

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-CF₃BOU. 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-CF₃BOU was found to be greater than HU. The reaction mechanism of synthesis 4-CF₃BOU was the substitution of nucleophilic hydroxyl group from HU to carbonyl group of 4-trifluoromethylbenzoyl chloride (4-CF₃BCl). 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-CF₃BOU was discovered to have antineoplastic activity with the IC₅₀ value of 82.37 µg/mL and was tested towards HeLa cells. On the other hand, HU had the IC₅₀ value of 430.21 µg/mL. The antineoplastic activity of 4-CF₃BOU 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-CF₃BOU. 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-CF₃BOU diprediksi memiliki aktivitas lebih besar dibanding HU. Mekanisme reaksi sintesis 4-CF₃BOU adalah masuknya gugus nukleofilik hidroksil dari HU pada gugus karbonil dari 4-trifluorometilbenzoil klorida (4-CF₃BCl). 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-CF₃BOU telah berhasil disintesis dan setelah diuji aktivitas antineoplastiknya terhadap sel HeLa mempunyai IC₅₀ sebesar 82,37 µg/mL, sedangkan HU mempunyai IC₅₀ 430,21 µg/mL. Aktivitas antineoplastik 4-CF₃BOU 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⁽¹⁾.

Modifikasi struktur melalui substitusi pada senyawa induk akan mengubah efek lipofilik, elektronik dan sterik⁽²⁾. Beberapa derivat urea telah diteliti sebagai calon obat antikanker. Senyawa tersebut adalah feniltiourea, benzoilfenilurea, fenilurea, benzoilurea, tiourea, *N.N.* diarilurea, asiltiourea dan tiourea α -aminofosfonate⁽³⁾. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi struktur dari hidroksiurea (HU) menjadi 1-(4-trifluorometilbenzoiloksi)urea atau 4-CF₃BOU.

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^(3,4). 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-CF₃BOU. Kedua senyawa ini membentuk kompleks dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD^(3,5). Tujuan uji *in silico* adalah untuk mengetahui interaksi antara 4-CF₃BOU dengan 2EUD, dalam upaya memprediksi aktivitas antineoplastiknya. Setelah dapat diprediksi aktivitas antineoplastiknya kemudian dilakukan sintesis 4-CF₃BOU melalui reaksi substitusi nukleofilik HU dengan 4-CF₃BCl. Setelah terbukti bahwa senyawa hasil sintesis adalah 4-CF₃BOU, 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-CF₃BOU yang membentuk kompleks dengan struktur kristal dari enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. Untuk menggambarkan interaksi dan

menghitung energi ikatan antara HU dan 4-CF₃BOU dengan 2EUD digunakan program Molegro^(3,5).

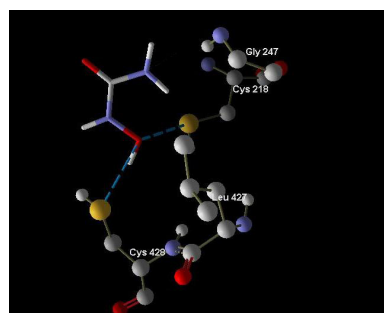
Sintesis 4-CF₃BOU. Sintesis 4-CF₃BOU dari HU dilakukan melalui reaksi substitusi nukleofilik HU terhadap 4-CF₃BCl dalam pelarut tetrahidrofuran. Sebagai katalis digunakan trietilamin yang sekaligus untuk menangkap HCl yang dihasilkan^(3,6,7).

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^(3,8). Identifikasi struktur dilakukan berdasarkan spektra ultra violet (UV-vis), infra merah (FT-IR), H/C resonansi magnet inti (RMI) dan spektrometer massa (MS)^(3,9).

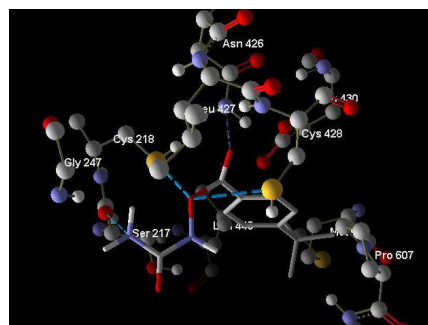
Uji Aktivitas Antineoplastik. Uji antineoplastik dilakukan dengan menentukan nilai IC₅₀ 4-CF₃BOU dalam membunuh sel HeLa, dibandingkan HU^(3,10).

HASIL DAN PEMBAHASAN

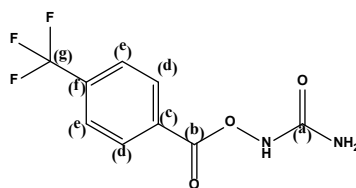
Pemodelan Molekul. Pada uji *in silico* terhadap HU didapatkan dua ikatan hidrogen antara HU dengan 2EUD. Ikatan hidrogen terjadi antara atom O gugus hidroksil dari HU dengan asam amino sistein 428 dan sistein 218 yang terdapat pada 2EUD. Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada Gambar 1, sedangkan untuk 4-CF₃BOU 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^(3,10). Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada Gambar 2.



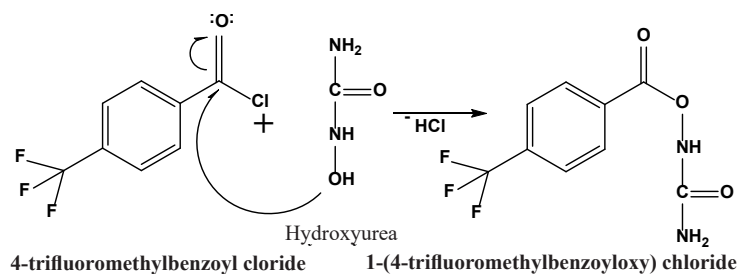
Gambar 1. Ikatan hidrogen antara HU dan 2EUD.



Gambar 2. Ikatan hidrogen antara 4-CF₃BOU dan 2EUD.

Tabel 1. Hasil spektrum UV, IR, ¹HRMI, ¹³CRMI dan MS dari 4-CF₃BOU.

Jenis spektrum	Hasil
Spektrum UV, λ maks (nm) dalam etanol	226 dan 274
Spektrum IR, ν (cm ⁻¹) dalam pelet KBr	3438 (-NH); 3231 dan 3186 (-NH ₂); 1751 (-C=O ester); 1717 (-C=O amida); 1515 dan 1432 (-C=C- aromatik), 1014 (-C-O-) dan 771(-C-H aromatik).
Spektrum ¹ 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 ₂).
Spektrum ¹³ 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 ₉ H ₈ N ₂ O ₃ F ₃ 249,0487 dan massa terukur 249,0458.

Gambar 3. Mekanisme reaksi sintesis 4-CF₃BOU.

Dari perhitungan energi ikatan antara HU dan 2EUD didapatkan *rerank score*: - 43,3565 sedangkan antara 4-CF₃BOU dan 2EUD didapatkan *rerank score*: -82,9755.

Senyawa hasil sintesis 4-CF₃BOU 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, ¹HRMI, ¹³CRMI dan MS dari 4-CF₃BOU dapat dilihat pada Tabel 1^(3,8,10).

Dari hasil uji *in silico* dapat diketahui bahwa jumlah ikatan hidrogen antara molekul 4-CF₃BOU 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-CF₃BOU lebih besar dibanding HU. Energi ikatan yang digambarkan dengan *rerank score* menunjukkan bahwa energi ikatan antara 4-CF₃BOU 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-CF₃BOU lebih besar dibanding HU.

Hasil sintesis 4-CF₃BOU 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, ¹HRMI, ¹³CRMI dan MS dari senyawa hasil sintesis. Dari karakterisasi tersebut dapat disimpulkan bahwa zat yang disintesis adalah 4-CF₃BOU.

Dari uji *in vitro* menggunakan sel HeLa dengan metoda MTT didapatkan nilai IC₅₀ dari 4-CF₃BOU adalah 82,37 μg/mL dan nilai IC₅₀ dari HU adalah 430,21 μg/mL. Makin kecil nilai IC₅₀ berarti senyawa tersebut aktivitasnya semakin besar. Dari hasil uji *in vitro* dapat disimpulkan bahwa 4-CF₃BOU mempunyai aktivitas lebih besar dibanding HU.

SIMPULAN

Dari hasil uji *in silico* dapat diprediksi bahwa 4-CF₃BOU lebih aktif dibanding HU. Senyawa yang dihasilkan adalah 4-CF₃BOU sesuai karakterisasi menggunakan spektra UV, IR, ¹H¹RMN, ¹³C¹RMN dan MS. Aktivitas antineoplastik 4-CF₃BOU 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, 2nd 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-(benzoyloksi) 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. 7th Ed. New York: John Wiley and Sons Inc; 2005.
10. CCRC UGM, (<http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/protokol>. 20/3/2012). 2012.