

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA 1-(2-KLOROBENZOILOKSI)UREA DAN 1-(4-KLOROBENZOILOKSI)UREA

SUKO HARDJONO

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

(E-mail: suko.hardjono@yahoo.com)

ABSTRACT

Hydroxyurea or (HU) is a compound that has antineoplastic activity through a mechanism of inhibiting ribonucleotide reductase enzyme. To design new drugs, the physicochemical properties of drug molecules can be predicted before they are synthesized and purified. In silico test is a method to predict the activity of the compound to be synthesized. Ribonucleotide reductase was the main target or receptor of anticancer compounds such as HU and their derivatives, namely 1-(2-chlorobenzoyl-oxy)urea or 2-ClBOU and 1-(4-chlorobenzoyloxy)urea or 4-ClBOU. These compounds formed a complex with crystal structure of ribonucleotide reductase I enzyme which was 2EUD. Bond energy in the form of rerank scores from both complexes were calculated with Molegro program. Rerank score 2-ClBOU -81,1349 and 4-ClBOU -82,7887 while HU - 43.3565. From the results obtained could be predicted that 2-ClBOU and 4-ClBOU have greater anticancer activity than HU. Synthesis of These compounds were performed by reacting hydroxyurea with 2-chlorobenzoyl chloride or 4-chlorobenzoyl chloride. Purity test was by TLC and melting point determination were performed.

The structure of compounds were confirmed using data from UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and MS/GC-MS spectra. In this study, 2-ClBOU and 4-ClBOU compounds have been successfully synthesized and after in vitro anticancer activity was tested against HeLa cells, it was obtained 2-ClBOU IC₅₀ 94 µg/ml, 4-ClBOU IC₅₀ 84 µg/ml while IC₅₀ HU 430 µg/ml. Can be concluded that 2-ClBOU and 4-ClBOU have greater anticancer activity than HU.

Keywords: 1-(2-chlorobenzoyloxy)urea, 1-(4-chlorobenzoyloxy)urea in silico test, synthesis, anticancer activity test

PENDAHULUAN

HU merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antineoplastik untuk menghambat enzim reduktase ribonucleotide. Fungsi enzim ini adalah untuk pada biosintesis DNA dengan mengkonversi ribonukleotida menjadi deoksiribonukleotida. Aktivitas penghambatan fungsi enzim ini disebut sitotoksik atau antineoplastik, yang memiliki efek khusus pada fase S. (Khayat *et al.*, 2004).

HU juga berguna dalam pengobatan anemia sel sabit karena meringankan rasa sakit dari pasien, yang merupakan sifat khasnya yaitu kemampuannya untuk menghasilkan oksida nitrat, yang merupakan vasodilator kuat. Nitrat oksida juga dapat menyebabkan efek antitumor dari HU, karena diketahui menghambat ribonukleotida reduktase. Penghambatan ini kemungkinan karena HU menetralkan radikal bebas tirosil yang ada pada pusat katalisa dari enzim (Chabner *et al.*, 2001, Navara *et al.*, 1998). Penetralkan bisa terjadi karena HU mengandung elektron tidak berpasangan, oleh

karena itu dapat memadamkan radikal tirosin (Avendano *et al.*, 2008).

Penelitian tentang pengaruh pemberian HU pada tikus telah dilakukan. Karena aktivitasnya dalam menghambat kerja ribonukleotida reduktase, maka HU dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sistem saraf pusat, bakal jaringan dan kraniofasial anggota tubuh pada hewan, dan gangguan pernapasan neonatal pada manusia (Woo *et al.* 2004). Penambahan HU pada pengobatan dengan imatinib terhadap GBM dapat meningkatkan efek sitotoksik dibanding dengan pengobatan imatinib tunggal (Dresemann, 2005). HU menginduksi radikal bebas yang memberi efek sitotoksik pada sel, dan sebagai target adalah membran sel. Pengaruh radikal bebas tersebut ditunjukkan dengan kerusakan eritrosit dan granulosit. HU adalah teratogen mamalia yang sangat kuat. Keterlibatan radikal hidroksil dapat menyebabkan kematian sel embrio. Pemeriksaan histologis hati hewan menunjukkan bahwa HU mempunyai efek

hepatotoksik (Kovacic, 2010). Turunan benzoilurea yaitu 3-haloasilamino benzoilureas (3-HBUs) dapat membunuh sel kanker melalui penghambatan mitosis) (Qing *et al.*, 2009)

Beberapa senyawa turunan thiourea telah dievaluasi aktivitas sitotoksiknya secara *in vitro* terhadap tikus *Ehrlich Ascites Carcinoma* (EAC) dan dua jenis sel kanker manusia (MCF-7 dan HeLa) (Manjula *et al.*, 2009)

Terdapat fakta yang menunjukkan bahwa dengan melakukan substitusi pada senyawa induk akan mengubah, efek lipofilik, elektronik dan sterik (Korolkovas, 1988). Untuk merancang obat baru, sifat fisikokimia molekul obat dapat diprediksi sebelum senyawa baru disintesis dan dimurnikan. Pada penelitian ini ditambahkan gugus -Cl pada posisi *ortho* dan *para*. Hal tersebut disebabkan karena gugus -Cl mempunyai sifat hidrofobik yang lebih besar dibanding hidrogen sehingga diharapkan lebih mudah menembus dinding sel. Gugus Cl juga merupakan penarik elektron, sehingga akan memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor.

Uji *in silico* adalah suatu istilah untuk percobaan atau uji yang dilakukan dengan melalui simulasi computer. Uji *in silico* telah menjadi metode yang digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan untuk meningkatkan efisiensi dalam optimasi aktivitas senyawa induk (Istyastoro, 2007). Energi interaksi molekul antara reseptor dan ligan pada penelitian ini dilakukan dengan melihat nilai *Rerank Score*. Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan *docking* molekul kandidat senyawa obat dengan reseptor yang dipilih. *Docking* adalah suatu upaya untuk menselaraskan antara ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam reseptor yang merupakan molekul protein yang besar, dengan memperhatikan sifat keduanya satu sama lain (Jensen, 2007).

Enzim ribonukleotida reduktase digunakan sebagai target utama atau reseptor dari senyawa antikanker HU dan turunannya seperti 2-CIBOU dan 4-CIBOU. Kedua senyawa ini membentuk kompleks dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. 2EUD dipilih karena merupakan reseptor dari gempitabin (Xu *et al.*, 2006).

Sintesis 2-CIBOU dan 4-CIBOU dilakukan dengan mereaksikan hidroksiurea dengan 2-klorobenzoil klorida atau 4-klorobenzoil klorida. Mekanisme reaksinya adalah masuknya gugus nukleofilik hidroksil dari hidroksiurea pada gugus karbonil dari 2-klorobenzoil klorida atau 4-klorobenzoil klorida (Clayden *et al.*, 2001; Zinner *et al.*, 1969). Uji kemurnian dilakukan dengan KLT dan penentuan titik lebur. Setelah senyawa dianggap murni dilakukan konfirmasi struktur dilakukan berdasarkan spektra Ultra Violet (UV-VIS), Infra Merah (FT-IR), H/C Resonansi Magnetik Inti (H/C-RMI) dan Mass Spektrometer (MS) (Silverstein *et al.*, 2005).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui interaksi antara 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD, dalam upaya memprediksi aktivitas antikanker. Setelah dapat diprediksi aktivitas antikankernya kemudian melakukan sintesis 2-CIBOU dan 4-CIBOU. Uji aktivitasnya dilakukan secara *in vitro* dalam membunuh sel HeLa, dan dibandingkan dengan HU.

METODE PENELITIAN:

Bahan

Hidroksiurea p.a. (Fluka), 2-klorobenzoil klorida p.s. (Aldrich), 4-klorobenzoil klorida p.s. (Aldrich), tetrahidrofur p.a. (Merck), trietilamina p.s. (Merck), DMSO, KBr, Media Kultur DMEM, dan MTT.

Alat

HEWLETT PACKARD 8452A Diode Array Spektrofotometer, PERKIN ELMER Spectrum One FT-IR Spectrometer, BRUKER BioSpin Avance III NMR Spektrometer, Spektrometer JEOL JMS 600, Spektrometer GC Agilent 6890, Mel Temp Electrothermal, Inkubator CO2 Hera Cell 51013721, Biorad Microplate Reader, Mikroskop inferted Axiovert 451205 Carlzeis.

Metode penelitian

Uji *in silico* terhadap 2-CIBOU, 4-CIBOU dan HU yang membentuk kompleks dengan struktur kristal dari enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. Untuk menggambarkan interaksinya dan menghitung energi ikatan antara 2-CIBOU, 4-CIBOU dan HU dengan 2EUD digunakan program Molegro.

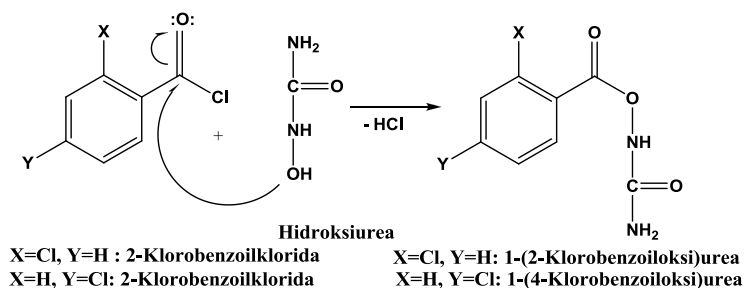
Sintesis 2-CIBOU dan 4-CIBOU dilakukan melalui reaksi asilasi dengan mereaksikan 2-klorobenzoil klorida atau 4-klorobenzoil klorida dengan hidroksiurea dalam pelarut tetrahidrofuran. Sebagai katalis digunakan trietilamin yang sekaligus untuk menangkap HCl yang dihasilkan.

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan tiga eluen dan uji titik lebur digunakan untuk

menunjukkan kemurnian senyawa. Konfirmasi struktur dilakukan berdasarkan spektra Ultra Violet (UV-VIS), Infra Merah (FT-IR), H/C Resonansi Magnetik Inti (H/C-RMI) dan Mass Spektrometer (MS).

Uji aktivitas dilakukan dengan menentukan nilai IC_{50} 2-CIBOU dan 4-CIBOU dalam membunuh sel HeLa, dibandingkan HU.

Reaksi



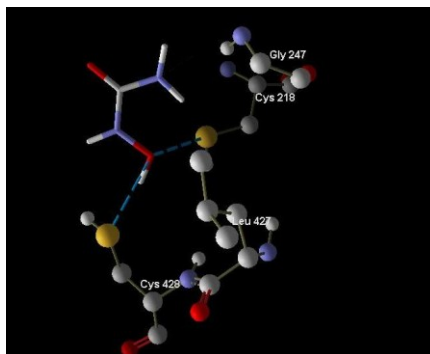
HASIL DAN DISKUSI

Dari uji *in silico* antara HU dengan 2EUD didapatkan 2(dua) ikatan hidrogen antara 2EUD dengan HU, yaitu antara atom O pada gugus hidroksi dengan *Cystein 428* dan *Cysteine 218*. Antara 2-CIBOU dengan 2EUD terdapat 4(empat) ikatan hidrogen antara atom O-ester dengan *Cysteine 428*, *Cysteine 218*, antara atom N dari gugus amin dengan *Serine 217* dan antara atom O pada gugus benzoil dengan *Asparagine 426*. Antara 4-CIBOU dengan 2EUD terdapat 5(lima) ikatan hidrogen, yaitu antara atom O-ester dengan *Cysteine 428* dan *Cysteine 218*, antara atom N dari gugus amin dengan *Serine 217*, antara atom O pada gugus benzoil dengan *Leucyene 427* dan *Asparagine 426*. Agar lebih jelas bisa dilihat pada Gambar 1, Gambar 2, Gambar 3 dan Tabel 1.

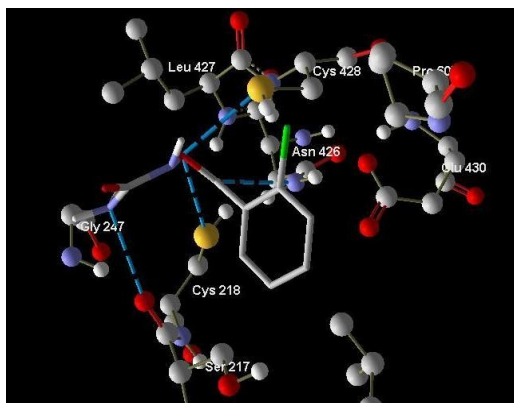
Dari uji *in silico* di atas menunjukkan bahwa jumlah ikatan hidrogen antara molekul 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD lebih banyak

dibanding ikatan hidrogen antara HU dengan 2EUD. Dari jumlah ikatan hidrogen dapat diprediksi ikatan antara 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD lebih kuat dibanding antara HU dengan 2EUD.

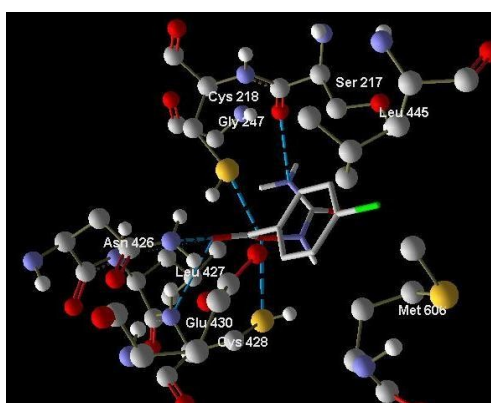
Dari perhitungan energi yang ditunjukkan dengan nilai *Rerank Score*, ikatan antara HU dengan 2EUD nilai *Rerank Score* : - 43.3565, sedangkan antara 2-CIBOU dengan 2EUD nilai *Rerank Score* : - 81.1349 dan antara 4-CIBOU dengan 2EUD nilai *Rerank Score* : - 82,7887. Nilai energi ikatan tersebut menunjukkan bahwa energi ikatan antara 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD jauh lebih kecil dibanding antara HU dengan 2EUD. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara teoritis ikatan antara 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD lebih stabil dibanding HU dengan 2EUD. Semakin stabil ikatan antara senyawa dengan 2EUD, dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut semakin aktif.



Gambar 1
Ikatan hydrogen HU dengan 2EUD



Gambar 2
Ikatan hidrogen 2-CIBOU
dengan 2EUD



Gambar 3
Ikatan hidrogen 4-CIBOU
dengan 2EUD

Tabel 1
Asam amino yang terlibat dalam ikatan hidrogen pada interaksi
HU, 2-CIBOU dan 4-CIBOU dengan 2EUD

SENYAWA	CYS428	CYS218	SER217	ASN426	LEU427
HU	+	+	-	-	-
2-CIBOU	++	+	+	+	-
4-CIBOU	++	+	+	+	+

Hasil sintesis 2-CIBOU dan 4-CIBOU ditentukan kemurniannya dengan penentuan titik lebur dan uji KLT menggunakan tiga eluen. Kedua senyawa menunjukkan jarak antara dua temperature kurang dari 2 °C. Noda yang dihasilkan pada KLT

adalah satu noda. Eluen 1 adalah (heksana : aseton = 2 : 3), eluen 2 (kloroform : etil asetat = 3 : 7), dan eluen 3 (heksana : etil asetat : metanol = 2 : 3 : 1). Hasil penentuan KLT dan penentuan titik lebur dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2
Nilai Rf dan Titik Lebur senyawa 2-CIBOU dan 4-CIBOU

SENYAWA	Nilai Rf			Titik Lebur (°C)
	Eluen 1	Eluen 2	Eluen 3	
2-CIBOU	0,75	0,69	0,80	129-130
4-CIBOU	0,73	0,70	0,89	189-190

Hasil penentuan kemurnian dengan titik lebur menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis murni karena selisihnya tidak lebih dari dua derajat Celsius. Kemurnian hasil sintesis juga ditunjukkan dengan hanya didapat satu noda pada uji KLT

dengan tiga eluen. Konfirmasi struktur ditunjukkan pada Tabel 3 dan Tabel 4. Hasil konfirmasi melalui spektra UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR dan MS dari senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa hasil sintesis adalah 2-CIBOU dan 4-CIBOU.

Tabel 3.
Spektra UV, IR, RMI- ^1H , RMI- ^{13}C dan MS senyawa 2-CIBOU

Spektrum UV, λ maks (nm) Dalam pelarut etanol	230 dan 280
Spektrum IR, ν (cm^{-1}) Dalam pelet KBr	3481 (-NH); 3276 dan 3207 (-NH ₂); 1739 (-C=O ester); 1685 (-C=O amida); 1590 dan 1437 (-C=C- aromatis); 1116,67 (-C-O-) serta 744 (-C-H aromatis).
Spektrum RMI- ^1H , δ (ppm) Dalam pelarut DMSO-D6	9,91, s (H pada NH=b); 7,99 ppm, d (1H pada inti benzene= c); 7,54, m (3H pada inti benzene=d,e); 6,56, s (2H pada NH2=a).
Spektrum RMI- ^{13}C δ (ppm) Dalam pelarut DMSO-D6	atom C pada 163,9 ppm (b), 159,0 ppm (a), 133,7 ppm (g) 132,8 (d), 131,4 (c), 130,7 ppm (e), 127,6 dan 127,2 ppm (f).
Spektrum Massa (m/e)	HRMS (m/z) : terhitung untuk $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ (M^++H): 215,0233 dan teramati 215,0192.

Tabel 4.
Spektra UV, IR, RMI- ^1H , RMI- ^{13}C dan MS senyawa 4-CIBOU

Spektrum UV, λ maks (nm) Dalam pelarut etanol	204 dan 244
Spektrum IR, ν (cm^{-1}) Dalam pelet KBr	3407 dan 755 (-C-H aromatic); 3092 (-NH); 3221 dan 3184 (-NH ₂), 1750 (-C=O ester), 1723 (-C=O amida), 1596 (-C=C- aromatis) dan 1011 (-C-O-).
Spektrum RMI- ^1H , δ (ppm) Dalam pelarut DMSO-D6	9,81, s (H pada NH=b); 8,00, d (2H pada inti benzene= d); 7,66, d (2H pada inti benzene=c); dan 6,60, s (2H pada NH2=a)
Spektrum RMI- ^{13}C δ (ppm) Dalam pelarut DMSO-D6	Atom C pada 164,1 (b), 159,1 (a), 138,6 (f), 131,2 (d), 128,8 (e) dan 126,4 (c)
Spektrum Massa (m/e)	HRMS (m/z) : terhitung untuk $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$ (M^++H) 215,0223 dan teramati 215,0193

Dari uji aktivitas *in vitro* menggunakan sel HeLa dengan metode MTT didapat IC_{50} 2-CIBOU sebesar 94 $\mu\text{g/ml}$, IC_{50} 4-CIBOU sebesar 84 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan HU mempunyai IC_{50} 430 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antikanker dari 4-CIBOU lebih besar dibanding 2-CIBOU. Kedua hasil sintesis mempunyai aktivitas jauh lebih besar dibanding HU.

KESIMPULAN

1. Melalui uji *in silico* dapat diprediksi bahwa 4-CIBOU lebih aktif dibanding 2-CIBOU dan lebih aktif dibanding HU;
2. 2-CIBOU dan 4-CIBOU dapat disintesis melalui reaksi asilasi dengan hasil murni berdasarkan titik lebur dan KLT;

3. Berdasarkan uji *in vitro* didapatkan bahwa aktivitas antikanker 4-CIBOU lebih besar dibanding 2-CIBOU dan lebih besar dibanding HU.

Ucapan Terima Kasih Kepada

1. Prof. Dr. Siswandono, Apt.,MS. Dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sebagai promotor dan yang mempunyai lisensi program Molegro.
2. Prof. Dr. Puwanto, Apt. Dari Fakultas Farmasi Universitas Airlangga sebagai ko-promotor
3. Prof. Drs. Win Darmanto, MSi.,Ph.D. Dari Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga sebagai ko-promotor
4. Prof Supargiyono DTM&H., SU.,Sp.Par(K), dari Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran

Universitas Gadjah Mada, yang telah mengijinkan saya belajar dan menentukan aktivitas sitotoksik.

PUSTAKA

- Avendano C & Menendes J.C, 2008, **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**, Elsevier, Amsterdam: 13-18
- Chabner BA, Ryan DP.,Paz-Arez L, 2001, Garcia-Carbonero Rocio, Calabresi Paul, Antineoplastic Agent. In **Goodman&Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics**, , McGraw-Hill, New York :1388 – 1445;
- Clayden, Greeves, Warren & Wothers, 2001, **Organic Chemistry**, Oxford University Press, New York : 279-303;
- Dresemann G, 2005, Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme : a patient series; **Annals of Oncology** 16(10): pp.1702-1708;
- Istyastono E.P., 2007, (<http://www.komputasi.lipi.go.id. 16/12/2007>);
- Jenzen F.,2007, **Introduction to Computational Chemistry**, 2nd Ed, Odense, Denmark: 415-416.
- Khayat A.S.,Guimarães A.C.,Cardoso P.C.,Lima P.D.L, Bahia M.O., Antunes L.M.G, Burbano R.R.,, 2004, Mutagenicity of hydroxyurea in lymphocytes from patients with sickle cell disease, **Genet. Mol. Biol. vol.27 no.1** São Paulo
- Korolkovas A., 1988, **Essentials of Medicinal Chemistry**, 2nd ed, New York, Singapore, John Wiley & Sons: 590-597, 692-697;
- Kovacac P. 2010, Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications, www.elsevier.com/locate/mehy.
- Manjula S.N., Noolvi N.M., Parihar K.V., Reddy S.A.M.,Ramani V., 2009, Synthesis and antitumor activity of optically active thiourea and their 2-aminobenzothiazole derivatives: a novel class of anticancer agents., **Eur. J. Med. Chem. (2009)** Volume: 44, Issue: 7: 2923-2929
- Navarra P., Preziosi P., 1999, Hydroxyurea: new insights on an old drug, **Critical Review in Oncology/Hematology** 29 (1999) : 249-255;
- Qing Song D., Ming Wang Y., Na Du N.,Ying He W., Liang Chen K.,Fang Wang G., Peng Yang, Zong Wu L., Bo Zhang X.,Dong Jiang J.,2009, Synthesis and activity evaluation of benzoylurea derivatives as potential antiproliferative agents, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 19 (2009): 755–758
- Siverstein R.M.,Webster F.X. and Kiemle D.J. Spectrofotometric Identification of Organic Compound, 7th Ed, 2005, **John Wiley and Sons, Inc., New York.**
- Woo G.J., Katayama K., Bak E.J.,Ueno M.,Yamauchi H.,Uetsuka K.,Nakayama H., Doi K.,2004, Effects of prenatal hydroxyurea-treatment on mouse offspring, **Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie** (2004) Volume: 56,Issue:1-2 : 1-7
- Xu H., Faber C., Uchiki T., Racca J., dan Dealwis C., 2006, Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly, **PNAS, March 14, 2006, vol. 103, no. 11:** 4028–4033
- Zinner G., Staffel R., 1969, Carbamoylation of hydroxylamine. 36. Hydroxylamine derivatives, **Arc Pharm Ber Ges.**: 438-447;