

## Pemodelan Molekul, Sintesis dan Penentuan Aktivitas Antineoplastik 1-(4-Trifluorometilbenzoiloksi)Urea

### (Molecular Modeling, Synthesis and Antineoplastic Activity of 1-(4-Trifluoromethylbenzoyloxy)Urea)

SUKO HARDJONO\*

Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Kampus B, Jln. Dharmawangsa Dalam, Surabaya  
60282, Indonesia.

Diterima 12 Februari 2016, Disetujui 16 Maret 2016

**Abstrak:** To design new drugs, physical-chemical characteristics of drug molecules can be predicted by *in silico* test before drugs are synthesized. Ribonucleotide reductase is the main target or receptor of antineoplastic compounds such as hydroxyurea (HU) and its derivatives like 1-(4-trifluoromethylbenzoyloxy)urea or 4-CF<sub>3</sub>BOU. This compound forms a complex with crystal structure of ribonucleotide reductase I enzyme, which is 2EUD. The hydrogen bond and bond energy in the form of rerank score from both complexes was calculated with Molegro program. Theoretically, compound activity is indicated by rerank score. The compound whose rerank score is small is predicted to have greater activity. The activity of 4-CF<sub>3</sub>BOU was found to be greater than HU. The reaction mechanism of synthesis 4-CF<sub>3</sub>BOU was the substitution of nucleophilic hydroxyl group from HU to carbonyl group of 4-trifluoromethylbenzoyl chloride (4-CF<sub>3</sub>BCl). Purity test was conducted using TLC and melting point. Structure identification was performed based on the spectra of UV-VIS, FT-IR, H/C-NMR and MS. In this study, 4-CF<sub>3</sub>BOU was discovered to have antineoplastic activity with the IC<sub>50</sub> value of 82.37 µg/mL and was tested towards HeLa cells. On the other hand, HU had the IC<sub>50</sub> value of 430.21 µg/mL. The antineoplastic activity of 4-CF<sub>3</sub>BOU was greater than HU.

**Keywords:** 1-(4-trifluoromethylbenzoyloxy)urea, *in silico* test, synthesis, antineoplastic activity test.

**Abstrak:** Untuk merancang obat baru, sifat fisikokimia molekul obat dapat diprediksi sebelum disintesis dan dimurnikan melalui uji *in silico*. Ribonukleotida reduktase merupakan target utama atau reseptor dari senyawa antineoplastik seperti hidroksiurea (HU) dan turunannya, yaitu 1-(4-trifluorometilbenzoiloksi) urea atau 4-CF<sub>3</sub>BOU. Senyawa ini membentuk kompleks dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. Jumlah ikatan hidrogen dan energi ikatan berupa *rerank score* dari kompleks keduanya dihitung dengan program Molegro. Secara teoretis, aktivitas senyawa ditunjukkan oleh *rerank score*. Senyawa yang mempunyai *rerank score* kecil diprediksi aktivitasnya besar. Senyawa 4-CF<sub>3</sub>BOU diprediksi memiliki aktivitas lebih besar dibanding HU. Mekanisme reaksi sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU adalah masuknya gugus nukleofilik hidroksil dari HU pada gugus karbonil dari 4-trifluorometilbenzoil klorida (4-CF<sub>3</sub>BCl). Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan KLT dan penentuan titik lebur. Identifikasi struktur dilakukan berdasarkan spektra UV-VIS, FT-IR, H/C-RMI, dan MS. Dalam penelitian ini, 4-CF<sub>3</sub>BOU telah berhasil disintesis dan setelah diuji aktivitas antineoplastiknya terhadap sel HeLa mempunyai IC<sub>50</sub> sebesar 82,37 µg/mL, sedangkan HU mempunyai IC<sub>50</sub> 430,21 µg/mL. Aktivitas antineoplastik 4-CF<sub>3</sub>BOU lebih besar dibanding HU.

**Kata kunci:** 1-(4-trifluorometilbenzoiloksi)urea, uji *in silico*, sintesis, uji aktivitas antineoplastik.

\* Penulis korespondensi, Hp. 0818311345  
e-mail: suko.hardjono@yahoo.com

## PENDAHULUAN

HIDROKSIUREA (HU) merupakan senyawa yang sampai saat ini masih digunakan sebagai obat antikanker karena memiliki aktivitas antineoplastik untuk menghambat enzim ribonukleotida reduktase. Fungsi enzim ini adalah pada biosintesis DNA dengan mengkonversi ribonukleotida menjadi deoksiribonukleotida pada fase S<sup>(1)</sup>.

Modifikasi struktur melalui substitusi pada senyawa induk akan mengubah efek lipofilik, elektronik dan sterik<sup>(2)</sup>. Beberapa derivat urea telah diteliti sebagai calon obat antikanker. Senyawa tersebut adalah feniltiourea, benzoilfenilurea, fenilurea, benzoilurea, tiourea, *N.N.* diarilurea, asiltiourea dan tiourea  $\alpha$ -aminofosfonate<sup>(3)</sup>. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi struktur dari hidroksiurea (HU) menjadi 1-(4-trifluorometilbenzoiloksi)urea atau 4-CF<sub>3</sub>BOU.

Untuk merancang obat baru, perubahan aktivitas calon obat dapat diprediksi sebelum senyawa baru disintesis, melalui uji *in silico*. Uji *in silico* merupakan uji yang dilakukan dengan melalui simulasi komputer. Uji *in silico* digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan untuk meningkatkan efisiensi dalam optimasi aktivitas senyawa induk<sup>(3,4)</sup>. Hasil uji *in silico* antara lain adalah jumlah ikatan yang terjadi dan nilai *rerank score* yang merupakan energi interaksi molekul antara sel target dan ligan.

Enzim ribonukleotida reduktase digunakan sebagai target utama atau reseptor dari senyawa antikanker HU dan turunannya seperti 4-CF<sub>3</sub>BOU. Kedua senyawa ini membentuk kompleks dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD<sup>(3,5)</sup>. Tujuan uji *in silico* adalah untuk mengetahui interaksi antara 4-CF<sub>3</sub>BOU dengan 2EUD, dalam upaya memprediksi aktivitas antineoplastiknya. Setelah dapat diprediksi aktivitas antineoplastiknya kemudian dilakukan sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU melalui reaksi substitusi nukleofilik HU dengan 4-CF<sub>3</sub>BCl. Setelah terbukti bahwa senyawa hasil sintesis adalah 4-CF<sub>3</sub>BOU, maka dilakukan uji aktivitasnya secara *in vitro* dalam membunuh sel HeLa dibandingkan HU.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Hidroksiurea, 4-trifluorometilbenzoil klorida, tetrahidrofuran, trietilamina, etanol, DMSO, aseton, kalium bromida (KBr), media kultur DMEM, pereaksi MTT dan SDS.

**METODE.** Uji *in silico* dilakukan terhadap HU dan 4-CF<sub>3</sub>BOU yang membentuk kompleks dengan struktur kristal dari enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. Untuk menggambarkan interaksi dan

menghitung energi ikatan antara HU dan 4-CF<sub>3</sub>BOU dengan 2EUD digunakan program Molegro<sup>(3,5)</sup>.

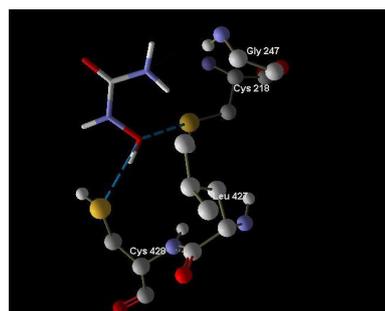
**Sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU.** Sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU dari HU dilakukan melalui reaksi substitusi nukleofilik HU terhadap 4-CF<sub>3</sub>BCl dalam pelarut tetrahidrofuran. Sebagai katalis digunakan trietilamin yang sekaligus untuk menangkap HCl yang dihasilkan<sup>(3,6,7)</sup>.

**Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Struktur.** Uji KLT dilakukan dengan tiga eluen dan uji jarak lebur digunakan untuk menunjukkan kemurnian senyawa hasil sintesis<sup>(3,8)</sup>. Identifikasi struktur dilakukan berdasarkan spektra ultra violet (UV-vis), infra merah (FT-IR), H/C resonansi magnet inti (RMI) dan spektrometer massa (MS)<sup>(3,9)</sup>.

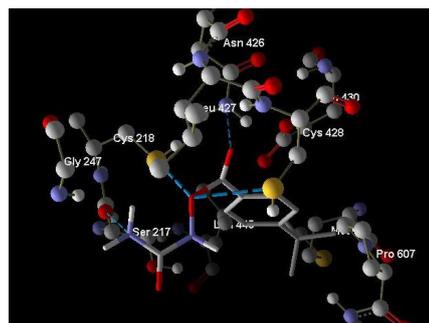
**Uji Aktivitas Antineoplastik.** Uji antineoplastik dilakukan dengan menentukan nilai IC<sub>50</sub> 4-CF<sub>3</sub>BOU dalam membunuh sel HeLa, dibandingkan HU<sup>(3,10)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

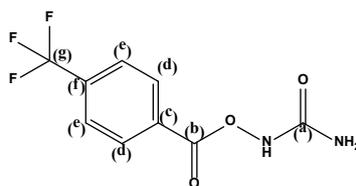
**Pemodelan Molekul.** Pada uji *in silico* terhadap HU didapatkan dua ikatan hidrogen antara HU dengan 2EUD. Ikatan hidrogen terjadi antara atom O gugus hidroksil dari HU dengan asam amino sistein 428 dan sistein 218 yang terdapat pada 2EUD. Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada Gambar 1, sedangkan untuk 4-CF<sub>3</sub>BOU didapatkan lima ikatan hidrogen antara atom O pada gugus ester dengan sistein 428 dan sistein 218, antara atom N dari gugus amina dengan serin 217 dan antara atom O dari gugus benzoil dengan leusin 427 dan asparagin 426<sup>(3,10)</sup>. Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada Gambar 2.



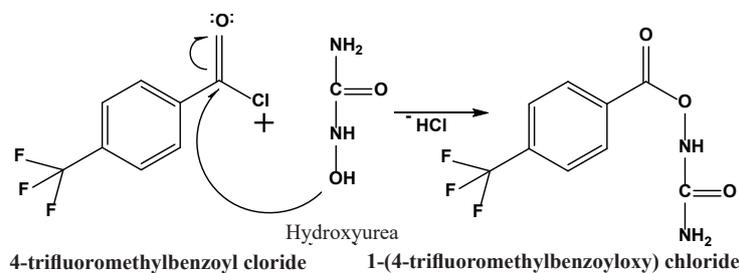
Gambar 1. Ikatan hidrogen antara HU dan 2EUD.



Gambar 2. Ikatan hidrogen antara 4-CF<sub>3</sub>BOU dan 2EUD.

Tabel 1. Hasil spektrum UV, IR, <sup>1</sup>HRMI, <sup>13</sup>CRMI dan MS dari 4-CF<sub>3</sub>BOU.

Jenis spektrum	Hasil
Spektrum UV, λ maks (nm) dalam etanol	226 dan 274
Spektrum IR, ν (cm <sup>-1</sup> ) dalam pelet KBr	3438 (-NH); 3231 dan 3186 (-NH <sub>2</sub> ); 1751 (-C=O ester); 1717 (-C=O amida); 1515 dan 1432 (-C=C- aromatik), 1014 (-C-O-) dan 771(-C-H aromatik).
Spektrum <sup>1</sup> HRMI, δ (μg/mL) dalam DMSO-D6	9.89, s (H pada NH); 8.18, d (2H pada inti benzena =d); 7.88, d (2H pada inti benzena=e); 6.65, s (2H pada NH <sub>2</sub> ).
Spektrum <sup>13</sup> CMRI, δ (μg/mL) dalam DMSO-D6	Atom C pada 163,9 μg/mL (b), 159,1 μg/mL (a), 132,4 μg/mL (f) 131,6 μg/mL (c), 131,4 μg/mL (d), 130,2 μg/mL (e), 125,7 μg/mL (g).
Spektrum MS (m/e)	HRMS (m/z): massa terhitung untuk C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> F <sub>3</sub> 249,0487 dan massa terukur 249,0458.

Gambar 3. Mekanisme reaksi sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU.

Dari perhitungan energi ikatan antara HU dan 2EUD didapatkan *rerank score*: - 43,3565 sedangkan antara 4-CF<sub>3</sub>BOU dan 2EUD didapatkan *rerank score*: -82,9755.

Senyawa hasil sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU berupa kristal putih dengan titik leleh 180-181°C. Nilai Rf: 0,92 (heksana : aseton = 2:3), 0,72 (kloroform : etil asetat = 3:7) dan 0,81 (heksana : etil asetat : metanol = 2:3:1). Hasil spektra UV, IR, <sup>1</sup>HRMI, <sup>13</sup>CRMI dan MS dari 4-CF<sub>3</sub>BOU dapat dilihat pada Tabel 1<sup>(3,8,10)</sup>.

Dari hasil uji *in silico* dapat diketahui bahwa jumlah ikatan hidrogen antara molekul 4-CF<sub>3</sub>BOU dan 2EUD lebih banyak dibanding ikatan hidrogen antara HU dan 2EUD. Dari jumlah ikatan hidrogen dapat diprediksi bahwa makin banyak ikatan hidrogen maka ikatan antar molekulnya lebih kuat. Semakin kuat ikatan ligan dengan reseptor maka diprediksi aktivitasnya juga semakin besar sehingga ikatan antar molekulnya lebih kuat. Dari jumlah ikatan hidrogen dapat diprediksi bahwa aktivitas 4-CF<sub>3</sub>BOU lebih besar dibanding HU. Energi ikatan yang digambarkan dengan *rerank score* menunjukkan bahwa energi ikatan antara 4-CF<sub>3</sub>BOU dan 2EUD lebih kecil dibanding energi ikatan antara HU dan 2EUD. Semakin kecil energi ikatan menunjukkan bahwa ikatan tersebut semakin stabil. Semakin stabil ikatan ligan dengan

reseptor maka dapat diprediksi aktivitasnya semakin besar. Berdasarkan besarnya energi ikatan ligan reseptor menunjukkan bahwa aktivitas 4-CF<sub>3</sub>BOU lebih besar dibanding HU.

Hasil sintesis 4-CF<sub>3</sub>BOU berupa kristal putih dengan titik lebur 180-181°C. Dari titik lebur yang bedanya tidak lebih dari dua derajat celsius menunjukkan bahwa kristal yang dihasilkan murni. Kemurnian juga ditunjukkan dengan adanya satu noda dari senyawa hasil reaksi pada lempeng KLT dengan tiga macam eluen. Nilai Rf dari hasil KLT adalah 0,80 (heksana : aseton = 2:3), 0,78 (kloroform : etil asetat = 3:7), dan 0,87 (heksana : etil asetat : metanol = 2:3:1).

Karakterisasi struktur dilakukan dengan menganalisis spektrum UV, IR, <sup>1</sup>HRMI, <sup>13</sup>CRMI dan MS dari senyawa hasil sintesis. Dari karakterisasi tersebut dapat disimpulkan bahwa zat yang disintesis adalah 4-CF<sub>3</sub>BOU.

Dari uji *in vitro* menggunakan sel HeLa dengan metoda MTT didapatkan nilai IC<sub>50</sub> dari 4-CF<sub>3</sub>BOU adalah 82,37 μg/mL dan nilai IC<sub>50</sub> dari HU adalah 430,21 μg/mL. Makin kecil nilai IC<sub>50</sub> berarti senyawa tersebut aktivitasnya semakin besar. Dari hasil uji *in vitro* dapat disimpulkan bahwa 4-CF<sub>3</sub>BOU mempunyai aktivitas lebih besar dibanding HU.

**SIMPULAN**

Dari hasil uji *in silico* dapat diprediksi bahwa 4-CF<sub>3</sub>BOU lebih aktif dibanding HU. Senyawa yang dihasilkan adalah 4-CF<sub>3</sub>BOU sesuai karakterisasi menggunakan spektra UV, IR, <sup>1</sup>H RMI, <sup>13</sup>C RMI dan MS. Aktivitas antineoplastik 4-CF<sub>3</sub>BOU lebih besar dibanding HU.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini. Terima kasih dan penghargaan disampaikan kepada Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS. dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sebagai promotor dan yang mempunyai lisensi program Molegro, Prof. Dr. Puwanto, Apt. dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sebagai *co-promotor*, Prof. Drs. Win Darmanto, MSi., Ph.D. dari Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai *co-promotor*, Prof. Honda dari Hoshi University, Jepang, yang telah membantu menginterpretasi data spektrum MS, Prof. Supargiyono, DTM & H, SU., Sp.Par (K), sebagai Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, yang telah mengizinkan saya untuk mempelajari dan menentukan aktivitas antineoplastik.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Salim AK. 2004, Genetics and molecular biology. Sau Paulo. 2004. 27(1).
2. Korolkovas A. Essentials of medicinal chemistry, 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons; 1988. 590-697.
3. Hardjono S, Siswandono, Purwanto, Darmanto W. Quantitative structure-cytotoxic activity relationship 1-(benzoyloxy)urea and its derivative. Curr Drug Discov Technol. 2016. 13(2).
4. Istyastono E.P., (<http://www.komputasi.lipi.go.id>. 16/12/2007), 2007.
5. Xu H, Faber C, Uchiki T, Racca J, Dealwis C. Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. PNAS. 2006. 103(11): 4028-33.
6. Clayden, Greeves, Warren, Wothers. Organic chemistry. New York: Oxford University Press; 2001. 279-303.
7. Zinner G, Staffel R. Carbamoylation of hydroxylamine derivatives. Arc Pharm Ber Ges. 1969: 438-47.
8. Hardjono S, Modifikasi struktur 1-(benzoioksi) urea dan hubungan kuantitatif struktur-aktivitas sitotoksiknya [disertasi]. Surabaya: Universitas Airlangga; 2012.
9. Silverstein RM, Webster FX and Kiemle DJ. Spectrofotometric identification of organic compound. 7<sup>th</sup> Ed. New York: John Wiley and Sons Inc; 2005.
10. CCRC UGM, (<http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/protokol>. 20/3/2012). 2012.