya amida (C=O amida/laktam, karbon C-4) dan 151 ppm menunjukkan adanya karbon (-C=N)-N (karbon C-2). Puncak-puncak pada δ 147,24-120,71 ppm menunjukkan adanya karbon-karbon aromatik atau etinil. Pada senyawa **2b** terdapat puncak karbon pada δ 20,86 ppm (karbon alifatik terikat Ar), senyawa **2c** [δ 55,44 ppm (karbon terikat O)], dan senyawa **2f** [δ 14,14 ppm (karbon alkil terikat alkil), dan δ 61,12 ppm (karbon terikat O)] (Tabel 4.17, Gambar 4.59, 4.65, 4.71, 4.77 dan 4.83).

Berdasarkan data dan pembahasan spektra LC-MS, HR-MS, UV-Vis., FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ tersebut di atas, disimpulkan bahwa struktur senyawa **2b**, **2c**, **2d**, **3e** dan **2f** sesuai dengan yang diharapkan. Struktur molekul dapat dilihat pada Gambar 1.1.

4.6 Uji Aktivitas Inhibisi 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida dan analognya (2a-f) pada COX-1 dan COX-2.

Uji aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** dilakukan menggunakan kit uji skrining inhibitor COX ("*COX Inhibitor Screening Assay Kit*", Nomor katalog 560131, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

Kit uji skrining inhibitor COX ini menentukan secara langsung konsentrasi $\text{PGF}_2\alpha$ yang dihasilkan dari reduksi PGH_2 yang dihasilkan oleh COX. Penentuan konsentrasi dilakukan dengan metode enzim immunoesei (EIA), menggunakan antibodi spesifik yang secara luas dapat berikatan dengan kebanyakan senyawa-senyawa prostaglandin (PG). Oleh karena itu, kit uji ini lebih akurat dan lebih dipercaya dibandingkan uji yang didasarkan atas inhibisi peroksidase. Pada kit ini terdapat baik COX-1 (*ovine*) maupun COX-2 (*human*), sehingga dapat digunakan untuk menentukan indeks selektivitas COX-1/COX-2 dari inhibitor.

Sebelum digunakan kit uji distandarisasi terlebih dahulu. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa kit uji menunjukkan kinerja sebagaimana yang seharusnya pada uji inhibitor COX. Standarisasi dilakukan sesuai protokol uji yang dibuat oleh pembuat kit, menggunakan senyawa inhibitor spesifik SC-560 untuk COX-1 dan DuP-697 untuk COX-2. Hasil standarisasi menunjukkan bahwa SC-560 dan DuP-697 menunjukkan inhibisi yang sangat kuat masing-masing pada COX-1 dan COX-2. IC_{50} SC-560 dan IC_{50} DuP-697 yang diperoleh adalah masing 0,06 μ M dan 0,003 μ M. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.19 dan 4.20. Hasil standarisasi menunjukkan kit uji skrining inhibitor COX masih memenuhi standar untuk digunakan melakukan uji skrining inhibitor COX (COX Inhibitor, 2011). Pada penelitian ini dipilih selekoksib dan aspirin sebagai senyawa pembanding. Seleksoksib dipilih karena senyawa tersebut merupakan inhibitor COX-2 selektif yang sudah diterima untuk digunakan diklinik. Sedangkan aspirin dikelompokkan sebagai inhibitor COX yang tidak selektif, meskipun aktivitas inhibisi aspirin pada COX-1 sedikit lebih tinggi (tujuh kali lipat) dibandingkan pada COX-2 (Zargi, Rao & Knaus, 2007).

4.3.1. Inhibisi senyawa **2a-f** pada aktivitas COX-1

Senyawa **2a-f** didisain sebagai senyawa yang dapat menghambat aktivitas enzim COX-2 lebih tinggi dibandingkan COX-1. Pada COX-1 diperkirakan aktivitasnya rendah, oleh karena itu pengujian aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** pada COX-1 dilakukan dengan konsentrasi yang sama dengan konsentrasi asam arakidonat (substrat) yang digunakan (100 μ M). Sedangkan senyawa pembanding (selekoksib dan aspirin) dilakukan dengan empat konsentrasi yang diperkirakan dapat menghasilkan inhibisi sedikit di bawah atau di atas 50% aktivitas COX-1, dengan mengacu pada data IC_{50} yang diperoleh pada penelitian sebelumnya.

Tabel 4.19. Inhibisi COX-1 oleh senyawa inhibitor COX-1 spesifik SC-560

Kons. Seny. uji (μM) ¹⁾	Kons. PG ²⁾ (pg/ml)	CV (%)	SEM	% Inhib ³⁾	IC ₅₀ ⁴⁾ (μM)
8×10^{-1}	4601,5	19,5	0,4	98,2	0,06
4×10^{-1}	16842,3	32,8	992,2	97,2	
2×10^{-1}	29370,2	29,6	1866,9	94,0	
1×10^{-1}	78380,0	25,5	11585,7	68,8	
5×10^{-2}	126076,1	32,4	16716,5	49,8	
25×10^{-3}	210146,5	38,0	46206,2	16,3	
125×10^{-4}	239369,4	5,2	5,1	4,6	
625×10^{-5}	256209,1	9,5	9,9	-2,1	
313×10^{-5}	247703,2	10,5	10,6	1,3	
0 ⁵⁾	251027,6	28,8	29596,6	0,0	-

Keterangan:

- 1) Konsentrasi senyawa uji yang ditambahkan
- 2) Konsentrasi prostaglandin (PG) yang terbentuk (rata-rata dari 6 kali pengukuran)
- 3) Rata-rata % inhibisi
- 4) IC₅₀ SC-560 pada COX-1 = 0,06 μM ; pada literatur sekitar 0,02 μM (COX Inhibitor, 2011)
- 5) Aktivitas Inisial (AI) COX-1 100%

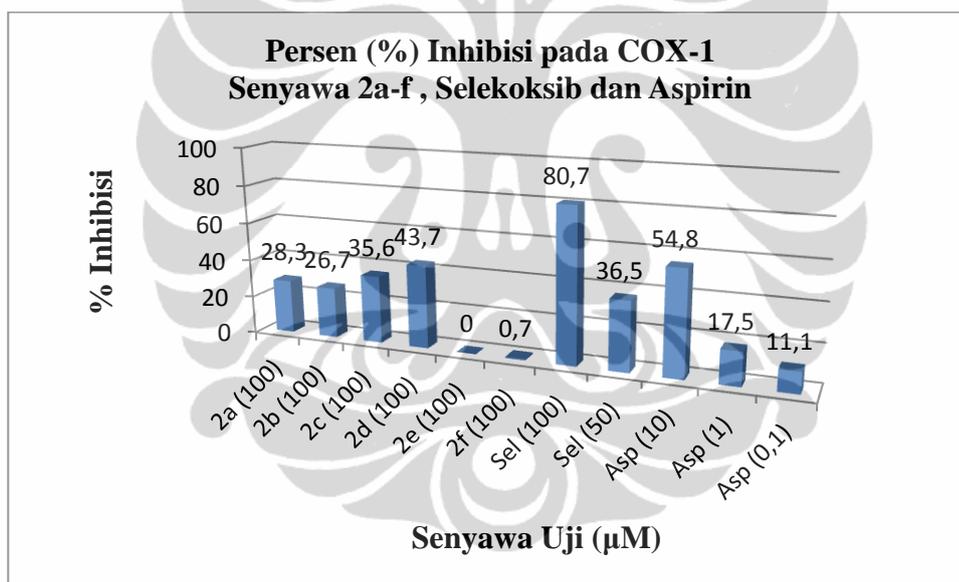
Tabel 4.20. Inhibisi COX-2 oleh senyawa inhibitor spesifik COX-2 DuP-697

Kons. Seny. uji (μM) ¹⁾	Kons. PG ²⁾ (pg/ml)	CV (%)	SEM	% Inhib ³⁾	IC ₅₀ ⁴⁾ (μM)
15×10^{-3}	32269,3	22,1	4138,1	97,4	-
75×10^{-4}	366710,0	34,0	50854,4	70,7	0,003
375×10^{-5}	553692,4	13,7	31058,3	55,8	
188×10^{-5}	714152,1	25,3	73624,3	43,0	
94×10^{-5}	1178289,8	5,3	36148,8	5,9	
0 ⁵⁾	1252665,8	22,6	115320,6	0,0	-

Keterangan:

- 1) Konsentrasi (akhir) senyawa uji yang digunakan
- 2) Konsentrasi PG yang terbentuk (rata-rata dari 6 kali pengukuran)
- 3) Rata-rata % inhibisi
- 4) IC₅₀ DuP-697 pada COX-2 = 0,003 μM ; pada literatur sekitar 0,005 μM (COX Inhibitor, 2011)
- 5) Aktivitas Inisial (AI) COX-2 100%

Hasil uji aktivitas inhibisi senyawa **2a-f**, selekoksib dan aspirin pada COX-1 dapat dilihat pada Tabel 4.21 dan Gambar 4.84. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa senyawa **2a**, **2b**, **2c** dan **2d** dapat menghambat dengan nyata pada aktivitas COX-1, sedangkan senyawa **2e** dan **2f** tidak aktif atau menghambat dengan nyata (<10%). Pada konsentrasi tersebut, aktivitas inhibisi terbaik ditunjukkan oleh senyawa **2d** (43,7%), diikuti oleh senyawa **2c** (35,6%), **2a** (28,3%) dan **2b** (26,7%), namun aktivitas tersebut lebih rendah dibandingkan aktivitas selekoksib (80,7%) dan aspirin (inhibisi pada konsentrasi 10 μM = 54,8%). Aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** pada konsentrasi 100 μM pada COX-1 tidak lebih dari 50%, oleh karena itu uji dengan konsentrasi yang lebih rendah tidak dilakukan.



Gambar 4.84. Perbandingan persen (%) inhibisi senyawa **2a-f** (100 μM), selekoksib (sel) (100 dan 50 μM) dan Aspirin (10, 1 dan 0,1 μM) pada COX-1.

Tabel 4.21. Inhibisi COX-1 oleh senyawa **2a-f**, Selecoxib dan Aspirin

Senyawa Uji	Kons. Seny. Uji (μM) ¹⁾	Kons. PG ²⁾ (pg/ml)	CV (%)	SEM	% Inhibisi	IC ₅₀ (μM) ³⁾
AI 100% (a) ⁴⁾	0	1192067,7	7,3	35830,8	0,0	-
2a	100	854743,8	5,8	28861,7	28,3	-
2b	100	873318,1	11,0	55746,2	26,7	-
2c	100	767938,8	5,6	24763,8	35,6	-
2d	100	670764,9	4,9	19219,2	43,7	-
2e	100	1242415,6	11,1	79792,2	-4,2	-
2f	100	1183845,9	8,4	57483,3	0,7	-
IA 100% (b) ⁴⁾	0	1206520,3	17,2	84966,3	0,0	-
Selekoksib	100	232268,4	29,9	40495,3	80,7	61,7
	50	764988,7	22,2	98311,2	36,6	
	10	1369553,6	38,0	32,6	-13,5	
	1	1313202,4	14,7	78705,8	-8,8	
Aspirin	10	544876,3	7,8	546963,8	54,8	11,15
	1	995076,0	22,9	93418,8	17,5	
	1 x 10 ⁻¹	1072226,0	10,4	45581,1	11,1	
	1 x 10 ⁻²	1289693,1	19,5	0,4	-6,9	

Keterangan:

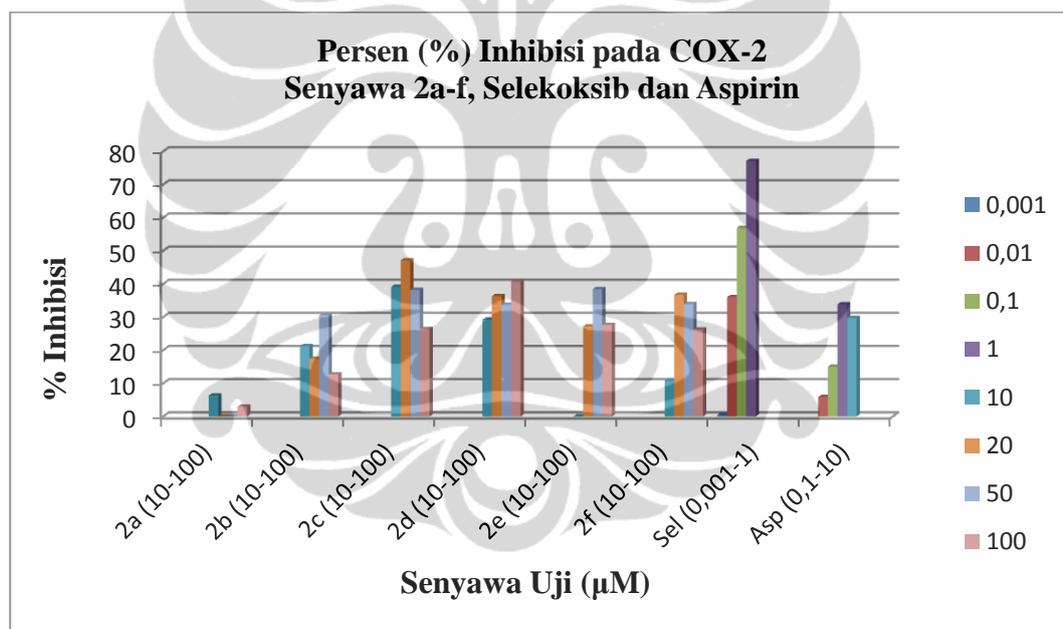
- ¹⁾ Konsentrasi senyawa uji yang ditambahkan
- ²⁾ Konsentrasi PG yang terbentuk, rata-rata dari 3 kali pengukuran
- ³⁾ IC₅₀ selekoksib = 61,7 μM ; data pada literatur = 33,1 μM (Rao, Uddin & Knaus, 2004).
IC₅₀ aspirin pada COX-1 = 11,15 μM ; data pada literatur = 0,35 μM (Zargi, Rao & Knaus, 2007)
- ⁴⁾ AI 100% = Aktivitas Inisial 100%. (a) = pada uji senyawa **2a-f**; (b) = pada uji selekoksib dan aspirin.

4.3.2. Inhibisi senyawa 2a-f pada aktivitas COX-2

Uji aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** pada COX-2 diawali dengan konsentrasi 10 μM , sedangkan senyawa pembanding (selekoksib dan aspirin) dilakukan pada empat konsentrasi yang diperkirakan dapat menghasilkan

inhibisi sedikit di bawah atau di atas 50% aktivitas COX-2, dengan mengacu pada data IC₅₀ yang diperoleh pada penelitian sebelumnya.

Hasil uji aktivitas inhibisi senyawa **2a-f**, dengan konsentrasi 10 µM pada COX-2 dapat dilihat pada Tabel 4.22. Hasil uji menunjukkan bahwa senyawa **2b**, **2c**, **2d** dan **2f** dapat menginhibisi dengan nyata pada aktivitas COX-2, sedangkan senyawa **2a** dan **2e** tidak nyata (<10%) atau tidak aktif (negatif). Aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** dengan konsentrasi 10 µM pada COX-2 tidak lebih dari 50%, oleh karena itu, pengujian dilanjutkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (20, 50 dan 100 µM). Hasil uji aktivitas inhibisi senyawa **2a-f**, selekoksib dan aspirin pada enzim COX-2 dapat dilihat pada Tabel 4.22 dan gambar 4.85.



Gambar 4.85. Perbandingan persen (%) inhibisi senyawa **2a-f**, selekoksib dan aspirin pada COX-2.

Tabel 4.22. Inhibisi COX-2 oleh senyawa **2a-f**, Selecoxib dan Aspirin

Senyawa Uji	Kons. Seny. Uji (μM) ¹⁾	Kons. PG ²⁾ (pg/ml)	CV (%)	SEM	% Inhibisi	IC ₅₀ (μM)
AI (a) ⁴⁾	0	1057482,0	13,7	83607,1	0,0	-
AI (b) ⁴⁾	0	859665,8	8,5	42261,4	0,0	-
AI (c) ⁴⁾	0	1034111,8	10,1	60627,1	0,0	-
AI (d) ⁴⁾	0	958893,8	11,7	64561,5	0,0	-
AI (e) ⁴⁾	0	997340,1	30,1	173430,6	0,0	-
2a	100	833526,5	4,3	20595,2	3,0	-
	50	869122,2	4,4	22050,8	-1,1	
	20	1092590,1	10,6	67080,2	-27,1	
	10	990598,2	6,7	38283,9	6,3	
2b	100	750149,0	4,8	20849,9	12,7	-
	50	596282,3	1,2	4237,6	30,6	
	20	710306,8	29,3	2008000	17,4	
	10	833683,3	16,9	81650,1	21,2	
2c	100	653764,3	6,2	23338,2	26,4	-
	50	531118,3	8,8	27166,4	38,2	
	20	455174,5	8,1	21200,7	47,1	
	10	644470,7	1,4	5386,7	39,1	
2d	100	613020,1	14,5	51425,8	40,7	-
	50	685932,9	24,8	88394,8	33,7	
	20	658920,2	12,2	46602,9	36,3	
	10	750358,7	30,7	133302,6	29,2	
2e	100	749132,9	21,7	82033,4	27,6	-
	50	636869,5	15,8	68658,3	38,4	
	20	752445,7	13,1	57022,9	27,2	
	10	1064449,8	30,7	133302,6	-0,7	
2f	100	762686,0	28,4	125282,4	26,2	-
	50	683345,0	7,8	30788,5	33,9	
	20	654512,8	7,8	30788,5	36,7	
	10	943245,4	10,7	58408,9	10,8	
Selekoksisib	1	220231,1	9,8	12485,5	77,1	0,063
	1 x 10 ⁻¹	413490,3	17,8	42435,0	56,9	
	1 x 10 ⁻²	613757,6	16,8	55650,9	36,0	
	1 x 10 ⁻³	954506,7	9,4	59691,2	0,5	

Aspirin	10	701192,9	7,3	29717,9	29,7	-
	1	659868,6	16,0	61174,6	33,8	
	1×10^{-1}	847475,0	31,9	156235,8	15,0	
	1×10^{-2}	938466,8	15,6	84478,1	5,9	

Keterangan:

- ¹⁾ Konsentrasi senyawa uji yang ditambahkan
- ²⁾ Konsentrasi PG yang terbentuk, rata-rata dari 3 kali pengukuran.
- ³⁾ IC₅₀ selekoksib pada COX-2 (*human*) = 0,063 μ M; pada literatur = 0,07 μ M (COX-2 *ovine*) (Rao, Uddin & Knaus, 2004).
IC₅₀ aspirin dan senyawa 2a-f pada COX-2 tidak dapat ditentukan karena tidak diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menginhibisi COX-2 > 50%. Pada literatur, IC₅₀ aspirin pada COX-2 (*ovine*) = 2,4 μ M (Zargi, Rao & Knaus, 2007)
- ⁴⁾ AI 100% = Aktivitas Inisial 100% (a) = pada uji senyawa **2a-f** 10 μ M; (b) = pada uji senyawa **2a-c** 20, 50 dan 100 μ M; (c) pada uji senyawa **2d-f** 20, 50 dan 100 μ M; (d) pada uji selekoksib dan (e) pada uji aspirin.

Data pada Tabel 4.22 menunjukkan bahwa pengaruh peningkatan konsentrasi senyawa **2a-f** (>10 μ M) bervariasi. Peningkatan konsentrasi senyawa **2a** menjadi 20, 50 dan 100 μ M tidak mempengaruhi aktivitasnya (tidak nyata atau tidak aktif). Peningkatan konsentrasi senyawa **2b**, **2c**, **2e** dan **2f** sampai dengan 50 μ M, meningkatkan aktivitas inhibisi, tetapi kemudian aktivitasnya menurun pada konsentrasi 100 μ M. Senyawa **2d** dengan konsentrasi 20, 50 dan 100 μ M menunjukkan aktivitas inhibisi pada COX-2 yang meningkat. Salah satu faktor penyebab terjadinya penurunan aktivitas pada pemberian inhibitor yang lebih tinggi kemungkinan besar adalah adanya interferensi oleh inhibitor pada reaksi EIA. Adanya interferensi diperkuat oleh fakta bahwa pada pengukuran dengan pengenceran sampel yang berbeda, memberikan hasil % inhibisi yang tidak sama (COX inhibitor, 2011).

Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh senyawa **2c** (konsentrasi 20 μ M) (47,1%), diikuti oleh senyawa **2d** (konsentrasi 100 μ M) (40,7%). Aktivitas tersebut jauh lebih rendah dibandingkan aktivitas selekoksib (inhibisi pada konsentrasi 1 μ M = 77,1%, Table 4.22), namun masih lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan aktivitas sejumlah turunan 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon yang telah diteliti oleh peneliti sebelumnya. Sejumlah turunan 2,3-diaril-4(3H)-kuinazolinon menunjukkan aktivitas sebagai inhibitor COX-

2. Aktivitas terbesar ditunjukkan oleh 2-(4-nitrofenil)-3-(4-tolil)-4(3H)-kuinazolinon dengan inhibisi sebesar 27,72% pada konsentrasi 22 μM (Yadav, Shirude, Parmar, Bataraman dan Giridhar, 2006). Dengan demikian penggantian 3-(4-tolil) dengan 3-(4-metoksifenil) yang diikuti penggantian 2-(4-nitrofenil) dengan 2-[(4-sulfonamidafenil)etenil] pada cincin 4(3H)-kuinazolinon sedikit berpengaruh pada peningkatan aktivitas.

Senyawa **2b**, **2c** dan **2d** pada konsentrasi 10 μM mempunyai aktivitas inhibisi pada COX-2 masing-masing 21,2%, 39,1%, dan 29,2%. Aktivitas senyawa **2c** lebih tinggi dibandingkan aktivitas aspirin (29,7%), tetapi jauh lebih rendah dibandingkan aktivitas selekoksib (77,1% pada konsentrasi 1 μM) (Tabel 4.22).

4.3.3. *Selektivitas Senyawa 2a-f pada COX-2.*

Penentuan selektivitas inhibisi pada COX-2 dibanding pada COX-1 dilakukan dengan menghitung nilai indeks selektivitasnya (IS), yaitu rasio IC_{50} pada COX-1/ IC_{50} pada COX-2 senyawa uji (Rao, Uddin & Knaus, 2004). Pada penelitian ini nilai IC_{50} senyawa **2a-f** tidak diperoleh, karena baik pada COX-1 maupun COX-2, sampai dengan konsentrasi 100 μM tidak menunjukkan inhibisi lebih dari 50%. Selain itu, tidak diperoleh data hubungan konsentrasi dengan % inhibisi yang baik (pada COX-2). Oleh karena itu nilai indeks selektivitas COX-2 senyawa **2a-f** tidak dapat ditentukan dengan cara di atas. Sebagai alternatif, selektivitas dinilai dengan menghitung rasio aktivitas inhibisi pada konsentrasi yang sama (Migliara, Raffa, Plescia, Cusimano & Carbone, 2009; Raffa, Maggio, Plescia, Cascioferro, Raimondi, Plescia & Cusimano, 2009). Peneliti lain tidak melakukan uji pada COX-1 jika IC_{50} yang diperoleh lebih besar dari 10 μM (Paramashivappa, R., Kumar, P.P., Rao, P.V.S., & Rao, A.S. (2003). Perbandingan aktivitas inhibisi senyawa **2a-f** pada COX-1 dan COX-2 dapat dilihat pada Tabel 4.23

Tabel 4.23. Perbandingan Persen (%) Inhibisi Senyawa **2a-f** pada COX-1 dan COX-2

Senyawa	COX-1 (100 μM)	COX-2 (μM)				Rasio % inhibisi COX-2/COX-1 Konsentrasi 100 μM
		10	20	50	100	
2a	28,3	6,3	-27,1	-1,1	3,0	0,1
2b	26,7	21,2	17,4	30,6	12,7	0,5
2c	35,6	39,1	47,1	38,2	26,4	0,7
2d	43,7	29,2	36,3	33,7	40,7	0,9
2e	-4,2	-0,7	27,2	38,4	27,6	>27
2f	0,7	10,8	36,7	33,9	26,2	37

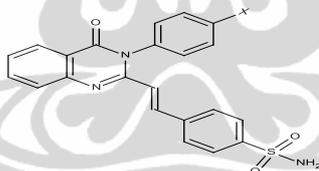
Senyawa **2a** hanya aktif sebagai inhibitor COX-1. Senyawa **2b**, **2c** dan **2d** menunjukkan aktivitas sebagai inhibitor COX-1 dan COX-2. Sedangkan senyawa **2e** dan **2f** hanya aktif sebagai inhibitor COX-2.

4.7 Studi Pemodelan Molekul.

Studi ini bertujuan untuk merasionalisasi hasil uji aktivitas yang diperoleh. Senyawa (ligan) **2a-f** ditambahkan pada protein target COX-2 (kode PDB: 6COX) menggunakan perangkat lunak PLANTS v1.1. Hasil penambatan molekul dapat dilihat pada Tabel 4.24. Berdasarkan data pada tabel tersebut menunjukkan bahwa skor total PLANTS_{CHEMPLP} senyawa **2a** (cincin N3-fenil tidak tersubstitusi) paling tinggi (-61,491). Substitusi dengan gugus metil, metoksi, brom, klor, dan ester etil karboksilat pada posisi para N-3 fenil menurunkan skor total PLANTS_{CHEMPLP}. Hasil penambatan ini sesuai dengan hasil penambatan menggunakan Autodoc 4.0 oleh Setiadjudi (2012). Pose penambatan senyawa **2c** dapat dilihat pada Gambar 4.86 sedangkan pose penambatan senyawa **2a** dapat dilihat pada Gambar 4.1. Hasil pengamatan pada hasil penambatan senyawa **2c** (senyawa uji dengan aktivitas inhibisi tertinggi pada COX-2) dan **2a** (senyawa uji yang tidak mempunyai aktivitas inhibisi pada COX-2) menunjukkan bahwa gugus sulfonamida ligan berinteraksi dengan residu-residu yang sama dari COX-2. Atom O

gugus gugus sulfonamida membentuk ikatan hidrogen dengan gugus NH Phe518. Jarak NH sulfonamida ligan **2a** dan **2c** dengan O keto Arg513 masing-masing 3,6 Å dan 4,5 Å. Namun, jarak gugus keto kuinazolinon ligan **2c** dan **2a** dengan OH Ser530 terdapat perbedaan yang cukup signifikan yaitu 2,73 Å dibandingkan 5,12 Å. Adanya gugus metoksi, juga menyebabkan jarak ligan tersebut dengan cincin fenil Tyr385 lebih dekat (4,7 Å dibanding 5,4 Å). Hal ini menyebabkan interaksi hidrogen antara gugus keto kuinazolinon dengan gugus OH Ser530 dan interaksi hidrofobik antara ligan dengan Tyr385 lebih kuat. Interaksi antara ligan dengan Ser530 dan Tyr385 berperan penting untuk inhibisi COX-2 oleh beberapa senyawa inhibitor (Rowlinsons, S.W. et al., 2003). Hal yang sama diperkirakan terjadi pada senyawa **2b**, **2d**, **2e**, dan **2f**. Faktor inilah yang diperkirakan menjadi penyebab senyawa **2b-f** aktif sebagai inhibitor COX-2, sedangkan senyawa **2a** tidak aktif.

Tabel 4.24. Aktivitas Inhibisi, Sifat Fisika-Kimia dan Hasil Penambatan Molekul Senyawa **2a-f**



Senyawa	X	COX-1	COX-2	Skor ¹⁾ COX-2	ΔG (kkal/ mol) ²⁾	CLog P ³⁾	D-A Ikatan H ⁴⁾
2a	H	Aktif	Inaktif ⁵⁾	-61,491	-8,39	3,62	1-4
2b	CH ₃	Aktif	Aktif	-66,761	-8,86	4,09	1-4
2c	OCH ₃	Aktif	Aktif	-65,256	-8,79	3,37	1-5
2d	Br	Aktif	Aktif	-66,820	-9,73	4,41	1-5
2e	Cl	Inaktif ⁴⁾	Aktif	-66,816	-9,95	4,14	1-5
2f	COOC ₂ H ₅	Inaktif ⁴⁾	Aktif	-73,554	-9,21	4,11	1-5
Selekoksib		Aktif	Aktif	-67.737	-10	3.83	1-6
SC-558		Aktif	Aktif	-75.308	-10,13	4.16	1-7

Keterangan:

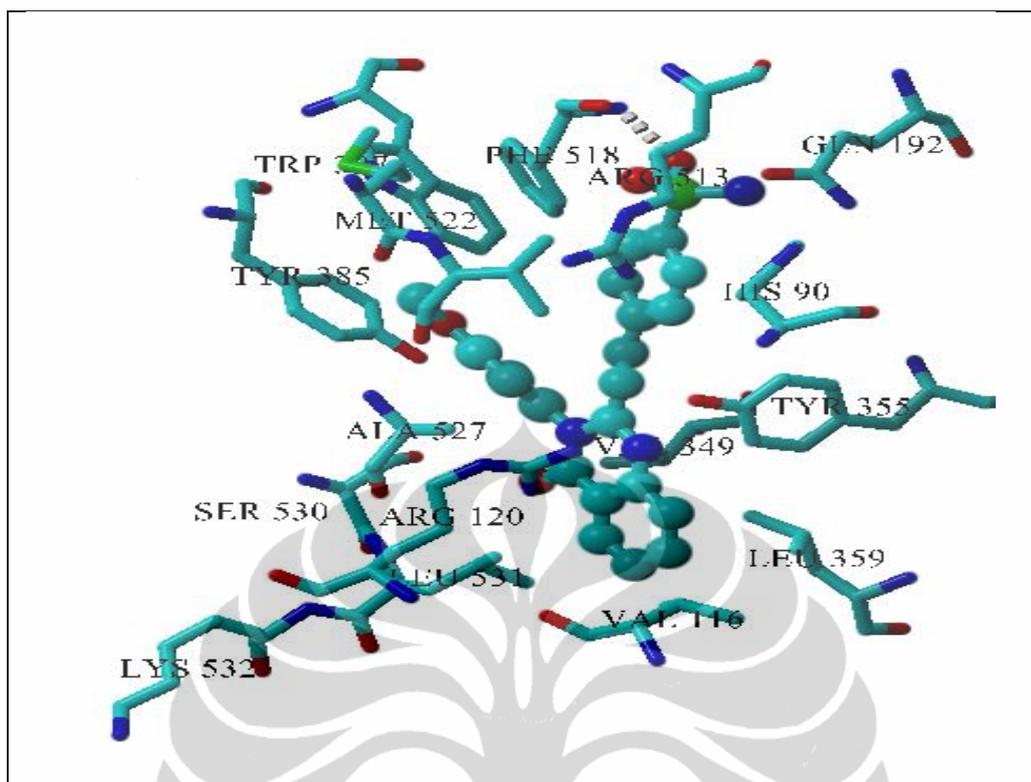
¹⁾ Total skor PLANTS_{CHEMPLP} (Korb, Stutzle & Exner, 2009)

²⁾ Hasil penambatan menggunakan perangkat lunak Autodoc 4.0 (Setiajid, 2012)

³⁾ Log P Hitungan, dihitung menggunakan perangkat lunak Chemaxon's Marvin (Marvin, 5.3.0, 2010)

⁴⁾ Jumlah atom Donor (D)-Akseptor (A) Ikatan Hidrogen

⁵⁾ Persen (%) inhibisi negatif atau < 10%



Gambar 4.86. Orientasi pose penambatan senyawa **2c** (ball & stick) pada sisi aktif dari COX-2. Semua atom hidrogen dihilangkan agar lebih jelas.

Data pada Tabel 4.22 dan 4.24 senyawa **2b-f** aktif sebagai inhibitor COX-2, namun aktivitasnya jauh lebih rendah dibandingkan aktivitas selekoksib dan SC-558, padahal skor interaksi pengikatan ligan-protein (total skor $PLANTS_{CHEMPLP}$) hasil studi pemodelan molekul ligan tersebut hampir sama. Residu-residu COX-2 yang berinteraksi dengan ligan SC-558 dan ligan **2c** hampir sama, namun atom-atom yang berinteraksi dan kekuatan interaksi masing-masing berbeda. Interaksi SC-558 dengan Gln-192 melalui NH sulfonamida dan O (jarak $2,1 \text{ \AA}$), sedangkan ligan **2a** melalui O sulfonamida dengan NH (jarak $2,73 \text{ \AA}$). Gugus O sulfonamida SC-558 berjarak lebih dekat dengan gugus NH guanidina Arg513 dibandingkan ligan **2c** ($3,15 \text{ \AA}$ dibanding $4,65 \text{ \AA}$). Interaksi ligan dengan Arg513 berperan penting untuk aktivitas inhibisi ligan pada COX-2 (Yuniarti, Ikawati & Istyastono, 2011). Faktor di atas kemungkinan yang berperan menyebabkan senyawa **2b-f** aktivitasnya lebih kecil dibandingkan SC-558 atau selekoksib.

Selain itu, pada struktur senyawa **2b-f**, SC-558 dan selekoksib terdapat perbedaan dalam jumlah atom akseptor ikatan hidrogen (pada senyawa **2b-f** jumlahnya lebih sedikit, Tabel 4.19). Hal ini menyebabkan potensi terbentuknya ikatan hidrogen dengan protein target dan dengan air lebih kecil.

Ikatan hidrogen sangat berperan dalam interaksi ligan-protein, disamping ikatan-ikatan lainnya seperti ikatan elektrostatik, hidrofobik, Van der Waals dan kovalen, yang dapat menambah atau menentukan aktivitas biologis ligan. Jumlah ikatan hidrogen antara molekul senyawa kimia dengan air merupakan salah satu faktor yang menentukan kelarutan molekul tersebut dalam air. Air merupakan medium reaksi biokimia. Senyawa kimia harus larut sempurna dalam medium tersebut untuk dapat masuk ke dalam loka aksi protein target (enzim) (Gringauz, 1997). Hasil pengamatan kelarutan dalam air menunjukkan bahwa senyawa **2b-f** lebih kecil kelarutannya dalam air dibanding selekoksib.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan data-data hasil dan pembahasan dalam penelitian yang dilakukan, dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

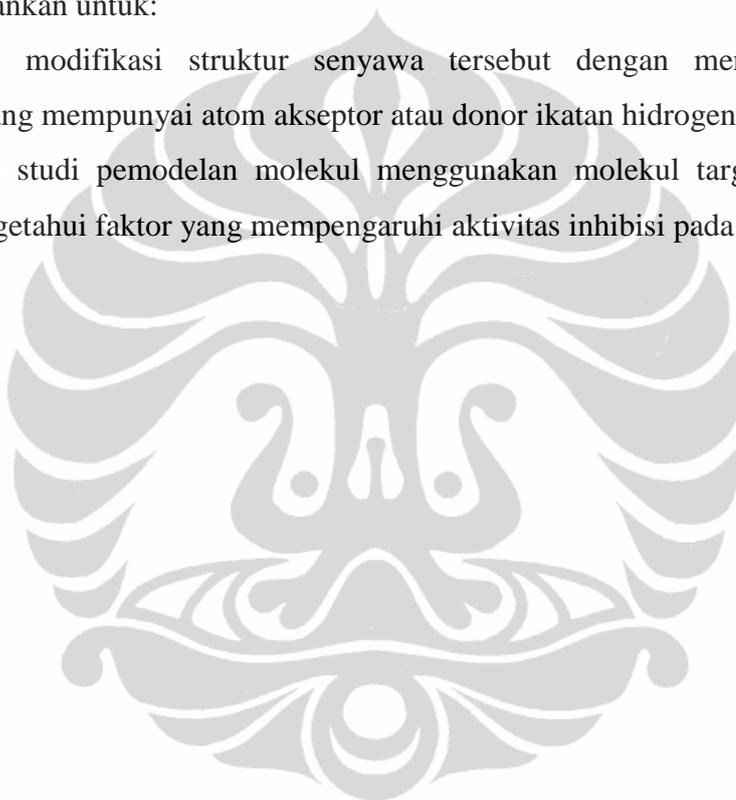
1. Senyawa diarilheterosiklik baru turunan 4(3H)-kuinazolinon yaitu: 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida (**2a**) dan lima analognya (masing-masing tersubstitusi metil (**2b**), metoksi (**2c**), brom (**2d**), klor (**2e**) dan ester etilkarboksilat (**2f**) pada posisi para cincin N3-fenil), telah berhasil disintesis dengan metode sintesis kimia organik. Struktur molekul ke-enam senyawa tersebut telah dikonfirmasi kebenarannya menggunakan spektra UV-visibel, infra-merah, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, LC-MS-ESI+, dan HR-MS-ESI+.
2. Senyawa **2a** hanya aktif sebagai inhibitor COX-1, senyawa **2b**, **2c**, dan **2d** aktif sebagai inhibitor COX-1 dan COX-2, sedangkan senyawa **2e** dan **2f** hanya aktif sebagai inhibitor COX-2.
3. Senyawa **2d** menunjukkan aktivitas inhibisi terbesar pada COX-1 (43,7% pada konsentrasi 100 µM), dan senyawa **2c** menunjukkan aktivitas inhibisi terbesar pada COX-2 (47,1% pada konsentrasi 20 µM).
4. Gugus fungsi pada posisi para cincin N3-fenil meningkatkan aktivitas senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida sebagai inhibitor COX-2. Berdasarkan studi pemodelan molekul, gugus fungsi tersebut meningkatkan afinitas pengikatan pada COX-2. Pada senyawa **2c**, jarak atom O karbonil 4(3H)-kuinazolinon terhadap OH Ser530 menjadi lebih dekat.
5. Aktivitas senyawa **2b-f** sebagai inhibitor COX-2 jauh lebih rendah dibandingkan selekoksib, padahal skor interaksi ligan-protein pada pemodelan molekul relatif sama. Hal ini kemungkinan disebabkan interaksi antara senyawa **2b-f** dengan COX-2 pada residu yang mempunyai peranan penting untuk aktivitas (Arg513) kurang kuat. Selain itu senyawa **2b-f** mempunyai atom akseptor ikatan hidrogen lebih sedikit sehingga kemungkinan

terbentuknya ikatan hidrogen pada interaksi ligan-protein lebih kecil dan kelarutannya dalam medium reaksi (air) lebih rendah.

5.2. Saran

Dalam rangka mengoptimisasi potensi dan selektivitas senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida sebagai inhibitor COX-2 selektif, disarankan untuk:

1. Melakukan modifikasi struktur senyawa tersebut dengan menambahkan gugusan yang mempunyai atom akseptor atau donor ikatan hidrogen.
2. Melakukan studi pemodelan molekul menggunakan molekul target COX-1 untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi aktivitas inhibisi pada COX-1.



PUSTAKA ACUAN

- Addrey, R.E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction*. Wiley & Sons, Inc., Chichester, U.K, p. 98-121.
- Allinger, N.L. (1976). *Organic Chemistry*, 2nd Ed. Worth Publisher, Inc., New York, p. 457-495.
- Ashok, V., Dash, C., Rohan, T.E., Sprafka, J.M., and Terry, P.D. (2011). Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors and Breast Cancer risk, *The Breast*, 20: 66-70.
- Beena, K.P. and Akelesh, T. (2010). Synthesis and Antibacterial Activity of Quinazolinone Derivatives. *In. J. Pharmacy and Pharm. Sci.*, 2 (3) : 166-168.
- Bing, R.J., and Lomnicka, M. (2002). Why Do Cyclo-oxygenase-2 Inhibitors Cause Cardiovascular Events. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 39 : 521. [Abstract].
- Blobaum, A.L. and Marnett, L.J. (2006). Structural and Fungsional Basis of Cyclooxygenase inhibitor. *J. Med. Chem.*, 50 (7) : 1425-1441.
- Bruce, A., 1998, Cyclooxygenase, (http://www.chem.uwec.edu/Webpapers_F98/bruce/bruce.html), diunduh tgl. 29 November 2009.
- Chandra, T., Garg, N., Kumar, A. (2009). Synthesis of Sulpha Drugs Quinazolin-4-one Derivatives and Their Evaluation for Anti-inflammatory Activity. *World J. Chem.*, 4 (2) : 210-218.
- Chandrasekharan, N.V.et al. (2002). COX-3, a Cyclooxygenase-1 Variant Inhibited by Acetaminophen and Other Analgesic/Antipyretic Drugs : Cloning, Structure, and Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (21) : 13926-13931.
- ChemSpider, Database of Chemical Structure and Property Predictions*. (2011). <http://www.chemspider.com/>
- Cheronis, N.D. (1942). *Semimicro and Macro Organic Chemistry*. Thomas Y. Crowell Co., New York, hal. 272.
- Cohen, E., Klarberg, B., and Vaughan Jr, J.R. (1960). Quinazolinone Sulfonamides. A Class of Diuretic Agents. *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (11) : 2731. [Firstpage].

- Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kits, catalog No. 760111.* (2010). Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. <http://www.caymanche.com/pdfs/760111.pdf> .
- Connolly, D.J.; Cusack, D.; O'Sullivan, T.P.; Guiry, P.J. Synthesis of quinazolinones an quinazolines. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10153-10202
- Coombs, R.V. et al. (1973). Synthesis and Anti-inflammatory Activity of 1-Alkyl-4-Aryl-2(1H)-Quinazolinones and Quinazolinethiones. *J. Med. Chem.*, **16** (11) : 1237. [Firstpage].
- Coruzzi, G., Venturi, N., and Spaggiari, S. (2007). Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitor and beyond. *Acta Biomed.* ,**78** : 96-110.
- COX Inhibitor Screening Assay Kits, catalog No. 560131.* (2011). Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. <http://www.caymanche.com/pdfs/560131.pdf> .
- Craig, P.N. (1994). Petunjuk Bagi Rancangan Obat dan Analognya. Dalam Wolff, M.E. (Ed). *Asas-asas Kimia Medisinal*, edisi IV (Mulyadi, Sabikis dan Sumarno, Penerjemah). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, p. 349-366.
- Dubois, R.N. et al. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, **12** : 1063-1073.
- Eid, A.I., Aboul-Enein, M.N., El-difrawy, S., Bibers, M., and El-Hawary, S. (1979). Synthesis and Antibacterial Activity of some 4(3H)-Quinazolinones. *Eur. J. Med. Chem. – Chimica Therapeutica*, **14** (5) : 463-466.
- Elliot, M.L., Welch, W.M., and Chenard, B.L. (2001). 2,3-Disubstituted-4(3H)-Quinazolinones. *United States Patent*, Patent No.: **US 6,303,615 B1** (Oct. 16). (<http://www.patentstorm.us>)
- Errede, L.A. (1976). Acylantranils.1. The Pathway of Quinazolinone formation in the Reaction of Acylantranils with Anilines. *J. Org. Chem.*, **41** (10) : 1763-1765.
- Errede, L.A., and McBrady, J.J. (1977). Acylantranils. 5. Reaction of Acetylantranil with β -Substituted Amines that Associate by Intermolecular Hydrogen Bonding. *J. Org. Chem.*, **42** : 3863. [Firstpage].

- Errede, L.A., McBrady, J.J., and Tiers, G.V.D. (1980) Acylanthranils.10. Influence of Hidrogen Bonding on Hydrolysis of Acetylanthranil in Organic Solvents. *J. Org. Chem.*, **45** : 3868. [Firstpage].
- Errede, L.A., Ashley, P.E., McBrady, J.J., and Yarian, D.R. (1982). Acylanthranils. 11. Reaction of Acylanthraanils with Alcohols To Bive the Corresponding Esters. *J. Org. Chem.*, **47** : 3825. [Firstpage].
- Es, van T and Staskun, B. (1988). Adehydes from Aromatic Nitriles: 4-Formylbenzenesulfonamide. *Organic Syntheses Coll.* , **6** : 631-633.
- Faller, B. (2008). Physicochemical Profiling in Early Drug Discovery : New Challenges at the Age of High-Throughput Screen and Combinational Chemistry, in *Chemistry and Molecular Aspects of Drug Design and Action* (Rekka, E.A. and Kourounakis, P.N., Editor). CRC Press, Boca Raton, FL, p. 303–312.
- Fernandez de Arriba, A. et. al. (1999). Inhibiton of Cyclooxygenase-2 Expression by 4-Trifluoromethyl Derivatives of Salicylate, Triflusal, and Its Deacetylated Metabolite, 2-Hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic Acid. *Mol. Pharm.*, **55** : 753-760.
- Flower, R.J. (2003). The Development of COX-2 Inhibitor. *Nature Reviews, Drug Discovery*, **2** : 179-191.
- Foye, W.O. (Ed) (1995/1996). *Prinsip-prinsip Kimia Medisinal*. Edisi II (Raslim Rasyid dkk., Penerjemah) Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, p. 13-91 dan p.1095-1147.
- Funk, C.D. and FitzGerald, G.A. (2007). COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk. *J. Cardivasc Pharmacol*, **50** (5): 470-479.
- Furniss, B.S. et al. (1989). *Vogel's Texbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed. Longmann Group Ltd. England, London, p. 877-884; 938-1003.
- Goodsell, D.S. (2000). Fundamental of Cancer Medicine. The Molecular Perspective : Cyclooxygenase-2, *The Oncologist*, **5** : 169-171 (<http://www.TheOncologist.com>)
- Gringauz, A. (1997). *Introduction to Medicinal Chemistry : How Drugs Acts and Why*. Wiley-VCH, New York, p. 1-13; 161-165.
- Gupta, V.; Kashaw, S.K.; Jatav, V.; Mishra, P. Synthesis and antimicrobial activity of some new 3-[5-(4-substituted)phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-yl]-2-styrylquinazoline-4(3H)-ones. *Med. Chem. Res.* **2008**, *17*, 205-211.

- Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., and Hudiyono, S. (2011). Virtual Screening of 2,3-Disubstituted-4(3H)-Quinazolinones Possessing Benzenesulfonamide Moiety for COX-2 Inhibitor. *Bioinformation*, **7**(5): 246-250.
- Hickinbottom, W.J. (1957). *Reactions of Organic Compounds*, 3rd Ed., Longmans, Green and Co., London, p. 493.
- Hitkari, A.; Bhalla, M.; Saxena, A.K.; Verma, M.; Gupta, M.P.; Shanker, K. (1995). Substituted quinazolinones and their anti-inflammatory activity. *Boll Chim Farm.*, **134**: 609-615.
- Hussain, M.A., Chiu, A.T. Price, W.A., Timmermans, P.B., and Shefter, E. (1988). Antihypertensive Activity of 2[(2-Hydroxyphenyl)amino]-4(3H)-quinazolinone. *Pharm. Res.*, **5** (4) : 242. [Firstpage].
- Introduction to Drug Discovery*. (2005). Molegro ApS, p. 1-9.
(<http://www.molegro.com>).
(http://www.daini.au.dk/~cstorm/courses/aiBTaS_e08/papers/Molegro2005_DrugDiscovery.pdf).
- Irwin, J.J. and Shoichet, B.K. (2005). ZINC – A free database of Commercially Available Compounds for virtual screening. *J. Chem. Inf. Model*, **45**(1), 177-82. <http://zinc.docking.org/>.
- Istiyastono, E.P. (2009). *Pelatihan Pemodelan Molekul*.
<http://www.molmod.org>.
- Jatav, V., Mishra, P., Kashaw, S. and Stables, J.P. (2008), Synthesis and CNS depressant activity of some novel 3-[5-substituted 1,3,4-thiadiazole-2-yl]-2-styryl quinazoline-4(3H)-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 135-141.
- Jorgensen, W.L. (2004). The Many Role of Computation in Drug Discovery. *Science*, **303** : 1813-1818.
- Kazakevich, Y. and LoBrutto, R. (Ed) (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, p. 303-311.
- Khajavi, M.S., Montazari, N. and Hosseini, S.S.S. (1997). Reaction of Antranilic Acid with Orthoesters : a New Facile One-pot Synthesis of 2-Substituted 4H-3,1-Benzoxazin-4-ones. *J. Chem. Res.(S)* : 286-287.
- Kohli, D., Hashim, S.R., Vishal, S., Sharma, M., and Singh, A.K. (2009). Synthesis and Antibacterial Activity of Quinazolinone Derivatives. *Int. J. Pharmacy and Pharm. Sci.*, **1** (1) : 163-16.

- Kolb, P., Ferreira, R.S., Irwin, J.J., and Shoichet, B.K. (2009). Docking and Chemoinformatic screens for new ligands and targets. *Curr. Opin. in Biotech.*, **20** : 429-436.
- Korb, O., Stutzle, T. and Exner, T.E. (2007). An Ant Colony Optimization Approach to Flexible Protein-Ligand Docking. *Swarm Intell* 1: 115-134.
- Korb, O., Stutzle, T. and Exner, T.E. (2009). Empirical Scoring Function for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. *J.Chem. Inf. Model.*, **49** : 84-96.
- Krieger E, Koraimann G, Vriend G. (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a Self-Parameterizing Force Field. *Proteins*, **47** (3) : 393-402.
- Kurumbail, R.G. et al. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents, *Nature*, **384** (19/26) : 644-648.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. and Feeney, P.J. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and development Settings. *Adv Drug Del Rev* , **23** : 3-25 [PPT : Lipinski's rule of five]
- Little, D., Jones, S.L., and Blikslager, A.T. (2007). Cyclooxygenase (COX) Inhibitor and the Intestine. *J. Vet. Intern. Med.*, **21** : 367-377.
- Mariler, M.M. and Eggimann, B.S. (2005). The prevalence of Rheumatic Diseases in Elderly in Developed Countries an Its Evolution Over Time. *Int. J. of Public Health*, **50** (1) : 45-51.
- Marvin 5.3.0 (2010). Chemaxon. <http://www.chemaxon.com> .
- Migliara, O., Raffa, D., Plescia, S., Cusimano, M.G., & Carbone, A. (2009). Synthesis and COX inhibition of 7-R1-8-R2-1-ethyl-3,4-dimethyl-4,10-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-c][1,5]benzodiazocine-5,11-diones. *Arkivoc* (ii), 1-10.
- Misra, VS., Singh, C., Agarwal, R., and Chaudhary, KC. (1981). Synthesis of 2-Styryl-3,6,8-Trisubstituted Quinazolin-4(3H)-ones as antiinflammatory Agents. *J. Chem Soc Pak.* **3** (4) : 209-213.
- Meiyyanathan, S.N., (2006). Chemistry of Quinazolinones. *Pharmainfo.net*, **3** (3). (<http://www.pharmainfo.net/reviews/chemistry-quinazolinones>), August 20, 2010.

- Moitessier, N., Englebienne, P., Lee, D., Lawandi, J. & Corbeil, C.R. (2008). Toward the Development of Universal, Fast, and Highly Accurate Docking/Scoring Methods : a long way to go. *Br. J. Pharmacol.*, **153** : S7-S26.
- Mohamed, MS., Kame, MM., Abotaleb, N., Nofal, SM, and Ahmed, MF.(2009). Novel 3-(p-Substituted phenyl)-6-bromo-4(3H)-quinazolinone Derivatives of Promising Anti-inflammatory and Analgesic Properties. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **66** (5) : 487-500.
- Mosaad, M.S., Mohsen, K.M., Emad, K.M.M., Abotaleb, N., Salwa, N.M., and Marwa, A.F., (2010). Novel 6,8-Dibromo-4(3H)-Quinazolinone derivatives of Promising Anti-inflammatory and analgesic Properties. *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, **67** (2) : 159-171.
- Mukherjee, D., Nissen, S.E., and Topol, E.J. (2001). Risk of Cardiovascular Events Associated with Selective COX-2 Inhibitors. *JAMA*, **286** (8) : 954. [Abstract] [Special Communication].
- Nagase, T. et al. (2008). Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Biological Profile of a Quinazolinone Class of Histamine H3 Receptor Inverse Agonist. *J. Med. Chem.*, **51** (15) : 4780-4789.
- Nograpy, T. And Weaver, D.F. (2005). *Medicinal Chemistry : A Molecular and Biochemical Approach*, 3rd Ed. Oxford University Press, Inc. Cary, NC, USA, p. 106-162
- Nurrochmad, A, Supardjan, A.M, and Sardjiman. (1998). Penghambatan Siklooksigenase oleh Siklovalon dan Tiga Senyawa Analognya. *Majalah Farmasi Indonesia*, **9** (4) : 180-185
- O'Neil, M.J. et al. (ed) (2006). *The Merck Index*. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, USA, p. 1385
- Ogawa, N., Yoshida, T., Aratani, T., Koshinaka, E., Kato, H., and Ito, Y. (1988). Synthesis and Histamine H2-Antagonist Activity of 4-Quinazolinone Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (8) : 2955-2967.
- Paramashivappa, R., Kumar, P.P., Rao, P.V.S., and Rao, A.S. (2003). Design, synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole/Benzothiazole and Benzoxazole derivatives as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorg. & Med Chem Let*, **13**, 657-660.
- Picot, D. , Loll, P.J. and Garavito, R.M. (1994), The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1, *Nature*, **367** (6460)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8121489?dopt=Abstract>;
<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1cqe/summary.html>

- Prasojo, S.L., Hartanto, F.A.D., Yuniarti, N., Ikawati, Z., and Istyastono, E.P. (2010), Docking of 1-Phenylsulfonamide-3-trifluoromethyl-5-parabromophenyl-pyrazole to Cyclooxygenase-2 Using PLANTS, *Indo. J. Chem.*, **10** (3), 348-351.
- Raffa, D., Maggio, B., Plescia, F., Cascioferro, S., Raimondi, M.V., Plescia S., & Cusimano, M.G. (2009). Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Derivatives as COX-2 Selective Inhibitor: Synthesis and Molecular Modelling Studies. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 342, 321-326.
- Raghavendra, N.M., Thampi, P.P., and Gurubasavarajaswamy, P.M. (2008). Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Substituted Piperazinyl-quinazolin-4(3H)-one. *E-Journal of Chemistry*, **5** (1) : 23-33.
- Rajveer, C.H., Kumaraswamy, D., Sudharshini, S., and Rathinraj, B.S. (2010). Synthesis of Some 6-BromoQuinazolinone derivatives for Their Pharmacological Activities. *Int. J. Pharma and BioSci.*, **1** (3) : 1-9.
- Rao, P.N.P. and Knaus, E.E. (2008). Evolution of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) : Cyclooxygenase (COX) inhibition and Beyond. *J. Pharm. and Pharmaceut. Sci.*, **11** (2) : 81s-110s.
- Rao, P.N.P., Uddin, Md. J., and Knaus, E.E. (2004). Design, Synthetis, and Structure-Activity Relationship Studies of 3,4,6-Triphenylpyran-2-ones as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **47** (16) : 3972-3990.
- Refaie, F.M., Esmat, A.Y., Gawad, S.M.A., Ibrahim, A.M., and Mohamed, M.A. (2005). The Antihyperlipidemic Activity of 4(3H)-Quinazolinone and Two Halogenated Derivatives in Rats. *Lipid Health Dis.*, **4** (22) : 1476-1511.
- Revanasiddappa, H.D., Prasad, K.S., Kumar, L.S., and Jayalakshmi, B. (2010). Synthesis and Biological Activity of New Schiff Bases Containing 4(3H)-Quinazolinone Ring System. *Int. J. ChemTech Res.*, **2** (2) : 1344-1349.
- Rowlinsons, S.W. et al. (2003). A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interaction with Ser-530 and Tyr-385. *J. Biol. Chem.*, **278** (46), 45763-45769.
- Sardjoko (1993). *Rancangan Obat*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

- Schneider, G., & Bohm, H-J. (2002). Virtual Screening and Fast Automated Docking Methods. *DDT*, **7** (1) :64-70.
- Segev, G. and Katz, R.J. (2004). Selective COX-2 Inhibitors and Risk of Cardiovascular Events. *Hospital Physician*, Feb : 39-46.
- Selvam, P., Babu, K., Padamraj, R., Persoons, L., and De Clercq, E. (2008). Synthesis, Antiviral and Cytotoxic Activities of some Novel 2-Phenyl-3-Disubstituted Quinazolin-4(3H)-ones. *Afr. J. Pharm. and Pharmacol.*, **2** (6).
- Setiajid, M.A. (2012). Analisis dinamika molekuler hasil penambatan molekul kompleks siklooksigenase-2 dengan beberapa senyawa 3-phenil-2-stiril-4(3H)-quinazolinon tersubstitusi sulfonamida atau sulfasetamida. Depok, Skripsi Sarjana Departemen Farmasi FMIPA-UI.
- Simmons, D.L., Chandrasekharan, N.V., Hu, D., Roos, K.L. and Tomsik, J. (2005). Comments on “Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fiction, and Uncertainties”. *J Pharmacol Exp Ther*, **315** (1): 1-7.
- Shukla, J.S., Singh, H.H. and Parmar, S.S. (1967). Effect of 2-methyl-3-(4'-acetylphenyl)-4-quinazolones on oxygen uptake in rat brain homogenates containing pyruvic acid. *Can. J.Chem.*, **45** : 2284-2286
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Smith, W.L., Garavito, L.M. dan DeWit, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **271** (52) : 33157-33160.
- Stouten, P.F.W, and Kroemer, R.T. (2007). Docking and Scoring. In P.F.W. Stouten (Ed). *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Vol. 4. Elsevier Ltd, London, p. 255-281.
- Suthakaran, R., Kavimani, S., Venkappayya, D., Sakina F., and Suganthi, K. (2008). Inflammation : Synthesis and Pharmacological Investigation of some New 4(3H)-Quinazolinone Analogs as Antioxidant, Antihistaminic, Anti-inflammatory and Antitumor Agents. *Rasayan J. Chem.*, **1** (1) : 263-275.
- Suthakaran, R., Kavimani, S., Venkaiaiah, P., and Suganthi, K. (2008). Synthesis and Antimicrobial Activity of 3-(2-(4Z)-4-Substituted Benzylidene-4,5-Dihydro-5-Oxo-2-Phenyl Imidazol-1-yl)Ethyl)-6,8-

Un/Dibromosubstitut-ed-2-SubstitutedQuinazoline-(3H)-one. *Rasayan J. Chem.*, **1** (1) : 22-29.

Tani, J., Yamada, Y., Oine, T., Ochiai, T., Ishida, R., and Inoue, I. (1979). Studies on Biologically Active Halogenated Compound. 1. Synthesis and Central Nervous System Depressant Activity of 2-(Fluoromethyl)-3-Aryl-4(3H)-Quinazolinone Derivatives. *J. Med. Chem.*, **22** (1) : 95. [Firstpage].

Thilagavathi, R., Kavitha, H.P., Arulmozhi, R., and Babu, S.M. (2009). Synthesis of 3-{4-[4-(Benzylideneamino)benzenesulfonyl]-phenyl}-2-phenylquina-zolin-4(3H)-one. *Molbank*, M589 [Open Acces].

Thomas, G. (2007). *Medicinal Chemistry : An Introduction*, 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 9-14.

Tonkikh, N.N., Petrova, M.V., Mishnev, A.F., Ryzhanova, K.V. Avotin'sh, F.M., and Strakov, A.Ya. (2000). 4(3H)-Quinazolinones Containing Heterocyclic Group in position 3. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **36** (7) : 822. [Firstpage].

Uddin, Md. J., Rao, P.N.P., and Knaus, E.E. (2003). Design and Synthesis, Novel Celecoxibs Analogues as Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors : Replacement of Sulfonamido Pharmacophore by a Sulfonylazide Bioisostere. *Bioorg. Med. Chem.*, **11** : 5273-5280.

Varma, R.S.; Bahadur, S.; Agnihotri, A.K. (1981). Synthesis of some 6-bromo-3-[(arylamino)methyl]- and 2-styryl-3-[4'-(carboalkoxy) phenyl]-4(3H)-quinazolinones. *J. Chem. Eng. Data*, **26**, 103-104.

Walker, M.C et al. (2001). A Three-step Kinetic Mechanism for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Diarylheterocyclic Inhibitor. *Biochem. J.*, **357** : 709-718.

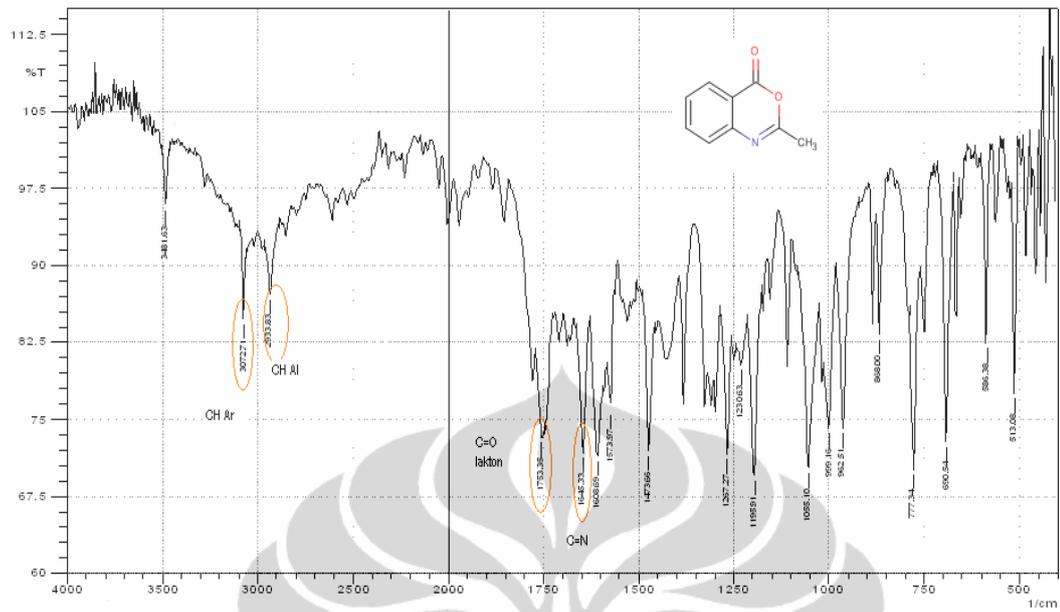
Warner, T.D. and Mitchell, J.A. (2002), Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum?, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (21) : 13371-13373

Warren, S. (1982). *Organic Synthesis : The Disconnection Approach*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 1-5; 66-74.

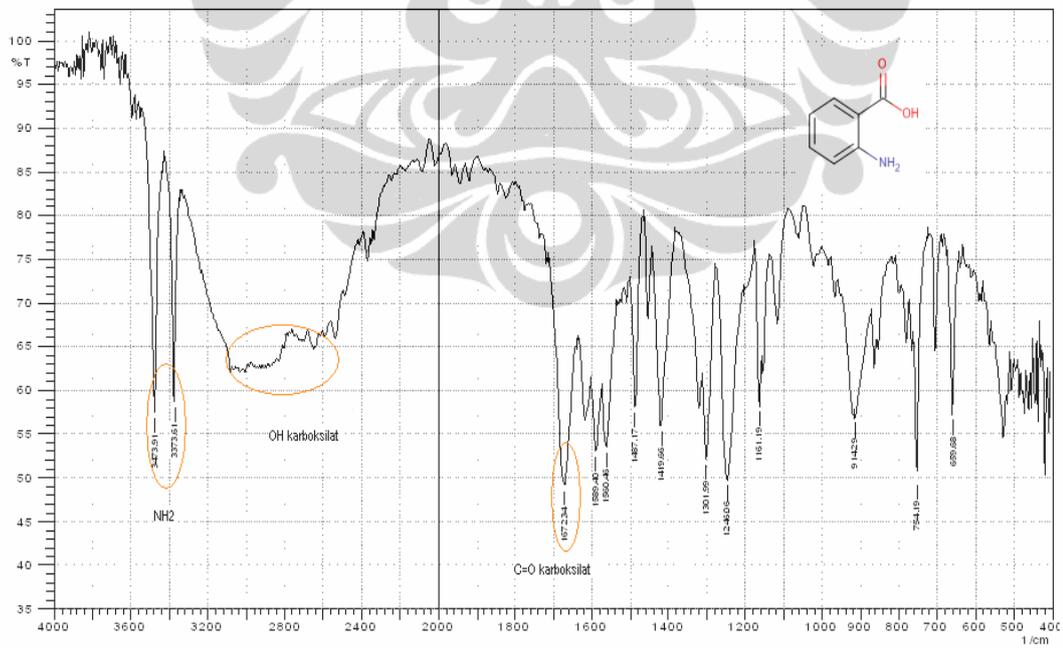
Webb, k., Bristow, T., Sargent, M, and Stein, B. (2004). Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules. LGC Limited, Teddington, UK.

Wiklund, Per. (2004). *Synthesis of Heterocycles from Anthranilic acid and its Derivatives*. Karolinska University Press, Stockholm, Sweden

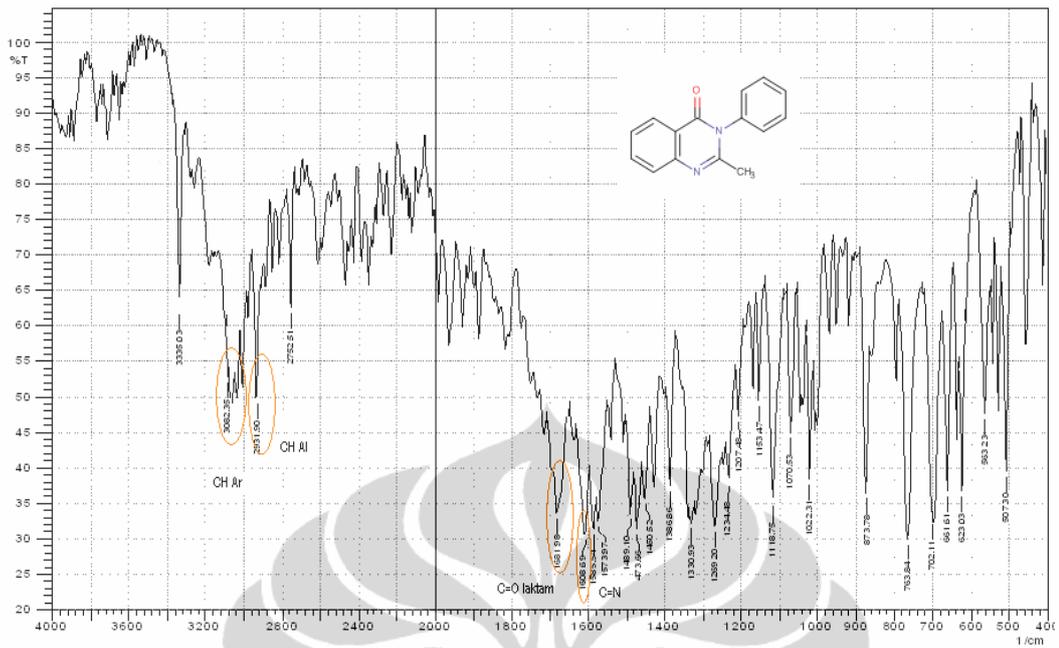
- Williams, D.H. and Fleming, I. (1980). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. Mc. Graw-Hill Book Co. Ltd., London, p. 22-32.
- Wolff, M.E. (Ed). (1981). *Burger's Medicinal Chemistry*, 4th ed., part III. John Wiley and Sons, New York, p. 1205-1227.
- Wolfe, J.F., Rathman, T.L., Sloovi, M.C., Campbell, J.A., and Greenwood, T.D. (1990). Synthesis and Anticonvulsant Activity of some New-2-Substituted 3-Aryl-4(3H)-Quinazolinones. *J. Med. Chem.*, **33** : 161. [Firstpage]
- Yadav, M.R., Shirude, S.T., Parmar, A., Bataraman, R., and Giridhar, R. (2006). Synthesis and anti-inflammatory Activity of 2,3-Diaryl-4(3H)-Quinazolinones. *Chemistry of Heterocyclic Compound*, **42** (8) : 1038-1045.
- Yang, Li-M, Lin, Shwu-J., Hsu, Fen-L and Yang, Tsang-H. (2002). Antitumor Agents. Part 3: Synthesis and Cytotoxicity of New trans-Stilbene Benzenesulfonamide Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 1013-1015.
- Yuniarti, N., Ikawati, Z., and Istyastono, E.P. (2011). The Important of Arg513 as hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitors in virtual screening campaign. *Bioinformation*, **6**(4), 164-166
- Zargi, A., Rao, P.N.P. and Knaus, E.E. (2007). Design and Synthesis of New Rofecoxib analogs as Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors : Replacement of the Methanesulfonyl Pharmacophore by an N-Acetylsulfonamido Bioisostere. *J. Pharm. and Pharmaceut. Sci.*, **10** (2) : 159-167.



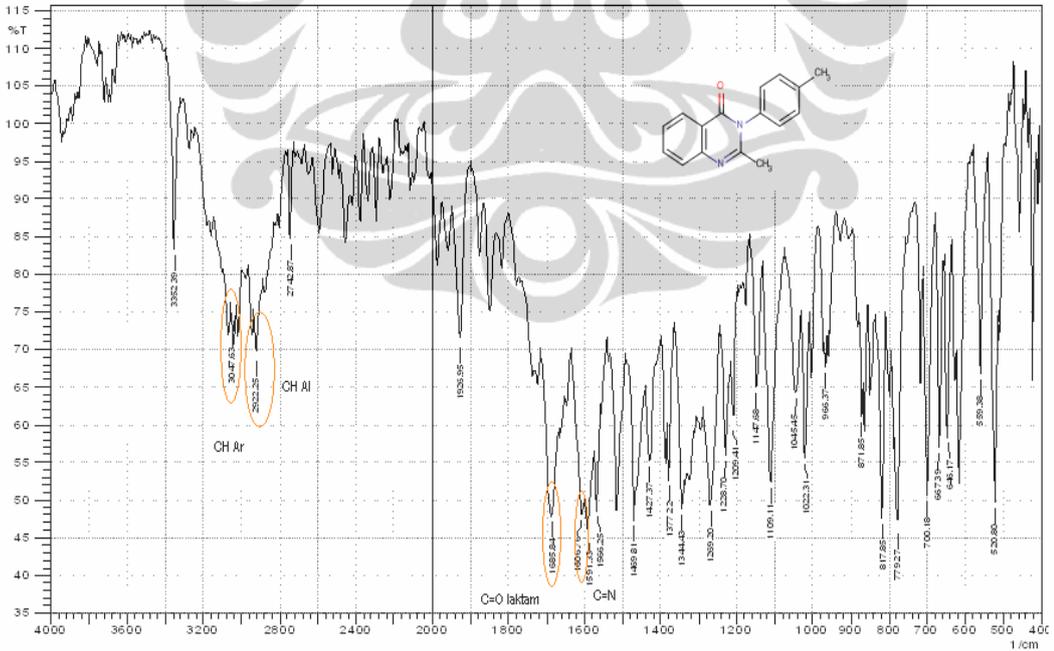
Gambar 4.6. Spektra FT-IR senyawa 5 dalam KBr.



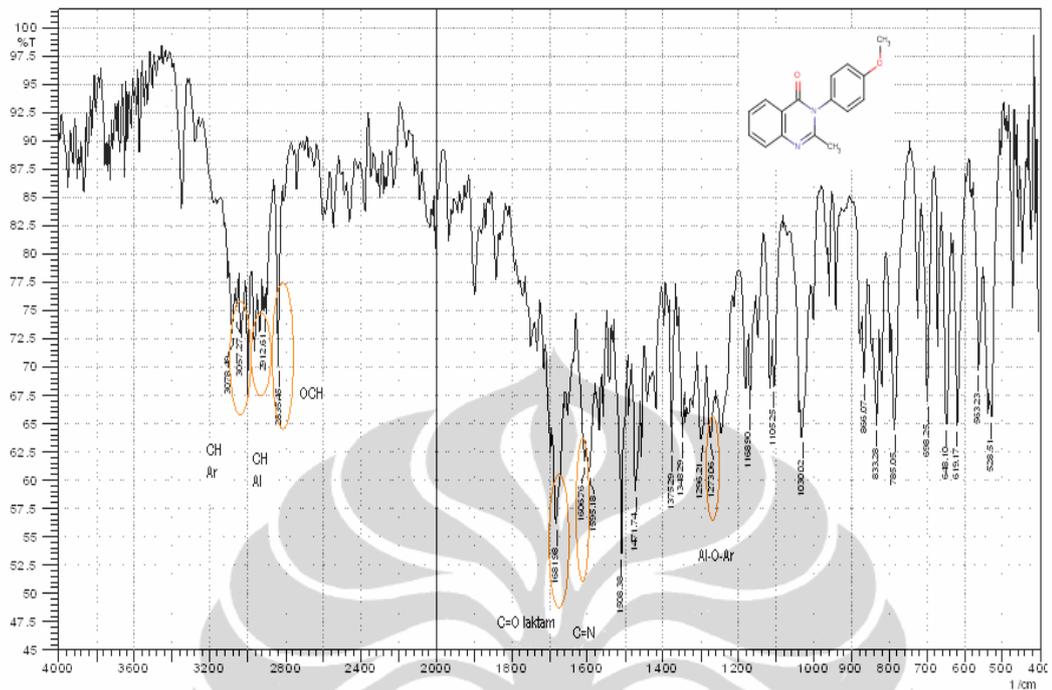
Gambar 4.7. Spektra FT-IR Asam Antranilat, dalam KBr



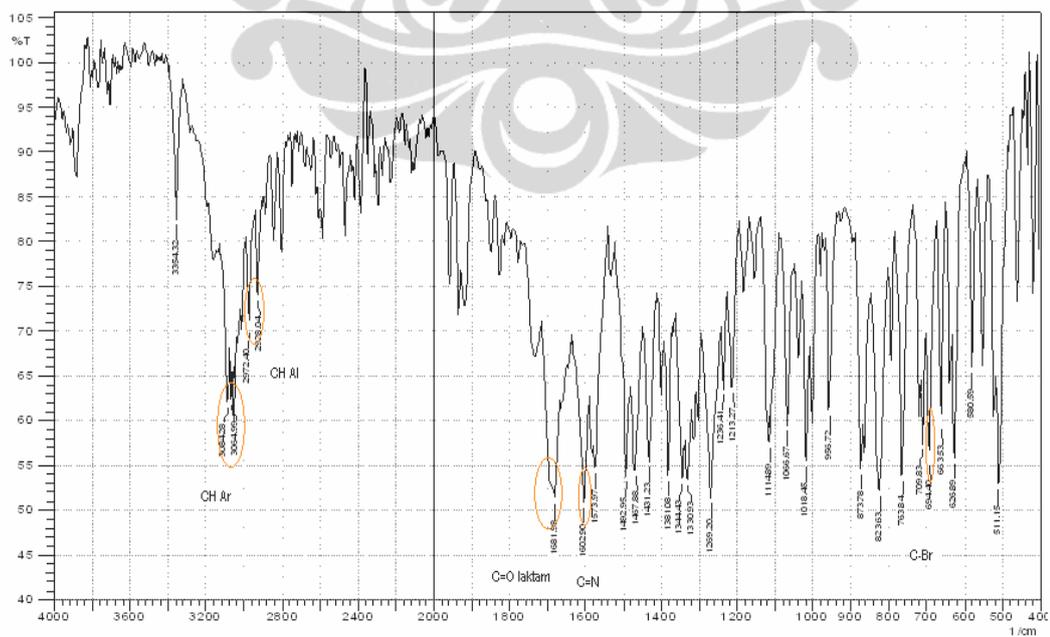
Gambar 4.10. Spektrum FT-IR senyawa **3a** dalam KBr



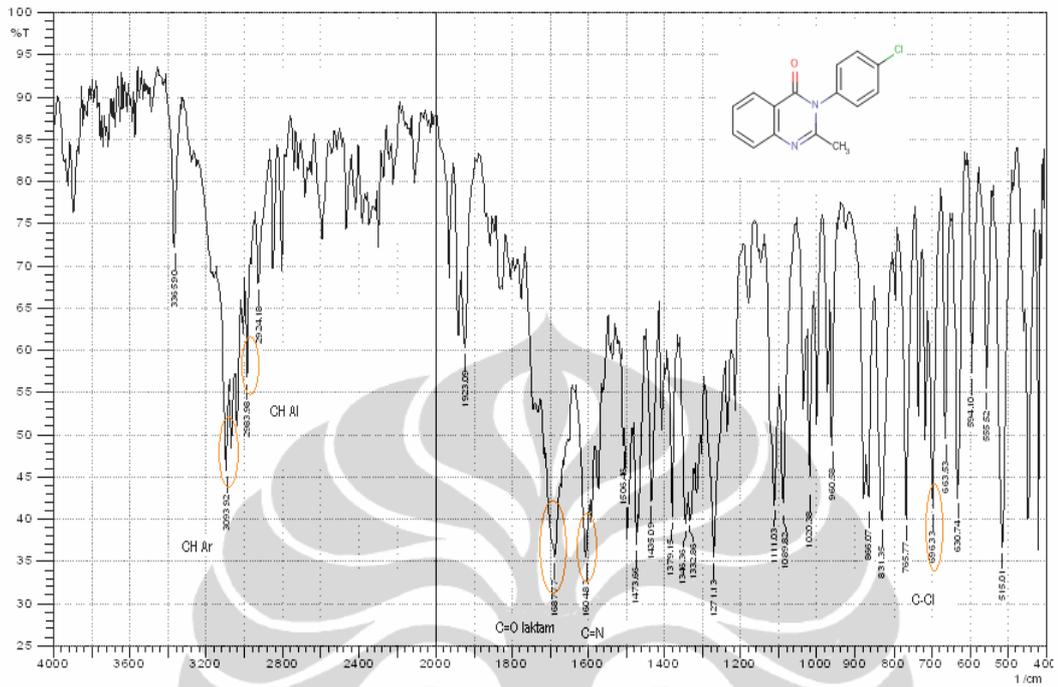
Gambar 4.11. Spektrum FT-IR senyawa **3b** dalam KBr



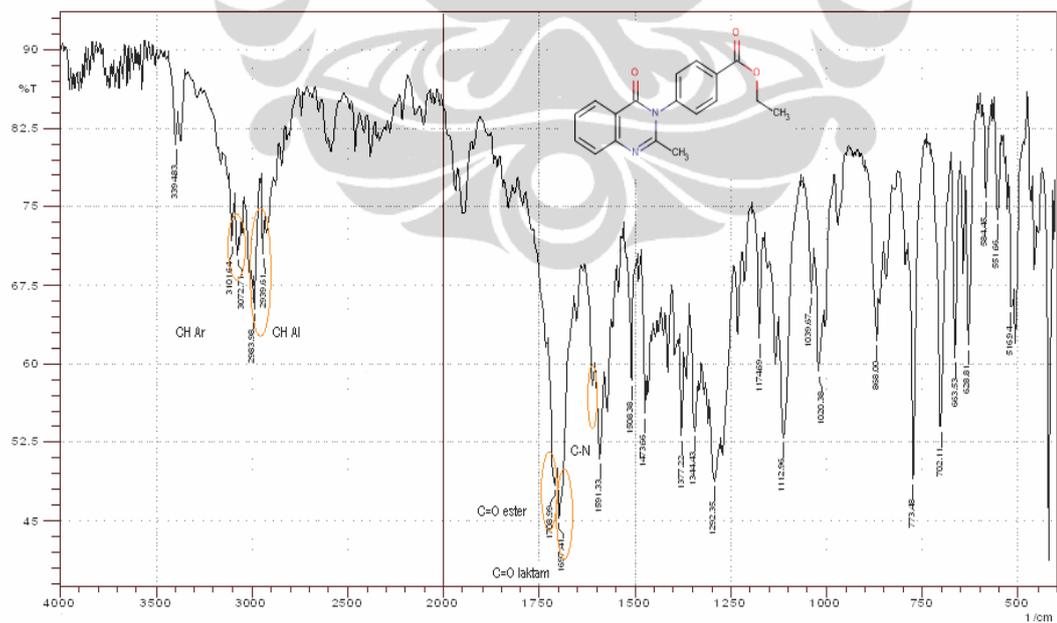
Gambar 4.12. Spektrum FT-IR senyawa 3c dalam KBr



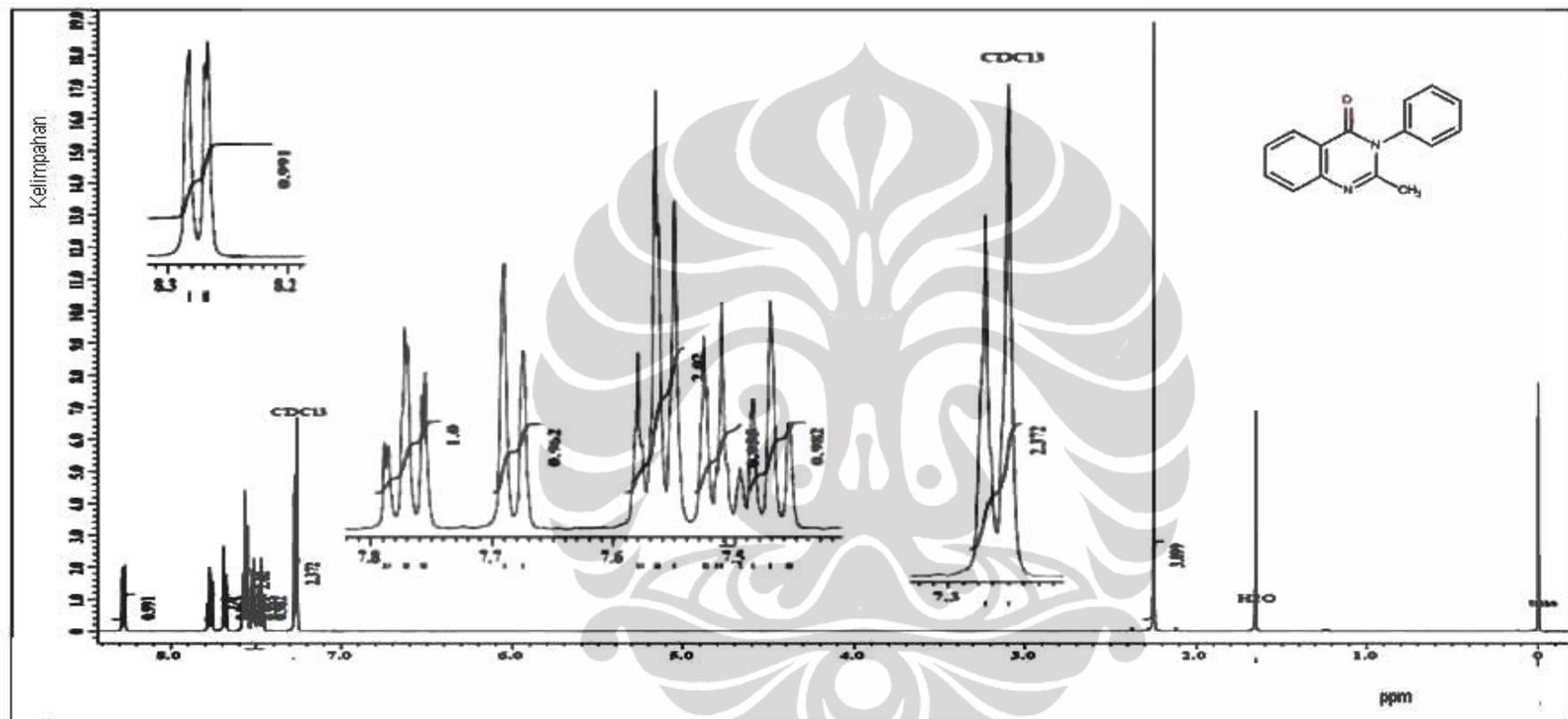
Gambar 4.13. Spektrum FT-IR senyawa 3d dalam KBr



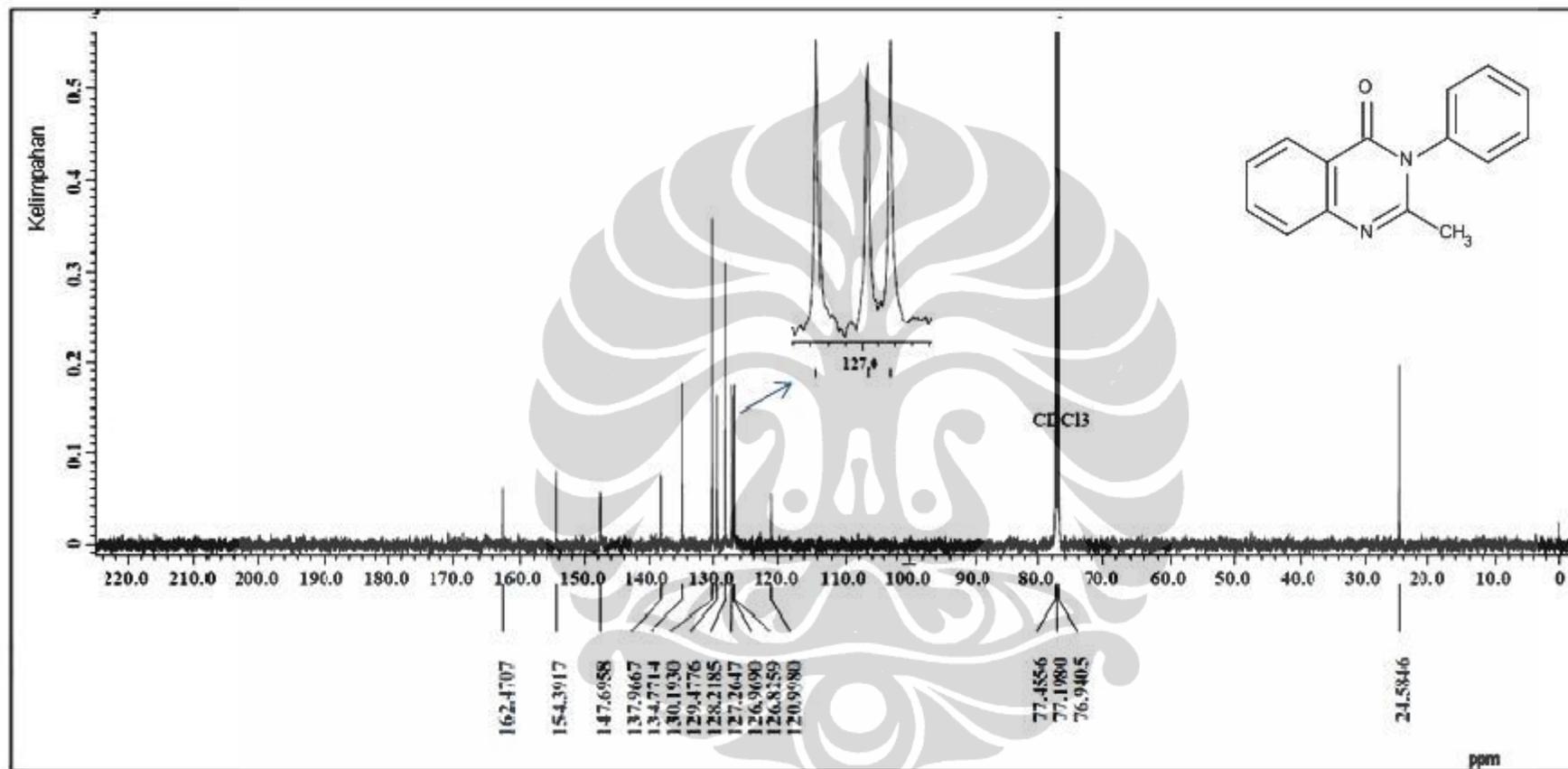
Gambar 4.14. Spektrum FT-IR senyawa **3e** dalam KBr



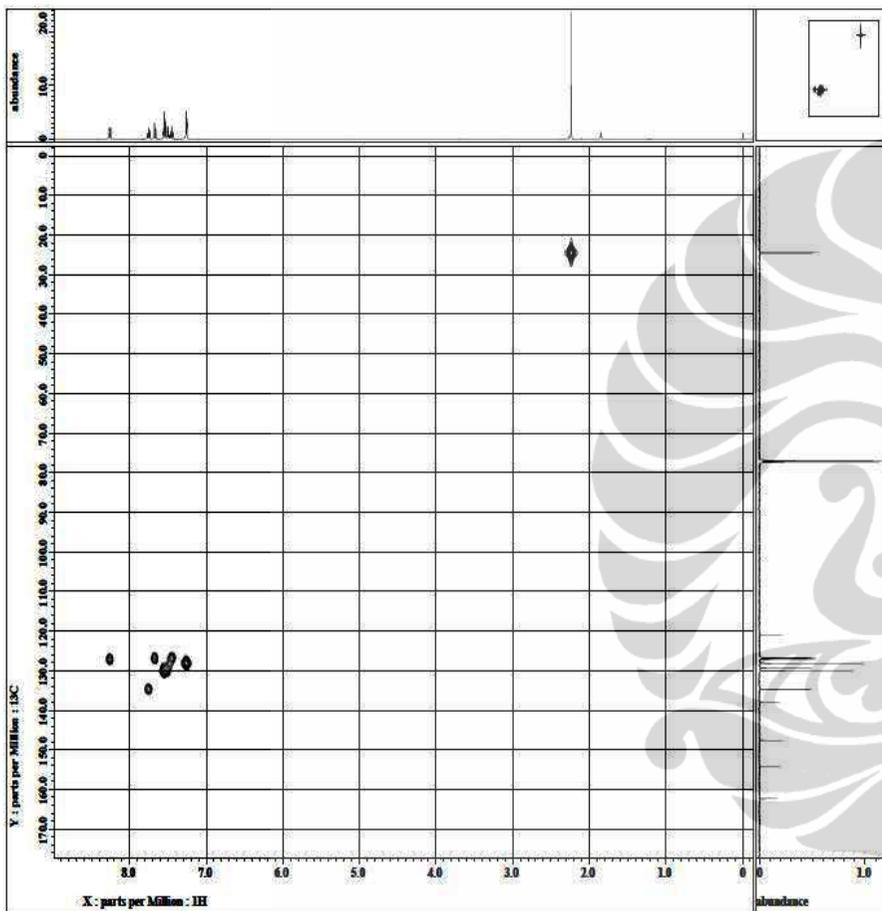
Gambar 4.15. Spektrum FT-IR senyawa **3f** dalam KBr



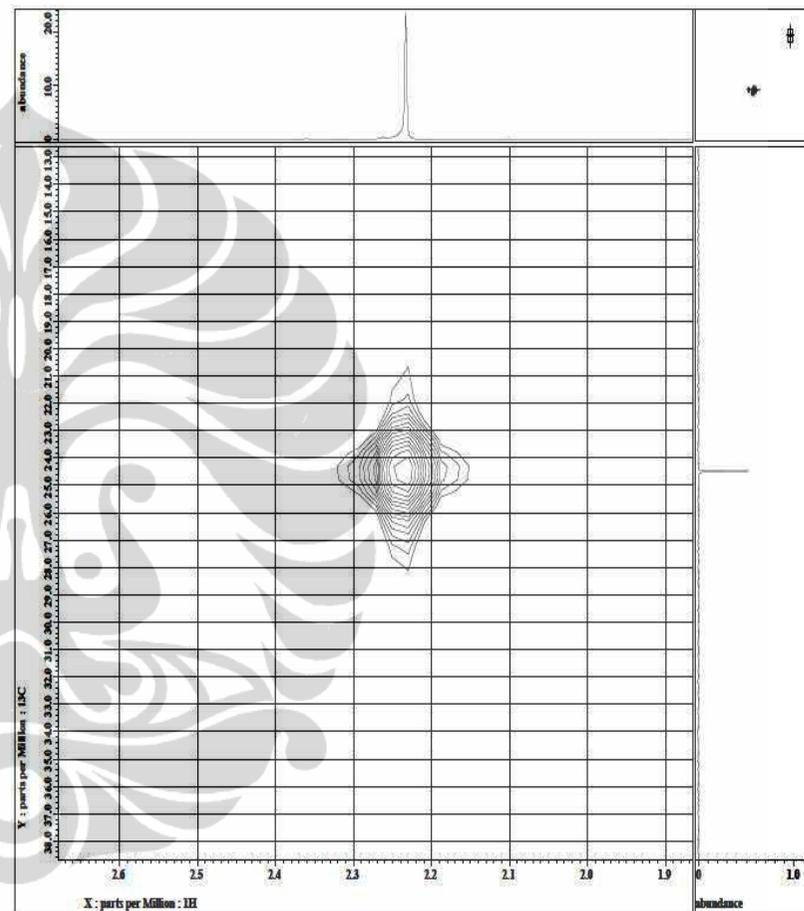
Gambar 4.16. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3a** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



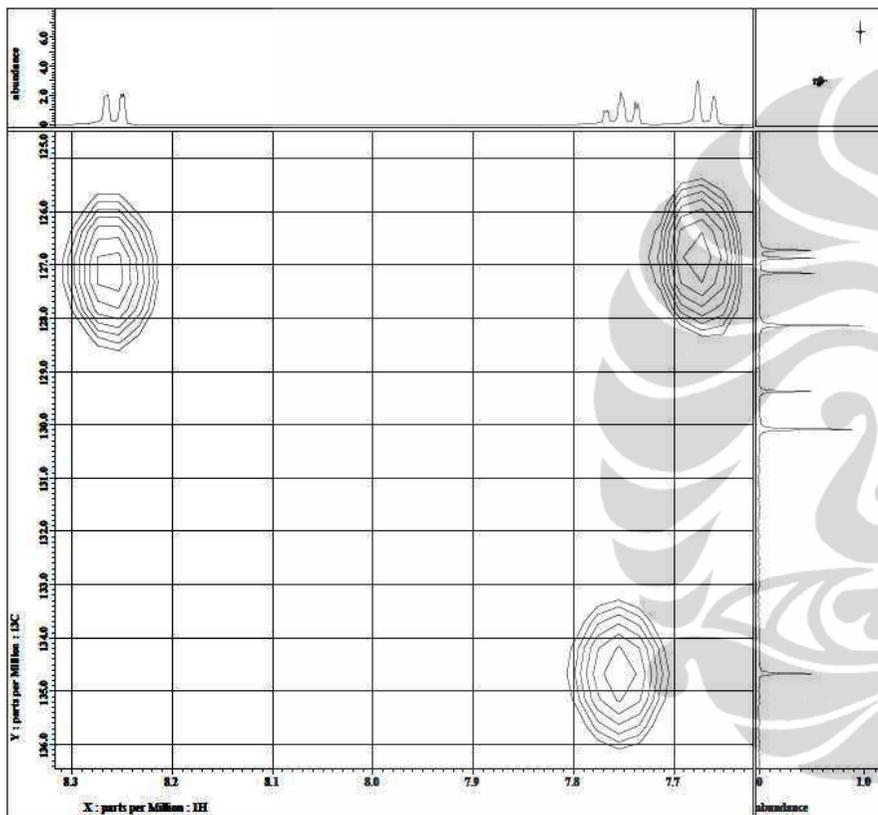
Gambar 4.17. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3a** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



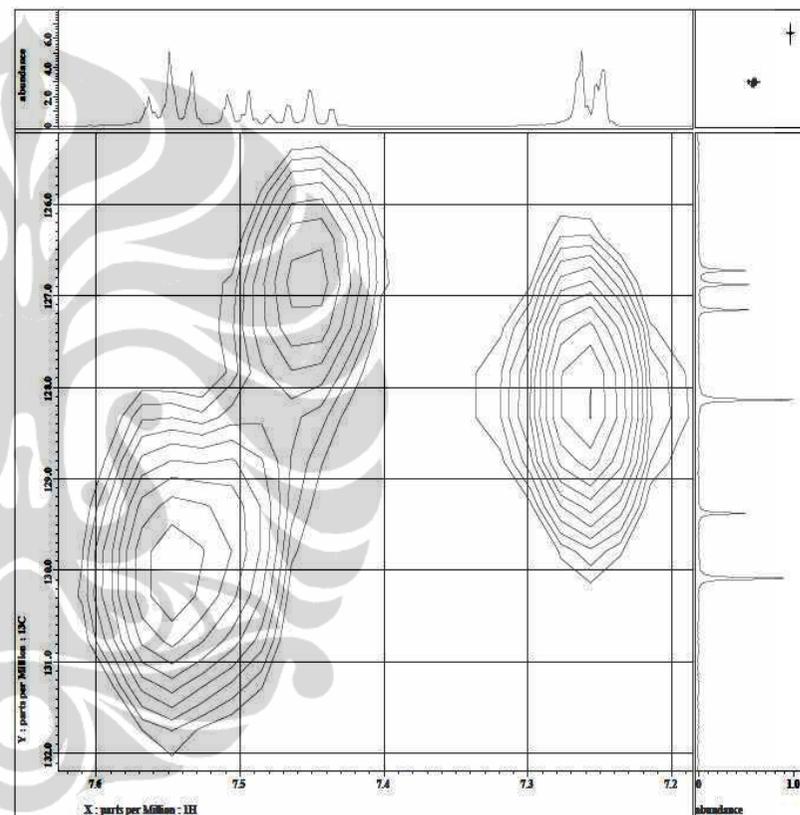
Gambar 4.18a. Spektrum HMQC senyawa 3a



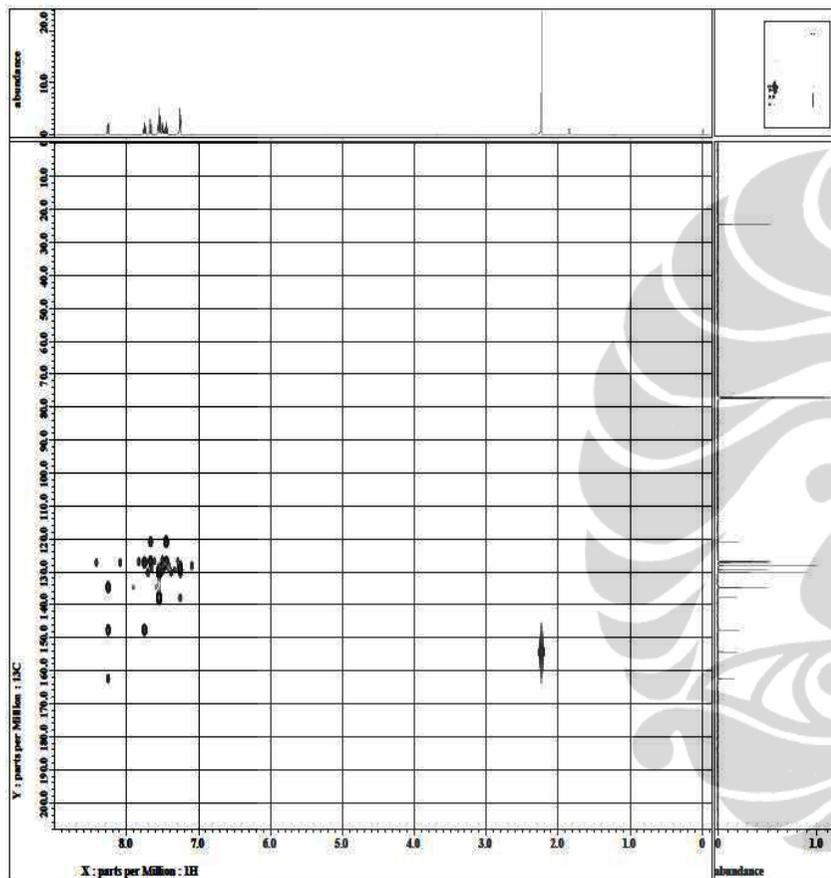
Gambar 4.18b. Spektrum HMQC senyawa 3a (ekspansi-1)



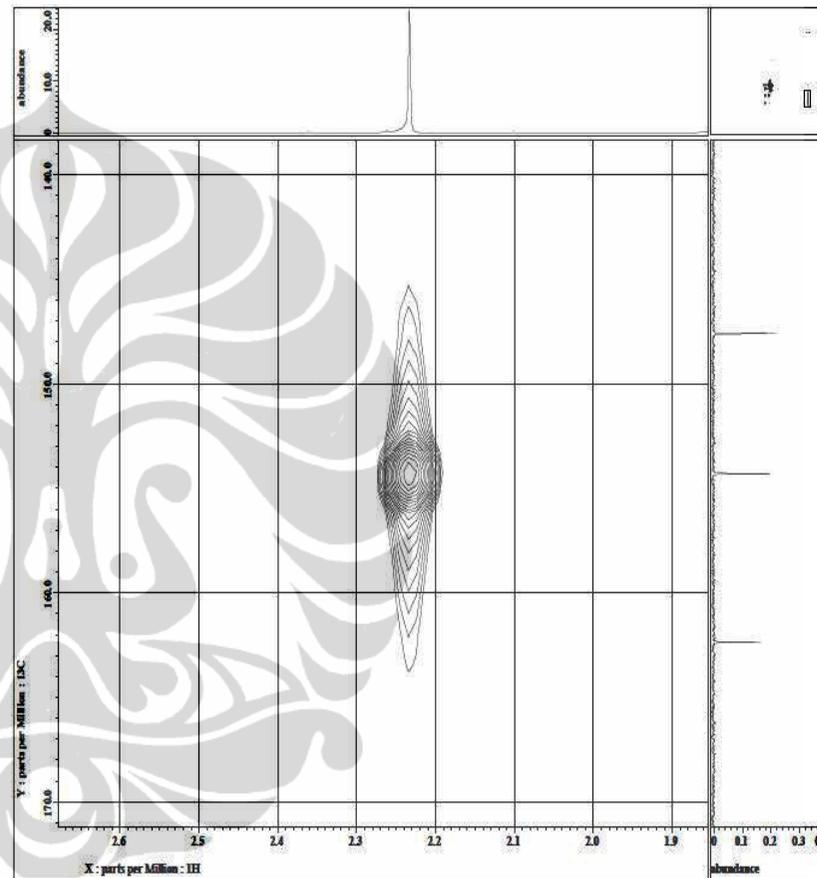
Gambar 4.18c. Spektrum HMQC senyawa 3a (ekspansi-2)



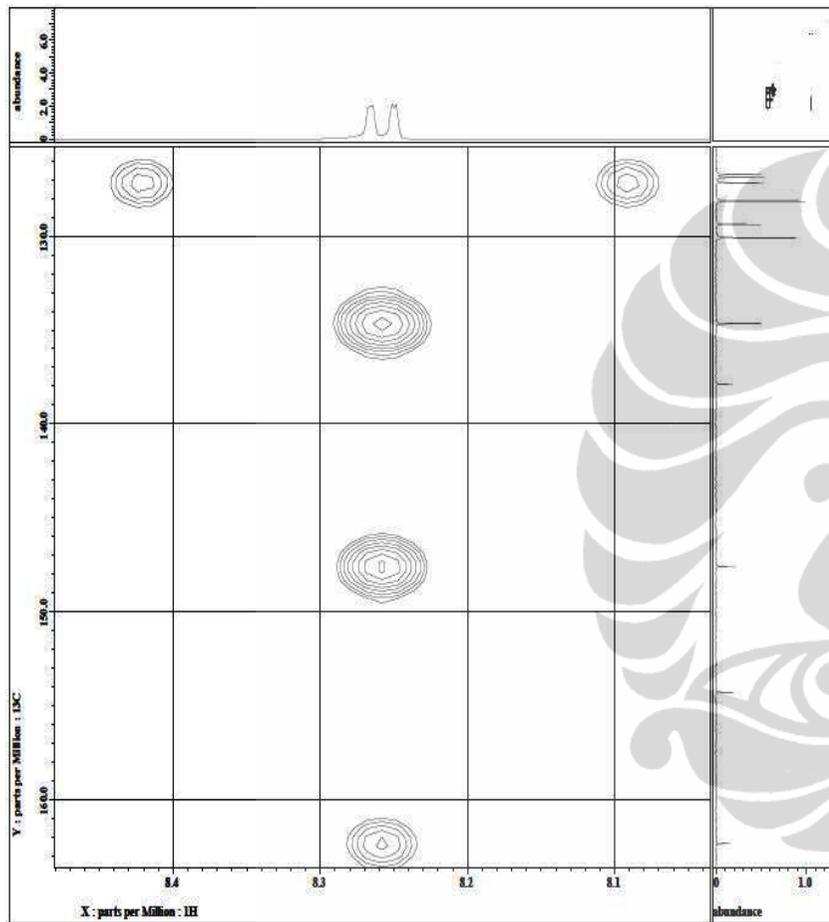
Gambar 4.18d. Spektrum HMQC senyawa 3a (ekspansi-3)



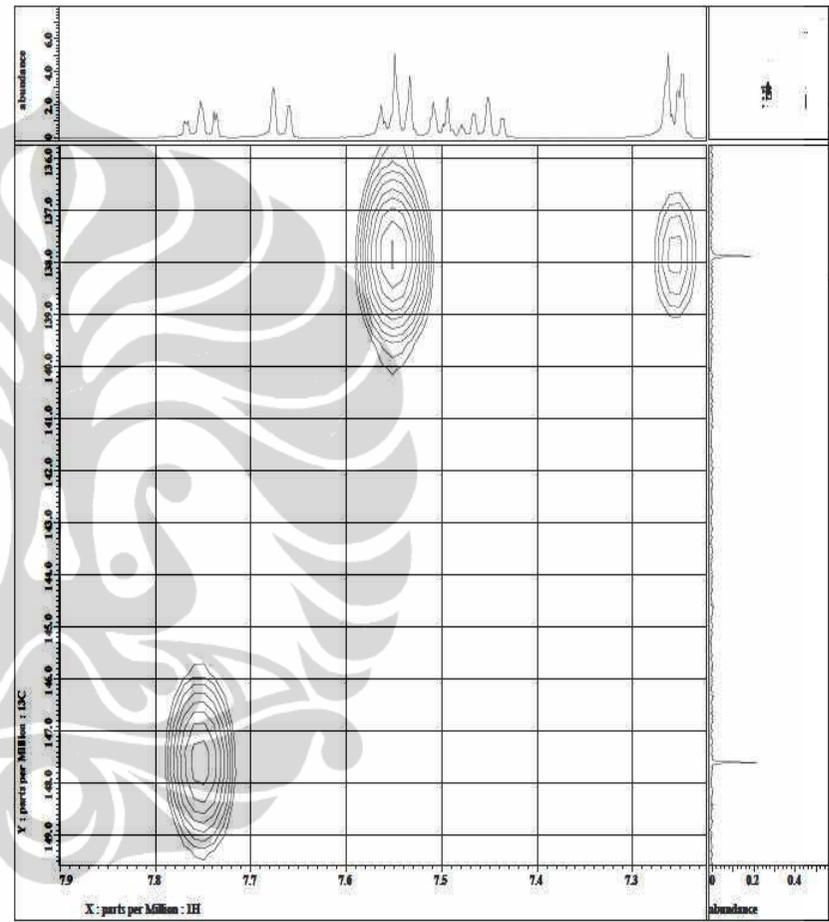
Gambar 4.19a. Spektrum HMBC senyawa 3a



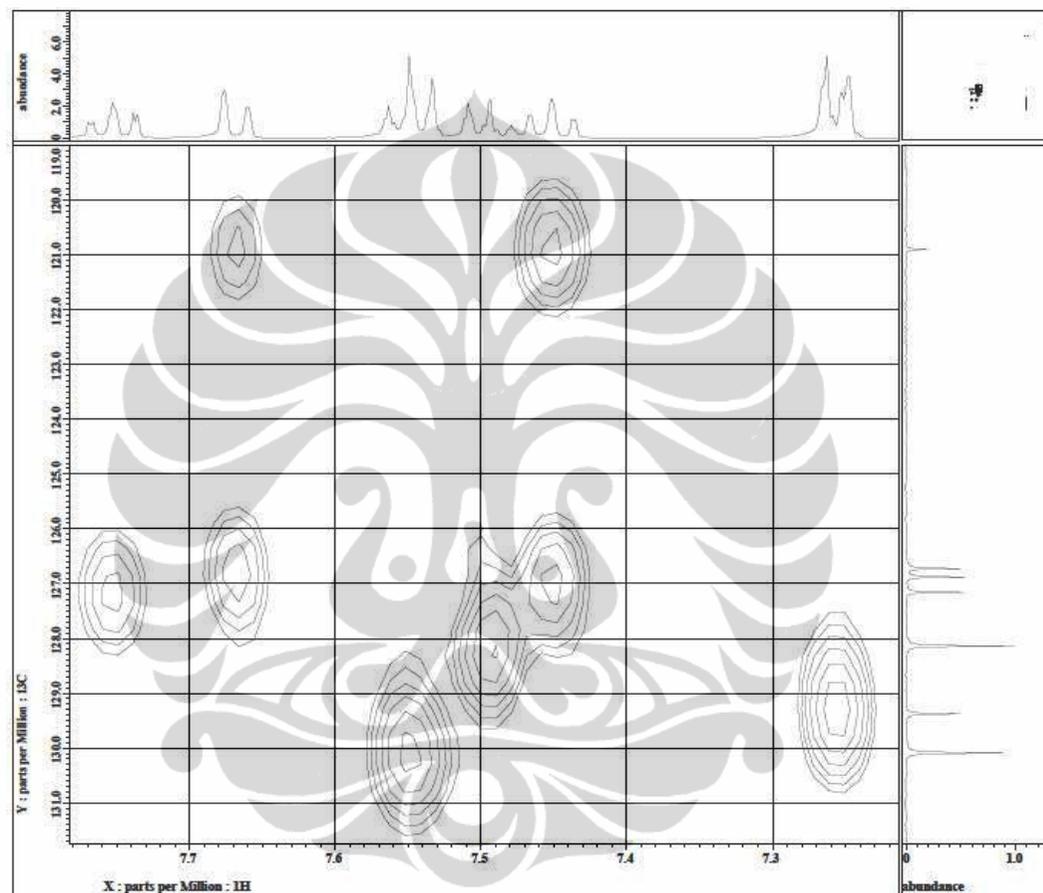
Gambar 4.19b. Spektrum HMBC senyawa 3a (ekspansi-1)



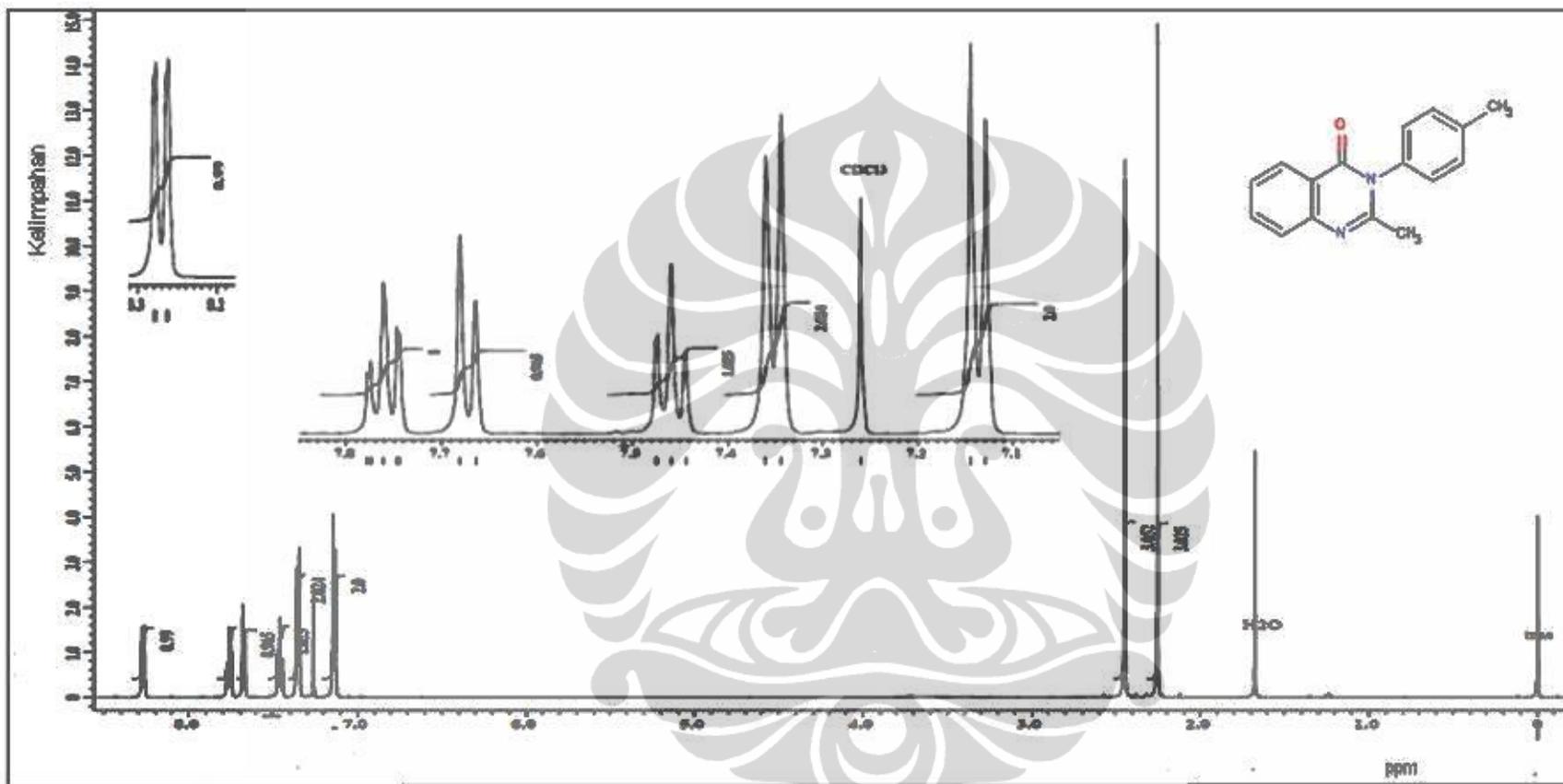
Gambar 4.19c. Spektrum HMBC senyawa **3a** (ekspansi-2)



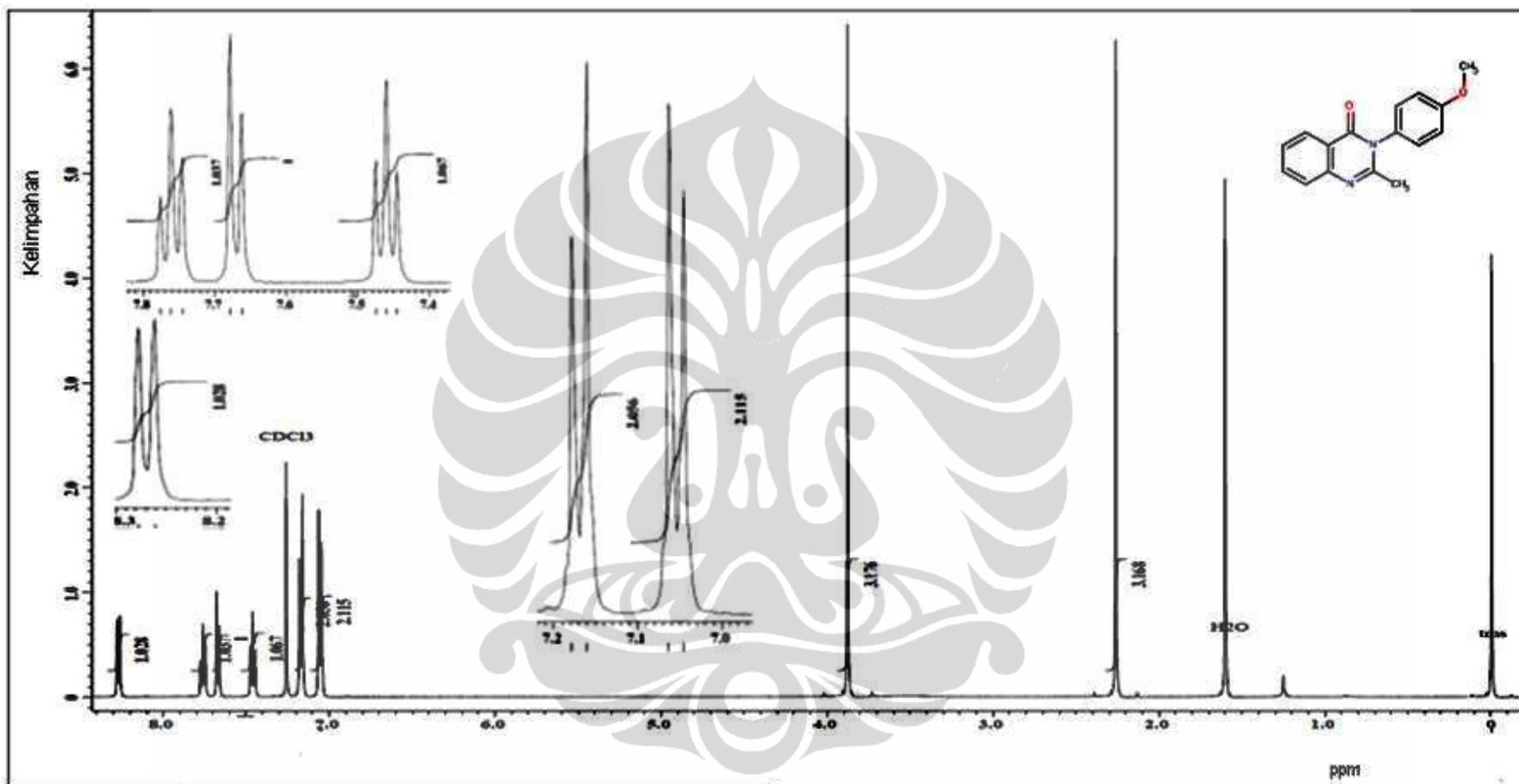
Gambar 4.19d. Spektrum HMBC senyawa **3a** (ekspansi-3)



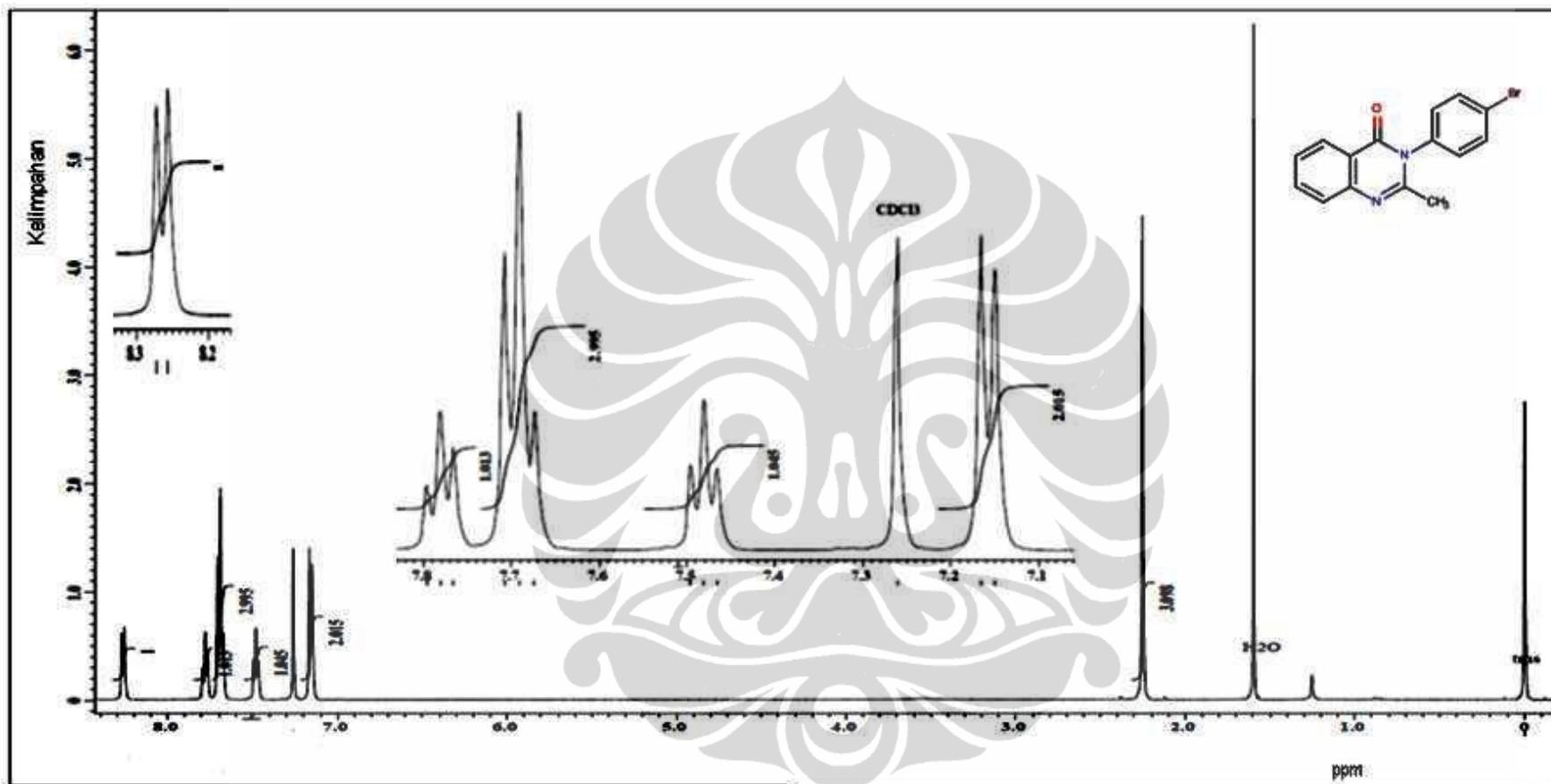
Gambar 4.19d. Spektrum HMBC senyawa **3a** (ekspansi-3)



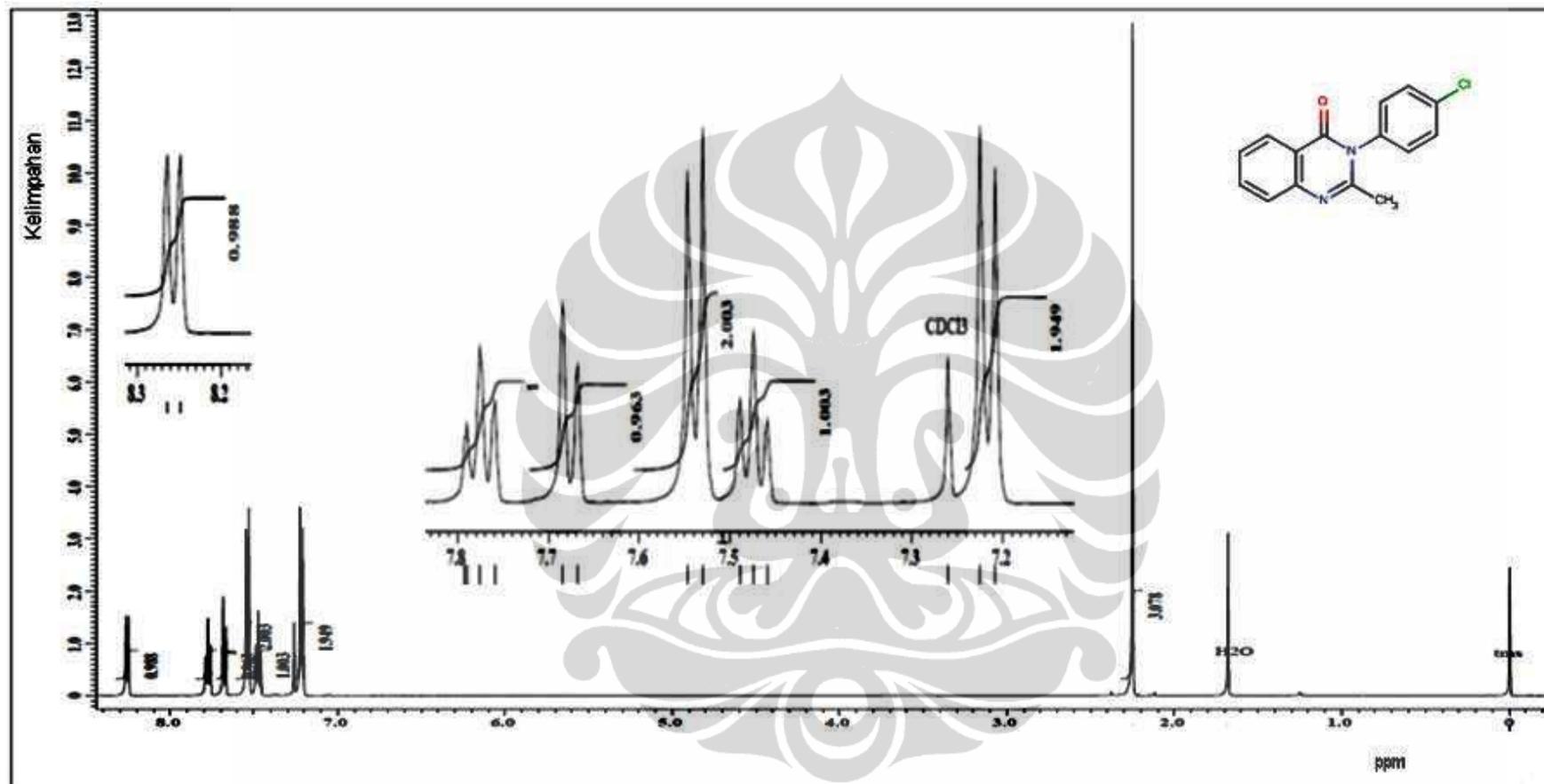
Gambar 4.21. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3b** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



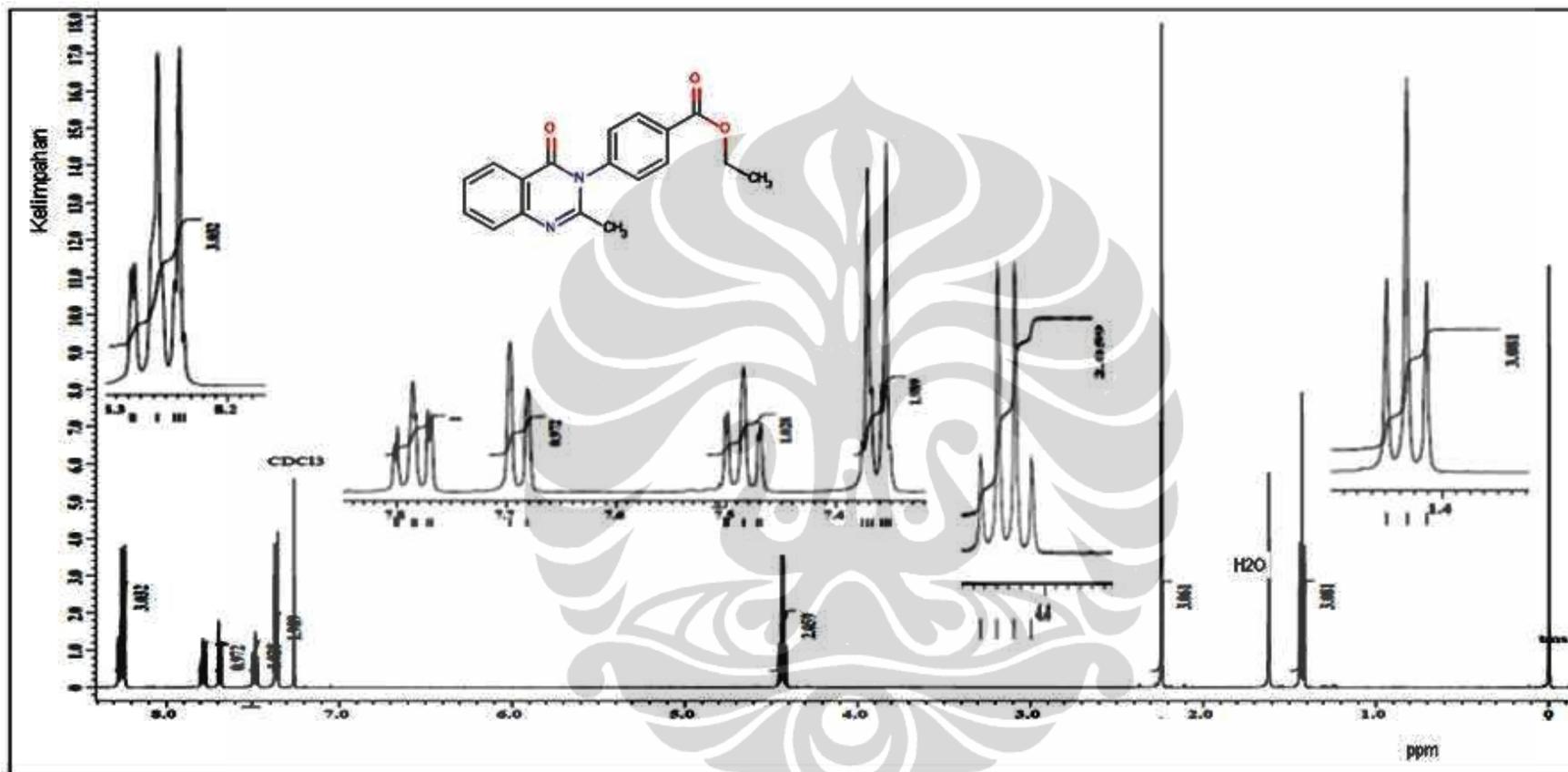
Gambar 4.22. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3c** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



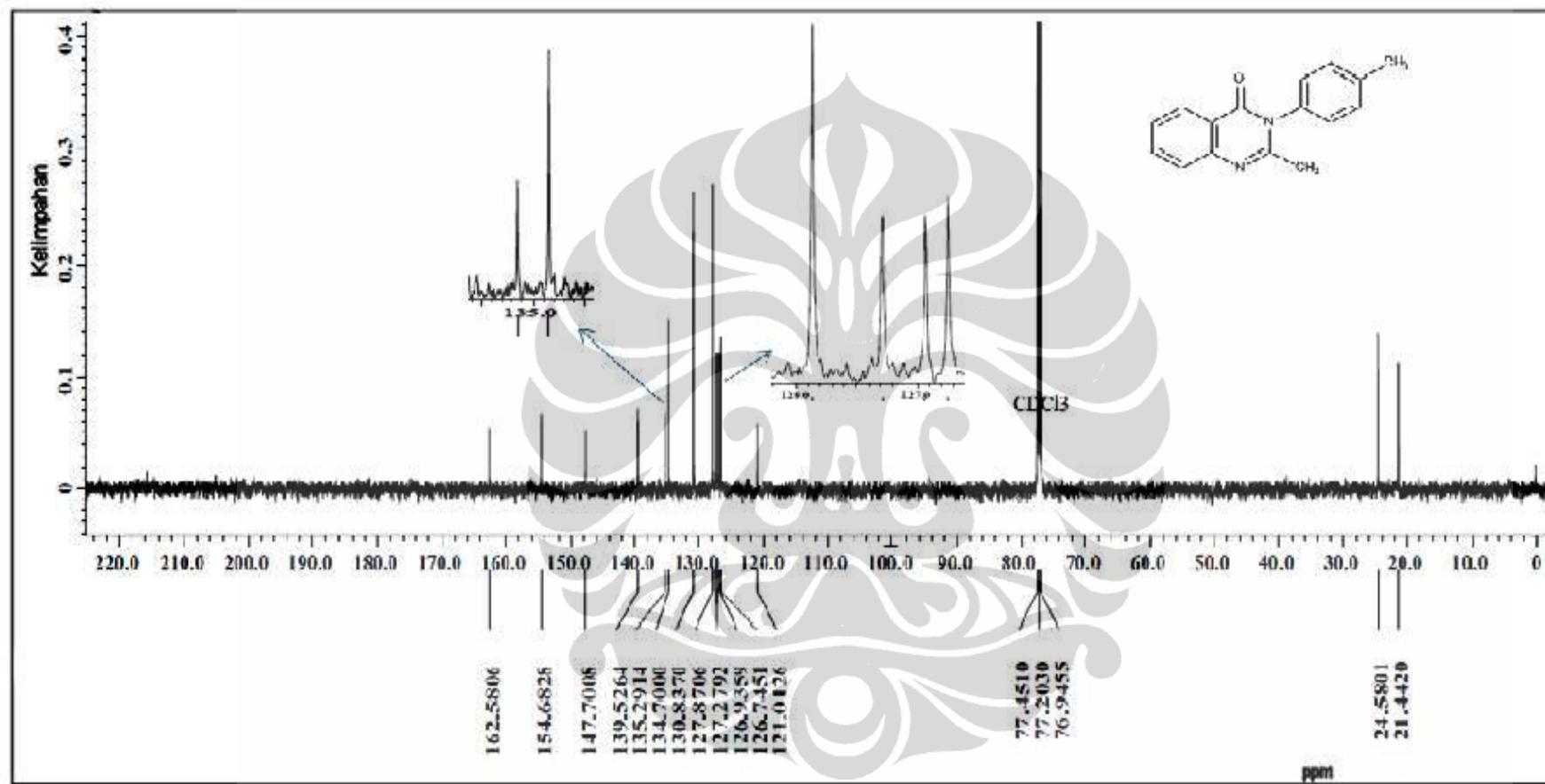
Gambar 4.23. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3d** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



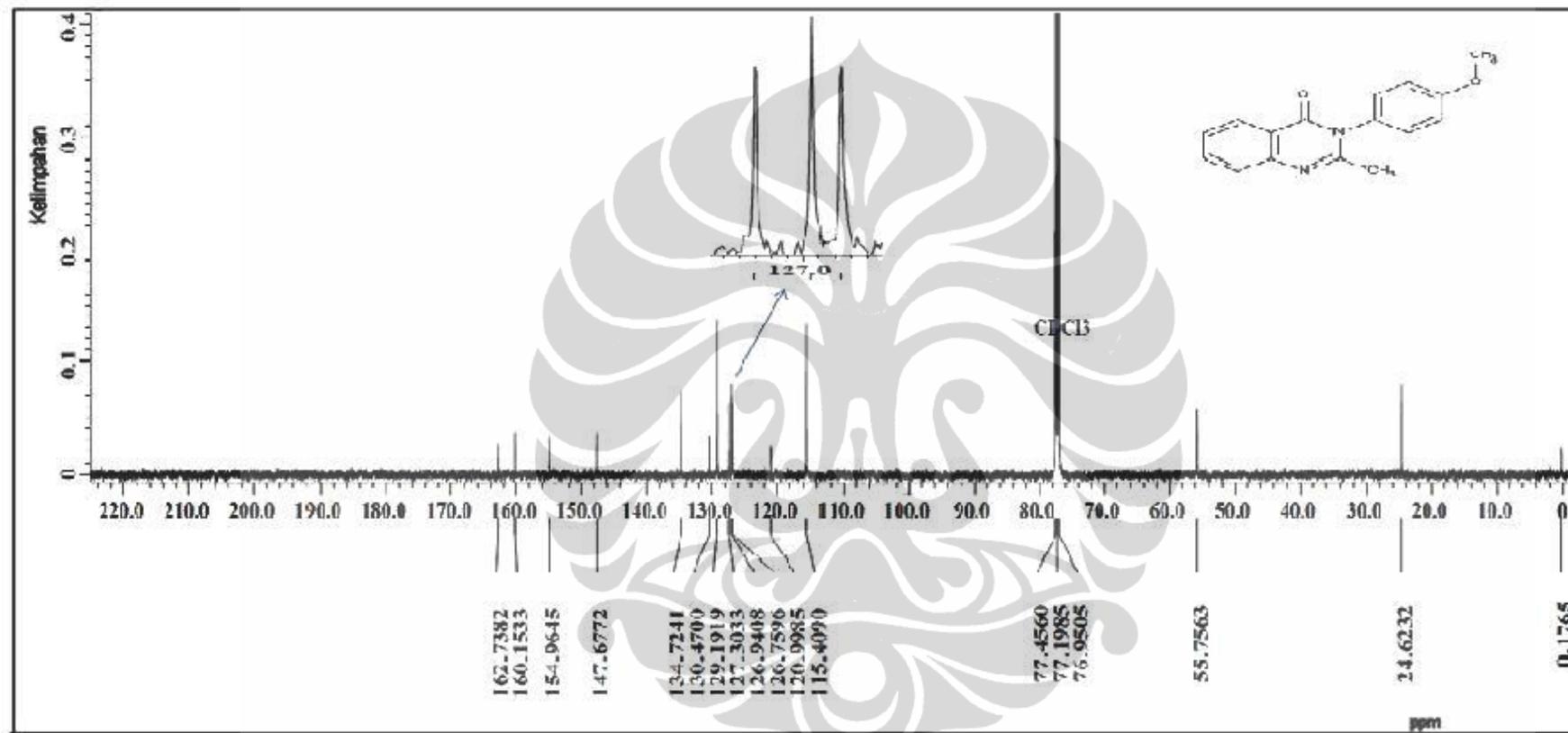
Gambar 4.24. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3e** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



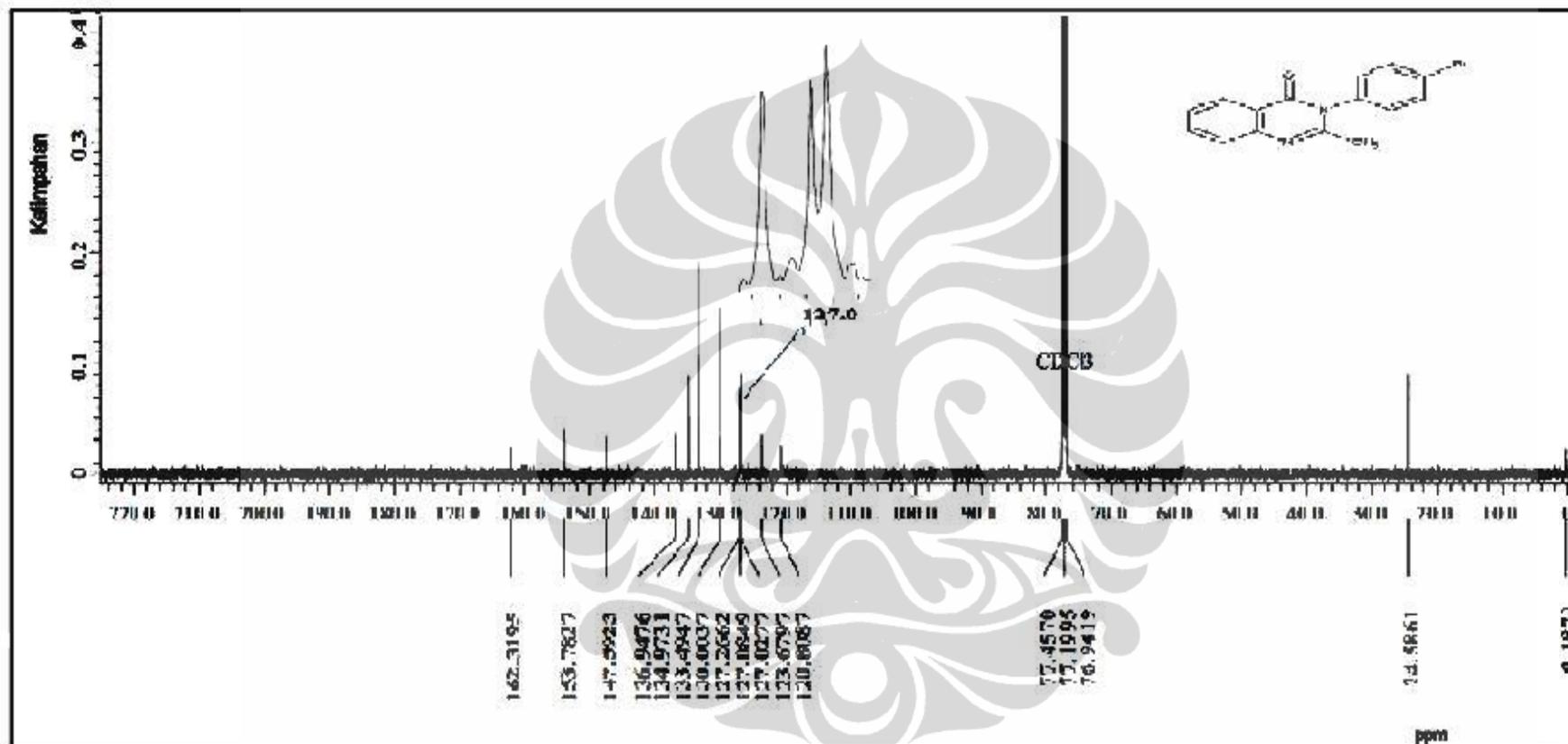
Gambar 4.25. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3f** dalam CDCl_3 pada 500 MHz



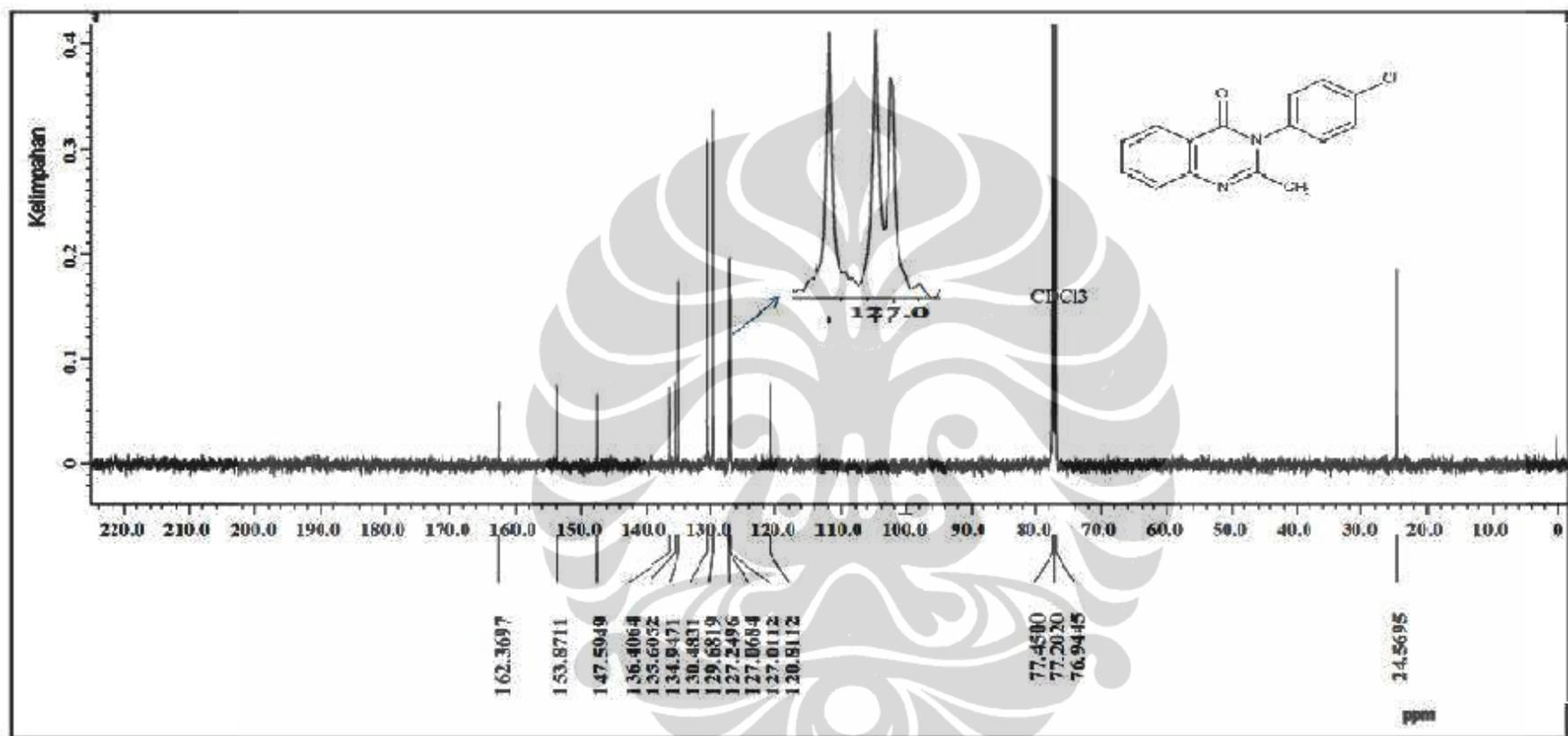
Gambar 4.26. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3b** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



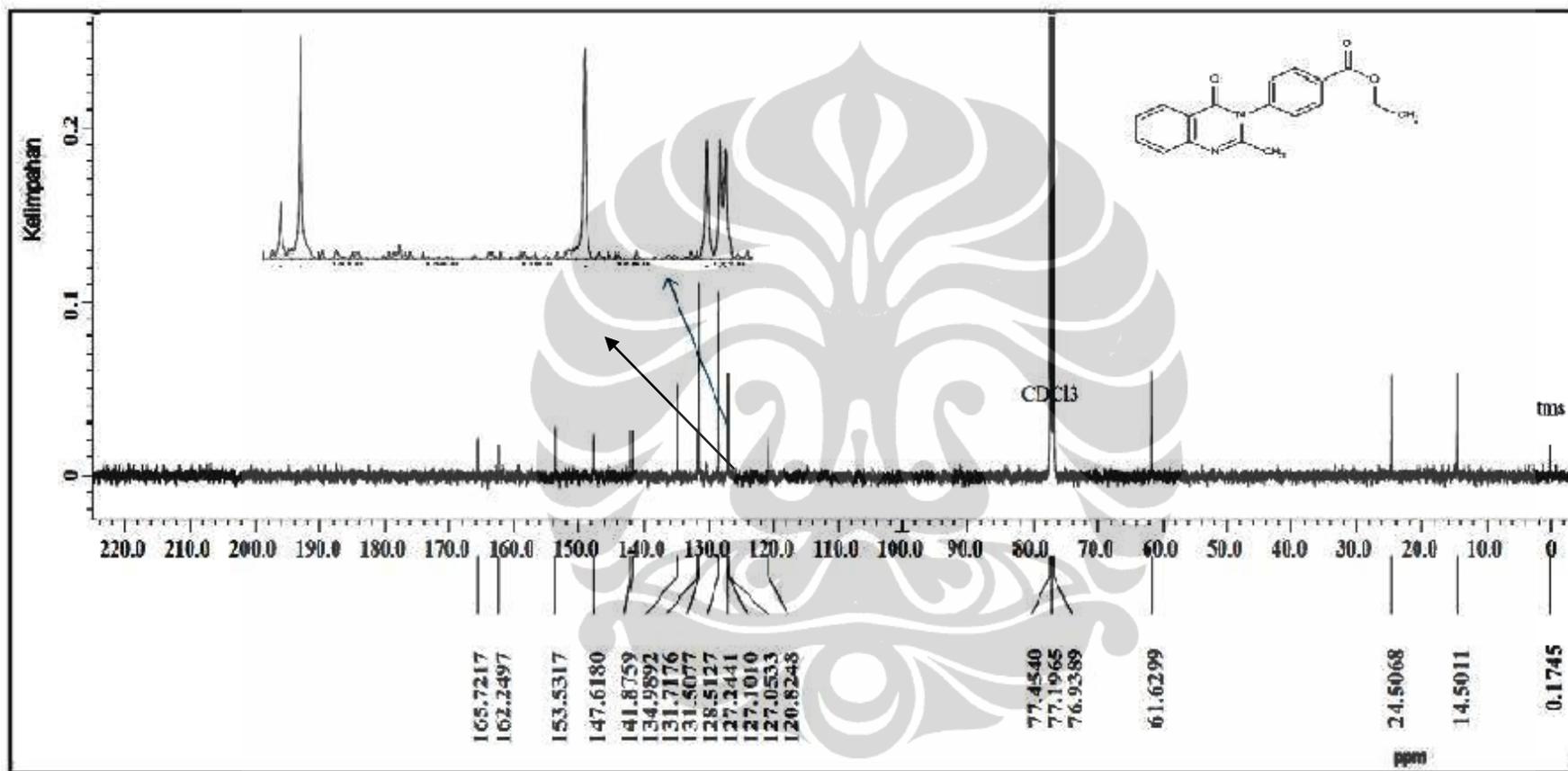
Gambar 4.27. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3c** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



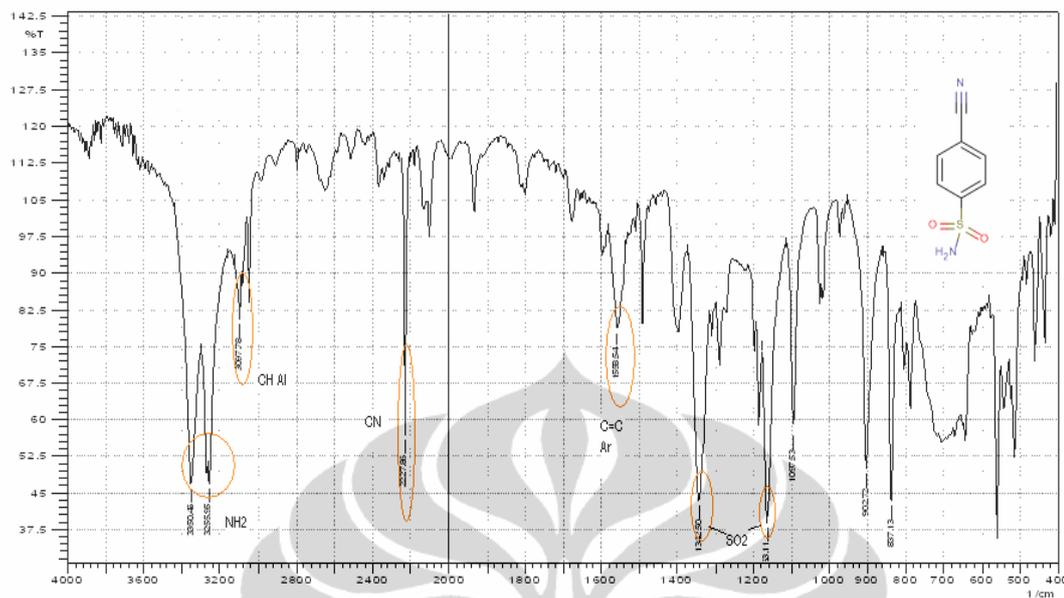
Gambar 4.28. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3d** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



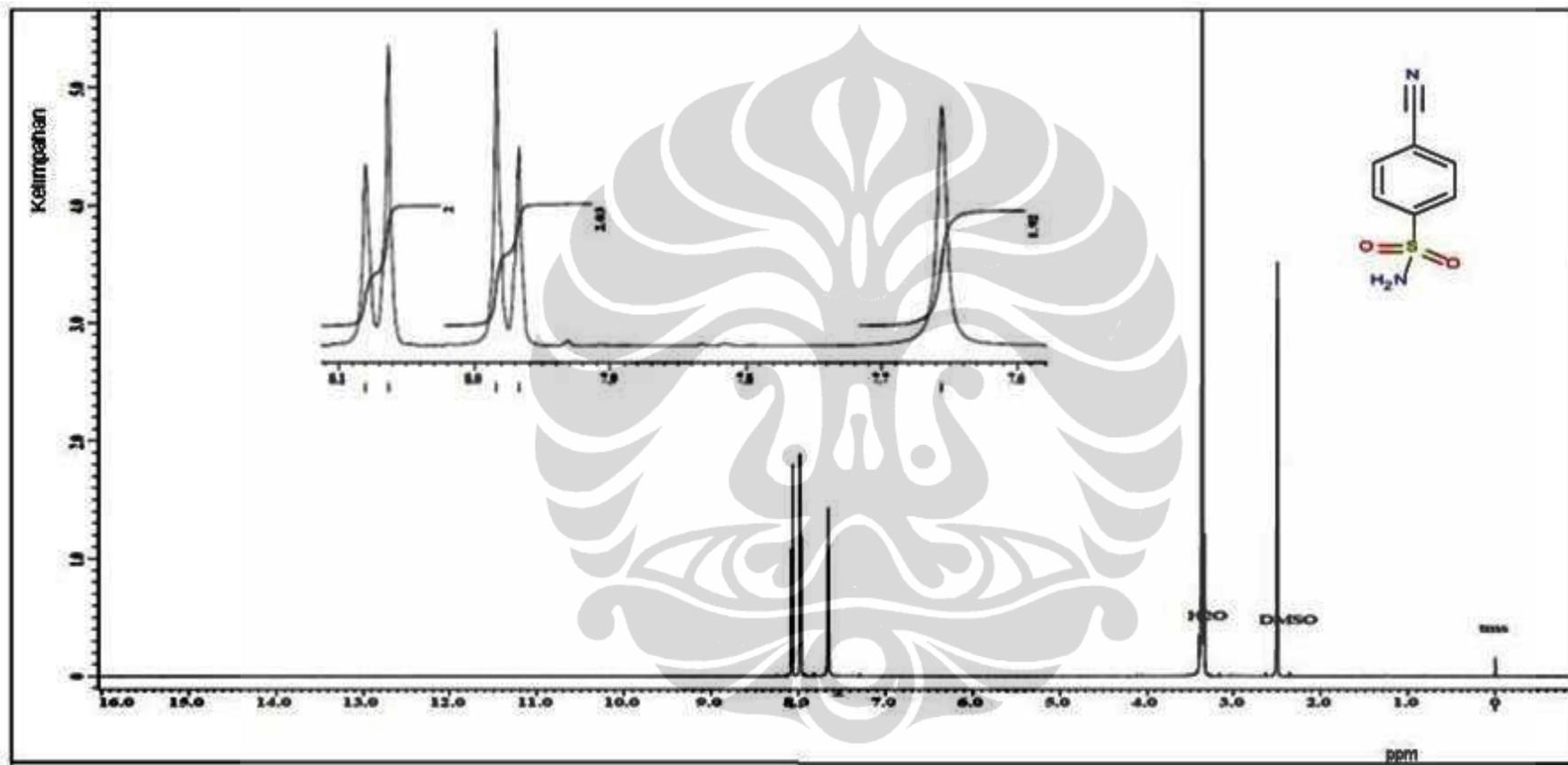
Gambar 4.29. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3e** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



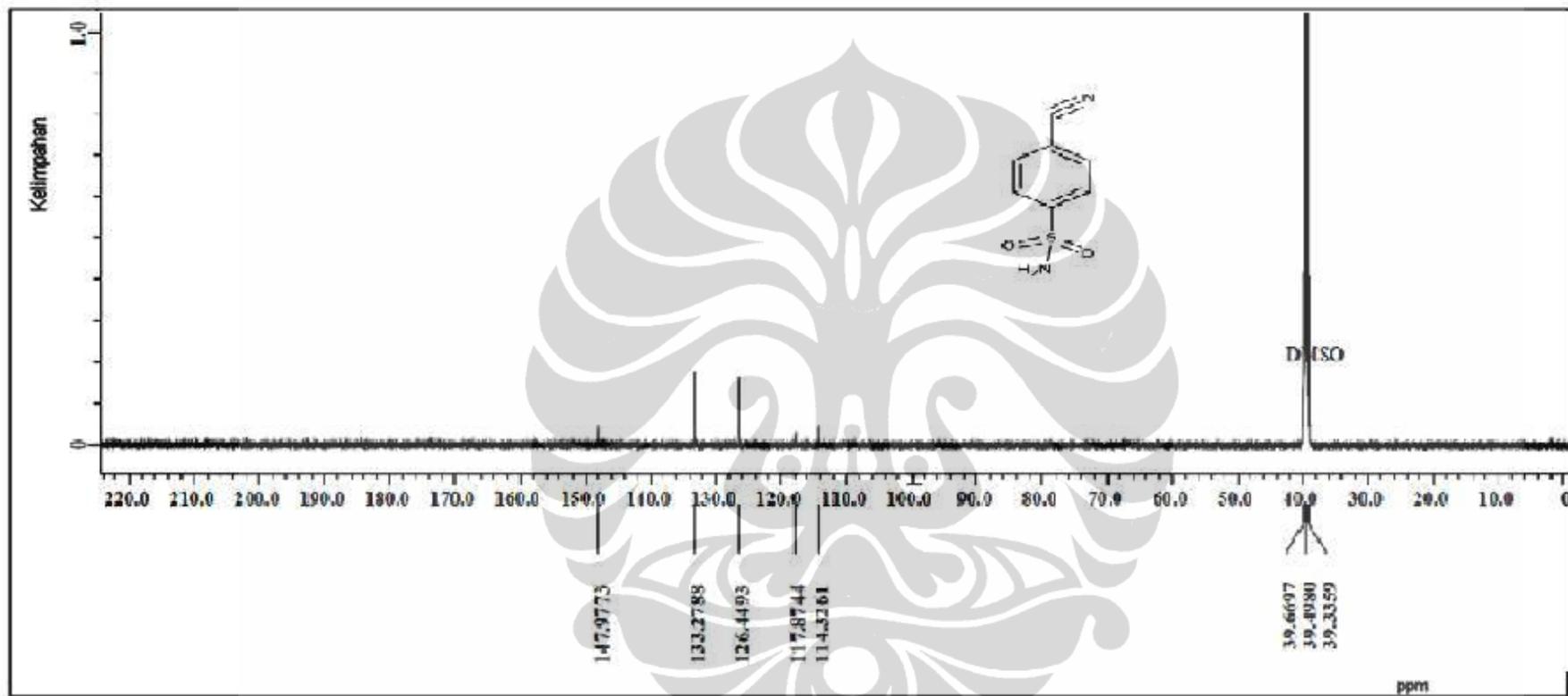
Gambar 4.30. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3f** dalam CDCl_3 pada 125 MHz



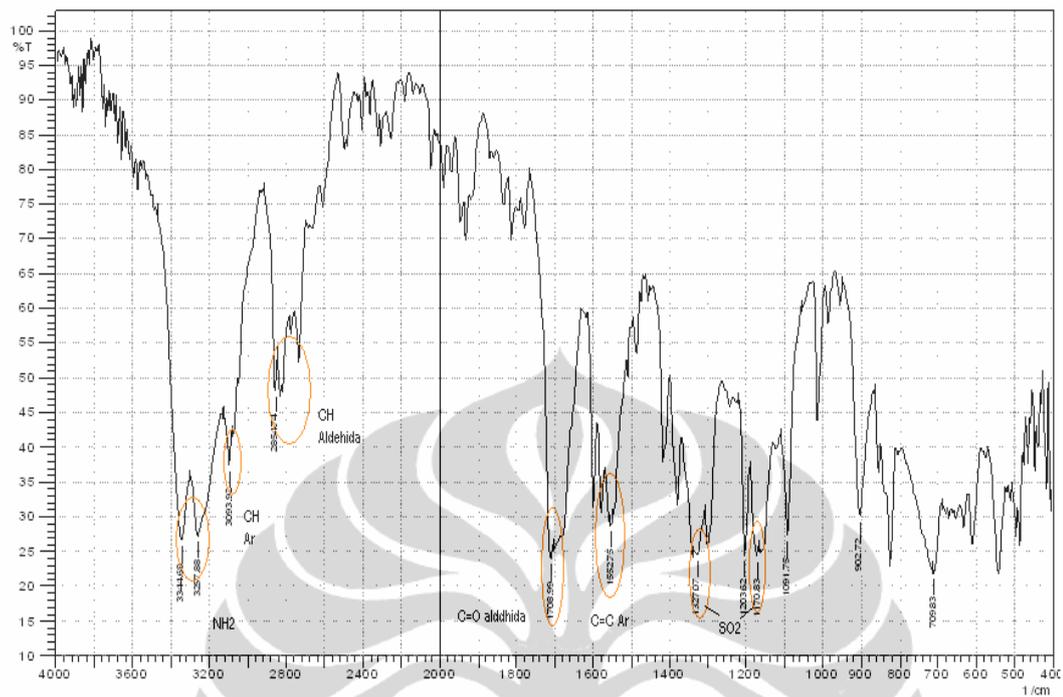
Gambar 4.34. Spektrum FT-IR senyawa **9** dalam KBr



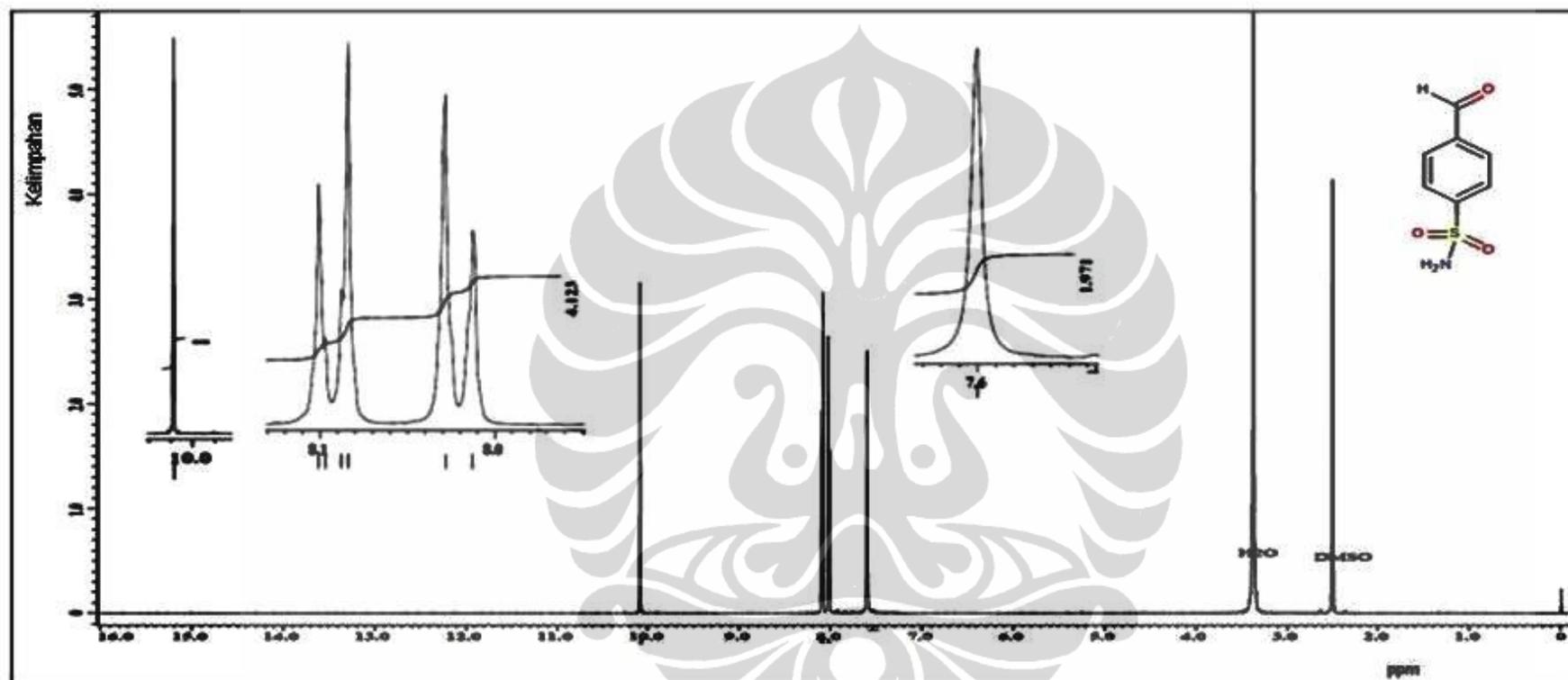
Gambar 4.35. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **9** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz



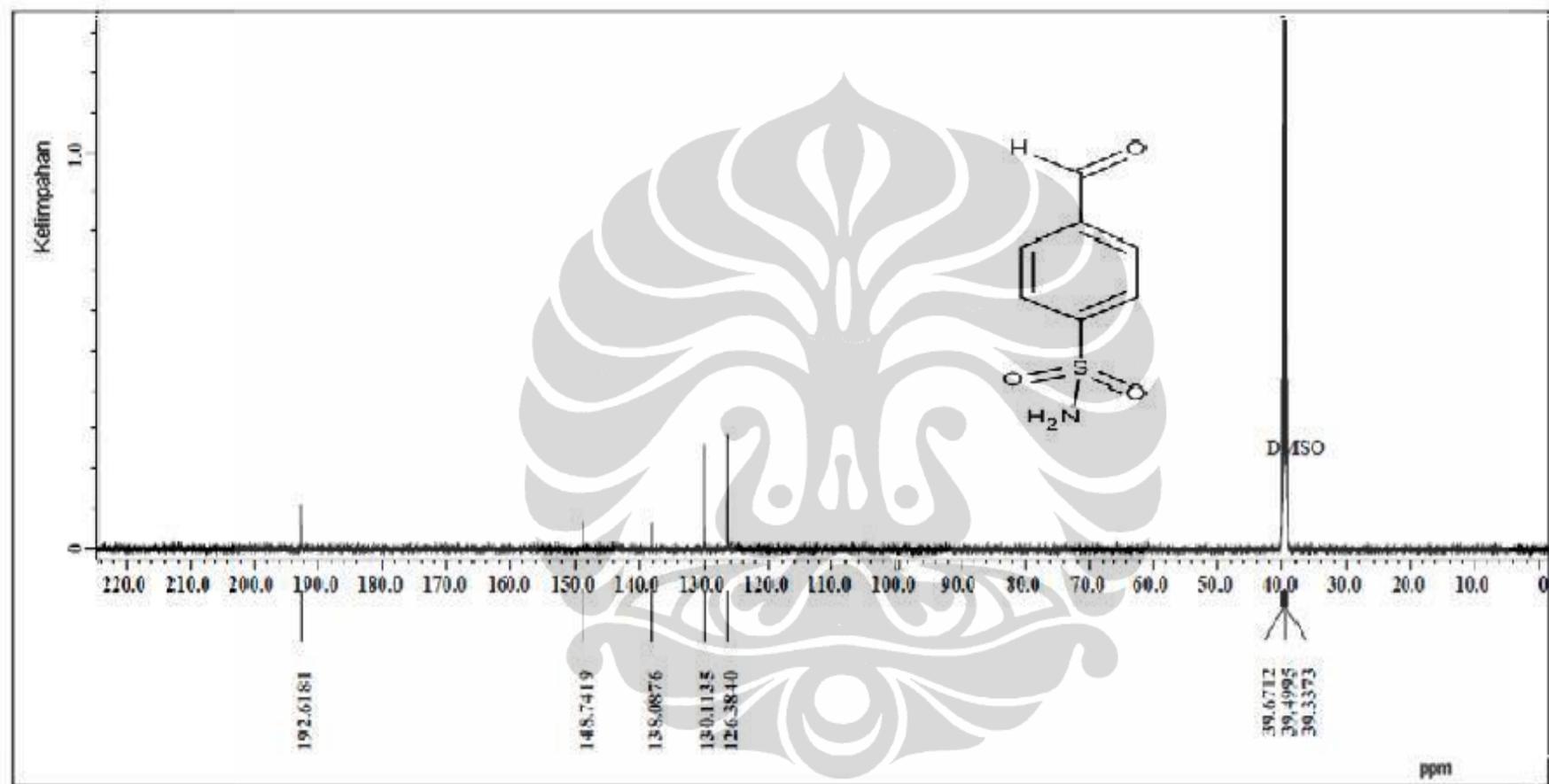
Gambar 4.36. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **9** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



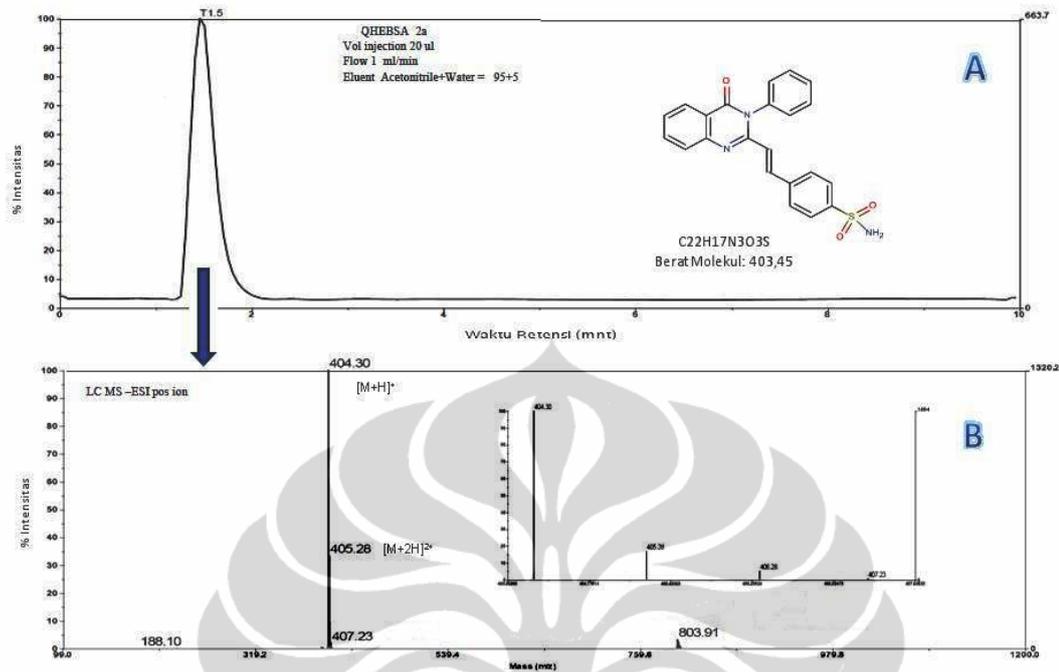
Gambar 4.39. Spektrum FT-IR senyawa 4 dalam KBr



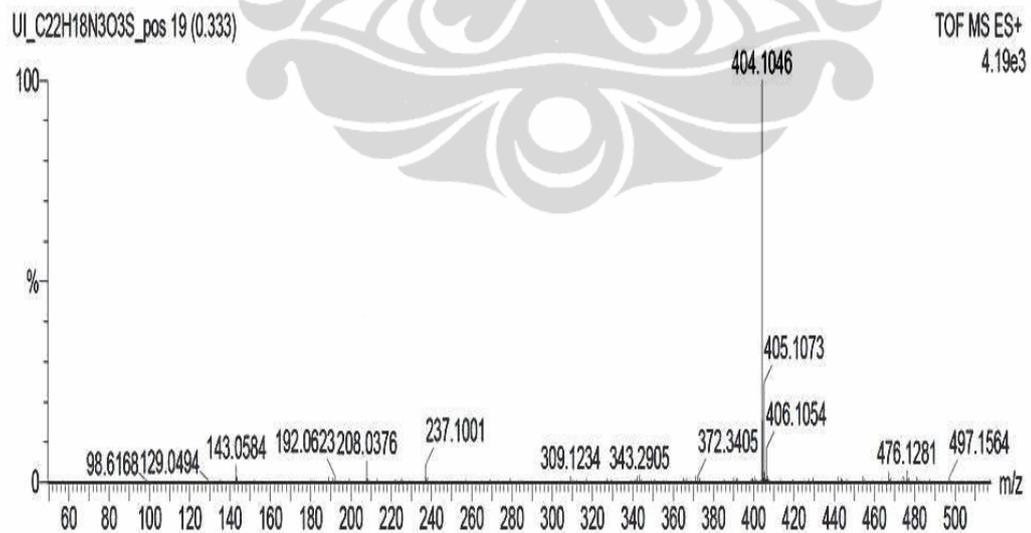
Gambar 4.40. Spektrum ¹H-NMR senyawa 4 dalam (CD₃)₂SO pada 500 MHz



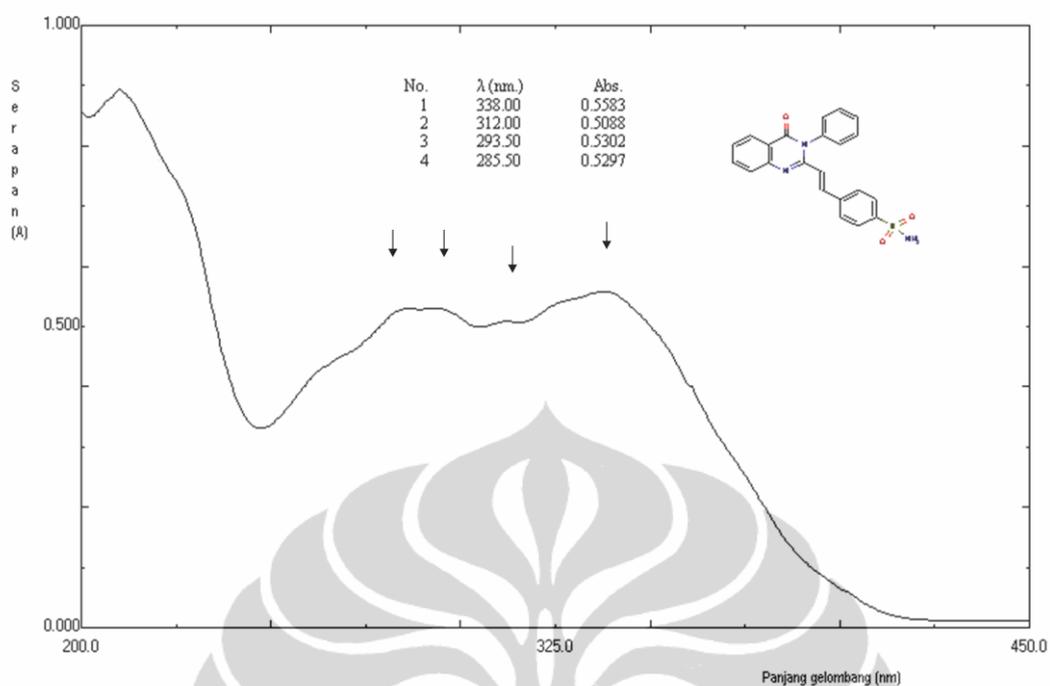
Gambar 4.41. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **4** hasil sintesis, dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



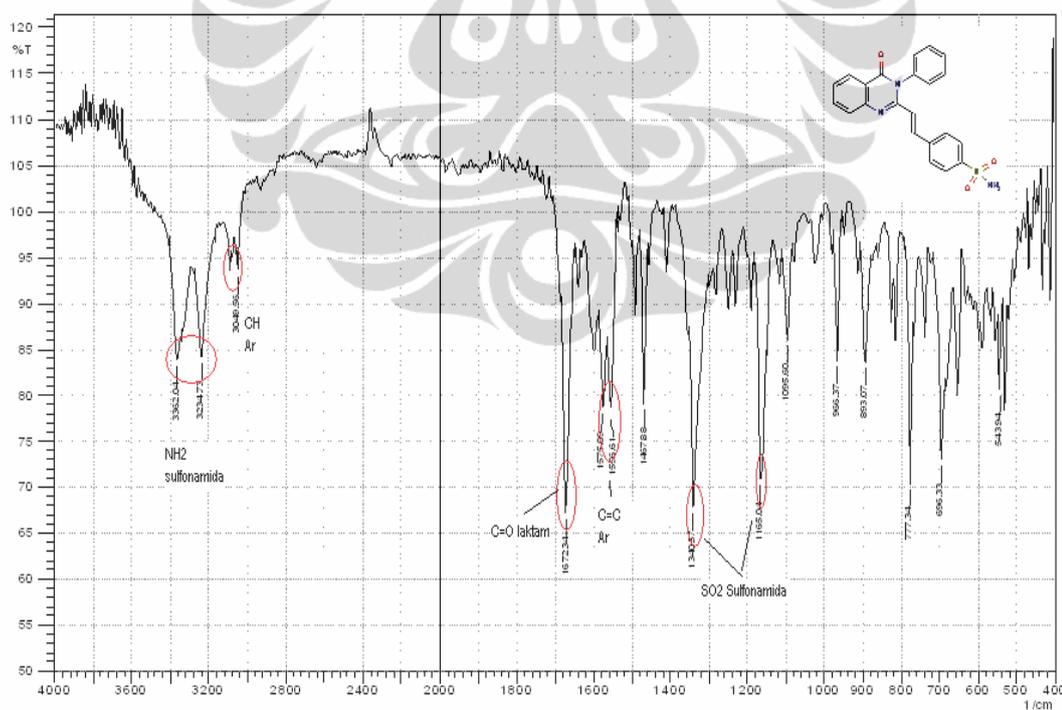
Gambar 4.45. A. Kromatogram LC dengan detektor massa senyawa **2a**.
B. Spektrum massa LC-ESI+ (B) senyawa **2a**.



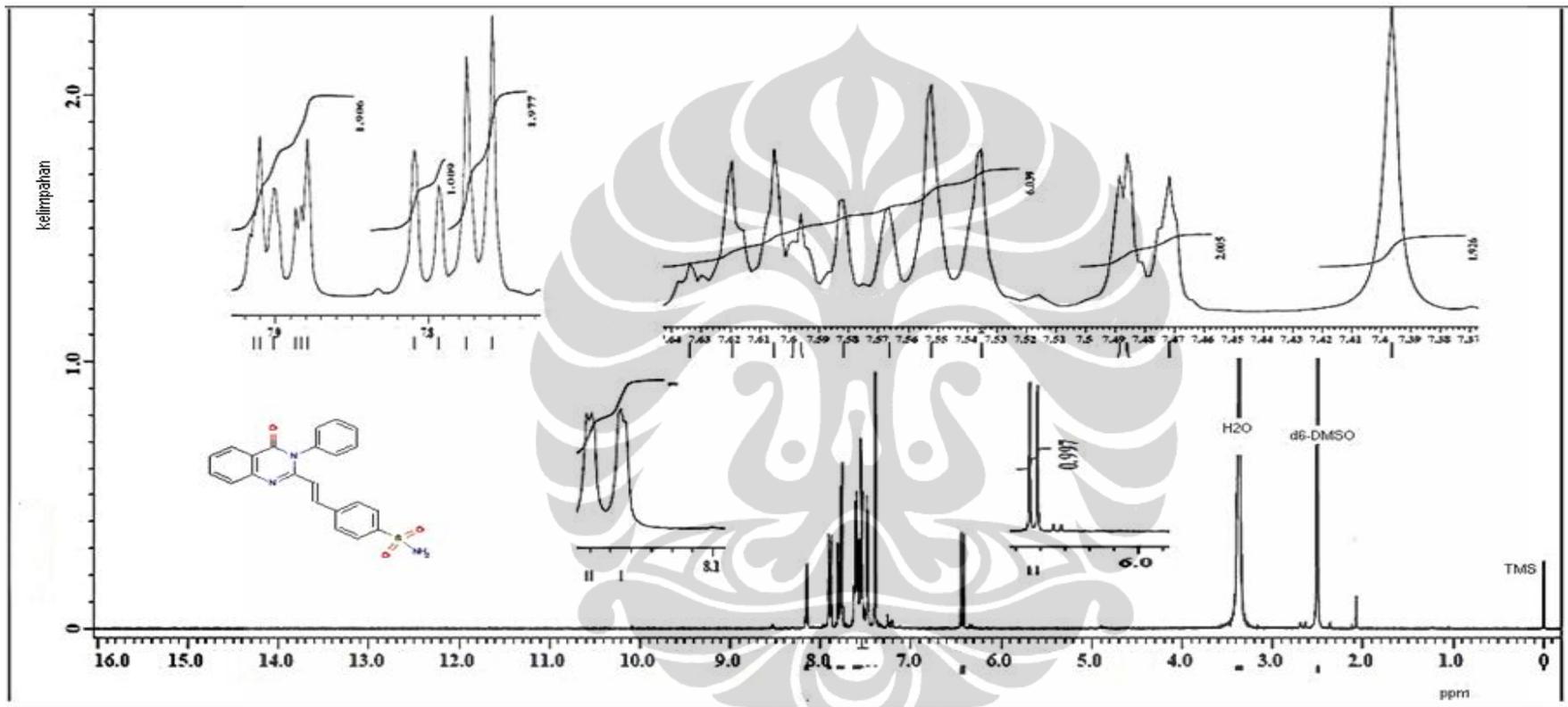
Gambar 4.46. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi (HR-MS ESI+) senyawa **2a**.



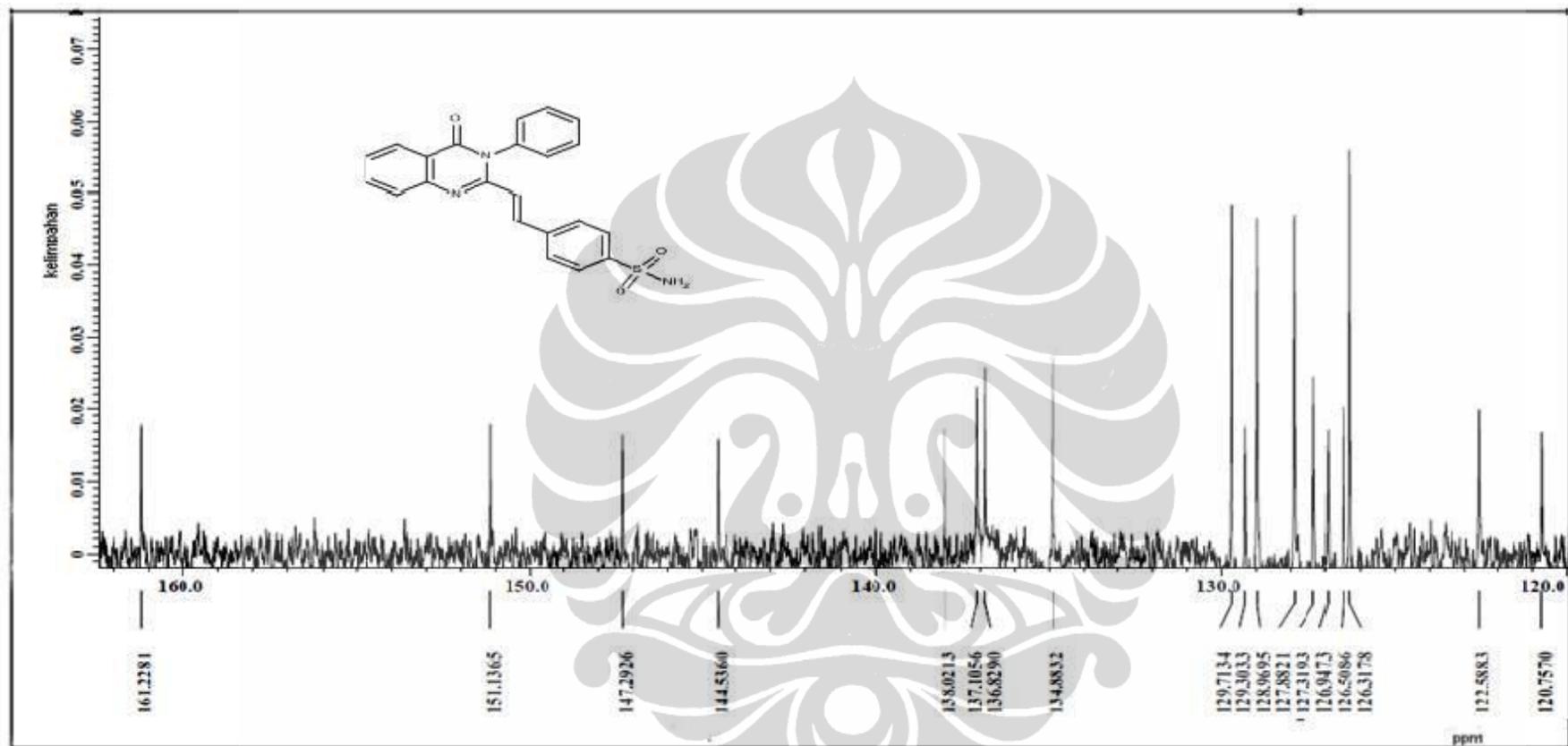
Gambar 4.47. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2a** dalam asetonitril



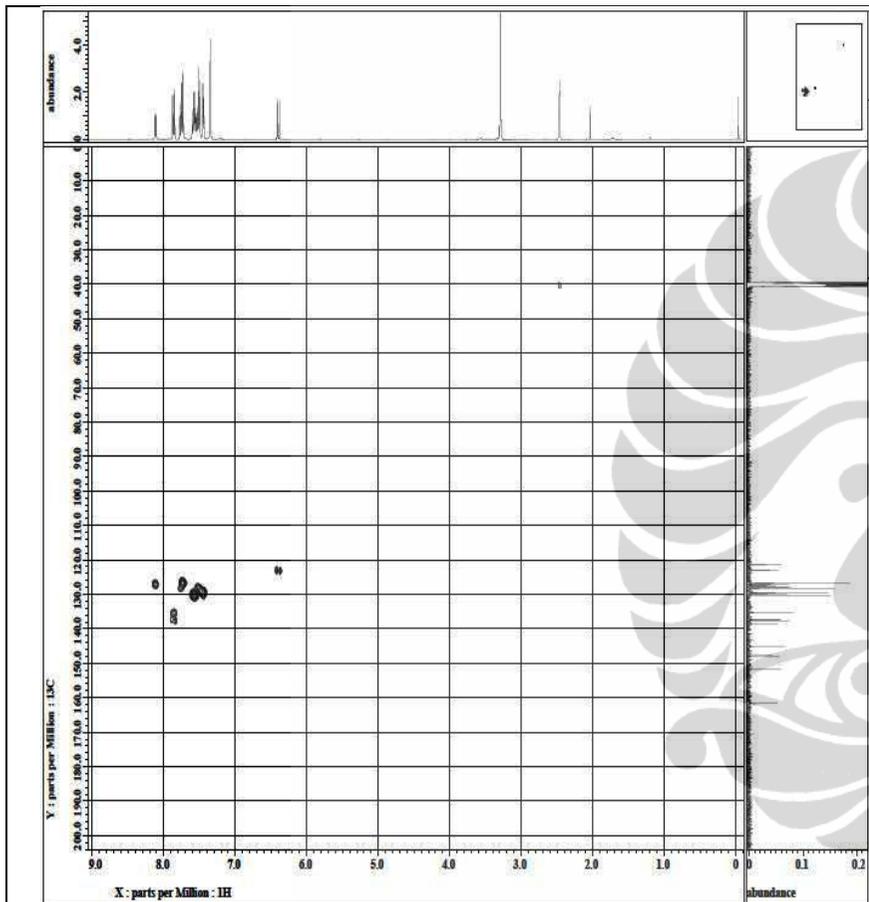
Gambar 4.48. Spektrum FT-IR senyawa **2a** dalam KBr



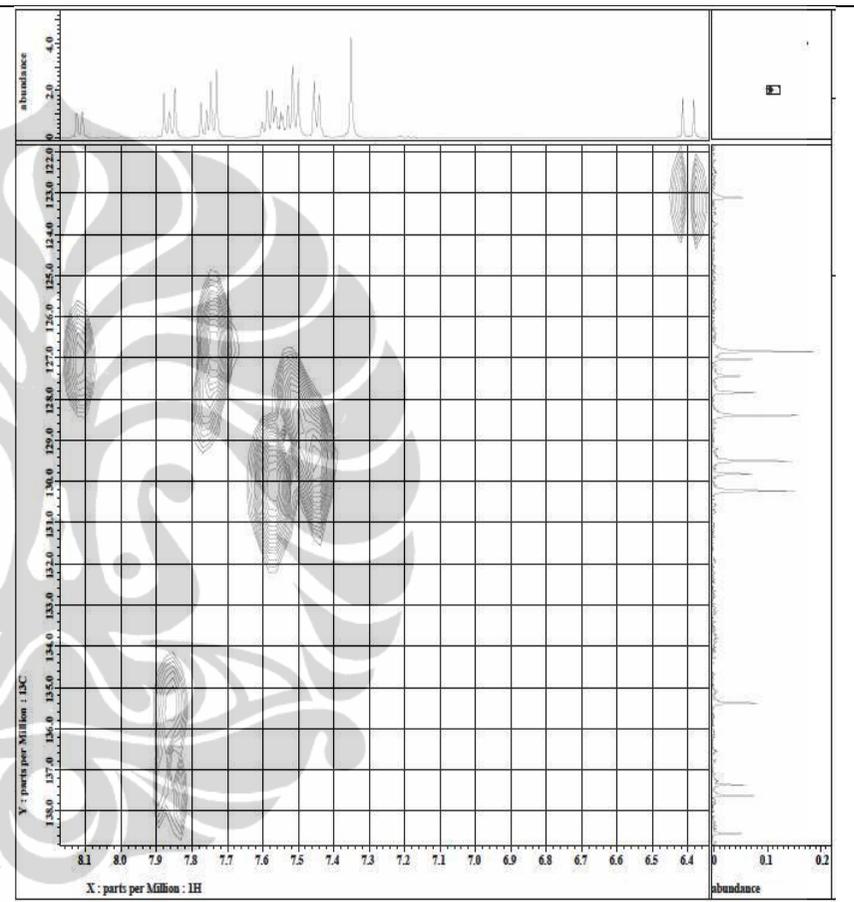
Gambar 4.49. Spektrum ¹H-NMR senyawa **2a** dalam (CD₃)₂SO pada 500 MHz



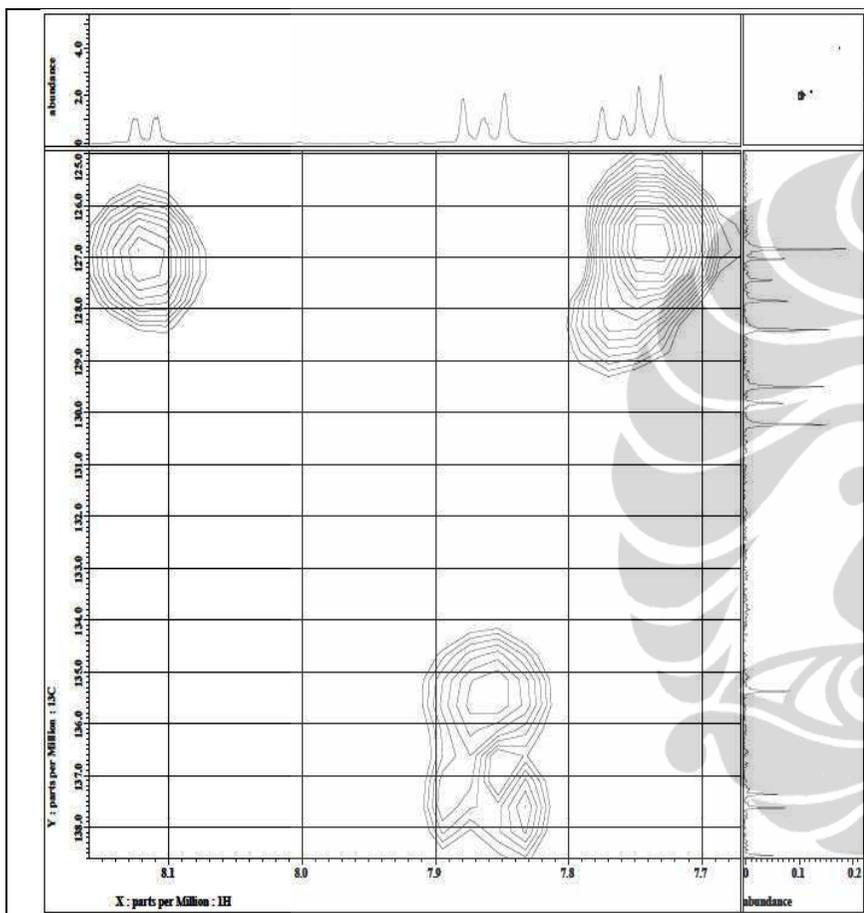
Gambar 4.50. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2a** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



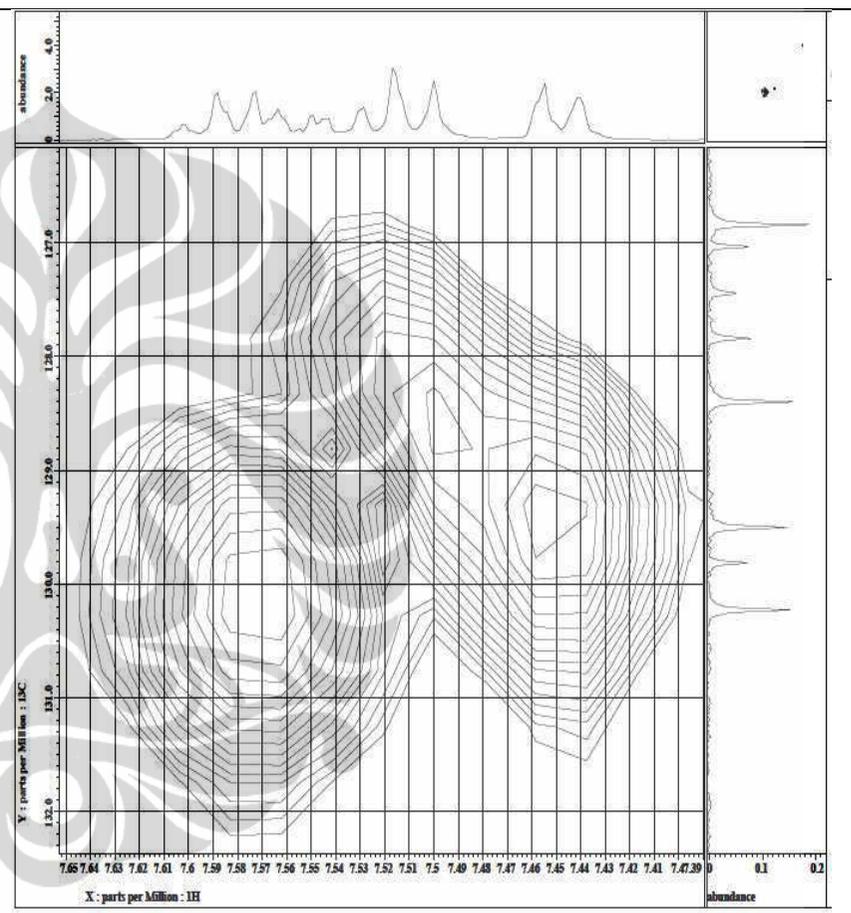
Gambar 4.51a. Spektrum HMQC senyawa 2a



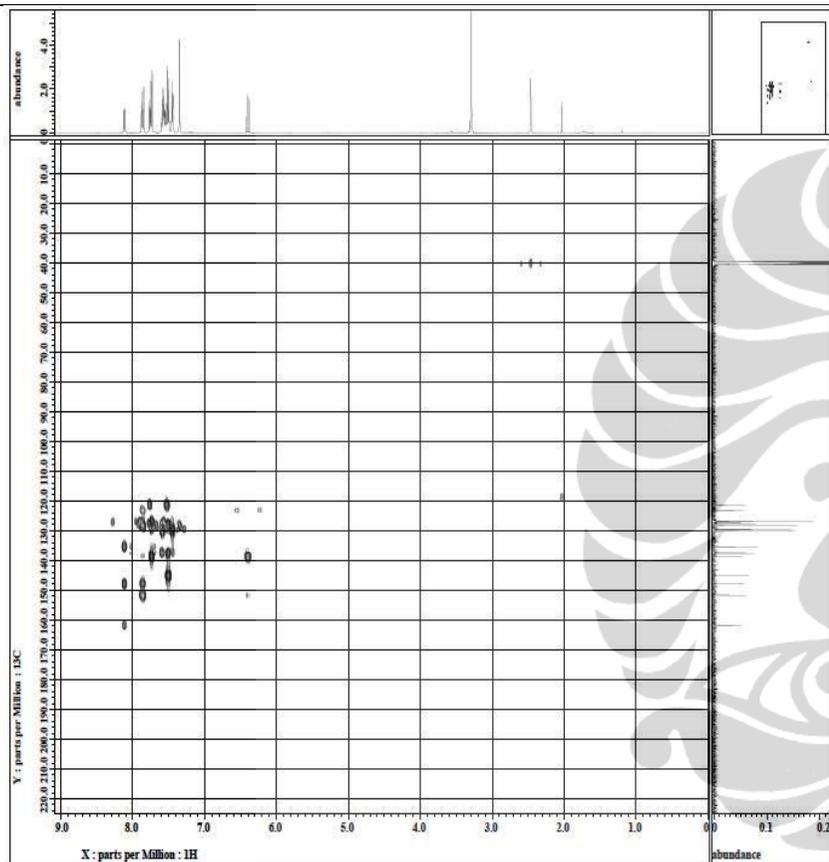
Gambar 4.51b. Spektrum HMQC senyawa 2a (ekspansi-1)



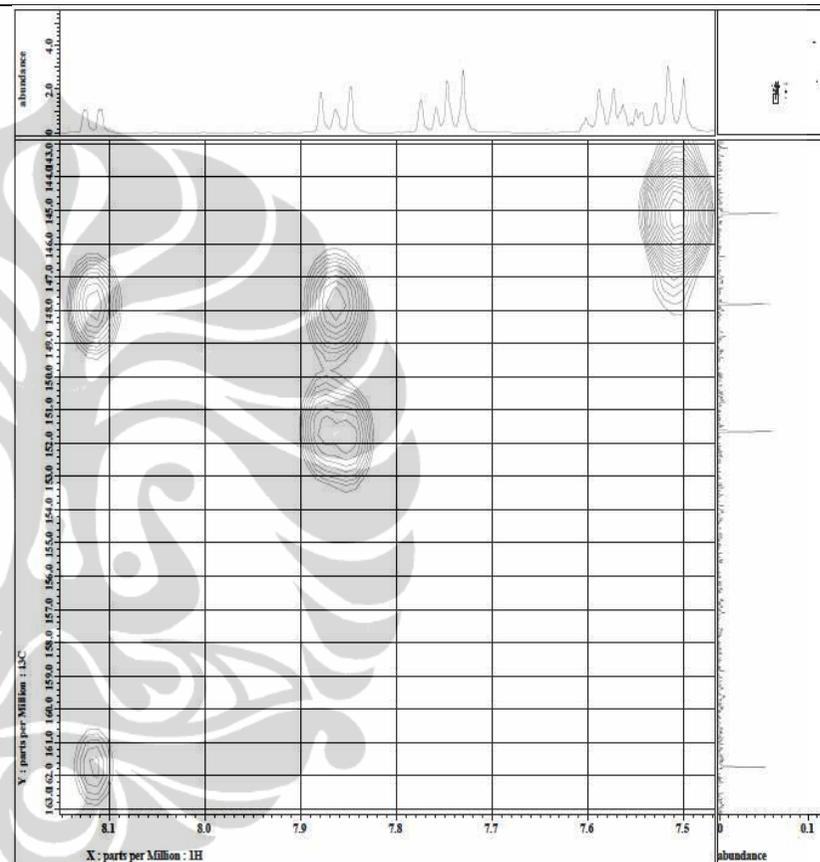
Gambar 4.51c. Spektrum HMQC senyawa **2a** (ekspansi-2)



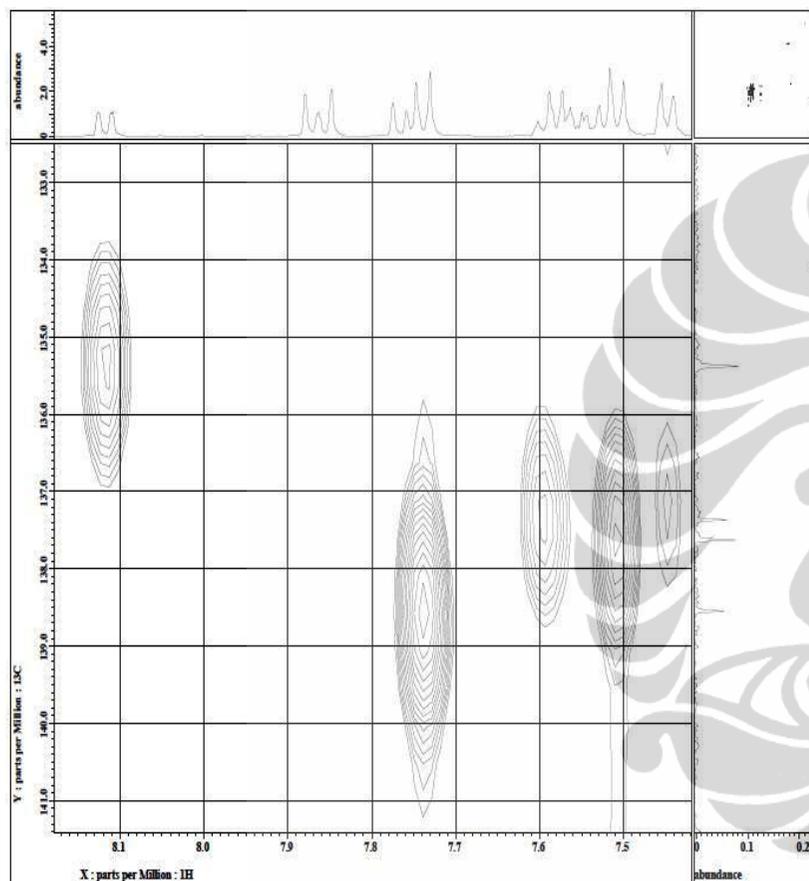
Gambar 4.51d. Spektrum HMQC senyawa **2a** (ekspansi-3)



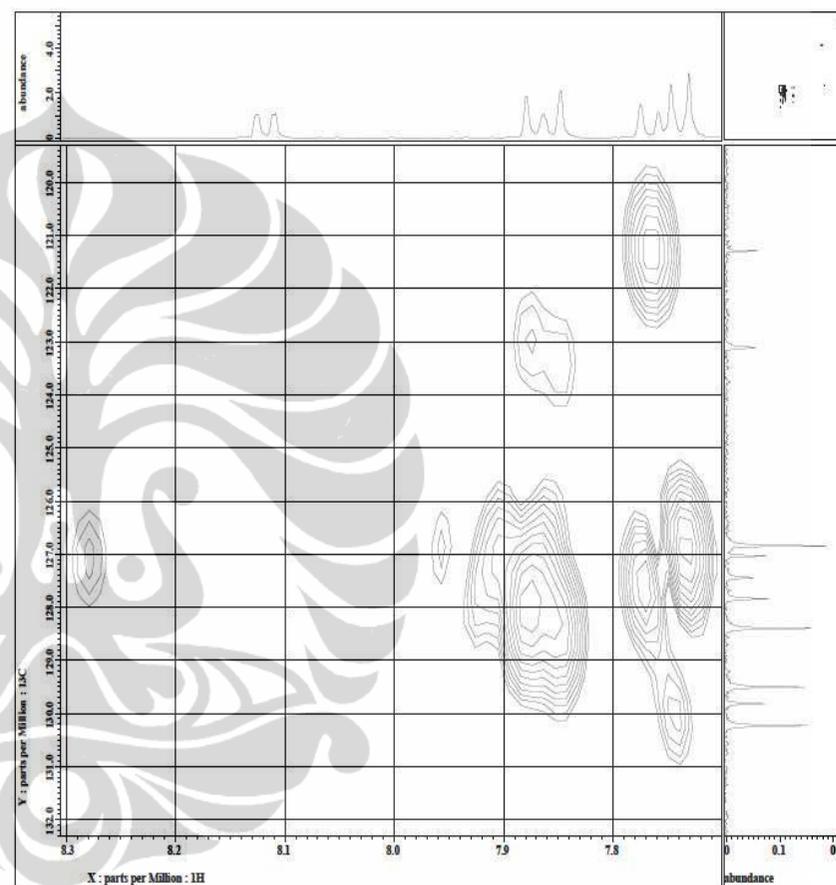
Gambar 4.52a. Spektrum HMBC senyawa **2a**



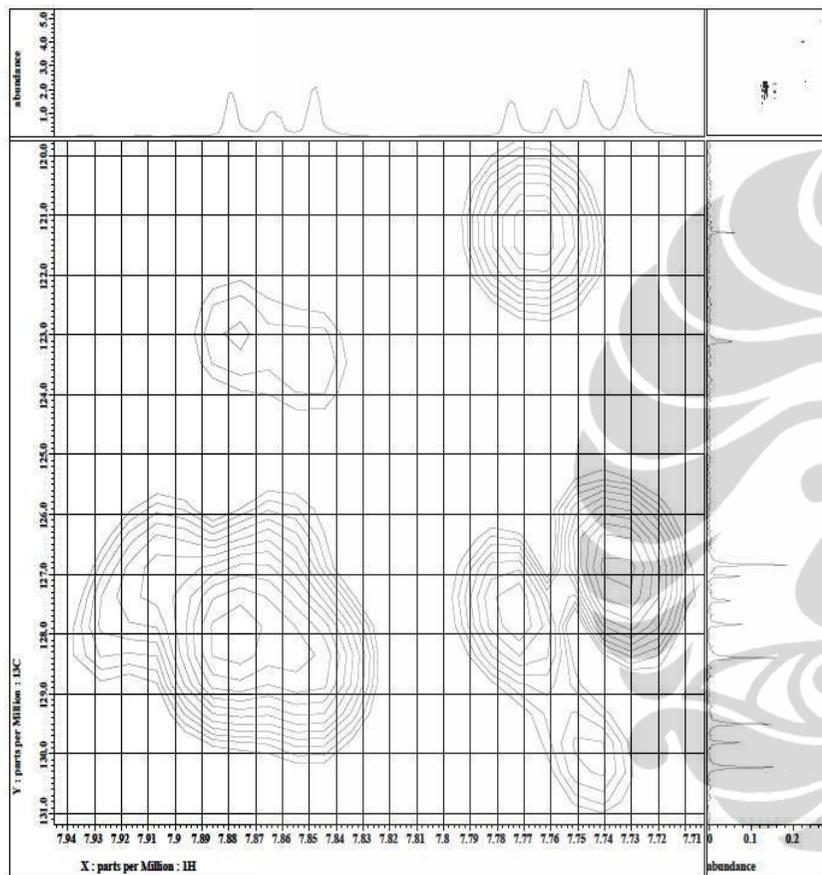
Gambar 4.52b. Spektrum HMBC senyawa **2a** (ekspansi-1)



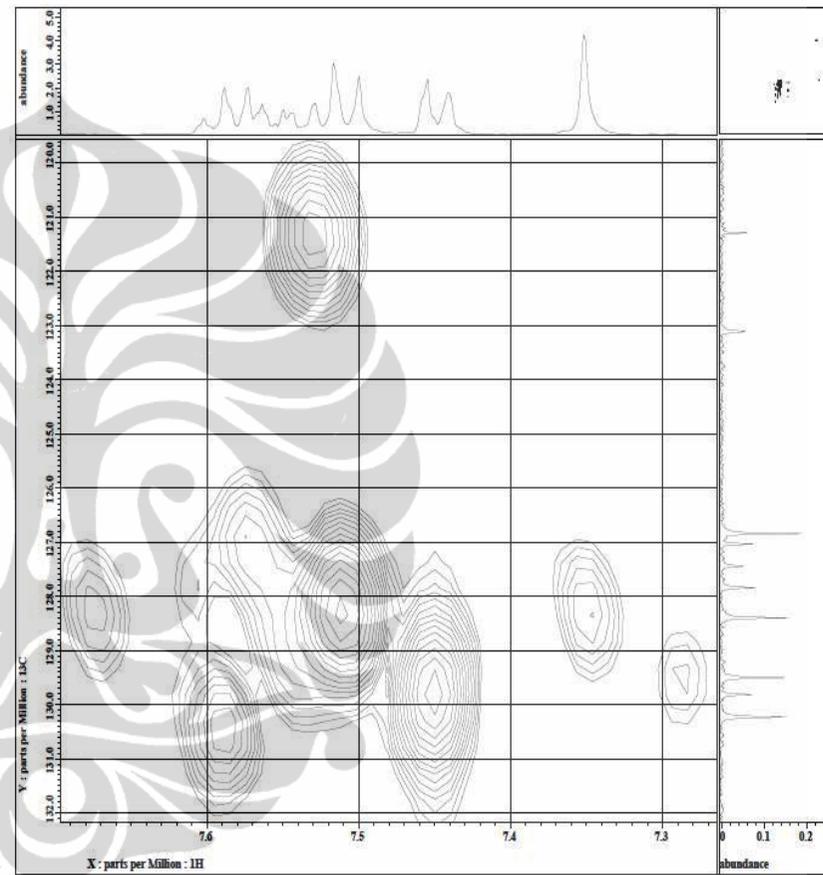
Gambar 4.52c. Spektrum HMBC senyawa **2a** (ekspansi-2)



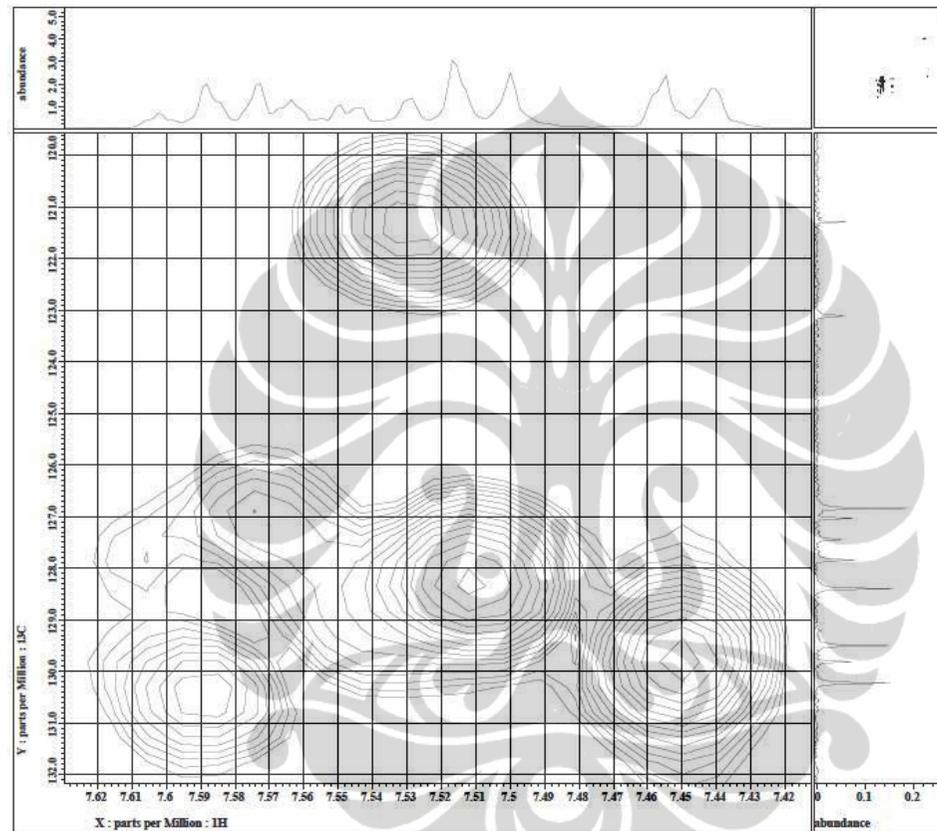
Gambar 4.52d. Spektrum HMBC senyawa **2a** (ekspansi-3)



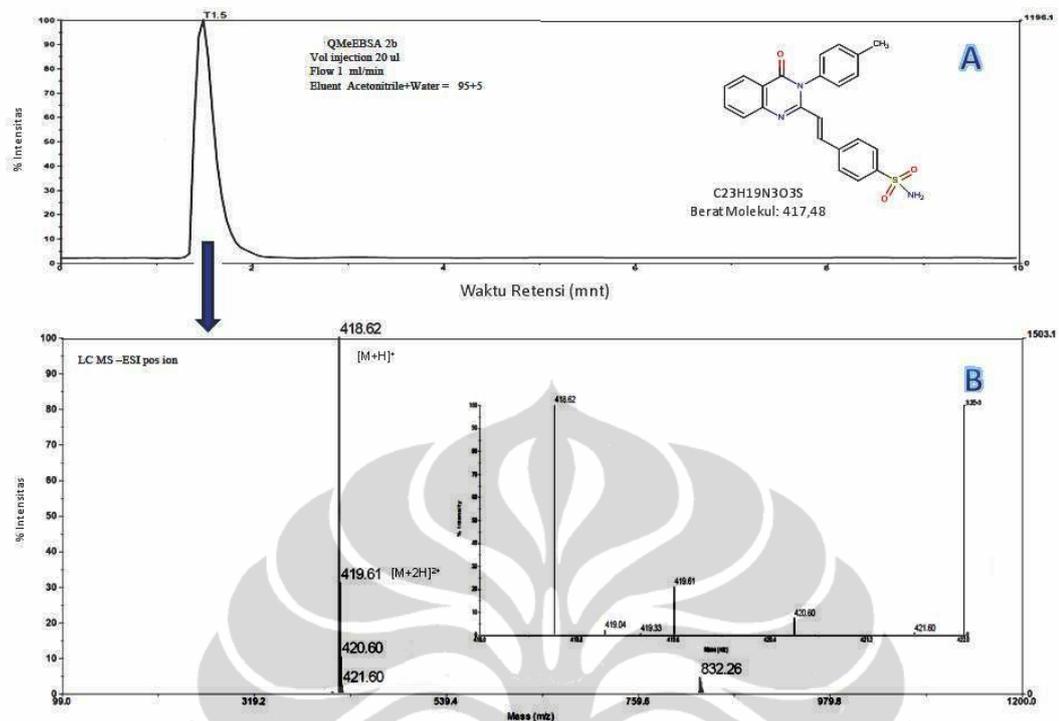
Gambar 4.52e. Spektrum HMBC senyawa **2a** (ekspansi-4)



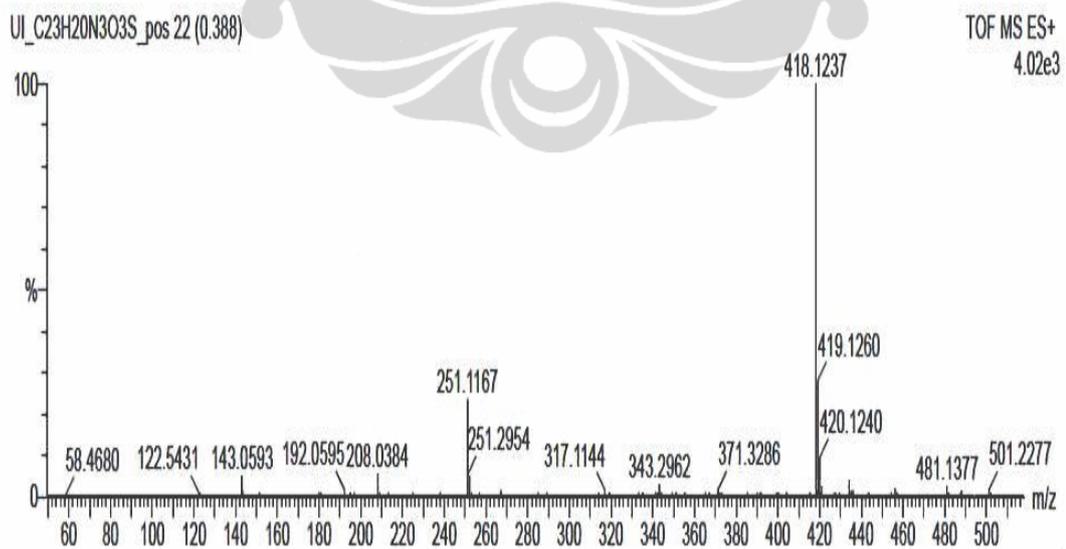
Gambar 4.52f. Spektrum HMBC senyawa **2a** (ekspansi-5)



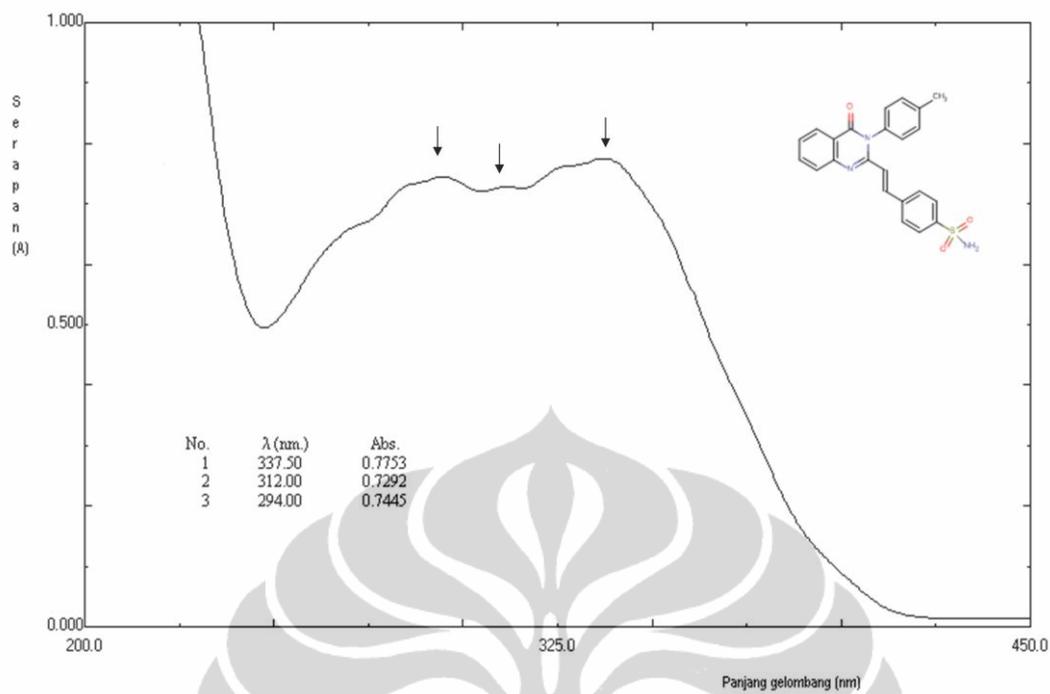
Gambar 4.52g. Spektrum HMBC senyawa 2a (ekspansi-6)



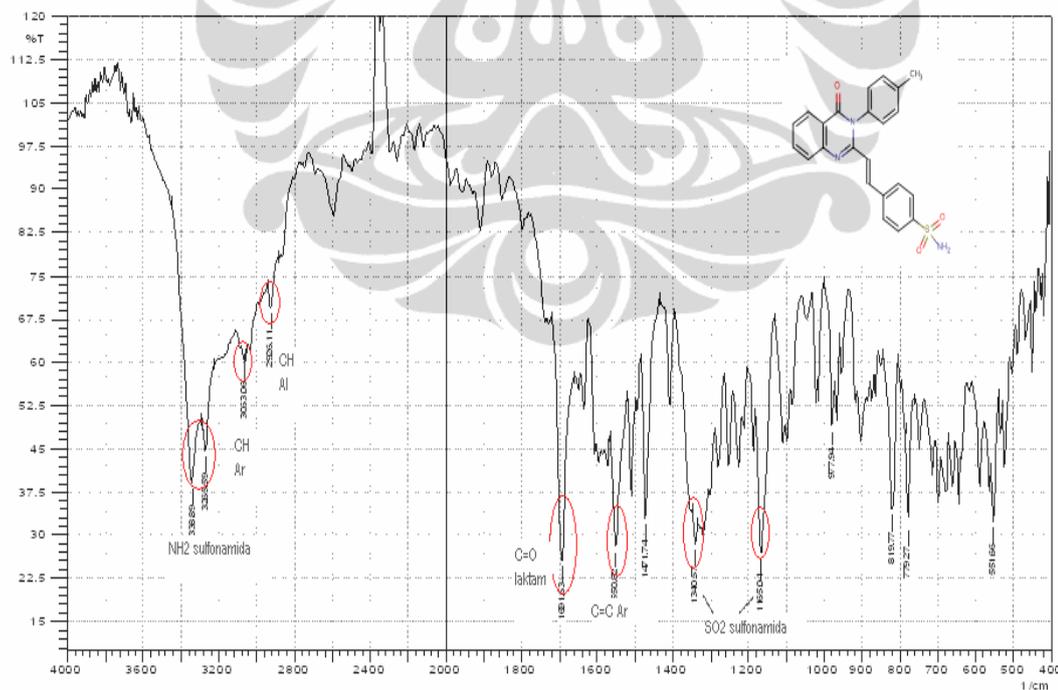
Gambar 4.54. A. Kromatogram dengan detektor massa senyawa **2b**.
 B. Spektrum massa LC-ESI+ senyawa **2b**



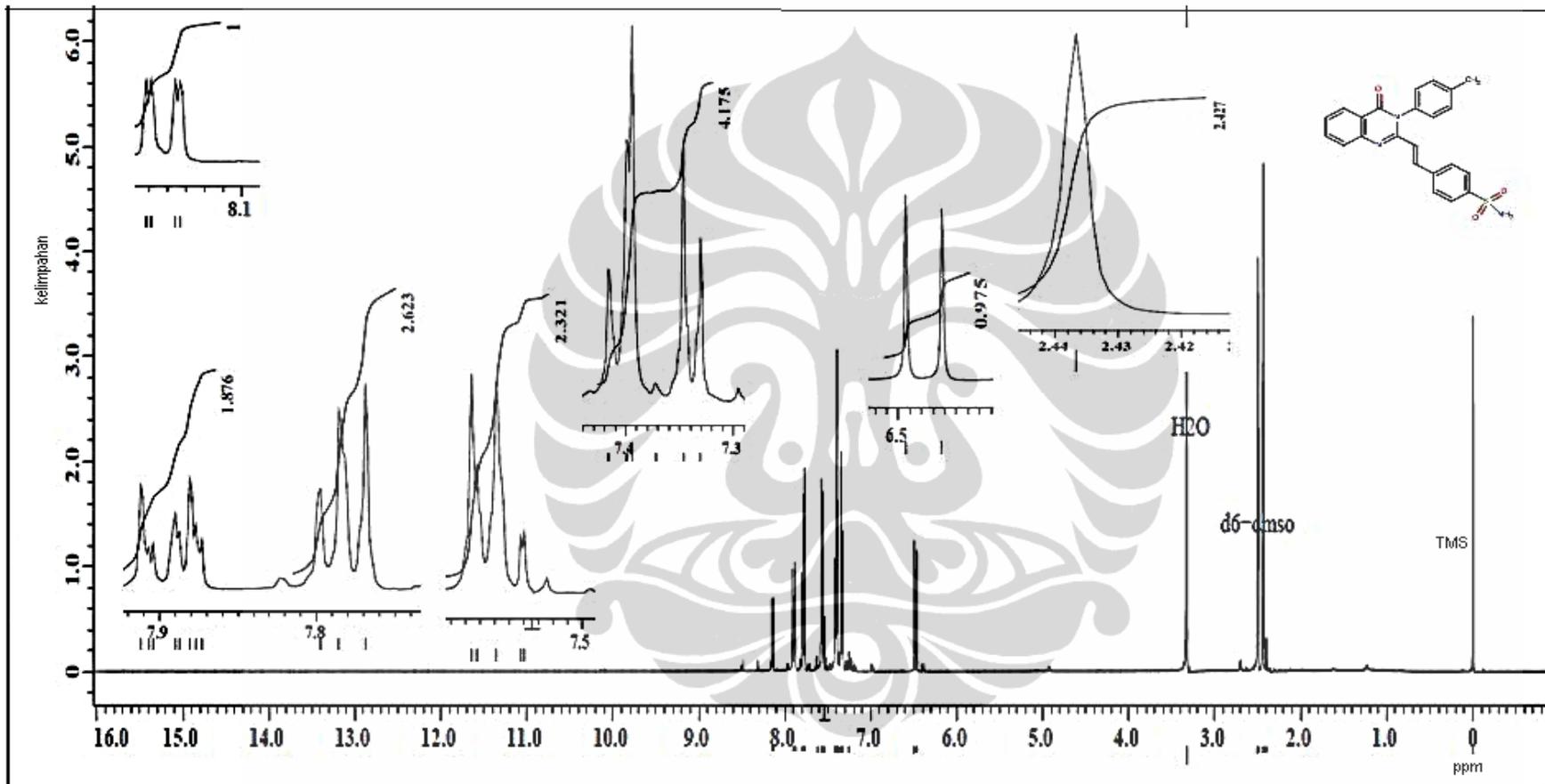
Gambar 4.55. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi (HR-MS) senyawa **2b**.



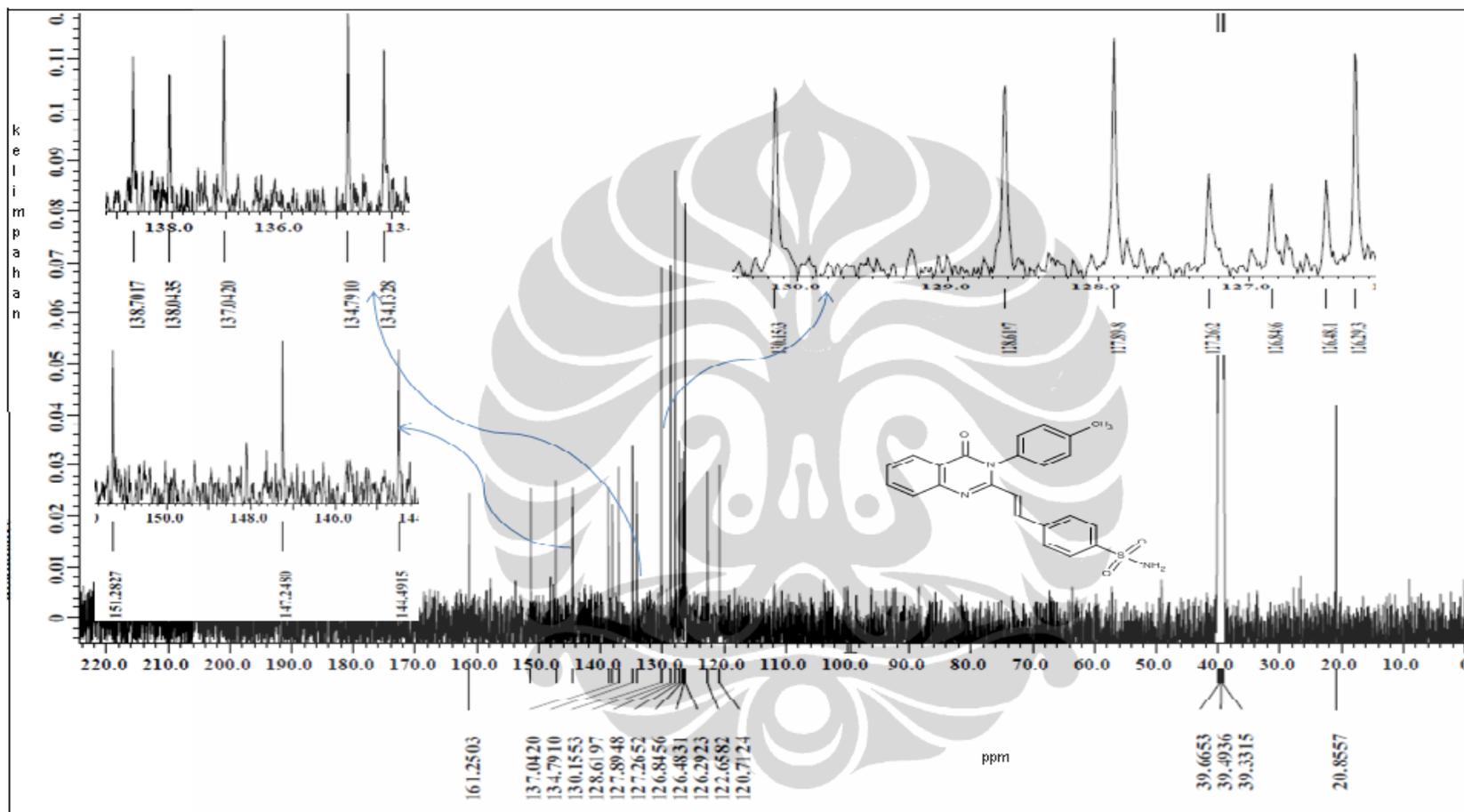
Gambar 4.56. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2b** dalam asetonitril.



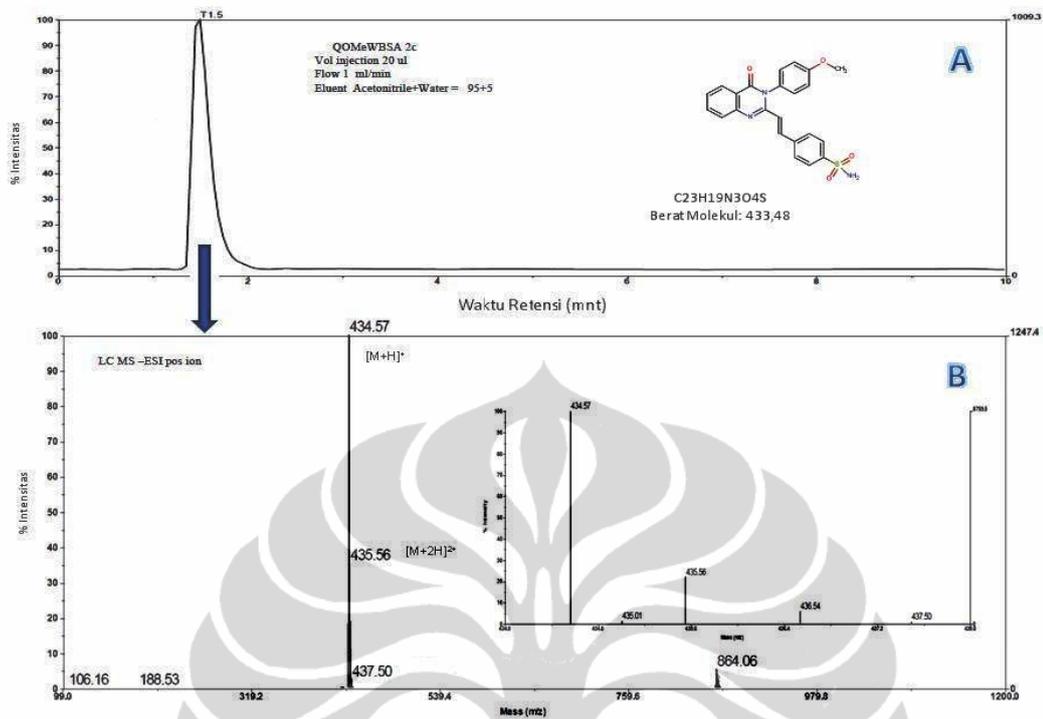
Gambar 4.57. Spektrum FT-IR senyawa **2b** dalam KBr



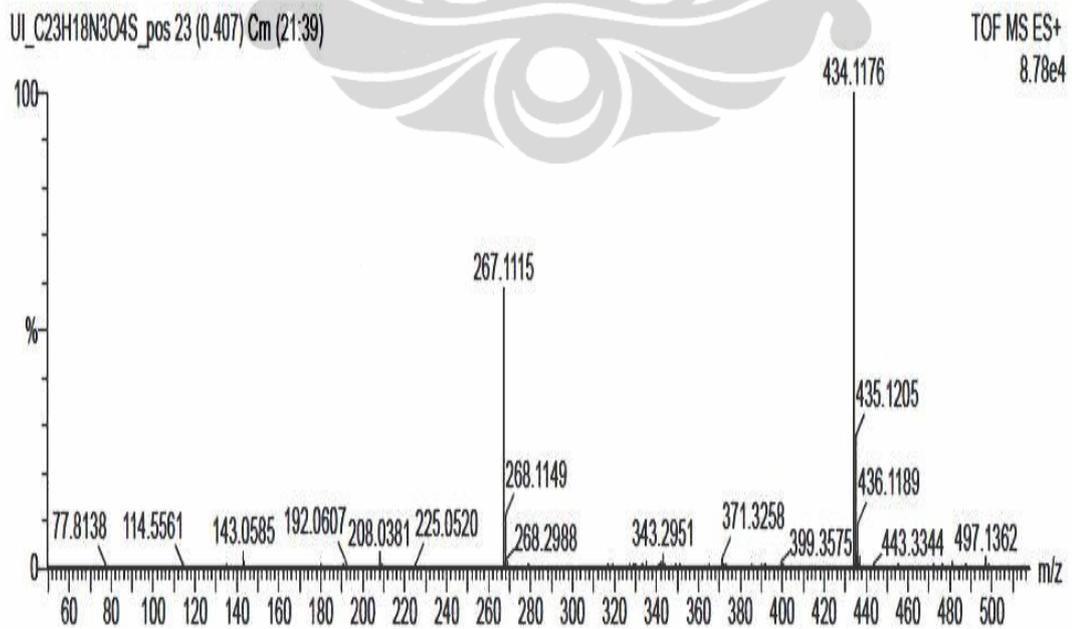
Gambar 4.58. Spektrum ¹H-NMR senyawa **2b** dalam (CD₃)₂SO pada 500 MHz



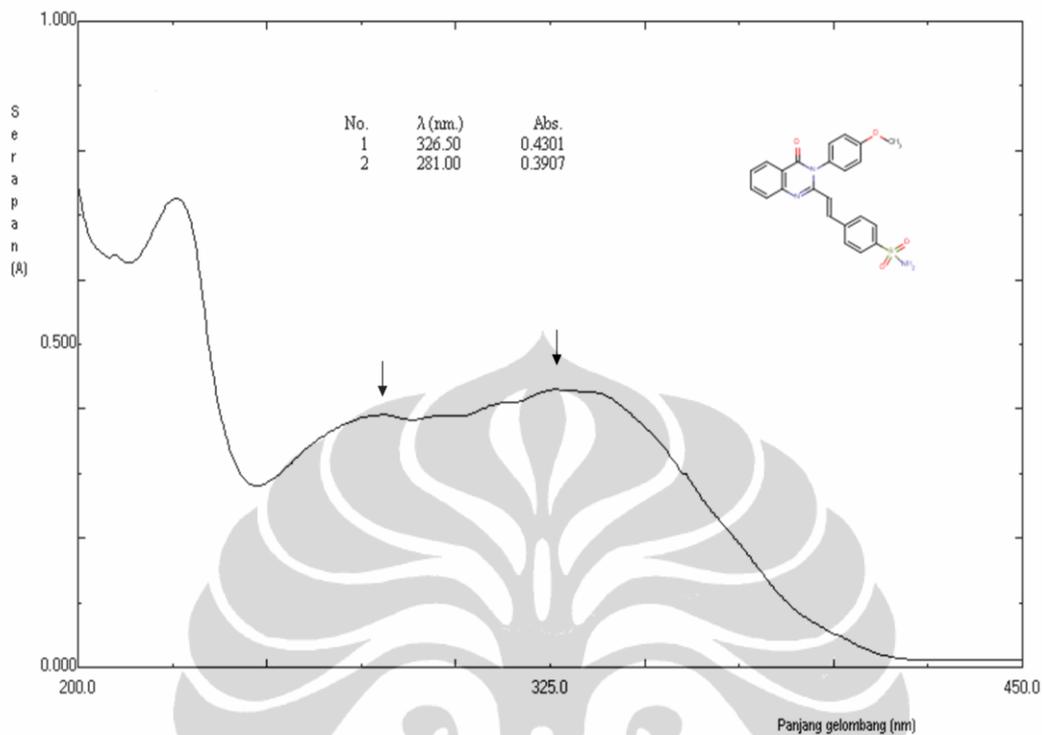
Gambar 4.59. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2b** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



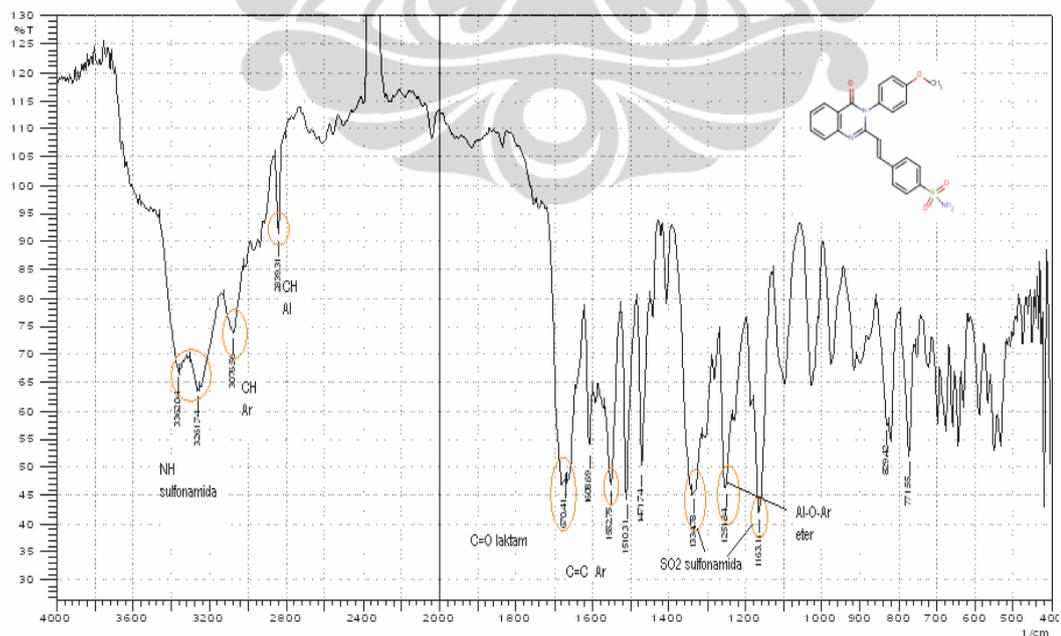
Gambar 4.60. A. Kromatogram dengan detektor massa senyawa 2c.
B. Spektrum Massa ESI+ senyawa 2c.



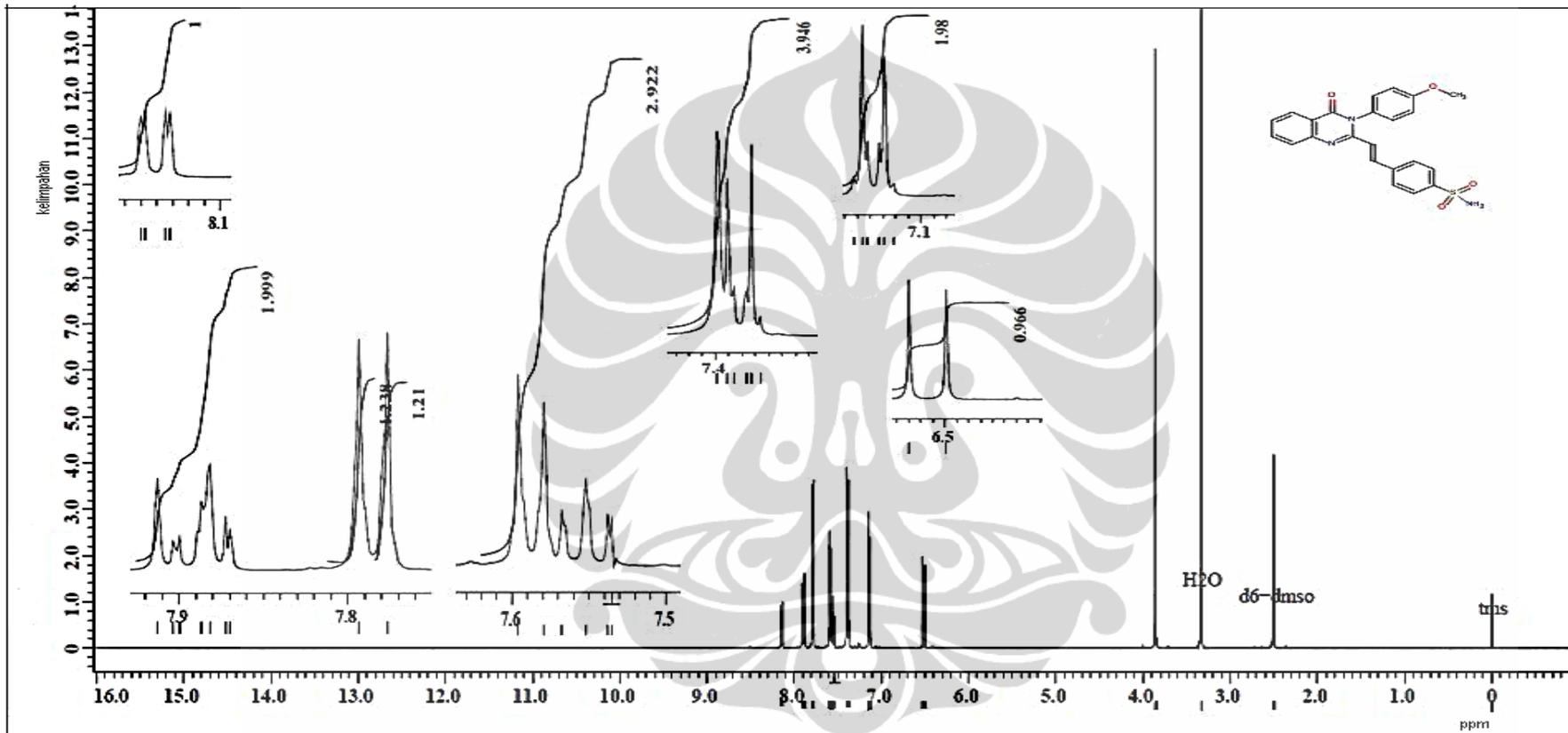
Gambar 4.61. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa **2c**.



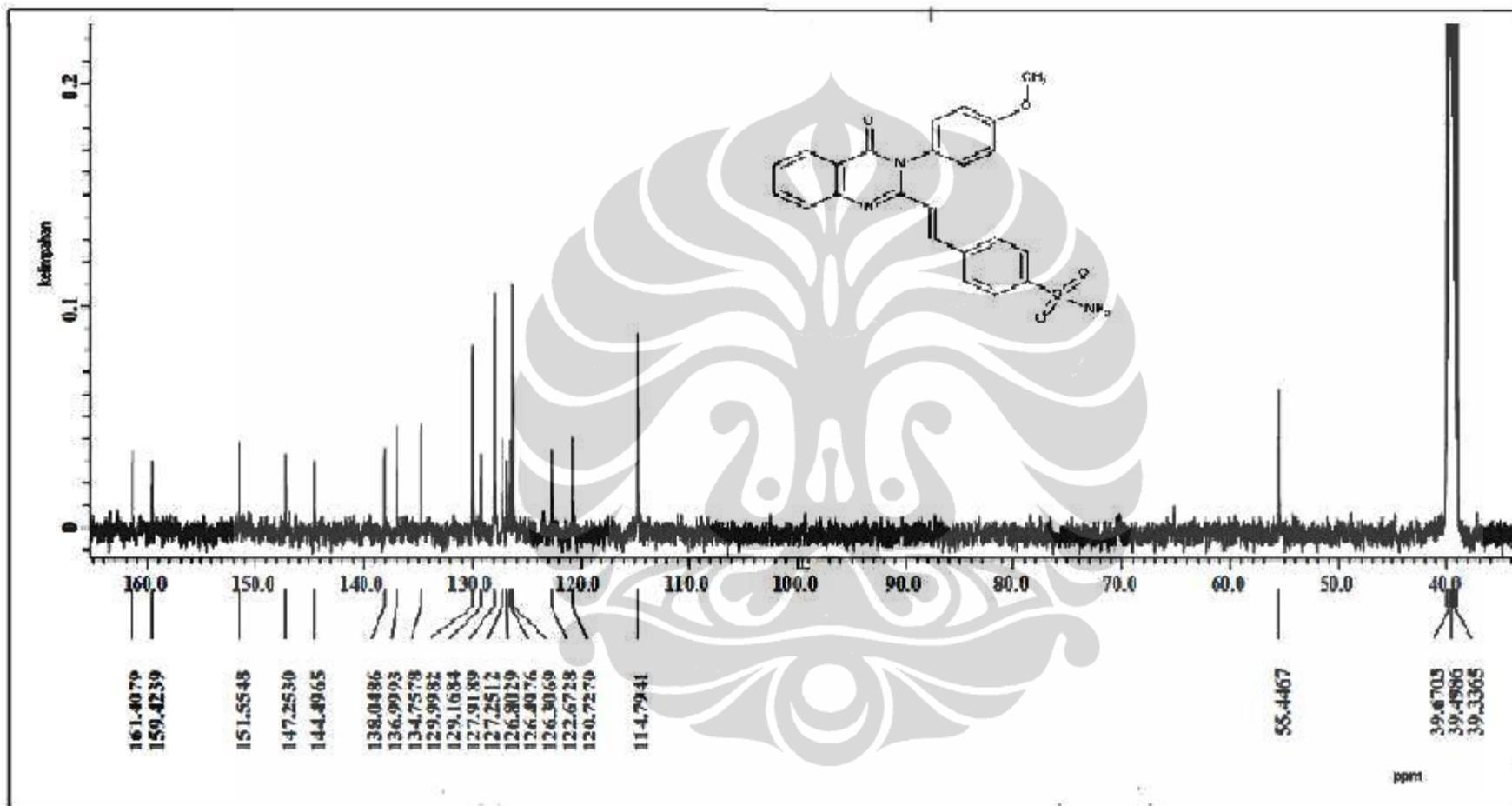
Gambar 4.62. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2c** dalam asetonitril.



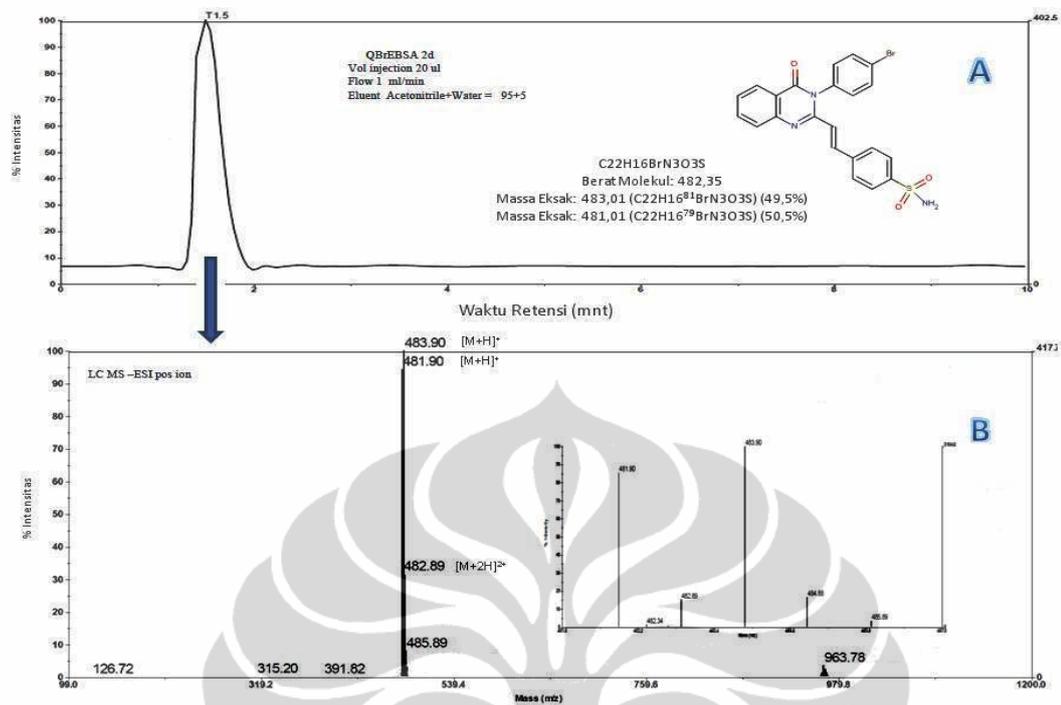
Gambar 4.63. Spektrum FT-IR senyawa **2c** dalam KBr



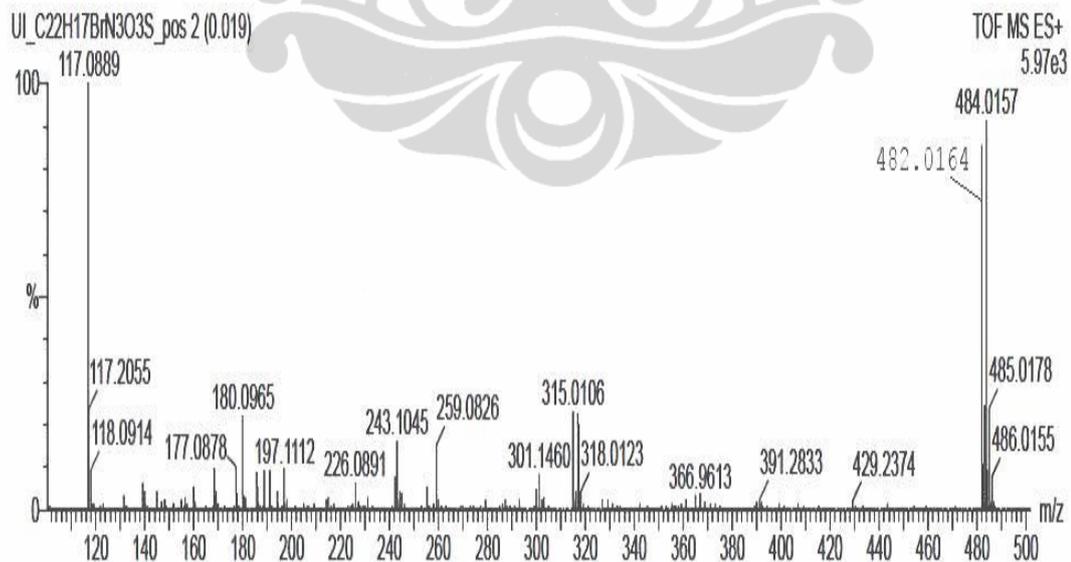
Gambar 4.64. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2c** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz



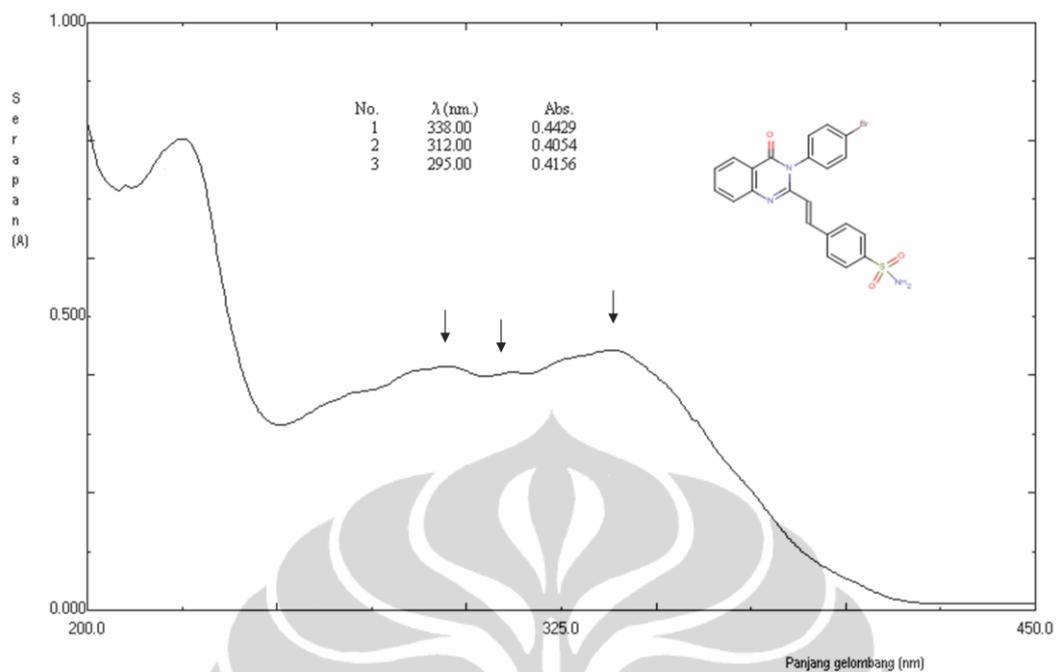
Gambar 4.65. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa 2c dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



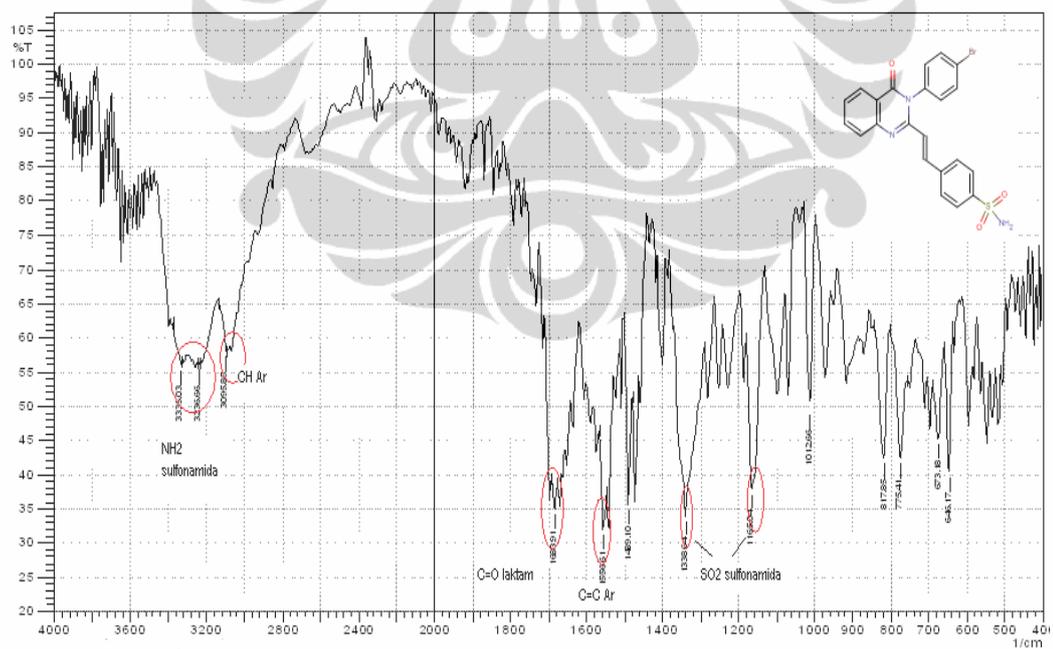
Gambar 4.66. A. Kromatogram dengan detektor massa senyawa **2d**.
B. Spektrum Massa ESI+ senyawa **2d**.



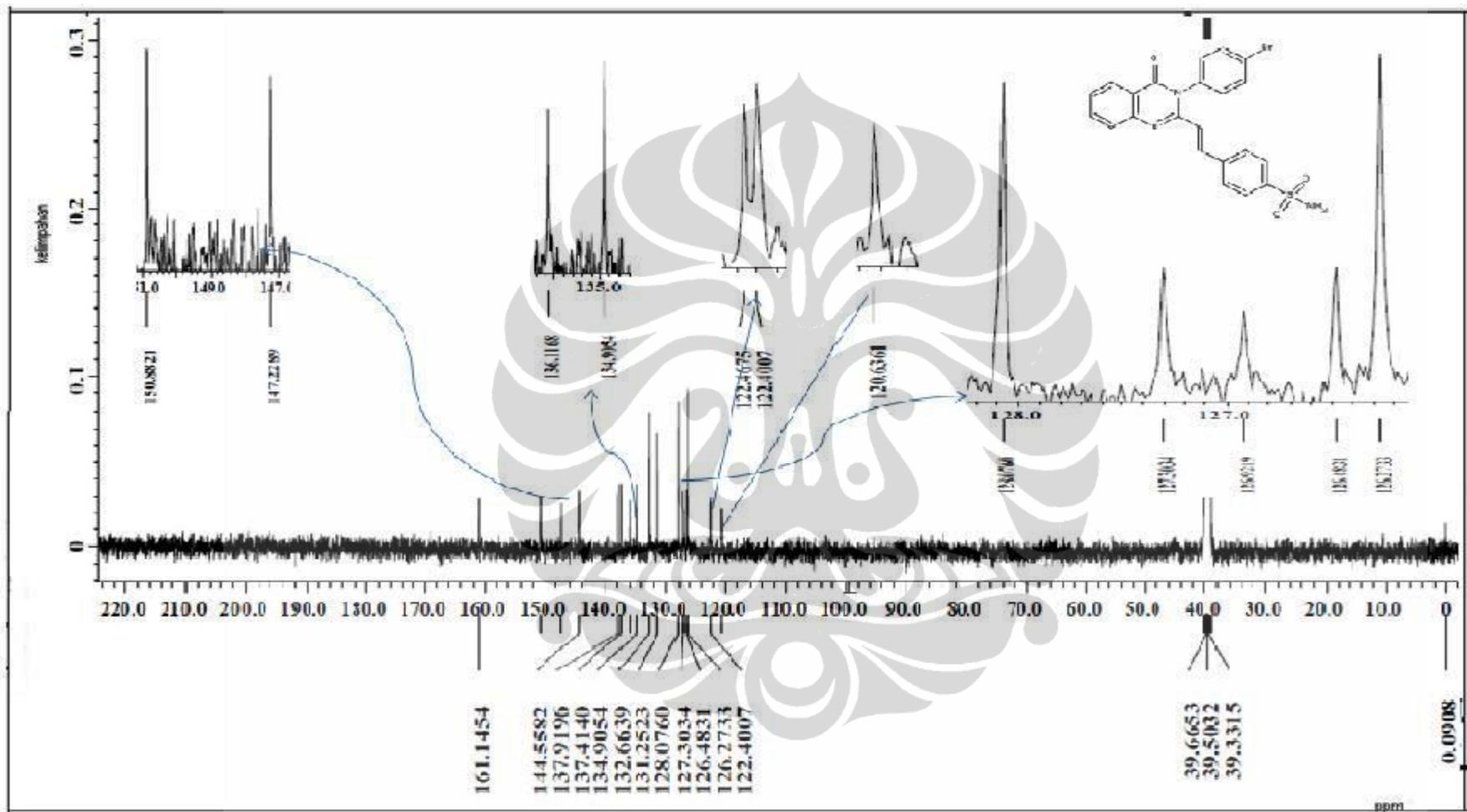
Gambar 4.67. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa **2d**.



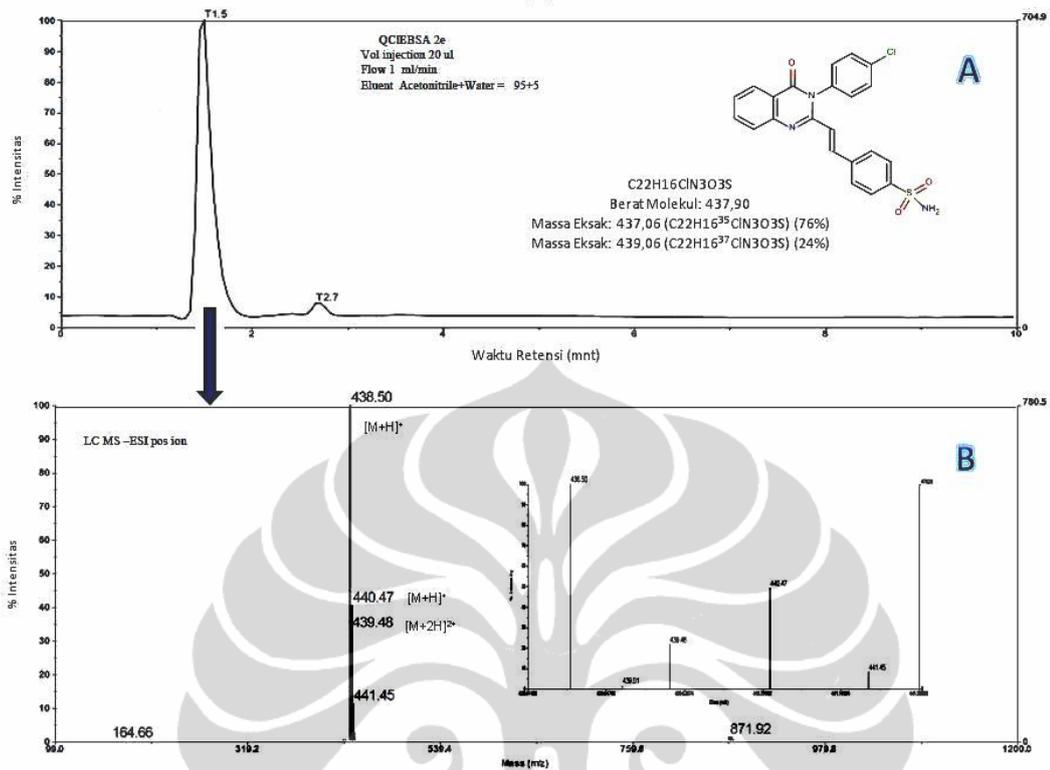
Gambar 4.68. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2d** dalam asetonitril.



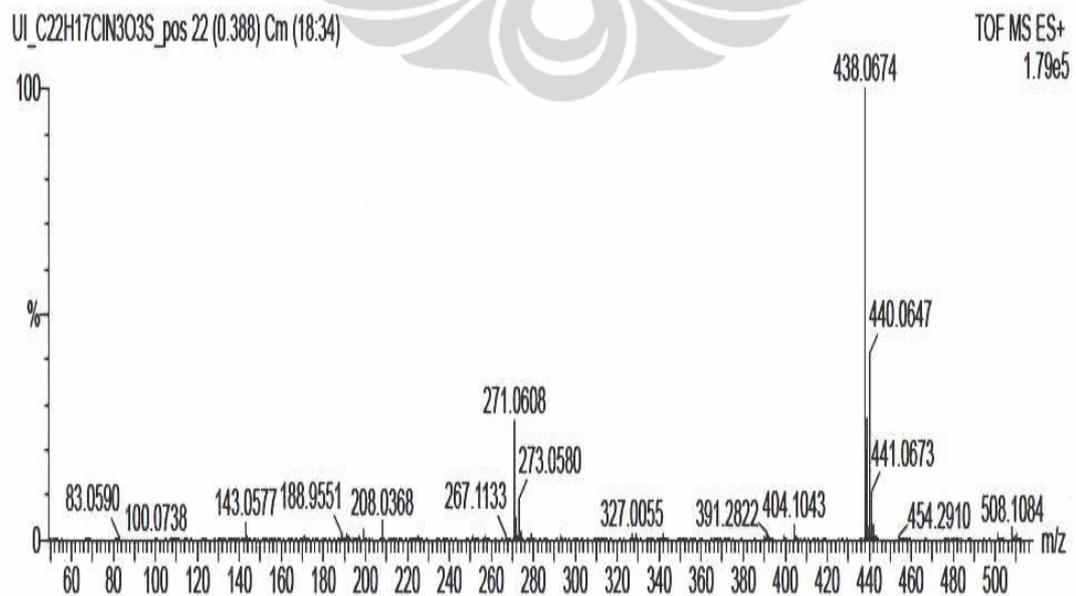
Gambar 4.69. Spektrum FT-IR senyawa **2d** dalam KBr



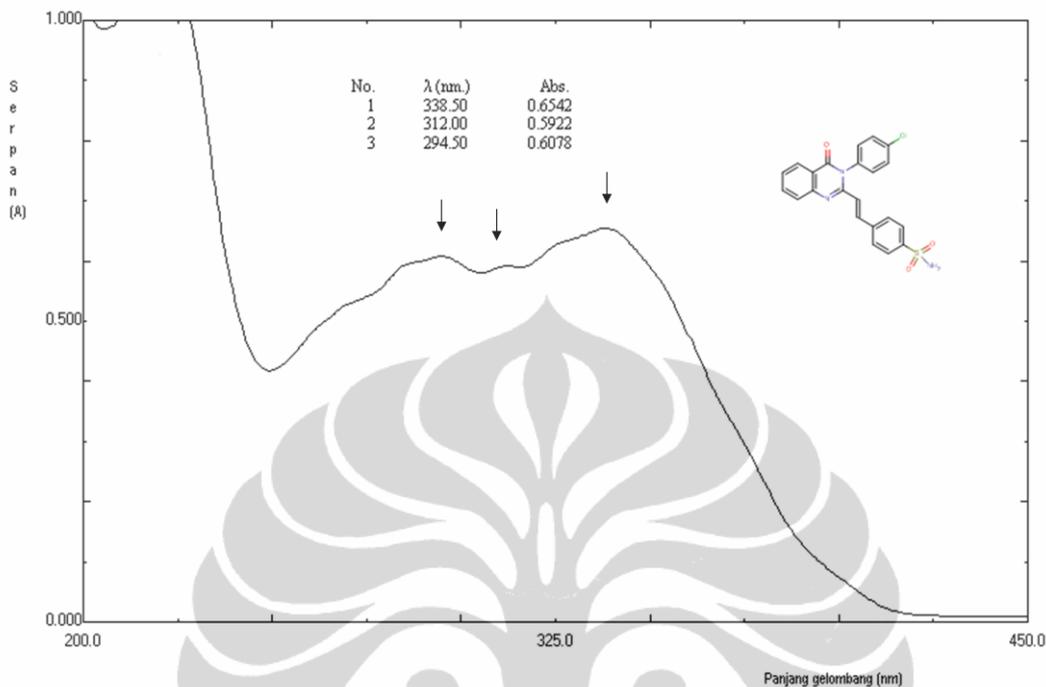
Gambar 4.71. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2d** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz



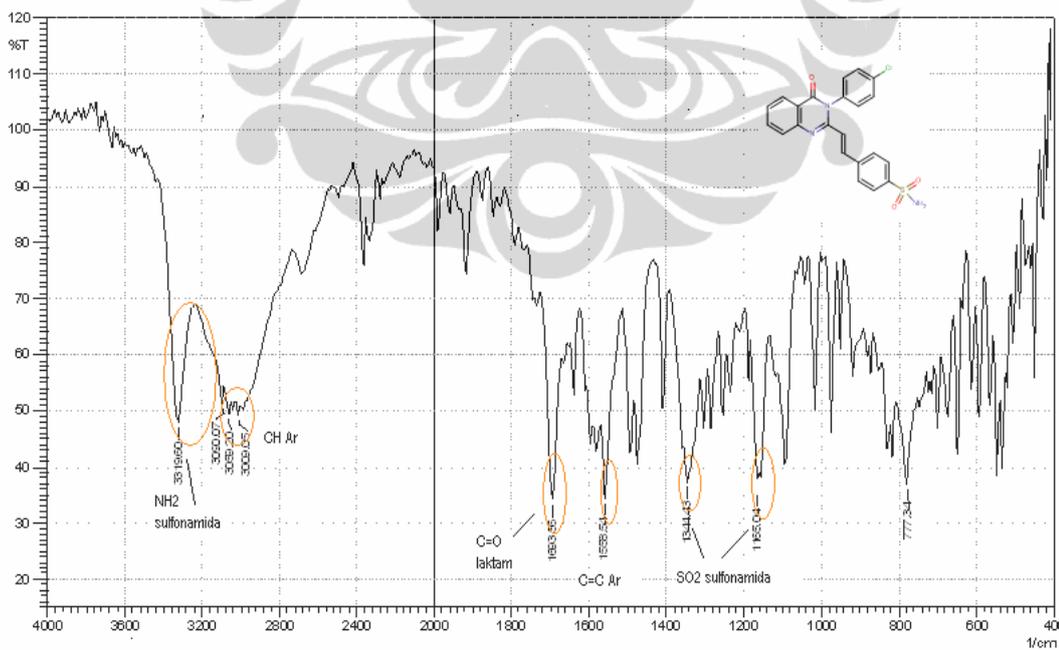
Gambar 4.72. A. Kromatogram dengan detektor massa senyawa 2e.
 B. Spektrum Massa ESI+ senyawa 2e.



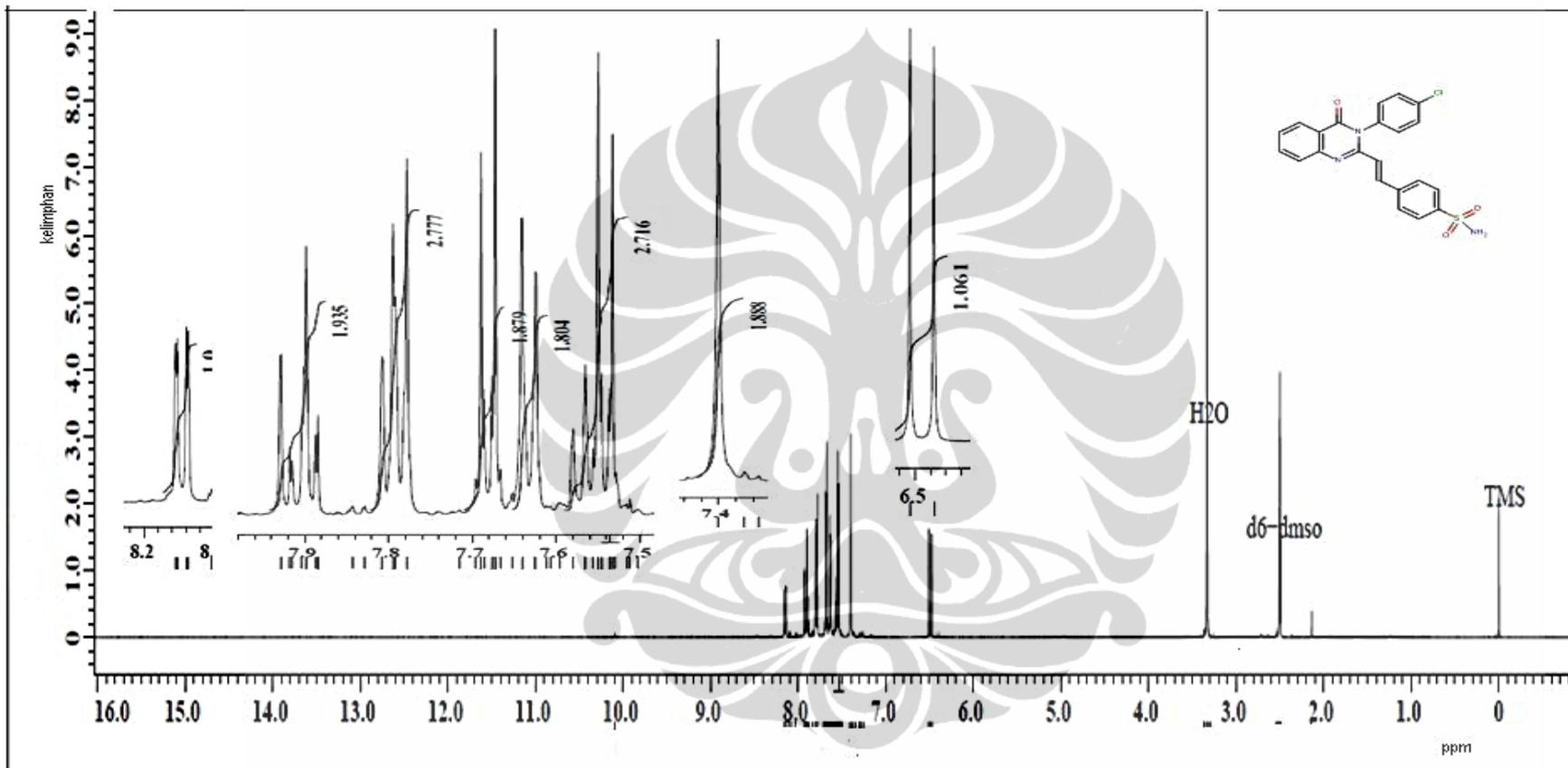
Gambar 4.73. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa **2e**.



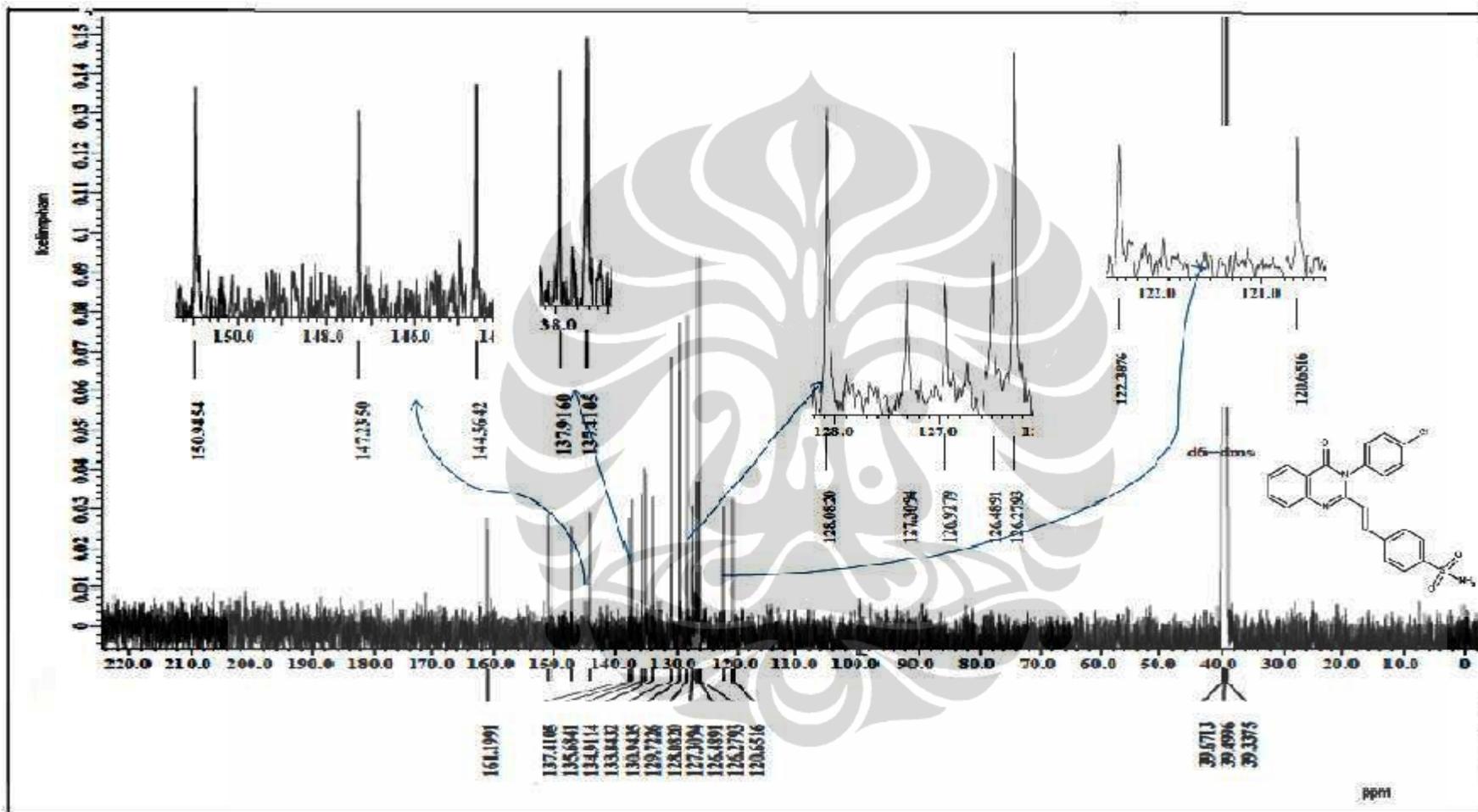
Gambar 4.74. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2e** dalam asetonitril.



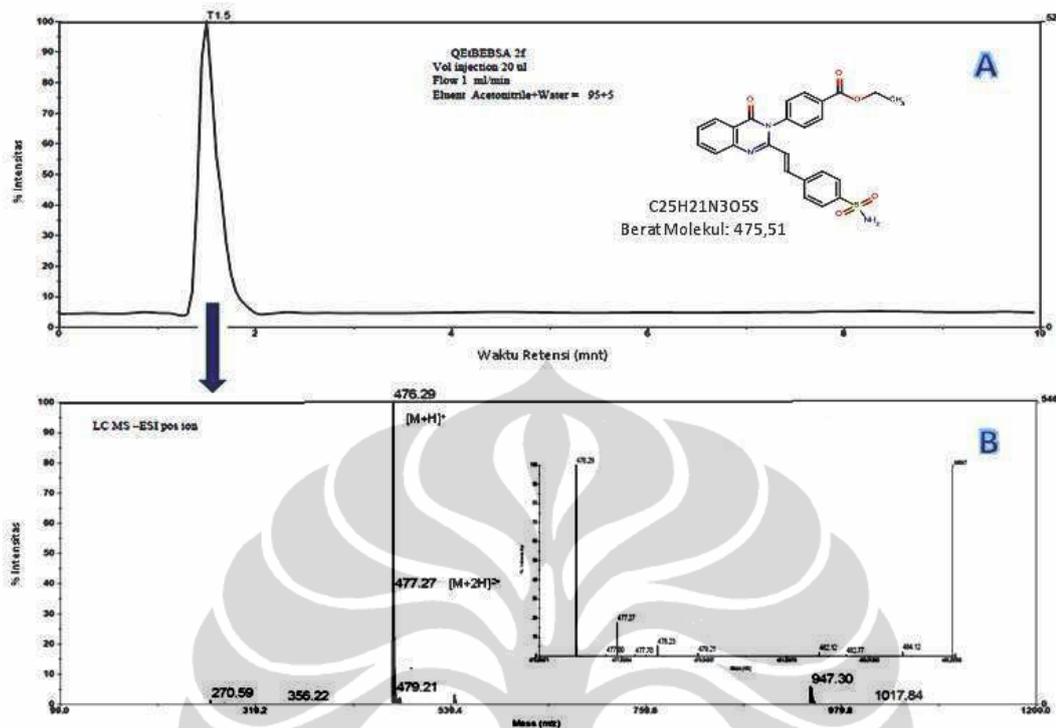
Gambar 4.75. Spektrum FT-IR senyawa **2e** dalam KBr



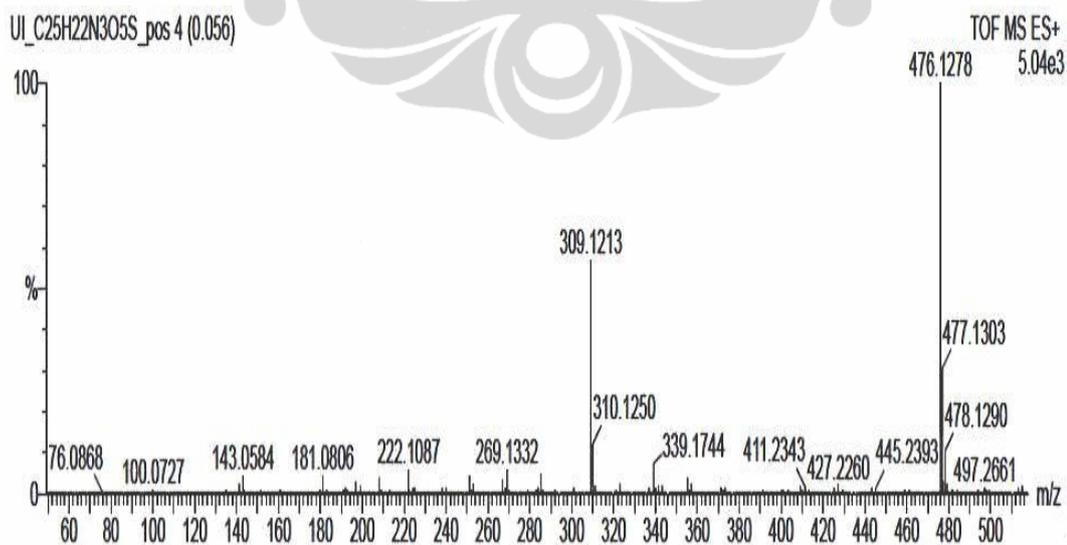
Gambar 4.76. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **2e** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 500 MHz



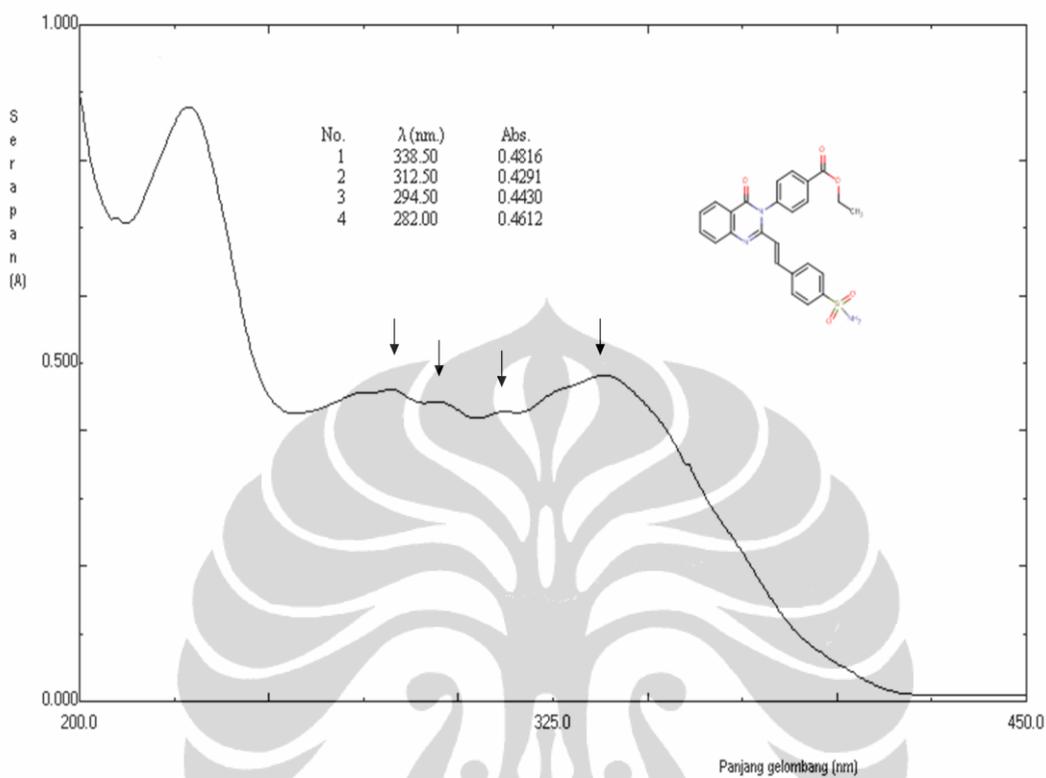
Gambar 4.77. Spektrum ¹³C-NMR senyawa 2e dalam (CD₃)₂SO pada 125 MHz



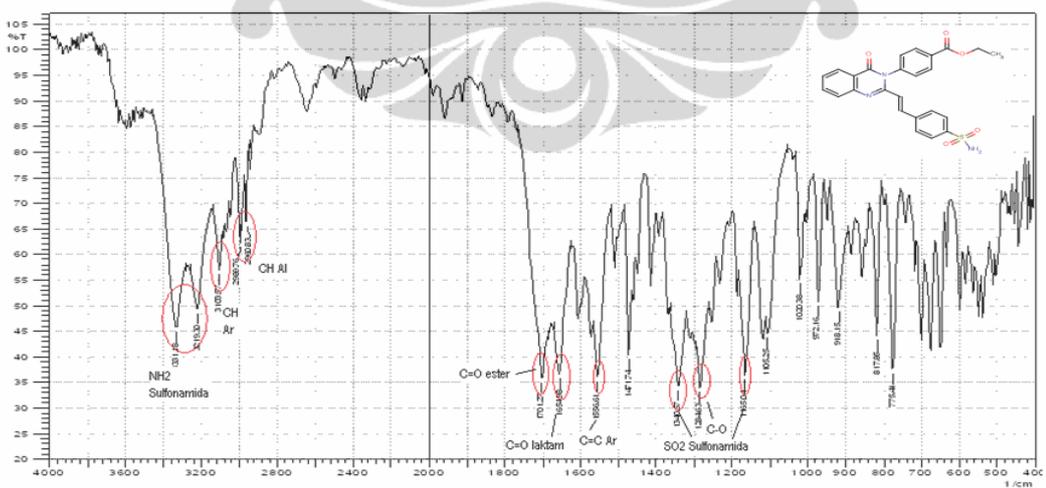
Gambar 4.78. A. Kromatogram dengan detektor massa senyawa 2f
 B. Spektrum Massa ESI+ senyawa 2f .



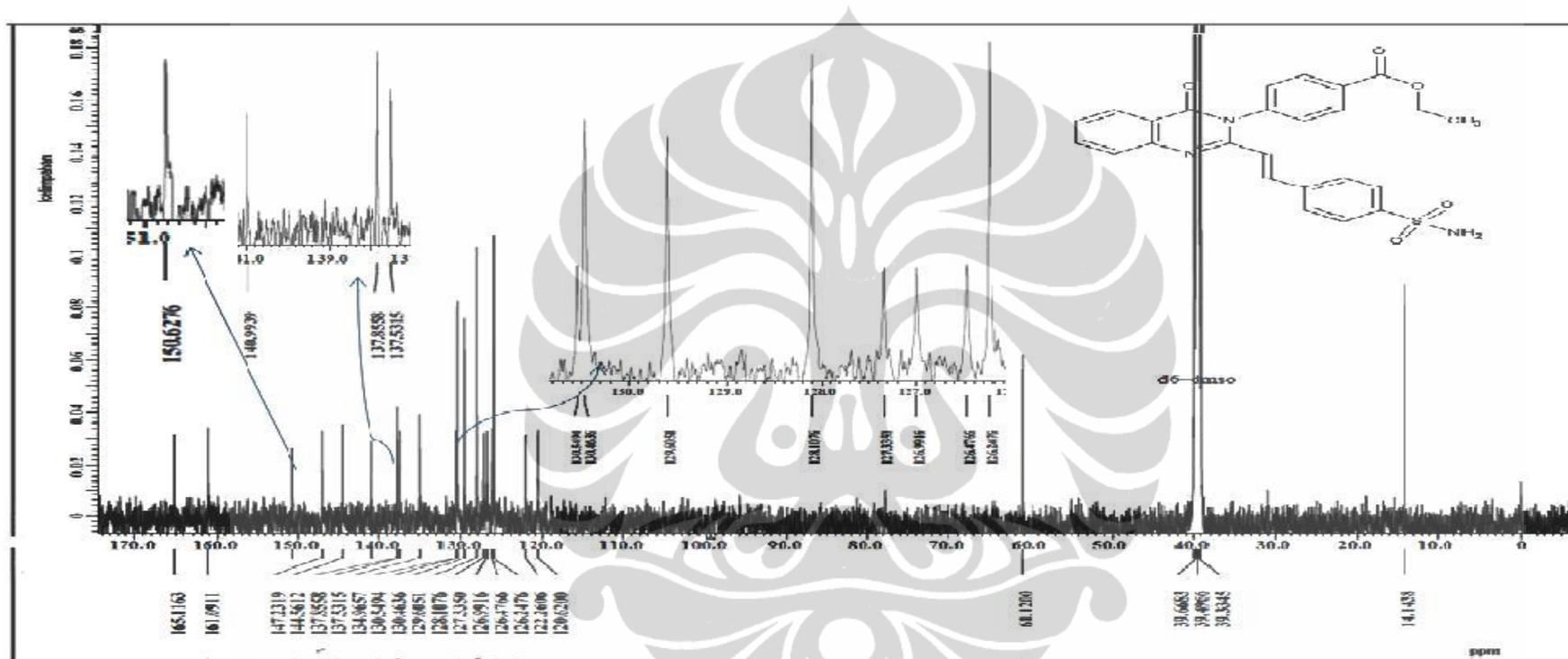
Gambar 4.79. Spektrum massa-ESI+ resolusi tinggi senyawa 2f.



Gambar 4.80. Spektrum UV-Vis larutan senyawa **2f** dalam asetonitril.



Gambar 4.81. Spektrum FT-IR senyawa **2f** dalam KBr.



Gambar 4.83. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2f** dalam $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ pada 125 MHz.

Lampiran 1.

Pembuatan Tembaga (I) sianida [Cu(I)CN] (Furniss, *et al.*, 1989, hal. 288).

Skema reaksi :



Bahan-bahan :

Tembaga (II)sulfat pentahidrat (Merck) (BM 249,68)	32,5 g
Kalium pentadisulfid ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (Merck)	10,5 g
Kalium sianida (KCN) (Merck)	9 g
Aquadest	154,5 ml

Cara kerja :

- 1) Tembaga (II) sulfat dilarutkan dalam 102,5 ml aquadest, dan dikur pH-nya. pH larutan harus dipastikan menunjukkan keasaman rendah (l.k. pH 5), kemudian dihangatkan hingga suhu 40-50°C.
- 2) Kalium pentadisulfid dan kalium sianida masing-masing dilarutkan dalam 26 ml aquadest dan dipanaskan hingga suhu 60°C.
- 3) Larutan kalium pentadisulfid ditambahkan ke dalam larutan tembaga (II) sulfat, diaduk selama 1-2 menit, dan segera ditambahkan larutan kalium sianida. Larutan akan sedikit berbusa, diaduk selama 10 menit, dan endapan yang terbentuk segera disaring (selagi panas) dengan corong *Buchner*, dicuci dengan air mendidih dan terakhir dicuci dengan etanol 95%.
- 4) Produk dikeringkan dalam oven pada suhu 100-110°C selama 24-36 jam.

Hasil :

Serbuk halus berwarna putih sebanyak 10,5 g (90,2%) (Lit. 93%)

Lampiran 2.

Daftar reagen yang digunakan untuk uji skrining inhibitor siklooksigenase (COX):

Reagen	Nomor Katalog ¹⁾
COX-1 (<i>ovine</i>)	460100
COX-2 (<i>human</i>)	460121
Heme	460102
Asam Arakidonat	460103
Dapar Reaksi	460104
Kalium Hidroksida	460105
Asam Hidroklorida	460106
Stanno Klorida	460107
DuP-697	70645
SC-560	70340
Traser Skrining PG AChE	414006
Antiserum Skrining PG EIA	414016
Standar Skrining PG EIA	414026
Pelat Sumur Uji terlapisi IgG “ <i>Mouse Anti-rabbit</i> ”	10003701
Dapar EIA	400060
Reagen Ellman’s	400050

¹⁾ Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA

Lampiran 3.

Penentuan Persen (%) Inhibisi dan IC₅₀ (COX inhibitor, 2011).

Perhitungan dilakukan menggunakan lembar kerja komputer (Microsoft Office Excel) yang disediakan oleh Cayman Chemical Co.

Langkah-langkah perhitungannya sebagai berikut:

a) Penyiapan Data

- 1) Data mentah disajikan sesuai *layout* pada program
- 2) Semua data dikurangi dengan rata-rata blanko.
- 3) Data serapan sumur pengikatan non spesifik (NSB) dirata-rata.
- 4) Data serapan sumur pengikatan maksimum (B₀) dirata-rata.
- 5) Rata-rata B₀ dikurangi dengan rata-rata NSB, diperoleh B₀ terkoreksi.
- 6) Rasio Pengikatan Sampel atau Standar terhadap Pengikatan Maksimum (B/B₀) untuk sumur-sumur yang tersisa dihitung. Untuk mengerjakan ini, serapan S1 dikurangi dengan rata-rata serapan NSB dan dibagi dengan B₀ terkoreksi (dari langkah ke 5). Langkah ini diulangi untuk S2-S8 dan semua sumur-sumur sampel.

b) Pembuatan Kurva Baku PG

- 1) Data dilinierisasi menggunakan transformasi logit, dengan persamaan:

$$\text{Logit (B/B}_0) = \ln [B/B_0/(1-B/B_0)]$$

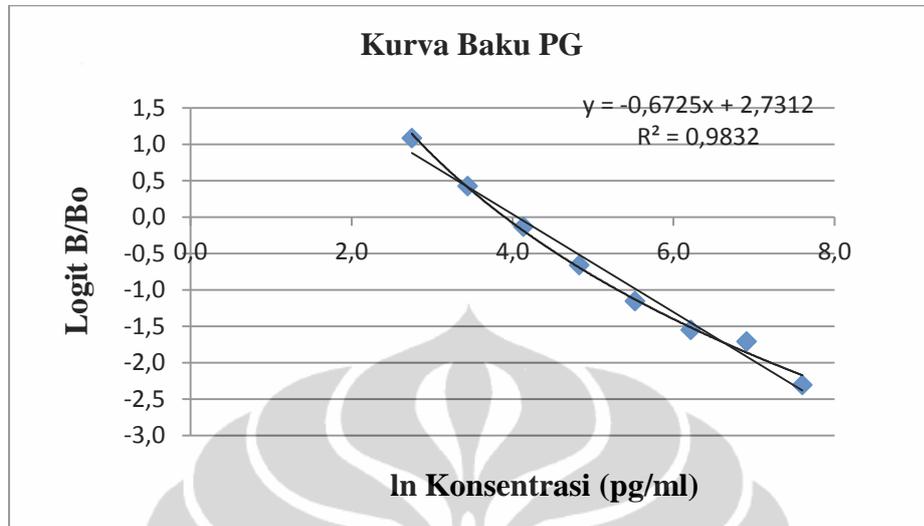
- 2) Data logit (B/B₀) versus ln konsentrasi diplot, kemudian dilakukan analisis regresi linier. Persamaan regresi diperoleh.

Contoh:

Hasil pengukuran baku PG dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Konsentrasi PG (pg/ml) (X)	ln (X)	logit B/B ₀
2000,00	7,6	-2,3041
1000,00	6,9	-1,7077
500,00	6,2	-1,5486
250,00	5,5	-1,1533
125,00	4,8	-0,6584
62,50	4,1	-0,1307
31,25	3,4	0,4274
15,63	2,7	1,0858

Kurva baku PG yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Persamaan garis regresi yang diperoleh:

$$Y = -0,6725 X + 2,7312$$

$$R^2 = 0,9832 \quad n = 8 \quad k = 2 \quad k_1 = 1 \quad k_2 = 2$$

$$r = 0,9916 \quad s = 0,162955$$

Nilai r teoritik (untuk $P' = 0,05$, $\emptyset = 6$) = 0,71

r hitungan > harga r teoritik → pada aras 95%, korelasi X dan Y signifikan

$F_{(1,6)}$ hitungan = 352,6001.

$F_{(1,6)}$ tabel pada aras 0,995 = 18,64

$F_{(1,6)}$ hitungan > $F_{(1,6)}$ tabel

→ persamaan regresi signifikan pada aras > 99,5%.

c) Penentuan Konsentrasi PG yang terbentuk.

- 1) Nilai Logit B/Bo untuk setiap sampel dihitung
- 2) Konsentrasi PG untuk setiap sampel dihitung dengan memasukkan ke dalam persamaan regresi yang diperoleh. Nilai B/B₀ yang lebih besar dari 0,80 dan yang kurang dari 0,20 tidak digunakan, karena berada diluar rentang linier dari kurva baku PG. Konsentrasi PG sampel-sampel COX yang diperoleh kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran yang digunakan.

d) Penentuan persen (%) inhibisi

- 1) Konsentrasi PG pada Aktivitas Inisial 100% (IA 100%) dan sampel-sampel inhibitor COX dikurangi dengan konsentrasi PG pada *background* (BC1 atau BC2) diperoleh konsentrasi PG terkoreksi pada IA 100% dan sampel-sampel inhibitor
- 2) Persen (%) inhibisi dihitung dengan rumus:

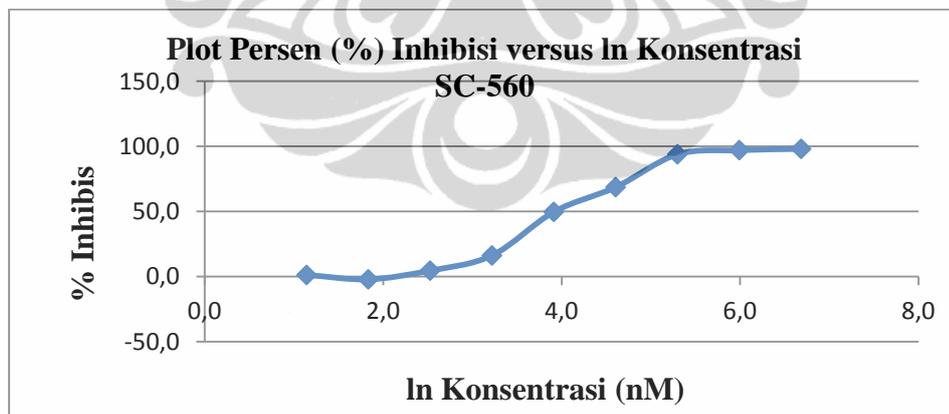
$$\text{Persen (\%)inhibisi} = \frac{[\text{PG IA 100\%}] - [\text{PG SAMPEL INHIBITOR}]}{[\text{PG IA 100\%}]} \times 100$$

e) Penentuan IC₅₀ (Konsentrasi yang menyebabkan inhibisi 50%)

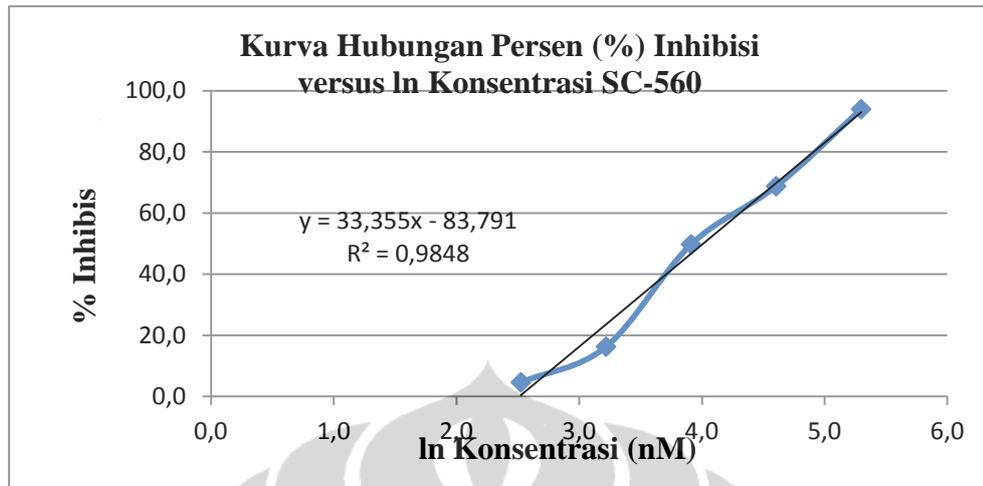
- 1) Data ln konsentrasi inhibitor diplot versus persen (%) inhibisi.
- 2) Dilakukan analisis regresi linier dengan data-data disekitar konsentrasi inhibisi 50%, maka diperoleh persamaan garis regresi.

Contoh:

Pehitungan IC₅₀ inhibitor COX-1 selektif SC-560 (Data persen (%) inhibisi pada Tabel 4.19). Kurva hubungan konsentrasi inhibitor versus % inhibisi yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar berikut :



Hasil analisis regresi regresi linier pada data-data di sekitar inhibisi 50%, diperoleh kurva dan persamaan garis regresi berikut:



Persamaan regresi yang diperoleh:

$$Y = 33,355 X - 83,791;$$

$$R^2 = 0,9848 \quad n = 5 \quad k = 2 \quad k_1 = 1 \quad k_2 = 2$$

$$r = 0,9924 \quad s = 5,240603$$

Nilai r teoritik (untuk $P' = 0,05$, $\emptyset = 3$) = 0,88

r hitungan > harga r teoritik → pada aras 95%, korelasi X dan Y signifikan

$$F_{(1,3)} \text{ hitungan} = 196,3442$$

$$F_{(1,3)} \text{ tabel pada aras } 0,995 = 55,55$$

$$F_{(1,3)} \text{ hitungan} > F_{(1,3)} \text{ tabel}$$

→ persamaan regresi signifikan pada aras > 99,5%.

Perhitungan IC₅₀:

$$IC_{50} \text{ SC-560: } \rightarrow 50 = 33,355 X - 83,791$$

$$\rightarrow \ln X \text{ (nM)} = 4,0111$$

$$\rightarrow X = 55,21 \text{ nM} = 0,05521 \mu\text{M} (0,06 \mu\text{M})$$

Lampiran 4.

DAFTAR PUBLIKASI TERKAIT DISERTASI

1. Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., and Hudiyono, S. (2011). Virtual Screening of 2,3-Disubstituted-4(3H)-Quinazolinones Possessing Benzenesulfonamide Moiety for COX-2 Inhibitor. *Bioinformation*, 7(5): 246-250. (Impact Factor: 1.15)
2. Hayun, Hanafi, M., Yanuar, A., and Hudiyono, S. (2012). 2-Methoxy-5-{4-oxo-2-[(E)-2-(4-sulfamoylphenyl)ethenyl]-3,4-dihydroquinazolin-3-yl}benzene-1-sulfonamide. *Molbank Journal* (Accepted July 11, 2012).
3. Hayun, Hanafi, M., Yanuar, A., dan Hudiyono, S. (2011). Klorosulfonasi-amidasi 3-(4-metoksifenil)-2-stiril-4(3H)-kuinazolinon. Kongres Ilmiah XIX IAI, Manado, 29-31 Oktober 2011
4. Hayun, Hudiyono, S., Hanafi, M., and Yanuar, A. (2012). Synthesis and COX-2 Inhibition of 4-[(E)-2-(4-Oxo-3-phenylquinazolin-2-yl)ethenyl] benzenesulfonamides. (in preparation, will be submitted to Chemistry Central Journal).
5. Hayun, Hanafi, M., Yanuar, A., and Hudiyono, S. (2012). Effect of Acetic Anhydride Addition on the Condensation Reaction of 2-Methyl-3-phenyl-3,4-dihydroquinazolin-4-one and 4-Formylbenzenesulfonamide. (will be presented at FAPA Congress in Bali, Indonesia on September 13-16, 2012).