



RESEARCH ARTICLE

SINTESIS DAN STUDI *MOLECULAR DOCKING* SENYAWA PIRAZOLO-PIRIDIN TERSUBSTITUSI METOKSI TURUNAN KURKUMIN MONOKARBONIL SEBAGAI INHIBITOR ENZIM SIKLOOKSIGENASE-2

Enda Mora^{1,2*}, Adel Zamri², Hilwan Yuda Teruna², Neni Frimayanti¹, Ihsan Ikhtiarudin¹, Shafira Melsonia¹

¹ Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau; Jalan Kamboja, Kelurahan Simpang Baru, Pekanbaru, 28293

² Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau; Jl. H.R. Subrantas Km.12,5 Panam, Pekanbaru, 28293

*e-mail korespondensi: endamora@stifar-riau.ac.id

Article History

Received:

20 Mei 2023

Accepted:

26 Juni 2023

Published:

30 Juni 2023

ABSTRAK

Scaffold pirazol maupun piazolo-piridin telah dilaporkan memiliki potensi aktivitas biologis yang menarik dan terdapat pada berbagai struktur senyawa obat yang telah disetujui oleh *food and drug administration* (FDA). Pada penelitian ini, senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi sebagai turunan dari analog kurkumin monokarbonil telah disintesis melalui dua tahap reaksi. Tahap pertama adalah sintesis analog kurkumin monokarbonil tersubstitusi metoksi melalui reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dengan bantuan iradiasi *microwave*. Tahap kedua adalah sintesis senyawa pirazolo-piridin melalui reaksi adisi nukleofilik yang diikuti oleh reaksi siklisasi intramolekular dalam reaktor tertutup, *monowave* 50. Kemurnian produk hasil sintesis telah dipastikan melalui analisis HPLC. Struktur senyawa pirazolo-piridin telah dikonfirmasi melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FT-IR, dan ¹H-NMR. Berdasarkan studi *molecular docking*, senyawa tersebut tidak menunjukkan potensi aktivitas yang baik sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-2 (COX-2), karena hanya memiliki nilai energi bebas pengikatan sebesar -5,98 kcal/mol. Selain itu, pirazolo piridin tersubstitusi metoksi juga tidak dapat membentuk satupun ikatan hidrogen dengan sisi aktif COX-2. Di sisi lain, celecoxib sebagai kontrol positif memiliki energi bebas pengikatan sebesar -11,97 kcal/mol dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino Gln178, Leu338, Arg499, dan Phe504 pada sisi aktif COX-2 (PDB ID: 3LN1).

Kata kunci: Analog kurkumin monokarbonil, kondensasi Claisen-Schmidt, *molecular docking*, pirazolo-piridin, siklooksigenase-2

ABSTRACT

Pyrazol and pyrazolopyridine scaffolds have been reported to have many interesting biological activities and present in various structures of drug compounds that have been approved by the food and drug administration (FDA). In this study, a methoxy-substituted pyrazolo-pyridine compound as derivative of monocarbonyl curcumin analogs was synthesized in two steps of reaction. The first step was the synthesis of monocarbonyl curcumin analog through the Claisen-Schmidt condensation with the assist of microwave irradiation. The second step is the synthesis of pyrazolopyridine through nucleophilic addition followed by intramolecular cyclization in a closed-vessel reactor, *monowave* 50. The purity of synthesized product was confirmed by HPLC analysis, and the structure has been confirmed through UV-Vis, FT-IR, and ¹H NMR spectroscopic analyses. Based on the molecular docking study, the pyrazolo-pyridine did not show good activity as cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, because it only has a binding free energy of -5.98 kcal/mol. In addition, methoxy-substituted pyrazolo-pyridine also can not form any hydrogen bonds with the active site of COX-2. On the other hand, celecoxib as a positive control has a binding free energy of -11.97 kcal/mol and can form hydrogen bonds with Gln178, Leu338, Arg499, and Phe504 amino acid residues on the active site of COX-2 (PDB ID: 3LN1).

Keywords: Claisen-Schmidt condensation, cyclooxygenase-2, *molecular docking*, monocarbonyl curcumin analogue, pyrazolo-pyridine

©Mora *et al.*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

PENDAHULUAN

Senyawa heterosiklik yang mengandung inti pirazol dan pirazolin memiliki peran penting dalam sintesis berbagai senyawa heterosiklik lainnya. Senyawa-senyawa ini telah digunakan secara intensif

sebagai farmakofor dalam mendesain obat-obatan dan juga digunakan sebagai senyawa intermediet dalam sintesis senyawa organik (Jaishree *et al.*, 2010). Adanya atom nitrogen pada cincin senyawa pirazolin menjadikan senyawa ini memiliki bioaktivitas yang beragam (Azizur dan Anees, 2010).

Beberapa contoh obat yang mengandung cincin pirazol antara lain adalah crizotinib (antiproliferasi), rimonabant (anti-obesity), sildenafil (vasodilator), and fezolamide (antidepressant) (Costa *et al.*, 2021). Selain pirazol, *scaffolding* golongan N-heterosiklik pirazolo-piridin juga terdapat dalam beberapa obat yang telah disetujui oleh FDA tahun 2021, seperti vericiguat (Verquvo), obat yang digunakan untuk mengurangi risiko kematian dan rawat inap pada pasien gagal jantung kronis (FDA, 2021a). Pada tahun yang sama, FDA juga telah menyetujui penggunaan asciminib, untuk pasien dengan Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (Ph+CML) dalam fase kronik, dimana pada strukturnya juga terdapat cincin pirazolo-piridin (FDA, 2021b).

Beberapa obat lainnya, seperti celecoxib yang merupakan obat golongan anti-inflamasi dengan mekanisme kerja sebagai inhibitor enzim COX-2 yang spesifik, pada strukturnya juga terdapat cincin pirazol. Beberapa turunan pirazol tersubstitusi lainnya juga telah disintesis untuk dieksplorasi potensi aktivitas anti-inflamasinya (Abdellatif *et al.*, 2019; Jasril *et al.*, 2019). Beberapa peneliti lainnya juga telah melaporkan potensi anti-inflamasi senyawa pyrazolo-piridin berdasarkan kajian *in silico*. Hasil kajian *in silico* tersebut menunjukkan bahwa senyawa pirazolo-piridin tersebut berpotensi sebagai inhibitor enzim COX-2 dengan nilai IC₅₀ lebih baik dibandingkan dengan celecoxib sebagai kontrol positif (Bilavendran *et al.*, 2019). Penelitian terakhir kami juga menunjukkan bahwa senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi menunjukkan aktivitas anti-inflamasi *in vivo* yang baik (Mora *et al.*, 2023). Oleh karena itu, menjadi suatu hal yang menarik untuk mensintesis senyawa-senyawa pirazolo-piridin ini dan kemudian mengeksplorasi potensinya sebagai anti-inflamasi melalui pendekatan kimia komputasi.

Salah satu pendekatan komputasi yang populer adalah studi *molecular docking*. Teknik *molecular docking* secara *in silico* dapat memprediksi interaksi antara suatu protein dengan ligan, sehingga diketahui potensi aktivitas dari senyawa bioaktif (ligan) tersebut, sehingga penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* dapat difokuskan pada senyawa-senyawa yang berpotensi aktif saja (Valasani *et al.*, 2014). Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk mensintesis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi turunan kurkumin monokarbonil, kemudian dilanjutkan dengan studi *molecular docking* untuk melihat potensi senyawa tersebut sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-2.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau (STIFAR), Laboratorium Sintesis Organik, Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau (UR), dan Laboratorium Spektroskopi NMR FMIPA Institut Teknologi Bandung (ITB).

Alat

Peralatan yang digunakan untuk sintesis adalah neraca analitik (Precisa[®]), *microwave* (Samsung[®]), *monowave* 50 (Anton-Paar[®]), pompa vakum (GAST[®]), lampu UV 254 dan 366 nm (Camag[®]), Stuart melting point (SMP-11[®]), HPLC (Shimadzu LC Solution[®]), jenis kolom *shim-pack* VP-ODS dengan panjang dan diameter kolom yaitu 250 x 4,6 mm), spektrofotometer UV (Genesys[®] 10S UV-Vis v4.002 21.9n170513), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu[®], IR Prestige-21), spektrometer ¹H NMR (Agilent[®], 500 MHz), dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Peralatan yang digunakan untuk studi *molecular docking* adalah seperangkat komputer LG Intel (R) Core (TM) i7-8700 CPU, 3.20 GHz, dengan RAM 16,0 GB yang dilengkapi dengan aplikasi Chemdraw Professional 15.0, BIOVA *Discovery Studio Client* 2021, dan *Molecular Operating Environment* (MOE) 2022 (Chemical Computing Group).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk sintesis adalah 4-piperidon monohidrat, HCl (Sigma-Aldrich[®]), 4-metoksibenzaldehid (Sigma-Aldrich[®]), hidrazin hidrat (Sigma-Aldrich[®]), natrium hidroksida (Merck[®]), indikator universal (Merck[®]), kertas saring, plat KLT GF254 (Merck[®]), aqua DM (Brataco[®]) dan beberapa pelarut organik, seperti *n*-heksana dan etil asetat yang telah didestilasi, etanol absolut (Merck), dan kloroform (Merck).

Prosedur Sintesis

Sintesis Senyawa Analog Kurkumin Monokarbonil

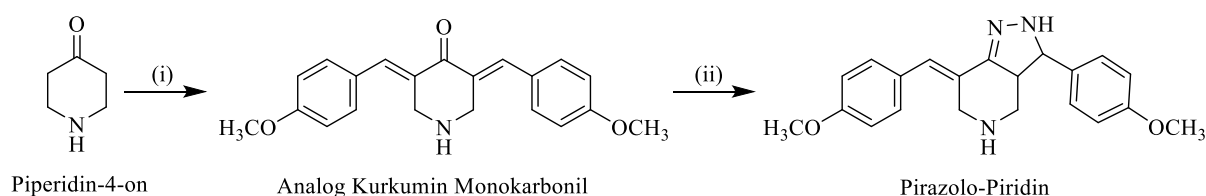
Sintesis senyawa analog kurkumin monokarbonil tersubstitusi metoksi dilakukan dengan metode iradiasi *microwave* (Gambar 1). Senyawa 4-piperidon monohidrat (0,768 g; 5,0 mmol) dan 4-metoksibenzaldehid (1,361 g; 10,0 mmol) dicampurkan dalam etanol absolut (10 mL), kemudian ditambahkan dengan KOH (3N, 5 mL) sebagai katalis. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu diiradiasi dengan *microwave* menggunakan daya 180 W. Jalannya reaksi dikontrol melalui uji KLT dengan membandingkan nilai R_f masing-masing noda pada campuran reaksi dengan R_f masing-masing senyawa awal yang digunakan. Setelah reaksi dinyatakan selesai melalui uji KLT (2 jam), campuran produk dinetralkan dengan larutan HCl 3N dingin, lalu didiamkan pada lemari pendingin selama 24 jam. Padatan yang diperoleh disaring menggunakan corong *buchner* dan dicuci dengan *n*-heksana dan aqua DM dingin. Kemudian *crude product* hasil sintesis diuji KLT. *Crude product* dicuci dengan metanol dingin untuk mendapatkan senyawa analog kurkumin monokarbonil

murni. Produk yang telah dicuci kemudian dianalisis kemurniannya melalui uji KLT dan pengukuran titik leleh dilakukan untuk dibandingkan dengan literatur.

Sintesis Senyawa Pirazolo-piridin Tersubstitusi Metoksi

Sintesis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi dilakukan dengan metode pemanasan menggunakan alat pemanas yang didesain khusus untuk sintesis, produksi Anton Paar, *monowave 50* (Gambar 1). Senyawa analog kurkumin monokarbonil yang diperoleh pada sintesis tahap pertama (0,321 g; 1 mmol) dan hidrazin hidrat (0,100 g; 2 mmol) dicampurkan dalam etanol absolut (5 ml), kemudian ditambahkan KOH (3N, 1 mL). Campuran tersebut

direaksikan pada suhu 70°C di dalam suatu reaktor tabung tertutup menggunakan alat *monowave 50* dan reaksi dikontrol dengan KLT selama 10 menit. Setelah reaksi selesai campuran produk dinetralkan dengan HCl 3N, lalu didiamkan pada lemari pendingin selama 24 jam. Padatan yang diperoleh disaring menggunakan corong *buchner*, dicuci dengan *n*-heksana dan aqua DM dingin. Kemudian *crude product* hasil sintesis dianalisis dengan KLT. *Crude product* dicuci dengan metanol dingin, dikeringkanginkan, lalu dianalisis kemurniannya melalui uji KLT, pengukuran titik leleh, dan analisis HPLC fase terbalik (reverse phase) dengan fase gerak campuran metanol dan air 50:50. Selanjutnya struktur produk dikarakterisasi dengan spektroskopi UV, FT-IR, dan ¹H NMR.



Gambar 1. Rute sintesis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi turunan analog kurkumin monokarbonil (i) 4-metoksibenzaldehid/NaOH/EtOH, 180 W, 2 jam, *microwave* (ii) NH₂-NH₂.H₂O/NaOH/EtOH, 70 °C, 10 menit, *monowave 50*

Studi Molecular Docking Senyawa Pirazolo-Piridin sebagai Inhibitor COX-2

Struktur kristal enzim siklooksigenase-2 yang berikatan dengan celecoxib sebagai ligan bawaan (PDB ID 3LN1) diunduh dari website rcsb.org. Molekul air dan ligan bawaan pada *chain A* dihilangkan dengan DSV 2021, kemudian *chain A* dipreparasi menggunakan menu *QuickPrep* pada aplikasi MOE 2022 (*forcefield* CHARM27, *fix hydrogen*, *fix charge*, dan *gradient* 0,01). Struktur enzim yang telah dipreparasi ini kemudian disimpan dalam format PDB dan siap digunakan untuk *docking*.

Struktur 2D ligan digambarkan dengan ChemDraw Professional 2015 lalu diubah menjadi struktur 3D dengan MOE 2022. Struktur ligan kemudian dipreparasi menggunakan *forcefield* MMFF94x, *fix hydrogen*, *fix charge*, dan *gradient* 0,0001. Struktur ligan yang telah dipreparasi ini kemudian disimpan sebagai *ligand database* dalam format MDB.

Sisi aktif (site 3) pada siklooksigenase-2 yang terdiri dari 30 residu asam amino (His75, Arg106, Gln178, Phe191, Phe195, Val214, Val330, Tyr334, Val335, Leu338, Ser339, Gly340, Tyr341, Phe367, Leu370, Tyr371, Trp373, Arg499, Ala502, Ile503, Phe504, Met508, Val509, Glu510, Gly512, Ala513, Phe515, Ser516, Gly519, dan Leu520) ditandai sebagai *dummy atom* dan dipilih sebagai target *docking*.

Docking dilakukan menggunakan aplikasi MOE 2022 dengan pengaturan *placement method triangle matcher*, *refinement method rigid receptor*, *placement score London dG* dan *refinement score GBVI/WSA dG* masing masing dengan pose 100 dan 10.

Kompleks hasil *docking* di *keep* dan *save* menggunakan aplikasi MOE 2022, lalu divisualisasi dalam bentuk gambar dengan aplikasi DSV 2021. Data energi bebas pengikatan (kcal/mol), *root mean square deviation* (RMSD), dan jenis interaksi antara enzim dan ligan, disajikan dalam tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, telah dilakukan sintesis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi sebagai turunan dari suatu analog kurkumin monokarbonil. Sintesis pirazolo-piridin dilakukan melalui dua tahap reaksi, yaitu sintesis senyawa analog kurkumin monokarbonil tersubstitusi metoksi dan dilanjutkan dengan sintesis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi.

Sintesis Analog Kurkumin Monokarbonil

Senyawa analog kurkumin monokarbonil tersubstitusi metoksi disintesis menggunakan senyawa awal 4-piperidon monohidrat dan 4-metoksibenzaldehid dalam suasana basa melalui reaksi

kondensasi Claisen-Schmidt. Reaksi kondensasi Claisen-Schmidt lebih umum digunakan untuk sintesis kalkon. Namun, reaksi ini juga bisa diaplikasikan untuk mensintesis analog kurkumin monokarbonil. Perbedaan sintesis senyawa analog kalkon dan analog kurkumin terletak pada rasio senyawa keton dan aldehid yang direaksikan. Pada sintesis analog kalkon, rasio yang dipakai 1:1 (Ikhtiarudin et al., 2014; Ikhtiarudin et al., 2019; Ikhtiarudin et al., 2020). Sedangkan pada sintesis analog kurkumin, rasio yang dipakai adalah 1:2 (Mora et al., 2019; Mora et al., 2023).

Reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dapat berlangsung dengan metode gerus, pengadukan, pemanasan secara konvensional, maupun pemanasan dengan bantuan iradiasi *microwave*. Namun, dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan energi gelombang mikro dalam reaksi organik menjadi semakin terkenal dan banyak digunakan (Ikhtiarudin et al., 2017; Jasril et al., 2019; Jasril et al., 2020). Prinsip dari metode pemanasan dengan iradiasi *microwave* adalah dengan pemberian energi tambahan untuk berlangsungnya suatu reaksi berupa energi iradiasi gelombang mikro. Keuntungan utama penggunaan gelombang mikro dalam sintesis senyawa organik, yaitu terjadinya pemanasan materi secara seragam, kecepatan reaksi meningkat, berkurangnya reaksi samping yang tidak diinginkan, hasil produk akhir lebih murni, meningkatkan produktivitas, mengurangi pemborosan bejana wadah selama reaksi berlangsung dan biaya operasi rendah (Ravichandran & Karthikeyan, 2011; Ikhtiarudin et al., 2020), namun tidak pada semua kondisi reaksi (Bhuiyan et al., 2011; Zamri et al., 2016).

Tahapan reaksi kondensasi Claisen-Schmidt dalam suasana basa diawali oleh perebutan hidrogen α pada senyawa 4-piperidon oleh ion hidroksida sehingga dihasilkan ion enolat. Ion enolat ini kemudian bertindak sebagai nukleofil dengan menyerang atom karbon pada gugus karbonil 4-metoksibenzaldehid yang bersifat elektrofil, sehingga terbentuk ikatan C-C dan dihasilkan senyawa intermediet β -hidroksi kurkumin monokarbonil. Proses tersebut berlanjut pada pelepasan molekul air yang dikenal dengan peristiwa dehidrasi, sehingga dihasilkan senyawa analog kurkumin monokarbonil.

Reaksi sintesis tahap 1 ini berlangsung dalam 2 jam. Selesaiannya reaksi diamati melalui uji KLT dengan membandingkan R_f noda dan warna pendar pada campuran reaksi dengan R_f noda dan warna pendar dari 4-metoksibenzaldehid sebagai senyawa awal (*starting material*). Berdasarkan uji KLT tersebut, noda pada campuran reaksi memiliki R_f yang berbeda dengan noda senyawa awalnya. Selain itu, warna pendar antara produk dengan senyawa awal juga berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa awal tersebut telah berhasil diubah menjadi produk melalui reaksi tersebut.

Crude product diperoleh berupa padatan amorf berwarna kuning. Kemudian *crude product* tersebut diuji kemurniannya melalui uji KLT. Berdasarkan hasil pengujian dapat diamati bahwa terdapat dua noda pada plat KLT, sehingga diperlukan pemurnian untuk memurnikan *crude product* tersebut. Dalam hal ini, pemurnian dilakukan dengan mencuci padatan *crude product* dengan metanol dingin, lalu dibiarkan kering pada suhu ruang. Hasil pemurnian ini diperoleh padatan amorf berwarna kuning (Gambar 2) dengan % rendemen sebesar 95,11%.



Gambar 2. Padatan senyawa analog kurkumin monokarbonil tersubstitusi metoksi

Selanjutnya untuk mengecek kemurnian padatan hasil pencucian dengan metanol dingin, dilakukan uji KLT dengan 3 variasi eluen. Hasil uji KLT menggunakan ketiga eluan tersebut masing-masing menunjukkan noda tunggal dengan nilai *retardation factor* (R_f) = 0,30 (*n*-heksana: kloroform= 5:5), R_f = 0,48 (*n*-heksana: etil asetat= 3:7), dan R_f = 0,82 (metanol: etil asetat= 6:4). Nilai R_f merupakan nilai antara 0,2-0,8 yang menunjukkan kecepatan elusi dari suatu komponen senyawa dalam spot noda. Nilai R_f dihitung dengan membagi jarak tengah noda dari titik awal dengan jarak tempuh eluen. Nilai R_f ini bisa berbeda-beda dipengaruhi oleh sifat eluen yang digunakan (Rohman, 2009). Kemudian hasil pengukuran titik leleh menunjukkan bahwa senyawa analog kurkumin tersubstitusi metoksi tersebut memiliki titik leleh 197-198°C. Senyawa ini sebelumnya telah disintesis oleh Dimmock et al., (2001) dan dilaporkan memiliki titik leleh senyawa tersebut diperoleh pada 210-211 °C. Perbedaan titik leleh ini biasa terjadi pada padatan amorf. Amorf adalah zat padat yang tidak mempunyai struktur kristal yang dikenal dengan sebutan zat amorphous atau zat amorf (a: tidak, morf: bentuk). Partikel-partikel dari zat amorf tersebut tidak mempunyai bentuk tertentu dan bentuknya tidak permanen. Selain tidak memiliki struktur yang beraturan, susunan atomnya juga tidak seragam, sehingga zat amorf memiliki titik leleh yang tidak seragam (Shete et al., 2010).

Sintesis Senyawa Pirazolo Piridin

Setelah diperoleh senyawa analog kurkumin monokarbonil murni, selanjutnya produk reaksi tahap pertama tersebut kemudian digunakan sebagai *starting material* untuk sintesis tahap kedua. Pada tahap kedua,

senyawa pirazolo-piridin, (*E*)-7-(4-methoxybenzylidene)-3-(4-methoxyphenyl)-3,3a,4,5,6,7-hexahydro-2H-pyrazolo[4,3-*c*] pyridine disintesis dengan mereaksikan senyawa analog kurkumin monokarbonil dengan hidrazin hidrat dalam suasana basa dan etanol digunakan sebagai pelarut. Senyawa awal tersebut direaksikan dengan metode pemanasan menggunakan *monowave* 50. Penggunaan *monowave* 50 dapat menjadi alternatif yang berharga dan efisien. Teknologi pemanasan yang diterapkan pada alat ini memungkinkan untuk meniru laju pemanasan yang dihasilkan oleh reaktor *microwave* (Zamri et al, 2019).

Reaksi sintesis senyawa pirazolo-piridin dilakukan melalui reaksi adisi nukleofilik dan diikuti reaksi siklisasi intermolekuler (Mora et al., 2021). Reaksi ini dapat berlangsung dalam suasana asam maupun basa. Pada penelitian ini, reaksi berlangsung dalam suasana basa. Mekanisme reaksi tersebut diawali dengan basa yang merebut atom H pada gugus NH₂ hidrazin hidrat sehingga terbentuk ion NH yang bersifat nukleofil. Kemudian, nukleofil tersebut akan menyerang karbon pada gugus keton senyawa analog kurkumin yang bersifat elektrofilik, selanjutnya terjadi pembentukan rantai siklik pirazolin yang mengandung dua atom nitrogen melalui reaksi siklisasi intermolekuler.

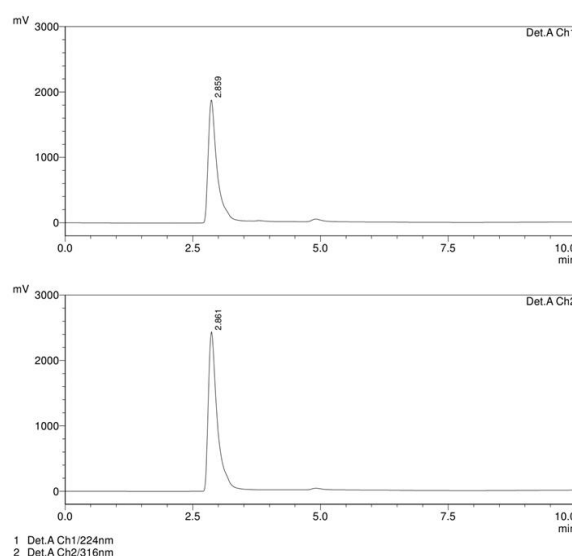
Crude product reaksi tahap dua ini juga menunjukkan lebih dari satu noda ketika diuji KLT. Sehingga dilakukan pencucian dengan metanol dingin dan padatan produk dibiarkan kering pada suhu ruang. Dari hasil pemurnian ini diperoleh padatan berwarna kuning pucat (Gambar 3) dengan % rendemen sebesar 31,51%. Rendemen pirazolo-piridin yang diperoleh masih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa metode pemanasan dengan *monowave* 50 kurang sesuai untuk diaplikasikan dalam sintesis pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi.



Gambar 3. Padatan senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi

Padatan produk yang telah dicuci kemudian diuji KLT dengan 3 variasi fase gerak. Hasil uji KLT menunjukkan satu noda dengan pendar biru di bawah lampu UV 366 nm dan pendar hitam di bawah lampu UV 254 nm. Hasil perhitungan nilai R_f diperoleh nilai R_f = 0,17 (*n*-heksana : kloroform = 5:5), R_f = 0,45 (*n*-heksana : etil asetat = 3:7), R_f = 0,77 (metanol : etil asetat = 7:3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa pirazolo-piridin hasil sintesis tahap dua ini telah murni.

Pengukuran titik leleh dan analisis HPLC kemudian dilakukan untuk memastikan kemurnian senyawa pirazolo-piridin. Hasil pengukuran titik leleh menunjukkan bahwa senyawa pirazolo-piridin memiliki titik leleh 144-145°C. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa padatan senyawa tersebut telah murni. Padatan murni biasanya menunjukkan jarak leleh yang tajam, yaitu $\leq 2^\circ\text{C}$ (Ikhtiarudin et al., 2022). Selain itu, hasil analisis HPLC senyawa pirazolo-piridin (Gambar 4) juga memperlihatkan satu puncak dominan pada menit ke 2,869 (detektor $\lambda=254$ nm) dan pada menit 2,861 (detektor $\lambda=316$ nm). Hasil analisis HPLC ini memperkuat kesimpulan bahwa senyawa pirazolo-piridin tersebut memiliki kemurnian yang baik.

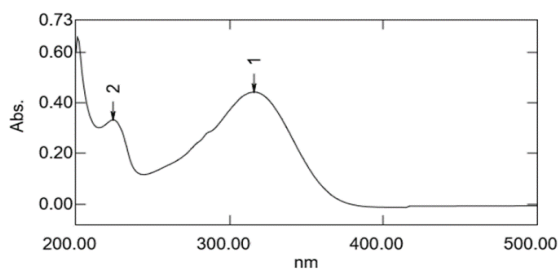


Gambar 4. Kromatogram hasil analisis HPLC senyawa pirazolo-piridin

Karakterisasi struktur senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi dilakukan melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FTIR, dan ¹H NMR. Pengukuran spektrum UV-Vis bertujuan untuk mengetahui keberadaan kromofor atau sistem konjugasi tertentu dalam suatu molekul. Kromofor adalah gugus tak jenuh (memiliki ikatan rangkap) yang bertanggung jawab terhadap penyerapan sinar UV oleh suatu molekul (Suhartati, 2017). Dengan demikian, adanya serapan pada spektrum UV-Vis menunjukkan bahwa pada molekul tersebut terdapat kromofor tertentu. Kromofor dapat berupa cincin benzena atau ikatan rangkap terkonjugasi. Dalam hal ini senyawa pirazolo-piridin menunjukkan serapan pada panjang gelombang maksimum 316 nm dan 224 nm (Gambar 5).

Serapan pada panjang gelombang maksimum 316 nm menunjukkan adanya transisi elektronik pada sistem konjugasi di cincin aromatik Ar'' (*p*-metoksi benziliden). Sedangkan serapan pada panjang gelombang maksimum 224 nm menunjukkan transisi

elektronik pada sistem konjugasi cincin aromatik Ar' (*p*-metoksifenil). Hal ini dikarenakan sistem konjugasi pada cincin aromatik Ar'' lebih panjang dari cincin aromatik Ar' yang mengakibatkan *splitting* orbital n dan π^* maupun π dan π^* pada cincin aromatik Ar'' menjadi lebih dekat, sehingga energi yang dibutuhkan untuk mengeksitasi elektron n maupun π menjadi lebih kecil, sehingga serapan yang dihasilkan oleh sistem konjugasi cincin aromatik Ar'' akan muncul pada panjang gelombang yang lebih kecil (Suhartati, 2017).

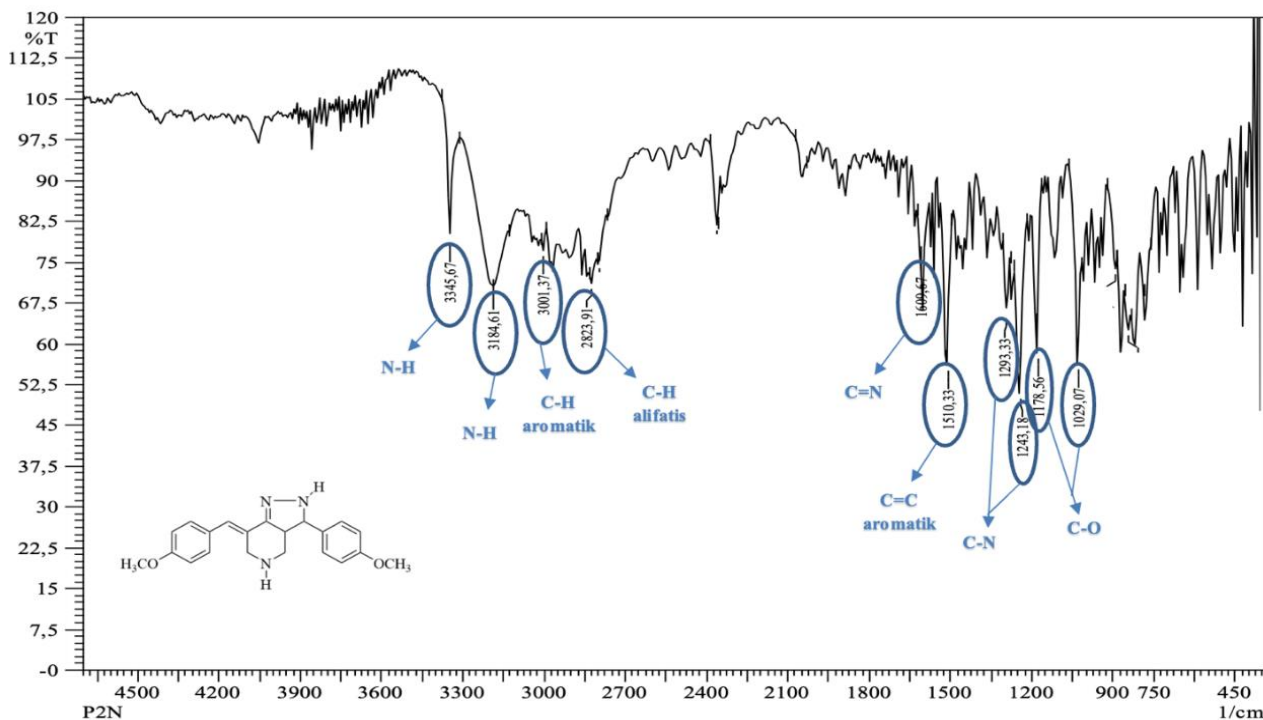


Gambar 5. Spektrum UV-Vis senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi

Pengukuran spektrum FT-IR dilakukan untuk memastikan apakah gugus fungsi dan jenis ikatan yang terdapat pada produk reaksi tahap dua telah sesuai dengan gugus fungsi dan jenis ikatan yang terdapat pada molekul target yang diinginkan (pirazolo-piridin). Spektrum FT-IR (Gambar 6) menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 3346 cm^{-1} yang dihasilkan oleh ikatan N-H pada cincin dihidropirazol, sedangkan

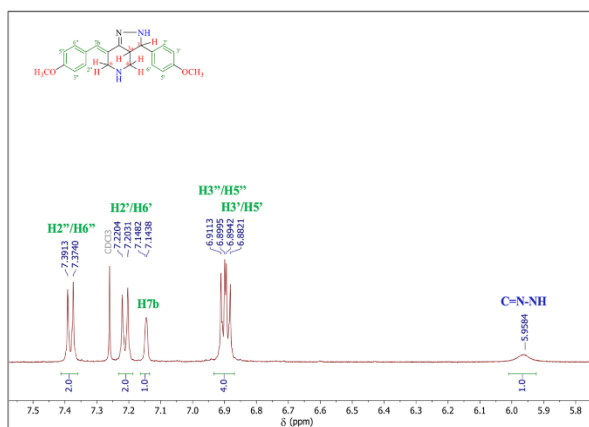
pita serapan pada 3185 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus N-H amina alifatik sekunder yang terdapat pada cincin heterosiklik tetrahidropiridin. Pita serapan pada bilangan gelombang 3001 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H aromatik pada kedua cincin fenil Ar' dan Ar'', sedangkan pita serapan pada bilangan gelombang 2824 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H alifatik yang terdapat pada kedua gugus metoksi dan cincin heterosiklik pirazolo-piridin. Selain itu pita serapan pada bilangan gelombang 1610 dan 1510 cm^{-1} masing-masing menunjukkan adanya ikatan C=N dan C=C aromatik. Kemudian pita serapan pada bilangan gelombang 1293-1243 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-N amina, sedangkan pita serapan pada bilangan gelombang 1789 dan 1029 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-O eter. Secara keseluruhan, spektrum FT-IR menunjukkan karakteristik struktur yang sesuai untuk senyawa pirazolo-piridin.

Pengukuran spektrum $^1\text{H-NMR}$ dilakukan untuk memastikan apakah jumlah dan jenis lingkungan kimia proton yang terdapat pada produk tahap dua sesuai dengan jumlah dan jenis lingkungan kimia proton yang terdapat pada struktur molekul target yang diinginkan (pirazolo-piridin). Perbesaran spektrum $^1\text{H NMR}$ senyawa pirazolo-piridin pada daerah proton aromatik (Gambar 7) menunjukkan sinyal-sinyal proton aromatik pada rentang pergeseran kimia 7,39-6,88 ppm dengan total integrasi 9H. Sinyal-sinyal ini dihasilkan oleh proton-proton aromatik yang terdapat pada kedua cincin fenil Ar' dan Ar'' serta proton H7b yang terikat pada sistem konjugasi cincin Ar''.

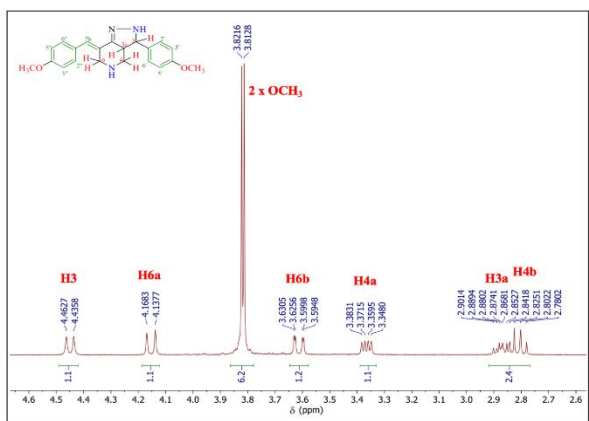


Gambar 6. Spektrum FTIR senyawa pyrazolo-piridin tersubstitusi metoksi

Perbesaran spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Gambar 8) pada daerah pergeseran proton alifatik juga menunjukkan sinyal-sinyal proton alifatik pada rentang pergeseran kimia 4,46-2,78 ppm dengan total integrasi 12H. Sinyal-sinyal ini dihasilkan oleh proton-proton alifatik yang terdapat pada kedua gugus metoksi dan pada cincin heterosiklik pirazolo-piridin. Kemudian dua buah *sinyal broad-singlet* (br-s) pada pergeseran kimia 5,96 dan 1,59 ppm masing-masing membuktikan bahwa pada struktur molekul produk reaksi tahap dua terdapat dua buah proton NH, yang terdapat pada cincin heterosiklik pirazolo-piridin.



Gambar 7. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa pirazolo-piridin (CDCl_3 , 500 MHz), perbesaran pada daerah aromatik



Gambar 8. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa pirazolo-piridin (CDCl_3 , 500 MHz), perbesaran pada daerah alifatik

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa pirazolo-piridin menunjukkan sinyal-sinyal proton ekuivalen yang khas untuk molekul dengan cincin aromatik yang mengikat dua substituen pada posisi para (1,4). Sinyal tersebut merupakan empat buah sinyal *doublet* (d) yang muncul pada pergeseran kimia 7,38; 7,21; 6,90 dan 6,89 ppm, masing-masing dengan nilai integrasi 2H dan konstanta kopling (J) sebesar 8,5 Hz. Sinyal-sinyal khas tersebut berturut-turut dihasilkan oleh proton $2''/6''$, $2'/6'$, $3''/5''$

dan $3'/5'$. Selanjutnya, sinyal *doublet* (d) pada pergeseran kimia 7,15 ppm dengan integrasi 1H dan nilai $J = 2,0$ Hz dihasilkan oleh proton 7b. Pemecahan pada sinyal proton 7b ini kemungkinan disebabkan karena korelasinya dengan proton alilik 6b pada cincin heterosiklik piridin.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa hasil sintesis tahap dua juga menunjukkan sinyal-sinyal proton alifatik yang khas untuk senyawa pirazolo-piridin seperti yang telah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Mora et al., 2021). Sinyal proton 3 muncul pada pergeseran kimia 4,45 ppm (1H) dengan bentuk *doublet* karena memiliki korelasi dengan proton 3a ($J=13,5$ Hz). Nilai konstanta *coupling* tersebut menunjukkan penjodohan visinal, di mana proton 3 dan 3a terikat pada karbon yang berbeda dan terletak pada posisi yang berlawanan dengan sudut sebesar 180° . Sinyal proton 3a muncul pada pergeseran kimia 2,88 ppm (1H) dengan bentuk *multiplet* karena memiliki korelasi dengan proton 3, 4a dan 4b. Sinyal proton 4a berada pada pergeseran kimia 3,37 ppm (1H) dengan bentuk *doublet of doublet* karena memiliki korelasi dengan proton 4b (*geminal coupling*) dan dengan proton 3a (*visinal coupling*) dengan nilai konstanta *coupling* masing-masing sebesar 12,0 dan 6,0 Hz. Sinyal proton 4b muncul pada pergeseran kimia 2,80 ppm (1H) dengan sinyal *triplet* karena memiliki korelasi pada proton 4a dan 3a dengan konstanta *coupling* sebesar 11,5 Hz. Kemudian sinyal proton 6a muncul pada pergeseran kimia 4,15 ppm (1H) dengan bentuk *doublet* karena memiliki korelasi dengan proton 6a (*geminal coupling*) dengan konstanta *coupling* sebesar 15 Hz. Sinyal proton 6b berada pada pergeseran kimia 3,61 ppm (1H) dengan bentuk *doublet of doublet* dengan nilai J masing-masing sebesar 15,5 Hz dan 2,0 Hz karena memiliki korelasi masing-masing dengan proton 6a (*geminal coupling*) dan proton 7b (*allylic coupling*). Selanjutnya sinyal dari kedua gugus metoksi (OCH_3) muncul pada 3,82 dan 3,81 ppm dengan puncak *singlet* dan total integrasi 6H. Dengan demikian, berdasarkan hasil analisis spektrum $^1\text{H NMR}$ ini dapat disimpulkan bahwa jumlah dan lingkungan kimia proton produk tahap dua yang diperoleh telah sesuai dengan struktur produk yang diinginkan.

Studi Molecular Docking sebagai Inhibitor COX-2

Selanjutnya, studi *molecular docking* dilakukan untuk mengeksplorasi potensi aktivitas senyawa hasil sintesis sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-2 (COX-2). Studi *molecular docking* dilakukan melalui beberapa tahapan sebagaimana yang telah dijelaskan pada prosedur, dimulai dari mengunduh dan melakukan preparasi struktur protein atau enzim yang akan digunakan, penyiapan database ligan, penandaan sisi aktif enzim, proses *docking*, dan diakhiri dengan visualisasi dan analisis data hasil *docking*. Dalam hal ini, struktur kristal COX-2 PDB 3LN1 dipilih karena pada sisi aktifnya terikat celecoxib, suatu inhibitor

COX-2 spesifik yang telah digunakan sebagai obat anti-inflamasi. Sehingga nantinya dapat dibandingkan pose pengikatan celecoxib hasil *redocking* dengan pose pengikatan celecoxib sebagai ligan bawaan atau *co-crystal ligand*. Hal ini penting untuk melakukan validasi protokol *docking* yang dipilih. Hasil *overlay* pose pengikatan celecoxib hasil *redocking* dan celecoxib ligan bawaan pada sisi aktif COX-2 dapat dilihat pada Gambar 9.

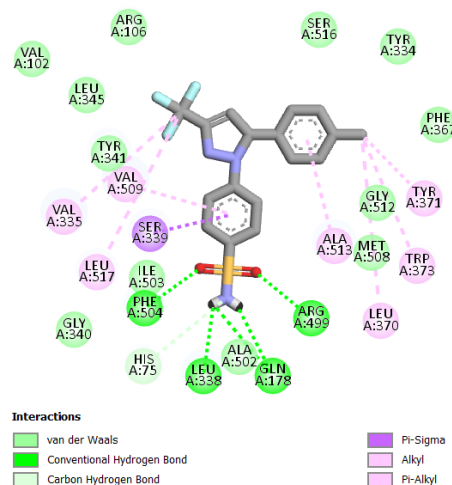
Berdasarkan gambar 9 dapat diamati bahwa celecoxib hasil *redocking* (warna kuning) memiliki pose pengikatan yang sangat mirip dengan pose pengikatan celecoxib ligan bawaan (warna *tosca*). Berdasarkan hasil *docking* pada tabel 1 juga menunjukkan bahwa celecoxib hasil *redocking* memiliki nilai RMSD kecil dari 2, sehingga dapat dikatakan bahwa protokol *docking* yang digunakan telah memenuhi syarat sebagai protokol *docking* yang baik dan dapat dipercaya (Sari et al., 2020; Ikhtiarudin et al., 2022b).

Hasil *docking* senyawa celecoxib sebagai inhibitor pambanding (kontrol positif) dan pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi dipresentasikan pada tabel 1. Berdasarkan tabel 1, dapat diamati bahwa celecoxib menunjukkan energi bebas pengikatan sebesar -11,97 kcal/mol dan mampu membentuk lima ikatan hidrogen dengan residu asam amino pada sisi aktif COX-2. Dalam hal ini, 2 ikatan hidrogen terbentuk dengan Gln178, dan masing-masing satu ikatan hidrogen terbentuk dengan asam amino Leu338, Arg499, dan Phe504. Selain itu, celecoxib juga dapat membentuk interaksi van der Waals dan beberapa jenis interaksi

lainnya dengan banyak asam amino pada sisi aktif COX-2, sebagaimana ditampilkan pada gambar 10.



Gambar 9. *Overlay* pose pengikatan celecoxib hasil *redocking* (kuning) dengan celecoxib ligan bawaan (*tosca*) pada sisi aktif COX-2.



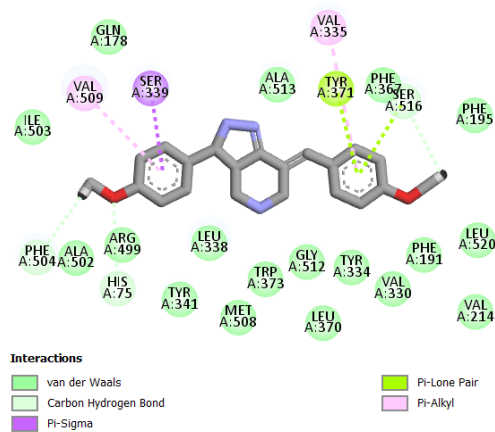
Gambar 10. Visualisasi interaksi celecoxib dengan asam amino pada sisi aktif COX-2.

Tabel 1. Hasil *redocking* celecoxib dan *docking* senyawa pirazolo-piridin (2) ke sisi aktif COX-2 (PDB ID: 3LN1)

Senyawa	S (kcal/mol)	RMSD	Jenis Interaksi		
			Ikatan hidrogen	van der Waals	Interaksi Lainnya
Celecoxib (Ligan bawaan)	-	-	Gln178, Leu338, Ser 339, Arg499, Phe504	His75, Val102, Arg106, Tyr334, Gly340, Tyr341, Leu345, Phe367, Ser516, Met508, Ala502, Ile503	Val335, Leu370, Tyr371, Trp373, Val509, Gly512, Ala513, Leu517,
Celecoxib (<i>Redocked</i>)	-11,97	1,27	Gln178, Leu338, Arg499, Phe504	Val102, Arg106, Tyr334, Gly340, Tyr341, Leu345, Phe367, Ala502, Ile503, Met508, Gly512, Ser516	His75 ^a , Val335 ^b , Ser339 ^c , Leu370 ^b , Tyr371 ^b , Trp373 ^b , Val509 ^b , Ala513 ^b , Leu517 ^b ,
Senyawa Pirazolo-piridin	-5,98	1,23	-	Ile503, Gln178, Ala513, Phe367, Phe195, Leu520, Val214, Phe191, Val330, Tyr334, Gly512, Leu370, Trp373, Met508, Leu338, Tyr341, Arg499, Ala502	His75 ^a , Val335 ^b , Ser339 ^c , Tyr371 ^d , Phe504 ^a , Val509 ^b , Ser516 ^a

Keterangan: ^a = ikatan hidrogen karbon (C-H---O atau C-H---N), ^b = Interaksi Pi-Alkyl, ^c = Interaksi Pi-Sigma, ^d = Interaksi Pi- Lone Pair

Hasil *docking* senyawa pirazolo-piridin pada tabel 1 menunjukkan nilai energi bebas pengikatan sebesar -5,98 kcal/mol. Nilai ini jauh berbeda dengan nilai energi bebas pengikatan celecoxib sebagai inhibitor pembanding. Selain itu, senyawa pirazolo-piridin juga tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan satupun asam amino pada sisi aktif COX-2. Senyawa pirazolo-piridin hanya dapat membentuk ikatan hidrogen karbon (C-H---O atau C-H---N) dengan asam amino His71, Phe594, dan Ser516. Namun, tentunya jenis ikatan hidrogen ini jauh lebih lemah dibandingkan dengan ikatan hidrogen konvensional (O-H---O) (Itoh et al., 2019; Gómez-Jeria et al., 2020). Selain itu, senyawa pirazolo-piridin juga dapat berinteraksi melalui interaksi van der Waals dan beberapa interaksi lain, sebagaimana dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Visualisasi interaksi pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi dengan asam amino pada sisi aktif COX-2.

Semakin negatif nilai *binding free energy* menunjukkan bahwa semakin mudah suatu ligan untuk berikatan pada sisi aktif protein (Purnomo, 2013). Dengan demikian, senyawa pirazolo-piridin yang memiliki energi bebas pengikatan sebesar -5,98 kcal/mol diprediksi sangat sulit untuk dapat berikatan dengan sisi aktif dari enzim COX-2. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa pirazolo-piridin tersebut tidak berpotensi sebagai inhibitor enzim COX-2.

Meskipun pada struktur senyawa pirazolo-piridin ini terdapat dua gugus N-H, yaitu 1 gugus N-H pirazolin dan 1 gugus N-H piridin, senyawa pirazolo-piridin tersebut teramati tidak dapat berikatan hidrogen dengan sisi aktif COX-2. Sedangkan gugus sulfonamida pada celecoxib teramati berperan penting pada pembentukan ikatan hidrogen antara celecoxib dengan sisi aktif COX-2. Hal ini didukung oleh beberapa literatur yang menyebutkan bahwa celecoxib memiliki kemampuan yang baik dalam membentuk ikatan hidrogen (Gedawy et al, 2020). Hal ini juga didukung oleh peneliti lainnya yang juga melaporkan

bahwa celecoxib dapat membentuk ikatan hidrogen dengan 6 asam amino, yaitu His75, Gln178, Leu338, Ser339, Arg499, dan Phe504. Interaksi ini diamati ketika celecoxib di-*docking* ke sisi aktif COX-2 menggunakan autodock vina (Pratama et al., 2021).

Berdasarkan visualisasi hasil *docking* pada gambar 10 dan 11 juga dapat diamati bahwa baik cincin pirazol yang terdapat pada senyawa pirazolo-piridin maupun celecoxib sama-sama teramati tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan sisi aktif COX-2. Hal ini menunjukkan bahwa hanya gugus sulfonamida pada cincin aromatik yang berperan penting untuk pembentukan ikatan hidrogen dengan sisi aktif COX-2. Tentunya ini dapat dijadikan sebagai dasar untuk desain inhibitor COX-2 berikutnya, dimana kita dapat mencoba mengganti *starting material* yang digunakan pada penelitian ini dengan *starting material* yang mengandung cincin aromatik tersubstitusi sulfonamida pada posisi para.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi dapat disintesis melalui dua tahap reaksi. Namun, rendemen hasil sintesis tahap dua yang diperoleh pada penelitian ini belum memuaskan, sehingga kedepannya diperlukan optimasi metode sintesis untuk mendapatkan rendemen yang lebih baik. Berdasarkan hasil *docking*, senyawa pirazolo-piridin tersubstitusi metoksi tersebut tidak berpotensi sebagai inhibitor COX-2, karena memiliki nilai energi bebas pengikatan yang masih sangat jauh selisihnya dibandingkan dengan celecoxib sebagai kontrol positif. Selain itu, senyawa pirazolo-piridin juga tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dengan satupun asam amino pada sisi aktif COX-2, sedangkan celecoxib sebagai inhibitor pembanding dapat membentuk lima ikatan hidrogen dengan asam amino pada sisi aktif COX-2. Selanjutnya, kehadiran gugus sulfonamida pada posisi para cincin fenil celecoxib teramati memiliki peran penting dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan asam amino Gln178, Leu338, Arg499, dan Phe504 pada sisi aktif COX-2. Sehingga, modifikasi struktur pirazolo-piridin kedepannya dengan mengganti *starting material* dengan suatu senyawa aromatik yang tersubstitusi gugus sulfonamida pada posisi para menjadi suatu hal yang perlu dipertimbangkan untuk meningkatkan kemampuan senyawa pirazolo-piridin dalam membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif COX-2.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada promotor saya, STIFAR Riau dan laboratorium sintesis

organik FMIPA Universitas Riau yang telah memberi dukungan *financial* terhadap penelitian ini melalui bantuan studi lanjut doktoral.

CONFLICT OF INTEREST

Penulis menyatakan bahwa tidak ada *conflict of interest* pada penulisan artikel ini.

REFERENSI

- Abdellatif, K.R., El-Saadi, M.T., Shaimaa G Elzayat, S.G., and Amin, N.H. 2019. New substituted pyrazole derivatives targeting COXs as potential safe anti-inflammatory agents. *Future Med Chem*, **11(15)**:1871-1882.
- Azizur, R. & Anees, A.S. 2010. Pyrazoline Derivatives: A Worthy Insight Into The Recent Advances and Potential Pharmacological Activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. **2(3)**: 165-175.
- Bhuiyan, M. M. H., Hossain, M. I., Mahmud, M. M. and Al-Amin, M. 2011. Microwave-assisted Efficient Synthesis of Chalcones as Probes for Antimicrobial Activities. *Chemistry Journal*, **1(1)**: 21-28.
- Bilavendran, J.D., Manikandan, A., Thangarasu, P., and Sivakumar, K. 2020. Synthesis and discovery of pyrazolo-pyridine analogues as inflammation medication through pro-and inflammatory cytokine and COX-2 inhibition assessments. *Bioorganic chemistry*, **94**: 103484.
- Costa, R.F., Turones, L.C., Cavalcante, K.V.N., Júnior, I.A.R., Xavier, C.H., Rosseto, L.P., Napolitano, H.B., Castro, P.F.S., Neto, M.L.F., Galvão, G.M., Menegatti, R., Pedrino, G.R., Costa, E.A., Martins, J.L.R., and Fajemiroye, J.O. 2021. Heterocyclic compounds: pharmacology of pyrazole analogs from rational structural considerations. Mini Review. *Frontiers in Pharmacology*. **12**: 666725.
- Dimmock, J.R., Padmanilayam, M.P., Puthucode, R.N., Nazarali, A.J., Motaganahalli, N.L., Zello, G.A., Quail, J.W., Oloo, E.O., Kraatz, H.B., Prisciak, J.S., Allen, T.M., Santos, C.L., Balzarini, J., De Clercq, E., and Manavathu, E.K. 2001. A Conformational and Structure Activity Relationship Study of Cytotoxic 3,5-Bis(Arylidene)-4-Piperidones and Related N-Acryloyl Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*. **44(4)**: 586-593.
- FDA. 2021a. Drug Trials Snapshot: VERQUVO. Available online at <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshot-verquvo>. Diakses pada 11 April 2023.
- FDA. 2021b. FDA approves asciminib for Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. Available online at <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-asciminib-philadelphia-chromosome-positive-chronic-myeloid-leukemia>. Diakses pada 11 April 2023.
- Gedawy, E.M., Kassab, A.E. and Kerdawy, A.M.E. 2020. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Pyrazole Sulfonamide Derivates as Dual COX-2/5-LOX Inhibitors. Elsevier. **189**:112066.
- Gómez-Jeria, J.S., Robles-Navarro, A., Kpotin, G.A., Garrido-Sáez, N., Gatica-Díaz, N. 2020. Some remarks about the relationships between the common skeleton concept within the Klopman-Peradejordi-Gómez QSAR method and the weak molecule-site interactions. *Chemistry Research Journal*, **5(2)**: 32-52.
- Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Frimayanti, N., Harlianti T., Jasril. 2020. Microwave-assisted synthesis of 1-(4-hydroxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one and its activities as an antioxidant, sunscreen, and antibacterial. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, **23(2)**: 51-60.
- Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Frimayanti, N., Mora, E., Nofriyanti, Rahmawati, R.D., and Zamri, A. 2022a. Sintesis, karakterisasi struktur, dan kajian *molecular docking* senyawa 4'-metoksi flavonol sebagai inhibitor main protease (Mpro) SARS-CoV-2. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, **26(1)**: 8-14.
- Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Harlianti T., Zamri, A. 2019. Sintesis dan potensi aktivitas tabir surya senyawa analog kalkon turunan 3'-hidroksiasetofenon dan 4-metoksibenzaldehid. *Jurnal Photon*, **10(1)**: 1-12.
- Ikhtiarudin, I., Dona, R., Frimayanti, N., Utami, R., Susianti, N., Septama, A.W. 2022b. Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian *Molecular Docking* Senyawa Turunan 4'-Metoksi Flavonol sebagai Antagonis *Estrogen Reseptor Alpha* (ER- α) pada Kanker Payudara. *Jurnal Riset Kimia*, **13(2)**: 236-248.
- Ikhtiarudin, I., Frimayanti, N., Teruna, H.Y., and Zamri, A. 2017. Microwave-Assisted Synthesis, Molecular Docking Study and In Vitro Evaluation of Halogen Substituted Flavonols Against P388 Murine Leukemia Cells.

- Prosiding ICST 2016 in *Applied Science and Technology*, **1(1)**: 375-381.
- Ikhtiarudin, I., Lelani, Zamri, A., Teruna, H.Y., and Yuharmen. 2014. Sintesis dan uji toksisitas senyawa analog kalkon turunan 2'-hidroksi asetofenon dan halobenzaldehid. *Jurnal Photon*, **5(1)**: 57-63.
- Itoh, Y., Nakashima, Y., Tsukamoto, S., Kurohara, T., Suzuki, M. Sakae, Y., Oda, M., Okamoto, Y., and Suzuki, T. 2019. N⁺-C-H...O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Scientific Reports*, **9**: 767.
- Jaishree, D. M., Manoja, S. C., Balsere, N. G., dan Rajput, P. R. 2010. Synthesis and study of chlorosubstituted 4-aryl and 4-alkoyl-pyrazolines, pyrazoles and their effect on some flowering plants. *Indian Journal of Chemistry*, **49**: 505-555.
- Jasril, J., Ikhtiarudin, I., Nurulita, Y., and Nurisma. 2020. Microwave-assisted synthesis and antioxidant activity of an imine, (*E*)-1-(3-bromobenzylidene)-2-phenylhydrazine. *AIP Conference Proceedings*, **2242**, 040041.
- Jasril, Teruna, H.Y., Aisyah, Nurlaili, and Hendra, R. 2019. Microwave Assisted Synthesis and Evaluation of Toxicity and Antioxidant Activity of Pyrazoline Derivatives. *Indones. J. Chem.*, **19(3)**: 583-591.
- Jasril, Teruna, H.Y., Frimayanti, N., Hasti, S., and Ikhtiarudin, I. 2019. Design, molecular docking study, synthesis and in vivo evaluation of some bromonaphthyl pyrazolines as new anti-inflammatory agents. In *Empowering Science and Mathematics for Global Competitiveness*. Rahmawati & Taylor (Eds). Taylor & Francis Group, London.
- Mora, E., Teruna, H.Y., Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Herfindo, N., Zamri, A. 2023. Synthesis, molecular docking study, and in vivo biological evaluation of pyrazolopyridines derived from monocarbonyl curcumin analogues as potential anti-inflammatory agents. *Pharmacy Education*, **23(2)**: 200-206.
- Mora, E., Zamri, A., Teruna, H.Y., Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Herfindo, N., and Rindiana, E.N. 2021. (*E*)-5-Benzyl-7-(3,4-dimethoxybenzylidene)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-phenyl-3,3a,4,5,6,7-hexahydro-2*H*-pyrazolo[4,3*c*]Pyridine. *Molbank* **2021**: M1240.
- Pratama, M.R.F., Poerwono, H. and Siswodiharjo, S. 2021. Introducing a two-dimensional graph of docking score difference vs. similarity of ligand-receptor interaction. *Indonesian Journal of Biotechnology*, **26(1)**: 54-60.
- Purnomo, Hari. 2013. *Kimia Komputasi Untuk Farmasi dan Ilmu Terkait (Uji In siliko Senyawa Antikanker)*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Ravichandran, S. & Karthikeyan, E. 2011. Microwave synthesis - A potential tool for green chemistry. *International Journal of ChemTech Research*, **3(1)**: 466-467.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*, Ed I. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sari, I. W., Junaidin, J. & Pratiwi, D. 2020. Studi molekular docking senyawa flavonoid herba kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) pada reseptor α -glukosidase sebagai antidiabetes tipe 2. *J. Farmagazine*, **7(2)**: 54-60.
- Shete, G., Puri, V., Kumar, L., and Bansal, A.K. 2010. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*, **11(2)**: 598-609.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa organik*. Bandar Lampung: AURA.
- Valasani, K.R., Vangavaragu, J.R., Day, V.W. & Yan, S.S. 2014. Structure based design, synthesis, pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies for identification of novel cyclophilin D inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **54(3)**: 90-120.
- Zamri, A., Teruna, H.Y., and Ikhtiarudin, I. 2016. Pengaruh variasi daya terhadap selektivitas reaksi sintesis analog 2'-hidroksikalkon menggunakan iradiasi gelombang mikro. *Molekul*, **11(2)**: 299-307
- Zamri, A., Teruna, H.Y., Wulansari, S., Herfindo, N., Frimayanti, N. and Ikhtiarudin, I. 2019. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-(2-fluorophenyl)-1-phenyl-4,5-dihidro-1*H*-pirazole. *Molbank*, **2019**: M1088.