

UPAYA UNTUK MENGHASILKAN 1-(4-BROMOBENZOYLOXY)UREA SEBAGAI CALON OBAT ANTIKANKER

SUKO HARDJONO

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya 60286 Indonesia

Email: 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 has been a method that is taken to initiate the discovery of new drug compounds and to improve the efficiency of lead compounds activity optimization. Ribonucleotide reductase was the main target or receptor of anticancer compounds such as hydroxyurea and its derivatives, namely 1-(4-bromo-benzoyloxy)urea or 4-BrBOU. These compounds formed a complex with crystal structure of ribonucleotide reductase enzyme I which is 2EUD. Bond energy in the form of rerank scores from both complex were calculated with Molegro program. Rerank score 4-BrBOU -82.9755 and HU -43.3565. From the results obtained can be predicted that 4-BrBOU has greater anticancer activity than HU. Synthesis of 4-BrBOU was performed by reacting hydroxyurea with 4-bromobenzoyl chloride. The reaction mechanism is inclusion of the nucleophilic hydroxyl group of hydroxyurea to the carbonyl group of 4-bromobenzoyl chloride. Purity test was performed by TLC and melting point determination was performed. Structure Identification was done based on UV-VIS, FT-IR, H/C-NMR, and MS spectrum. In this study, 4-BrBOU compound have been successfully synthesized and after in vitro anticancer activity was tested against HeLa cells, it was obtained IC₅₀ 98,42 µg/ml and the HU had IC₅₀ of 430.21 µg/ml.

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

PENDAHULUAN

Hidroksiurea (HU) adalah senyawa yang memiliki aktivitas antineoplastik dengan menghambat enzim ribonukleotida reduktase. Fungsi enzim ini adalah untuk biosintesis DNA dengan mengubah ribonukleotida ke deoksiribonukleotida. Aktivitas penghambatan enzim ini disebut sitotoksik atau antineoplastik, yang memiliki efek khusus pada fase S. (Khayat, 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).

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 substitusi pada senyawa penuntun akan mengubah sifat fisikokimia yaitu sifat lipofilik, elektronik dan sterik (Korolkovas, 1988). Untuk merancang obat baru, sifat fisikokimia molekul obat dapat diprediksi sebelum senyawa baru disintesis dan dimurnikan. Pada tahun 1972 Topliss mengusulkan skema atau diagram operasional untuk mensintesis analog dalam rancangan obat. Diagram ini didasarkan pada asumsi dasar dari metode Hänsch, bahwa suatu substituen tertentu dapat mengubah aktivitas relatif terhadap senyawa induk

berdasarkan hasil perubahan hidrofobik, efek elektronik, dan sterik (Topliss, 1972).

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi struktur terhadap senyawa 1-(benzoiloksi)-urea dengan penambahan gugus -Br pada posisi *para* dari benzoil yang mempunyai sifat lipofilik sehingga diharapkan lebih mudah menembus dinding sel. Gugus -Br merupakan penarik elektron lebih rendah dibanding gugus -Cl. Dengan penambahan -Br juga diharapkan akan memperkuat ikatan senyawa dengan reseptor, walaupun lebih kecil dibanding pengaruh gugus -Cl pada posisi *para*. Senyawa 1-(4-bromobenzoiloksi)urea, mempunyai sifat lipofilik sehingga diharapkan lebih mudah menembus dinding sel.

Untuk memprediksi aktivitas suatu senyawa yang akan disintesis dilakukan uji *in silico*. 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 melalui *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). Energi interaksi molekul antara reseptor dan ligan dalam penelitian ini diamati dengan *Rerank Score*.

Enzim ribonukleotida reduktase digunakan sebagai target utama atau reseptor senyawa antikanker seperti HU dan 1-(4-bromobenzoiloksi)urea atau 4-BrBOU. Senyawa ini membentuk kompleks dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. 2EUD dipilih karena merupakan reseptor dari gemsitabin (Xu *et al.*, 2006). Tujuan dari uji *in silico* pada penelitian ini adalah untuk mengetahui

interaksi antara 4-BrBOU dan 2EUD, dalam upaya untuk memprediksi aktivitas antikanker. Senyawa 4-BrBOU diprediksi memiliki aktivitas antikanker. Setelah itu baru senyawa tersebut disintesis dan aktivitas sitotoksiknya ditentukan secara *in vitro* menggunakan sel HeLa dan dibandingkan dengan HU.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

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

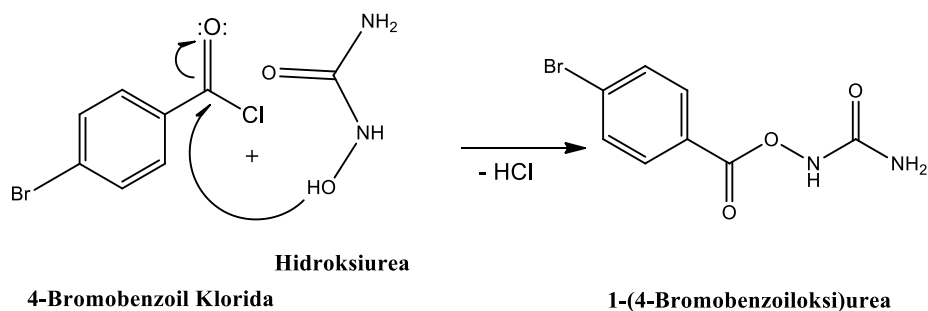
Metode

Uji silico terhadap HU dan 4-BrBOU dilakukan dengan membentuk kompleks kedua senyawa dengan struktur kristal enzim ribonukleotida reduktase I yaitu 2EUD. Untuk menggambarkan interaksi dan menghitung energi ikatan antara HU dan 4-BrBOU dengan 2EUD digunakan Program Molegro.

Senyawa 4-BrBOU disintesis melalui reaksi asilasi antara 4-bromobenzoil klorida dan HU dalam pelarut tetrahidrofuran. Trietilamina digunakan sebagai katalis serta untuk menangkap HCl yang dihasilkan (Clayden, 2001; Zinner, 1969).

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan tiga eluen dan uji jarak lebur digunakan untuk menunjukkan kemurnian senyawa hasil sintesis. Karakterisasi struktur dilakukan berdasarkan spektrum Ultra Violet (UV-VIS), Infrared (FT-IR), H/C Resonansi Magnetic Inti (H/C-RMI) dan Spektrometer Massa (MS) (Silverstein, 2005).

Uji aktivitas dilakukan dengan menentukan nilai IC₅₀ dari 4-BrBOU dalam membunuh sel HeLa dengan metode MTT, dibandingkan dengan HU (ccrcfarmasiugm)..



Reaksi Bromobenzoyl klorida

HASIL DAN PEMBAHASAN

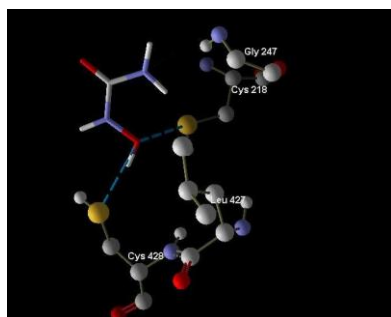
Dari hasil uji *in silico* diperoleh dua ikatan hidrogen antara 2EUD dengan HU, yaitu antara atom O pada gugus hidroksil dengan *Cystein 428* dan *Cystein 218*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 1. Sementara 4-BrBOU memiliki lima ikatan hidrogen, yaitu antara atom O-ester dengan *Cystein 428* dan *Cystein 218*, antara atom N gugus amina dengan *Serine 217*, atom O pada gugus benzoyl dengan *Leucine 427* dan *Asparagine 426*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Dari uji *in silico* di atas menunjukkan bahwa jumlah ikatan hidrogen antara molekul 4-BrBOU

dan 2EUD lebih banyak dibanding ikatan hidrogen antara HU dan 2EUD. Dari jumlah ikatan hidrogen dapat diramalkan bahwa ikatan antara 4-BrBOU dan 2EUD lebih kuat dibanding HU dan 2EUD.

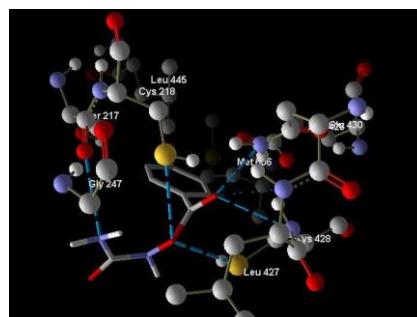
Dari perhitungan energi ikatan antara HU dan 2EUD diperoleh nilai *Rerank Score* sebesar: -43,3565, sedangkan antara 4-BrBOU dan 2EUD diperoleh *Rerank Score*: -85,1651.

Nilai energi ikatan tersebut menunjukkan bahwa energi ikatan antara 4-BrBOU dan 2EUD jauh lebih kecil daripada HU dan 2EUD. Hal ini menunjukkan bahwa secara teoritis ikatan antara 4-BrBOU dan 2EUD lebih stabil daripada HU dan 2EUD..



Gambar 1.

Ikatan hidrogen antara
Hidroksiurea dengan 2EUD



Gambar 2.

Ikatan hidrogen antara
1-(4-bromobenzoyloksi)urea dan 2EUD

Dari sintesis 4-BrBOU diperoleh serbuk putih dengan titik leleh 198-199 °C. Kemurnian hasil sintesis ditunjukkan dengan KLT menggunakan tuga eluen dengan komposisi yang berbeda. Nilai-nilai *R_f* dari KLT adalah : 0,64 (heksana : aseton = 2 : 3), 0,70 (kloroform : etil asetat = 3 : 7) , dan 0,81 (heksana : etil asetat : metanol = 2 : 3 : 1) .

Dari hasil penentuan kemurnian dengan titik leleh menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah murni karena perbedaan tersebut tidak lebih dari dua derajat Celsius . Kemurnian hasil sintesis

juga ditunjukkan dengan jumlah noda yang hanya satu noda pada uji KLT menggunakan tiga macam eluen.

Konfirmasi struktur terhadap hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel 1. Dari spektra UV, IR, RMI-¹H, RMI-¹³C dan MS menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah 4-BrBOU. Hasil konfirmasi struktur senyawa 4-BrBOU juga dibandingkan dengan spektra UV, IR, RMI-¹H dan MS dari senyawa HU, yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Spektra UV, IR, RMI-¹H, RMI-¹³C dan MS senyawa 4-BrBOU

Spektrum UV, λ maks (nm)	206 dan 244
Dalam pelarut etanol	
Spektrum IR, ν (cm ⁻¹)	3469 (-NH); 3225 (-NH ₂); 1746 (-C=O ester); 1720 (-C=O amida); 1589,67 (-C=C- aromatis); 1008,68 (-C-O-); 750 (-C-H aromatis).
Spektrum RMI- ¹ H, δ (ppm)	9,79,s (H pada NH=b), 7,90 , d (2H pada inti benzene =c), 7,71 d (2H pada inti benzene= d), pada 6,57 ,s (2H pada NH ₂ =a).
Spektrum RMI- ¹³ C δ (ppm)	Atom C pada 165,7 (b), 159,1 (a), 131,8 dan 131,2 (d), 129,4 dan 129,2 (e), 127,8 (c), 126,8 (f).
Spektrum Massa (m/e)	HRMS (m/z) : terhitung untuk C ₈ H ₈ N ₂ O ₃ Br (M ⁺ +H): 258,9718 dan dan teramati 258,9738.

Tabel 2. Spektra UV, IR, RMI-¹H, dan MS dari hidroksiurea

Spektrum UV, λ maks (nm)	204
Dalam pelarut etanol	
Spektrum IR, ν (cm ⁻¹)	3427 dan 3319 (-NH ₂), 3319 (-NH), 3427 dan 3319 (-OH), serta 1646 (-C=O).
Spektrum RMI- ¹ H, δ (ppm)	2.20,s, (H pada OH) dan 4,53 ,s, (H pada -NH ₂ dan -NH).
Spektrum Massa (m/e)	HRMS (m/z) : terhitung untuk CH ₅ N ₂ O ₂ (M ⁺ +H) 77,0351 dan teramati: 77,0343.

Konfirmasi Struktur senyawa 4-BrBOU dapat dijelaskan sebagai berikut: pada spektrum UV terdapat dua puncak (λ 206 nm dan 244 nm) yang menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis telah berubah dari hidroksiurea yang hanya mempunyai satu puncak (λ 204 nm). Penambahan puncak pada λ 244 nm disebabkan karena adanya gugus aoksokrom dari benzoil. Pada spektrum IR terdapat puncak pada 1589 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus -C=C- aromatis; 750 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus -C-H aromatis, 1746 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus -C=O ester, dan 1008 cm⁻¹ yang menunjukkan gugus -C-O-, sedangkan pada spektrum IR hidroksiurea tidak ada. Dari spektrum RMI-¹H terlihat bahwa ada dua puncak duplet pada 7,90 dan 7,71 ppm yang berasal dari 4H pada inti benzena, serta telah terjadi pergeseran puncak yang berasal dari gugus amin primer dan amin sekunder. Pada hidroksiurea hanya ada satu puncak yaitu 4,53 ppm yang berasal dari tiga atom H pada amin primer dan sekunder. Dari spektrum RMI-¹³C dapat dilihat bahwa dibanding hidroksiurea telah terjadi penambahan jumlah atom C dari gugus benzoil yang terlihat pada puncak 165,7 ppm, 131,8 ppm, 131,2 ppm, 129,4 ppm dan 129,2 ppm, 127,8 ppm, 126,8 ppm. Kedudukan puncak juga sesuai dengan prediksi yang digambarkan pada ChemBio Draw. Dari spektrum HRMS didapatkan puncak pada 259 m/z yaitu (M⁺) yang menunjukkan berat molekul senyawa senyawa hasil sintesis sesuai dengan berat

molekul 1-(4-bromobenzoiloksi)urea yaitu 259,06. Dari hasil analisis spektra UV, IR, RMI-¹H, RMI-¹³C dan HRMS dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah 1-(4-bromobenzoiloksi)urea.

Dari uji aktivitas secara *in vitro* menggunakan sel HeLa dengan metode MTT diperoleh nilai IC₅₀ dari 4-BrBOU sebesar 98,42 mg/ml, sedangkan nilai IC₅₀ dari HU adalah 430,21 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antikanker dari 4-BrBOU lebih besar dari HU.

KESIMPULAN

1. Secara teori, melalui uji *in silico*, diprediksi bahwa 4-BrBOU lebih aktif daripada HU;
2. Senyawa 4-BrBOU dapat disintesis melalui reaksi asilasi terhadap hidroksiurea dengan hasil murni berdasarkan titik leleh dan KLT;
3. Aktivitas antikanker dari 4-BrBOU lebih besar dibanding HU.

ACKNOWLEDGEMENT

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. Honda dari Universitas Hoshi, Jepang, yang telah membantu dalam menginterpretasi data spectra MS.
5. Prof Supargiyono, DTM&H.,SU., Sp.Par(K), dari Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, yang telah mengizinkan saya belajar dan menentukan aktivitas sitotoksik.

DAFTAR 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
- 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;
- Kovacic 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.**
- Topliss J.G., 1972, Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design, **J. Med. Chem.**, 1972, Vol 15, No.10: 1006-1009
- 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;