

**MOLECULAR DOCKING, SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK
SENYAWA 1-(3-KLOROBENZOIL)-1,3-DIMETILUREA**

Dian Agung Pangaribowo
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Email: agung.pangaribowo@gmail.com

Abstract

A novel 1-(3-chlorobenzoyl)-1,3-dimethylurea has been designed, synthesized, structurally determined, and the in vitro cytotoxic activity was evaluated. Docking simulation was performed to the position of this compound into the Checkpoint kinase 1 (Chk1) active site to determine the probable binding model. Synthesis of 1-(3-chlorobenzoyl)-1,3-dimethylurea was completed by acylation reaction between 1,3-dimethylurea and 3-chlorobenzoyl chloride. The purity of synthesized product was determined by Thin Layer Chromatography and melting point measurement. Structure identification was performed by UV and FTIR spectrophotometer, 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-(3-chlorobenzoyl)-1,3-dimethylurea, molecular docking, cytotoxic activity*

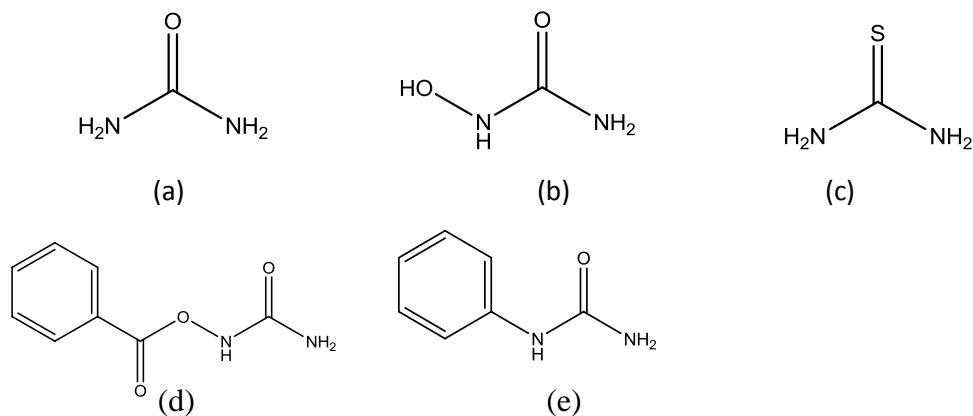
Pendahuluan

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 stroke, tuberkulosis, hipertensi, cedera, perinatal, dan *Diabetes Mellitus* (Risksdas, 2007). Diperkirakan pada tahun 2012 terdapat 1.638.910 kasus kanker baru di Amerika Serikat, dengan

perkiraan kasus kematian sejumlah 577.190 (Cancer Facts and Figures, 2012).

Beberapa penelitian telah dilakukan pada turunan urea sebagai senyawa antineoplastik. Song (2009) 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 µM. Saeed (2010) 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 IC_{50} senyawa turunan tiourea dengan menggunakan sel MCF-7 berkisar antara 18,10-45,72 μ M, dan pada sel HeLa nilai IC_{50} berkisar antara 38,85-75,13 μ M. Hardjono (2012) melakukan



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

Rancangan sintesis dalam penelitian ini adalah melakukan reaksi asilasi salah satu gugus amina pada 1,3-dimetilurea dengan 3-klorobenzoil klorida dalam pelarut tetrahidrofur, dalam suasana basa dengan trietilamin. Prosedur sintesis senyawa turunan urea ini mengacu pada reaksi Schotten-Baumann yang telah dimodifikasi (Clayden, 2001).

Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan proses *docking* molekul kandidat obat terhadap reseptor melalui simulasi komputer. *Docking* molekul senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dilakukan terhadap reseptor Chk1 yang dapat diunduh dari *Protein*

modifikasi struktur 1-(benzoyloksi)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.

Data Bank. Penentuan aktivitas antikanker turunan 1-(3-klorobenzoil)-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-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dengan aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan kontrol positif, yaitu hidroksiurea.

Metodologi

Bahan baku sintesis: 1,3-Dimetilurea p.s (Merck), 3-Klorobenzoilklorida 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 *melt-temp electrothermal* dan 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 $^{13}\text{C-NMR}$.

Metode molecular docking

Molecular docking senyawa 1-(3-klorobenzoil)-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 3-klorobenzoil 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 (Hardjono, 2012).

Metode uji sitotoksik secara in vitro

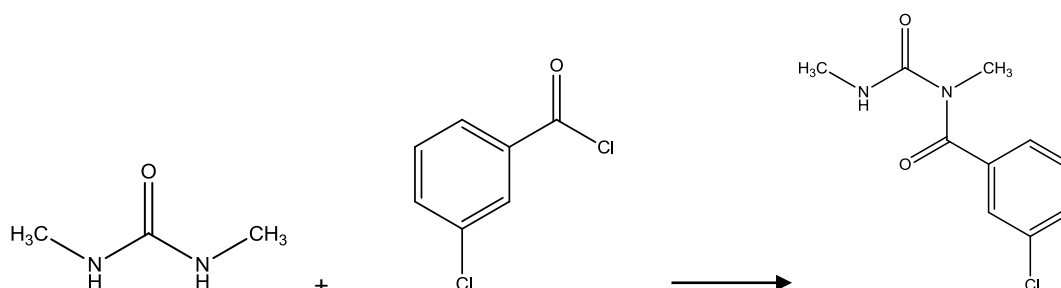
Kultur sel HeLa sejumlah 7×10^3 sel/*well* diinokulasikan ke dalam *microplate 96 well plate* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂. Hari kedua dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Sampel dengan konsentrasi beragam diencerkan dengan penambahan PBS (*phosphoric buffer solution*) dengan pH (7,30–7,65) ditambahkan ke dalam sel dalam *microplate* lalu dikocok dan disimpan kembali dalam inkubator CO₂.

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 (Gil, 1999).

Hasil dan Pembahasan

1. Sintesis senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea

Skema sintesis senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dapat dilihat pada Gambar 2. Dari reaksi tersebut dihasilkan rendemen sebesar 49,7%. Uji kemurnian produk hasil sintesis dengan *melt-temp electrothermal* didapatkan jarak lebur kurang dari 2°C yaitu sebesar $51 - 52^{\circ}\text{C}$. Uji kemurnian dengan metode KLT menggunakan tiga komposisi eluen dengan polaritas yang berbeda dihasilkan noda tunggal.



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

Konfirmasi struktur 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dengan menggunakan spektrum UV terlihat bahwa terbentuk dua puncak pada λ_{maks} 204 nm dan 222 nm. Absorbansi pada λ 222 nm dikarenakan adanya ikatan rangkap terkonjugasi dari cincin aromatis. Pada spektrum IR terlihat adanya pita serapan pada 3320 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus $-\text{NH}$; 1700 cm^{-1} dan 1646 cm^{-1} menunjukkan adanya dua gugus karbonil –

$\text{C}=\text{O}$; 1531 cm^{-1} menunjukkan adanya – $\text{C}=\text{C}$ – aromatis. Terbentuknya dua pita serapan gugus karbonil $-\text{C}=\text{O}$ menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis terbentuk, karena senyawa asal hanya memiliki satu gugus karbonil $-\text{C}=\text{O}$.

Dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ terlihat dua puncak singlet pada 2,89 ppm dan 3,14 ppm yang berasal dari atom H dua gugus metil. Puncak pada 7,22 – 7,46 berasal dari atom H cincin aromatis, dan puncak pada

8,92 ppm berasal dari atom H gugus –NH. Dari spektrum ¹³C-NMR dapat dilihat dua puncak pada pergeseran kimia 27,18 ppm dan 35,72 ppm yang berasal dari dua atom C gugus metil. Cincin aromatis memberikan enam puncak yaitu pada 124,62 ppm; 127,89 ppm; 130,15 ppm; 130,89 ppm; 134,92 ppm dan 137,78 ppm. Dua puncak pada pergeseran kimia 155,63 ppm dan 172,99 ppm berasal dari dua atom C gugus karbonil –C=O.

2. 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-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji sitotoksik senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea terhadap sel HeLa

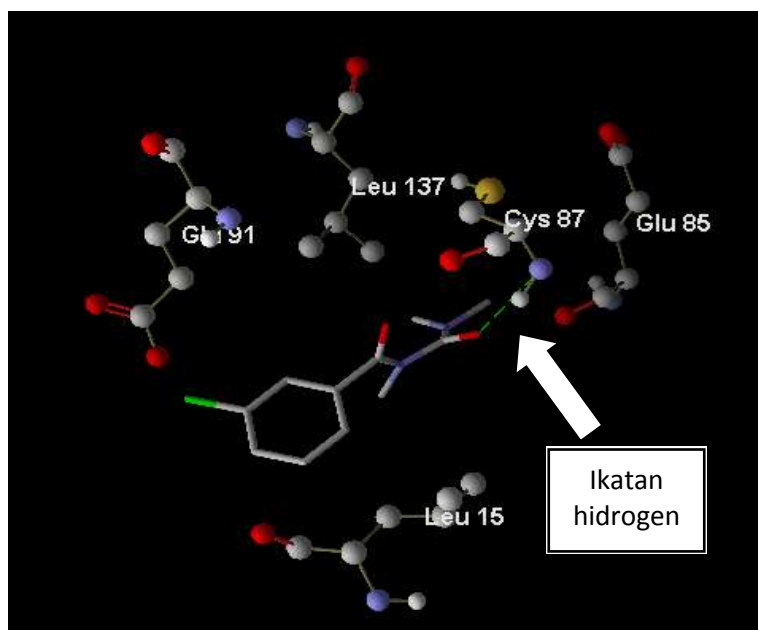
No.	Senyawa	IC ₅₀ (µg/ml)
1.	1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea	223,87
2.	Hidroksiurea	479,02

Berdasarkan nilai IC₅₀ pada tabel 1, dapat disimpulkan senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan obat kanker yang telah beredar yaitu hidroksiurea.

3. *Molecular docking* senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea

Proses *docking* senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dilakukan

terhadap reseptor Chk1 menggunakan program MVD. Dari proses *docking* ligan terhadap reseptor didapatkan data bahwa gugus amin dari senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea berikatan hidrogen dengan asam amino Cys 87. Ikatan Hidrogen yang ditandai dengan garis putus-putus dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Ikatan hidrogen antara 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dengan asam amino Cys 87 reseptor 2YWP

Nilai *Rerank Score* dari senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea yaitu -64,1151 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-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dengan reseptor lebih stabil dibandingkan ikatan hidroksiurea dengan reseptor. Sehingga, dapat diprediksi bahwa senyawa 1-(3-klorobenzoil)-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} .

Simpulan

Senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea dapat disintesis melalui reaksi asilasi antara 1,3-dimetilurea dan 3-klorobenzoil klorida, dan diperoleh rendemen sebesar 49,7%. Senyawa 1-(3-klorobenzoil)-1,3-dimetilurea ($IC_{50} = 223,87 \mu\text{g/ml}$) memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan obat kanker yang telah beredar yaitu hidroksiurea ($IC_{50} = 479,02 \mu\text{g/ml}$).

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih untuk Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang memfasilitasi penelitian ini dan Prof. Siswandono yang menyediakan lisensi program MVD.

Daftar Pustaka

- Abraham, D.J., 2003, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery Volume 5: Chemotherapeutic Agents*, 6th Ed., John Wiley & Sons, Inc, Virginia, 2-46
- Boriana, H., Ilieva, S., Cheshmedzhieva, D., Galabov, B., 2005, Conformation of some biologically active aromatic ureas, *Spectrochimica Acta Part A*, 61: 1321–1326
- Cancer Facts & Figures, 2012, American Cancer Society
- Clayden, Greeves, Warren & Wothers, 2001, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 279-303
- Fortin, S., Moreau, E., Lacroix, J., Côté, M.F., Petitclerc, E., Gaudreault, R.C., 2010, Synthesis, antiproliferative activity evaluation and structure activity relationships of novel aromatic urea and amide analogues of N-phenyl-N'-(2-chloroethyl)ureas, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 2928-2937
- Gil, M.J., Mafiti, M.A., Arteaga, C., Migliaccio, M., Encfo, I., Gonz~ilez, A., Merino, V.M., 1999. Synthesis and Cytotoxic Activity of N-(2-pyridylsulfenyl)urea Derivatives, a New Class of Potential Antineoplastic Agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9: 2321-2324
- Hardjono, S., 2012, Modifikasi Struktur 1-(benzoioksi)urea dan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas sitotoksiknya, *Disertasi*, Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya
- Huang, V., Lu, X., Jiang, Y., Wang, J.Y.J., 2009, Effect of hydroxyurea on the promoter occupancy profiles of tumor suppressor p53 and p73, *BMC Biology*, 7(35): 1-16
- Li, G., Tao, Z.F., Tong, Y., Przytulinska, M.K., Kovar, P., Merta, P., Chen, Z., Zhang, H., Sowin, T., Rosenberg, S.H., Lin, N.H., 2007. Synthesis and in-vitro biological activity of macrocyclic urea Chk1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17:6499–6504
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R., *Introduction to Spectroscopy*, 4th Ed., Cengage Learning, California, 15-28
- Risikesdas, 2007, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI
- Saeed, S., Rashid, N., Jones, P.G., Ali, M., Hussain, R., 2010. Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and

- anticancer agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45:1323–1331
- Song, D.Q., Du, N.N., Wang, Y.M., He, W.Y., Jiang, E.Z., Cheng, S.X., Wang, Y.X., Li, Y.H., Wang, Y.P., Li, X., Jiang, J.D., 2009. Synthesis and activity evaluation of phenylurea derivatives as potent antitumor agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17:3873–3878
- Song, D.Q., Wang, Y.M., Du, N.N., He, W.Y., Chen, K.L., Wang, G.F., Yang, P., Wu, L.Z., Zhang, X.B., Jiang, J.D., 2009. Synthesis and activity evaluation of benzoylurea derivatives as potential antiproliferative agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19:755–758