

Synthesis of Ethyl 4-(3,5-dimethyl-4-phenoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate and Cytotoxic Activity Test Against T47D Cells

Sintesis Etil 4-(3,5-dimetil-4-fenoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-Karboksilat dan Uji Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel T47D

Fariha Mufidah Maulina ^a, Ahmad Fauzi ^{a*}, Muhammad Reza Ramadhan ^a, Wafiq Kholifatul Hakimah ^a

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia.

*Corresponding Authors: af585@ums.ac.id

Abstract

Cancer is one of the biggest health problems in the world, including in Indonesia. Previous studies have found that DHPM compounds have various pharmacological activities such as anticancer, antifungal, antibacterial, antituberculosis, and antioxidant. Based on this potential, it is interesting to conduct further research with the aim of synthesizing and developing new Dihydropyrimidinone (DHPM) compound derivatives that have potential as anticancer. The synthesis of DHPM derivatives was carried out to obtain ethyl 4-(4-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (M1). Then the compound was developed by Mitsunobu reaction using a sonicator to obtain a new compound ethyl 4-(3,5-dimethyl-4-phenoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (C2) which will be tested for cytotoxic activity against T47D cancer cells. Characterization of the compound was done using FT-IR, LC-MS, and melting point. Cytotoxic test against T47D cells as anticancer agent using MTT method [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] assay. The test results of compound C2 had cytotoxic activity with IC₅₀ of 202.22 µg/mL. The results showed that compound C2 has cytotoxic activity but it is mild because the IC₅₀ produced is high. These findings suggest that compound C2 has anticancer potential, but further structure optimization is needed to increase its effectiveness.

Keywords: DHPM, Mitsunobu, Cytotoxic, MTT assay, T47D

Abstrak

Kanker menjadi salah satu masalah terbesar kesehatan di dunia termasuk di Indonesia. Penelitian terdahulu telah menemukan jika senyawa DHPM memiliki berbagai aktivitas farmakologi seperti antikanker, antijamur, antibakteri, antituberkulosis, dan antioksidan. Berdasarkan potensi tersebut, menarik untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan tujuan melakukan sintesis dan mengembangkan turunan senyawa Dihidropirimidinon (DHPM) baru yang berpotensi sebagai antikanker. Sintesis senyawa turunan DHPM dilakukan untuk mendapatkan senyawa etil 4-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (M1). Kemudian senyawa dikembangkan dengan reaksi Mitsunobu menggunakan sonikator untuk mendapatkan senyawa baru etil 4-(3,5-dimetil-4-fenoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (C2) yang akan diuji aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D. Karakterisasi senyawa dilakukan menggunakan FT-IR, LC-MS, dan melting point. Uji sitotoksik terhadap sel T47D sebagai agen antikanker menggunakan metode MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida] assay. Hasil pengujian senyawa C2 memiliki aktivitas sitotoksik dengan IC₅₀ sebesar 202,22 µg/mL. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa C2 memiliki aktivitas sitotoksik namun sifatnya ringan karena IC₅₀ yang dihasilkan tergolong tinggi. Hasil temuan ini menunjukkan bahwa senyawa C2 memiliki

potensi antikanker, tetapi masih diperlukan optimalisasi struktur lebih lanjut untuk meningkatkan efektifitasnya.

Kata Kunci: DHPM, Mitsunobu, Sitotoksik, MTT assay, T47D



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Article History:

Received: 19/01/2025,
Revised: 23/04/2025,
Accepted: 25/04/2025,
Available Online : 25/04/2025,

QR access this Article



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v8i2.772>

Pendahuluan

Saat ini kanker telah menjadi masalah kesehatan utama di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Kanker yang paling banyak terdiagnosis dibandingkan kanker lainnya adalah kanker payudara, dengan 2,3 juta kasus baru dan 684.996 kematian terjadi pada wanita secara global, menurut data Globocan tahun 2020. Selain itu, data Organisasi Kesehatan Dunia menunjukkan terdapat 65.858 kasus baru kanker payudara dan 22.430 kematian baru di kalangan perempuan Indonesia pada tahun 2020 [1].

Dihidropirimidinon (DHPM) adalah senyawa heterosiklik dengan gugus pirimidin dalam inti cincinnya yang memiliki aktivitas biologis yang beragam. Sehingga, menarik perhatian para peneliti dalam beberapa dekade terakhir untuk dikembangkan lebih lanjut [2]. Senyawa turunan DHPM memiliki berbagai aktivitas farmakologi seperti antikanker, antituberculosis, antijamur, antibakteri, antifilaria, antihiperglikemik, antihipertensi, analgesik, antikonvulsan, antioksidan, anti-TRPA1 atau anti-SARS [3–5]. Pada penelitian sebelumnya, oleh Fauzi et al., [6] telah dilakukan sintesis senyawa turunan dihidropirimidinon (DHPM) menggunakan metode *Multicomponent Reaction* (MCR) dengan bahan awal 4-hidroksi-3,5-dimetilbenzaldehid, urea, dan etil asetoasetat, yang menghasilkan senyawa etil 4-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidine-5-karboksilat atau bisa disebut M1. Metode *Multicomponent Reaction* (MCR) dipilih dalam pembuatan senyawa M1 karena aplikasinya yang luas dalam penemuan dan pengembangan obat. Metode *Multicomponent Reaction* (MCR) juga memiliki beberapa keunggulan yang memungkinkan pembuatan senyawa yang lebih berkelanjutan, cepat, dan hemat biaya [7].

Senyawa M1, pada penelitian ini dikembangkan dengan melakukan reaksi mitsunobu untuk mengganti gugus OH pada senyawa M1 dengan fenol. Hal ini akan menurunkan polaritas senyawa M1 sehingga bioavailabilitas obat dalam tubuh dapat meningkat. Menurut Dzakwan & Priyanto (2019), senyawa dengan polaritas rendah dapat meningkatkan kelarutan obat dalam tubuh. Hal ini dapat meningkatkan ketersediaan hayati obat, yang memungkinkan tubuh untuk memaksimalkan bioavailabilitas obat [8].

Reaksi mitsunobu yaitu reaksi perubahan dari alkohol menjadi ester dengan konfigurasi inversi, menggunakan asam karboksilat dan sepasang dua reagen tambahan, sebagian besar trifenilfosfin dan dialkil azodikarboksilat [9]. Dalam penelitian ini digunakan reaksi mitsunobu dengan fenol karena dengan pronukleofil seperti karboksilat, fenol, imida dan sulfonamid, memungkinkan terjadi pembentukan ikatan C-O, C-S dan C-N, dan ikatan C-C yang dapat berpartisipasi pada reaksi [10]. Keuntungan reaksi mitsunobu dalam sintesis organik, diantaranya adalah kemampuannya untuk memasang berbagai macam substrat

fenol dan alkohol, dan pembuatan alkil aril eter dalam kondisi ringan secara efisien. Selain itu, reaksi mitsunobu telah dioptimalkan untuk digunakan dalam sintesis fase padat [11].

Hasil reaksi mitsunobu mendapatkan senyawa etil 4-(3,5-dimetil-4-fenoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat atau disebut C2 yang selanjutnya dikarakterisasi dan diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis senyawa C2 dan melakukan uji aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker T47D. Diharapkan dari penelitian ini dapat menghasilkan senyawa C2 yang secara *in vitro* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *water bath* (Mettler), *hotplate stirrer* (Cimarec), *vacuum buchner*, sonikator (Branson), LC-MS Waters Xevo TQD (Massachusetts, USA), FT-IR Perkin-Elmer Spectrum Two (Llantrisant, UK), *melting point* (Electrothermal), incubator CO₂ (Binder), mikroskop inverted (Olympus CKX41), *ELISA reader* (Epoch), *Cytotoxic Safety Cabinet* (ESCO, tipe *cytotechnology*), *vorteks* (Barnstead).

Bahan yang digunakan yaitu urea (Merck), 4-hidroksi-3,5-dimetilbenzaldehid 95% (Sigma Aldrich), etil asetoasetat (Merck), trifenilfosfin (PPh₃) (Merck), DIAD (Diisopropil azodikarboksilat 98%) (Sigma Aldrich), THF (Tetrahidrofuran) (Merck), fenol (Merck), aquadest (Sungai Budi), metanol (Merck), sel T47D yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, larutan MTT (3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromida), sumuran 96-well plate, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), media kultur (RPMI 1640), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), doksorubisin, DMSO (Merck), *aluminium foil*.

Sintesis Senyawa M1

Campuran 4-hidroksi-3,5-dimetilbenzaldehid 3,0 g (20 mmol), urea 2,4 g (40 mmol), dan etil asetoasetat 5,2 g (40 mmol) direaksikan dalam labu alas bulat. Proses reaksi dilakukan dengan refluks selama 1 jam pada suhu 60–80 °C. Setelah reaksi selesai, endapan kristal yang terbentuk disaring menggunakan corong Büchner dan dicuci dengan aquadest untuk menghilangkan sisa-sisa pengotor. Kristal hasil pemurnian, yaitu senyawa M1, kemudian dikeringkan dalam eksikator dan disimpan dalam flakon setelah mencapai kondisi kering sempurna [6].

Reaksi Mitsunobu Senyawa C2

Sebanyak 404,2 mg (4,30 mmol) fenol, 18 mg ($6,891 \times 10^{-2}$ mmol) trifenilfosfin, dan 100 mg ($6,558 \times 10^{-2}$ mmol) *starting material* dimasukkan ke dalam flakon reaksi. Campuran tersebut kemudian dilarutkan dalam 1 mL pelarut THF dan disonikasi selama 60 menit pada suhu 55 °C. Pada menit ke-10 proses sonikasi, DIAD sebanyak 0,0137 mL ditambahkan secara bertahap. Setelah proses sonikasi selesai dan campuran mencapai suhu ruang, larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 1 hari. Selanjutnya, sampel dipanaskan dalam *water bath* pada suhu 70 °C selama 60 menit.

Uji Melting Point

Serbuk senyawa C2 hasil reaksi mitsunobu yang telah kering dimasukkan pada tabung kapiler untuk mengetahui titik leleh senyawa. Tabung kapiler yang berisi serbuk senyawa C2 dimasukkan pada alat *melting point* dan diamati perubahan suhu saat sampel mulai mencair sampai sampel meleleh sepenuhnya.

Uji FT-IR

Sampel senyawa C2 diambil secukupnya dan dilarutkan dengan DMSO pada eppendorf. Kemudian dibaca pada FTIR dan dianalisis sesuai bilangan gelombang yang dihasilkan.

Uji LC-MS

Seri konsentrasi 1 ppm disiapkan dengan menimbang senyawa C2 sebanyak 5 mg, kemudian dilarutkan dalam DMSO hingga mencapai volume 10 mL dalam labu takar. Selanjutnya, sebanyak 20 µL dari larutan stok tersebut diambil dan diencerkan kembali dengan DMSO hingga volume akhir 10 mL dalam labu takar terpisah. Larutan yang telah diencerkan kemudian dipindahkan ke dalam flakon untuk dianalisis

menggunakan instrumen LC-MS. Data yang diperoleh dari pembacaan LC-MS selanjutnya dianalisis untuk mengevaluasi kandungan senyawa C2.

Pembuatan Larutan Uji

Produk akhir hasil sintesis (C2) dibuat larutan stok dengan kadar 100.000 µg/mL. Senyawa C2 ditimbang sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 50 µL DMSO dan di vorteks sampai homogen. Larutan stok diencerkan untuk membuat larutan substok dengan kadar 1000 µg/mL. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi dari larutan substok sebanyak 7 seri konsentrasi 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; dan 200 µg/mL dalam media kultur. Kontrol positif yang digunakan yaitu doxorubisin yang dibuat 7 seri konsentrasi 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5; dan 10 µg/mL dalam media kultur. Proses pembuatan larutan uji ini dilakukan dalam keadaan aseptis pada *Cytotoxic Safety Cabinet*.

Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Sumuran 96-well plate yang berisi sel kanker T47D diambil dari inkubator dan untuk memastikan bahwa sel sudah 80% konfluen, diamati plate di bawah mikroskop inverted. Dibuang media dari sumuran 96-well plate dan dimasukkan PBS sebanyak 100 µL pada setiap sumuran lalu dihomogenkan. Buang PBS dari sumuran dilanjutkan dengan memasukkan 100 µL seri konsentrasi kontrol positif (doxorubisin), dan sampel C2. Masukkan juga 100 µL kontrol sel (berisi sel dan media RPMI), dan kontrol media (berisi media RPMI) dalam sumuran 96-well plate sesuai pola yang telah dibuat. Inkubasi sumuran 96-well plate dalam inkubator CO2 selama 24 jam pada suhu 37 °C. Dilakukan dokumentasi pada hari selanjutnya sebelum dilakukan MTT. Buang isian sumuran 96-well plate dan masukkan PBS sebanyak 100 µL dalam setiap sumuran, lalu dibuang. Dimasukkan 100 µL campuran MTT 1 mL yang telah ditambahkan dengan 9 mL media RPMI pada setiap sumuran. Inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO2 hingga terbentuk kristal formazan dan sel-sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT, membentuk warna ungu. Diamati kembali dengan mikroskop inverted untuk melihat adanya kristal formazan. Untuk menghentikan reaksi dengan MTT ditambahkan reagen stopper yaitu larutan SDS sebanyak 100 µL pada setiap sumuran. Pemberian SDS dapat dilakukan di luar *Cytotoxic Safety Cabinet*, selanjutnya plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam suhu ruang selama semalaman dalam ruang gelap. Absorbansi dibaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis Data

Data hasil absorbansi yang telah didapatkan dihitung rata-rata pada setiap seri konsentrasinya. Untuk menentukan persentase sel hidup pada setiap konsentrasi dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media}}{\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi Kontrol Media}} \times 100\% \quad (1)$$

Hasil perhitungan persentase sel hidup kemudian dibuat grafik persamaan antara persentase sel hidup vs konsentrasi menggunakan Microsoft Excel dan mendapatkan persamaan regresi linier :

$$y = ax + b \quad (2)$$

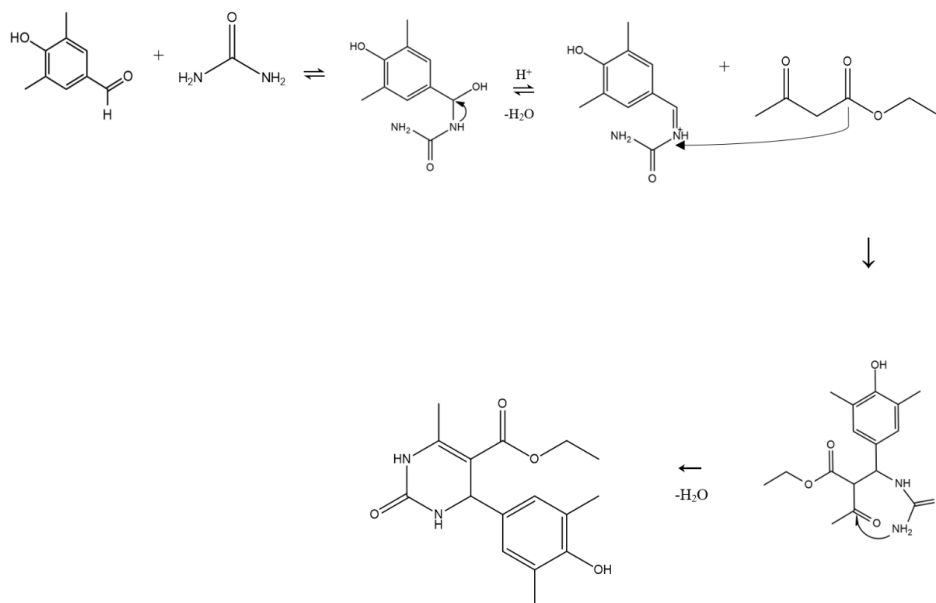
Untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dilakukan substitusi nilai y = 50 dan akan didapatkan nilai x adalah nilai IC₅₀.

Hasil dan Diskusi

Sintesis Senyawa M1

Penelitian ini melakukan sintesis senyawa turunan dihidropirimidinon (DHPM) berupa 4-hidroksi-3,5-dimetilbenzaldehida. Sintesis turunan dihidropirimidinon (DHPM) ini dilakukan melalui metode MCR (*Multicomponent Reaction*), yang dipakai untuk mensintesis sejumlah analog termasuk dalam kelas senyawa heterosiklik yang menawarkan aplikasi farmasi multidimensi. MCR (*Multicomponent Reaction*) termasuk metode pendekatan untuk sintesis yang efisien. Seiring berjalannya waktu, pendekatan ini terus berkembang

dan penting untuk penemuan bahan kimia baru, termasuk pengembangan obat baru [6,12]. Mekanisme sintesis senyawa turunan DHPM dapat dilihat seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme reaksi senyawa M1

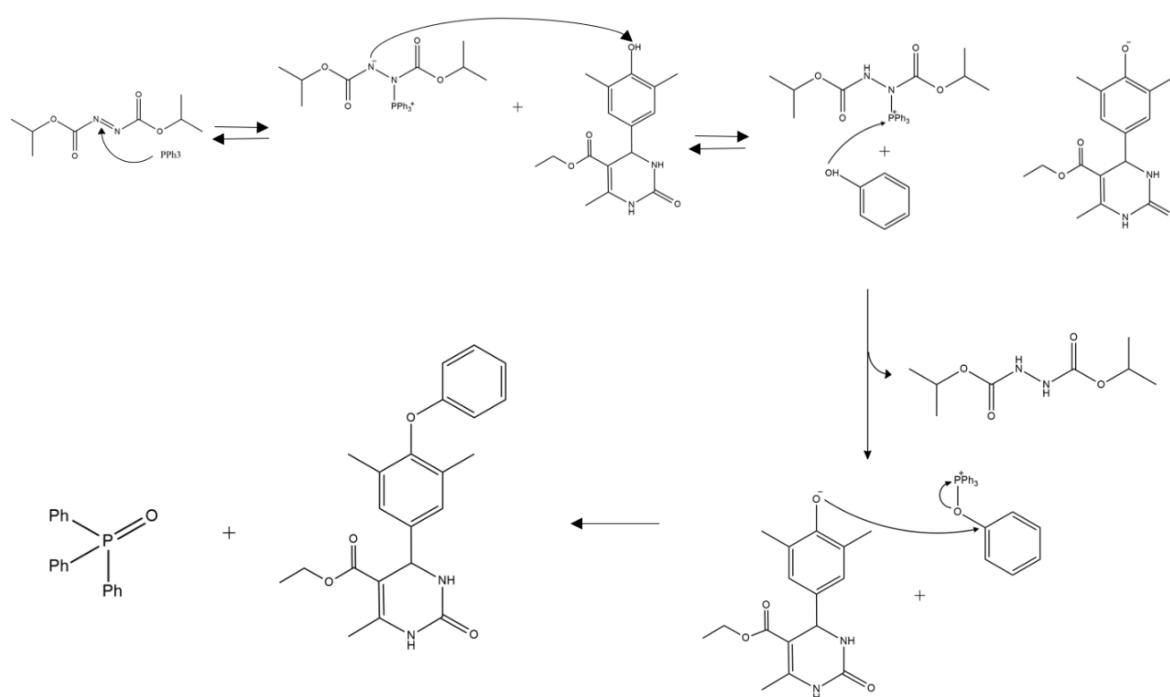
Reaksi ini dimulai ketika gugus amina pada urea menyerang karbon pada aldehid melalui mekanisme serangan nukleofilik. Selanjutnya karena kondisi asam, maka terbentuk ion iminium positif yang berperan sebagai elektrofil. Ion iminium ini kemudian diserang oleh etil asetoasetat, yang bertindak sebagai nukleofil. Pada tahap akhir reaksi, terjadi penambahan nukleofilik oleh gugus amida urea ke gugus karbon karbonil dari etil asetoasetat, yang mengarah pada pembentukan cincin [6]. Proses sintesis ini dilakukan dengan refluks dengan suhu 60-80°C selama 1 jam. Selama melakukan refluks dilakukan pengadukan menggunakan magnetik stirer yang akan menyebabkan partikel-partikel saling bertumbukan satu sama lain, sehingga mempengaruhi peningkatan energi kinetik molekul [13].

Reaksi Mitsunobu Senyawa C2

Hasil sintesis senyawa M1 direaksikan kembali dengan reaksi mitsunobu menggunakan fenol sebagai pronukleofil karena akan membentuk ikatan C-O pada produk [10]. Mekanisme reaksi mitsunobu Gambar 2 terjadi ketika trifenilfosfin sebagai nukleofil menyerang DIAD sehingga terbentuk betain intermediet. Betain intermediet mende protonasi gugus hidroksil dari starting material (M1) untuk membentuk pasangan ion. Selanjutnya gugus hidroksil pada fenol akan mengikat ion fosfonium dan membentuk ion alkoksifosfonium. O negatif dari M1 sebagai nukleofil akan menyerang secara SN2 ion alkoksifosfonium untuk menghasilkan produk akhir berupa senyawa etil 4-(3,5-dimetil-4-fenoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (C2). Dalam melakukan reaksi mitsunobu digunakan sonikator untuk mempercepat proses reaksi, karena saat melakukan reaksi mitsunobu terjadi hambatan sterik dari fenol dan alkohol, sehingga membutuhkan sonikasi untuk mengurangi hambatan sterik tersebut. Dampaknya senyawa dapat bereaksi secara maksimal dan terjadi peningkatan laju reaksi [11]. Proses sonikasi ini dilakukan selama 60 menit dalam suhu 55°C. Selanjutnya untuk mendapatkan kristal senyawa C2 diuapkan pada *water bath* selama 60 menit pada suhu 70°C.

Uji Melting Point

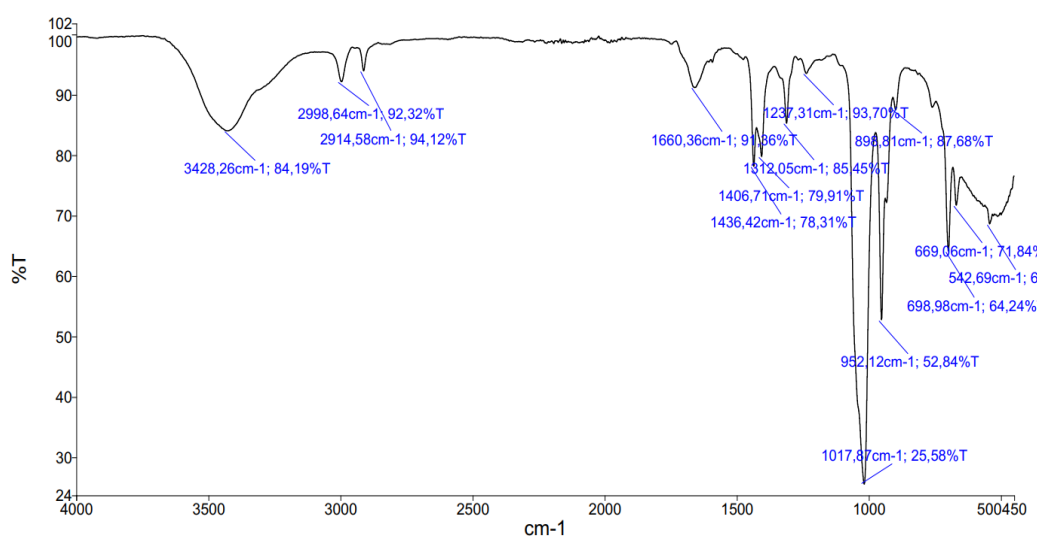
Senyawa C2 dilakukan karakterisasi dengan uji *melting point*, FT-IR, dan LC-MS. *Melting point* digunakan untuk memastikan bahwa senyawa yang dihasilkan merupakan senyawa baru bukan bahan awal. Pada hasil *melting point* senyawa C2 mendapatkan titik leleh sebesar 105-135°C.



Gambar 2. Mekanisme reaksi senyawa C2

Uji FT-IR

Analisis FT-IR Gambar 3 bertujuan untuk mendapatkan informasi tentang gugus fungsional dari senyawa C2 yang dihasilkan. Berdasarkan hasil analisis FT-IR senyawa C2 pada bilangan gelombang 3428.26 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus amida (N-H), bilangan gelombang $2998.64\text{--}2914.58\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan vibrasi dari gugus alkana (C-H), bilangan gelombang 1660.36 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O) yaitu pada ester atau keton, bilangan gelombang $1436.42\text{--}1406.71\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan vibrasi dari gugus alkana C-H yaitu metil, bilangan gelombang $1312.05\text{--}1017.87\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya gugus ester atau eter (C-O), bilangan gelombang $952.12\text{--}669.06\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi dari gugus aromatik (C-H) [14]. Dari hasil analisis senyawa C2 yang disintesis dari senyawa M1 dengan reaksi mitsunobu menunjukkan bahwa senyawa C2 memiliki spektrum IR yang khas yaitu pada bilangan gelombang 3428.26 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus amida (N-H), bilangan gelombang 1660.36 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O) yaitu pada ester atau keton, bilangan gelombang $1312.05\text{--}1017.87\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya gugus ester atau eter (C-O). Hal ini menunjukkan bahwa adanya keberhasilan dalam transformasi struktural.



Gambar 3. Hasil FT-IR senyawa C2

Uji LC-MS

Analisis dengan menggunakan kombinasi tandem kromatografi cair dan spektroskopi massa, (LC-MS) merupakan suatu teknik analisis kimia yang memiliki kemampuan pemisahan yang sangat baik. Hal ini karena LC-MS memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. LC-MS banyak digunakan dalam penelitian tentang farmakokinetika, terutama dalam hal pengembangan obat [15]. Berdasarkan pengujian sampel C2 dapat dilihat jika hasil puncak ion molekul memiliki nilai m/z sebesar 375,32 g/mol. Sedangkan secara teoritis perhitungan berat molekul kompleks senyawa C2 yaitu 380,44 g/mol. Penurunan hasil pengukuran LC-MS yang selisihnya 5,12 g/mol ini, kemungkinan besar bisa disebabkan oleh fragmentasi gugus amida yaitu dapat menyebabkan pelepasan proton H^+ dari N-H yang mungkin terlibat dalam ikatan hidrogen intramolekul dengan C=O pada cincin tetrahidropirimidin. Hal ini dapat menyebabkan penurunan massa yang terdeteksi sebagai ion yang lebih ringan [15]. Selain itu juga bisa dari gugus ester yang mengalami interaksi hidrogen intramolekul, sehingga mempengaruhi stabilitas gugus ester dan menyebabkan pelepasan fragmen kecil seperti atom H.

Uji Sitotoksik Metode MTT assay

Hasil sitotoksik senyawa C2 yang diujikan terhadap sel kanker T47D dengan metode MTT assay. Prinsip uji sitotoksik didasarkan pada bagaimana garam tetrazolium dimetabolisme oleh enzim mitokondria dalam sel hidup. Enzim dehidrogenase akan memecah cincin tetrazolium, sehingga menghasilkan formazan ungu yang tidak larut. Intensitas warna ungu yang dihasilkan berkorelasi dengan jumlah sel kanker yang bertahan hidup. Selanjutnya, nilai absorbansinya akan dihitung untuk menentukan nilai persen sel hidup [16]. Hasil dari perhitungan tersebut dapat dilihat pada [Tabel 1](#).

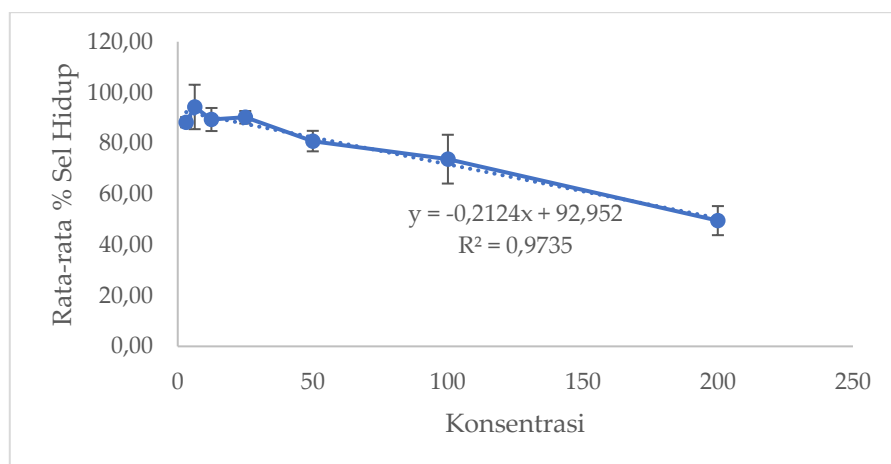
Tabel 1. Data uji aktivitas sitotoksik senyawa C2 dan doxorubicin (kontrol positif)

Senyawa C2			Kontrol positif (doxorubicin)		
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata% sel hidup*	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata% sel hidup*	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
3,125	88,31 $\pm$ 2,01	202,22	0,15625	80,39 $\pm$ 1,26	3,33
6,25	94,31 $\pm$ 8,76		0,3125	76,92 $\pm$ 2,46	
12,5	89,36 $\pm$ 4,55		0,625	75,89 $\pm$ 1,90	
25	90,25 $\pm$ 2,46		1,25	58,81 $\pm$ 4,11	
50	80,86 $\pm$ 4,04		2,5	36,97 $\pm$ 14,43	
100	73,75 $\pm$ 9,61		5	23,17 $\pm$ 5,02	
200	49,53 $\pm$ 5,73		10	19,83 $\pm$ 2,68	

Keterangan : *) Hasil nilai sel hidup merupakan rerata dari 3 replikasi $\pm$ standar deviasi

Berdasarkan [Tabel 1](#) setelah dihitung nilai rerata % sel hidupnya, kemudian dibuat grafik antara konsentrasi dengan % nilai sel hidup. Hasil grafik uji sitotoksik senyawa C2 terhadap sel kanker T47D dapat dilihat pada [Gambar 4](#).

Berdasarkan [Gambar 4](#) uji aktivitas sitotoksik senyawa C2 terhadap sel kanker T47D secara *in vitro* menunjukkan jika persentase sel hidup menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi senyawa C2. Kemampuan penghambatan yang tinggi ini ditunjukkan oleh rendahnya persentase sel hidup. Semakin rendah persentase sel hidup yang dihasilkan oleh sel kanker T47D, semakin efektif senyawa C2 dalam membunuh sel kanker. Nilai IC₅₀ adalah ukuran kualitas sitotoksik suatu senyawa dan menunjukkan kapasitasnya untuk menghambat 50% sel kanker. *American National Cancer Institute* mengklasifikasikan nilai IC₅₀ menjadi 4 bagian yaitu sangat toksik jika nilai IC₅₀ $\leq$ 20 $\mu\text{g/mL}$, moderat jika nilai IC₅₀ 21-200 $\mu\text{g/mL}$, ringan jika nilai IC₅₀ 201-500 $\mu\text{g/mL}$, dan tidak toksik jika nilai IC₅₀ $\geq$ 500 $\mu\text{g/mL}$ [17,18]. Berdasarkan hasil uji sitotoksik senyawa C2 terhadap sel kanker T47D menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 202,22 $\pm$ 5,31 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan jika senyawa C2 memiliki aktivitas sitotoksik yang ringan terhadap sel kanker T47D. Sedangkan, hasil uji sitotoksik kontrol positif (doxorubisin) mendapatkan nilai IC₅₀ sebesar 3,33 $\pm$ 4,55 $\mu\text{g/mL}$ yang menandakan jika doxorubisin memiliki aktivitas sitotoksik sangat tinggi. Selain itu penelitian oleh Fauzi et al., [6] telah melakukan uji sitotoksik terhadap turunan senyawa dihidropirimidinon (DHPM) yaitu etil 4-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidine-5-karboksilat terhadap sel kanker T47D yang menghasilkan nilai IC₅₀ 90,4 $\mu\text{g/mL}$ yang tergolong memiliki aktivitas sitotoksik yang moderat.



Gambar 4. Grafik konsentrasi vs rata-rata % sel hidup

Senyawa C2 pada penelitian ini, mempunyai gugus fenoksi yang disintesis dengan mengganti gugus hidroksil pada senyawa M1 dengan fenol. Tujuannya untuk menurunkan polaritas senyawa sehingga dapat meningkatkan sifat lipofilisitas yang dapat mempengaruhi kelarutan obat dalam membran sel. Menurut Dzakwan & Priyanto (2019), penurunan polaritas dapat meningkatkan kelarutan obat, karena kelarutan memiliki peran penting dalam bioavailabilitas obat [8]. Interaksi hidrofobik antara gugus fenoksifenil dan substituen metil pada posisi 3,5 juga berperan dalam penentuan afinitas senyawa C2 dengan target biologis dalam pertumbuhan sel kanker. Walaupun senyawa C2 diduga berpotensi sebagai antikanker, tetapi hasil analisis IC_{50} menunjukkan jika senyawa C2 memiliki sifat sitotoksik yang ringan karena nilai IC_{50} yang cukup tinggi terhadap sel T47D, sehingga dibutuhkan dosis yang lebih besar untuk mencapai efek terapeutik yang diinginkan. Hal yang diduga menjadi penyebab senyawa C2 memiliki sifat sitotoksik ringan yaitu sifat lipofilisitas yang berlebih menyebabkan senyawa C2 kurang cukup larut dalam cairan biologis saat uji sitotoksik. Sehingga menyebabkan penyerapan dan konsentrasi senyawa C2 yang efektif pada target menjadi terhambat. Senyawa dengan lipofilisitas tinggi sering mengalami masalah terhadap kelarutan, sehingga dapat menghambat distribusi dan efektivitas farmakologi [19]. Untuk meningkatkan aktivitas sitotoksik dari senyawa C2 dapat dilakukan modifikasi senyawa dengan penambahan atau penggantian gugus fungsional yang lebih polar atau dapat dilakukan rekristalisasi pada senyawa untuk memurnikan senyawa dari pengotor.

Kesimpulan

Sintesis berhasil dilakukan dengan mereaksikan hasil sintesis senyawa M1 dengan fenol yang dilakukan dengan sonikasi sehingga, dapat menghasilkan senyawa C2. Senyawa C2 (etil 4-(3,5-dimetil-4-fenoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat) memiliki aktivitas sitotoksik yang ringan terhadap sel kanker T47D yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} 202,22 μ g/mL. Meskipun aktivitas sitotoksiknya tergolong ringan, senyawa C2 ini dapat menjadi potensi awal sebagai kandidat agen antikanker. Sehingga masih diperlukan modifikasi struktur ataupun dapat dilakukan rekristalisasi pada senyawa untuk memurnikan senyawa dari pengotor untuk meningkatkan efektifitas agen antikanker.

Conflict of Interest

Para penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan pribadi, institusional, maupun finansial yang memengaruhi penelitian ini. Seluruh proses dilakukan secara independen dan objektif tanpa intervensi pihak berkepentingan.

Acknowledgment

Supplementary Materials

References

- [1] Khaerunnisa AB, Latief S, Syahrudin FI, Royani I, Juhamran RP. Hubungan Tingkat Pengetahuan dan Sikap terhadap Deteksi Dini Kanker Payudara pada Pegawai Rumah Sakit Ibnu Sina Makassar. *Fakumi Med J* 2023;3:685–94.
- [2] Bosica G, Cachia F, De Nittis R, Mariotti N. Efficient one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1h)-ones via a three-component biginelli reaction. *Molecules* 2021;26:1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules26123753>.
- [3] Farooq S, Alharthi FA, Alsalmeh A, Hussain A, Dar BA, Hamid A, et al. Dihydropyrimidinones: Efficient one-pot green synthesis using Montmorillonite-KSF and evaluation of their cytotoxic activity. *R Soc Chem* 2020;10:42221–34. <https://doi.org/10.1039/d0ra09072g>.
- [4] Khasimbi S, Ali F, Manda K, Sharma A, Chauhan G, Wakode S. Dihydropyrimidinones Scaffold as a Promising Nucleus for Synthetic Profile and Various Therapeutic Targets: A Review. *Curr Org Synth* 2021;18:270–293.
- [5] Mauricio-Sánchez RA, Salazar R, Luna-Bárcenas JG, Mendoza-Galván A. FTIR Spectroscopy Studies On The Spontaneous Neutralization Of Chitosan Acetate Films By Moisture Conditioning. *Vib Spectrosc* 2018;94:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.10.005>.
- [6] Fauzi A, Saifudin A, Rullah K. Synthesis of Dihydropyrimidinone (DHPM) Derivatives through a Multicomponent Reaction (MCR) and Their Biological Activity. *J Med Chem Sci* 2023;6:1810–7. <https://doi.org/10.26655/JMCHEMSCI.2023.8.9>.
- [7] Graziano G, Stefanachi A, Contino M, Prieto-Díaz R, Ligresti A, Kumar P, et al. Multicomponent Reaction-Assisted Drug Discovery: A Time- and Cost-Effective Green Approach Speeding Up Identification and Optimization of Anticancer Drugs. vol. 24. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24076581>.
- [8] Dzakwan M, Priyanto W. Peningkatan Kelarutan Fisetin Dengan Teknik Kosolvensi. *Parapemikir J Ilm Farm* 2019;8:5–9. <https://doi.org/10.30591/pjif.v8i2.1388>.
- [9] Hain J, Rollin P, Klaffke W, Lindhorst TK. Anomeric modification of carbohydrates using the Mitsunobu reaction. *Beilstein J Org Chem* 2018;14:1619–36. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.138>.
- [10] Fletcher S. The Mitsunobu Reaction in the 21st Century. *R Soc Chem* 2012;00:1–13. <https://doi.org/10.1093/jaoac/27.4.588>.
- [11] Lepore SD, He Y. Use of sonication for the coupling of sterically hindered substrates in the phenolic Mitsunobu reaction. *J Org Chem* 2003;68:8261–3. <https://doi.org/10.1021/jo0345751>.
- [12] Younus HA, Al-Rashida M, Hameed A, Uroos M, Salar U, Rana S, et al. Multicomponent Reactions (MCR) in Medicinal Chemistry: a Patent Review (2010-2020). *Expert Opin Ther Pat* 2020;31:267–289.
- [13] Ruswanto R, Wulandari WT, Cantika I, Mardianingrum R. Synthesis and virtual screening of bis-(4-(tert-butyl)-N-(methylcarbamothioyl) benzamide)-Iron (III) complex as an anticancer candidate. *Pharmaciana* 2021;11:1–14. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v11i1.17837>.
- [14] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy, Fourth Edition. USA: 2009. <https://doi.org/10.3917/popu.p1977.32n1.0034>.
- [15] Khairan K, Jenie UA, Sudibyo RS. Fragmentation Studies Of Δ 6,7-Anhidroeritromisin-A By Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (Lc-Ms). *Indones J Chem* 2009;9:491–9. <https://doi.org/10.22146/ijc.21519>.
- [16] Lestari E, Matsjeh S, Swasono RT. Sintesis Senyawa Turunan Khalkon Dan Flavon Berbahan Dasar Vanilin Dan Uji Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Serviks (Hela), Sel Kanker Kolon (Widr), Dan Sel Kanker Payudara (T47D) Secara In Vitro. *Bimipa* 2018;25:53–65.
- [17] Nurdiani E, Masriani, Rasmawan R, Muharini R, Sartika RP. Sitotoksisitas dan Selektivitas Fraksi Kayu Batang Simpung Air (*Dillenia suffruticosa* (Griff.) Martelli) Terhadap Sel Kanker Payudara. *Al-Kauniyah J Biol* 2024;17:190–200. <https://doi.org/10.15408/kauniyah.v17i1.31299>.
- [18] Abdel-Hameed E-SS, Bazaid SA, Shohayeb MM, El-Sayed MM, El-Wakil EA. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L.

Growing in Taif, Saudi Arabia. European J Med Plants 2012;2:93–112. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2012/1040>.

- [19] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev 2001;46:3–26. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.