

MOLECULAR DOCKING, SINTESIS dan UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK SENYAWA 1-BENZOIL-1,3-DIMETILUREA

Dian Agung Pangaribowo
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Jl. Kalimantan I/2 Kampus Tegalboto Jember 68121
agung.pangaribowo@gmail.com

ABSTRAK: Senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea telah dirancang, disintesis, diidentifikasi struktur, dan diuji aktivitas sitotoksik secara *in vitro*. Simulasi *docking* dilakukan dengan memosisikan senyawa ke dalam sisi aktif reseptor *Checkpoint kinase 1* (Chk1) untuk menentukan model pengikatan ligan reseptor. Sintesis 1-benzoil-1,3-dimetilurea dilakukan lewat reaksi asilasi antara 1,3-dimetilurea dan benzoil klorida. Kemurnian produk hasil sintesis ditentukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Identifikasi struktur dilakukan dengan spektrofotometer UV, FT-IR dan spektrometer NMR. Hasil uji antiproliferatif menunjukkan bahwa senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol positif. Senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan aktivitas sitotoksik dapat menjadi agen antikanker yang potensial.

Kata kunci: 1-benzoil-1,3-dimetilurea, *molecular docking*, aktivitas sitotoksik

ABSTRACT: A novel 1-benzoyl-1,3-dimethylurea has been designed, synthesized, structurally determined, and the *in vitro* cytotoxic activity was evaluated. Docking simulation was performed to position this compound into the Checkpoint kinase 1 (Chk1) active site to determine the probable binding model. Synthesis of 1-benzoyl-1,3-dimethylurea was completed by acylation reaction between 1,3-dimethylurea and benzoyl chloride. The purity of synthesized product was determined by Thin Layer Chromatography. Structure identification was performed by UV spectrophotometer, FT-IR and NMR spectrometer. Antiproliferative assay result demonstrated that this compound possessed good cytotoxic activity against HeLa cells, which is comparable to the positive control. This compound with potent cytotoxic activity might be a potential anticancer agent.

Keywords: 1-benzoyl-1,3-dimethylurea, molecular docking, cytotoxic activity

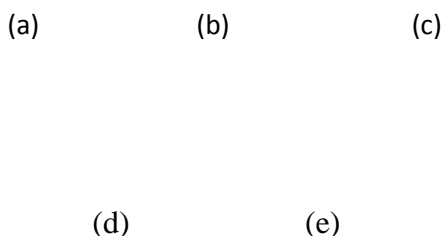
1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan permasalahan kesehatan masyarakat yang utama di Indonesia dan negara lain di dunia. Sebagai negara berkembang, prevalensi penyakit tumor/kanker di Indonesia adalah 4,3 per 1.000 penduduk. Kanker merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) setelah

strok, tuberkulosis, hipertensi, cedera, perinatal, dan *Diabetes Mellitus*^[1]. Pada tahun 2012 terdapat 1.638.910 kasus kanker baru di Amerika Serikat, dengan perkiraan kasus kematian sejumlah 577.190^[2].

Beberapa penelitian telah dilakukan pada turunan urea sebagai senyawa

antineoplastik. Song^[3] mensintesis 14 senyawa baru turunan fenilurea. Diantara senyawa analog tersebut, senyawa dengan gugus bromoasetil pada posisi N' menunjukkan aktivitas terhadap delapan jenis sel tumor dengan nilai IC₅₀ berkisar antara 0,38 sampai 4,07 μ M. Saeed^[4] melakukan sintesis turunan tiourea yang berikatan dengan gugus benzotiazol. Uji aktivitas antikanker turunan tiourea tersebut dilakukan dengan menggunakan sel HeLa dan MCF-7. Dari penelitian didapatkan nilai IC₅₀ senyawa turunan tiourea dengan menggunakan sel MCF-7 berkisar antara 18,10-45,72 μ M, dan pada sel HeLa nilai IC₅₀ berkisar antara 38,85-75,13 μ M. Hardjono^[5] melakukan modifikasi struktur 1-(benzoiloksi)urea dan mencari hubungan kuantitatif struktur aktivitas sitotoksiknya secara *in vitro* terhadap sel HeLa. Struktur senyawa turunan urea dan tiourea tersebut dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur senyawa (a) urea, (b) hidroksiurea, (c) tiourea (d) 1-(benzoiloksi)urea, (e) fenilurea

Rancangan sintesis dalam penelitian ini adalah melakukan reaksi asilasi salah satu gugus amina pada 1,3-dimetilurea dengan benzoil klorida dalam pelarut tetrahidrofuran, dalam suasana basa dengan trietilamin. Prosedur sintesis senyawa turunan urea ini mengacu pada reaksi Schotten-Baumann yang telah dimodifikasi^[6].

Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan proses *docking* molekul kandidat obat terhadap reseptor melalui simulasi komputer. *Docking* molekul senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dilakukan terhadap reseptor Chk1 yang dapat diunduh dari *Protein Data Bank*. Penentuan aktivitas antikanker turunan 1-benzoil-1,3-dimetilurea dilakukan secara *in vitro* dengan metode MTT menggunakan sel HeLa, sesuai dengan uji aktivitas antikanker turunan urea pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan kontrol positif, yaitu hidroksiurea.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan baku sintesis: 1,3-Dimetilurea p.s (Merck), Benzoilklorida p.s (Aldrich), Tetrahidrofuran p.a (Merck), Etanol p.a (Merck), Trietilamin p.a (Merck)

Bahan uji sitotoksik: Reagen MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida]; *Fetal Bovine Serum* (FBS); penisilin; streptomisin; Kultur sel kanker HeLa; DMSO (dimetil sulfoksida); PBS (*phosphoric buffer solution*); SDS (sodium dodesil sulfat).

Alat

Uji kemurnian senyawa hasil sintesis menggunakan plat KLT GF254. Identifikasi gugus kromofor menggunakan Spektrofotometer UV HP 8452A Diode Array pada kisaran panjang gelombang, $\lambda = 200-400$ nm dengan konsentrasi 10 ppm dalam pelarut etanol. Analisis gugus fungsi menggunakan Spektrofotometer FT-IR PERKIN ELMER *Spectrum One*. Sampel padatan yang digerus bersama KBr kemudian dibentuk menjadi cakram tipis

dan serapannya diukur pada daerah infra merah. Konfirmasi struktur lebih lanjut ditentukan dengan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

2.2 Metode

Metode *molecular docking*

Molecular docking senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dilakukan dengan menggunakan program *Molegro Virtual Docker* (MVD). Ligan di *docking* pada sisi aktif reseptor *Checkpoint kinase 1* (2YWP.pdb). Model pengikatan ligan reseptor dilihat melalui ikatan Hidrogen ligan reseptor dan nilai *Rerank Score*.

Metode sintesis

Pada labu alas bulat 250 ml, dicampur 0,08 mol 1,3-dimetilurea dengan 50 ml tetrahidrofuran dan 0,08 mol trietilamin. Tambahkan larutan benzoil klorida 0,04 mol dalam 15 ml tetrahidrofuran sedikit demi sedikit sampai habis. Kemudian campuran direfluks di atas penangas air selama 4 jam. Jika reaksi dianggap telah selesai, campuran dicuci dengan 100 ml air sebanyak dua kali, kemudian disaring dengan corong Buchner. Proses rekristalisasi dilakukan dengan menggunakan etanol panas. Kristal yang terbentuk disaring dengan corong Buchner, dicuci dengan etanol 10 ml sebanyak dua kali. Kristal dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C ^[5].

Metode uji sitotoksik secara *in vitro*

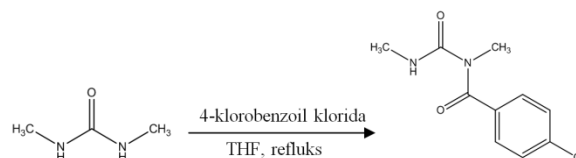
Kultur sel HeLa sejumlah 7×10^3 sel/*well* diinokulasikan ke dalam *microplate 96 well plate* dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 . Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Sampel dengan konsentrasi beragam diencerkan dengan penambahan PBS (*phosphoric buffer solution*) dengan pH (7,30–7,65) ditambahkan ke dalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dan disimpan kembali dalam inkubator CO_2 . Setelah 48 jam, ke dalam sel

ditambahkan reagen MTT dan diinkubasi selama 4 jam untuk selanjutnya ditambahkan SDS dan dikocok dengan baik. Inkubasi sel dilanjutkan kembali selama 24 jam. Perubahan warna dari MTT kuning menjadi formazan ungu di dalam mitokondria sel yang masih hidup dapat dikuantifikasi pada panjang gelombang $\lambda=550$ nm dengan *Microplate reader*. Nilai IC_{50} dilihat dari grafik hubungan antara konsentrasi senyawa bahan uji ($\mu\text{g/mL}$) dengan intensitas larutan dari viabilitas sel^[7].

HASIL dan PEMBAHASAN

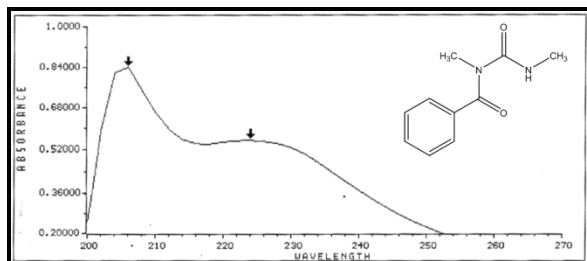
Sintesis senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea

Skema sintesis senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dapat dilihat pada Gambar 2. Dari reaksi tersebut dihasilkan rendemen sebesar 78%. Uji kemurnian dengan metode KLT menggunakan tiga komposisi eluen dengan polaritas yang berbeda dihasilkan noda tunggal.



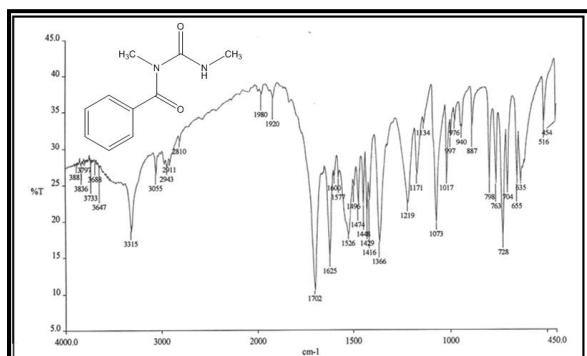
Gambar 2. Skema sintesis senyawa 1-(4-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea

Konfirmasi struktur 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan menggunakan spektrum UV terlihat bahwa terbentuk dua puncak pada λ_{maks} 206 nm dan 224 nm. Absorbansi pada λ 224 nm dikarenakan adanya ikatan rangkap terkonjugasi dari cincin aromatis (Gambar 3).



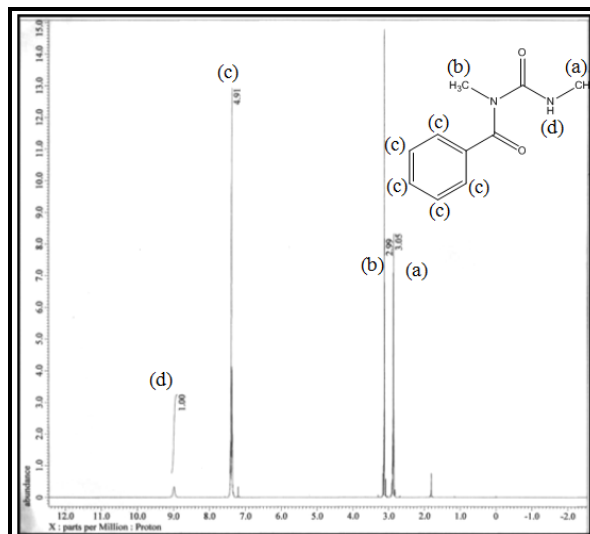
Gambar 3. Spektrum UV senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dalam pelarut etanol

Pada spektrum IR terlihat adanya pita serapan pada 3315 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus -NH ; 1702 cm^{-1} dan 1625 cm^{-1} menunjukkan adanya dua gugus karbonil imida; 1526 cm^{-1} menunjukkan adanya -C=C- aromatis. Terbentuknya dua pita serapan gugus karbonil -C=O menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis terbentuk, karena senyawa asal hanya memiliki satu gugus karbonil -C=O (Gambar 4).



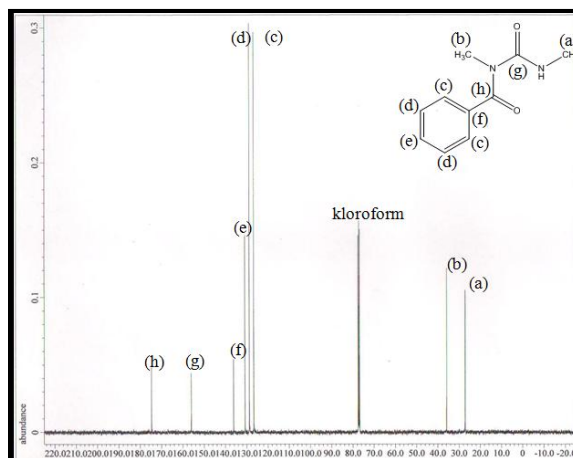
Gambar 4. Spektrum IR senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dalam pelet KBr

Dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ terlihat dua puncak singlet pada 2,87 ppm dan 3,12 ppm yang berasal dari atom H dua gugus metil. Puncak pada 7,34 – 7,42 berasal dari atom H cincin aromatis, dan puncak pada 8,98 ppm berasal dari atom H gugus -NH (Gambar 5).



Gambar 5. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan pelarut kloroform

Dari spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dapat dilihat dua puncak pada pergeseran kimia 27,15 ppm dan 35,87 ppm yang berasal dari dua atom C gugus metil. Cincin aromatis memberikan empat puncak yaitu pada 126,64 ppm; 128,74 ppm; 130,81 ppm; dan 136,18 ppm. Dua puncak pada pergeseran kimia 156,04 ppm dan 174,67 ppm berasal dari dua atom C gugus karbonil -C=O (Gambar 6).



Gambar 6. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dalam pelarut kloroform

Uji sitotoksik *in vitro*

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas sitotoksik adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

Hasil uji sitotoksik senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dapat dilihat pada tabel 1. Berdasarkan nilai IC_{50} pada tabel 1, dapat disimpulkan senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan obat kanker yang telah beredar yaitu hidroksiurea.

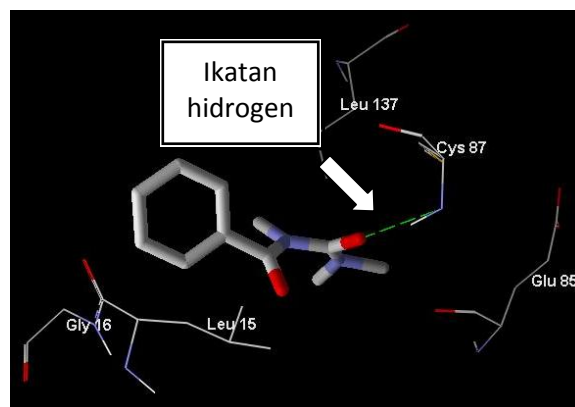
Tabel 1. Hasil Uji Sitotoksik Senyawa 1-Benzoil-1,3-Dimetilurea Terhadap Sel HeLa

Senyawa	1-benzoil-1,3-dimetilurea	Hidroksiurea
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	258,28	479,02

Molecular docking senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea

Proses *docking* senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dilakukan terhadap reseptor Chk1 menggunakan program MVD. Dari proses *docking* ligan terhadap reseptor didapatkan data bahwa gugus urea merupakan farmakofor dari senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea, yang berikatan hidrogen dengan asam amino Cys 87. Ikatan Hidrogen yang ditandai dengan garis putus-putus dapat dilihat pada Gambar 7. Nilai

Rerank Score dari senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea yaitu -62,3909 dan hidroksiurea sebesar -39,0396. Nilai *Rerank Score* menggambarkan kestabilan ikatan ligan dan reseptor. Semakin kecil nilai *Rerank Score* maka semakin stabil ikatan obat reseptor. Dari data *Rerank Score* dapat disimpulkan bahwa ikatan antara senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan reseptor lebih stabil dibandingkan ikatan hidroksiurea dengan reseptor. Sehingga, dapat diprediksi bahwa senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih baik dibandingkan hidroksiurea. Hasil prediksi *molecular docking* ini sesuai dengan hasil uji sitotoksik senyawa yang dapat dilihat dari nilai IC_{50} .



Gambar 7. Model ikatan antara 1-benzoil-1,3-dimetilurea dengan reseptor 2YWP. Ikatan ini menghasilkan nilai *Rerank Score* -62,3909 dan membentuk 1 ikatan Hidrogen (garis putus-putus hijau) antara gugus urea dan asam amino Cys 87 dengan jarak 2,62 Å

3. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea dapat disintesis melalui reaksi asilasi antara 1,3-dimetilurea dan benzoil klorida, dan diperoleh rendemen sebesar 78%. Senyawa 1-benzoil-1,3-dimetilurea ($IC_{50} = 258,28$

$\mu\text{g/ml}$) memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan obat kanker yang telah beredar yaitu hidroksiurea ($\text{IC}_{50} = 479,02 \mu\text{g/ml}$).

4. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih untuk Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang memfasilitasi penelitian ini

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Riskesdas. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2007
- [2] Cancer Facts & Figures. American Cancer Society. 2012
- [3] Song D.Q., Du N.N., Wang Y.M., He W.Y., Jiang E.Z., Cheng S.X., Synthesis and activity evaluation of phenylurea derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg Med Chem*; 17:3873–3878, 2009
- [4] Saeed S., Rashid N., Jones P.G., Ali M., Hussain R. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *Eur J Med Chem*; 45:1323–1331, 2010
- [5] Hardjono S. Modifikasi Struktur 1-(benzoioksi)urea dan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas sitotoksiknya, Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya; 2012
- [6] Clayden, Greeves, Warren & Wothers. Organic Chemistry. New York: Oxford University Press; 2001
- [7] Gil M.J., Mafiti M.A., Arteaga C., Migliaccio M., Encfo I., Gonzilez A., Merino V.M. Synthesis and Cytotoxic Activity of N-(2-pyridylsulfenyl)urea Derivatives, a New Class of Potential Antineoplastic Agents. *Bioorg Med Chem Lett*; 9: 2321-2324, 1999