



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS SENYAWA POTENSIAL ANTI KANKER
TURUNAN METIL SINNAMAT**

TESIS

**DWI MARWATI J.S.
0906495274**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**SINTESIS SENYAWA POTENSIAL ANTI KANKER
TURUNAN METIL SINNAMAT**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

**DWI MARWATI J.S.
0906495274**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Dwi Marwati JS.
NPM : 0906495274
Tanda Tangan : 
Tanggal : 12 Juli 2012

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Dwi Marwati J.S.
NPM : 0906495274
Program Studi : Kimia
Judul Tesis : Sintesis Senyawa Potensial Anti Kanker Turunan Metil
Sinnamat

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing	: Dr. Endang Saefudin	(.....)
Pembimbing	: Dr. Muhammad Hanafi, M.Sc	(.....)
Penguji	: Dr. Emil Budianto	(.....)
Penguji	: Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana	(.....)
Penguji	: Dr.rer.nat. Budiawan	(.....)
Penguji	: Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc	(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Endang Saepudin yang telah mencurahkan segenap waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing saya.
2. Dr. Muhammad Hanafi yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penelitian ini.
3. Dr. Asep Saifumillah sebagai Sekretaris Program Studi beserta seluruh staf pengajar pascasarjana Ilmu Kimia.
4. Ibu Teni Ernawati, M.Sc. yang telah memberikan kesempatan serta bimbingan kepada saya.
5. Bu Lia, Bu Mimin, Bu Dewi, Bu Mega dan semua yang sudah membantu selama penelitian di LIPI yang tidak bisa disebutkan satu per satu.
6. Seluruh staf Pusat Penelitian Kimia Puspitek Serpong, terutama Divisi BAPF atas segala bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
7. Teman-teman seperjuangan di Lab BAPF, Dila, mbak Dini, Lisa, Dewi, Dzia, Irwanto dan pak Eddy.
8. Teman-teman angkatan 2009 yang tidak bosan dalam memberikan dukungan dan motivasi.
9. Keluarga tercintaku, terima kasih atas pengertian serta dukungan material dan moral selama ini.
10. Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis ini, sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan penulis sangat berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya khususnya pada ilmu kimia.

Penulis

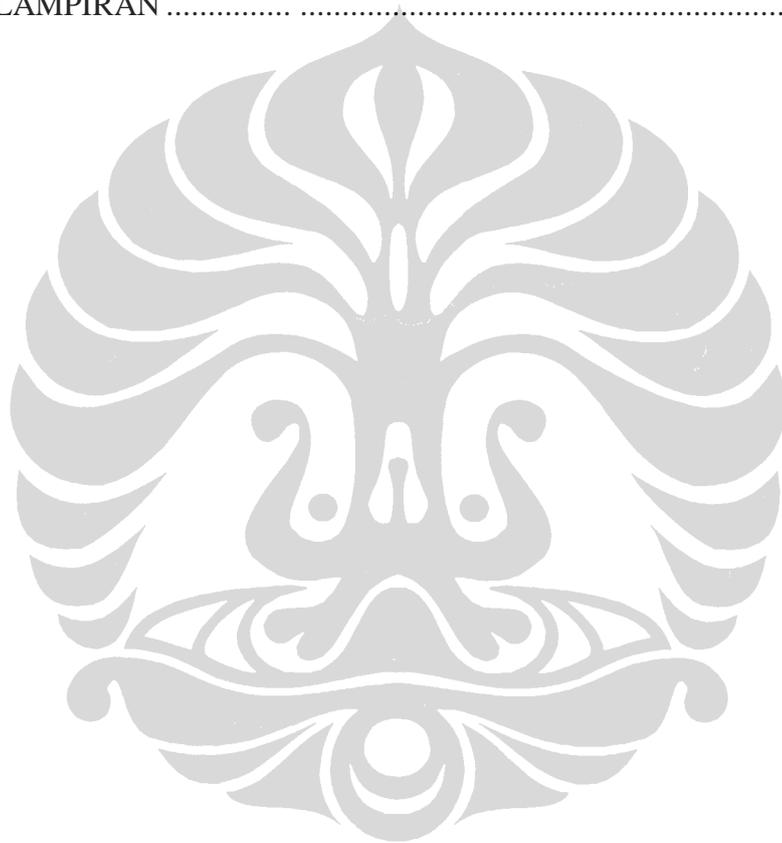
2012



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	2
1.3. Manfaat Penelitian.....	2
1.4. Hipotesis.....	2
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1. Metil Sinnamat	3
2.2. Asam Sinnamat.....	4
2.3. Modifikasi Metil Sinnamat	6
2.3.1. Reaksi Hidrolisis	6
2.3.2. Reaksi Amidasi dan Esterifikasi	9
2.3.3. Penggunaan Katalis Lain.....	10
2.4. Kanker.....	12
2.5. Uji Toksisitas	12
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	15
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	15
3.2. Alat dan Bahan	15
3.3. Prosedur	15
3.3.1. Hidrolisis MetilSinnamat.....	15
3.3.2. Prosedur Sintesis Senyawa 2	16
3.3.3. Prosedur Sintesis Senyawa 3	18
3.3.4. Karakterisasi Senyawa	20
3.3.5. Uji Toksisitas	20
3.3.5.1 Uji Toksisitas dengan Metode Pengujian Kematian larva udang /Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)..	20
3.3.5.2 Uji Sitotoksisitas.....	22
3.4. Bagan Penelitian.....	24
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1. Reaksi Hidrolisis Metil Sinnamat.....	25
4.2. Sintesis Lanjutan	26
4.2.1. Sintesis Senyawa 2.....	26

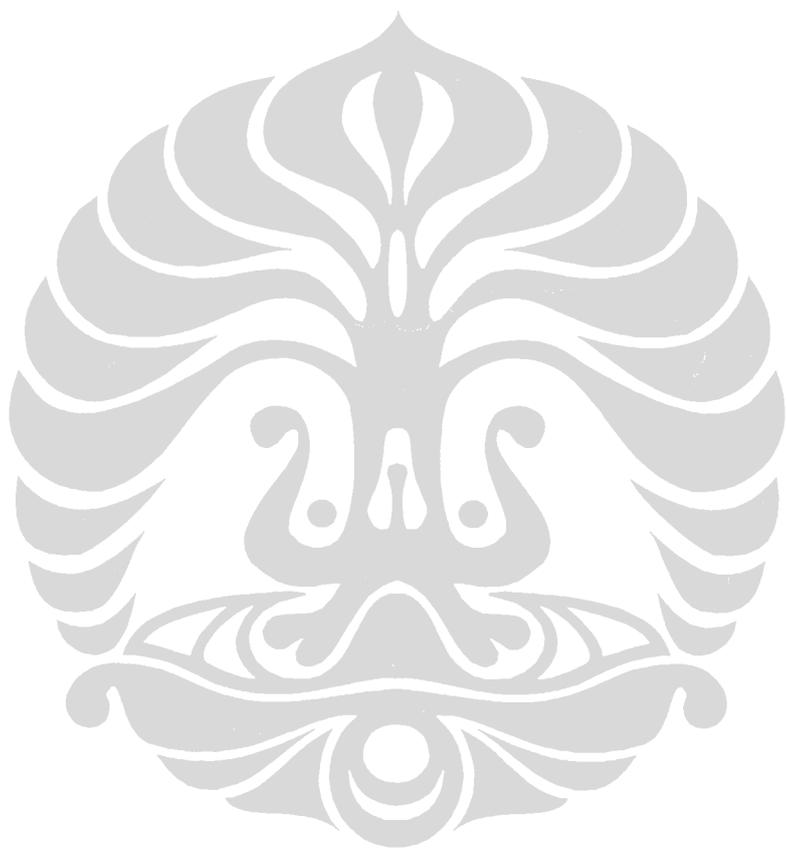
4.2.2. Sintesis Senyawa 3.....	28
4.3. Karakterisasi Senyawa.....	29
4.3.1. Metil Sinamat	29
4.3.2. Asam Sinamat.....	31
4.3.3. Senyawa 2.....	32
4.3.4. Senyawa 3.....	36
4.4. Uji Toksisitas	39
4.4.1. Hasil Uji BSLT	39
4.4.2. Hasil Uji Sitotoksisitas	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	48



DAFTAR GAMBAR

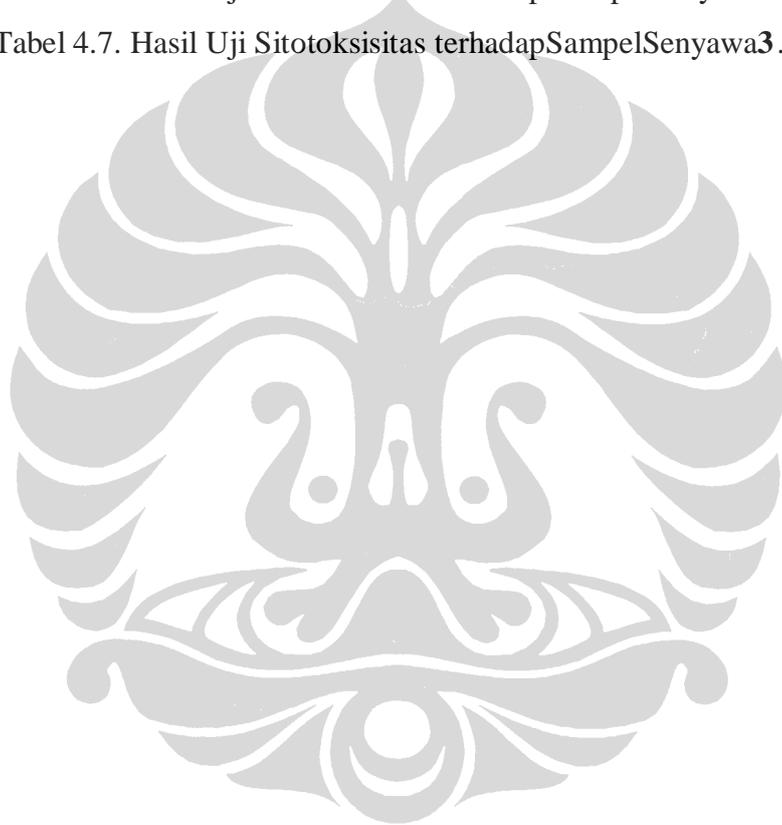
Gambar 2.1. Kristal Metil Sinamat.....	3
Gambar 2.2. Struktur Metil Sinamat dan Asam Sinamat	4
Gambar 2.3. Turunan Sinamat Amida.....	5
Gambar 2.4. Mekanisme Reaksi Hidrolisis Ester	7
Gambar 2.5. Reaksi Hidrolisis Metil Sinamat	7
Gambar 2.6. Usulan Mekanisme Reaksi Sintesis Turunan Metil Sinamatdari Asam Sinamat	9
Gambar 2.7. Mekanisme Aktivasi DCC pada Suatu Karboksilat	11
Gambar 2.8. Prinsip Kerja DCC/DMAP	11
Gambar 3.1. Skema Sintesis Asam Sinamat dengan Hidrolisis.....	16
Gambar 3.2. Skema Sintesis II Turunan Senyawa Metil <i>Trans</i> Sinamat dengan Anilin	18
Gambar 3.3. Skema Sintesis Dimerisasi Senyawa Sinamat	19
Gambar 3.4. Skema uji toksisitas BSLT	22
Gambar 4.1. Hasil Kromatografi lapis Tipis Reaksi Hidrolisis Asam Sinamat dengan eluen heksana:etil asetat = 4:1	25
Gambar 4.2. Hasil ekstraksi dibandingkan dengan senyawa awal dengan eluen heksana:etil asetat = 4:1.....	26
Gambar 4.3. Prediksi Hasil Reaksi Sintesis Senyawa 2	27
Gambar 4.4. Usulan MekanismaReaksi Sintesis Senyawa 3	28
Gambar 4.5. Spektrum ¹ H NMR Metil Sinamat	29
Gambar 4.6. Spektrum ¹ H NMR AsamSinamat.....	31
Gambar 4.7. Kromatogram LC Senyawa 2	32
Gambar 4.8. Spektrum LC-MS senyawa 2	33
Gambar 4.9. Perkiraan Struktur Senyawa 2	33
Gambar 4.10. Perkiraan Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa 2	36

Gambar 4.11. Perkiraan Struktur Senyawa 3	38
Gambar 4.12. Usulan Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa 3	39
Gambar 4.13. Sel HeLa dalam Beberapa Kondisi	42
Gambar 4.14. Grafik laju inhibisi senyawa 2 dan 3 terhadap sel Hela	43



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Nilai Pergeseran Kimia MetilSinnamat	29
Tabel 4.2. Nilai Pergeseran Kimia Asam Sinnamat	31
Tabel 4.3. Nilai Pergeseran Kimia Senyawa2	35
Tabel 4.4. Nilai Pergeseran Kimia Senyawa 3	38
Tabel 4.5. Hasil Nilai LC ₅₀ pada Uji BSLT	40
Tabel 4.6. Hasil Uji Sitotoksisitas terhadap SampelSenyawa2.....	42
Tabel 4.7. Hasil Uji Sitotoksisitas terhadapSampelSenyawa3.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja Penelitian.....	48
Lampiran 2. Spektrum LC Metil Sinamat	49
Lampiran 3. Spektrum LC-MS Metil Sinamat	50
Lampiran 4. Spektrum FT-IR Metil Sinamat	51
Lampiran 5. Spektrum ^1H NMR Metil Sinamat (500 MHz, CDCl_3).....	52
Lampiran 6. Spektrum ^{13}C NMR Metil Sinamat (125 MHz, CDCl_3).....	53
Lampiran 7. Spektrum LC Asam Sinamat	54
Lampiran 8. Spektrum LC-MS Asam Sinamat	55
Lampiran 9. Spektrum FT-IR Asam Sinamat.....	56
Lampiran 10. Spektrum ^1H NMR Asam Sinamat (500 MHz, CDCl_3)	57
Lampiran 11. Spektrum ^{13}C NMR Asam Sinamat (125 MHz, CDCl_3) ...	58
Lampiran 12. Spektrum LC Senyawa2.....	59
Lampiran 13. Spektrum LC-MS Senyawa2	60
Lampiran 14. Spektrum FT-IR Senyawa2	61
Lampiran 15. Spektrum ^1H NMR Senyawa2 (500 MHz, CDCl_3).....	62
Lampiran 16. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa2 (125 MHz, CDCl_3).....	63
Lampiran 17. Spektrum LC-MS Senyawa 3	64
Lampiran 18. Spektrum LC-MS Senyawa 3	65
Lampiran 19. Spektrum FT-IR Senyawa 3	66
Lampiran 20. Spektrum ^1H NMR Senyawa 3 (500 MHz, CDCl_3).....	67
Lampiran 21. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa 3 (125 MHz, CDCl_3).....	68
Lampiran 22. Hasil Uji BSLT	69
Lampiran 23. Hasil Uji Sitotoksisitas	70
Lampiran 24. Penghitungan IC_{50}	71

Lampiran 25. Penghitungan Rendemen	72
Lampiran 26. Hasil Pengukuran Titik Leleh	73



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

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

Nama : Dwi Marwati J.S.
NPM : 0906495274
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : FMIPA
Jenis karya : Tesis

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

“Sintesis Senyawa Potensial Anti Kanker Turunan Metil Sinamat”

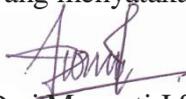
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 16 Juli 2012

Yang menyatakan



(Dwi Marwati J.S.)

ABSTRAK

Nama : Dwi Marwati J.S.
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul : Sintesis Senyawa Potensial Anti Kanker Turunan Metil Sinnamat

Metil sinnamat telah berhasil diisolasi dari lengkuas hutan (*Alpinia malaccensis*) dengan rendemen yang cukup banyak. Metil sinnamat dan turunannya juga telah banyak diteliti dan merupakan senyawa-senyawa yang digunakan dalam dunia pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis turunan senyawa metil sinnamat. Sintesis diawali dengan reaksi hidrolisis, dan dilanjutkan dengan mereaksikan hasil reaksi dengan beberapa senyawa yang cukup reaktif dengan menggunakan katalis asam. Senyawa hasil sintesis diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR dan LC-MS. Senyawa hasil sintesis dilakukan uji awal toksisitas dan sitotoksitas.

Pada pengujian awal dengan larva udang *Artemia salina* Leach, telah dihasilkan LC_{50} untuk senyawa 2, senyawa 3 masing-masing 65,17 ppm dan 93,95 ppm.

Senyawa 3 memiliki IC_{50} terhadap sel HeLa pada konsentrasi 5,94 ppm.

Melihat hasil sintesis ini memiliki bioaktivitas yang tinggi, diharapkan dapat dijadikan awal penelitian bahan baku obat anti kanker yang berasal dari bahan alam.

Kata kunci : metil sinnamat, sintesis, anti kanker, uji toksisitas
xv+77 halaman : 26 gambar + 7 tabel
Daftar Pustaka : 41

ABSTRACT

Nama : Dwi Marwati J.S.
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul : Synthesis Metil Sinamat Derivates as A Potential Anti Cancer

Methyl cinnamate was isolated from galangal (*Alpiniamalaccensis*) successfully with amount of yield. Methyl cinnamate and its derivatives has become interesting subject to explore, because they are used in medicinal. This research aim to synthesize methyl cinnamate derivatives, The synthesis start from hydrolyse the methyl cinnamate, then modified into amides by adding aniline and mediated by *para* toluen sulfonic acid dan DCC/DMAP. The product identified by FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR and LC-MS spectrofotometer. Toxicity and cytotoxicity assay are then done.

In the preliminary assay by Brine srimph Lethality Test (BSLT), it get LC₅₀ value for compound 2, and compound 3 for each of them 65,17 ppm and 93,95 ppm. Compound3 has IC₅₀ to HeLa cell line for 5,94 ppm.

Key word : methyl cinnamate, synthesis, anticancer, toxicity assay
xv+77 pages : 26 figures + 7 tables
Bibliography : 41

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang potensial akan sumber bahan baku obat karena memiliki kekayaan keanekaragaman hayati. Salah satunya adalah tanaman Laja Gowah (*A. malaccensis*) yang banyak digunakan sebagai bumbu masak, dan obat herbal.

Asamsinamat dan turunannya merupakan senyawa aromatis yang terdapat di alam. Isolasi asam sinamat dan turunannya telah dilakukan dari propolis lebah, kayu manis, kopi, dan banyak tumbuhan, terutama rempah-rempah, seperti jahe, kencur, lengkuas dan bahkan buah-buahan. Isolasi metil sinamat dari rimpang Laja Gowah (*A. malaccensis*) telah dilakukan dan mendapatkan rendemen yang cukup banyak yakni sebanyak 78,2 % (Shirat et al, 2011).

Penelitian tentang asam sinamat dan turunannya sudah banyak dilakukan, terutama untuk meningkatkan penggunaannya sebagai bahan baku obat dengan meningkatkan aktivitas biologinya. Sinamat dan turunannya memiliki aktivitas anti inflamasi, anti hipertensi, anti mikrobia (Qian-Sheng Huang, et al, 2009), anti diabetik (Ramesh B. Kasetti, 2012) serta anti kanker. Turunan asam sinamat dari propolis lebah (baccharin dan drupanin) dilaporkan memiliki aktivitas antitumor dan dapat menyebabkan kematian sel tumor dengan sedikit genotoksik pada sel-sel hematopoetik normal (Mishima et al, 2005).

Jika dibandingkan dengan metil sinamat, asam sinamat lebih reaktif karena memiliki gugus hidroksi (OH). Asam sinamat secara kimia memiliki tiga gugus fungsi yang berpotensi untuk sebagai sisi aktif, yakni substitusi pada cincin fenil, α,β *unsaturated* (ikatan rangkap), dan reaksi pada gugus karboksilat. Metil sinamat dapat dihidrolisis menghasilkan asam sinamat. Reaksi selanjutnya yang memungkinkan adalah reaksi Friedel Craft, halogenasi, addisi, dan eliminasi.

Berdasarkan hal di atas, dalam penelitian ini dilakukan sintesis turunan dari senyawa metil sinamat dari lengkuas (*A. malaccensis*) untuk mendapatkan aktivitas biologis yang lebih tinggi. Sintesis ini dibatasi pada modifikasi awal, dan nantinya akan dilanjutkan dengan menambahkan substitusi pada cincin fenil.

Senyawa akhir yang dihasilkan, diharapkan berupa senyawa turunan metil sinamat yang memiliki bioaktivitas yang tinggi.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis turunan metil sinamat dan menguji aktivitasnya sebagai anti kanker secara *in vitro*.

1.3 Perumusan Masalah

Pemanfaatan metil sinamat masih sangat terbatas, padahal senyawa ini dapat disediakan dengan teknologi yang sederhana dan mudah serta bahan bakunya melimpah. Sintesis turunan metil sinamat melalui asam sinamat diharapkan mampu menambah kemungkinan pemanfaatannya sebagai bahan baku anti kanker.

1.4 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah:

- a. Sintesis turunan metil sinamat melalui proses hidrolisis dapat menghasilkan senyawa turunannya, dengan rendemen yang baik.
- b. Senyawa hasil sintesis memiliki bioaktivitas yang lebih tinggi dengan meningkatnya lipofilisitas.

1.5 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini melakukan sintesis turunan dari metil sinamat, dan menguji toksisitasnya sebagai senyawa anti kanker, serta mengidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ serta LC-MS.

1.6 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai sintesis senyawa analog metil sinamat. Selain itu, senyawa hasil sintesis diharapkan dapat dikembangkan dan digunakan sebagai bahan baku obat yang bersumber dari alam untuk kebutuhan industri farmasi.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Metil Sinnamat

Metil sinnamat memiliki nama lain 3-fenil metil propenoat, atau sering dituliskan sebagai metil (E) sinnamat, metil *trans*-3-fenil-2-propenoat, ester metil asam *trans*sinnamat. Metil sinnamat memiliki bentuk fisik berupa kristal putih kekuningan dengan aroma yang khas. Memiliki titik didihnya 262 °C dan titik leleh 33°C..Metil sinnamat merupakan ester yang banyak terdapat di alam, salah satunya terdapat dalam *A.malaccensis* (Shirat et al, 2011).

Menurut Nor Azah (2005),metil sinnamat merupakan komponen utama dalam tanaman *A.malaccensis*. Isolasi senyawa ini dari berbagai daun, batang dan rimpang *A.malaccensis* var. *nobilis* pernah dilakukan dengan menghasilkan rendemen masing-masing 88,0%, 64,4% dan 85,7%. Isolasi metil sinnamat juga telah dilakukan dari tanaman *A. malaccensis* dengan rendemen 78% (Shirat et al, 2011), sedangkan sintesis metil sinnamat dilakukan dari esterifikasi asam sinnamat dengan metanol (Sharma C.K. and Kanwar S.S., 2012).



Gambar 2.1. Kristal Metil Sinnamat

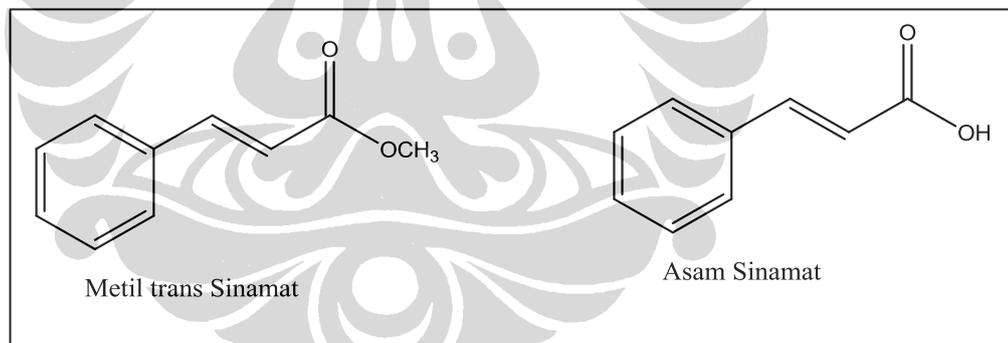
Penggunaan metil sinnamat saat ini hanya sebagai bahan pewangi dalam berbagai senyawa pewangi.Hal ini dapat ditemukan dalam kosmetika, shampoo, sabun mandi, pewangi toilet, pewangi dalam pembersih ruangan dan lain-lain. Menurut Letizia, et. al. (2004) dalam reviewnya tentang penggunaan metil sinnamate sebagai pewangi, keamanan dalam penggunaannya sebagai penambah aroma (*flavor*) telah diakui oleh badan-badan pengawas internasional seperti:

Europe of Council (EOC), Food Drug Administration (FDA), Flavor and Extract Manufactures Association (FEMA), dan Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

Menurut Qian-Sheng Huang, et al, 2009, metil sinamat dapat menghambat aktivitas monophenolase dan diphenolase tirosinase. Senyawa ini memiliki spektrum kemampuan antimikrobal yang luas. Ia juga menambahkan bahwa metil sinamat merupakan zat aditif makanan yang digunakan sebagai *antibrowning*, yang secara luas telah digunakan sebagai fragrance yang aman. Penelitian yang lain juga telah dilakukan untuk memastikan keamanan seperti toksisitas, iritasi terhadap kulit, iritasi terhadap membran lendir, sensitivitas kulit. Hasilnya bahwa penggunaannya aman dalam kisaran 10-100 metrik ton per tahun. (Letuzia, 2007).

2.2 AsamSinamat

Asamsinamat merupakan asam organik dengan bentuk kristal yang berwarna putih dan sedikit larut dalam air, merupakan senyawa alam, karena ditemukan dalam banyak tanaman, termasuk buah-buahan.

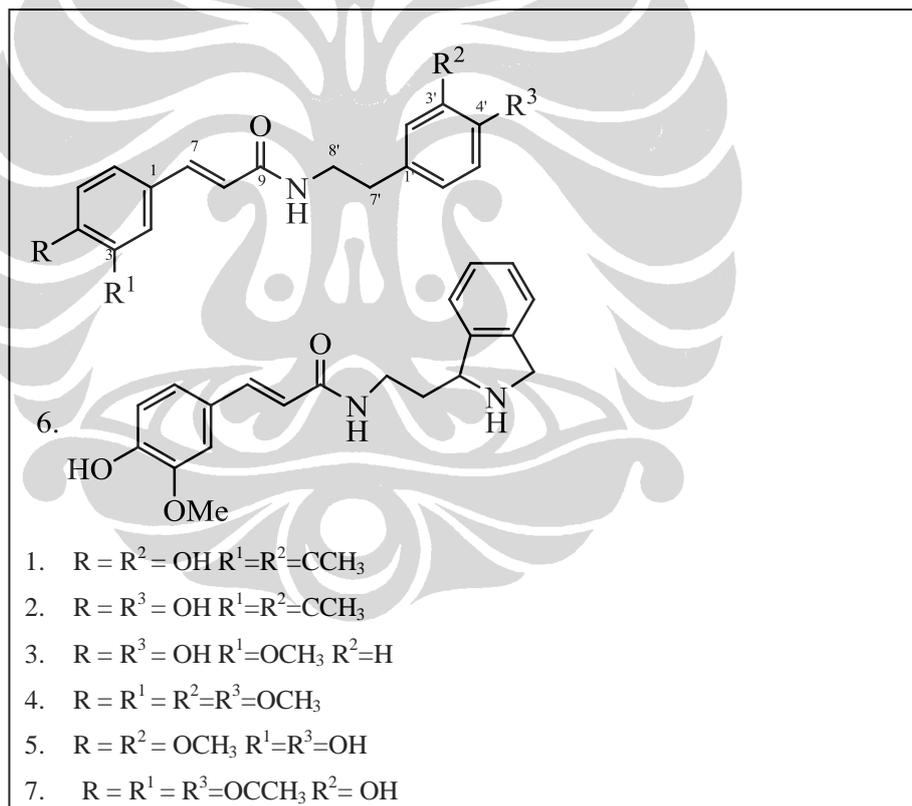


Gambar 2.2. Struktur Metil Sinamat dan AsamSinamat

Sinamat memiliki beberapa senyawa turunan (derivat), yaitu delapan ester sinamat frukto-oligosakarida yang telah diisolasi dari tanaman *Lindelfia stylosa*, diantaranya 6'-O-kumaril-3-O-feruloilsukrosa, 6'-O-kafeoil-3-O-feruloilsukrosa, 3,6'-O-diferuloilsukrosa, 3-O-feruloil fruktofuranosil sukrosa, 3,6'-O-diferuloil-1-kestosa, 6'-O-kumaril-3-O-feruloil-1-kestosa, 3,6'-O-diferuloilnistosa, dan 6'-O-kumaril-3-O-feruloilnistosa (Choudhary, 2006).

Turunan sinamat amida juga telah berhasil diisolasi dari *Chenopodium album* yaitu:

1. N-*trans*-feruloil 4'-O-metil dopamin, dari bagian akar
2. N-*trans*-feruloil 3-O-metildopamin,
3. N-*trans*-feruloil tiramin,
4. N-*trans*-4-O-metil feruloil 3',4'-O-dimetildopamine,
5. N-*trans*-4-O-Metil caffeoil 3'-O-metildopamin ,
6. N-*trans*-feruloyl triptamin dan
7. N-*trans*-4-O-metil feruloil 4'-O-metildopamin. (Cutillo et al, 2003).



Gambar 2.3. Turunan Sinamat Amida (Cutillo et. al, 2003)

Turunan metil sinamat telah diteliti memiliki kemampuan sebagai anti diabetes (Ramesh B. Kasetti, et al, 2012), antiinflamasi, anti jamur, anti bakteri dan anti tumor (De, et al. 2011). Aktivitas biologis turunan asam sinamat

dipengaruhi oleh struktur dan gugus yang mensubstitusinya. Pada substitusi gugus hidroksi pada posisi para, memberikan tingkat aktivitas yang tertinggi dibandingkan struktur yang sama dengan substitusi gugus lain ataupun gugus yang sama pada posisi yang berbeda.

Adanya senyawa-senyawa turunan alami dari metil sinamat memungkinkan untuk mensintesis senyawa turunan tersebut. Banyak turunan metil sinamat memiliki sifat yang lebih aktif daripada senyawa aslinya. Produk ini yang nantinya diharapkan akan dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan obat. Sirichai Adisakwattana et al (2004) menyatakan bahwa turunan asam sinamat dapat diklasifikasikan sebagai kelompok baru sebagai inhibitor α -glukosidase. Aktivitas tertinggi terlihat pada substitusi para metoksi dan gugus alkohol pada posisi para.

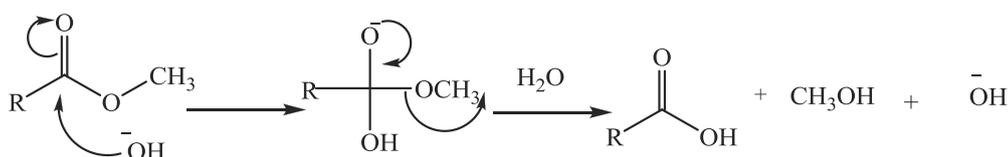
2.3 Modifikasi Metil Sinamat

Metil sinamat kurang reaktif jika direaksikan secara langsung. Kemungkinan reaksi yang ada hanyalah penambahan substituen pada cincin aromatik, dan pada ikatan rangkap karbon α dan β atau reaksi pengurangan, sehingga reaksi dimulai dengan hidrolisis metil sinamat menjadi asam sinamat. Diharapkan, keberadaan gugus hidroksi (OH) akan menambah reaktivitas dan memudahkan terjadinya reaksi. Secara kimia, asam sinamat memiliki tiga gugus fungsi yang memungkinkan untuk terjadinya reaksi, yakni pada cincin aromatik dimungkinkan terjadinya substitusi, pada rantai ikatan rangkap karbon α dan β , serta gugus karboksilat yang dimilikinya.

2.3.1 Reaksi Hidrolisis

Secara harafiah, makna reaksi hidrolisis adalah suatu reaksi pemecahan dengan menggunakan air. Reaksi ini dapat terjadi pada suatu asam karboksilat dengan menggunakan larutan katalis asam atau basa. Suatu ester akan terpecah menjadi asam karboksilat dan alkohol dalam suatu reaksi hidrolisis. Hidrolisis ester dengan basa diawali dengan masuknya satu nukleofil dalam hal ini ion hidroksi pada karbon karbonil yang mengakibatkan pecahnya ikatan π . Karbon

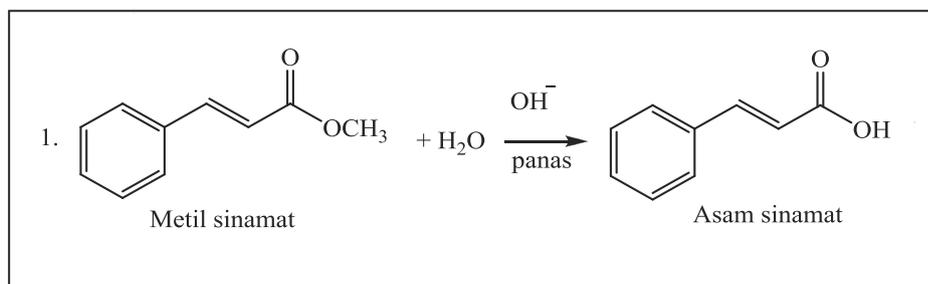
yang pada awalnya terhibridisasi sp^2 menjadi sp^3 . Hal ini akan membuat oksigen menjadi bermuatan negatif. Setelah gugus metoksi keluar, gugus karbonil kembali mengalami hibridisasi sp^2 . Proton pada asam karboksilat lepas, membentuk metanol dengan ion metoksi, meninggalkan asam yang bermuatan negatif. (Clayden, 2000).



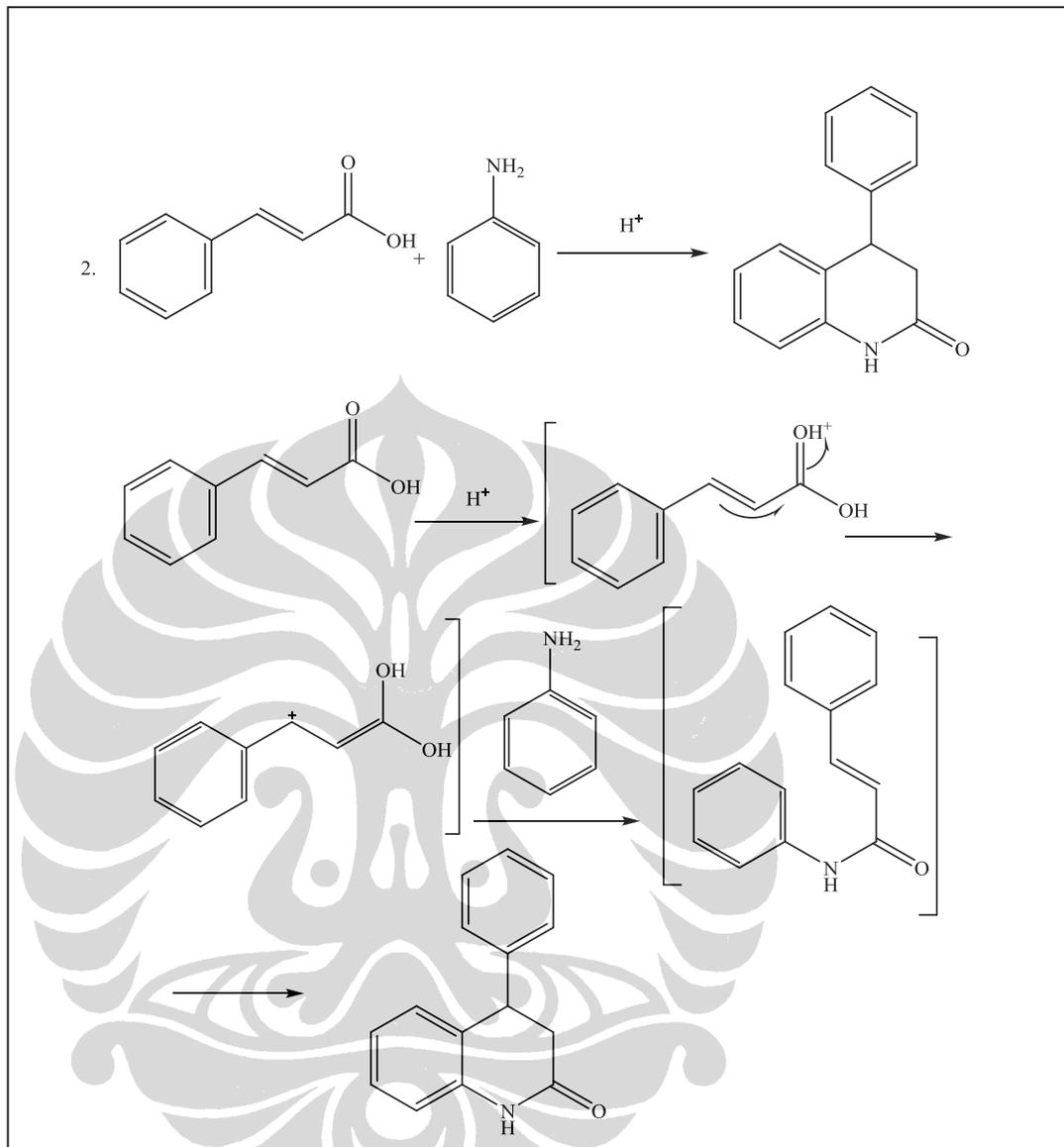
Gambar2.4. Mekanisme Reaksi Hidrolisis Ester

Dalam penggunaan katalis asam kuat, mereaksikan asam sinamat dengan arena, terdapat dua kompetisi mekanisme reaksi yang diusulkan. Kedua reaksi tersebut melibatkan formasi intermediat dikationik (super elektrofilik). Reaksi tersebut menghasilkan chalcone dan atau indanone. Gugus asam karboksilat dapat meningkatkan reaktivitas suatu pusat elektrofilik yang berdekatan. (Li, K. et al, 2005).

Triflic acid merupakan suatu katalis asam yang efektif untuk sintesis langsung beberapa chalcon yang kekurangan elektron dan heterosiklik dari asam sinamat. Reaksi asam sinamat dengan menggunakan katalis super asam telah dilakukan pada reaksi menggunakan CF_3SO_3H (*Triflic acid*) dan benzena. Semakin tinggi kekuatan asamnya maka produk yang dihasilkan akan meningkat (Rendy, et al, 2006). Namun penggunaannya harus pada jumlah yang banyak. Katalis asam yang lain yang pernah digunakan yakni *para* toluen sulfonat (pTSA), dapat dipergunakan lebih efektif jika tanpa keberadaan pelarut (Jadgale dan Sudalai, 2007).



Gambar 2.5. Reaksi Hidrolisis Metil Sinamat



Gambar 2.6. Usulan Mekanisme Reaksi Sintesis Turunan Metil Sinaamat Melalui Reaksi Hidrolisis

Bahan alam tetap mendominasi sumber pengembangan obat baru, seperti obat anti tumor taxol, topotecan, irinotecan, dan vinblastin, yang diisolasi dari alam digunakan secara medis. Beberapa turunan asam hidroksinamat telah ditemukan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat sebagai *radical scavenger* dan aktivitas antioksidannya berhubungan dengan fitur strukturnya dan gugus hidroksi pada struktur aromatik. Turunan asam sinamat juga telah dilaporkan

mampu bertindak sebagai inhibitor enzim tirosinase. Aktivitas turunan amida dari turunan asam sinamat telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme (*Candidaalbican* dan *Aspergillusniger*). (Narasimham et al, 2004).

Serangkaian senyawa sinamil yang berhubungan dengan 2- hidroksi sinamaldehyd telah berhasil disintesa dan dievaluasi efeknya dalam melawan anti tumor pada manusia. Turunan hidroksilamin mampu menghambat pertumbuhan kanker pada manusia dan tumor kolon pada mencit. Antitumor efeknya, ditunjukkan dengan kemampuan menginduksi kematian sel dan menghentikan siklus sel pada fase G2/M, yang terlihat dengan deteksi analisa penanda kematian dan siklus sel.

Dae-seop Shin(2007) telah mempelajari kemampuan turunan amida dan asam sinamat yang diisolasi dari batang *Cinnamomumcassi* dalam menghambat aktivitas protein transferase farnesil dan proliferasi pada sel kanker manusiatermasuk kanker payudara, leukimia, ovarium, dan kolon. Menurutnya, agen anti tumor dapat dikembangkan dari senyawa-senyawa amida turunan sinamat.

2.3.2. Reaksi Amidasi dan Esterifikasi

Amidasi adalah suatu reaksi pembentukan ikatan amida yang secara teori hampir mirip dengan reaksi esterifikasi. Pada reaksi amidasi digunakan senyawa yang memiliki gugus amin, sedangkan pada reaksi esterifikasi digunakan senyawa yang memiliki gugus alkohol.

Ikatan amida merupakan suatu yang penting dalam elaborasi dan komposisi sistem biologi. Mewakili ikatan kimia utama yang berhubungan dengan kerangka asam amino. Ikatan amida juga tidak dibatasi pada sistem biologi, namun sudah meluas pada obat-obatan yang dipasarkan. Misalnya atorvastatin 1, merupakan obat terlaris di dunia sejak 2003, membatasi produksi kolesterol dan mengandung gugus amida. Contoh yang lain misalnya lisinopril 2 (merupakan inhibitor enzim konversi angiotensin, valsartan dan lain-lain).

Ikatan amida biasanya disintesis dari asam karboksilat dan amina. Namun reaksi ini tidak dapat terjadi begitu saja pada suhu kamar, harus dengan suhu tinggi, dan hampa udara (menghindari adanya air). Oleh karena itu, biasanya

langkah pertama dalam reaksi ini adalah dengan mengaktivasi asam karboksilat, supaya -OH berubah menjadi *leaving group* utama untuk masuknya amina. Karena alasan inilah digunakan katalis dalam reaksi ini agar berperan sebagai aktivator. (Valeur dan Bradley, 2008)

Anilin atau fenil alamin atau amino benzena merupakan senyawa organik dengan formula $C_6H_5NH_2$. Ia merupakan salah satu prekursor atau bahan awal senyawa kimia. Sifatnya sebagai basa lemah, sehingga mudah bereaksi dengan asam. Reaksi anilin dengan asam karboksilat akan membentuk anilida. Anilin juga bereaksi dengan metanol dengan katalis super asam dan pengaturan suhu, membentuk N-metilanilin dan dimetil anilin dalam reaksi N alkilasi atau N metilasi. Selain itu masih ada beberapa reaksi yang mungkin terjadi, misalnya diazotisasi, hidrogenasi, bereaksi dengan nitro benzena dan lain-lain.

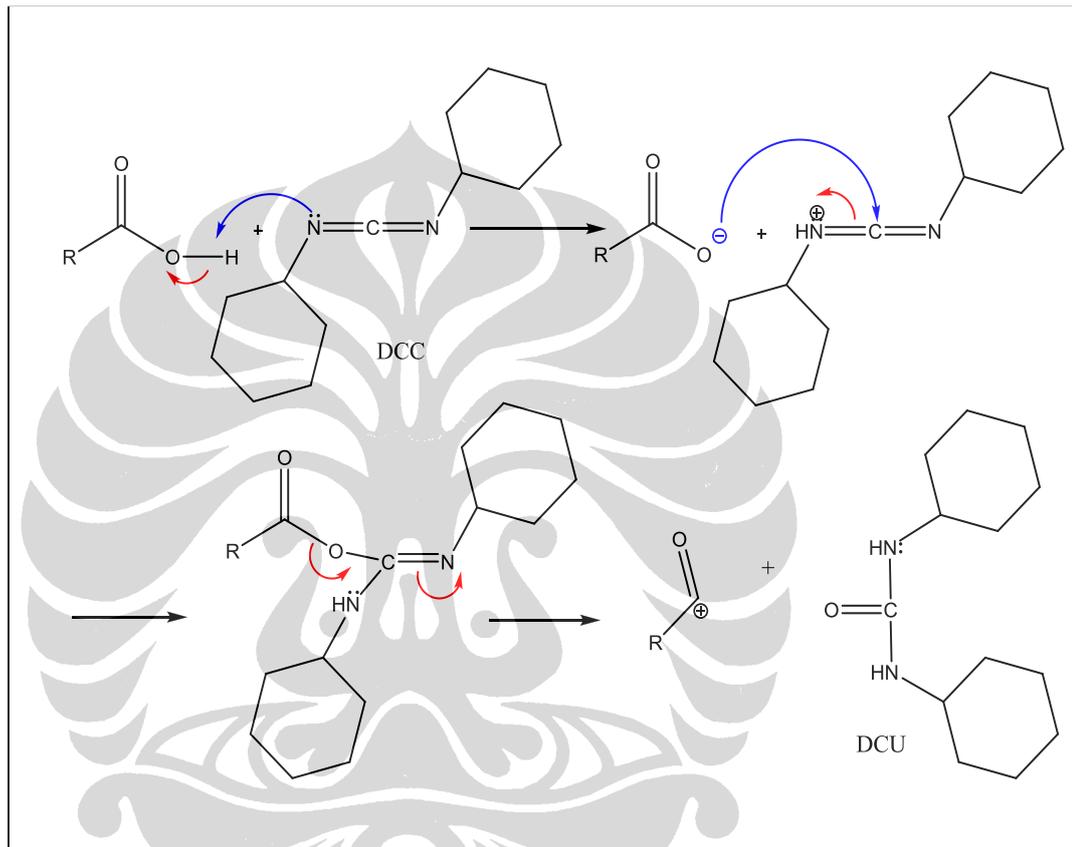
2.3.3. Penggunaan Katalis Lain

Dalam reaksi yang menggunakan asam karboksilat, beberapa reagen yang sering digunakan reagen karbodiimida, fosfonium, uronium, imonium, imidazolium, organofosforus, dan masih banyak lagi.

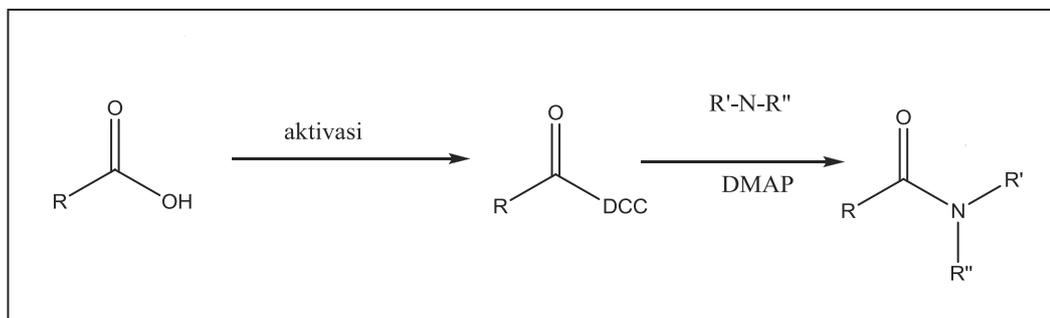
Senyawa N,N-disikloheksilkarbodiimida (DCC) merupakan senyawa yang berfungsi mengaktifkan gugus karboksilat menjadi suatu agen pengasilasi yang reaktif. Gugus aktif senyawa ini adalah gugus imida dari isourea (-N=C=N-) yang mengandung atom pusat karbon yang kekurangan elektron setelah bereaksi dengan proton dari asam karboksilat sehingga sangat mudah diserang oleh suatu nukleofilik dan membentuk asil isourea. Gugus asil isourea ini sangat reaktif karena mampu memecah ikatan asil-oksigen dan mengubah ikatan rangkap karbonitrogen dari iso urea menjadi gugus karbonil yang lebih stabil. Pada akhir reaksi terbentuk disikloheksil urea (DCU) sebagai hasil samping penggunaan DCC. Mekanisme reaksi pengaktifan gugus karboksilat dengan menggunakan aktivator DCC dapat dilihat pada Gambar 8. (Husniati, 2008)

Senyawa N,N-4 -dimetil amino piridin (DMAP) adalah senyawa yang memiliki fungsi sebagai katalis. DMAP memiliki efek katalitik yang kuat dan digunakan sebagai katalis nukleofilik. Gugus dimetil amino dalam DMAP berfungsi sebagai substituen donor elektron, memperbesar efek nukleofilitas dan

kebiasaan dari nitrogen piridin. Penggabungan aktivasi karbonil oleh DCC dan katalis DMAP secara bersamaan merupakan suatu metode untuk mengaktivasi asam karboksilat ketika akan direaksikan dengan nukleofil seperti alkohol, atau amida pada temperatur kamar. Mekanisme reaksi amidasi yang dikatalisis oleh DMAP dan diaktivasi oleh DCC dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 2.7. Mekanisme Aktivasi DCC pada Suatu Karboksilat



Gambar 2.8. Prinsip Kerja DCC/DMAP

2.4 Kanker

Kanker merupakan penyakit yang mengakibatkan kematian kedua di Indonesia setelah penyakit jantung. Di Indonesia dan dunia tiap tahun penderita kanker terus meningkat. Mulai dari yang tertinggi: kanker payudara, kanker leher rahim (serviks), kanker paru, kanker usus besar (kolorektal), kanker prostat, kanker darah, kanker tulang, kanker hati dan kanker kulit. WHO memperkirakan setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta meninggal karena kanker pada tahun 2030. (www//health.detik.com/read/2010/04/26/123804/1345485/763/penyebab-kanker-orang-indonesia)

Kanker timbul karena terjadi mutasi pada sel normal oleh bahan radiasi, virus dan bahan karsinogen. Terapi kanker bertujuan untuk mengontrol pertumbuhan atau mematikan sel kanker tanpa mengganggu kelangsungan hidup dan fungsi sel sehat. Terapi kanker dapat dilakukan dengan radiasi (radioterapi), pembedahan, bahan kimia (kemoterapi) dan hormon (endokrinoterapi). Berbagai kajian dan studi tentang obat kanker dilakukan terus menerus mengingat manfaatnya yang besar bagi kesehatan.

Senyawa fenolik memiliki aktifitas biologis penting pada tumbuhan dan hewan seperti peranannya pembawa elektron pada fotosintesis dan dalam aktivitas enzim tertentu, menghambat dan mempercepat pertumbuhan, bersifat racun terhadap herbivora, sehingga dimanfaatkan sebagai herbisida dan lainnya. Selain dimanfaatkan sebagai antioksidan, senyawa fenolik bermanfaat sebagai antimikroba, antikanker dan lain-lain. Sinamat dan turunannya termasuk senyawa fenolik yang banyak digunakan dalam industri kosmetik dan makanan.

2.5 Uji Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan. Toksisitas selalu menunjukkan efek berbahaya atas mekanisme biologi

tertentu. Istilah toksisitas biasa dipergunakan dalam membandingkan suatu zat kimia lebih toksik dari zat kimia lainnya (Purbarani, 2011).

Uji pendahuluan senyawa aktif biasanya menggunakan hewan uji. Kematian hewan uji menjadi salah satu kriteria toksisitas. Hewan uji yang biasa digunakan adalah *brine shrimp* (udang laut) yang termasuk dalam golongan artemia, yaitu *Artemia salina* Leach.

Uji toksisitas senyawa aktif dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) bertujuan untuk skrining awal senyawa terhadap potensi aktivitasnya. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT dapat diketahui dari jumlah kematian larva udang *A. salina* Leach karena pengaruh senyawa hasil sintesis dari dosis yang telah ditentukan. Tingkat toksisitas ekstrak kasar dapat ditentukan dengan melihat nilai LC_{50} (*lethal concentration*). Apabila nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak kasar tersebut dikatakan toksik dan sebaliknya jika nilai LC_{50} lebih dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ tidak toksik (Ayo, Audu, dan Amupitan, 2007).

Pengujian MTT

Metode MTT merupakan suatu metode untuk mempelajari pembelahan dan kemampuan hidup sel dalam suatu populasi. Pengukuran atau penghitungan sel yang hidup dan mengalami pembelahan merupakan suatu variabel dalam mengetahui populasi sel, dan dapat digunakan sebagai dasar analisa in vitro populasi sel terhadap pengaruh faktor eksternal. Penggunaan garam tetrazolium saat ini telah banyak diterima sebagai cara yang reliabel untuk menganalisa proliferasi (pembelahan) sel. Tetrazolium MTT kuning berkurang mengikuti aktivitas metabolisme sel, dalam bagian aksi enzim dehidrogenase dalam meningkatkan pengurangan NADH dan NADPH. Hasilnya formazan ungu intraselular yang dapat dihitung dengan menggunakan spektrofotometer.

Dalam setiap tipe sel, hubungan linear antara jumlah sel dan sinyal yang dihasilkan dimunculkan, sehingga memungkinkan penghitungan perubahan laju proliferasi sel yang akurat.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) merupakan substrat kuning pucat yang pada sel hidup akan membentuk produk formazan yang berwarna biru tua (ungu). Proses ini membutuhkan mitokondria aktif, dan sel mati yang segar tidak menunjukkan jumlah MTT yang signifikan. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini sehingga kemudian dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Sadeghi et al, 2010). Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak. Sel diinkubasi dalam substrat kolorimeter (colorometric substrate) sehingga memungkinkan sampel untuk dihitung langsung dalam mikroplate dengan suatu pembaca plate ELISA (ELISA reader).

Pengujian sitotoksitas ini ditujukan secara khusus sebagai aplikasi dari senyawa hasil sintesis ini. Senyawa target direncanakan sebagai agen anti kanker, maka perlu dilakukan uji anti kanker. Ada banyak sel yang telah dikembangkan untuk uji MTT ini, misalnya sel kanker kolon manusia, paru-paru, leukimia, dan lain-lain. Dalam penelitian ini dipilih sel kanker serviks atau sering disebut sel HeLa.

Sel HeLa merupakan suatu sel yang mewakili hidup terus dan dipergunakan dalam penelitian di bidang kesehatan. Sel yang mewakili (*cell line*) merupakan turunan sel kanker serviks yang diambil dari Henrietta Lacks, yang meninggal karena kanker pada 1951. HeLa ATCC CCL2 merupakan biakan sel karsinoma manusia pada jaringan epitel yang lestari (*immortal*). Sel ini, dibiakkan dalam media esensial minimal pada 37⁰C dengan CO₂ 5%.

Pengujian sitotoksitas senyawa turunan metil sinamat dilakukan pada HeLa *Cell Line*, yang dibiakkan di PSSP IPB, dengan metode MTT.

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Pangan dan Farmasi (BAPF) Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) kawasan PUSPIPTEK, Serpong. Pelaksanaan penelitian ini dilakukan pada bulan September 2011 – Juni 2012.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi kolom, labu distilasi, termometer, *hot plate*, *rotary evaporator*, penangas air, neraca analitik, lampu UV, spektrofotometer FT-IR, dan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, LC-MS serta peralatan gelas kimia lainnya.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang akan digunakan antara lain senyawa metil sinamat hasil isolasi dari lengkuas (*A. malaccensis*), anilina, katalis asam *para* toluen sulfonat (*pTSA*), N,N-disikloheksil karbo diimida (DCC), 4-dimetil amino piridin (DMAP), NaOH, pelarut organik (metanol, etil asetat, n-hexana, butanol, kloroform), aquades, kertas saring, silika gel, dan plat kromatografi lapisan tipis (KLT).

3.3 Prosedur

3.3.1 Hidrolisis Metil Sinamat

Bahan baku utama dalam penelitian ini, yaitu senyawa metil sinamat hasil isolasi lengkuas (*A. malaccensis*).

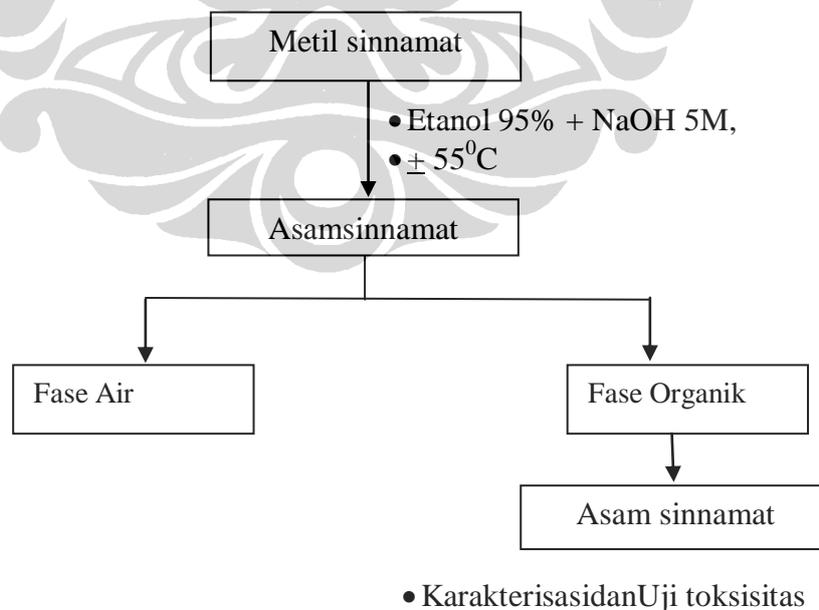
Metil sinamat ditimbang sekitar 20 gram (123,4 mmol) kemudian dilarutkan dalam 200 ml etanol 95% dan ditambahkan 10 ml NaOH 5 M, bila masih

diperlukan tambahkan lagi secara bertahap (per 10 ml/jam). Campuran ini kemudian dipanaskan pada penangas minyak dan diaduk dengan magnetik stirer. Suhu dijaga agar tetap 55°C. Hasil reaksi dicek setiap 1(satu) jam dengan KLT.

Jika sudah tidak terdapat spot metil sinamat, berarti reaksi sudah sempurna dan bisa dihentikan. Hasil reaksi dilarutkan dalam aquades, dan diuapkan untuk menghilangkan etanol. Sebelum diekstraksi, pH dinetralkan dengan cara menambahkan larutan HCl 5% sedikit demi sedikit. Selanjutnya asam sinamat yang terbentuk, diekstraksi dengan pelarut organik. dalam penelitian ini digunakan aquades dan butanol. Pencucian hasil reaksi dilakukan untuk menghilangkan garam-garam yang merupakan hasil samping dari reaksi. Fase organik yang didapatkan dikeringkan dan dimurnikan.

Hasil yang diperoleh merupakan senyawa asam sinamat murni. Asam sinamat ini ditimbang untuk mengetahui persentasinya. Hasil ini yang selanjutnya akan digunakan dalam reaksi selanjutnya.

Asam sinamat hasil sintesis ini dikarakterisasi dan dilakukan pengujian toksisitas.

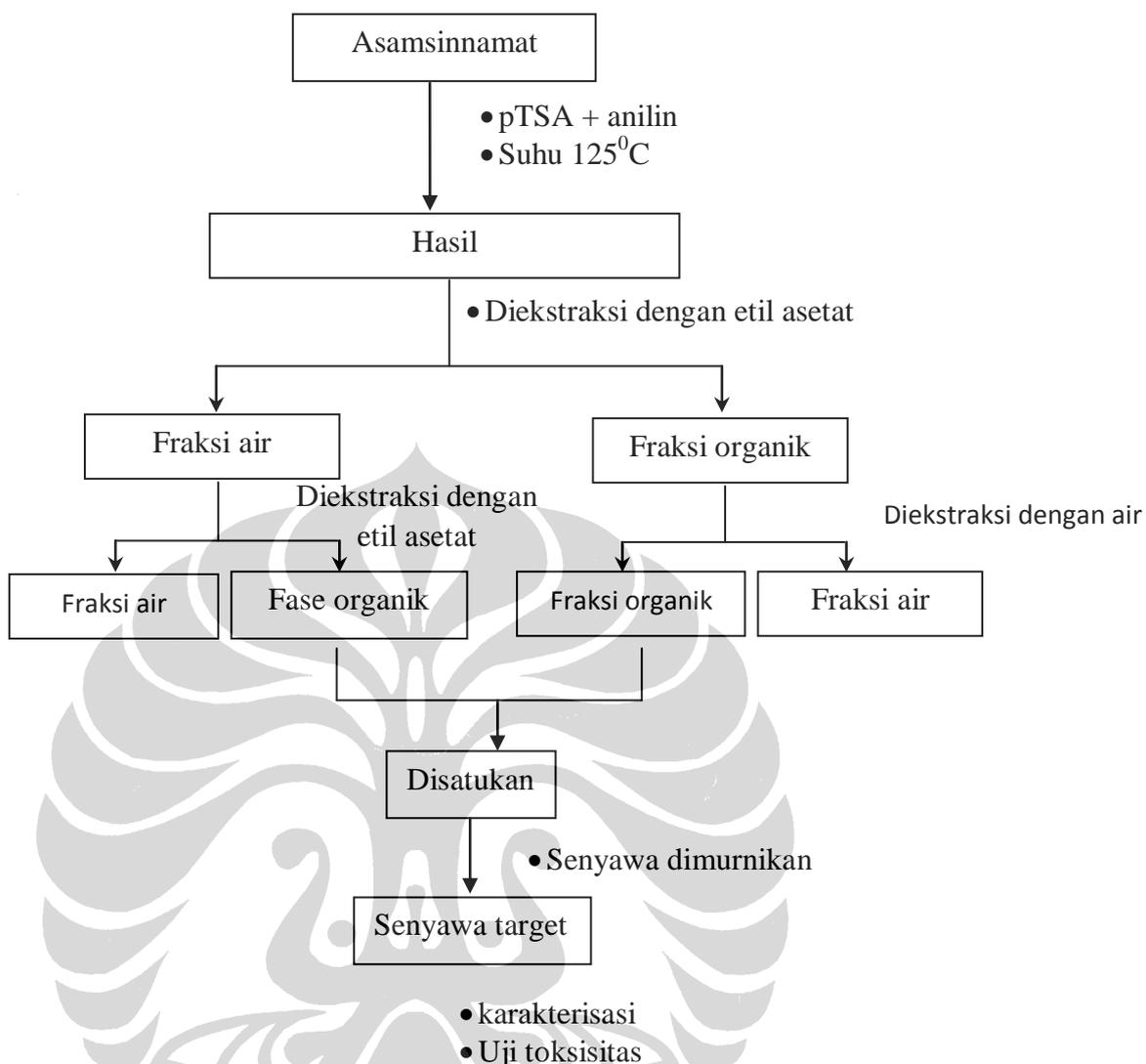


Gambar 3.1. Skema Sintesis Asam Sinamat dengan Hidrolisis

3.3.2 Prosedur Sintesis Senyawa 2

Dalam suatu labu bulat, dimasukkan satu gram (6,76 mmol) asam sinamat dan ditambahkan anilin 1,23 ml, dan 1,54 gram asam *para* Toluen Sulfonat (pTSA). Pada reaksi amidasi ini, digunakan asam sinamat: anilin: pTSA=1:2:1,2 mol equivalen. Labu reaksi yang telah berisi asam sinamat, pTSA, dan anilin masing-masing 6,76 mmol, 8,112 mmol, dan 13,52 mmol diletakkan dalam penangas minyak pada suhu 125⁰C, diaduk menggunakan magnetik stirer. Hasilnya dicek dengan KLT setiap 2 (dua) jam.

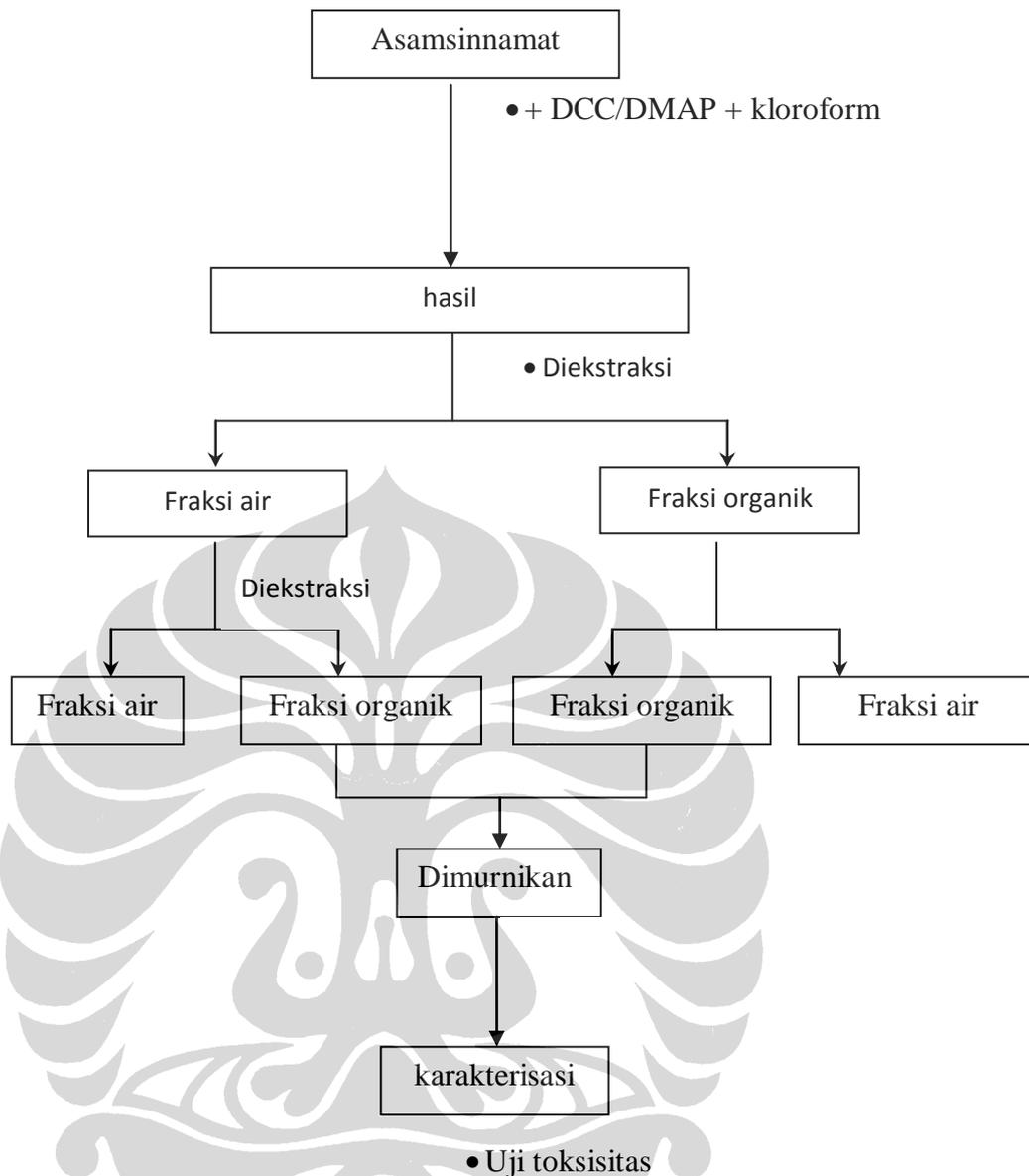
Setelah reaksi dirasa cukup (produk sudah terbentuk), hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat dan air berkali-kali. Fraksi etil asetat diuapkan sebelum dilakukan proses pemurnian dengan kolom kromatografi. Proses kolom kromatografi menggunakan pengembang heksana:etil asetat dengan perbandingan yang divariasikan dari heksana 100% sampai etil asetat 100%. Dari setiap fraksinya dikumpulkan dan dicek dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Senyawa yang telah murni, dikarakterisasi dengan spektroskopi FT-IR, HNMR, C NMR, dan LC-MS. Selanjutnya senyawa diuji bioaktivitasnya dengan metode uji BSLT sebagai pengujian awal dan dilanjutkan dengan uji sitotoksitas dengan metode MTT.



Gambar 3.2. Skema Sintesis II Analog Senyawa Metil sinamat dengan Anilin

3.3.3 Prosedur Sintesis Senyawa 3

Dipergunakan 1 gram asam sinamat (6,76 mmol), 1,6686 gram (8,1 mmol) N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dan 0,9895 gram (8,1 mmol) N,N, Dimetil Aminopiridin (DMAP) atau dengan perbandingan Asam Sinamat : DCC/DMAP 1:1,2 mol equivalen. Campuran ditambahkan pelarut kloroform agar reaksi berjalan lebih mudah.



Gambar 3.3. Skema Sintesis Dimerisasi Senyawa Sinnamonat

Pada sintesis ini digunakan katalis DCC/DMAP dengan perbandingan 1:1. Campurkan Asam sinnamonat dan katalis DCC/DMAP dengan perbandingan 1:1,2 mol ekuivalen. Tambahkan pelarut kloroform 5 ml. Aduk dengan magnetik stirer. Hasilnya dicek dengan KLT setelah 3 (tiga) jam reaksi. Hasil reaksi diekstraksi dengan etil asetat dan air berkali-kali. Fraksi organik dikeringkan dan senyawa hasil dimurnikan.

Hasil ekstraksi yang dikeringkan dimurnikan dengan pemisahan kromatografi kolom dengan pengembang heksana: etil asetat yang divariasikan

perbandingannya dari mulai heksana 100% hingga etil asetat 100%. Dari hasil pemurnian ini dilakukan karakterisasi senyawa dengan menggunakan FT-IR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan LC-MS. Setelah proses karakterisasi, maka dilakukan studi uji toksisitas awal dengan metode BSLT, dan dilanjutkan dengan MTT *assay* terhadap sel HeLa.

3.3.4 Karakterisasi Senyawa

Senyawa murni yang mempunyai bioaktivitas tinggi diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FT-IR, spektrometer ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan LC-MS. Hal ini untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh benar-benar senyawa target yang diinginkan.

3.3.5 Uji Toksisitas

3.3.5.1 Uji Toksisitas dengan Metode Pengujian Kematian larva udang /Brine Srimp Lethality Test (BSLT) (Meyer, 1982)

Uji toksisitas awal ini dilakukan untuk dijadikan dasar uji toksisitas berikutnya.

1. Penetasan larva udang

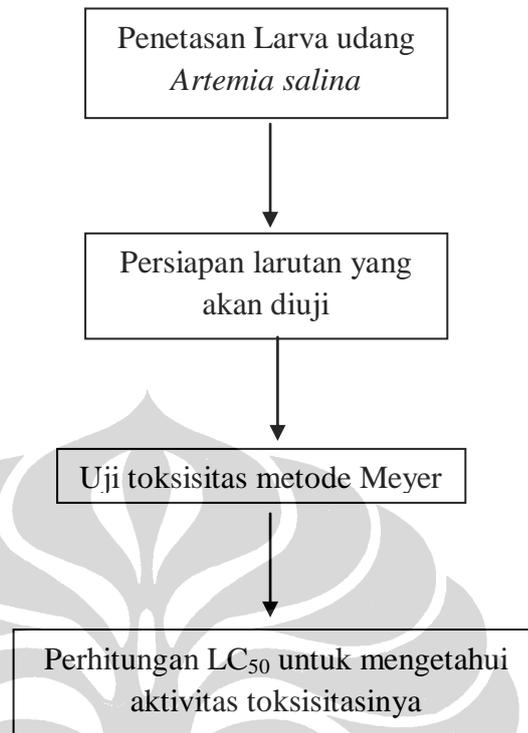
Kurang lebih 50 – 100 mg telur udang ditetaskan di dalam tempat persegi panjang (2 x 10 cm) yang dilengkapi pembatas berlubang diameter 2 mm dan telah diisi air laut, ditutup dengan aluminium foil pada bagian yang berisi telur, dan dibiarkan selama 48 jam. Telur akan menetas dan larva-larva udang yang akan diuji diambil dengan pipet pada bagian yang terang.

2. Persiapan larutan yang akan diuji

Senyawa murni yang akan diuji dibuat dengan konsentrasi 2000, 1000, 200, 20 ppm dalam air laut. Bila senyawa tidak larut, ditambahkan 10 μL DMSO. Larutan blanko atau kontrol terdiri dari air laut dan DMSO juga dipersiapkan.

3. Uji toksisitas

Larva udang yang hidup sebanyak 10 – 15 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 μL air laut. Ditambahkan larutan sampel yang akan diuji masing-masing sebanyak 100 μL , sehingga konsentrasi akhir menjadi 10, 100, 500, 1000 ppm. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam. Larva yang mati dan hidup dihitung jumlahnya. Selanjutnya tingkat mortalitas dihitung dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = ax + b$. Nilai LC_{50} diperoleh dengan memasukkan nilai $y = 50$, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50% larva, yang disebut LC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif jika mempunyai nilai $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$.



Gambar 3.4. Skema Uji Toksisitas BSLT

3.3.5.2 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Pengujian ini tidak hanya dilakukan pada obat anti kanker, namun juga pada bahan tambahan makanan, bahan kosmetik, serta obat-obatan yang lain. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduсібel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis.

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan

berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

Prosedur Pelaksanaan merupakan prosedur tetap yang telah dibakukan di laboratorium Pusat Riset Pencegahan Kanker Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM).

Persiapan sampel

Melihat hasil uji toksisitas dari metode BSLT, maka konsentrasi larutan yang diambil harus di bawah konsentrasi yang dipakai pada metode BSLT.

Sedangkan prosedur dasar MTT adalah:

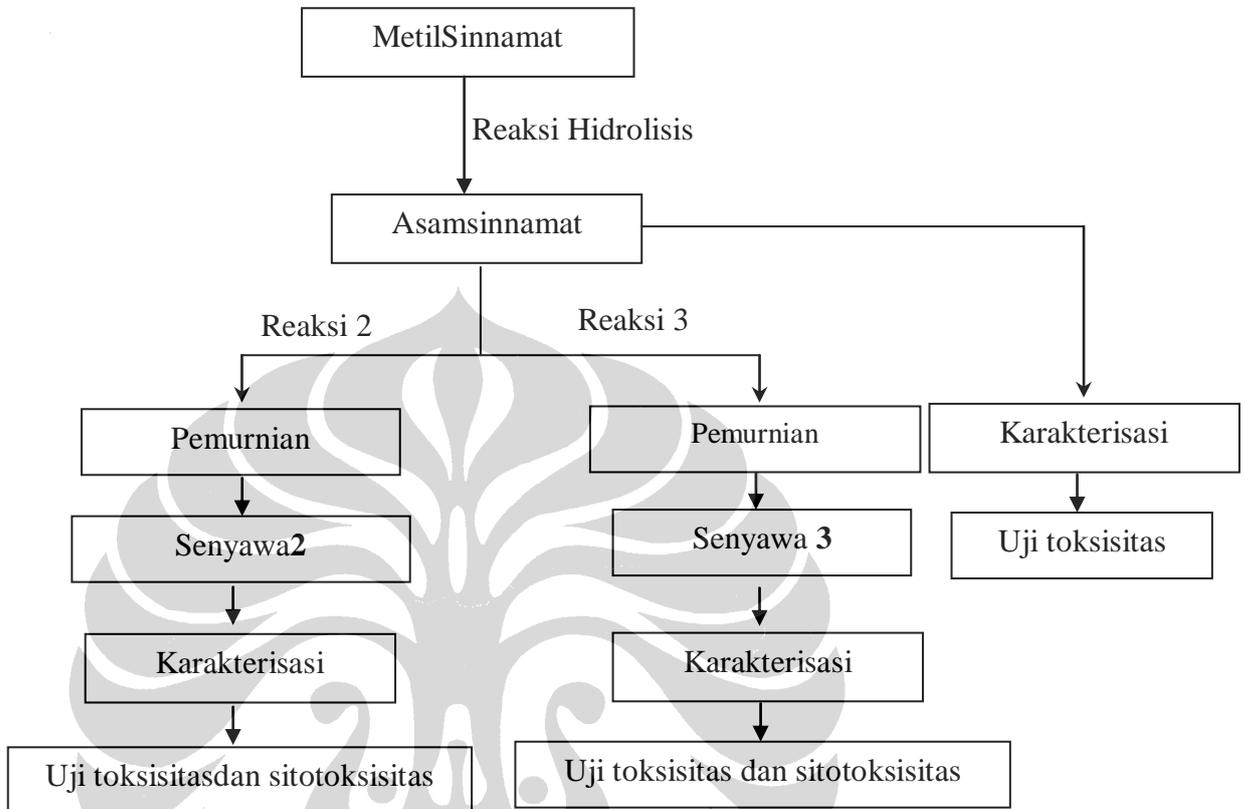
1. Sel ditempatkan sebanyak 1000 sampai 100.000 per well
2. Sel diinkubasi selama 24 jam
3. Ditambahkan 10 μ l reagen MTT
4. Diinkubasi kembali selama 2 hingga 4 jam sampai muncul warna keunguan
5. Ditambahkan 100 μ l pelarut/emulsifier
6. Didiamkan dalam keadaan gelap, pada suhu kamar selama 2 jam
7. Absorbansinya dibaca pada 570 nm

Data yang diperoleh merupakan data absorbansi, yang kemudian digunakan untuk menghitung % inhibisinya dengan mengikuti persamaan 3.1.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{rerata OD sel kontrol} - \text{rerata OD}}{\text{rerata OD sel kontrol}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Perhitungan laju inhibisi ditentukan dari grafik yang diperoleh dengan memasukkan nilai $y=50\%$ dan dihitung nilai x nya, maka diperoleh konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan laju inhibisi 50% terhadap sel HeLa, yang disebut IC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif jika mempunyai nilai $LC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$.

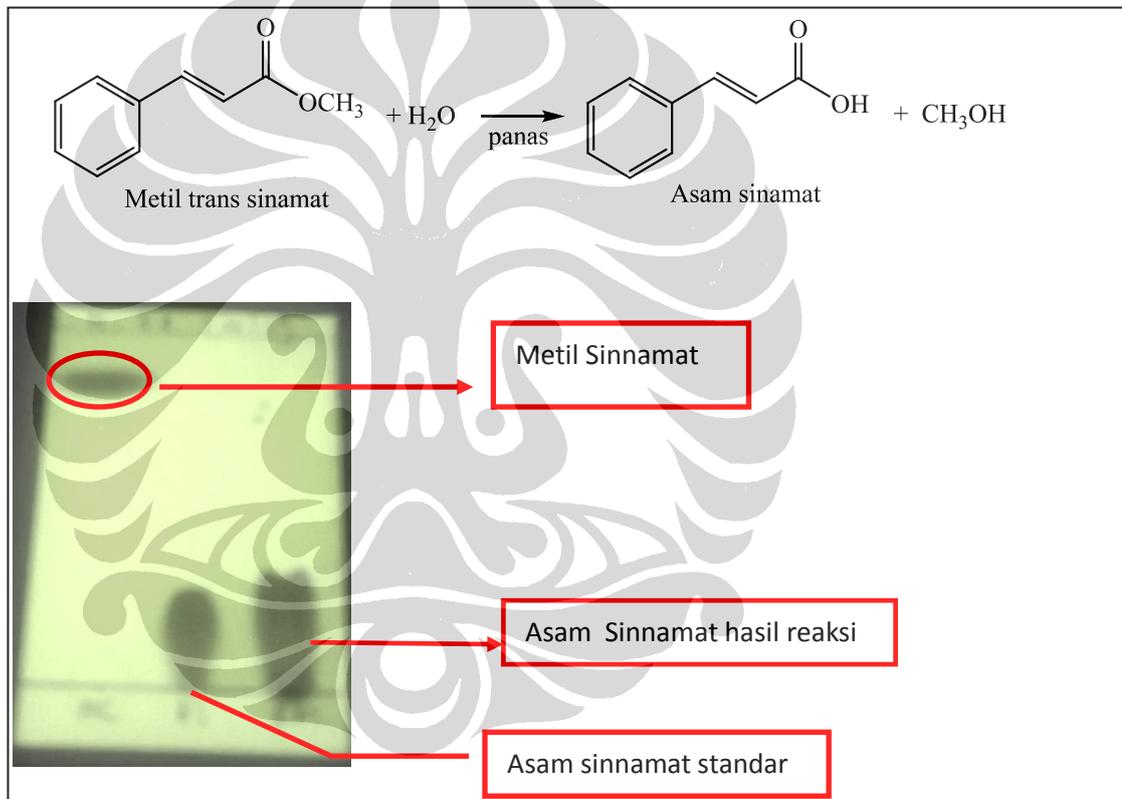
3.4. Bagan Kerja Penelitian



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Reaksi Hidrolisis Metil Sinamat

Reaksi pertama adalah hidrolisis metil sinamat menggunakan NaOH akan menghasilkan metanol dan garam natrium sinamat. Perlu ditambahkan air untuk menghidrolisis garam dan melepaskan Na^+ . Penambahan HCl akan menetralkan pH dan mengikat Na^+ sehingga terbentuk garam yang larut dalam air. Dari hasil KLT, diketahui pada jam ke 2, spot metil sinamat sudah tidak terlihat, sehingga reaksi dianggap sudah optimal dan dihentikan.



Gambar 4.1. Hasil Kromatografi lapis Tipis Reaksi Hidrolisis Asam Sinamat dengan pengembang heksana:etil asetat = 4:1

Metanol yang terbentuk dan sisa etanol (pelarut) harus diuapkan terlebih dahulu, mengingat metanol dan etanol larut dalam air. Penambahan basa akan membentuk garam, sehingga harus dilakukan penetralan/pencucian dengan larutan asam berkali-kali. Ekstraksi butanol dan air ini harus dilakukan pada pH netral agar fraksi air dan fraksi butanol dapat terpisah. Setelah fraksi butanol

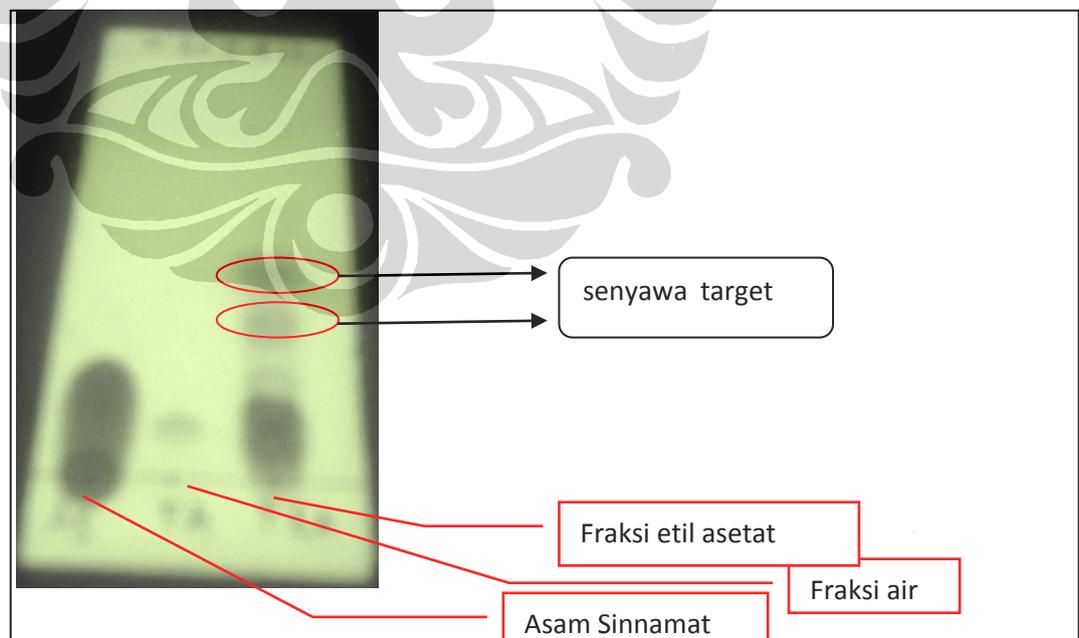
dikeringkan, ditimbang asam sinamat yang diperoleh seberat 12,87 gram atau 0,0869 mol sehingga rendemen yang dihasilkan adalah sekitar 70%. Asam Sinamat ini yang akan dipergunakan dalam reaksi selanjutnya.

4.2 Sintesis Lanjutan

4.2.1 Sintesis Senyawa 2

Metode yang digunakan dalam reaksi ini dengan menggunakan katalis *para* toluen sulfonat tanpa pelarut.. Proses ini pernah dilakukan dalam pembentukan hidrokumarin dari asam sinamat dan fenol tanpa menggunakan pelarut (Jagdale, 2007).

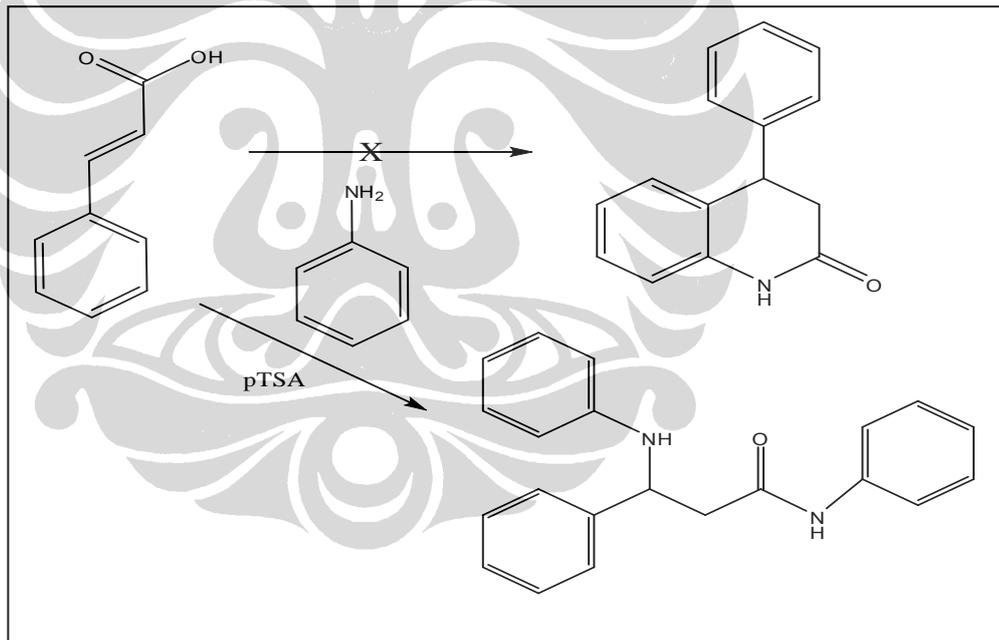
Pada reaksi ini suhu dibuat 120°C , sehingga semua senyawa dalam fase cair. Diketahui bahwa pTSA memiliki titik leleh 38°C , titik didih 140°C , sedangkan asam sinamat memiliki titik leleh 133°C , titik didih 300°C . Meskipun asam sinamat belum mencapai titik didih, namun karena keberadaan anilin dan pTSA yang dalam keadaan cair, maka asam sinamat larut dalam kondisi ini. Meskipun reaksi ini tidak dipergunakan pelarut, pada suhu reaksi tersebut, semua reagen dalam kondisi cair. Reaksi dicek dengan KLT setiap 2 jam.



Gambar4.2. Hasil ekstraksi dibandingkan dengan senyawa awal dengan pengembang heksana:etil asetat = 4:1.

Walaupun sudah terlihat senyawa target berada pada pengembang perbandingan heksana:etil asetat =4:1, namun proses pemisahan dengan kolom kromatografi tetap dilakukan dengan variasi pengembang mulai dari heksana 100% sampai dengan etil asetat 100% secara berhati-hati. Hasil kromatografi kolom dikumpulkan sesuai dengan spot hasil KLT, dan dikeringkan dengan *rotaryevaporator*.

Dari dua target ini, diperoleh senyawa1, dan senyawa2, namun karena jumlah senyawa1 terlalu sedikit, sehingga diabaikan dan hanya diambil senyawa 2 saja untuk dianalisa lebih lanjut. Senyawa 2 dikarakterisasi dengan menggunakan Spektrofotometer FT-IR, H NMR, C NMR, dan LC-MS. Selanjutnya senyawa diuji dengan uji toksisitas menggunakan metode BSLT dan MTT dengan sel HeLa.

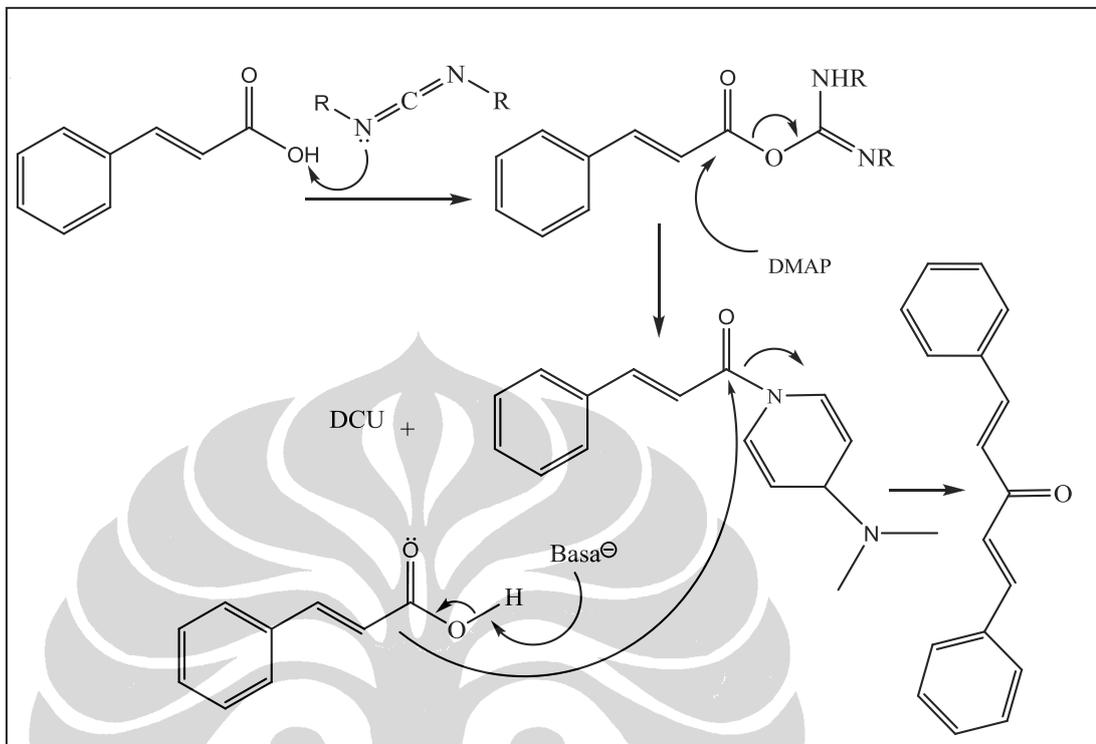


Gambar 4.3. Prediksi Hasil Reaksi Sintesis Senyawa2

4.2.2 Sintesis Senyawa 3

Pada reaksi kali ini dipakai aktivator N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dan katalis N,N, Dimetil Aminopiridin (DMAP) dengan perbandingan

DCC/DMAP 1:1. Walaupun masih diperlukan pembuktian, namun diduga mekanisme reaksi pembentukan senyawa **3** seperti yang tertera pada gambar 11.



Gambar 4.4. Usulan Mekanisma Reaksi Sintesis Senyawa **3**

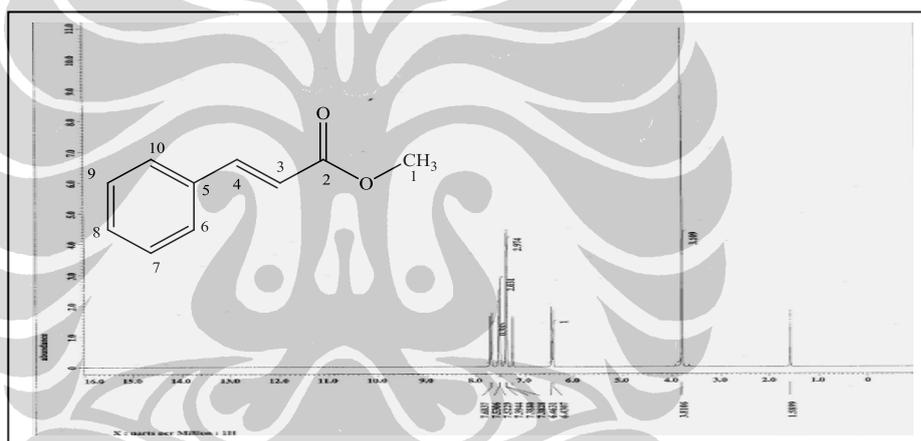
4.3 Karakterisasi Senyawa

4.3.1 Metil Sinamat

Spektrum hasil FT-IR metil sinamat menunjukkan pita-pita serapan pada daerah 981,77 menunjukkan adanya vibrasi ulur dari ikatan rangkap trans. Pada daerah 1712 terdapat serapan yang menunjukkan adanya gugus karbonil atau gugus ester. Hasil LC-MS menunjukkan spektrum nilai M pada 162. Hal ini sesuai dengan perhitungan secara teori, karena metil sinamat memiliki rumus molekul $C_{10}H_{10}O_2$. Hasil 1H NMR dan ^{13}C NMR (500 MHz) menggunakan pelarut $CDCl_3$.

Tabel 4.1. Nilai Pergeseran Kimia Metil sinamat

Posisi	δ_C	δ_H
1	51,9	3,86 (s, 3H)
2	167,6	
3	117,9	6,46 (d, 1H)
4	145,1	7,68 (d, 1H)
5	134,5	
6	128,3	7,52 (d, 1H)
7	129,1	7,38 (t, 1H)
8	130,5	7,38 (t, 1H)
9	129,1	7,38 (t, 1H)
10	128,3	7,52 (d, 1H)



Gambar 4.5. Spektrum ^1H NMR Metil Sinamat

Sinyal pergeseran kimia proton pada δ 3,86 ppm berbentuk *singlet* yang mewakili 3 buah proton, menunjukkan adanya pergeseran kimia metil yang terisolir. sinyal pada daerah δ 6,46 ppm dan 7,68 ppm berbentuk *doublet* dengan nilai konstanta J kopling 16 Hz, merupakan penanda bahwa terdapat sepasang proton olefinik berkonfigurasi *trans*. Puncak pada pergeseran kimia proton pada 7,52 ppm berbentuk *doublet* yang setara dengan dua buah proton (H-6 dan H-10), menunjukkan proton pada gugus aromatis yang simetris. Sedangkan tiga buah proton *triplet* ditunjukkan pada daerah pergeseran 7,38 ppm (H-7, H-8 dan H-9).

Nilai pergeseran kimia karbon (δ_c , ppm) (dalam CDCl_3 , 125MHz) (Lampiran1) memberikan data bahwa metil sinamat memiliki 1 buah metil pada pergeseran kimia $\delta_c = 51,9$ ppm; karbon quartener pada $\delta_c = 134,5$ ppm (C-5),gugus karbonil pada pergeseran kimia 167,6 ppm (C-1). Pada daerah pergeserean kimia antara 128-130 ppm merupakan karbon pada fenil.

4.3.2 Asam Sinamat

Spektrum FT-IR senyawa asam sinamat menunjukkan adanya serapan pada 1638 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil, ada serapan yang melebar pada daerah 3323 cm^{-1} menunjukkan adanya OH. Dari dua pita serapan yang menunjukkan adanya gugus karbonil dan gugus alkohol, kemungkinan senyawa ini adalah asam organik. Vibrasi tarikan pada daerah 972 cm^{-1} menunjukkan bahwa ikatan rangkap trans tidak berubah.

Hasil LC-MS menunjukkan spektrum yang jelas pada 149,26 yang menunjukkan ion molekuler $(M+1)^+$. Hal ini merupakan petunjuk yang cukup jelas, bahwa senyawa yang diperoleh bersesuaian dengan asam sinamat yang memiliki rumus molekul $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$ dan memiliki massa molekul relatif $m/z=148,26$.

Pada spektrum metilsinamat yang memiliki sinyal metil ester ($-\text{COOCH}_3$) pada $\delta 3,86$ (s) dan 51,9 ppm, tetapi pada spektrum ^1H NMR asam sinamat tidak memiliki sinyal proton *singlet* dari gugus metil ester. Hal ini menunjukkan bahwa telah lepas atau hilangnya gugus metil pada reaksi hidrolisis metil sinamat.

Spektrum ^1H NMR senyawa hasil hidrolisis ini terlihat adanya pergeseran kimia proton di daerah 7,49-7,57 ppm (5H) yang menunjukkan masih adanya gugus aromatik, dalam hal ini benzena, dan ikatan rangkap. Adanya sinyal ikatan rangkap pada $\delta=6,47$ ppm dan 7,79 ppm berbentuk *doublet* dengan nilai konstanta J kopling 16 Hz. Hal ini berarti tidak terjadi perubahan struktur selain lepasnya gugus metil. Proses hidrolisis yang melepaskan gugus metil ini telah mempengaruhi nilai pergeseran kimia pada proton olefinik (nilai pergeseran kimianya bertambah).

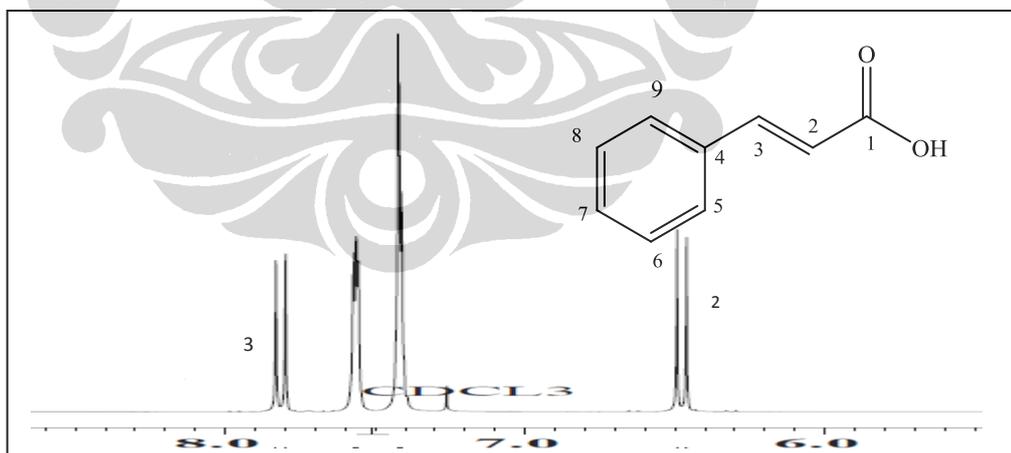
Dari spektrum ^{13}C NMR (125 MHz), dalam pelarut CDCl_3 terlihat bahwa jumlah atom C yang pada metil sinamat berjumlah 10, telah berkurang menjadi 9 buah atom C. Pergeseran kimia karbon yang mengikat oksigen (gugus karbonil)

menunjukkan perubahan menjadi δ_C 172,8 ppm. Selain itu, perubahan nilai pergeseeran kimia tidak terlalu signifikan. Hal ini dikarenakan atom C yang pada metil sinamat

Selengkapnya, hasil ^1H NMR asam sinamat dapat dilihat pada lampiran 3 dan tabel 4.2.

Tabel 4.2. Nilai Pergeseeran Kimia Asam Sinamat

Posisi	δ_C	δ_H
1	172,8	
2	117,5	6,47 (d, 1H)
3	147,2	7,79 (d, 1H)
4	134,1	
5	128,6	7,57 (d, 1H)
6	129,1	7,49 (t, 1H)
7	130,9	7,49 (t, 1H)
8	129,1	7,49 (t, 1H)
9	128,6	7,57 (d, 1H)



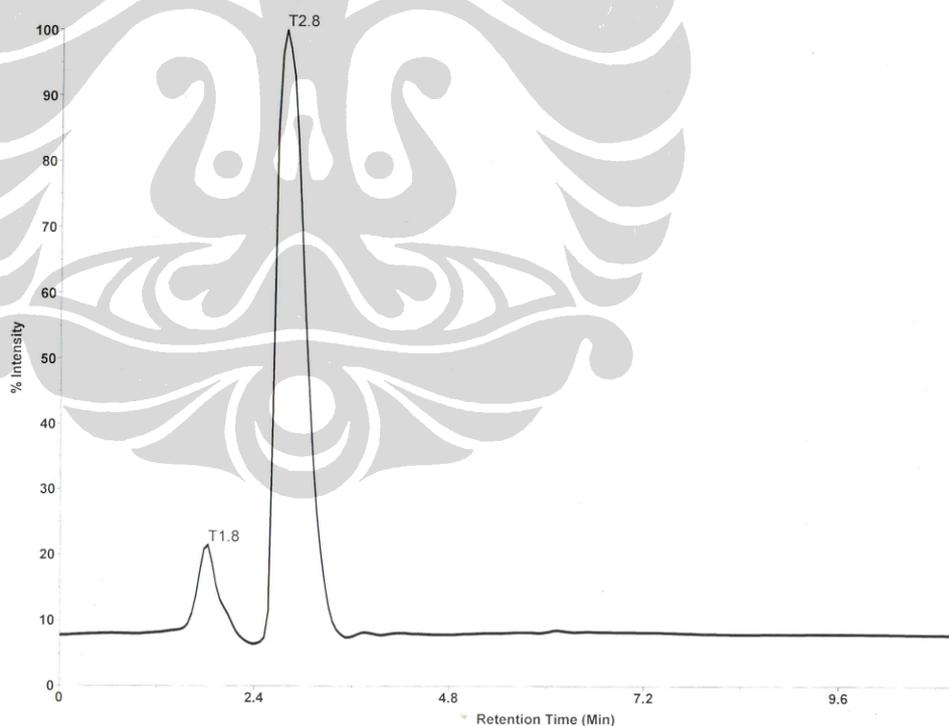
Gambar 4.6. Spektrum H NMR Asam Sinamat

4.3.3 Hasil Sintesis Senyawa 2

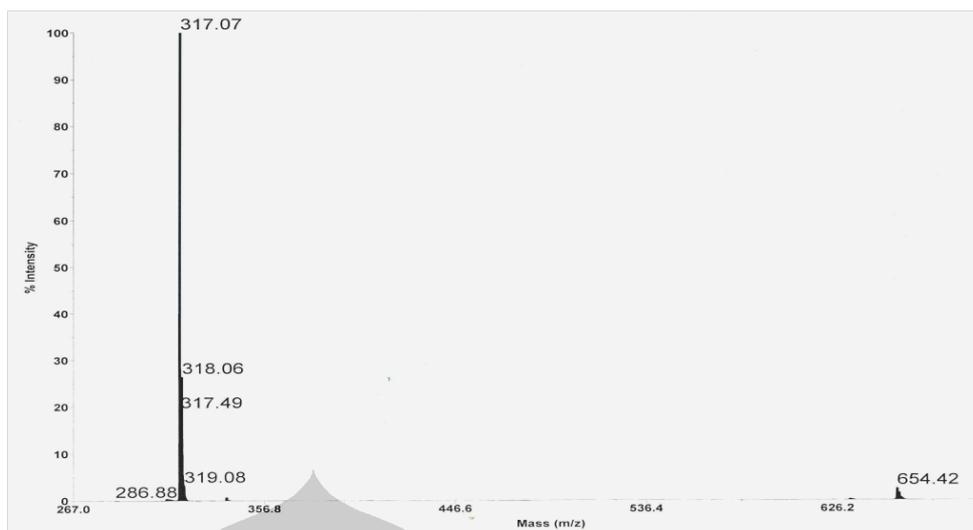
N,3-diphenyl-3-(phenylamino)propanamide

Spektrum hasil FT-IR menunjukkan adanya vibrasi tarikan pada daerah 3246 cm^{-1} yang diperkuat dengan vibrasi tarikan pada daerah 1658 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus amida. Gugus C=O masih ada, dibuktikan dengan vibrasi pada 1658 cm^{-1} . Ikatan C-N ditunjukkan oleh adanya vibrasi tarikan pada daerah 1504 cm^{-1} . Hal ini berarti reaksi telah berhasil memasukkan gugus amin pada karbon karbonil.

Berdasarkan hasil kromatogram LC (Gambar. 4.14) diperoleh puncak tertinggi pada waktu retensi 2,77 menit. Spektrum LC-MS menunjukkan $m/z:317,07$ yang merupakan puncak ion molekuler $[M+H]^+$. Ini berarti senyawa **2** memiliki massa molekul relatif $M_r = 316,07$. Karena senyawa ini memiliki massa molekul relatif yang genap, berarti dalam senyawa ini terdapat dua atom N. Dengan demikian diduga bahwa tidak terjadi proses siklisasi membentuk turunan laktam.

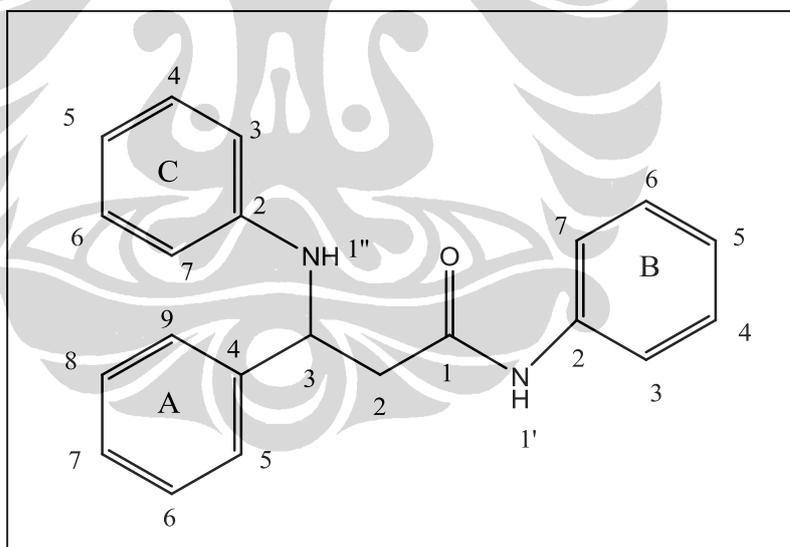


Gambar 4.7. Kromatogram LC Senyawa **2**



Gambar 4.8. Spektrum LC-MS senyawa 2

Untuk itu konfirmasi bentuk struktur senyawa2 dipastikan dengan melakukan pengukuran spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Lampiran 7) yang memberikan sinyal-sinyal pergeseran kimia (Tabel 4.3) dengan panduan gambar 19. sebagai berikut:



Gambar 4.9. Perkiraan Struktur Senyawa 2

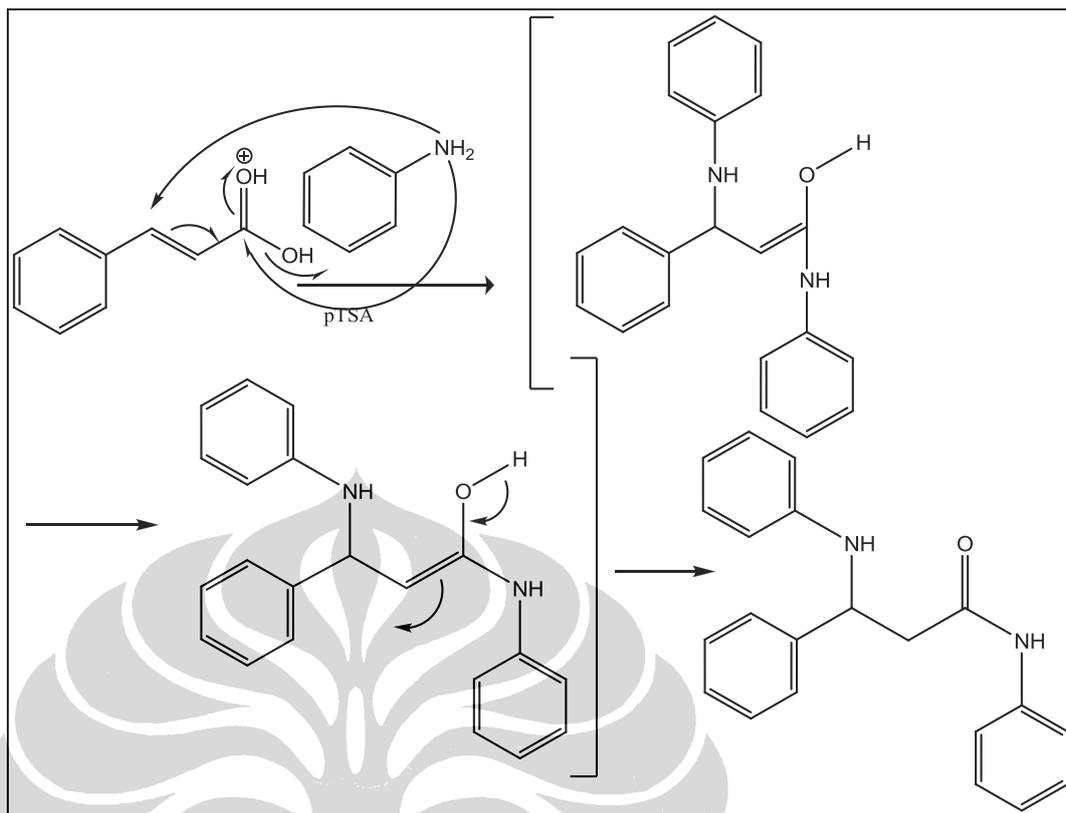
Hasil spektrum $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) senyawa2 menunjukkan bahwa nilai pergeseran kimia proton pada $\delta=2,8$ ppm berbentuk *doubeldoublet* yang mewakili 2 buah proton dengan nilai konstanta kopling $J =4,8$ Hz dan 13Hz. Konstanta J kopling menunjukkan korelasi dengan *triplet* pada $\delta= 4,8$ ppm yang

memiliki nilai konstanta kopling $J=5$ Hz. Hal ini berarti bahwa proton pada daerah $\delta=2,8$ ppm dan $\delta= 4,8$ ppm berdekatan. Proton pada daerah pergeseran kimia antara 7,1 ppm sampai dengan 7,37 ppm merupakan proton untuk gugus aromatik (benzena) atau fenil. Pada nilai pergeseran kimia dan 7,57 ppm terdapat sinyal atau puncak yang melebar, diduga puncak ini merupakan gugus amida (-CONH-). Hal ini sesuai dengan aturan bahwa nilai pergeseran kimia proton yang terikat pada karbon di dekat gugus amida memiliki nilai pergeseran kimia antara 5-9 ppm tergantung pada konsentrasi, temperatur dan pelarut yang digunakan (Pavia et al, 2009). Pada daerah $\delta= 7,32$ ppm, nilai konstanta koplingnya 2 Hz dan 8 Hz, sehingga ini memiliki korelasi proton pada daerah dengan nilai pergeseran kimia $\delta= 7,37$ ppm. Daerah dengan nilai pergeseran kimia $\delta= 7,1$ memiliki bentuk puncak atau sinyal *multiplet*, hal ini bisa diasumsikan bahwa daerah pergeseran kimia ini mewakili tiga buah proton yang memiliki lingkungan kimia yang sama, dan memiliki tetangga dua buah proton atau lebih yang terikat pada atom karbon tetangganya. Untuk lebih lengkapnya, uraian nilai pergeseran kimia ini dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Dari spektrum C NMR, dapat dilihat bahwa jumlah atom C berjumlah 21 buah. Karbon yang terikat pada gugus amida, memiliki nilai pergeseran kimia dengan $\delta_C = 168$ ppm. Karbon yang terikat pada gugus amina akan memberikan nilai pergeseran kimia antara 30-60 ppm (Pavia et al, 2009). Nilai pergeseran kimia pada cincin A tidak akan jauh berbeda dengan nilai pergeseran kimia pada asam sinamat, walaupun ada pergeseran, tidak akan terlalu besar. Pada rantai alifatik, terjadi perubahan yang cukup signifikan, karena ikatan rangkap sudah tidak ada lagi, dan terjadi ikatan baru dengan gugus amina dari anilin. Nilai pergeseran kimia karbon ke 3, δ_{C_3} menjadi 55,8 ppm. Spektrum ^{13}C NMR senyawa ini terlihat adanya sejumlah karbon ekuivalen sehingga sinyalnya berimpit dan menimbulkan puncak yang lebih tinggi, yaitu C_5 dengan C_9 , dan C_6 dengan C_8 pada cincin A, C_3 dengan C_7 , dan C_4 dengan C_6 pada cincin B, serta C_3 dengan C_7 , dan C_4 dengan C_6 pada cincin C. Uraian lebih lengkap akan terlihat lebih jelas melalui tabel 4.3.

Tabel 4.3. Nilai Pergeseran Kimia Senyawa²

Posisi	δC	δH
1	168,8	
2	45,7	2,8 (d, 2H)
3	55,8	4,8 (t, 1H)
4	142,2	
5	129,1	7,37 (d, 1H)
6	129,4	7,32 (t, 1H)
7	129,1	7,1 (t, 1H)
8	129,4	7,32 (t, 1H)
9	129,1	7,37 (d, 1H)
1' (CONH)		7,57 (s, 1H)
2 _B	137,4	
3 _B	120,3	7,37(d, 1H)
4 _B	126,3	7,32 (dd, 1H)
5 _B	127,8	7,1 (t, 1H)
6 _B	126,3	7,32 (dd, 1H)
7 _B	120,3	7,37(d, 1H)
1''(NH)		7,59 (s, 1H)
2 _C	146,6	
3 _C	114,4	6,6 (d, 1H)
4 _C	129,4	7,29 (dd, 1H)
5 _C	118,5	6,7 (t, 2H)
6 _C	129,4	7,29 (dd, 1H)
7 _C	114,4	6,6 (d, 1H)



Gambar 4.10. Perkiraan Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa2

Proses siklisasi tidak terjadi diduga karena sebagian katalis pTSA bereaksi dengan anilin membentuk garam amonium sehingga pada gugus aril tidak menjadi gugus anion (Ar^-) atau tidak terjadi pelepasan proton H^+

Reaksi tersebut di atas seharusnya hanya memasukkan satu anilin dalam proses amidasi ini, namun karena proses reaksi yang *over time*, jumlah anilin yang berlebih, sehingga menyebabkan gugus amina menyerang pada dua tempat yaitu pada karbon karbonyl dan karbon yang memiliki ikatan rangkap. Hal ini bisa menjadi suatu masukan bagi penelitian selanjutnya, agar memberikan campuran yang proporsional tanpa menambah jumlah atau kuantitas reagen yang digunakan.

4.3.4 Hasil Sintesis Senyawa3

(1E,4E)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one

Spektrum FT-IR senyawa ini menunjukkan vibrasi tarikan pada daerah 1651 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karbonyl $C=O$ yang terkonjugasi. Daerah

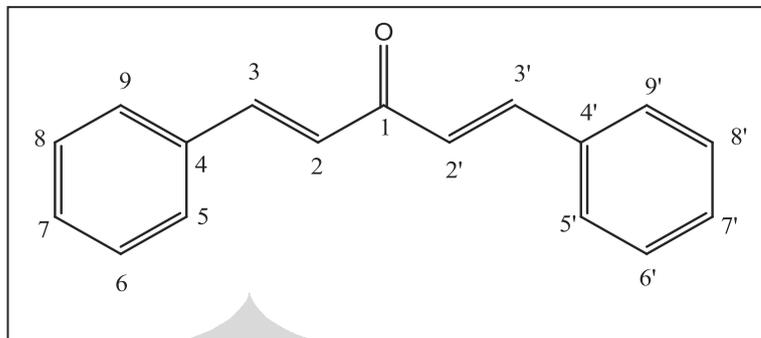
pitas serapan 3053-3026 cm^{-1} , menunjukkan adanya gugus aromatik. Ikatan rangkap dengan posisi trans ditunjukkan oleh adanya pita vibrasi pada 983 cm^{-1} . Pada daerah 758-696 cm^{-1} , terdapat pita tarikan yang cukup kuat, menunjukkan bahwa gugus aromatik (benzena) tersubstitusi tunggal.

Spektrum hasil LC-MS menunjukkan puncak pada waktu retensi 3,43 menit. Spektrum pada waktu retensi tersebut menunjukkan nilai m/z 235,18. Nilai ini menunjukkan nilai $[M+H]^+$. Berarti senyawa ini memiliki nilai massa molekul relatif 234,18.

Reaksi pada awalnya ini merupakan reaksi esterifikasi asam sinamat dengan asam 2-hidroksinikotinat. Namun senyawa yang diperoleh merupakan suatu keton yang menyerupai dimer asam sinamat. Jika dilihat sepintas dari spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR akan terlihat sama seperti spektrum asam sinamat, namun hal tersebut tidak didukung oleh hasil spektroskopi FT-IR dan LC-MS. Dugaan sementara yang harus dibuktikan adalah bahwa asam hidroksi nikotinat tidak ikut bereaksi, atau hanya memberi suasana basa sehingga ikut mengkatalisasi terbentuknya dimer ini.

Hasil ^1H NMR menunjukkan adanya nilai pergeseran kimia pada $\delta = 7,1$ ppm dan 7,7 ppm berbentuk *doublet* dan masing-masing memiliki J kopling 16 Hz, ini menunjukkan adanya proton olefinik dengan posisi *trans* yang berpasangan, bukan pada aromatik. Sinyal pada kedua nilai pergeseran kimia tersebut masing-masing mewakili 2 buah proton, sehingga terdapat dua buah ikatan rangkap yang simetris atau memiliki lingkungan kimia yang sama. Dengan panduan gambar 4.15, dan tabel 4. dapat dilihat bahwa pada posisi 5 dan 5' memiliki lingkungan kimia yang sama, sehingga ekuivalen. Demikian juga antara 5 dan 9 memiliki lingkungan kimia yang sama pula, sehingga antara 5, 9, 5' dan 9' ekuivalen. Hal ini juga terlihat pada posisi 6, 8, 6' dan 8'. Gugus aromatik terlihat pada sinyal di daerah $\delta = 7,41 - 7,62$ ppm. Sinyal pada daerah $\delta = 7,4$ ppm memiliki bentuk *doublet*, dengan nilai regresi 2, atau mewakili 4 proton. Pada nilai pergeseran kimia $\delta = 7,62$ ppm, dengan bentuk *double doublet*, mewakili 4 proton dan memiliki J kopling 5 dan 8 Hz, sehingga diperkirakan menempati posisi 6,8,6' dan 8'. Sedangkan nilai pergeseran kimia untuk $\delta = 7,42$ ppm

mewakili dua proton memiliki bentuk *triplet* dengan J kopling 8 Hz, sehingga ini diperkirakan menempati posisi 7 dan 7'.



Gambar4.11. Perkiraan Struktur Senyawa3

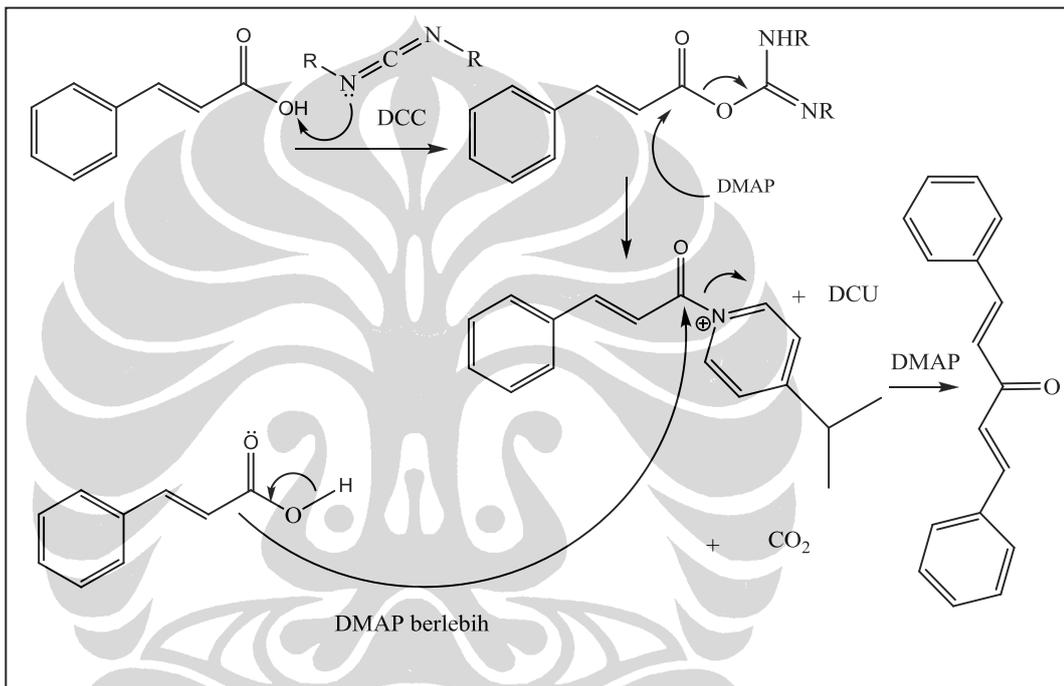
Dari hasil spektroskopi ^{13}C NMRnya akan dapat dilihat bahwa spektrum senyawa ini menunjukkan satu gugus keton pada $\delta_c = 189$ ppm. Nilai pergeseran kimia pada karbon kuartener terlihat pada $\delta_c = 134,9$ ppm. Jika puncak atau sinyal ini mewakili 2 karbon kuartener yang *ekuivalen*, memiliki lingkungan kimia yang sama, maka sinyal pada nilai pergeseran kimia $\delta_c = 128$ dan 129 ppm masing-masing mewakili empat karbon yang memiliki lingkungan kimia atau nilai pergeseran kimia yang sama pula.

Tabel 4.4 Nilai Pergeseran Kimia Senyawa3

Posisi	δ_c	δ_H
1	189,1	
2, 2'	125,6	7,1 (2H, d, $J = 16$ Hz)
3, 3'	143,5	7,7 (2H, d, $J = 16$ Hz)
4, 4'	134,99	
5,9, 5'9'	129,1	7,41 (4H, d, $J = 8$ Hz)
6, 8, 6',8'	128,6	7,62 (4H, d, $J = 8$)
7, 7'	130.7	7,42 (2H, t, $J = 8$ Hz)

Reaksi antara asam sinamat dan DCC/DMAP, dimana DMAP yang berlebih, membentuk dimer turunan sinamat. DCC mengaktivasi asam sinamat

sehingga menjadi ion sinamaldehyd, sedangkan sebagian asam sinamat mengalami dekarboksilasi dan menjadi ion stiren. Keduanya bergabung menjadi dimer sinamat (1E,4E)-1,5-difenil-penta-1,4-dien-3-on. Pengaruh suasana basa, dan jumlah ekuivalen mol DCC/DMAP yang berlebih, diduga merupakan penyebab terjadinya reaksi ini. Dalam reaksi esterifikasi maupun amidasi, biasanya digunakan tidak lebih dari 0,15 mol ekuivalen DCC/DMAP. Walaupun mekanisme reaksi ini perlu dibuktikan lebih lanjut, namun hasil reaksi ini merupakan suatu perkembangan baru dalam sintesis dimer sinamat.



Gambar 4.12. Usulan Mekanisme Reaksi Pembentukan Senyawa3

4.4 Uji Toksisitas

4.4.1 Hasil Uji BSLT

Hasil Uji toksisitas BSLT dapat dilihat pada tabel, bahwa pada pengujian untuk Senyawa 2 dan 4 telah dilakukan pada konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm, dan 20 ppm.

Selain kontrol terhadap pelarut (DMSO) juga dibuat kontrol media (tanpa DMSO), hal ini digunakan untuk menunjukkan bahwa air laut yang digunakan merupakan air laut dengan keadaan salinitas yang standar. Kontrol terhadap

pelarut, dibuat dengan menambahkan 10 ml DMSO pada air laut. Data mortalitas pada kontrol sebesar mempengaruhi tingkat kepercayaan dalam pengujian ini. Semakin rendah nilai mortalitasnya berarti kualitas air laut dan larva udang yang digunakan semakin baik.

Tabel 4.5. Hasil Nilai LC₅₀ pada Uji BSLT

Nomor	Nama senyawa	C, ppm	Log K	Mortalitas	LC ₅₀
1	Metil Sinamat	10	1	18,033	144,21
		100	2	42,308	
		500	2.7	80,769	
		1000	3	100,000	
2	Asam Sinamat	10	1	8,451	169,82
		100	2	25,455	
		500	2.7	64,815	
		1000	3	100,000	
3	Senyawa2	10	1	10,00	65,17
		100	2	61,54	
		500	2.7	95,65	
		1000	3	100,00	
4	Senyawa 3	10	1	4,762	93,95
		50	1,7	23,256	
		250	2,4	77,273	
		500	2,7	93,750	
		1000	3	100,00	
5	Kontrol			0	

Walaupun senyawa ini sulit larut dalam air laut, namun aktivitasnya tetap tinggi. Penambahan DMSO, dilakukan agar senyawa dapat larut dalam pengujian

ini. Dalam pelarut yang berbeda, kemungkinan akan menunjukkan hasil yang berbeda pula. Perlakuan dilakukan pengulangan tiga kali atau triplo agar hasil lebih mewakili. Terlihat bahwa nilai toksisitas senyawa **2** dan **3** memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metil sinamat, asam sinamat sebagai senyawa awalnya. Hal ini diduga karena adanya peningkatan lipofilisitas dengan adanya penambahan ikatan rangkap pada senyawa **3**, dan atau penggantian ester atau gugus karboksilat dengan gugus amida. Karenanya, pada senyawa **2** dan **3** akan dilakukan uji sitotoksitas untuk mengetahui aktivitasnya terhadap sel kanker.

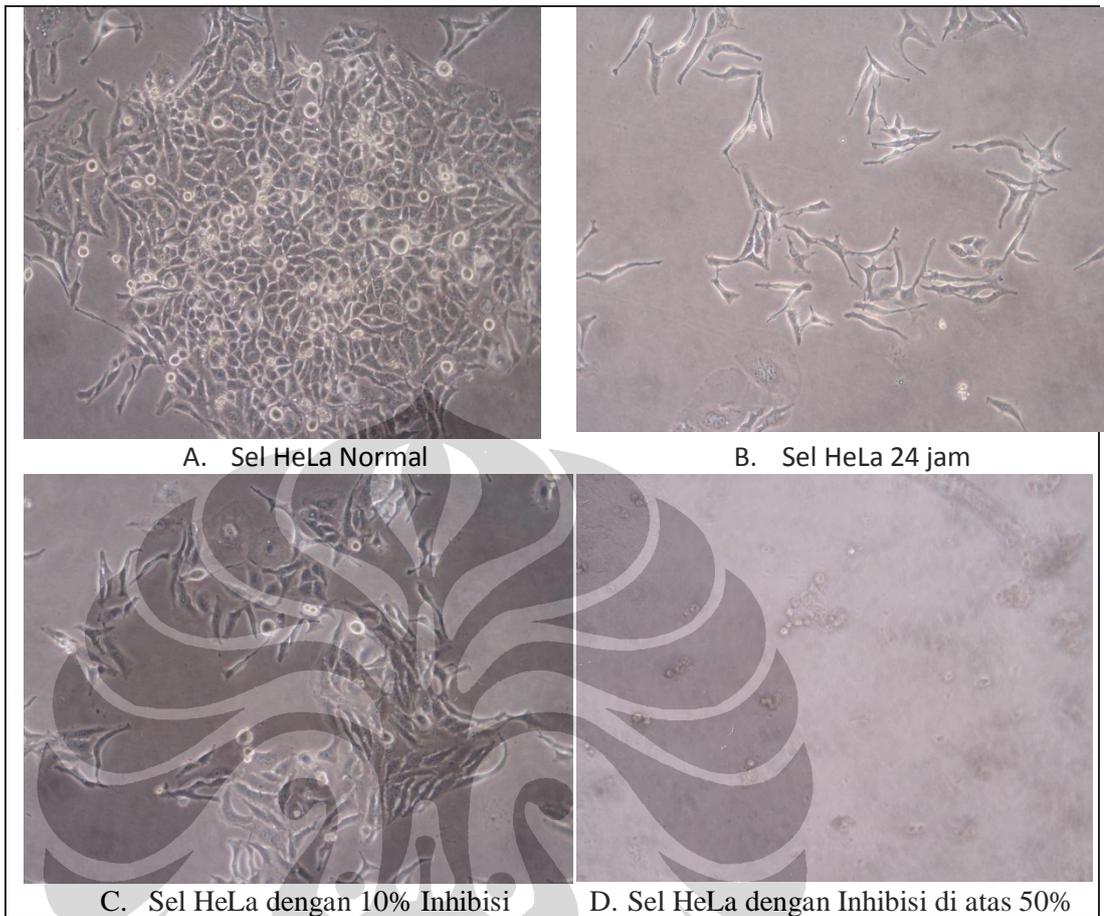
4.4.2 Hasil Uji Sitotoksitas

Berdasarkan hasil uji BSLT, maka pengujian anti kanker dibuat dalam variasi konsentrasi 50 ppm, 10 ppm dan 2 ppm. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali (triplo) dan dibandingkan dengan kontrol. Kontrol merupakan sel kanker, tanpa perlakuan. Sel yang digunakan adalah sel HeLa ATCC CCL2, dengan metode pengujian MTT. HeLa ATCC CCL2 merupakan sel imortal yang proses Sel HeLa yang tanpa perlakuan akan mengalami perkembangan yang maksimal karena hanya sedikit sel yang mati dibandingkan dengan jumlah sel yang berproliferasi (terlihat pada Gambar 22.A). Perlakuan yang berbeda akan memberikan efek yang berbeda pula pada fisiologis sel. Pada keadaan sel HeLa mengalami inhibisi di atas 50%, terlihat banyak sel yang mati.

Dari pembacaan ELISA *reader*, diperoleh nilai absorbansi atau *optical density* (OD), dan dari nilai rerata OD ini dapat dihitung nilai % inhibisinya dengan mengikuti persamaan

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{rerata OD sel kontrol} - \text{rerata OD}}{\text{rerata OD sel kontrol}} \times 100\%$$

Berikut ini beberapa gambar sel HeLa yang bisa dilihat.



Gambar 4.13. Sel HeLa dalam Beberapa Kondisi

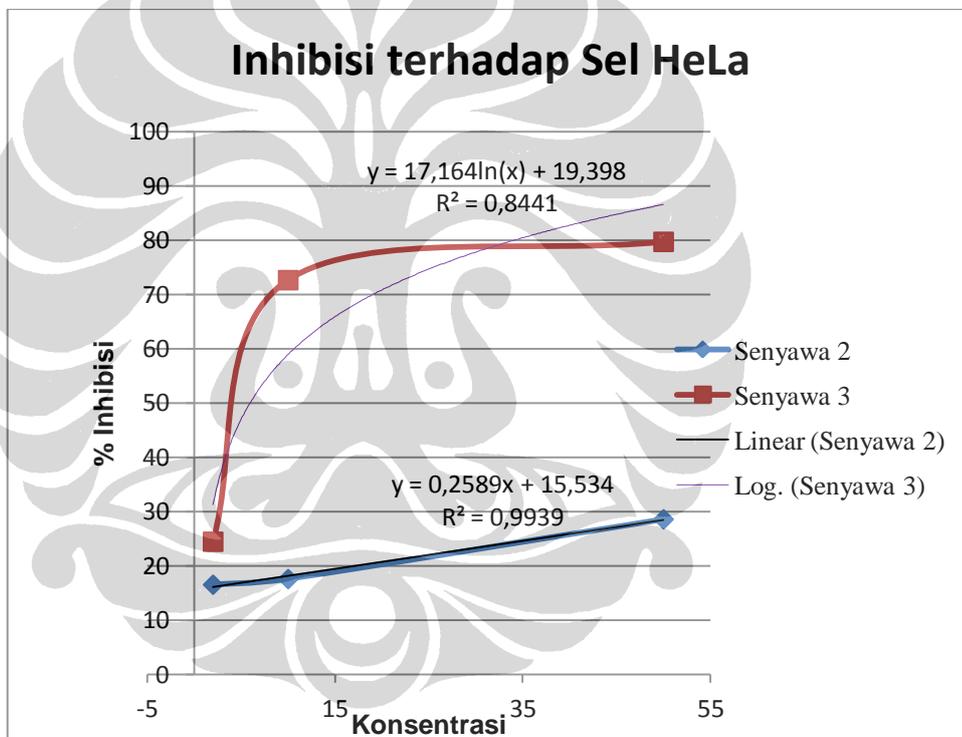
Tabel 4.6. Hasil Uji Sitotoksitas terhadap Sampel Senyawa 2

Konsentrasi Ekstraks (ppm)	Ulangan			Rerata	%inhibisi
	OD1	OD2	OD3		
50	0,154	0,125	0,136	0,138	28,57
10	0,172	0,14	0,167	0,160	17,56
1	0,165	0,172	0,148	0,162	16,52
sel kontrol	0,183	0,196	0,202	0,194	0,00

Tabel 4.7. Hasil Uji Sitotoksitas terhadap Sampel Senyawa 3

Konsentrasi Ekstraks (ppm)	Ulangan			Rerata	%inhibisi
	OD1	OD2	OD3		
50	0,052	0,046	0,02	0,039	79,69
10	0,063	0,046	0,05	0,053	72,63
1	0,146	0,164	0,129	0,146	24,44
selkontrol	0,183	0,196	0,202	0,194	0,00

Dari kedua tabel di atas, dapat dibuat suatu grafik %inhibisi vs konsentrasi untuk penghitungan IC_{50} , yakni konsentrasi sampel yang mampu menginhibisi sel sebesar 50%.



Gambar 4.14. Grafik Laju Inhibisi Senyawa 2 dan 3 terhadap Sel HeLa

Dengan memasukkan nilai $y = 50\%$, untuk masing-masing persamaan dari grafik pada gambar 25. diperoleh bahwa senyawa 2 memiliki nilai $IC_{50} = 133,1248$ ppm, sedangkan senyawa 3 memiliki nilai $IC_{50} = 5,94$ ppm. Dapat dilihat bahwa Senyawa 3 memiliki kemampuan atau aktivitas biologis yang lebih tinggi dalam menginhibisi sel HeLa dibandingkan dengan senyawa 2. Hal ini diduga karena Senyawa 3 lebih bersifat lipofilik karena memiliki dua ikatan rangkap ($HC=CH$)

dan gugus keton (C=O), sedangkan senyawa **2** tidak tetapi memiliki gugus amida (-CONH). Senyawa **3** juga berbentuk planar jika dibandingkan dengan senyawa **2**.

5. KESIMPULAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Asam sinamat dapat dihasilkan dari reaksi hidrolisis metil sinamat dengan menggunakan katalis larutan NaOH dengan rendemen sekitar 70%.
2. Reaksi antara asam sinamat dan anilin menggunakan katalis asam *para* toluen sulfonat tidak terjadi siklisasi tetapi membentuk suatu amida, dengan rendemen 3,2 %
3. Reaksi asam sinamat menggunakan DCC/DMAP menghasilkan dimer asam sinamat dengan rendemen sekitar 7,8%
4. Senyawa turunan asam sinamat memiliki toksisitas dan sitotoksitas yang tinggi dengan meningkatnya sifat lipofilik, terutama senyawa **3**, yang memiliki IC₅₀ sebesar 5,94 ppm terhadap sel Hela.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang perlu disampaikan untuk penelitian ke depan antara lain:

1. Perlu dilakukan kajian dan optimasi dalam setiap tahapan reaksi.
2. Sintesis ini diharapkan bisa dilanjutkan dengan substitusi gugus hidroksi untuk meningkatkan aktivitas senyawa.
3. Perlu dikembangkan metode reaksi dengan memanfaatkan aktivator/katalis yang lain, misalnya etil-(N',N'-dimetilamino)propil karbodiimid hidro klorida (EDC), atau karbonildiimidazol (CDI) untuk mempermudah menghilangkan produk sampingnya.

DAFTAR PUSTAKA

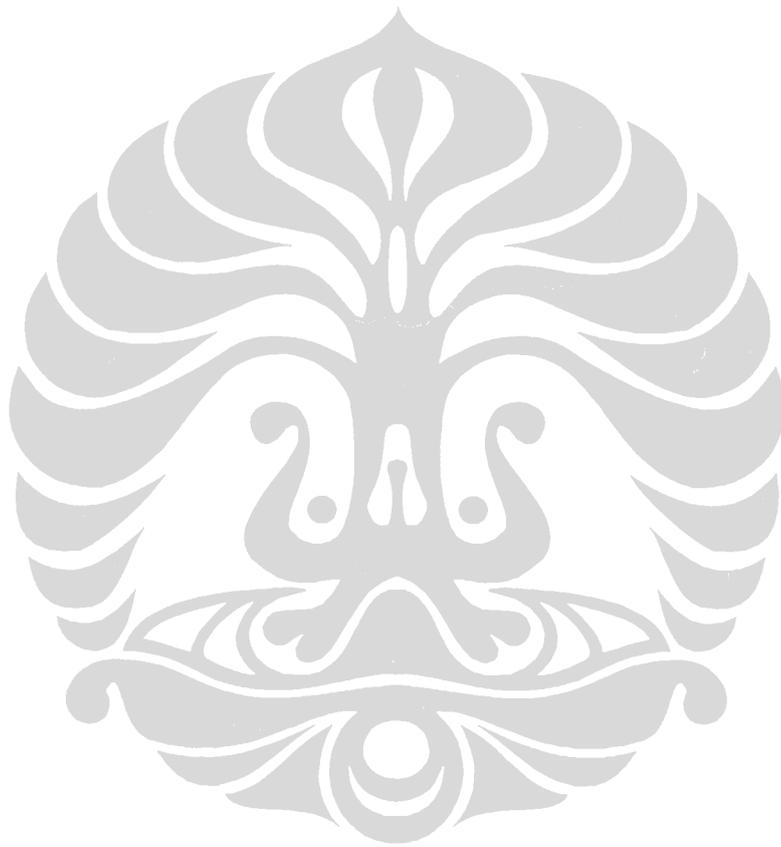
- Alluri. N, Thameemulansari L.H. dan Reddy C. UmaMaheswara. (2012). *Cytotoxic Activity of Methanol and Dichloromethane Extracts Soft Halicona Species*. IJPSR. Vol. 3(6): Hlm. 1782-1784
- Arun R. Jagdale dan Arumugam Sudalai. (2007) *p-Toluenesulfonic acid mediated hydroarylation of cinnamic acids with anisoles and phenols under metal and solvent-free conditions*. Tetrahedron Letters Vol. 48 Hlm. 4895-4898
- Ayo, R. G., Audu, O.T., dan Amupitan, J.O., (2007), *Physico-Chemical Characterization and Cytotoxicity Studies of Seed Extracts of Khaya senegalensis (Desr)*. Afr. J. Biotechnol, Vol. 6 Hlm 894-896
- Choudhary, M. Iqbal, Afshan Begum, Ahmed Abbaskhan, Shafiq-ur-Rehman, dan Atta-ur-Rahman. (2006). *Cinnamate Derivatives of Fructooligosaccharides from Lindelofia stylosa*. Science Direct. Carbohydrate Research 341. Hlm. 2398-2405.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. (2001). Organic Chemistry, Edisi ke 3. Oxford University Press,
- Cutillo F.D'Abrosca, B. DellaGreca, M. Di Marino, C. Golino, A. Previtiera, L. Zarrelli, A. (2003). *Cinnamic Acid Amides from Chenopodium album: Effects on Seeds Germination and Plant Growth*. Phytochemistry. Vol. 64. Hlm. 1381-1387
- De, P., Baltas, M. Dan Bedos-Belval, F. (2011). *Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review*. Current Medicinal Chemistry. Vol. 18. Hal. 1672-1703
- Dey, P.M., dan Harborne, J.B. (1991). *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 6 Assay for Bioactivity. San Diego. Academic Press
- Furniss, Brian S., Antony J. Hannaford, Peter W. G. Smith, dan Austin R. Tatchell. (1989). *Vogel's, Textbook of Practical Organic Chemistry*, Fifth Edition. New York. John Willey & Sons, Inc.

- Han, So-Yeop dan Kim, Young-Ah.(2004). *Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis*. Tetrahedron Vol. 60 Hlm. 2447–2467
- Ho, Chi-Kuan. Huang Y. L., dan Chen C. (2002). *GarcinomaE, a Xanthone Derivative, has Potent Cytotoxic Effect Against Hepatocellular Carcinoma Cell Lines*. Planta Med. Vol. 68. Hlm. 975-979.
- Huang, Qian-Sheng. Zhu, Yu-Jing. Li, Hua-Liang .Zhuang, Jiang-Xing.Zhang, Chun-Le. Zhou, Jing-Jing. Li, Wen-Gang. dan Chen, Qing-Xi.(2009). *Inhibitory Effects of Methyl trans-Cinnamate on Mushroom Tyrosinase and Its Antimicrobial Activities*. J. Agric. Food Chem. Vol.57. Hlm 2565–2569
- Husniati.(2008).*Sintesis Senyawa analog UK-3A:3-Hidroksi-N-oktilpikolinamida, 2-hidroksi-n-Fenil-Bensamida, 3-hidroksi-Nfenilpikoli-namida, dan 2-hidroksi-N-Oktilbenzamida dan uji bioaktivitas secara in vitro terhadap sel kanker murine leukimia P-388*, Universitas Indonesia.
- Indiastuti, Danti Nur, Sri Purwaningsih, Yuani Setiawati, dan Noor Cholies. (2008). *Skrining Pendahuluan Toksisitas Beberapa Tumbuhan Benalu terhadap Larva Udang Artemia salina Leach*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Vol. 6. Hlm. 81-85.
- Jadgale, Arun R dan Sudalai, Arumugam.(2007).*p-Toluenesulfonic Acid Mediated Hydroarylation of Cinnamic Acids with Anisoles and Phenols Under Metal and Solvent-Free Conditions*. Tetrahedron Letters. Vol. 48. Hlm. 4895-4898.
- Jaya Prakash dan Sujit Roy. (2003). *Catalytic Hunsdiecker Reaction of α,β -Unsaturated Carboxylic Acid: How Efficient Is the Catalyst*. J. Org. Chem. Vol. 67. Hal. 7861-7864.
- Letizia, C.S. Cocchiara, J. Lapczynski, A. Lalko, J. Api, A.M. (2005). *Fragrance material review on cinnamic acid*. Food and Chemical Toxicology Vol. 43 Hlm. 925–943
- Li, K. et al. (2005). *Trifluoroacetic Acid-Mediated Hydroarylation Synthesis of Dihydrocoumarins and Dihydroquinolones*. J. Org. Chem. Vol.70. Hlm. 2881-2883
- M. A. Nor Azah, Y. Y. Sam, J. Mailina dan L. S. L. Chua. (2005). *(E)-Methyl Cinnamate: The Major Component of Essential Oils of Alpinia Malaccensis Var. Nobilis*. Journal of Tropical Forest Science Vol.17(4) Hlm. 631- 633

- Mosley, C.C. (2009). *Synthesis, structural activity-relationships, and biological evaluation of novel amide-based allosteric binding site antagonists in NR1A/NR2B N-methyl-D-aspartate receptors*. *Bioorg Med Chem*. Vol. 17(17) Hlm. 6463–6480
- Narasimhan, B. Belsare D. Pharande D. Mourya V. dan Dhake A. (2004). *Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 39. Hlm. 827–834
- Palizban, A.A, Aliabadi, H. S. dan Abdollahpour, F. (2010). *Effect of cerium lanthanide on Hela and MCF-7 cancer cell growth in the presence of transferrin*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5(2). Hlm. 119-125
- Purbarani, Nurul F. (2011). *Studi Transformasi Kimia Senyawa Katekin serta Uji Aktivitas Biologi terhadap Larva Udang Artemia salina L*. Tesis. Depok. Universitas Indonesia.
- Ramesh Babu Kaseti, Shaik Abdul Nabi, Sirasangandla Swapna, Chippada Apparao. (2012). *Cinnamic Acid As One Of The Antidiabetic Active Principle(s) From the Seeds of Syzygium Alternifolium*. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 50 Hlm. 1425–1431
- Rendy Rendy, Yun Zhang, Aaron McElrea, Alma Gomez, dan Douglas A. Klumpp. (2004). *Superacid Catalyzed Reactions of Cinnamic Acids and Role of Superelectrophiles*. *J.Org. Chem*. Vol. 69. Hlm 2340-2347.
- Sadeghi-aliabadi, H. M. Minaiyan dan A. Dabestan. (2010). *Cytotoxic Evaluation of Doxorubicin in Combination with Simvastatin Against Human Cancer Cells*. *RPS* . Vol. 5(2). Hlm 127-133
- Sardjoko. (1993). *Rancangan Obat*. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.
- Satoshi Mishima, Yosuke Ono, Yoko Araki, Yukihiro Akao, Dan Yoshinori Nozawa. (2005) *Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allografted Sarcoma S-180 in Mice*. *Biol. Pharm. Bull*. Vol. 28. Hlm. 1025—1030.
- Sharma C.K. and Kanwar S.S. (2012). *Synthesis of methyl cinnamate using immobilized lipase from B. licheniformis*. Vol. 1(3), Hlm 68-71
- Dae-Seop Shin, Jiin Kim, Dong Cho Han, Kwang-Hee Son, Chang Woo Lee, Hwan-Mook Kim, Su Hyung Hong dan Byoung-Mog Kwon. (2007). *Synthesis and Biological Evaluation of Cinnamyl Compounds as Potent Antitumor Agent*. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. Vol. 17 Hlm. 5423–5427

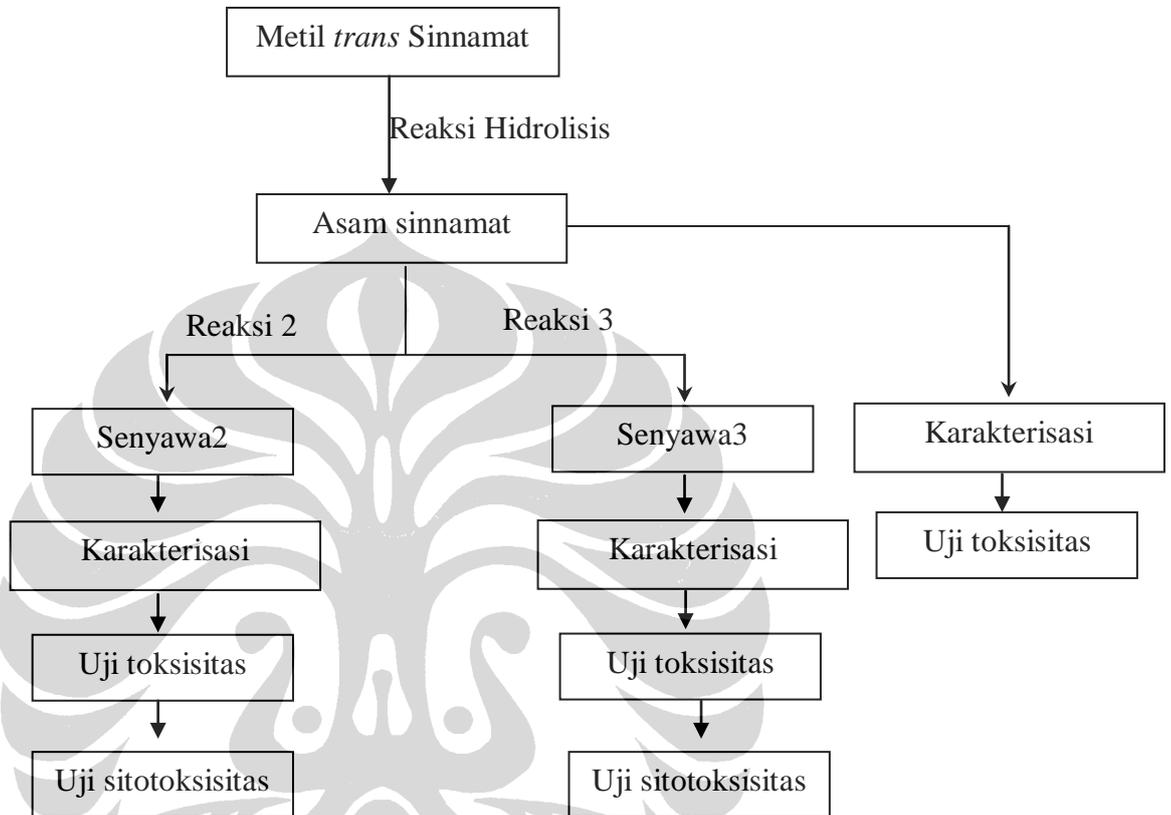
Sirichai Adisakwattana, Weerachat Sompong, Aramsri Meeprom, Sathaporn Ngamukote , dan Sirintorn Yibchok-anun. (2012). *Cinnamic Acid and Its Derivatives Inhibit Fructose-Mediated Protein Glycation*. Int. J. Mol. Sci. Vol. 13, Hlm. 1778-1789

Sirat, H.M.Basar, N. danJani, N.A.(2011). *Chemical Compositions of the Rhizome Oils of Two Alpinia species of Malaysia*. Nat. Prod. Res. Vol 25. Hlm 982-986



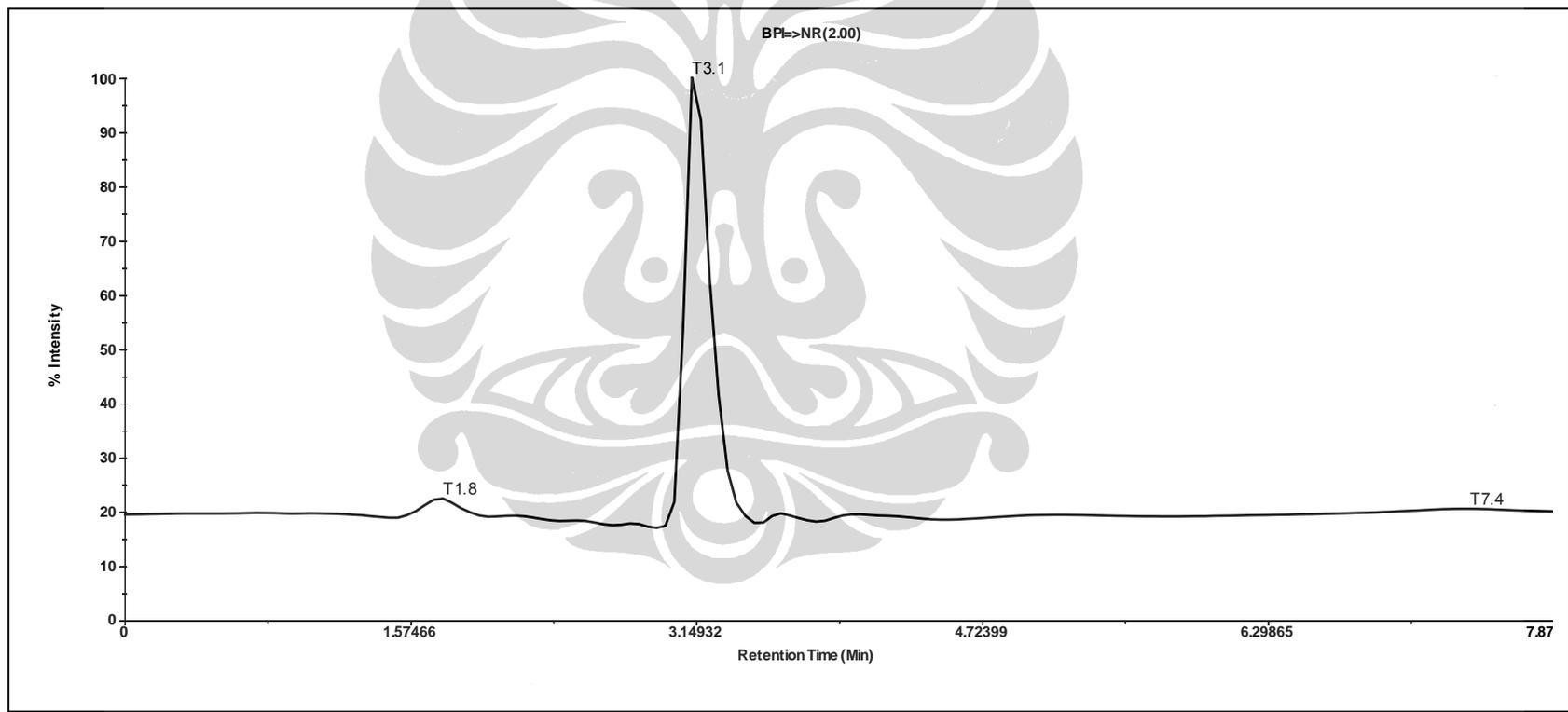
LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja Penelitian

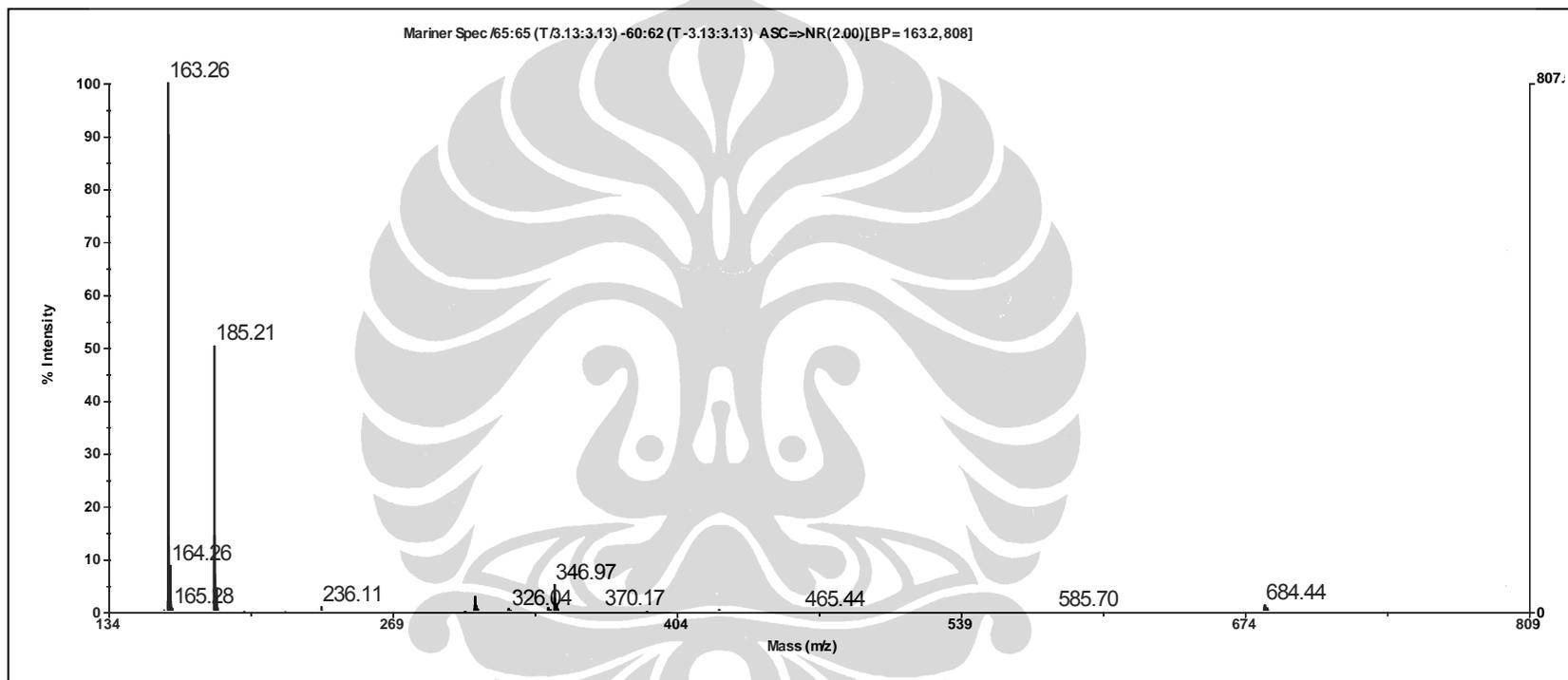


Lampiran 2. Kromatogram LC-MS Metil Sinamat

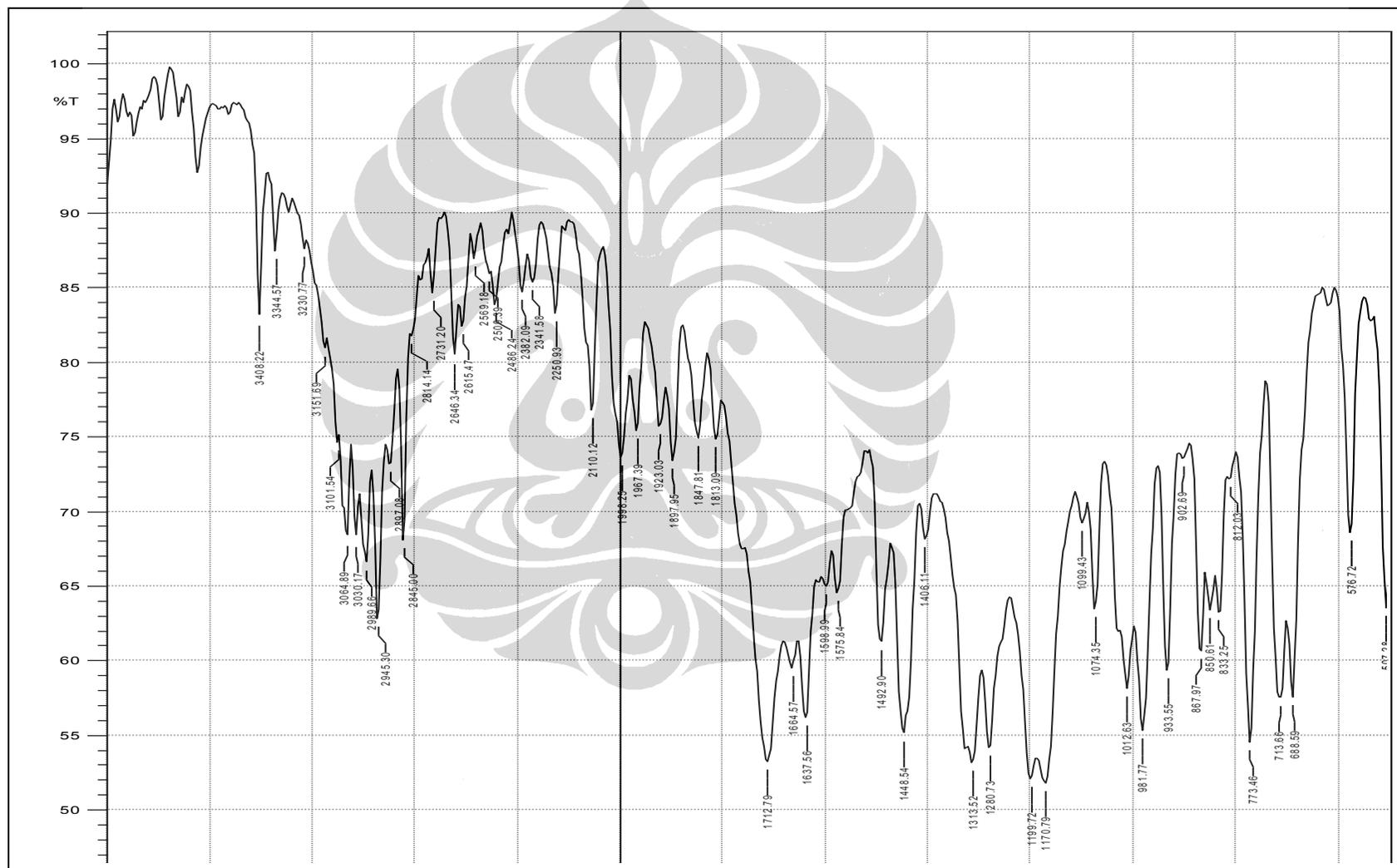
Dwi K3 LC MS –ESI pos ion
Vol injection 20 ul
Flow 1 ml/min
Eluent Methanol+Water = 90+10



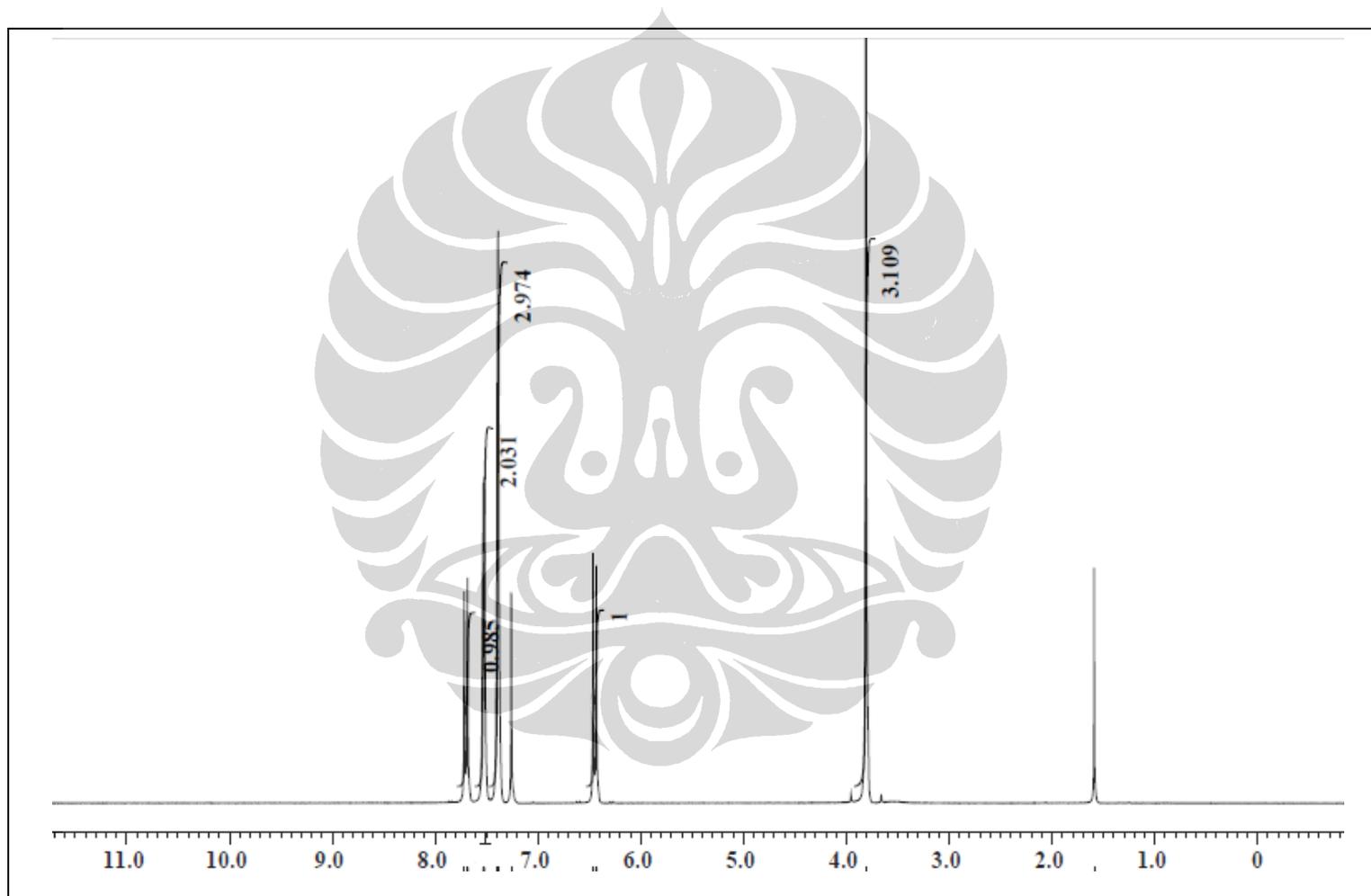
Lampiran 3. Spektrum LC-MS Metil Sinamat



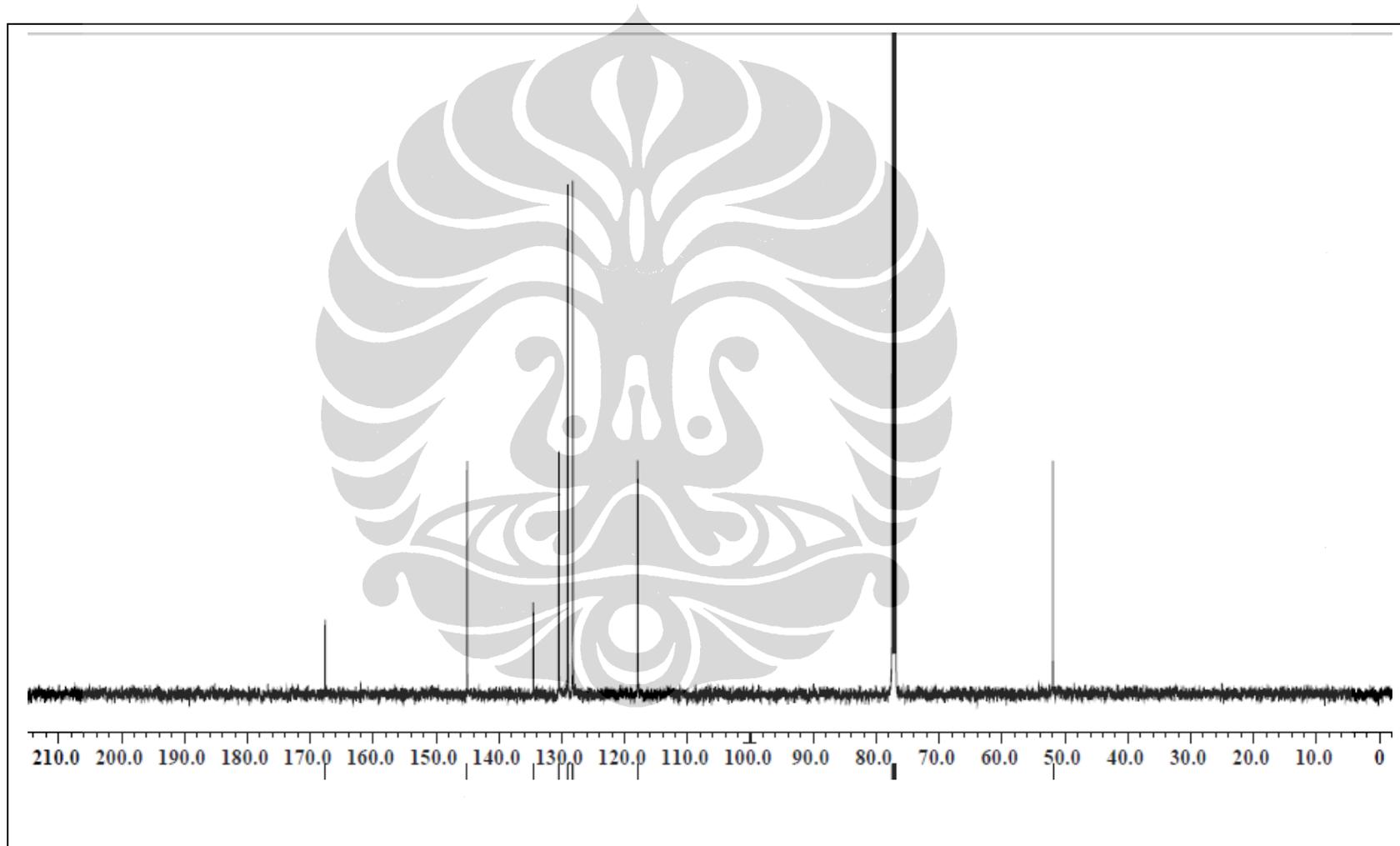
Lampiran 4. Spektrum FT-IR Metil Sinamat



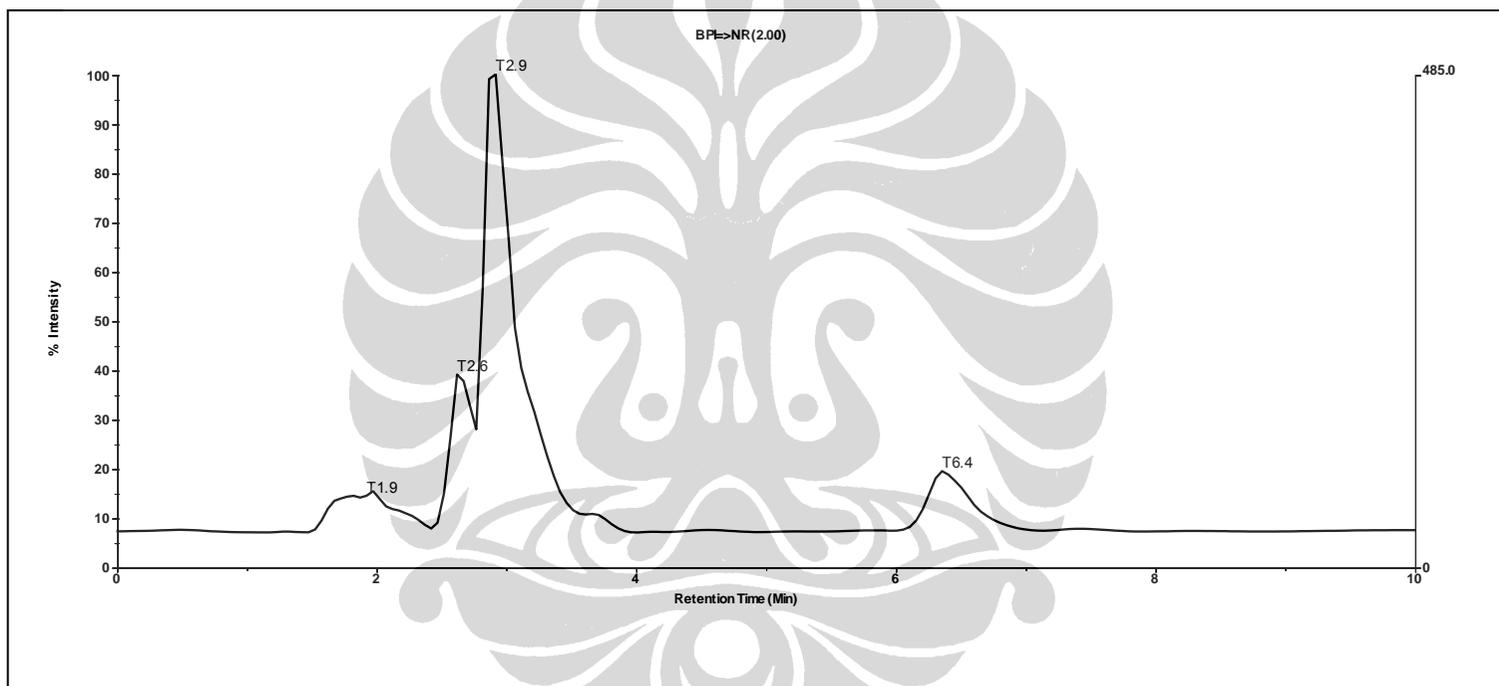
Lampiran 5. Spektrum ¹H NMR Metil Sinamat (500 MHz, CDCl₃)



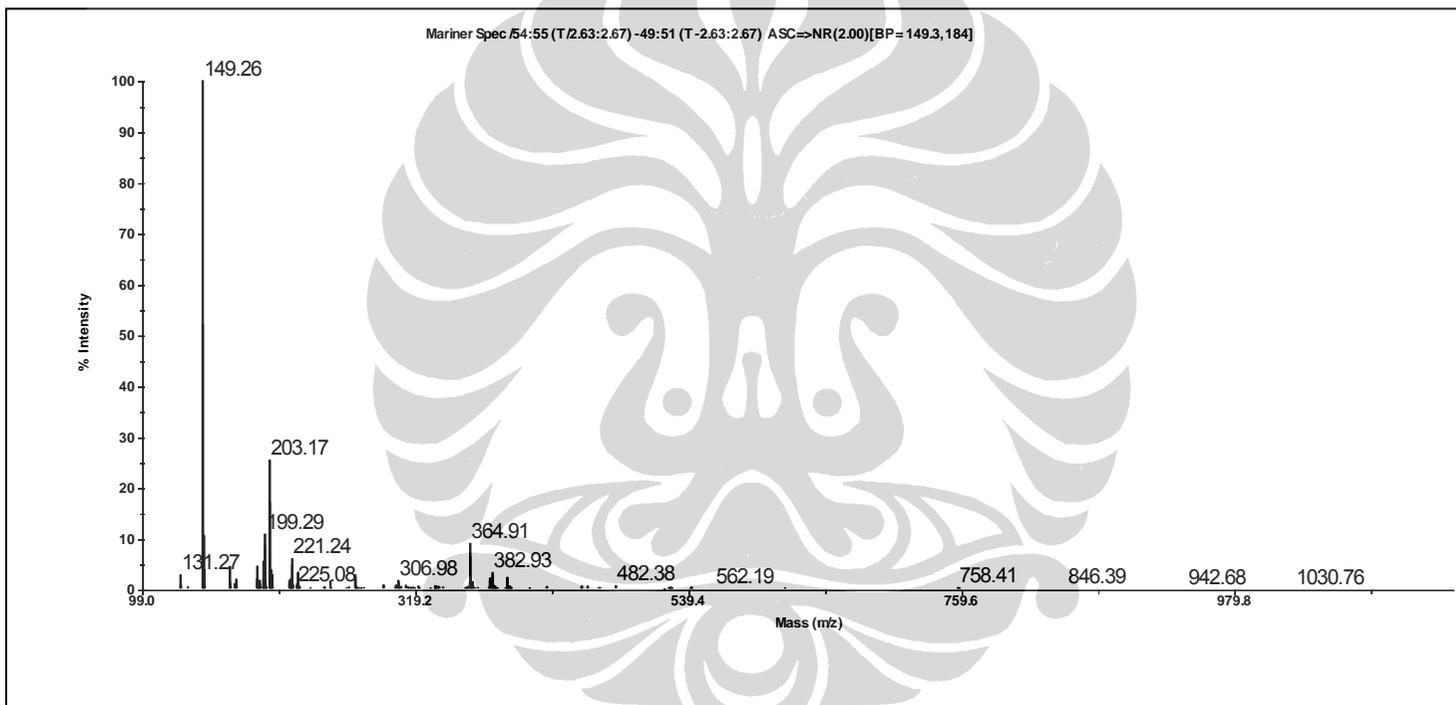
Lampiran 6. Spektrum ^{13}C NMR Metil Sinamat (125 MHz, CDCl_3)



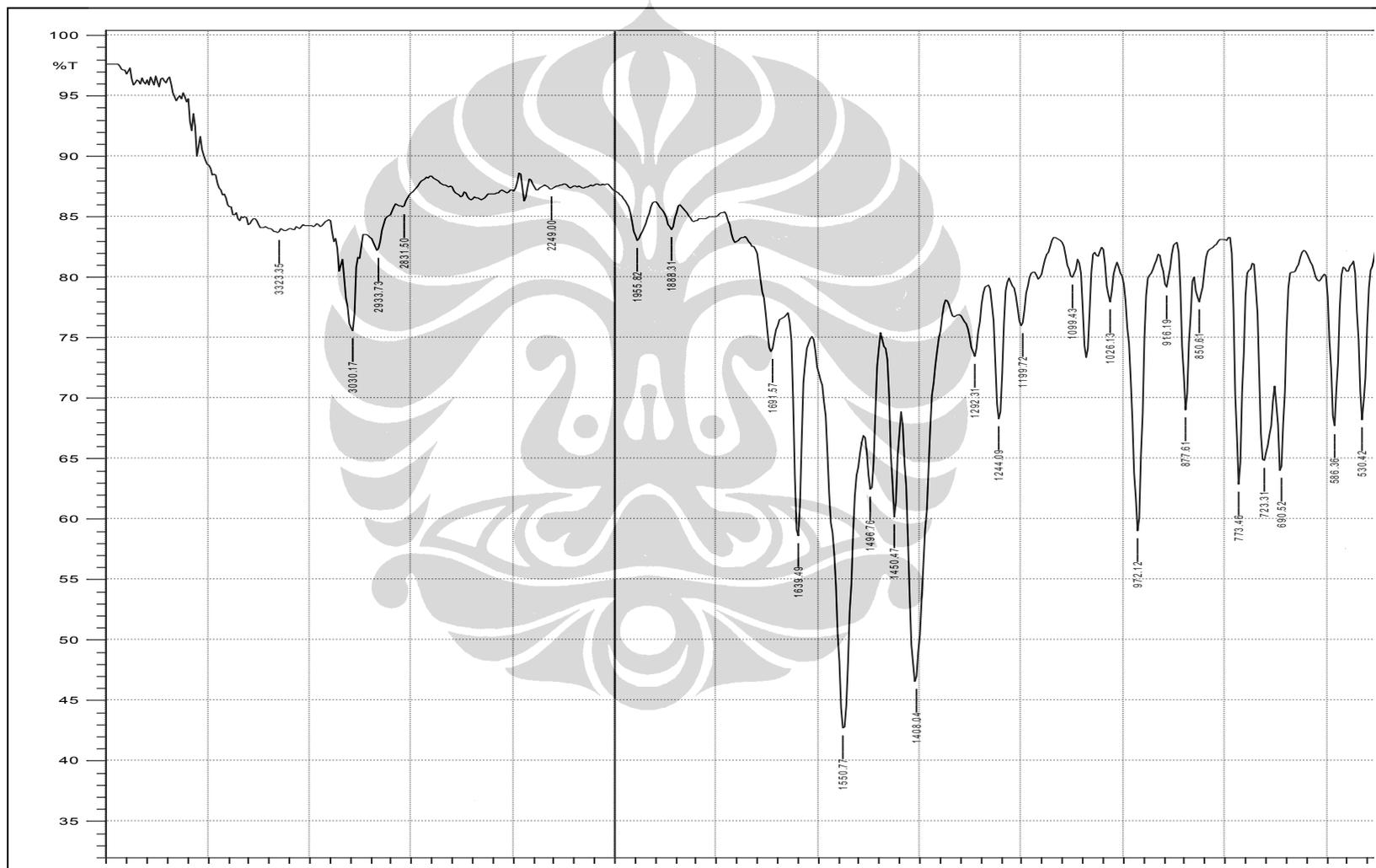
Lampiran 7. Kromatogram LC Asam Sinamat



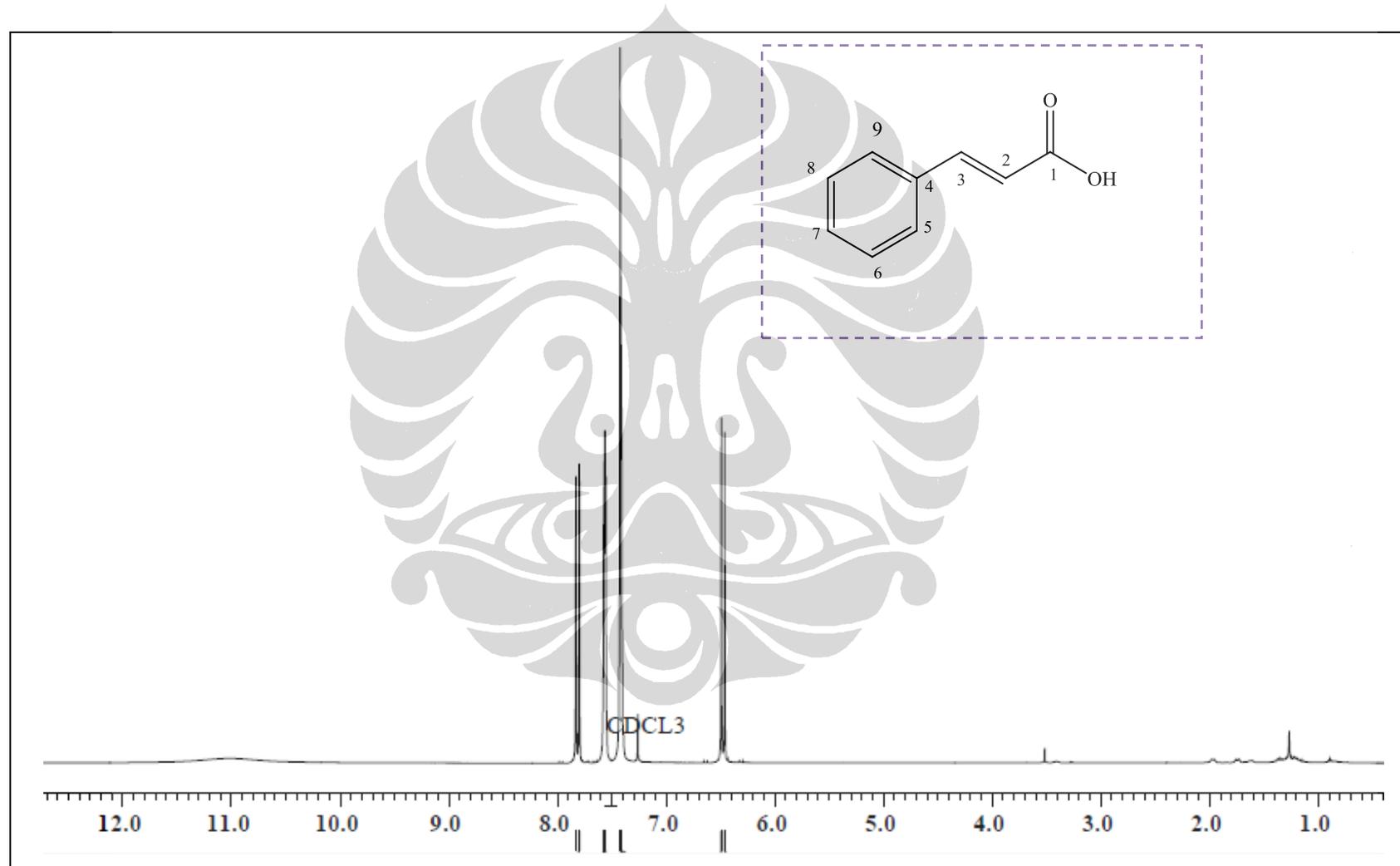
Lampiran 8. Spektrum LC-MS Asam Sinamat



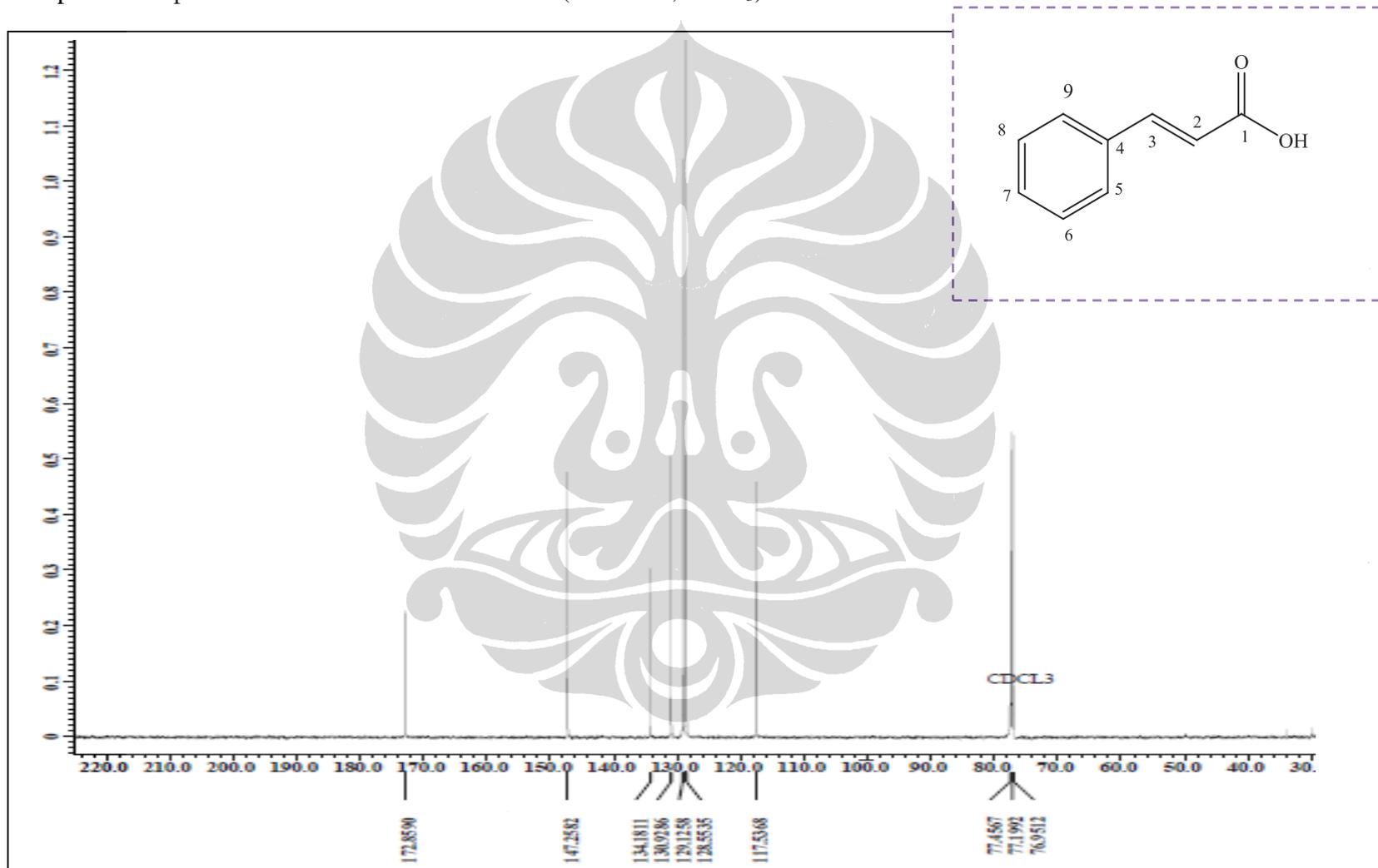
Lampiran 9. Spektrum FT-IR Asam Sinamat



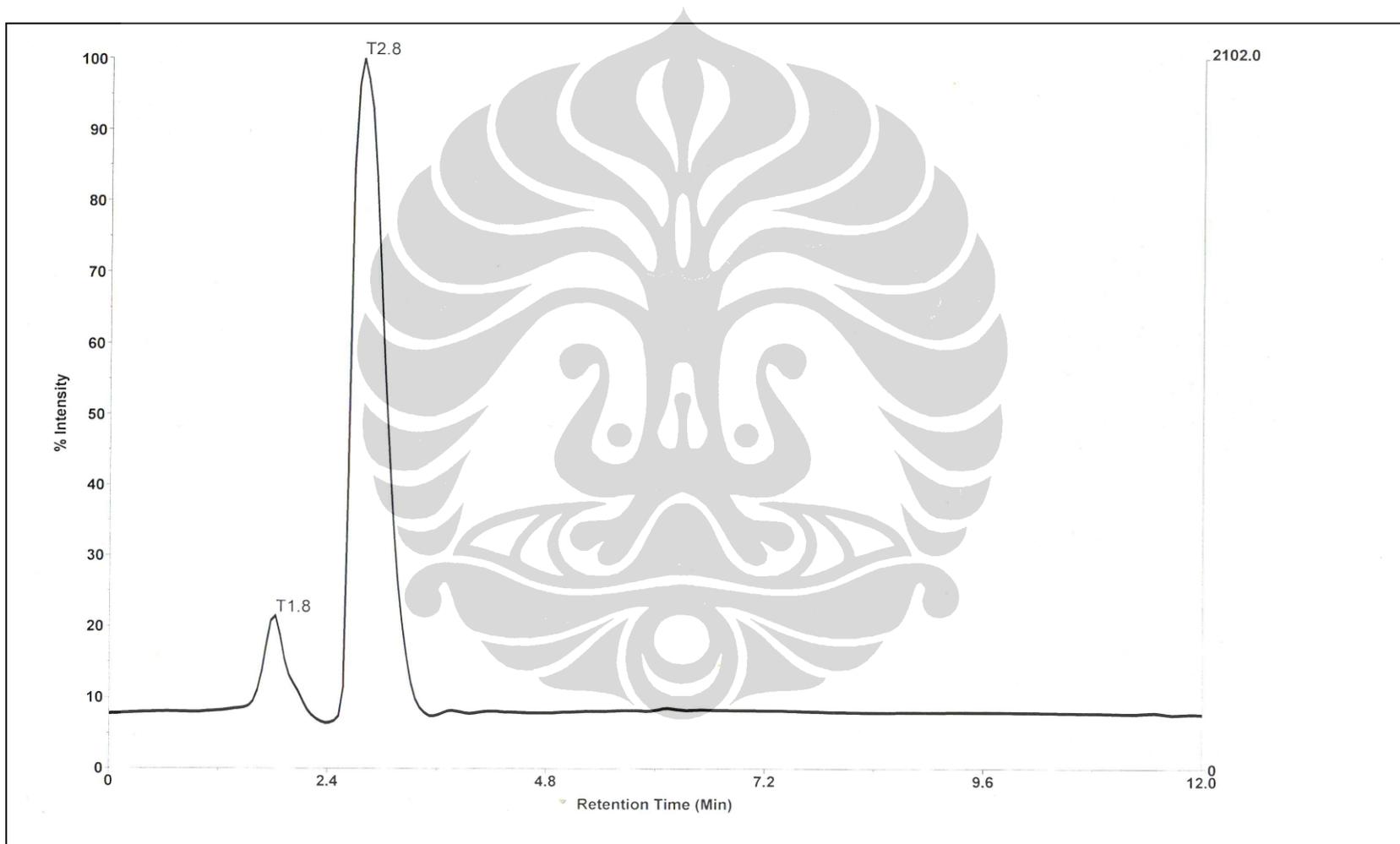
Lampiran 10. Spektrum ^1H NMR Asam Sinamat (500 MHz, CDCl_3)



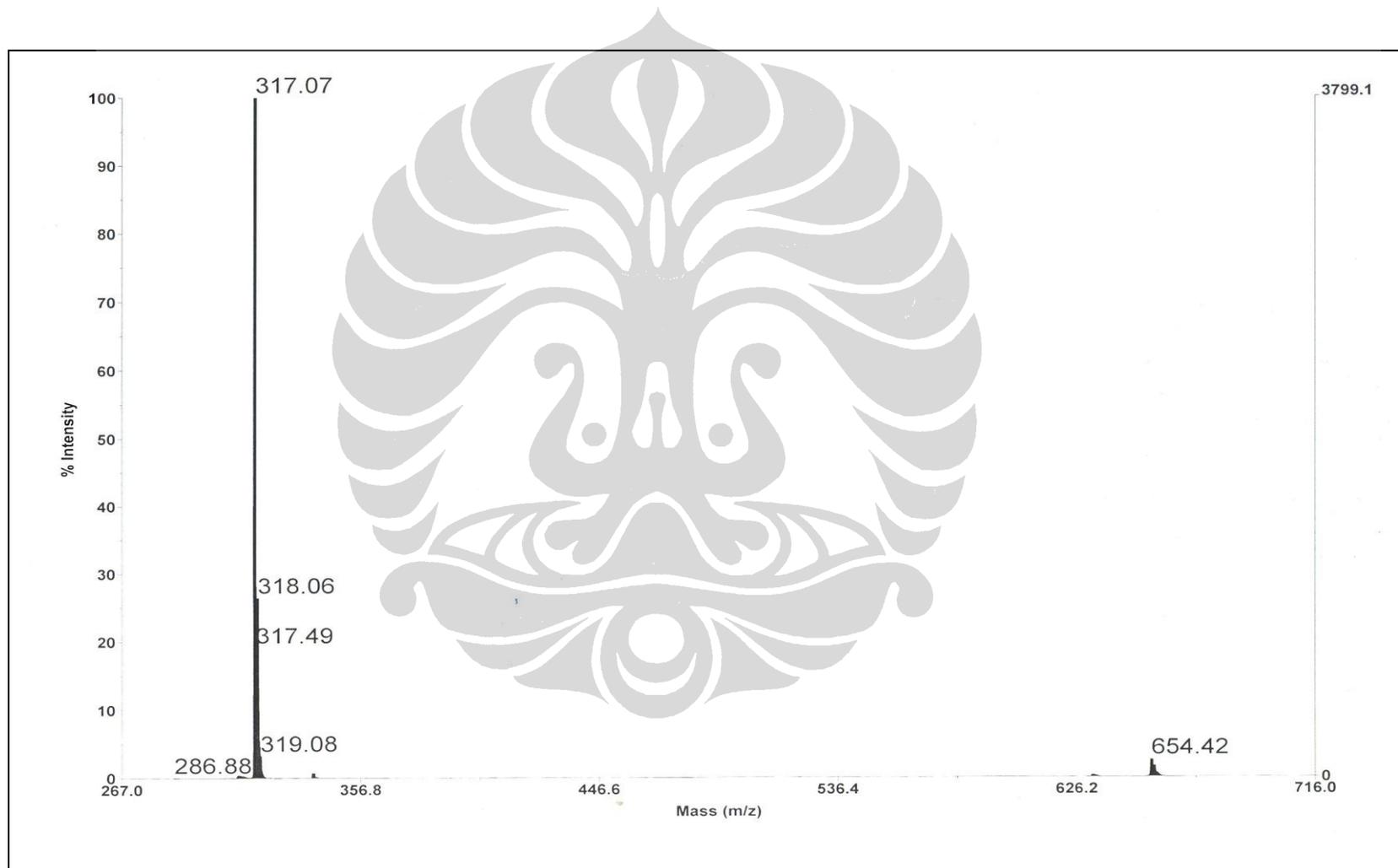
Lampiran 11. Spektrum ^{13}C NMR Asam Sinamat (125 MHz, CDCl_3)



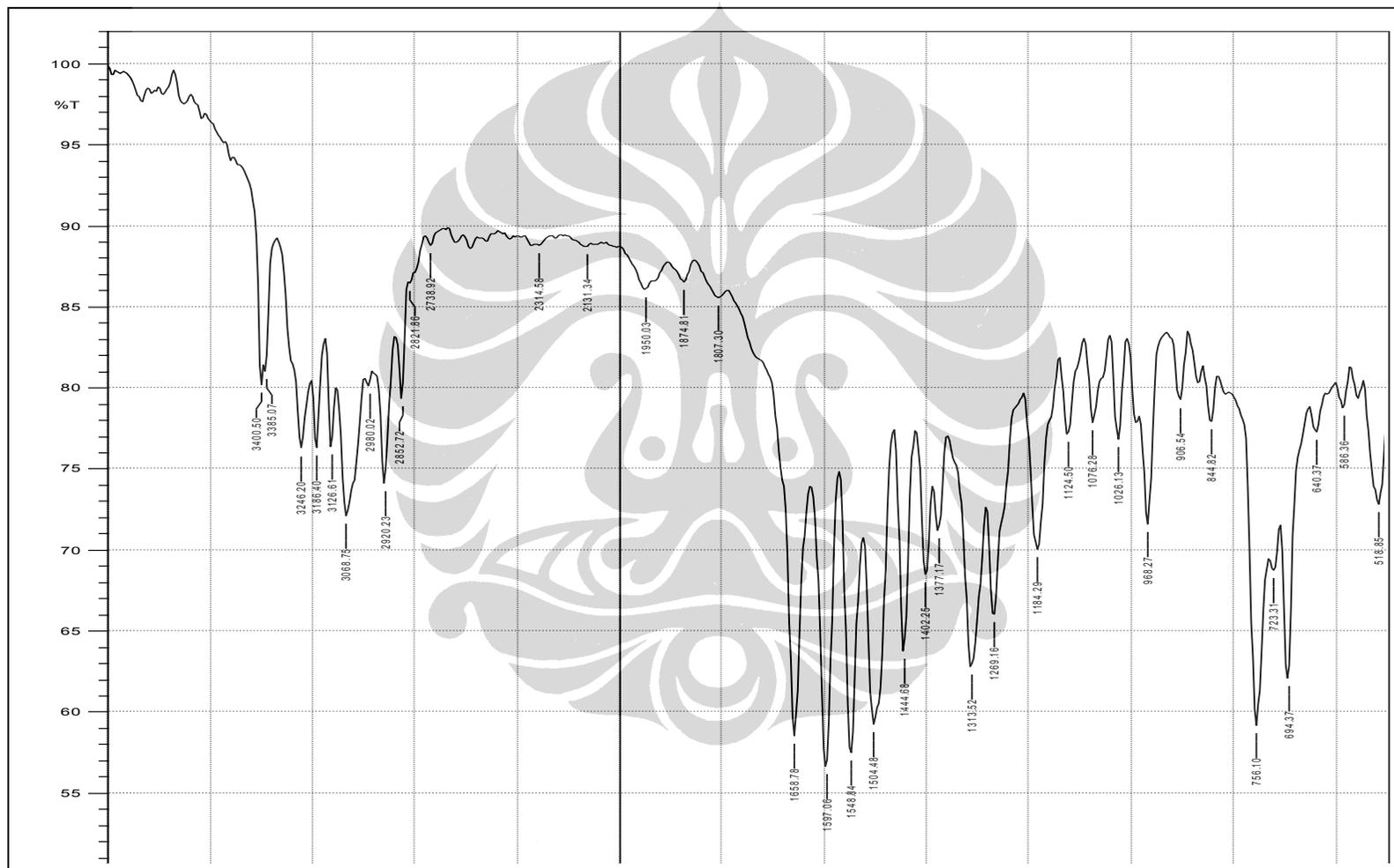
Lampiran 12. Kromatogram LC Senyawa2



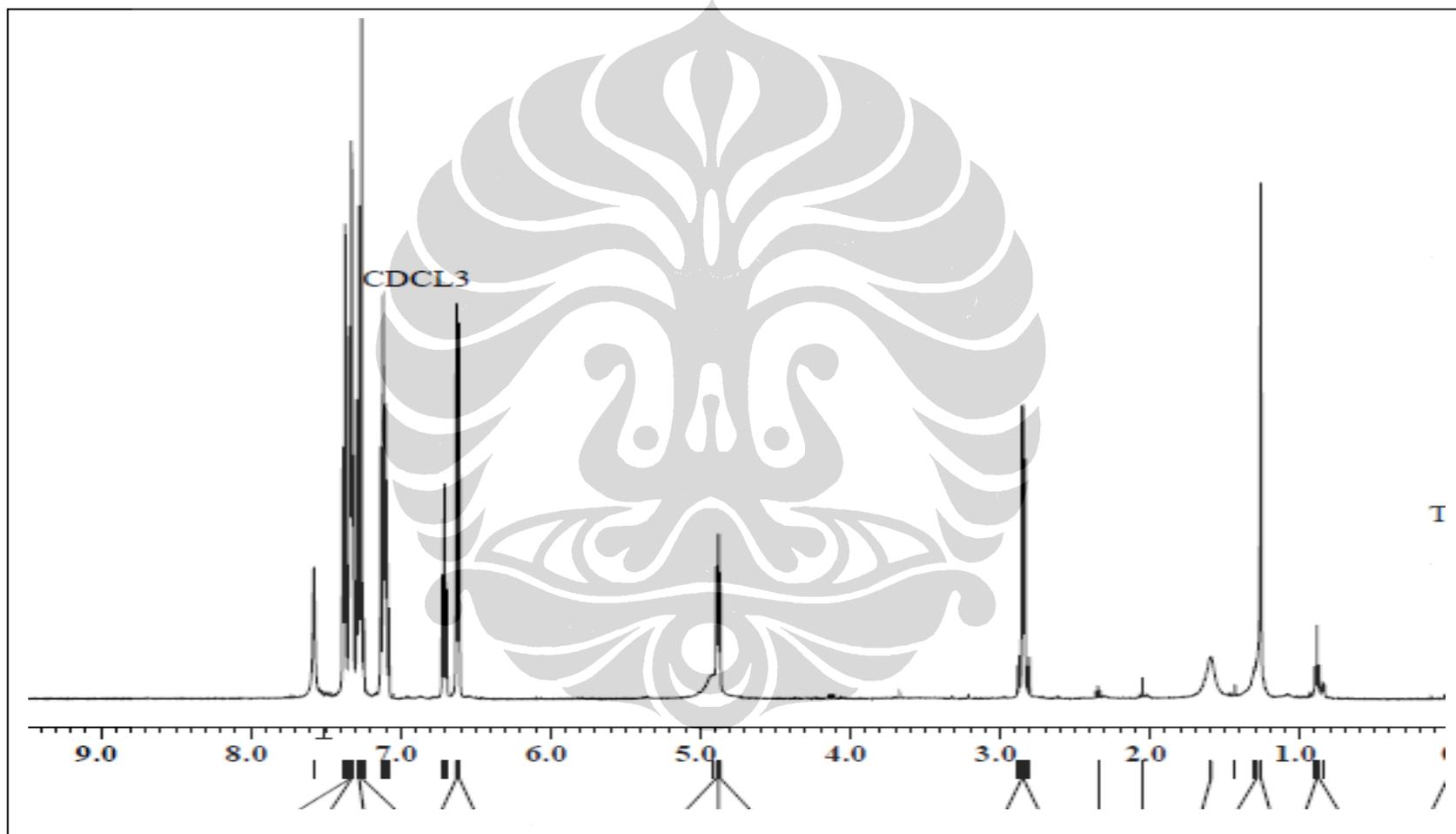
Lampiran 13. Spektrum LC-MS Senyawa2



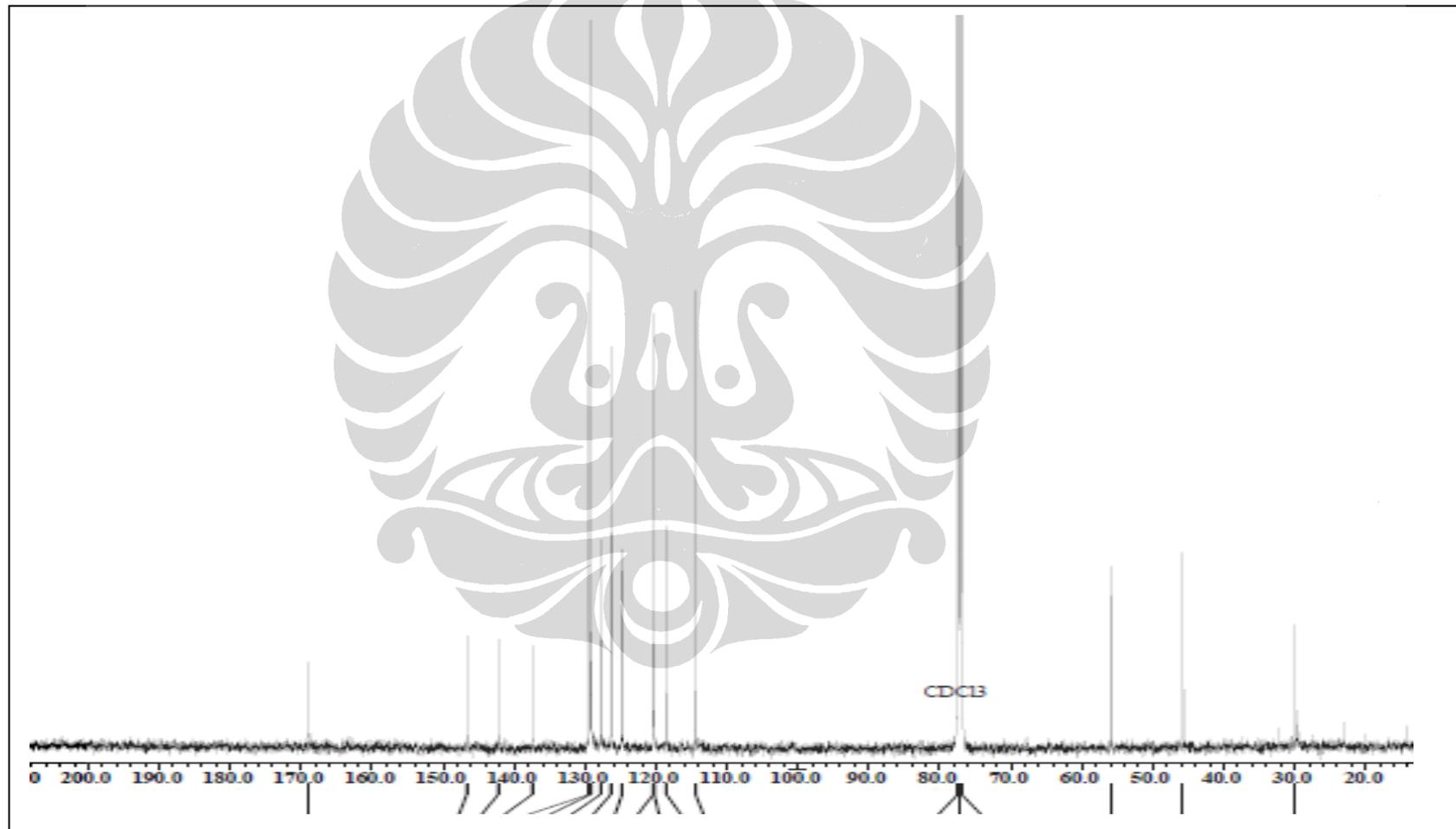
Lampiran 14. Spektrum FT-IR Senyawa2



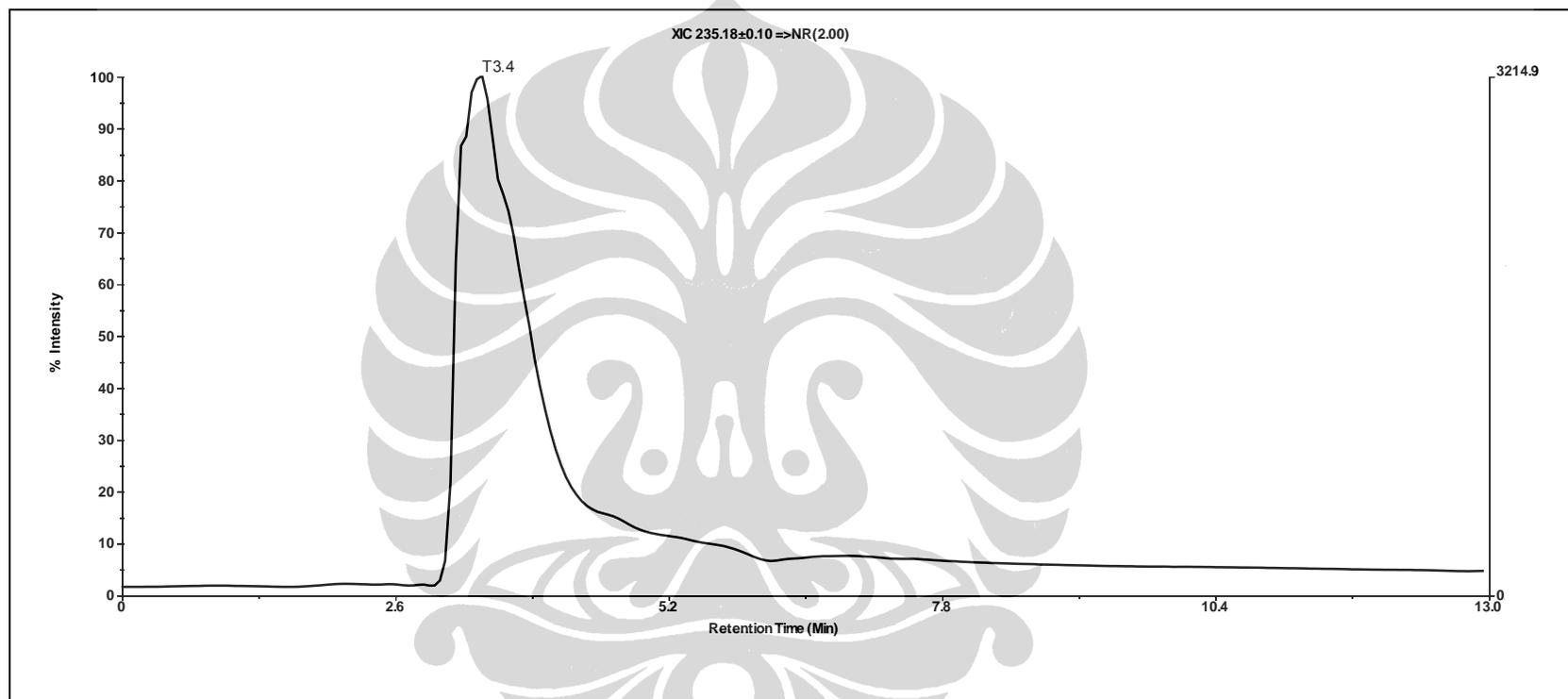
Lampiran 15. Spektrum ^1H NMR Senyawa2 (500 MHz, CDCl_3)



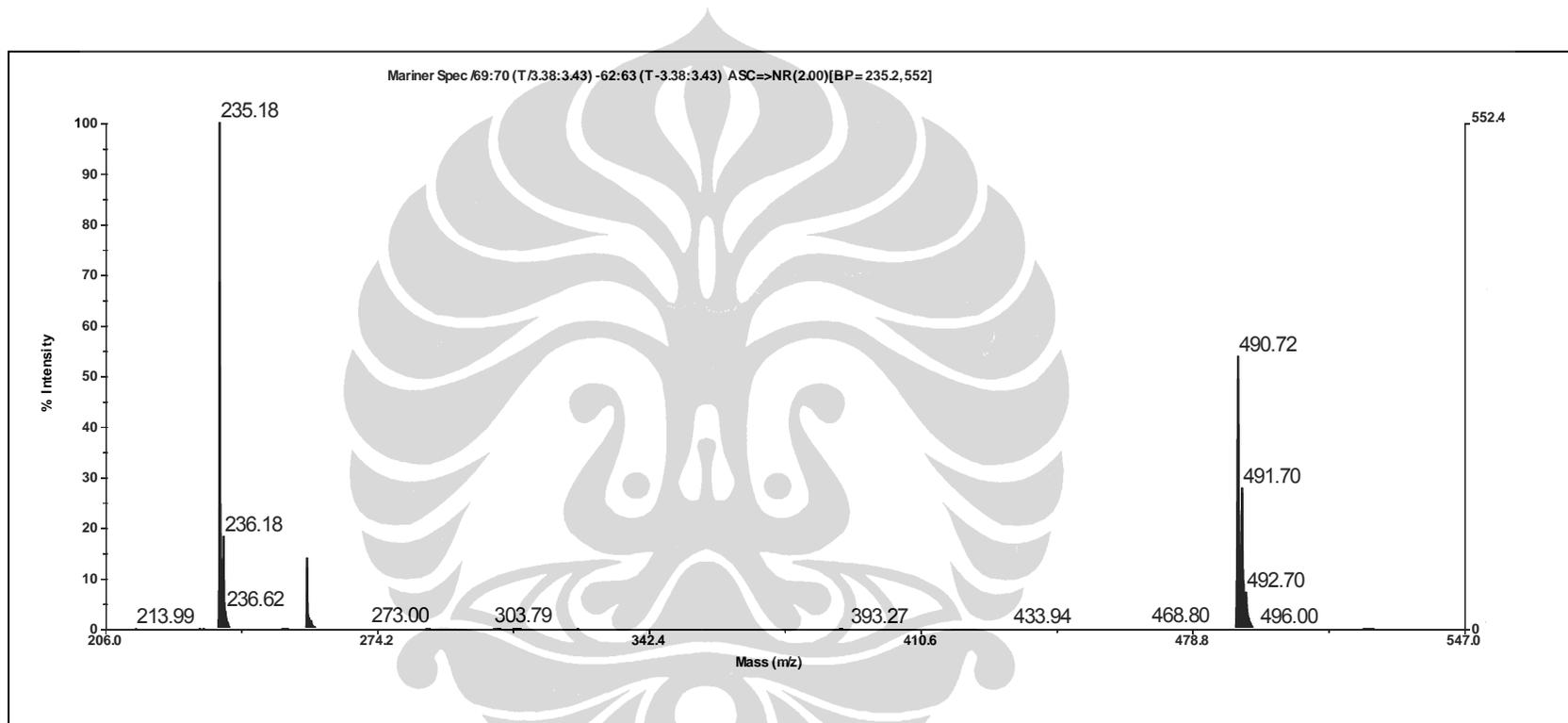
Lampiran 16. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa2 (125 MHz, CDCl_3)



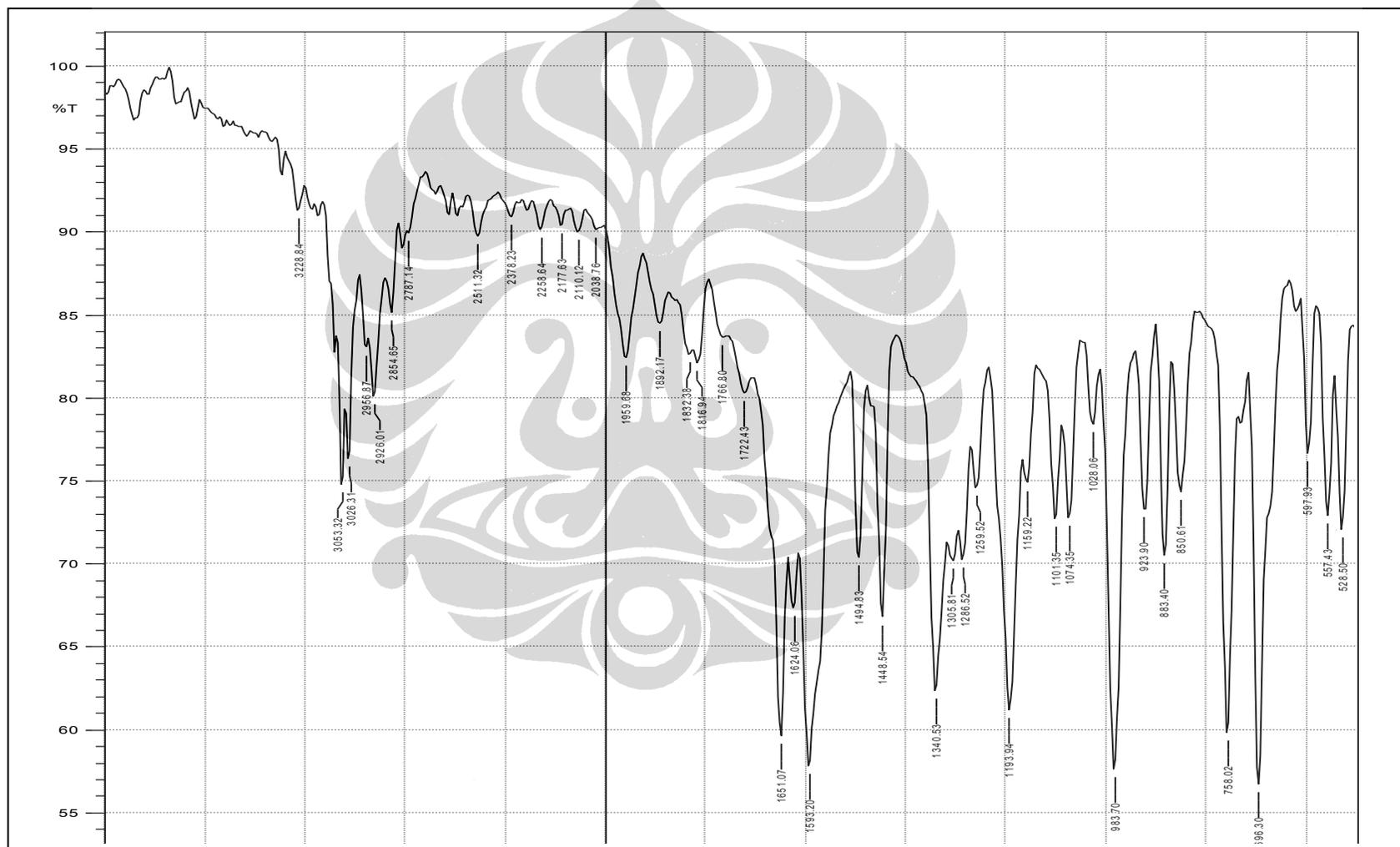
Lampiran 17. Kromatogram LC-MS Senyawa 3



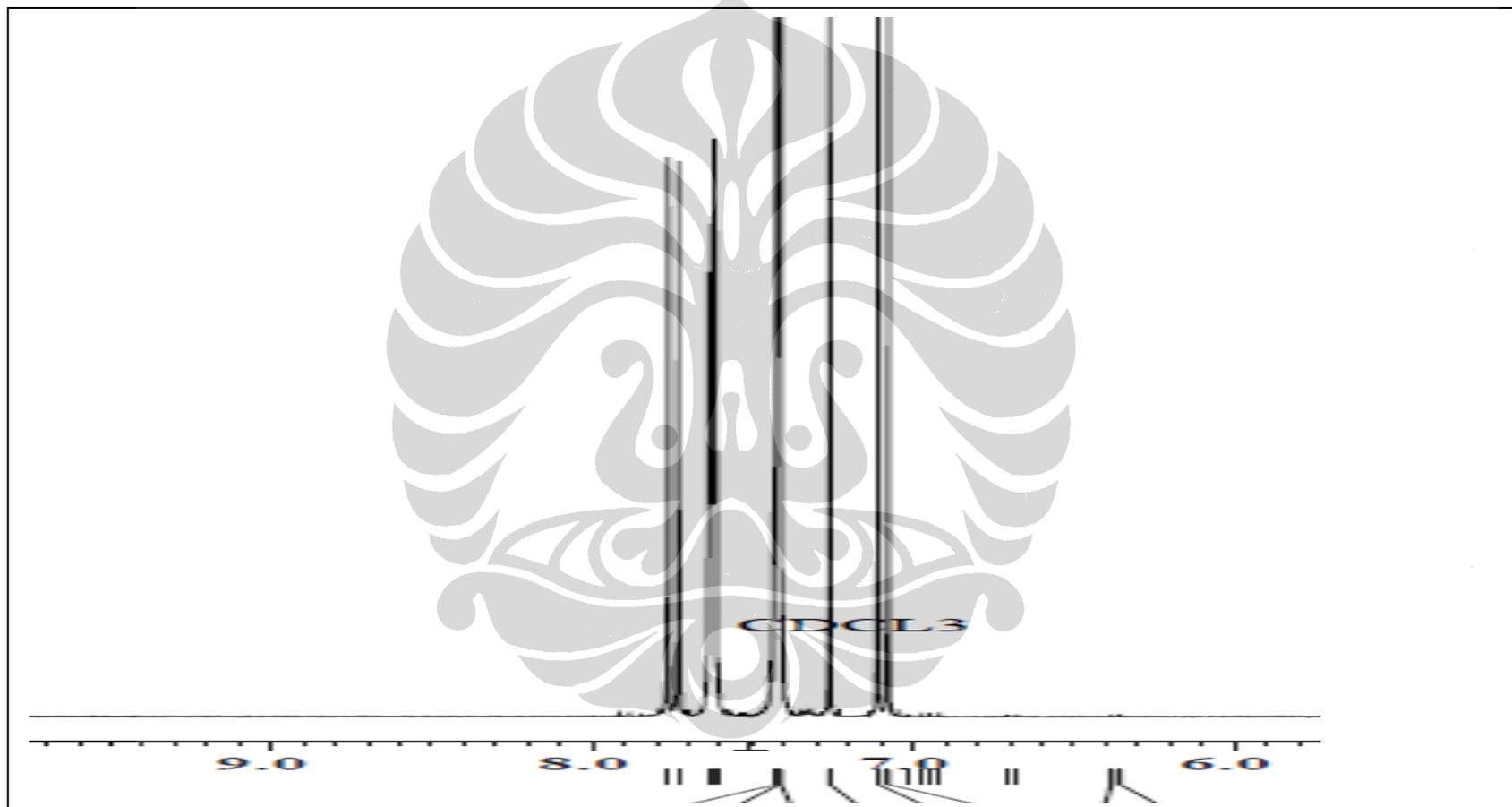
Lampiran 18. Spektrum LC-MS Senyawa3



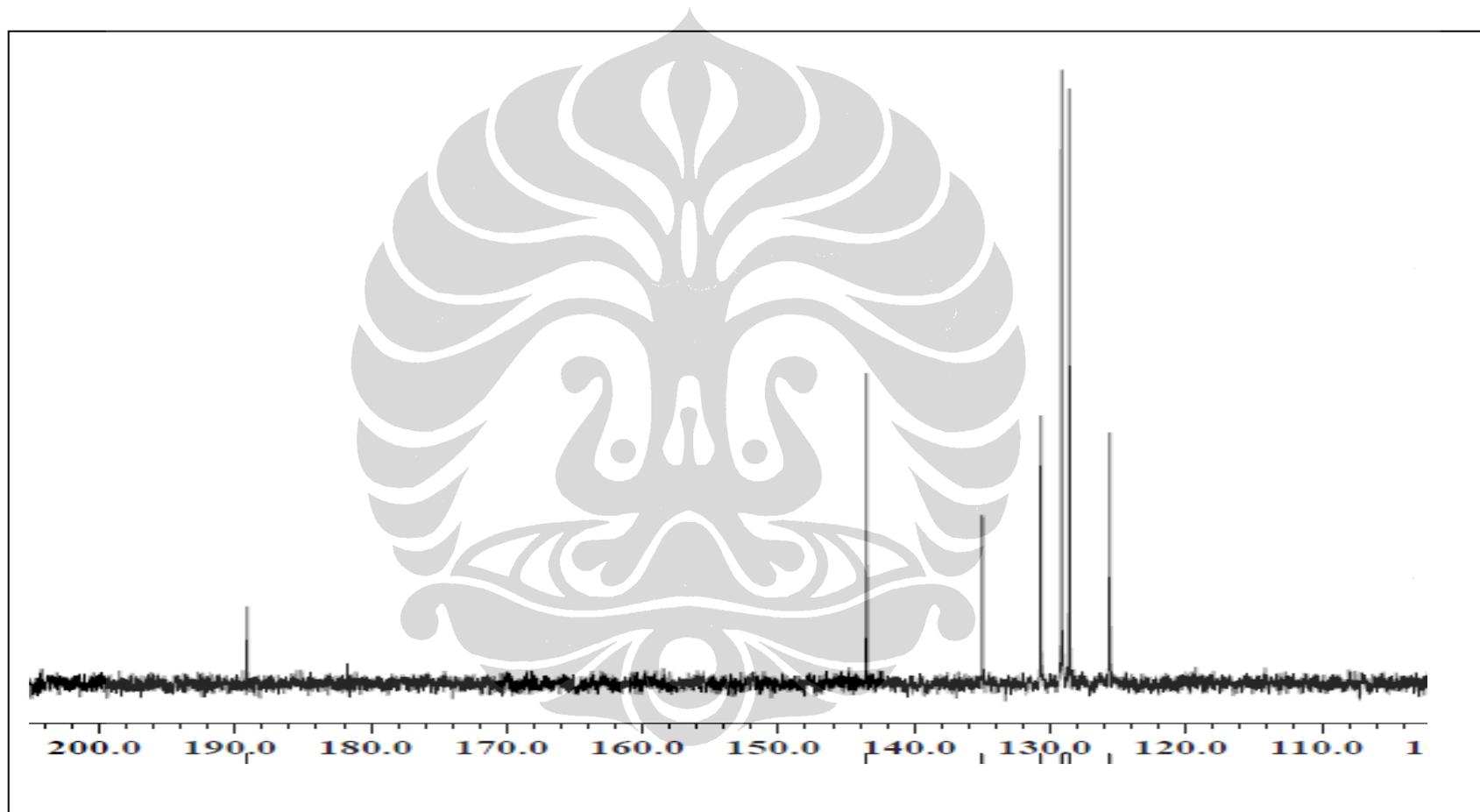
Lampiran 19. Spektrum FT-IR Senyawa3



Lampiran 20. Spektrum ^1H NMR Senyawa3 (500 MHz, CDCl_3)



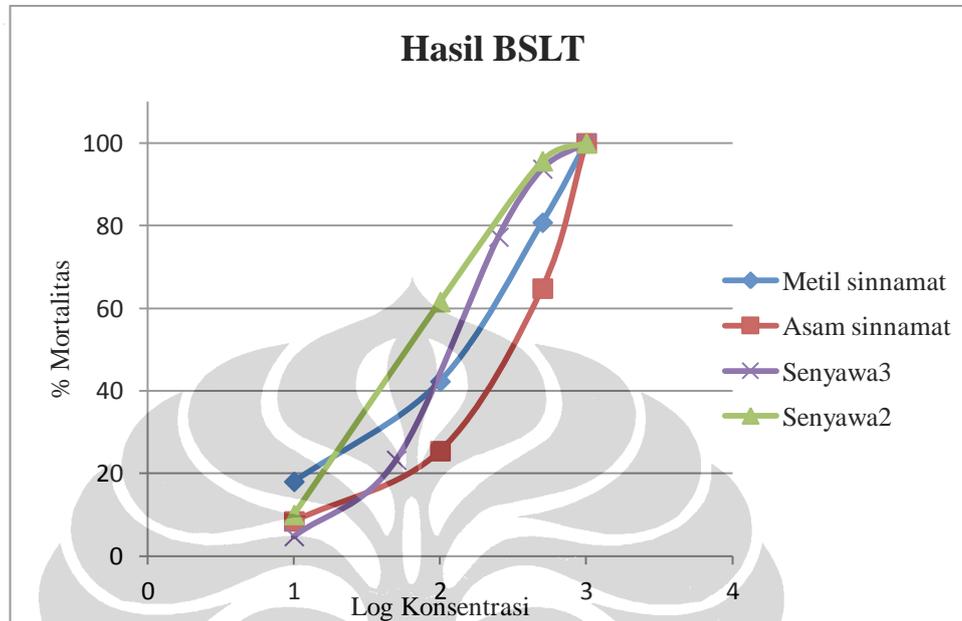
Lampiran 21. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa3 (125 MHz, CDCl_3)



Lampiran 22. Hasil Uji BSLT

Nomor	Nama senyawa	C, ppm	Log K	Mortalitas	LC ₅₀
1	Metil Sinnamat	10	1	18,033	144,21
		100	2	42,308	
		500	2.7	80,769	
		1000	3	100,000	
2	Asam Sinnamat	10	1	8,451	169,82
		100	2	25,455	
		500	2.7	64,815	
		1000	3	100,000	
3	Senyawa2	10	1	10.00	65,17
		100	2	61.54	
		500	2.7	95.65	
		1000	3	100.00	
4	Senyawa 3	10	1	4,762	93,95
		50	1,7	23,256	
		250	2,4	77,273	
		500	2,7	93,750	

Dari tabel data hasil uji BSLT, dibuat grafik antara % mortalitas dengan log konsentrasi



Dari masing-masing grafik, dicari persamaan garis lurusnya dan nilai Rnya.

Nama senyawa	Persamaan	R
Metil sinamat	$y = 28,436x - 10,813$	0,9849
Asam sinamat	$y = 31,401x - 28,822$	0,9767
Senyawa 2	$y = 46,546x - 34,439$	0,9886
senyawa 3	$y = 52,431x - 53,442$	0,9653

Menghitung LC_{50} dengan cara memasukkan nilai $y=50$ dan dicari nilai x -nya

Contoh :

Senyawa2 memiliki persamaan linear $y = 46,546x - 34,439$

Jika $y = 50$ maka

$$x = \frac{50 + 34,439}{46,546}$$

$$x = 1,814 \quad \rightarrow \quad LC_{50} = 10^x \\ = 65,17 \text{ ppm}$$

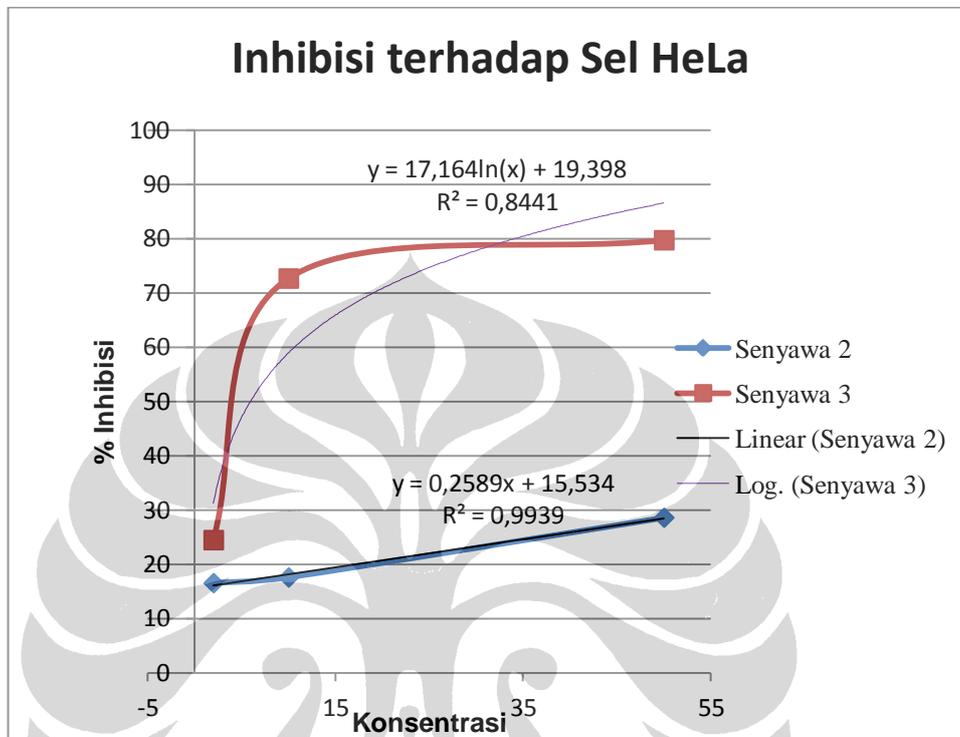
Lampiran 23. Hasil Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT

Sampel	Konsentrasi Ekstraks (ppm)	Ulangan			Rataan	%inhibisi
		OD1	OD2	OD3		
Senyawa 2	50	0,154	0,125	0,136	0,138	28,57
	10	0,172	0,14	0,167	0,160	17,56
	1	0,165	0,172	0,148	0,162	16,52
Senyawa 3	50	0,052	0,046	0,02	0,039	79,69
	10	0,063	0,046	0,05	0,053	72,63
	1	0,146	0,164	0,129	0,146	24,44
	Cell control	0,183	0,196	0,202	0,194	0,00



Lampiran 24. Penghitungan IC₅₀

Perhitungan IC₅₀ laju inhibisi senyawa turunan metil sinamat terhadap sel HeLa



Dari grafik persamaan untuk senyawa 2 dan Senyawa3 dapat diketahui

1. Senyawa 2

$$y = 0,2589x + 15,534$$

Jika $y = 50$

Maka

$$x = \frac{50 - 15,534}{0,2589}$$
$$= 133,1248$$

Jadi IC₅₀ senyawa 2 adalah 133,12 ppm

2. Senyawa 3

$$y = 17,164 \ln(x) + 19,398$$

Jika $y = 50$

Maka

$$x = e^{(50 - 19,398)/17,164}$$
$$= e^{0,77}$$
$$= 5,94 \text{ ppm}$$

Lampiran 25. Penghitungan Rendemen

Perhitungan Rendemen Hasil Reaksi

1. Hidrolisis Asam Sinamat

Metil sinamat

$$m = 20 \text{ gram}$$

$$Mr = 162 \text{ gram / mol}$$

$$\text{jumlah metil sinamat yang direaksikan } 20/162 = 0,1234 \text{ mol}$$

Berat asam sinamat yang dihasilkan = 12,87 gram

$$Mr \text{ asam sinamat} = 148 \text{ gram/mol}$$

$$\text{Jumlah asam sinamat hasil reaksi } 12,87/148 = 0,0869 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen asam sinamat} &= 0,0869/0,1234 \times 100\% \\ &= 70\% \end{aligned}$$

2. Sintesis senyawa 2

Asam sinamat

$$m = 1 \text{ gram}$$

$$Mr = 148 \text{ gram/mol}$$

$$\text{jumlah yang direaksikan } 1/148 = 0,00675 \text{ mol}$$

Senyawa yang dihasilkan 123 mg

$$Mr = 316$$

$$\text{Jumlah hasil } 0,123/316 = 0,000389$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen senyawa 2} &= 0,000389/0,00675 \times 100\% \\ &= 5,766\% \end{aligned}$$

3. Sintesis Senyawa3

2mol asam sinamat → 1mol dimer asam sinamat

Asam sinamat

$$m = 1 \text{ gram}$$

$$Mr = 148 \text{ gram/mol}$$

$$\text{jumlah yang direaksikan } 1/148 = 0,00675 \text{ mol}$$

Senyawa yang dihasilkan 62 mg

$$Mr = 234$$

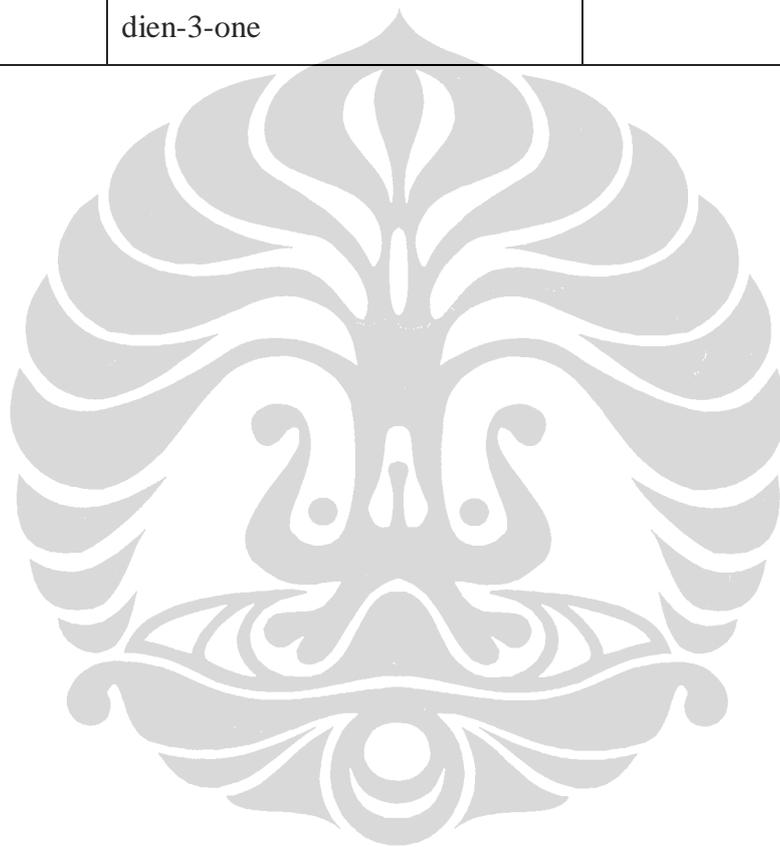
Jumlah hasil $0,062/234 = 0,00026$ mol

$$\begin{aligned}\text{Rendemen Senyawa3} &= (0,00026) \times \frac{2}{0,00675} \times 100\% \\ &= 7,8 \%\end{aligned}$$

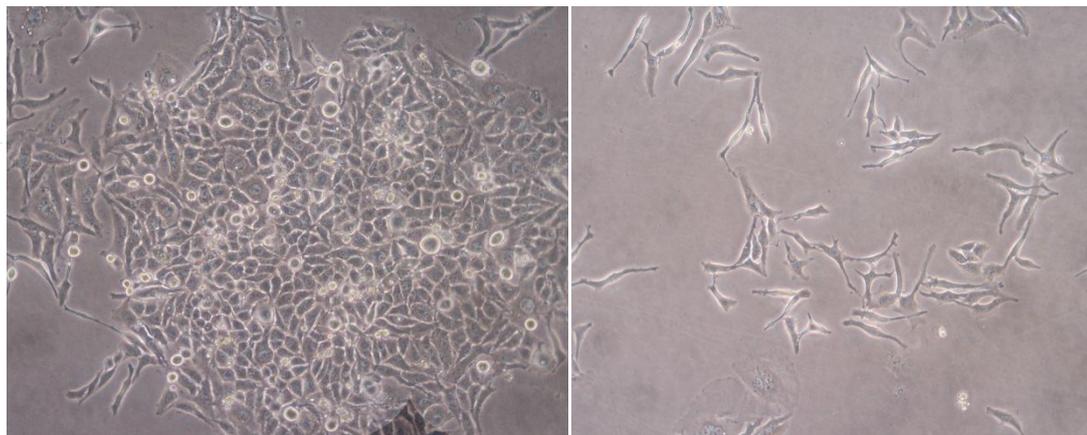


Lampiran 26. Hasil Pengukuran Titik Leleh

Nomor	Nama Sennyawa	Titik Leleh baku	Titik leleh real
1	Metil Sinnamat	33°C	33 °C
2	Asam Sinnamat	132-134 °C	132-134 °C
3	N,3-diphenyl-3-(phenylamino)propanamide	141-142 °C	141-142 °C
4	(1E,4E)-1,5-diphenylpenta-1,4-dien-3-one	108-109 °C	108-109 °C

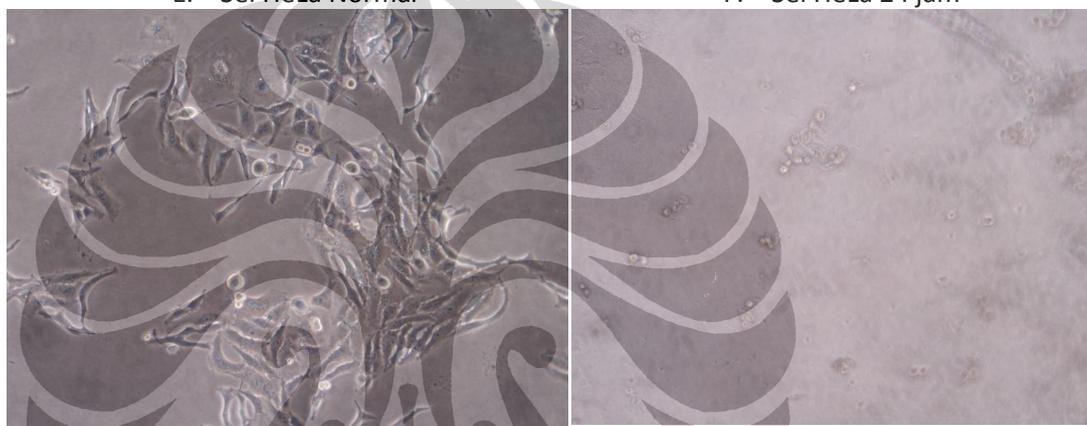


Lampiran 27. Sel HeLa dalam Variasi Persen Inhibisi



E. Sel HeLa Normal

F. Sel HeLa 24 jam



G. Sel HeLa dengan 10% Inhibisi

H. Sel HeLa dengan Inhibisi di atas 50%