

**Laporan Akhir  
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi  
Tahun Anggaran 2013**



**M I D I K**  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**PEMODELAN MOLEKUL DAN MODIFIKASI STRUKTUR  
SENYAWA BARU TURUNAN 1-BENZOIL-1,3-DIETILUREA  
UNTUK MEMPEROLEH SENYAWA ANTIKANKER**

Oleh :

Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, Apt., M.Si. (NIDN : 0028126608)  
Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS. (NIDN : 0002105207)  
Dr. Juni Ekowati, Apt., M.Si. (NIDN : 0006026703)

Dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013  
sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga  
Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi  
Nomor : 8714/UN3/KR/2013, Tanggal 25 Juni 2013

**Universitas Airlangga  
Oktober 2013**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : PEMODELAN MOLEKUL DAN MODIFIKASI STRUKTUR  
SENYAWA BARU TURUNAN 1-BENZOIL-1,3-DIETILUREA  
UNTUK MEMPEROLEH SENYAWA ANTIKANKER

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, Apt., MSi.  
NIDN : 0028126608  
Jabatan Fungsional : Lektor  
Program Studi : Farmasi  
Nomor HP : 081235188462  
Surel (e-mail) : [nuzul\\_wd@yahoo.com](mailto:nuzul_wd@yahoo.com)

Anggota (1)

Nama Lengkap : Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS.  
NIDN : 0002105207  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dra. JUNI EKOWATI, Apt., M.Si.  
NIDN : 0006026703  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : --  
Alamat : --  
Penanggung Jawab : --  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,00  
Biaya Keseluruhan : Rp. 100.000.000,00

Surabaya, 31 Oktober 2013

Mengetahui :  
Dekan Fakultas Farmasi,

Ketua Peneliti,



Dr. Umi Athiyah, Apt., MS.  
NIP. 19560407 198103 2 001

Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, Apt., MSi.  
NIP. 19661228 199203 2 002

Mengetahui :  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

(Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.)  
NIP. 19590805 198701 1 001

## RINGKASAN

### Pemodelan Molekul Dan Modifikasi Struktur Senyawa Baru Turunan 1-Benzoil-1,3-Dietilurea Untuk Memperoleh Senyawa Antikanker

Nuzul Wahyuning Diyah, Siswandono, Juni Ekowati

Dalam rangka pengembangan urea sebagai bahan dasar obat antikanker, telah dilakukan modifikasi struktur dan sintesis 5 senyawa baru turunan Benzoil-1,3-dietilurea. Rancangan senyawa dilakukan dengan metode *ligand based drug design* melalui pemodelan molekul menggunakan reseptor tirosin kinase (pdb id. 1TVO). Pemilihan reseptor berdasarkan gugus kromofor yang sama antara turunan Benzoil-1,3-dietilurea dengan obat antikanker imatinib yang merupakan inhibitor tirosin kinase. Untuk optimasi aktivitas senyawa dalam satu turunan, dilakukan substitusi pada posisi para cincin benzena dalam struktur molekul senyawa dengan substituen yang menurut metode Topliss dapat meningkatkan aktivitas senyawa, yaitu : metil, butil, metoksi, dan klor. Berdasarkan analisis retrosintetik, senyawa turunan Benzoil-1,3-dietilurea dapat disintesis dari material awal (pereaksi) 1,3-dietilurea dan turunan benzoil klorida. Aktivitas antikanker senyawa diuji dengan metode hambatan pertumbuhan sel kanker MCF-7 karena pada sel ini terdapat overstimulasi reseptor tirosin kinase.

Permasalahannya adalah : (1) apakah dapat diperoleh senyawa turunan Benzoil-1,3-dietilurea sebagai hasil reaksi antara 1,3-dietilurea dengan senyawa turunan benzoil klorida, (2) apakah senyawa hasil sintesis mempunyai aktivitas antikanker lebih tinggi daripada hidroksiurea berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap kultur sel kanker MCF-7, dan (3) apakah aktivitas antikanker *in vitro* berhubungan dengan kekuatan interaksi senyawa dengan reseptor 1TVO pada pemodelan molekul secara *in silico*. Adapun tujuan penelitian tahap I ini adalah mensintesis 5 senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai aktivitas antikanker lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea berdasarkan sitotoksitasnya terhadap sel MCF-7 dan mengetahui hubungan antara nilai energi interaksi ligan-reseptor *in silico* dengan aktivitas antikanker *in vitro* senyawa yang mempunyai aktivitas paling tinggi di antara senyawa hasil sintesis.

Dari studi pemodelan molekul dengan program Molegro 5.5 dapat diketahui nilai energi interaksi antara senyawa (ligan) dengan reseptor, gugus-gugus pada struktur senyawa yang berinteraksi dengan protein dalam reseptor, dan jenis ikatan ligan-reseptor. Nilai energi interaksi ligan-reseptor adalah *docking score*, yaitu MolDock Score (MDS) dan Rerank Score (RS), yang diperoleh dari docking molekul ligan dengan reseptor 1TVO menggunakan program Molegro 5.5. Senyawa disintesis melalui reaksi antara 1,3-dietilurea dengan benzoil klorida tersubstitusi pada cincin. Reaksi dilakukan dalam pelarut tetrahidrofuran (THF) dan menggunakan piridin sebagai katalis. Struktur senyawa hasil sintesis diidentifikasi berdasarkan data spektroskopi IR, NMR-<sup>1</sup>H dan NMR-<sup>13</sup>C. Aktivitas antikanker diuji dengan metode hambatan pertumbuhan sel kanker (uji sitotoksik MTT) menggunakan kultur sel MCF-7 dan dinyatakan sebagai IC<sub>50</sub>. Dianalisis data *docking score* dan IC<sub>50</sub> aktivitas

sitotoksik turunan senyawa untuk mengetahui adanya hubungan antara kekuatan interaksi ligan-reseptor dengan aktivitas antikanker senyawa.

Reaksi antara 1,3-dietilurea dan turunan benzoil klorida ternyata menghasilkan senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea yang mengandung 2 cicin benzena pada kedua atom N urea. Berdasarkan pemodelan molekul senyawa-senyawa turunan ini mempunyai *docking score* yang lebih rendah daripada 1-benzoil-1,3-dietilurea dan hidroksiurea sehingga kompleks ligan-reseptor yang terbentuk lebih stabil. Data  $IC_{50}$  aktivitas sitotoksik memperlihatkan bahwa semua senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea mempunyai aktivitas sitotoksik pada kultur sel MCF-7 lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea. Senyawa yang mempunyai aktivitas antikanker lebih tinggi mempunyai nilai energi interaksi ligan-reseptor lebih rendah dibanding hidroksiurea.

Dari hasil penelitian dapat diperoleh 5 senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai aktivitas sitotoksik pada kultur sel MCF-7 lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea. Satu senyawa yang aktivitasnya paling tinggi, yaitu BEU-2, menunjukkan aktivitas 11 kali lebih tinggi daripada obat antikanker hidroksiurea sehingga dapat dikembangkan sebagai calon obat antikanker payudara.

Untuk optimasi aktivitas turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea pada tahap berikutnya akan dilakukan modifikasi struktur melalui sintesis 5 turunan lagi dan uji aktivitas antikankernya sehingga dapat diperoleh 10 senyawa antikanker yang aktivitasnya lebih tinggi dibanding hidroksiurea. Di samping itu, data dari 10 senyawa yang dihasilkan akan digunakan untuk memperoleh model hubungan kuantitatif struktur-aktivitas antikanker (HKSA) turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea. Model HKSA digunakan untuk menentukan senyawa yang paling poten dan mengetahui sifat fisikokimia yang berperan pada aktivitasnya sehingga dapat dirancang turunan senyawa antikanker baru yang aktivitasnya lebih tinggi lagi dibanding obat antikanker yang telah digunakan saat ini.

## SUMMARY

### **Molecular Modeling and The Structure Modification of Benzoyl-1,3-Diethylurea Derivatives to Find New Anticancer Agents**

Nuzul Wahyuning Diyah, Siswandono, Juni Ekowati

In order to develop urea as lead compound of anticancer drug, were modified urea's structure and synthesize a new seri compounds Benzoyl - 1,3 - diethylurea. The compounds design was conducted using ligand-based drug design through molecular modeling using receptor tyrosine kinase ( pdb id . 1TVO ). Selection of receptor clusters were based on the same chromophore between Benzoyl-1,3-diethylurea derivatives with an anticancer drug imatinib, a tyrosine kinase inhibitors. For optimization of the compounds activity, the substitutions at the benzene ring of compounds structure were carried with some substituents that according to Topliss method can increase the activity of compounds, namely : methyl, butyl, methoxy, and chlorine. Based on the retrosynthetic analysis, Benzoyl-1,3-diethylurea derivatives can be synthesized from the starting materials (reactants) 1,3-diethylurea and ring-substituted benzoyl chloride. Anticancer activities of compounds were tested by the growth inhibition method using MCF-7 cancer cell culture because there are tyrosine kinase receptor overstimulation in these cells.

The problem is: (1) whether the Benzoyl-1,3-diethylurea derivatives can be obtained as a result of the reaction between 1,3-diethylurea with ring-substituted benzoyl chloride, (2) whether the compounds synthesized have higher anticancer activities than anticancer drug hydroxyurea based on their cytotoxic effects against MCF-7 cancer cell culture, and (3) whether the *in vitro* anticancer activity related to the strength of its interaction with the receptor 1TVO on the *in silico* molecular modeling. The purpose of this phase I study is to synthesize five benzoyl-1,3-diethylurea derivatives that have anticancer activities higher than the anticancer drug hydroxyurea based on their cytotoxicities against MCF-7 cells and find out the relationship between the of *in silico* ligand-receptor interaction energy with *in vitro* anticancer activity of the most active compound.

From molecular modeling studies with Molegro 5.5 program, it can be known the interaction energy of compounds (ligands) with their receptors, groups on the structure of compounds that interact with the receptor protein, and the type of ligand-receptor binding. The ligand-receptor interaction energy is represented by docking score, i.e MolDock Score (MDS) and Rerank Score (RS), which is obtained by docking ligand molecule to the receptor 1TVO using 5,5 Molegro program. The compounds were synthesized by reaction between 1,3- diethylurea with ring-substituted benzoyl chloride. Reactions were performed in the tetrahydrofuran (THF) as solvent and using pyridine as a catalyst. The structure of the synthetic compounds were identified by spectroscopic data of IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. Anticancer activity tested by the growth inhibition method using the MCF-7 cell culture (cytotoxic MTT assay) was expressed as IC<sub>50</sub>. Docking scores and IC<sub>50</sub> cytotoxic

activities were conducted to find out whether the strength of ligand-receptor interactions related to anticancer activity.

The reaction between 1,3-diethylurea and ring-substituted benzoyl chloride results 1,3-dibenzoyl-1,3-diethylurea derivatives containing 2 benzene ring attached to N atoms of urea. Based on molecular modeling, the compounds have docking scores lower than the 1-benzoyl-1,3-diethylurea and hydroxyurea implying that ligand-receptor complexes formed are more stable.  $IC_{50}$  cytotoxic activity showed that all derivatives of 1,3-dibenzoyl-1,3-diethylurea have cytotoxic activity against MCF-7 cell culture higher than the anticancer drug hydroxyurea. Compounds that have anticancer activity has a higher ligand- receptor interaction energy (docking scores) lower than hydroxyurea.

The research have resulted five compounds of 1,3-dibenzoyl-1,3-diethylurea derivatives that have cytotoxic activities against MCF-7 cell culture higher than the anticancer drug hydroxyurea. A compound whose activity is highest, the BEU-2, showed activity eleventh level higher than the anticancer drug hydroxyurea so it can be developed as a potential anticancer drug against breast cancer.

For optimization of 1,3-dibenzoyl-1,3-diethylurea derivative activity the next stage will be structure modification of the derivative through synthesis another five compound and testing their anticancer activities to obtain some compounds which have anticancer activities higher than hydroxyurea. In addition, data from 10 compounds generated in the two stage of the researchs will be used to obtain a model of anticancer quantitative structure-activity relationship (QSAR) of 1,3-dibenzoyl-1,3-diethylurea derivative. QSAR models are used to determine the most potent compounds and determine the physicochemical properties that contribute to its activity. This is important in designing a new anticancer compound with higher activity than the anticancer drug that has been used.

## PRAKATA

Pengembangan obat baru (*Drug Design and Development*) merupakan proses yang sangat panjang dan membutuhkan waktu, tenaga, serta biaya yang tidak sedikit sehingga di Indonesia masih sedikit penelitian yang dilakukan dalam bidang ini. Untuk memacu agar proses dapat diperpendek, diupayakan usaha merancang obat secara lebih terarah dan mengurangi faktor *trial & error*, yaitu melalui rational drug design. Dengan memanfaatkan teknologi komputer masa kini, merancang obat dapat lebih terarah melalui pemodelan molekul (*molecular modeling*). Penelitian ini telah menerapkan cara merancang obat dengan pendekatan tersebut untuk menghasilkan senyawa antikanker.

Puji syukur kepada Allah SWT karena tahap I penelitian ini telah dapat dijalankan dan dapat merekomendasikan beberapa senyawa yang berpotensi sebagai obat antikanker, meskipun proses yang berlangsung tidaklah sederhana dan singkat. Tahap selanjutnya akan diarahkan untuk menentukan senyawa yang paling unggul di antara yang dihasilkan selama penelitian. Penelitian ini tidak akan berjalan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu kami menyampaikan terimakasih kepada semua pihak terkait yang telah berkontribusi dalam penelitian ini, antara lain :

- a. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah memberikan kesempatan melalui program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi.
- b. Rektor Universitas Airlangga yang telah mengalokasikan dana untuk penelitian melalui DIPA BOPTN tahun anggaran 2013.
- c. LPPM Universitas Airlangga yang telah memfasilitasi dan memberikan rekomendasi untuk melakukan penelitian ini; termasuk Tim Reviewer yang telah memberikan dukungan melalui kritik dan sarannya untuk menyempurnakan laporan penelitian.
- d. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan izin dan fasilitas penelitian, serta Ketua Departemen Kimia farmasi yang sangat membantu dalam hal perizinan.

Harapan kami, penelitian ini masih dapat berlanjut sampai tahap II sehingga manfaatnya akan lebih utuh. Laporan ini tentu masih mengandung kesalahan sehingga kami mohon kritik dan saran untuk menyempurnakannya.

Surabaya, Oktober 2013

Penulis.

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
PRAKATA .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Rancangan Obat dan Pemodelan Molekul .....	6
2.2 Modifikasi Struktur Urea .....	7
2.3 Reaksi Asilasi .....	8
2.4 Uji Aktivitas Antikanker .....	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	11
BAB IV. METODE PENELITIAN .....	12
4.1. Rancangan Penelitian .....	12
4.2. Bahan .....	12
4.3. Alat .....	13
4.4. Prosedur sintesis senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea .....	13
4.5. Uji Kemurnian dan Identifikasi Struktur Senyawa .....	13
4.6. Uji Aktivitas Antikanker .....	14
4.7. Pemodelan Molekul .....	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	32
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA .....	42
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN .....	43
DAFTAR PUSTAKA .....	44
LAMPIRAN .....	47



## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1.	<i>Docking Score</i> Turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor 1TVO menggunakan program Molegro Virtual Docker 5.5 .....	16
Tabel 5.2.	Titik lebur dan Harga Rf senyawa hasil sintesis .....	17
Tabel 5.3.	Karakteristik spektra senyawa BEU-1 .....	21
Tabel 5.4.	Karakteristik spektra senyawa BEU-2 .....	24
Tabel 5.5.	Karakteristik spektra senyawa BEU-3 .....	27
Tabel 5.6.	Karakteristik spektra senyawa BEU-4 .....	30
Tabel 5.7.	Karakteristik spektra senyawa BEU-5 .....	32
Tabel 5.8.	Struktur Umum dan Persentase Senyawa hasil sintesis .....	33
Tabel 5.9.	<i>Docking Score</i> Turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor 1TVO menggunakan program Molegro Virtual Docker 5.5 .....	34
Tabel 5.10.	Tabel 5.10. Asam-asam amino yang berinteraksi membentuk ikatan hidrogen dengan turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dalam cavity-1 reseptor 1TVO .....	38
Tabel 5.11.	Persentase sel yang hidup setelah pemberian sampel larutan senyawa uji .....	39
Tabel 5.12.	Nilai IC <sub>50</sub> senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea terhadap kultur sel MCF-7 .....	40

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1. Struktur Karmustin (a), ENU (b), hidroksiurea (c), dan 1-(benzoiloksi)urea (d) .....	2
Gambar 1.2. Struktur Imatinib (a), N-benzoilurea (b), dan 1-benzoil-1,3-dietilurea (c) .....	3
Gambar 2.1. Mekanisme reaksi asilasi .....	9
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian .....	12
Gambar 5.1. Spektrum IR senyawa BEU-1 dalam pellet KBr .....	18
Gambar 5.2. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa BEU-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	19
Gambar 5.3. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa BEU-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	20
Gambar 5.4. Spektrum IR senyawa BEU-2 dalam pellet KBr .....	22
Gambar 5.5. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa BEU-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	22
Gambar 5.6. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa BEU-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	23
Gambar 5.7. Spektrum IR senyawa BEU-3 dalam pellet KBr .....	25
Gambar 5.8. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa BEU-3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	25
Gambar 5.9. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa BEU-3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	26
Gambar 5.10. Spektrum IR senyawa BEU-4 dalam pellet KBr .....	28
Gambar 5.11. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa BEU-4( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	28
Gambar 5.12. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa BEU-4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	29
Gambar 5.13. Spektrum IR senyawa BEU-5 dalam pellet KBr .....	31
Gambar 5.14. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa BEU-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	31
Gambar 5.15. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa BEU-5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) .....	32
Gambar 5.16. Reaksi sintesis turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea	34
Gambar 5.17. Visualisasi struktur 3D Reseptor ITVO dengan <i>cavity-1</i> menurut program Molegro 5.5 .....	35
Gambar 5.18. Ligan FRZ dan residu asam amino yang membentuk <i>cavity-1</i> pada reseptor ITVO .....	36
Gambar 5.19. Molekul-molekul senyawa BEU berinteraksi dengan asam amino (A) dalam <i>cavity-1</i> reseptor ITVO (B) .....	36
Gambar 5.20. Interaksi senyawa turunan BEU dengan asam amino dalam <i>cavity-1</i> reseptor ITVO menurut program Molegro 5.5.....	37

# BAB I PENDAHULUAN

M I B I E  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

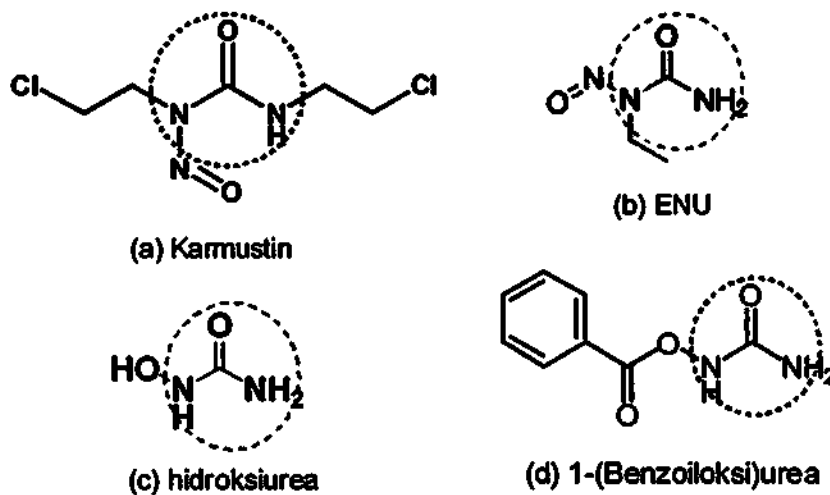
## 1.1. Latar Belakang

Kanker adalah salah satu penyakit penyebab utama kematian di negara berkembang dan juga di seluruh dunia. Dari 58 juta kematian di seluruh dunia dalam tahun 2005, tercatat 7,6 juta (13%) diantaranya disebabkan oleh kanker. Kematian yang disebabkan oleh penyakit kanker diperkirakan akan terus meningkat di tahun 2015 dan 11,4 juta orang di tahun 2030. Di Indonesia, kanker menjadi penyumbang kematian ketiga terbesar setelah penyakit jantung (DepKes RI, 2006). Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia (16,85%), disusul kanker leher rahim (11,78%). Hingga kini masih terus dilakukan usaha untuk menemukan obat antikanker baru karena obat-obat yang sudah lama digunakan lambat laun menjadi kurang efektif dan ada kecenderungan resistensi (Kar, 2007).

Obat antikanker klasik yang digunakan dalam kemoterapi antara lain adalah golongan senyawa pengalkil, antimetabolit, antibiotika antrasiklin, alkaloida tanaman, inhibitor topoisomerase. Obat-obat golongan tersebut menghambat pembelahan sel atau sintesis dan fungsi DNA dengan beberapa cara. Obat antikanker generasi baru tidak mempengaruhi DNA secara langsung, tetapi mempengaruhi molekul target spesifik yang diperlukan untuk karsinogenesis dan pertumbuhan sel kanker; dikenal dengan istilah *molecularly targeted therapy* (Zhukov dan Tjulandin, 2008). Antikanker yang termasuk golongan ini adalah inhibitor tirosin kinase dan antibodi monoklonal. Inhibitor tirosin kinase yang telah menjadi obat antikanker antara lain : imatinib, gefitinib, dan erlotinib. Ahli onkologi meyakini bahwa terapi molekul target adalah kemoterapi masa depan.

Pengembangan obat modern dilakukan melalui proses yang panjang serta memakan biaya yang tinggi, karena pada awalnya bersifat coba-coba (*trial and error*). Untuk meminimalkan sifat coba-coba, dilakukan rancangan obat dengan mengembangkan obat yang telah diketahui struktur molekul dan aktivitas biologisnya, atas dasar penalaran yang sistemik dan rasional (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Dalam era komputer masa kini pendekatan hubungan struktur dan aktivitas dapat dilakukan secara lebih cepat dan terarah dengan “pemodelan molekul” (*molecular modeling*) (Abraham, 2003).

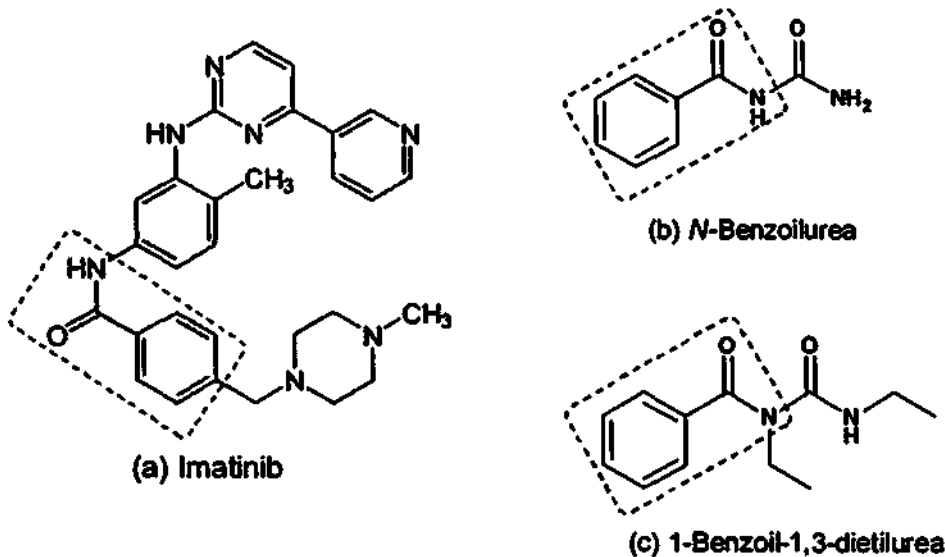
Langkah pertama dalam rancangan obat adalah menentukan senyawa penuntun (*lead compound*) yang akan di modifikasi strukturnya untuk memperoleh aktivitas yang dikehendaki, meningkatkan aktivitas atau selektivitasnya, atau menurunkan toksisitasnya (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Urea adalah salah satu dari *lead compound* yang menjadi induk dari sekian banyak turunan yang potensial sebagai antikanker. Obat antikanker turunan urea yang dikenal antara lain adalah karmustin atau BCNU (*bis-chloroethylnitrosourea*) dan ENU (*N-etil-N-nitrosourea*) yang termasuk senyawa pengalkil, serta hidroksiurea yang bekerja dengan menghambat enzim ribonukleotida reduktase (Platt, 2008). ENU dapat menginduksi mutasi dan juga toksik pada dosis tinggi. Struktur senyawa-senyawa tersebut ditampilkan pada gambar 1.



**Gambar 1.1.** Struktur Karmustin (a), ENU (b), hidroksiurea (c), dan 1-(benzoiloksi)urea (d)

Siswandono (1999) telah melakukan sintesis senyawa baru turunan benzoilurea yang mempunyai aktivitas pada sistem saraf pusat pada mencit. Susilowati dkk. (2011) melaporkan bahwa *N*-benzoilurea, *N*-4-metoksibenzoilurea, dan 2-klorobenzoilurea menunjukkan efek sitotoksik berdasarkan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*), sehingga berpotensi sebagai antikanker. Aktivitas sitotoksik senyawa tersebut lebih tinggi daripada hidroksiurea yang dikenal sebagai obat antikanker. Hardjono (2011) telah melakukan modifikasi struktur urea dengan mensintesis 9 turunan 1-(benzoiloksi)urea dan menyimpulkan bahwa ada hubungan linear antara aktivitas sitotoksik *in vitro* terhadap se HeLa dengan prediksi aktivitas secara *in silico*. Aktivitas sitotoksik turunan 1-(benzoiloksi)urea lebih tinggi dibanding hidroksiurea.

Dalam usaha mendapatkan senyawa antikanker baru dilakukan modifikasi struktur urea. Struktur senyawa antikanker mengandung gugus NH-CO-NH yang merupakan gugus farmakoforik. Pada beberapa senyawa, farmakofor tersebut berada dalam cincin heterosiklik aromatik atau dalam heterosiklik nonaromatik, sebagai -NH atau -N- (Moreau *et al.*, 2008). Dengan mempertahankan farmakofor -NH-CO-NH- serta menambahkan gugus alkil berupa etil dan gugus aromatik, dirancang senyawa turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea (gambar 2).



**Gambar 1.2.** Struktur Imatinib (a), N-benzoilurea (b), dan 1-benzoil-1,3-dietilurea (c)

Struktur senyawa dirancang berdasarkan pemodelan molekul *ligand-based design* menggunakan program Molegro versi 5.5. Reseptor yang dipilih untuk pemodelan molekul adalah tirosin kinase (pdb id. 1TVO) karena farmakofor yang sama dalam struktur inhibitor tirosin kinase imatinib dan senyawa 1-benzoil-1,3-dietilurea (gambar 2).

Dari *docking* molekul 1-benzoil-1,3-dietilurea terhadap reseptor 1TVO diperoleh *docking score* yaitu *Rerank Score* (RS) sebesar 72,56. RS 1-benzoil-1,3-dietilurea lebih tinggi daripada RS hidroksiurea (-40,81) dan benzoilurea (-61,97). Besarnya nilai RS tersebut dapat menjelaskan bahwa turunan benzoilurea mempunyai efek sitotoksik lebih tinggi daripada hidroksiurea. Berdasarkan pemodelan molekul, senyawa turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea hasil modifikasi akan mempunyai aktivitas antikanker yang lebih tinggi daripada hidroksiurea.

Untuk optimasi aktivitas antikanker, dilakukan modifikasi struktur senyawa 1-benzoil-1,3-dietilurea berdasarkan perubahan sifat lipofilik, sterik, dan elektronik senyawa. Modifikasi sifat lipofilik dan elektronik dilakukan dengan memasukkan substituen pada cincin benzena yang diprediksi akan menghasilkan senyawa dengan aktivitas lebih tinggi daripada senyawa induk; substituen tersebut digunakan dalam model Topliss (Patrick, 2009). Substituen metil dan *tert*-butil ( $C-(CH_3)_3$ ) yang non polar akan meningkatkan sifat lipofilik, sedangkan substituen yang elektronegatif seperti metoksi dan kloro akan mengubah sifat elektronik senyawa. Modifikasi sifat sterik dihasilkan dari perubahan ukuran gugus benzoil yang tersubstitusi (Diyah, dkk., 2007). Berdasarkan analisis retrosintesis, turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea dapat disintesis melalui reaksi antara 1,3-dietilurea dan turunan benzoil klorida dengan mekanisme asilasi nukleofilik. Atom N gugus N-H amida pada 1,3-dietilurea bertindak sebagai nukleofil yang menyerang asil pada benzoil klorida. Mengingat terdapat 2 gugus N-H pada 1,3-dietilurea, ada kemungkinan keduanya dapat diasilkan oleh benzoil klorida sehingga perbandingan mol pereaksi dan lamanya reaksi merupakan kondisi reaksi yang sangat penting.

Untuk menguji aktivitas antikanker dilakukan penentuan aktivitas hambatan pertumbuhan sel secara *in vitro* (Fortin *et al.*, 2005). Kultur sel tumor yang digunakan adalah sel karsinoma payudara (Sel MCF-7) karena pada sel ini terdapat overstimulasi reseptor tirosin kinase. Sebagai kontrol positif adalah hidroksiurea, obat antikanker yang masih banyak digunakan dan merupakan turunan urea. Aktivitas hambatan pertumbuhan sel dinyatakan dalam  $IC_{50}$ , yaitu kadar obat yang dapat mengakibatkan kematian 50 % sel tumor (Li *et al.*, 2003).

## 1.2. Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah :

- a. apakah dapat diperoleh senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea sebagai hasil reaksi antara 1,3-dietilurea dengan turunan benzoil klorida,
- b. apakah senyawa hasil sintesis mempunyai aktivitas antikanker lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea berdasarkan efek sitotoksiknya pada kultur sel MCF-7 ?
- c. apakah aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 *in vitro* ( $IC_{50}$ ) berhubungan dengan kekuatan interaksi (*docking score*) terhadap reseptor ITVO pada pemodelan molekul secara *in silico* ?

Dari penelitian tahap I akan diperoleh senyawa baru turunan benzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7 lebih tinggi dibandingkan dengan obat antikanker hidroksiurea. Setelah dilanjutkan sampai tahap II, dari semua senyawa hasil sintesis yang aktivitas sitotoksiknya lebih tinggi dibanding hidroksiurea akan diperoleh senyawa yang paling tinggi aktivitasnya terhadap sel kanker payudara (MCF-7). Juga dihasilkan model HKSA yang dapat digunakan untuk desain dan modifikasi struktur turunan benzoil-1,3-dietilurea sebagai antikanker yang bermanfaat untuk pengembangan Ilmu Kefarmasian.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Rancangan Obat dan Pemodelan Molekul

Salah satu proses dalam usaha mendapatkan obat baru adalah mencari senyawa penuntun/induk (*lead compound*) yang sudah diketahui aktivitasnya untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi senyawa baru dengan efek yang dikehendaki. Pada umumnya senyawa yang akan dikembangkan mempunyai sifat yang kurang menguntungkan, seperti aktivitas yang lemah, kurang spesifik, efek samping besar, kurang stabil, masa kerja singkat, atau mempunyai bau dan rasa yang kurang menyenangkan (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Dalam era komputer masa kini pendekatan hubungan struktur dan aktivitas dapat dilakukan secara lebih cepat dan terarah dengan “pemodelan molekul” (*molecular modeling*) (Abraham, 2003). Rancangan obat melalui pemodelan molekul dapat menggunakan model *structure-based design* atau *ligand-based design*. Dengan pemodelan molekul aktivitas biologis suatu senyawa dapat diperkirakan sebelum senyawa disintesis, melalui penentuan energi interaksi senyawa (ligan) dengan reseptor berdasarkan *docking* senyawa dengan “ruang” yang ditempati ligan dalam reseptor. Makin rendah energi interaksi ligan-reseptor, makin stabil kompleks yang terbentuk dan dihasilkan efek hambatan atau aktivasi yang tinggi terhadap reseptor sehingga makin tinggi aktivitas biologisnya.

Tujuan *docking* molekul adalah untuk optimasi konformasi molekul protein (reseptor) dan ligan sehingga diperoleh energi bebas sistem yang minimal. Dalam *docking* molekul, struktur protein target telah ditetapkan menggunakan teknik biofisik seperti kristalografi x-ray atau spektroskopi NMR. Struktur protein dan database ligan-ligan yang poten merupakan input untuk program *docking*. Struktur molekul protein dan ligan dapat diunduh dari beberapa database yang tersedia seperti RSCB *Protein Data Bank* (PDB).

Dalam program *docking* masing-masing bentuk dari pasangan ligan-reseptor disebut “pose”. Pada program untuk ligan yang fleksibel, konformasi ligan dapat dihasilkan dengan adanya tempat ikatan pada reseptor (*receptor binding cavity*) (Friesner, 2004).



Keberhasilan program *docking* bergantung pada dua komponen, yaitu *search algorithm* dan fungsi *scoring*. Fungsi *scoring* mengambil “pose” sebagai input untuk menghasilkan bilangan yang mewakili “pose” yang lebih disukai. Sebagian besar fungsi *scoring* berdasarkan pada mekanika molekul dan menggunakan *force field*, yaitu energi bebas dari “pose”; energi yang rendah menunjukkan sistem dan interaksi yang stabil (Klebe and Mietzner, 1994). Fungsi *scoring* pada berbagai program *docking* mempunyai istilah yang berbeda; pada program Molegro Virtual Docker *docking score* dinyatakan dalam *MolDock Score* dan *Rerank Score* (Yang and Chen, 2004).

## 2.2. Modifikasi Struktur Urea

Urea adalah salah satu dari *lead compound* yang menjadi induk dari turunannya yang potensial sebagai antikanker. Beberapa turunan benzoilurea, seperti diflubenzuron dan fluometuron mempunyai efek insektisida dan bersifat toksik terhadap sel (Ledirac, 2000). Sifat sitotoksik urea menjadi dasar dikembangkannya turunan urea sebagai antikanker. Turunan urea yang termasuk obat antikanker antara lain : karmustin (*alkylating agent* turunan nitrosourea), hidroksiurea (antimetabolit penghambat ribonukleotida reduktase), dan sorafenib (generasi baru kelompok inhibitor Raf kinase).

Hidroksiurea (HU) adalah obat antikanker klasik turunan urea yang masih digunakan dan banyak dijadikan bahan penelitian obat antikanker. Diketahui bahwa HU mempengaruhi target enzim spesifik yang terlibat dalam perkembangan kanker seperti histon deasetilase, matriks metaloproteinase (MMP), dan ribonukleotida reduktase (Saban and Bujak, 2009) sehingga dapat dirancang senyawa turunan urea yang berguna dalam *targeted therapy*. HU mempunyai sifat khas yaitu mampu menghasilkan oksida nitrat yang merupakan vasodilator dapat menyebabkan efek antitumor. Penghambatan ribonukleotida reduktase oleh HU kemungkinan karena HU mempunyai elektron tidak berpasangan yang dapat memadamkan radikal tirosin (Avendano and Menendes, 2008).

Yang and Gao (2012) telah mensintesis turunan *N*-asil urea siklik melalui reaksi antara 1-((6-kloropiridin-3-il)metil)imidazolidin-2-on dengan berbagai asil klorida yang memperoleh hasil 35-95%. Juga disintesis turunan urea siklik yang mengandung amina  $\alpha$ -tersier melalui reaksi substitusi nukleofilik 1-(2-haloasetil)-3-((6- kloropiridin-3-il)metil)imidazolidin-2-on dengan berbagai amina sekunder yang

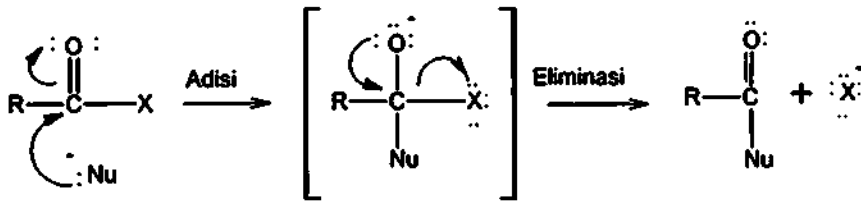
memperoleh hasil 49-86%. Sebagian besar reaksi berlangsung dalam pelarut toluen, tetapi ada yang menggunakan THF dan diklorometana. Sebagai katalis digunakan trietilamin (TEA) dan piridin. Zheng *et al.* (2010) melakukan sintesis beberapa turunan *N*-alkilurea dengan cara asilasi berbagai anilin tersubstitusi cincin dalam pelarut diklorometana dengan katalis TEA. Song *et al.* (2008) melaporkan sintesis turunan amida dan urea dari benzotiazol yang direaksikan dengan turunan benzoil klorida dalam pelarut dimetilformamida (DMF). Senyawa-senyawa turunan urea tersebut mempunyai aktivitas antikanker.

Susilowati dkk. (2011) melaporkan bahwa *N*-benzoilurea, *N*-4-metoksibenzoilurea, dan 2-klorobenzoilurea menunjukkan efek sitotoksik berdasarkan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*), sehingga berpotensi sebagai antikanker. Aktivitas sitotoksik senyawa tersebut lebih tinggi daripada hidroksiurea yang telah dikenal sebagai obat antikanker. Diyah dkk. (2013) telah melakukan studi HKSA dan pemodelan molekul turunan benzoilurea menggunakan reseptor ribonukleotida reduktase (PDB id. 3HNC) dan melaporkan bahwa terdapat hubungan linier antara total energi interaksi ligan-reseptor (*Rerank Score* = RS) dengan aktivitas sitotoksik *in vitro*. Turunan benzoilurea, yang mempunyai nilai RS lebih rendah daripada hidroksiurea, mempunyai aktivitas lebih tinggi. Aktivitas sitotoksik turunan benzoilurea dipengaruhi pula oleh sifat sterik (MR) dan sifat lipofilik (log P).

### 2.3. Reaksi Asilasi

Urea mengandung 2 gugus amina yang dapat mengalami asilasi dan menghasilkan suatu amida. Reaksi asilasi merupakan proses pemindahan gugus asil ( $R-C=O$ ) dari satu gugus molekul ke gugus molekul yang nukleofilik. Gugus yang bertindak sebagai nukleofil mempunyai sepasang elektron bebas dan menyerang atom karbon asil pada gugus karbonil.

Mekanisme reaksi substitusi asil nukleofilik meliputi adisi nukleofil  $Nu:$  pada gugus karbonil, diikuti dengan eliminasi  $X$  (halida atau gugus pergi lainnya). Mekanisme reaksi asilasi atau substitusi nukleofilik pada gugus asil terjadi dua tahap. Tahap pertama adalah adisi nukleofilik membentuk intermediet tetrahedral. Kemudian tahap kedua berlangsung, yaitu lepasnya gugus pergi ( $-X^-$ ). Lepasnya gugus pergi tersebut akan segera diikuti dengan pembentukan kembali ikatan rangkap karbonil (Clayden, 2001).



**Gambar 2.1.** Mekanisme reaksi asilasi

Asil halida dan anhidrida adalah turunan karboksilat yang merupakan bahan pengasil reaktif karena kombinasi efek polar halogen atau oksigen, yang meningkatkan reaktivitas gugus karbonil, dan memudahkan intermediate tetrahedral dapat mengeluarkan gugus pergi (Carey and Giuliano, 2011). Asil klorida lebih reaktif daripada anhidrida dalam reaksi asilasi nukleofilik. Substitusi asil klorida terhadap gugus amin atau gugus hidroksi akan menghasilkan senyawa baru dengan melepaskan asam klorida. Asam klorida yang dilepaskan akan ditangkap oleh basa natrium hidroksida, dan metode ini pertama kali diperkenalkan oleh *Schotten-Baumann* (Clayden, 2001).

Asilasi secara langsung pada struktur urea telah dilakukan melalui reaksi antara urea dengan benzoil klorida dalam pelarut THF menghasilkan turunan benzoilurea yang mempunyai aktivitas penekan saraf pusat (Siswandono, 1999). Reaksi asilasi dengan benzoil klorida telah dilakukan terhadap tiourea (Suzana dkk., 2009) menghasilkan turunan benzoilurea dan terhadap asam salisilat menghasilkan turunan asam benzoilsalisilat (Diyah dkk., 2007). Sedangkan Purwanto (2010) melakukan reaksi benzoilasi gugus N pada fenilurea menghasilkan turunan *N*-benzoil-*N'*-fenilurea. Reaksi dilakukan dalam THF dengan katalis piridin.

#### 2.4. Uji Aktivitas Antikanker

Obat antikanker adalah senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan (kanker). Obat antikanker sering dinamakan pula sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Tumor adalah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal dari jaringan baru (neoplasia) yang tidak membahayakan kehidupan. Ada 3 cara untuk mengatasi kanker, yaitu : pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Di samping itu ada cara lain, seperti imunoterapi, terapi hormon, dan terapi gen. Kemoterapi umumnya menggunakan obat berbobot molekul

rendah (*small molecule*) untuk merusak tumor secara selektif atau paling tidak membatasi pertumbuhannya; disebut obat antikanker (Thurston, 2007).

Sitotoksik dapat diartikan sebagai meracuni sel atau membunuh sel. Pemberian kemoterapi dan radioterapi adalah bentuk terapi dengan cara membunuh sel kanker. Aktivitas sitotoksik dapat ditunjukkan dengan persentase sel kanker yang mati karena pemberian senyawa obat yang ditentukan aktivitasnya. Aktivitas sitotoksik dapat ditentukan secara *in vitro* yaitu : (a) pada larva udang dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), (b) pada model sel non mamalia, seperti ragi yang uniseluler (Shweta, *et al.*, 2012) atau *Drosophila* yang multiseluler, (c) pada kultur sel kanker manusia dengan metode hambatan pertumbuhan sel (Campestre *et al.*, 2006).

Aktivitas sitotoksik pada metode BST dinyatakan sebagai  $LC_{50}$ , yaitu kadar senyawa yang mengakibatkan kematian 50% larva udang (McLaughlin, 1991). Sedangkan pada metode yang menggunakan kultur sel kanker aktivitas sitotoksik dinyatakan sebagai  $IC_{50}$ , yaitu kadar senyawa uji yang mengakibatkan kematian 50% sel. Metode ini telah digunakan pada berbagai penelitian aktivitas antikanker turunan urea (Fortin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2003). Jumlah sel yang mati ditentukan dengan menghitung sel yang masih hidup setelah pemberian senyawa uji. Untuk menentukan jumlah sel yang hidup dapat digunakan pewarnaan dengan *trypan blue* atau dengan metode MTT.

Kultur sel yang digunakan dalam uji hambatan pertumbuhan sel kanker dapat berasal dari berbagai tipe tumor manusia. Beberapa kultur sel tumor yang telah digunakan dalam uji aktivitas antikanker turunan urea adalah : CEM (leukemia *T-cell*), HT-29 dan HCT-116 (karsinoma kolon); M21 dan MEL-AC (melanoma kulit); HTB-54 (karsinoma paru); HeLa (karsinoma serviks); MCF-7 dan T47D (karsinoma payudara); serta Hep2G (hepatokarsinoma). Sel HeLa yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) yang diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Sel T47D merupakan sel kanker yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara, memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel kanker T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi (Schafer *et al.*, 2000). Sel MCF-7 adalah kultur sel epitel yang diturunkan dari adenokarsinoma payudara, sel ini berguna untuk mendeteksi MAPK/ERK dan komponen jalur PI3K seperti Akt (Lacroix *et al.*, 2006).

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini merupakan bagian dari 2 tahap penelitian. Tujuan penelitian tahap I ini adalah :

- a. Memperoleh 5 senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea
- b. Mengetahui aktivitas sitotoksik senyawa hasil sintesis terhadap kultur sel MCF-7 dibandingkan dengan hidroksiurea.
- c. Menentukan hubungan antara hasil studi interaksi senyawa dengan reseptor melalui pemodelan molekul (*secara in silico*) dengan uji aktivitas antikanker secara *in vitro*.

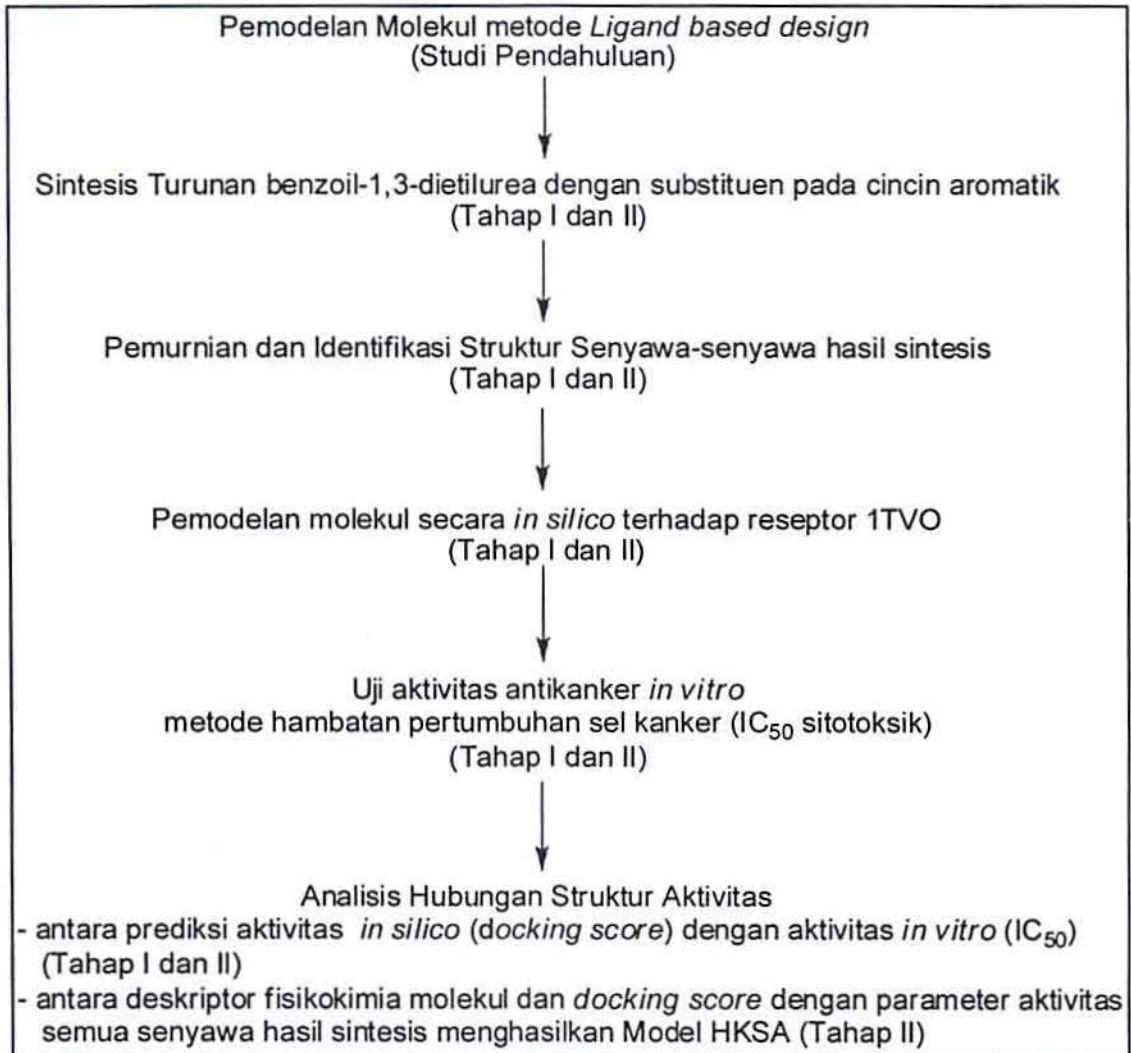
#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Dengan diperolehnya beberapa senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 akan dapat dikembangkan obat antikanker baru yang dapat dimanfaatkan dalam terapi kanker payudara. Dengan berhasilnya disintesis senyawa dari bahan awal dietilurea, akan meningkatkan nilai tambah bahan dasar urea sebagai bahan baku obat.

## BAB IV METODE PENELITIAN

M I A I E  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 4.1. Rancangan Penelitian



**Gambar 4.1.** Skema Rancangan Penelitian

### 4.2. Bahan

Bahan untuk sintesis dan analisis struktur : 1,3-dietiltiourea, 4-metilbenzoil klorida, 4-t-butylbenzoil klorida, 4-metoksibenzoil klorida, 4-klorobenzoil klorida (Sigma); piridin, berbagai pelarut organik (aseton, etil asetat, *n*-heksana, kloroform, etanol, dan metanol), dan Lempeng Kromatografi lapisan Tipis (KLT) Kieselgel 60 F<sub>254</sub> buatan E. Merck.

Bahan untuk uji aktivitas : Senyawa hasil sintesis, kultur sel MCF-7, Media Kultur DMEM, DMSO, dapar fosfat salin (PBS), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), SDS 10% dalam 0,1 N HCl.

#### 4.3. Alat

Alat yang digunakan untuk sintesis dan analisis struktur senyawa : alat gelas di laboratorium, Spektrofotometer UV-vis Shimadzu HP 8452 A, Spektrofotometer Jasco FT-IR 5300, Spektrometer NMR JEOL ECS-400, Alat penentu titik lebur Fisher-John, Corning Hot Plate P 351, Neraca analitik Shimadzu LM-20. Alat untuk uji sitotoksik: Mikropipet 200, 1000  $\mu$ L dan tip, tabung reaksi, *microplate*, *Conical tube*, ELISA-Reader. Untuk Pemodelan Molekul digunakan komputer dengan prosesor intel Core i3 berbasis operasi windows 7 dengan program-program : ChemBioDraw Ultra 11.0, Molegro Virtual Docker 5.5, dan untuk analisis HKSA digunakan SPSS 11.5.

#### 4.4. Prosedur sintesis senyawa turunan benzoil-1,3-dietilurea

Pada labu alas bulat 200 ml 0,0275 mol 1,3-dietilurea dicampur dengan 40 ml tetrahidrofur dan 4 ml piridin. Pada suhu 5° C ditambahkan larutan turunan benzoil klorida 0,025 mol dalam 20 ml tetrahidrofur, sedikit-sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Setelah larutan turunan benzoil klorida habis, campuran direfluks dan diaduk selama 3 jam dalam penangas air suhu 50°C, kemudian dilanjutkan selama 20 jam dalam suhu ruang.

Setelah reaksi dihentikan, tetrahidrofur diuapkan pada lemari asam. Pada hasil reaksi ditambahkan larutan natrium bikarbonat jenuh sambil diaduk sampai tidak terjadi gelembung udara. Hasil disaring dengan corong Buchner, zat padat dicuci dengan air, kemudian disaring kembali.

Dilakukan rekristalisasi dengan cara melarutkan zat padat dengan campuran etanol-air di atas pemanas (*hot plate*). Larutan disaring, filtrat didiamkan dalam suhu kamar sampai terbentuk kristal. Kristal yang terbentuk dicuci dengan etanol dingin, kemudian dikeringkan dalam oven.

#### 4.5. Uji Kemurnian dan Identifikasi Struktur Senyawa

Uji kemurnian senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan KLT dan penampak noda lampu UV. Penentuan titik lebur dilakukan dengan Fisher-John *melting point apparatus*. Identifikasi struktur senyawa-senyawa hasil sintesis

dilakukan secara spektroskopi ultra-violet (UV), infra merah (IR), resonansi magnet inti  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  (Silverstein dkk., 2005).

#### 4.6. Uji Aktivitas Antikanker

Aktivitas antikanker ditentukan melalui uji sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dengan metode MTT. Disiapkan larutan induk dari 5 senyawa uji dengan kadar 25000  $\mu\text{g/mL}$  dalam pelarut DMSO. Dari masing-masing larutan induk dibuat satu seri larutan baku kerja konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250,  $\mu\text{g/mL}$  dengan cara pengenceran. Juga dibuat larutan obat antikanker standar (hidroksiurea) sebagai kontrol positif dan blanko pelarut sebagai kontrol negatif.

Disiapkan kultur sel kanker berupa suspensi sel dengan kepadatan  $5 \times 10^4$ . Sel dimasukkan ke dalam sumuran *microplate*, masing-masing 100  $\mu\text{L}$ , kecuali sumuran yang digunakan sebagai kontrol media, kemudian *plate* diinkubasi semalam. Media kultur dibuang, dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang. Sebanyak 0,2 mL dari masing-masing baku kerja, kontrol positif dan kontrol negatif dimasukkan dalam sumuran *microplate*. Untuk tiap konsentrasi larutan baku kerja dibuat replikasi 3. *Microplate* diinkubasi dalam inkubator 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ .

Disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan mengencerkan 1 mL stok MTT (50 mg MTT dalam 10 mL PBS) dengan media secukupnya. Setelah inkubasi, media sel dibuang dan sel dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan reagen MTT 100  $\mu\text{L}$  ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). *Plate* diinkubasi 24 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$ . Setelah terbentuk formazan ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* dibungkus dengan aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Selanjutnya absorbansi masing-masing sumuran diamati dengan ELISA reader pada 595 nm. Makin banyak sel yang hidup, absorbansi makin besar. Persentase sel yang hidup dihitung dari absorbansi dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Sel yang hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

$\text{IC}_{50}$  senyawa uji dihitung dengan analisis regresi probit dari data persentase sel yang hidup pada pemberian 5 kadar senyawa uji.



#### 4.7. Pemodelan Molekul

Pemodelan molekul dilakukan dengan program Molegro versi 5.5 menggunakan reseptor tirosin kinase (PDB id. : 1TVO) dengan cara sebagai berikut : diunduh struktur 3 dimensi reseptor dari PDB kemudian ditentukan *active site*-nya. Diimpor struktur 3D molekul ke dalam *workspace* layar kemudian diletakkan ke dalam *cavity-3* dengan cara *align* pada *reference ligand*. Dilakukan *docking* molekul untuk memperoleh *docking score*, yaitu *MolDock Score* (MDS) dan *Rerank Score* (RS) yang merupakan energi interaksi antara senyawa (ligan) dengan reseptor. Diamati jenis ikatan yang terjadi antara ligan-reseptor dan asam amino pada reseptor yang berinteraksi dengan ligan secara 2 dimensi dan 3 dimensi.

Hubungan antara prediksi aktivitas secara *in silico* dan aktivitas sitotoksik *in vitro* dianalisis dengan analisis regresi linier menggunakan program SPSS. Sebagai variabel bebas adalah *docking score* (MDS atau RS) dan variabel tergantungnya adalah aktivitas sitotoksik ( $IC_{50}$ ). Adanya hubungan linier ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi ( $r$ ), simbbangan baku ( $s$ ), dan nilai F dari masing-masing persamaan regresi yang diperoleh.

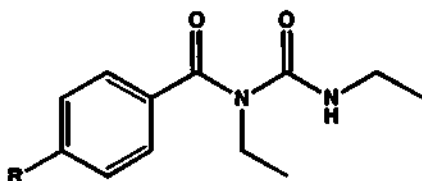
## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Docking Score Turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea

Pada pemodelan molekul interaksi senyawa turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor ITVO dilakukan *docking* molekul dihasilkan *docking score*, yaitu MolDock Score (MDS) dan Rerank Score (RS). Hidroksiurea sebagai kontrol positif antikanker mempunyai MDS = -43,0298 dan RS = -38,2967. MDS dan RS senyawa-senyawa turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea ditampilkan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. *Docking Score* Turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor ITVO menggunakan program Molegro Virtual Docker 5.5



R	MolDock Score (kcal/mol)	Rerank Score (kcal/mol)
H	-85,2922	-71,7933
CH <sub>3</sub>	-87,0111	-70,6498
C-(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-83,5070	-71,8342
OCH <sub>3</sub>	-92,1882	-79,6065
Cl	-84,3227	-65,8843

Data tersebut menunjukkan bahwa nilai energi interaksi molekul turunan 1-benzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor ITVO lebih rendah daripada hidroksiurea sehingga kompleks ligan-reseptor yang terbentuk lebih stabil.

#### 5.2. Titik Lebur dan nilai Rf senyawa hasil sintesis

Diperoleh 5 senyawa hasil sintesis yang berupa zat padat berwarna putih yang tak larut dalam air. Data titik lebur dan nilai Rf dari KLT dengan fase diam silika gel senyawa-senyawa hasil sintesis disajikan pada tabel 5.2. Sebagai pembanding KLT digunakan senyawa *N,N'*-dietilurea dan asam benzoat, yang merupakan hasil hidrolisis benzoil klorida yang digunakan sebagai material awal dalam sintesis. Sedangkan sebagai pembanding KLT digunakan senyawa asam benzoat.

**Tabel 5.2. Titik lebur dan Harga Rf senyawa hasil sintesis**

Kode Senyawa	Titik Lebur (°C)				Rf *		
	1	2	3	Rata-rata	Rf <sub>1</sub>	Rf <sub>2</sub>	Rf <sub>3</sub>
BEU-1	146	147	147	147	0,83	0,36	0,60
BEU-2	95	96	95	95	0,75	0,46	0,58
BEU-3	150	151	151	151	0,92	0,49	0,78
BEU-4	79	78	79	79	0,91	0,72	0,76
BEU-5	142	140	141	141	0,78	0,33	0,50
Asam benzoat	112	113	113	113	0,40	0,34	0,38
1,3-dietilurea	104	105	104	104			

**Keterangan \*:**Rf<sub>1</sub> : menggunakan eluen *n*-heksana- kloroform- aseton = 5:4:1Rf<sub>2</sub> : menggunakan eluen kloroform- *n*-heksana = 6:4Rf<sub>3</sub> : menggunakan eluen *n*-heksana-aseton = 7:3

Senyawa-senyawa hasil sintesis cukup murni berdasarkan titik leburnya dan pada KLT dengan eluen yang berbeda menghasilkan satu noda. Hasil sintesis mempunyai sifat lebih non polar daripada asam benzoat, yang ditunjukkan oleh Rf hasil KLT menggunakan eluen yang relatif non polar. Sifat ini berkaitan dengan masuknya gugus benzoil beserta substituenya dari pereaksi turunan benzoil klorida ke dalam struktur dietilurea. Perbedaan titik lebur senyawa hasil sintesis dibandingkan material awal sintesis dan perubahan polaritasnya menunjukkan telah terbentuk senyawa baru yang berbeda dari asalnya. Senyawa BEU-2 dan BEU-4 mempunyai titik lebur rendah, di bawah 100 °C, menunjukkan bahwa gaya tarik antar molekulnya dalam struktur padat lemah. Keduanya dirancang mengandung gugus benzoil yang tersubstitusi metil (BEU-2) dan metoksi (BEU-4) pada posisi para. Secara organoleptis kristal BEU-2 sangat halus, sedangkan BEU-4 agak liat mirip lilin. Persentase hasil disintesis akan dihitung setelah struktur senyawa diidentifikasi secara spektroskopik.

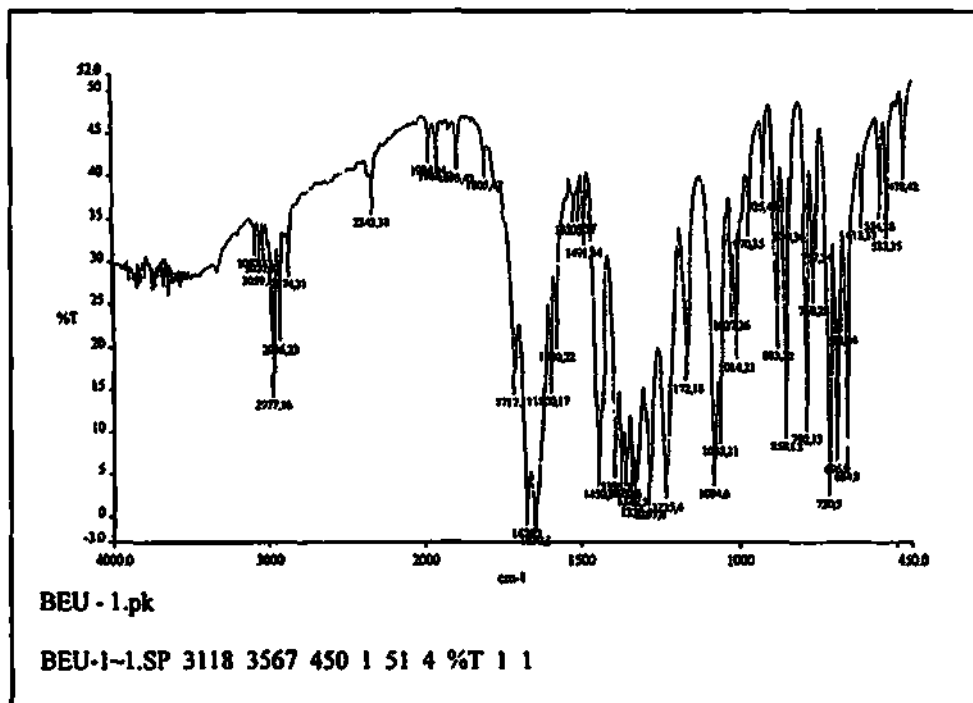
**5.3. Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis**

Struktur senyawa hasil sintesis diidentifikasi berdasarkan hasil analisis data spektroskopi yang meliputi spektra ultraviolet, infra merah dan <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR. Data spektra infra merah dan <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR dapat dilihat pada gambar 5.1 – 5.15 serta dirangkum dalam tabel 5.3 – 5.7. Spektra dietilurea dan asam benzoat, sebagai pembanding, dapat dilihat pada lampiran. Spektra ultraviolet semua

senyawa hasil sintesis hanya menunjukkan satu puncak serapan pada  $\lambda$  222 – 250 nm (tabel 5.3 – 5.7) yang merupakan hasil transisi elektronik  $\pi - \pi^*$ .

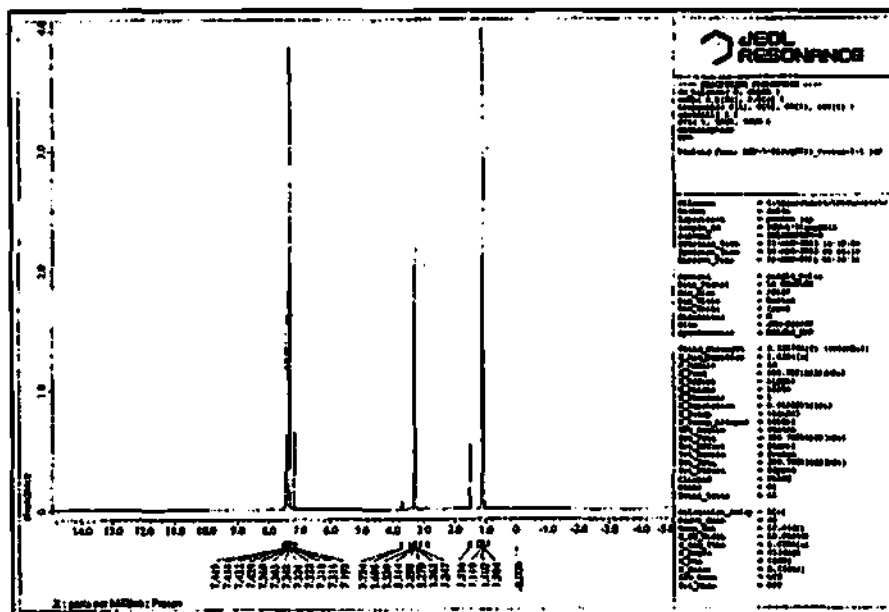
### 5.3.1. Senyawa BEU-1

Pada spektrum IR senyawa BEU-1 (gambar 5.1) terdapat pita serapan pada  $3059\text{ cm}^{-1}$  dari =C-H,  $1717$  dan  $1676\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=O dari amida, pita pada  $1600\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=C. Tidak terdapat pita serapan khas gugus N-H di sekitar  $3345\text{ cm}^{-1}$  seperti pada senyawa 1,3-dietilurea ataupun O-H asam di  $3071\text{ cm}^{-1}$  seperti pada spektrum IR asam benzoat. Berdasarkan gambar 5.1. pada senyawa terdapat gugus amida dan cincin aromatis.



Gambar 5.1. Spektrum IR senyawa BEU-1 dalam pellet KBr

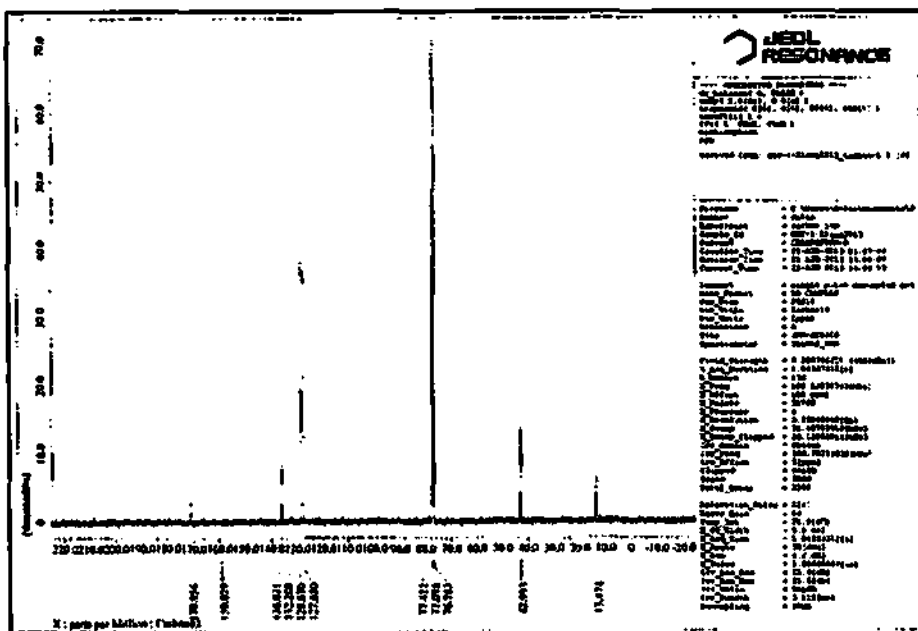
Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa BEU-1 yang menunjukkan jenis dan jumlah proton dalam senyawa ditampilkan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa BEU-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa BEU-1 menunjukkan puncak pada  $\delta = 7,2 - 7,4$  ppm dari proton gugus  $=\text{CH}$  benzena;  $\delta = 3,2$  ppm dari proton gugus  $-\text{CH}_2$ ;  $\delta = 1,1$  ppm dari proton gugus  $-\text{CH}_3$ . Jumlah proton dari integrasi ada 10H, sedangkan pada struktur pereaksi 1,3-dietilurea terdapat 2 gugus  $\text{C}_2\text{H}_5$ , sehingga jumlah proton seluruhnya adalah  $10\text{H} \times 2 = 20\text{H}$ . Tidak terdapat puncak tunggal pada sekitar 8 ppm dari proton gugus  $\text{N-H}$ .

Struktur senyawa yang dirancang, yaitu : 1-benzoil-1,3-dietilurea hanya mengandung 16H yang berasal dari cincin benzena (5H), 2 gugus etil (10H), dan 1 amina sekunder (1H), sedangkan senyawa hasil sintesis mempunyai 20H. Pada hasil sintesis ada tambahan 5 proton di daerah 7-8 ppm yaitu proton cincin benzena, tetapi tidak terdapat proton  $\text{N-H}$  di sekitar 8 ppm dari molekul 1,3-dietilurea. Berdasarkan data tersebut, maka pada struktur senyawa hasil sintesis terdapat 2 cincin benzena dari gugus benzoil pereaksi benzoil klorida yang telah mensubstitusi H pada kedua gugus  $\text{N-H}$  pereaksi 1,3-dietilurea. Selanjutnya dilakukan konfirmasi dengan data spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$ . Spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa BEU-1 ditampilkan pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

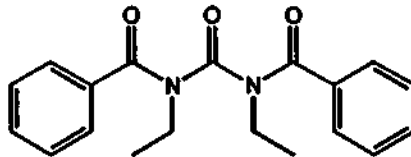
Dari gambar 5.3 diketahui ada 8 macam atom C pada senyawa BEU-1, yang berasal dari puncak-puncak pada :  $\delta = 170,96$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\delta = 159,03$  ppm menunjukkan karbon dari  $\text{C}=\text{O}$  amida,  $\delta = 136,03$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}$  aromatis,  $\delta = 132,21$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}$  aromatis,  $\delta = 128,67$  menunjukkan 4 karbon dari  $\text{C}$  aromatis,  $\delta = 127,65$  menunjukkan 4 karbon dari  $\text{C}$  aromatis,  $\delta = 42,99$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_2$ , dan  $\delta = 13,47$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_3$ .

Data spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR menunjukkan 3 gugus karbonil dan 2 cincin benzena yang mendukung data  $^1\text{H}$ -NMR bahwa pada senyawa BEU-1 terdapat 2 cincin benzena dan tidak adanya N-H; pita serapan N-H juga tidak terdapat pada spektrum IR. 2 cincin benzena berasal dari gugus benzoil pereaksi benzoil klorida yang mensubstitusi H dari 2 gugus N-H pereaksi 1,3-dietilurea. Karakteristik spektra IR,  $^1\text{H}$ -NMR, dan  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-1 dirangkum pada tabel 5.3.

**Tabel 5.3. Karakteristik spektra senyawa BEU-1**

Senyawa BEU-1	
Spektrum Ultraviolet	$\lambda$ maks. (etanol) : 239,0 nm
Spektrum Inframerah (KBr, $\nu$ maks., $\text{cm}^{-1}$ )	3087 ( $\text{Csp}_2\text{-H}$ ), 2977 ( $\text{C-H}$ alifatis), 1717, 1676 ( $\text{-C=O}$ amida), 1580 ( $\text{C=C}$ ), 858 ( $\text{C-H}$ aromatis)
Spektrum NMR- $^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	7,2–7,4 (H dari $\text{=CH}$ benzena, 2x5H, multiplet); 3,2 (H dari $\text{CH}_2$ , 2x2H, multiplet); 1,1 ppm (H dari $\text{CH}_3$ , 2x3H, multiplet).
Spektrum NMR- $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	170,96 (C dari $\text{Ar-(C=O)-N}$ ); 159,03 (C dari $\text{N-(C=O)-N}$ ); 136,03 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ dari $\text{=C-C=O}$ ); 132,21 (C aromatik dari $\text{=C-C=}$ ); 128,67 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ dari $\text{=C-C=}$ ); 127,65 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ dari $\text{=C-C=}$ ); 42,99 (C dari $\text{CH}_2$ ); 13,47 (C dari $\text{CH}_3$ ).

Berdasarkan data spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  dapat disimpulkan struktur senyawa adalah sebagai berikut :

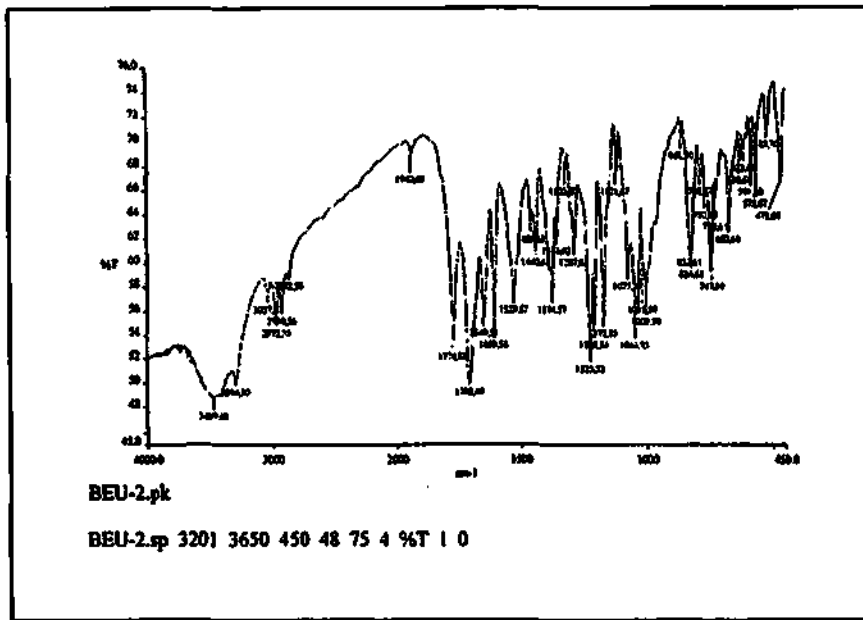


1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea

Nama IUPAC : *N,N'*-karbonilbis(*N*-etilbenzamida)

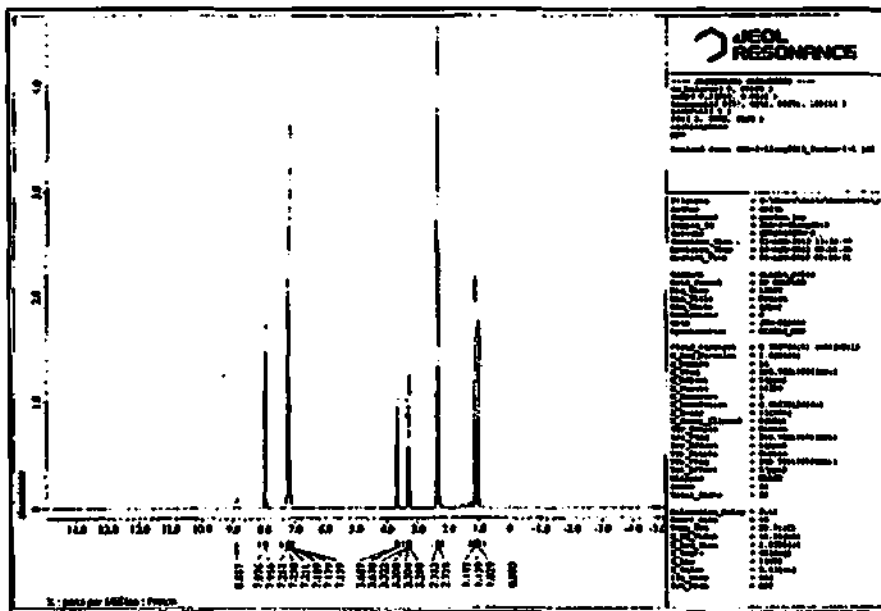
### 5.3.2. Senyawa BEU-2

Pada spektrum IR senyawa BEU-2 (gambar 5.4) terdapat pita serapan pada  $3037 \text{ cm}^{-1}$  dari  $\text{=C-H}$ ,  $2972 \text{ cm}^{-1}$  dari  $\text{C-H}$  alifatis,  $1774$  dan  $1708 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=O}$  dari amida, pita pada  $1609 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=C}$ , dan  $832 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan cincin aromatis tersubstitusi para.



Gambar 5.4. Spektrum IR senyawa BEU-2 dalam pellet KBr

Berdasarkan gambar 5.4. pada senyawa terdapat gugus amida dan cincin aromatis. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-2 ditampilkan pada gambar 5.5.

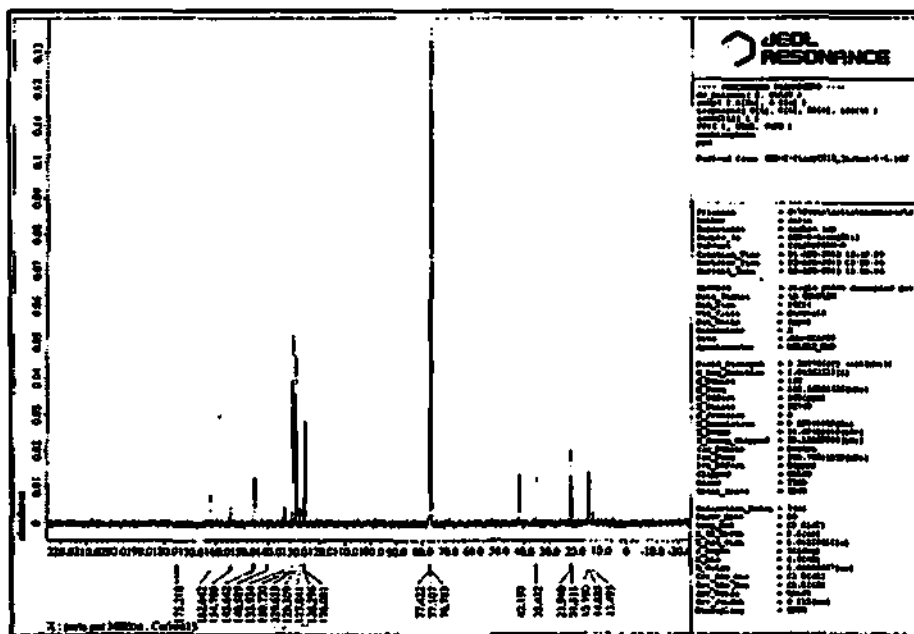


Gambar 5.5. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-2 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)



Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa BEU-2 menunjukkan terdapat 24 H yang berasal dari puncak-puncak pada  $\delta = 7,2 - 7,9$  ppm dari proton gugus  $=\text{CH}$  benzena (8H);  $\delta = 3,3$  dan  $3,6$  ppm dari proton gugus  $-\text{CH}_2$  ( $2 \times 2\text{H}$ );  $\delta = 2,32$  ppm dari proton 2 gugus  $-\text{CH}_3$  pada C aromatis (6H);  $\delta = 1,1$  ppm dari proton 2 gugus  $-\text{CH}_3$  alkil (6H). Berdasarkan data pada gambar 5.5. senyawa mengandung 2 cincin benzena tersubstitusi para. Cincin benzena tersubstitusi berasal dari pereaksi 4-metilbenzoil klorida yang mengandung gugus metil, ditunjukkan oleh puncak pada  $\delta = 2,32$  ppm.

Seperti pada senyawa BEU-1, pada BEU-2 ada tambahan 5 proton di daerah 7-8 ppm yaitu proton cincin benzena dan tidak terdapat proton N-H di sekitar 8 ppm Selanjutnya diamati data spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  yang ditampilkan pada gambar 5.6.



Gambar 5.6. Spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa BEU-2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

Dari gambar 5.6 diketahui ada 9 macam atom C pada senyawa BEU-2, yang berasal dari puncak-puncak pada :  $\delta = 162,64$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}=\text{O}$ ;  $\delta = 154,71$  ppm menunjukkan karbon dari  $\text{C}=\text{O}$  amida;  $\delta = 145,64$  menunjukkan 2 karbon dari C aromatis,  $\delta = 140,59$  menunjukkan 2 karbon dari C aromatis;  $\delta = 129,65$  ppm menunjukkan 4 karbon dari C aromatis,  $\delta = 126,29$  menunjukkan 4 karbon dari C aromatis,  $\delta = 42,19$  dan  $35,43$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_2$ ; dan  $\delta = 21,94$

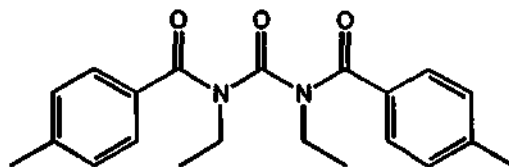
menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{\text{C}}\text{H}_3$  pada cincin, dan  $\delta = 13,47$  menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ .

Karakteristik spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa BEU-1 dirangkum pada tabel 5.4.

**Tabel 5.4. Karakteristik spektra senyawa BEU-2**

Senyawa BEU-2	
Spektrum Ultraviolet	$\lambda$ maks. (etanol) : 234,0 nm
Spektrum Inframerah (KBr, $\nu$ maks., $\text{cm}^{-1}$ )	3037 ( $\text{Csp}_2\text{-H}$ ), 2972 ( $\text{C-H}$ alifatis), 1774, 1708 ( $\text{-C=O}$ amida), 1609 ( $\text{C=C}$ ), 832 ( $\text{C-H}$ aromatis tersubstitusi para)
Spektrum NMR- $^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	7,2–7,9 (H dari $=\underline{\text{C}}\text{H}$ benzena, 8H, multiplet); 3,68 (H dari $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ , 2x2H, multiplet); 2,32 ppm (H dari $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , 6H, multiplet). 1,13 ppm (H dari $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , 2x3H, multiplet).
Spektrum NMR- $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	170,96 (C dari $\text{Ar-(}\underline{\text{C}}=\text{O)-N}$ ); 159,03 (C dari $\text{N-(C=O)-N}$ ); 136,03 (Car dari $=\underline{\text{C}}\text{-C=O}$ ); 132,21 (C aromatik dari $=\underline{\text{C}}\text{-C=}$ ); 128,67 (Car dari $=\underline{\text{C}}\text{-C=}$ ); 127,65 (Car dari $=\underline{\text{C}}\text{-C=}$ ); 42,99 (C dari $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 13,47 (C dari $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

Berdasarkan data spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  dapat disimpulkan struktur senyawa adalah sebagai berikut :

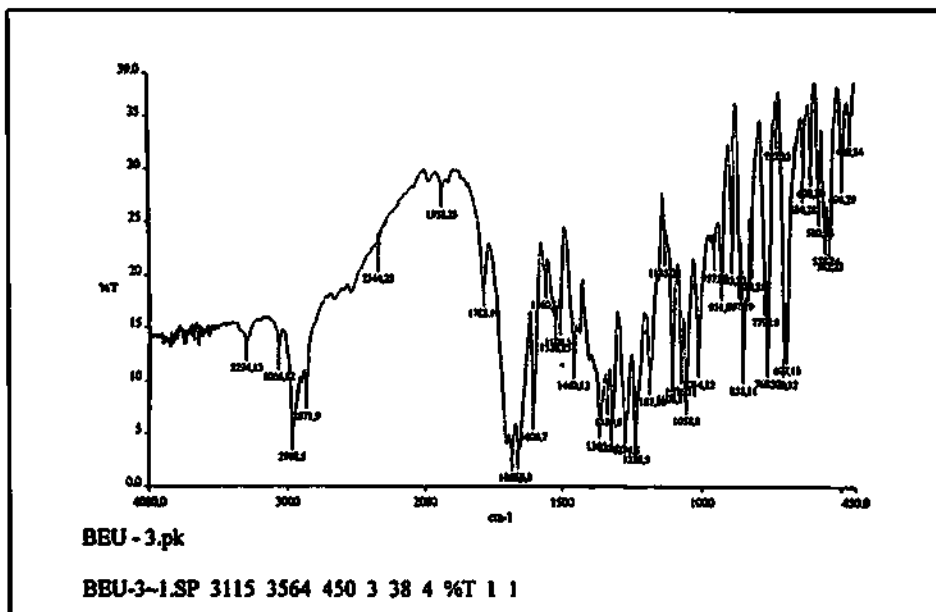


1,3-di-(4'-metilbenzoyl)-1,3-dietilurea

Nama IUPAC : *N,N'*-karbonilbis(*N*-etil-4-metilbenzamida)

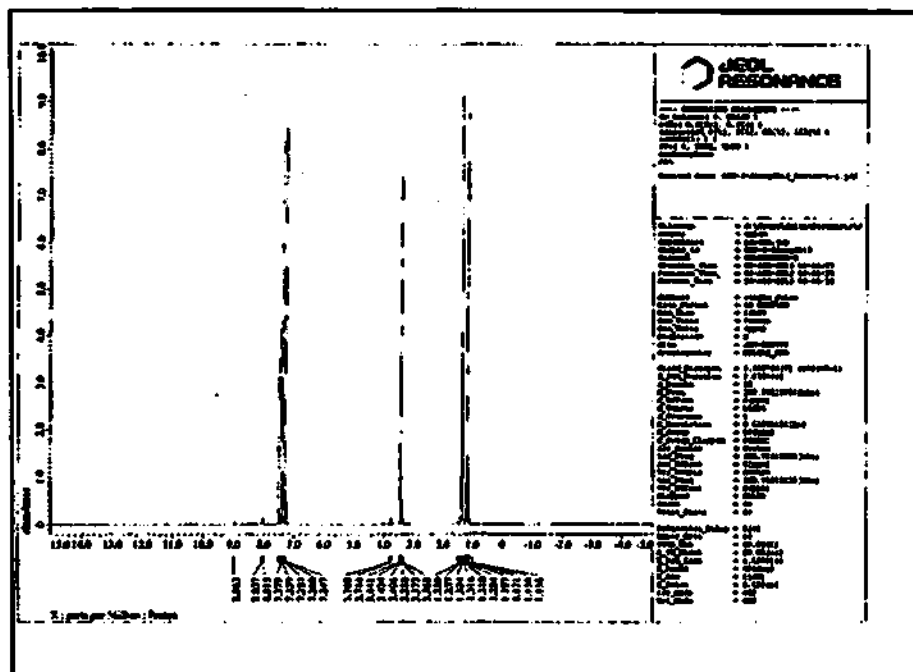
### 5.3.3. Senyawa BEU-3

Pada spektrum IR senyawa BEU-3 (gambar 5.7.) terdapat pita serapan pada  $3066 \text{ cm}^{-1}$  dari  $=\text{C-H}$ ,  $2968 \text{ cm}^{-1}$  dari  $\text{C-H}$  alifatis,  $1701$  dan  $1683 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=O}$  dari amida, pita pada  $1605 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=C}$ , dan  $856 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan cincin aromatis tersubstitusi para.



Gambar 5.7. Spektrum IR senyawa BEU-3 dalam pellet KBr

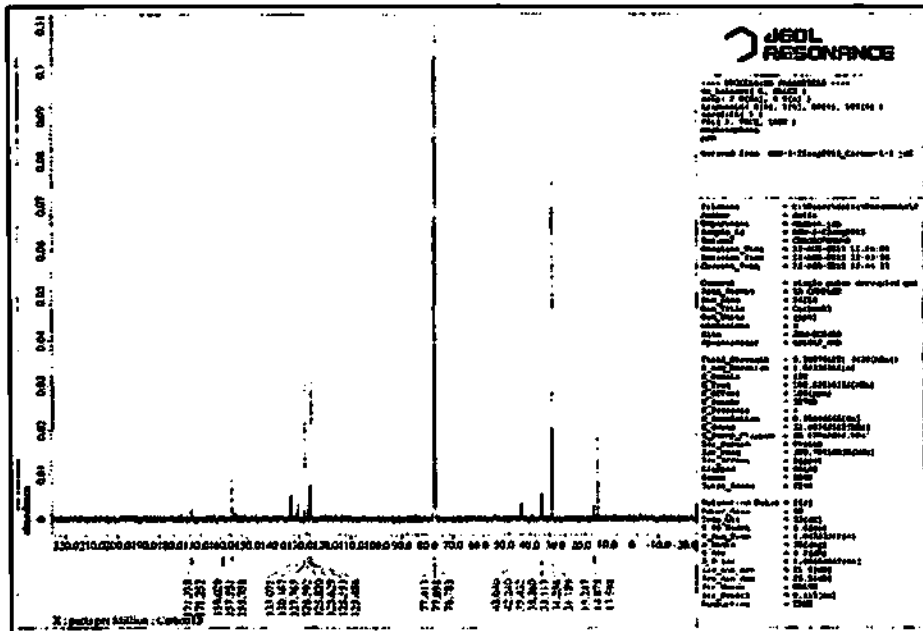
Berdasarkan gambar 5.7. pada senyawa terdapat gugus amida dan cincin aromatis. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-2 ditampilkan pada gambar 5.8.



Gambar 5.8. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-3 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-3 menunjukkan terdapat 36 H yang berasal dari puncak-puncak pada  $\delta = 7,2 - 7,4$  ppm dari proton gugus =CH benzena (2x4H);  $\delta = 3,4$  ppm dari proton gugus -CH<sub>2</sub> (2x2H);  $\delta = 1,35$  ppm dari proton 9 gugus -CH<sub>3</sub> pada

C aromatis (2x9H);  $\delta = 1,1$  ppm dari proton 2 gugus  $-\text{CH}_3$  alkil (6H). Berdasarkan data pada gambar 5.8. senyawa mengandung 2 cincin benzena tersubstitusi para. Cincin benzena tersubstitusi berasal dari pereaksi 4-t-butilbenzoil klorida yang mengandung gugus t-butil, ditunjukkan oleh puncak pada  $\delta = 1,35$  ppm dengan jumlah proton 18. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-3 ditampilkan pada gambar 5.9.



Gambar 5.9. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

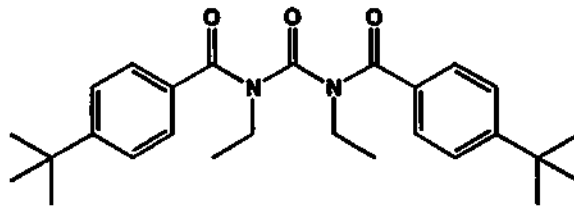
Dari gambar 5.9 diketahui ada 10 macam atom C pada senyawa BEU-3, yang berasal dari puncak-puncak pada :  $\delta = 171,33$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}=\text{O}$ ;  $\delta = 155,76$  ppm menunjukkan karbon dari  $\text{C}=\text{O}$  amida;  $\delta = 133,07$ ; ppm menunjukkan 2 karbon dari C aromatis;  $\delta = 130,17$  menunjukkan 2 karbon dari C aromatis;  $\delta = 127,76$  ppm menunjukkan 4 karbon dari C aromatis,  $\delta = 125,55$  menunjukkan 4 karbon dari C aromatis,  $\delta = 43,04$  ppm menunjukkan karbon dari  $-\text{C}-$  alkil,  $\delta = 35,26$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_2$ ; dan  $\delta = 31,25$  menunjukkan 9 karbon dari  $\text{CH}_3$  simetris, cincin, dan  $\delta = 13,47$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_3$ . Karbon  $-\text{C}-$  dan  $\text{CH}_3$  yang simetris berasal dari gugus  $-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$  pereaksi 4-t-butylbenzoil klorida.

Karakteristik spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa BEU-3 dirangkum pada tabel 5.5.

Tabel 5.5. Karakteristik spektra senyawa BEU-3

Senyawa BEU-3	
Spektrum Ultraviolet	$\lambda$ maks. (etanol) : 234,0 nm
Spektrum Inframerah (KBr, $\nu$ maks., $\text{cm}^{-1}$ )	3066 ( $\text{Csp}_2\text{-H}$ ), 2968 ( $\text{C-H}$ alifatis), 1701, 1683 ( $\text{-C=O}$ amida), 1605 ( $\text{C=C}$ ), 856 ( $\text{C-H}$ aromatis tersubstitusi para)
Spektrum NMR- $^1\text{H}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	7,2–7,4 (H dari $\text{=CH}$ benzena, $2 \times 4\text{H}$ , multiplet); 3,4 (H dari $\text{CH}_2$ , $2 \times 2\text{H}$ , multiplet); 1,35 ppm (H dari $\text{-CH}_3$ , $2 \times 9\text{H}$ ); 1,1 ppm (H dari $\text{-CH}_3$ alkil, $2 \times 3\text{H}$ ).
Spektrum NMR- $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ , ppm, $\text{CDCl}_3$ )	171,33 (C dari $\text{Ar-(C=O)-N}$ ); 159,03 (C dari $\text{N-(C=O)-N}$ ); 155,76 ( $\text{Car}$ dari $\text{=C-C=O}$ ); 130,16 (C aromatik dari $\text{=C-C=}$ ); 127,76 ( $\text{Car}$ dari $\text{=C-C=}$ ); 125,55 ( $\text{Car}$ dari $\text{=C-C=}$ ); 43,04 ppm (C dari $\text{-C-}$ alkil); 35,26 ppm (C dari $\text{CH}_2$ ); 31,25 ppm (C dari 3 gugus $\text{CH}_3$ ), 13,47 ppm (C dari $\text{CH}_3$ ).

Berdasarkan data spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  dapat disimpulkan struktur senyawa adalah sebagai berikut :

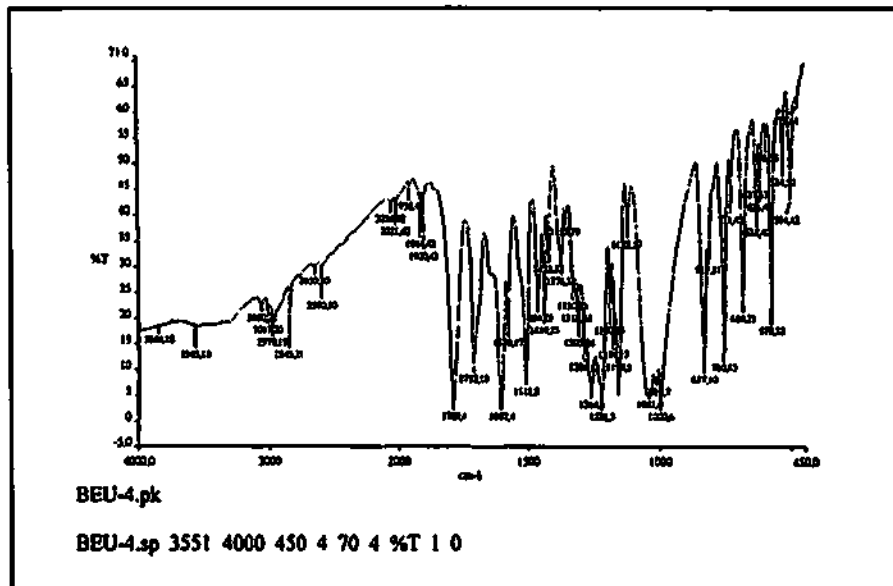


1,3-di-(4'-*tert*-butilbenzoyl)-1,3-dietilurea

Nama IUPAC : *N,N'*-karbonilbis(4-*tert*-butil-*N*-etilbenzamida)

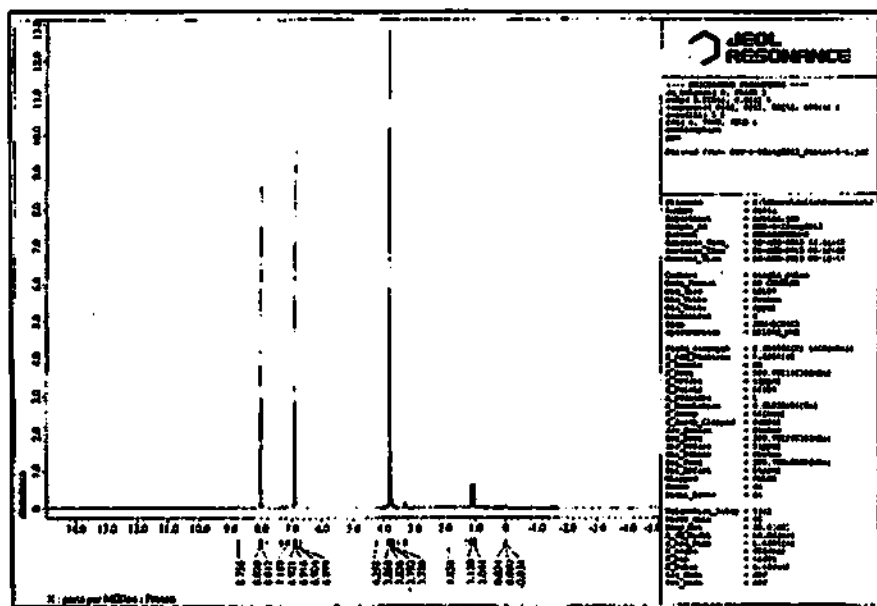
#### 5.3.4. Senyawa BEU-4

Pada spektrum IR senyawa BEU-4 (gambar 5.10.) terdapat pita serapan pada  $3060 \text{ cm}^{-1}$  dari  $\text{=C-H}$ ,  $2979 \text{ cm}^{-1}$  dari  $\text{C-H}$  alifatis,  $1774$  dan  $1711 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=O}$  dari amida, pita pada  $1609 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan  $\text{C=C}$ , dan  $838 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan cincin aromatis tersubstitusi para.



Gambar 5.10. Spektrum IR senyawa BEU-4 dalam pellet KBr

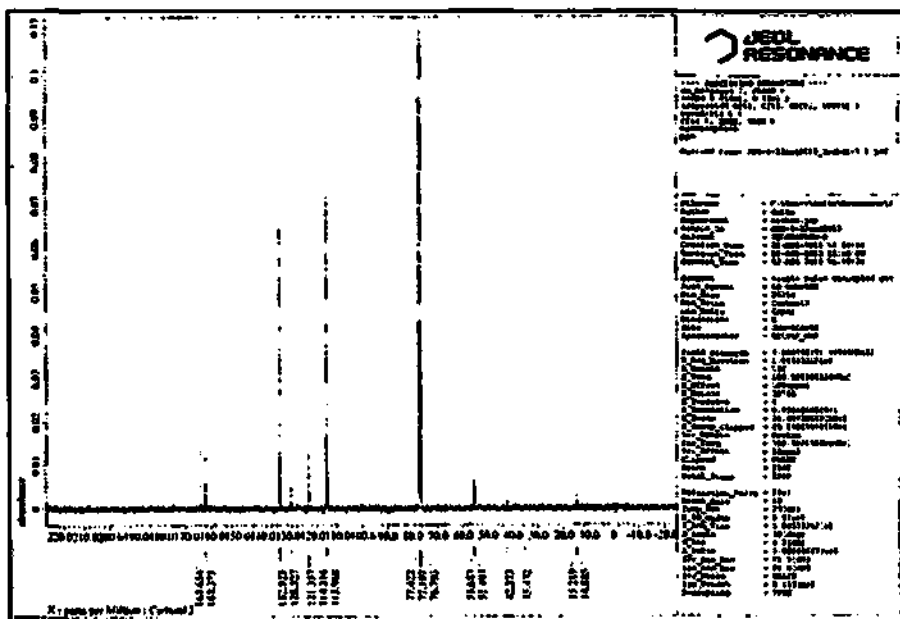
Berdasarkan gambar 5.10. pada senyawa terdapat gugus amida dan cincin aromatis. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-4 ditampilkan pada gambar 5.11.



Gambar 5.11. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-4 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-4 menunjukkan terdapat 24 H yang berasal dari puncak-puncak pada  $\delta = 6,92$  dan  $8,04$  ppm dari proton gugus  $=\underline{C}H$  benzena ( $2 \times 4H$ );  $\delta = 4,26$  ppm dari proton gugus  $-\underline{C}H_3$  ( $6H$ );  $\delta = 3,83$  ppm dari proton gugus  $-\underline{C}H_2$  ( $4H$ );

$\delta = 1,13$  ppm dari proton gugus  $-\text{CH}_3$  (3H);  $\delta = 1,04$  ppm dari proton gugus  $-\text{CH}_3$  alkil (3H). Berdasarkan data pada gambar 5.8. senyawa mengandung 2 cincin benzena tersubstitusi para. Cincin benzena tersubstitusi berasal dari pereaksi 4-metoksibenzoil klorida yang mengandung gugus  $\text{O}-\text{CH}_3$ , ditunjukkan oleh puncak H pada  $\delta = 3,83$  ppm dengan jumlah proton 6H yang menunjukkan ada 2 gugus  $\text{O}-\text{CH}_3$ . Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR ditampilkan pada gambar 5.12.



Gambar 5.12. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

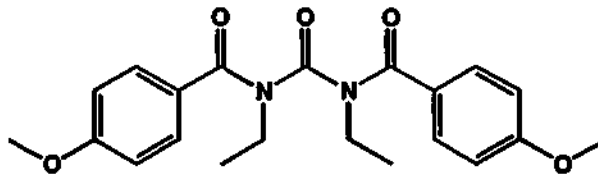
Dari gambar 5.12 diketahui ada 9 macam atom C pada senyawa BEU-4, yang berasal dari puncak-puncak pada :  $\delta = 164,65$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}=\text{O}$ ;  $\delta = 162,38$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}$  aromatis;  $\delta = 132,92$  ppm menunjukkan 4 karbon dari  $\text{C}$  aromatis;  $\delta = 128,32$  ppm menunjukkan karbon dari  $\text{C}=\text{O}$  amida;  $\delta = 121,36$  menunjukkan 2 karbon dari  $\text{C}$  aromatis;  $\delta = 114,22$  ppm menunjukkan 4 karbon dari  $\text{C}$  aromatis;  $\delta = 55,68$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $-\text{CH}_3$ ,  $\delta = 42,37$  dan  $35,43$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_2$ ; dan  $\delta = 15,22$  dan  $14,88$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\text{CH}_3$  alkil. Puncak pada  $\delta = 55,68$  ppm adalah dari karbon yang terikat oksigen dalam gugus metoksi ( $-\text{OCH}_3$ ) yang berasal dari gugus pereaksi 4-metoksibenzoil klorida.

Karakteristik spektra IR,  $^1\text{H}$ -NMR, dan  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa BEU-4 dirangkum pada tabel 5.6.

Tabel 5.6. Karakteristik spektra senyawa BEU-4

Senyawa BEU-4	
Spektrum Ultraviolet	$\lambda$ maks. (etanol) : 274,0 nm
Spektrum Inframerah (KBr, $\nu$ maks., $\text{cm}^{-1}$ )	3060 (Csp <sup>2</sup> -H), 2979 (C-H alifatis), 1774, 1711 (-C=O amida), 1609 (C=C), 838 (C-H aromatis tersubstitusi para)
Spektrum NMR- <sup>1</sup> H ( $\delta$ , ppm, CDCl <sub>3</sub> )	8,04 ppm (H dari =CH benzena, 4H, multiplet); 6,92 ppm (H dari =CH benzena, 4H, multiplet); 4,26 ppm (H dari -OCH <sub>3</sub> , 6H, singlet); 3,82 ppm (H dari CH <sub>2</sub> , 4H, multiplet); 1,13 ppm (H dari -CH <sub>3</sub> , 3H, multiplet); 1,04 ppm (H dari -CH <sub>3</sub> alkil, 3H, multiplet).
Spektrum NMR- <sup>13</sup> C ( $\delta$ , ppm, CDCl <sub>3</sub> )	164,65 ppm (C dari Ar-(C=O)-N); 162,38 ppm (Car dari C-O); 132,92 ppm (Car dari =C-C-); 128,32 ppm (C dari C=O amida); 121,36 ppm (Car dari =C-C=); 114,22 ppm (Car dari =C-C=); 55,68 ppm (C dari -O-CH <sub>3</sub> ); 42,37 ppm (C dari CH <sub>2</sub> ); 35,43 ppm (C dari CH <sub>2</sub> ), 15,22 ppm (C dari CH <sub>3</sub> ).

Berdasarkan data spektra IR, <sup>1</sup>H-NMR, dan <sup>13</sup>C-NMR dapat disimpulkan struktur senyawa adalah sebagai berikut :



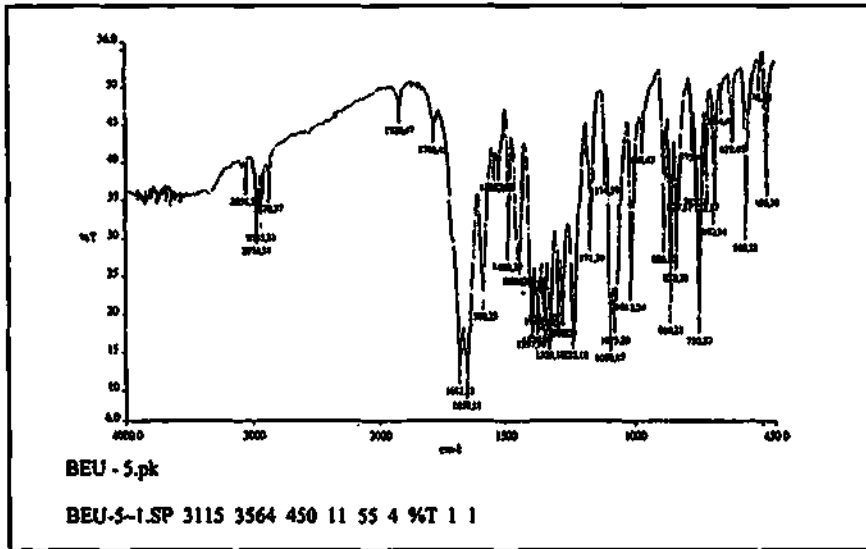
1,3-di-(4'-metoksibenzoil)-1,3-dietilurea

Nama IUPAC : *N,N'*-karbonilbis(*N*-etil-4-metoksibenzamida)

### 5.3.5. Senyawa BEU-5

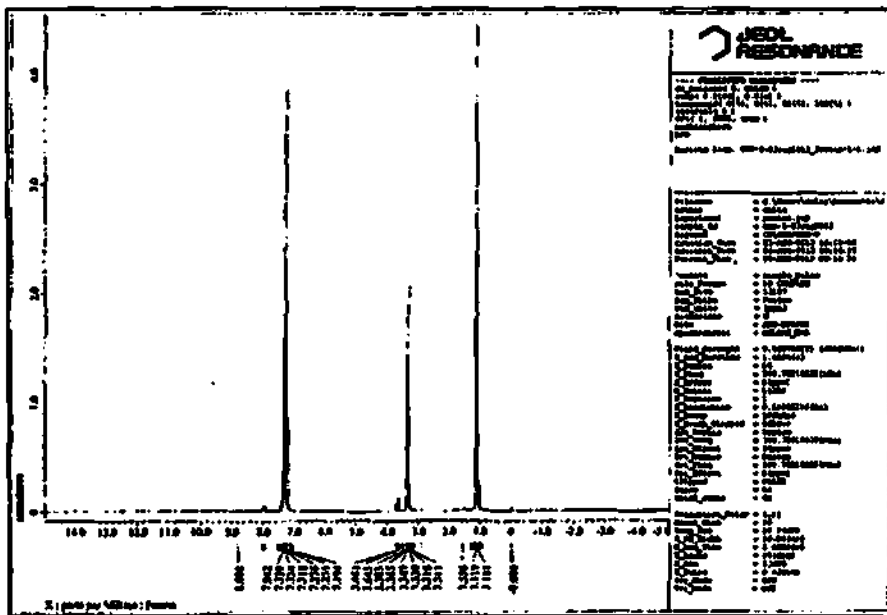
Pada spektrum IR senyawa BEU-4 (gambar 5.13.) terdapat pita serapan pada 3056  $\text{cm}^{-1}$  dari =C-H, 2974  $\text{cm}^{-1}$  dari C-H alifatis, 1786 dan 1681  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=O dari amida, pita pada 1588  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan C=C, dan 860  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan cincin aromatis tersubstitusi para.





**Gambar 5.13.** Spektrum IR senyawa BEU-5 dalam pellet KBr

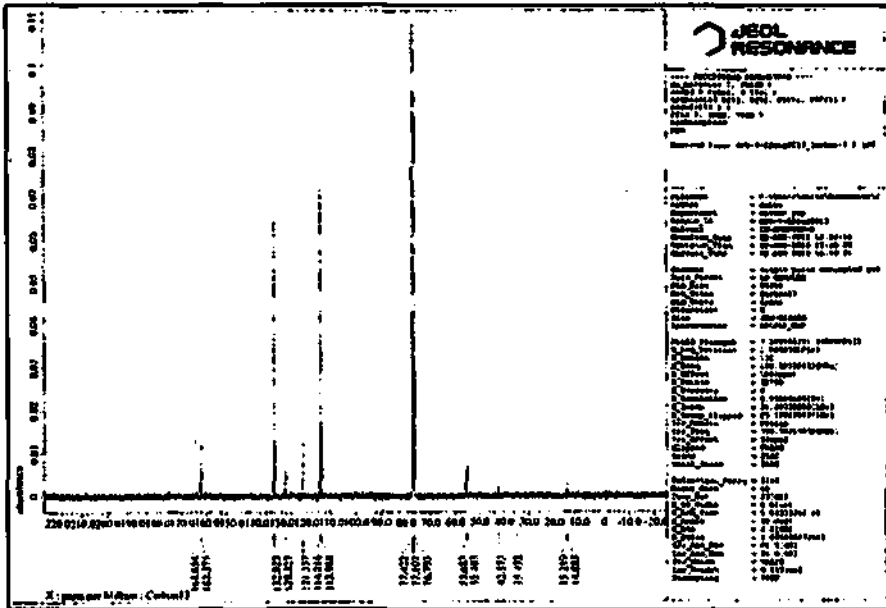
Berdasarkan gambar 5.13. pada senyawa terdapat gugus amida dan cincin aromatis. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-4 ditampilkan pada gambar 5.14.



**Gambar 5.14.** Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-5 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

Spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa BEU-5 menunjukkan terdapat 18 H yang berasal dari puncak-puncak pada  $\delta = 7,33$  ppm dari proton gugus =CH benzena (8H);  $\delta = 3,35$  dari proton gugus -CH<sub>2</sub> (4H);  $\delta = 1,12$  ppm dari proton gugus -CH<sub>3</sub> (6H). Berdasarkan data pada gambar 5.14. senyawa mengandung 2 cincin benzena tersubstitusi para. Cincin

benzena tersubstitusi berasal dari pereaksi 4-klorobenzoil klorida. Spektrum <sup>13</sup>C-NMR ditampilkan pada gambar 5.15.



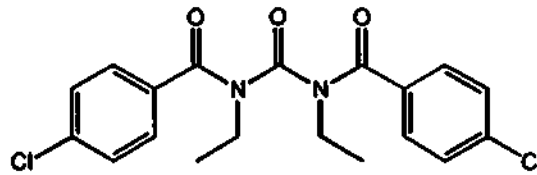
Gambar 5.15. Spektrum <sup>13</sup>C-NMR senyawa BEU-5 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz).

Dari gambar 5.15 diketahui ada 7 macam atom C pada senyawa BEU-5, yang berasal dari puncak-puncak pada :  $\delta = 170,18$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{C=O}$ ;  $\delta = 158,37$  ppm menunjukkan karbon dari  $\underline{C=O}$  amida,  $\delta = 138,76$  ppm menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{C}$  aromatis,  $\delta = 134,06$  menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{C}$  aromatis,  $\delta = 129,06$  menunjukkan 8 karbon dari  $\underline{C}$  aromatis;  $\delta = 43,25$  menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{CH_2}$ , dan  $\delta = 13,55$  menunjukkan 2 karbon dari  $\underline{CH_3}$ . Karakteristik spektra IR, <sup>1</sup>H-NMR, dan <sup>13</sup>C-NMR senyawa BEU-4 dirangkum pada tabel 5.7.

Tabel 5.7. Karakteristik spektra senyawa BEU-5

Senyawa BEU-5	
Spektrum Ultraviolet	$\lambda$ maks. (etanol) : 228,0 nm
Spektrum Inframerah (KBr, $\nu$ maks., $\text{cm}^{-1}$ )	3056 (Csp <sub>2</sub> -H), 2974 (C-H alifatis), 1786, 1681 (-C=O amida), 1588 (C=C), 860 (C-H aromatis).
Spektrum NMR- <sup>1</sup> H ( $\delta$ , ppm, CDCl <sub>3</sub> )	7,33 (H dari =CH benzena, 8H, multiplet); 3,35 (H dari CH <sub>2</sub> , 4H, multiplet); 1,12 (H dari CH <sub>3</sub> , 6H, multiplet).
Spektrum NMR- <sup>13</sup> C ( $\delta$ , ppm, CDCl <sub>3</sub> )	170,18 (C dari Ar-(C=O)-N); 158,37 (C dari N-(C=O)-N); 138,76 (Car dari =C-C=O); 134,06 (C aromatik dari =C-C=); 129,06 (Car dari =C-C=); 43,25 (C dari CH <sub>2</sub> ); 13,55 (C dari CH <sub>3</sub> ).

Dari data spektra IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa BEU-5 dapat disimpulkan struktur senyawa adalah sebagai berikut :



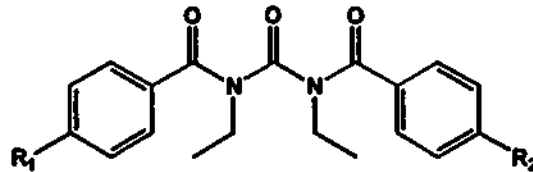
1,3-di-(4'-klorobenzoyl)-1,3-dietilurea

Nama IUPAC : *N,N'*-karbonilbis(*N*-etil-4-klorobenzamida)

#### 5.4. Persentase Hasil Sintesis

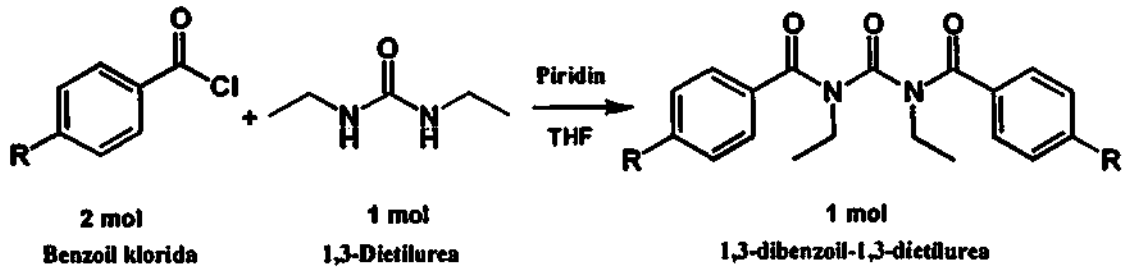
Berdasarkan data spektroskopi yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa dari reaksi antara 1,3-dietilurea dengan benzoil klorida tersubstitusi pada kondisi reaksi dalam penelitian ini telah dihasilkan senyawa-senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dengan struktur umum dan persen hasil sintesis yang dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8. Struktur Umum dan Persentase Senyawa hasil sintesis



Kode	Struktur Senyawa	BM	Berat 0,0125 mol	Berat Hasil Sintesis	Persentase Hasil
BEU-1	$R_1 = R_2 = \text{H}$	324	4,05 g	1,207 g	29,80 %
BEU-2	$R_1 = R_2 = \text{CH}_3$	352	4,40 g	1,169 g	26,57 %
BEU-3	$R_1 = R_2 = \text{C}-(\text{CH}_3)_3$	436	5,45 g	0,909 g	16,68 %
BEU-4	$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$	384	4,80 g	1,07 g	22,29 %
BEU-5	$R_1 = R_2 = \text{Cl}$	393	4,91 g	1,365 g	27,79 %

Persentase hasil sintesis relatif rendah karena jumlah mol pereaksi yang digunakan diperhitungkan atas dasar senyawa yang dirancang semula, yaitu 1 mol benzoil klorida untuk 1 mol 1,3-dietilurea (1:1). Sedangkan untuk mensubstitusi 2 gugus  $-\text{NH}$  diperlukan 2 mol benzoil klorida untuk setiap mol 1,3-dietilurea. Reaksi sintesis turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dapat digambarkan sebagai berikut :



**Gambar 5.16.** Reaksi sintesis turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea

Berdasarkan gambar 5.7, perbandingan mol pereaksinya adalah 2 mol benzoil klorida untuk 1 mol 1,3-dietilurea untuk menghasilkan 1 mol senyawa 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea. Pada prosedur sintesis digunakan 0,025 mol benzoil klorida sehingga persen hasil sintesis dihitung dari 0,0125 mol senyawa 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea.

Senyawa hasil sintesis adalah turunan urea dengan gugus farmakofor yang sama yaitu adanya gugus N-CO-N dan cincin aromatis sehingga perlu diuji aktivitasnya. Tambahan satu cincin benzena dapat memperkuat interaksi sterik dengan reseptor. Untuk memprediksi aktivitasnya sebelum dilakukan uji aktivitas antikanker secara *in vitro*, dilakukan pemodelan dan *docking* molekul senyawa hasil sintesis.

### 5.5. Pemodelan Molekul Turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea

Hasil pemodelan molekul interaksi: senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor 1TVO yang berupa *docking score* ditampilkan pada tabel 5.9. Sebagai perbandingan ditampilkan sekali lagi *docking score* senyawa 1-benzoil-1,3-dietilurea dan hidroksiurea.

**Tabel 5.9.** *Docking Score* Turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dengan reseptor 1TVO menggunakan program Molegro Virtual Docker 5.5

Senyawa	MolDock Score (kcal/mol)	Rerank Score (kcal/mol)
BEU-1	-96,801	-69,157
BEU-2	-112,154	-91,110
BEU-3	-121,471	-90,857
BEU-4	-108,216	-81,665
BEU-5	-99,319	-77,189
1-benzoil-1,3-dietilurea	-85,292	-71,793
Hidroksiurea	-43,030	-38,297

Dari gambar 5.20 dapat dilihat bahwa adanya cincin aromatis mengubah pola interaksi ikatan hidrogen gugus urea (N-CO-N). Perbedaan substituen pada posisi cincin aromatis juga menghasilkan variasi pada interaksi hidrofobik sehingga mempengaruhi kekuatan interaksi ligan-reseptor ditinjau dari makin rendahnya nilai energi interaksi yang ditunjukkan oleh *docking score*.

Interaksi yang terjadi dapat berupa ikatan hidrogen maupun interaksi hidrofobik (ikatan van der Waals). Asam amino yang membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa turunan BEU ditampilkan pada tabel 5.10.

Tabel 5.10. Asam-asam amino yang berinteraksi membentuk ikatan hidrogen dengan turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea dalam cavity-1 reseptor ITVO

Asam amino	Senyawa					
	HU	BEU-1	BEU-2	BEU-3	BEU-4	BEU-5
Asn 154	-	-	-	-	+	-
Asp 106	+	-	-	-	-	-
Asp 167	-	-	+	-	+	-
Cys 166	-	+	-	-	-	+
Gln 105	-	++	-	-	+	+
Lys 54	-	+	-	+	+	-
Met 108	+	-	-	-	-	-

## 5.6. Aktivitas Antikanker Senyawa Hasil Sintesis

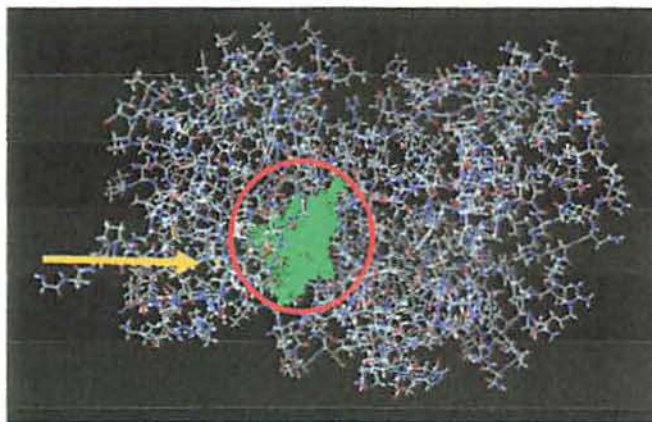
Aktivitas antikanker senyawa uji adalah aktivitas hambatan pertumbuhan sel berdasarkan uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT yang dinyatakan dalam  $IC_{50}$ .

### 5.6.1. Persentase sel yang hidup

Data persentase sel yang hidup pada media kultur diperoleh dari absorbansi sel dalam media setelah pemberian senyawa uji, absorbansi media kultur serta absorbansi pelarut dalam media yang dapat dilihat pada tabel 5.11.

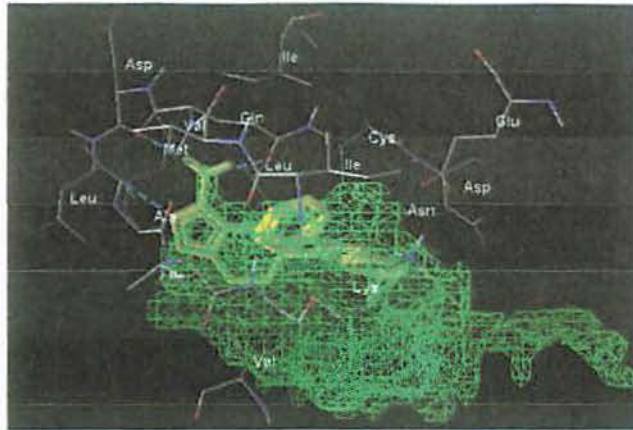
Pada tabel 5.9. tampak bahwa senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea (BEU) mempunyai *docking score* lebih rendah dibanding senyawa yang dirancang semula yang berarti dapat berinteraksi lebih baik dengan reseptor. Interaksi yang lebih baik akan menghasilkan kompleks ligan-reseptor yang lebih stabil dan pada akhirnya akan menghasilkan aktivitas biologis yang lebih baik. Jika diperhatikan dari hidroksiurea yang tidak mempunyai cincin benzena hingga senyawa turunan BEU yang mempunyai 2 cincin benzena tampak bahwa adanya cincin aromatis berpengaruh terhadap *docking score*. Dalam hal ini cincin aromatis dapat memperbaiki interaksi ligan-reseptor.

Docking molekul ligan dilakukan pada *active site* reseptor ITVO yang membentuk kompleks dengan *reference ligand* FRZ, yaitu *cavity-1*. Gambar 5.16 menunjukkan struktur 3 dimensi reseptor ITVO yang diunduh dari RCSB Protein Data Bank.



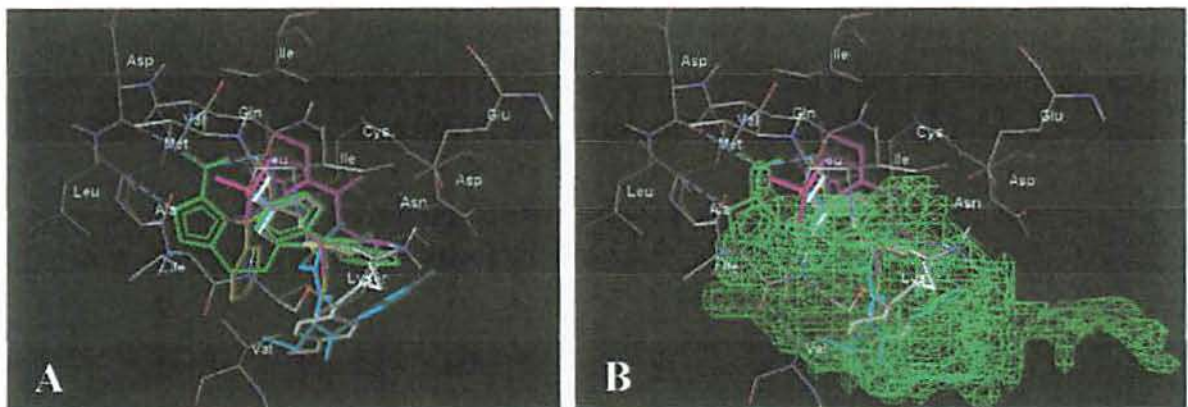
Gambar 5.17. Visualisasi struktur 3D Reseptor ITVO dengan *cavity-1* menurut program Molegro 5.5

Pada gambar 5.17 ditampilkan *cavity-1* tempat interaksi ligan FRZ dengan ITVO (reseptor tirosin kinase). Residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan FRZ ditunjukkan pada gambar 5.18.



Gambar 5.18. ligan FRZ dan residu asam amino yang membentuk *cavity-1* pada reseptor ITVO

Pada gambar 5.18. tampak residu asam-asam amino aspartat, isoleusin, leusin, metionin, valin, glisin, sistein, glutamin, asparagin, alanin, dan lisin yang membentuk *active site* ITVO (*cavity-1*). Konformasi 3 dimensi 5 senyawa turunan BEU dan hidroksiurea pada *cavity-1* setelah *docking molekul* ditampilkan pada gambar 5.19.

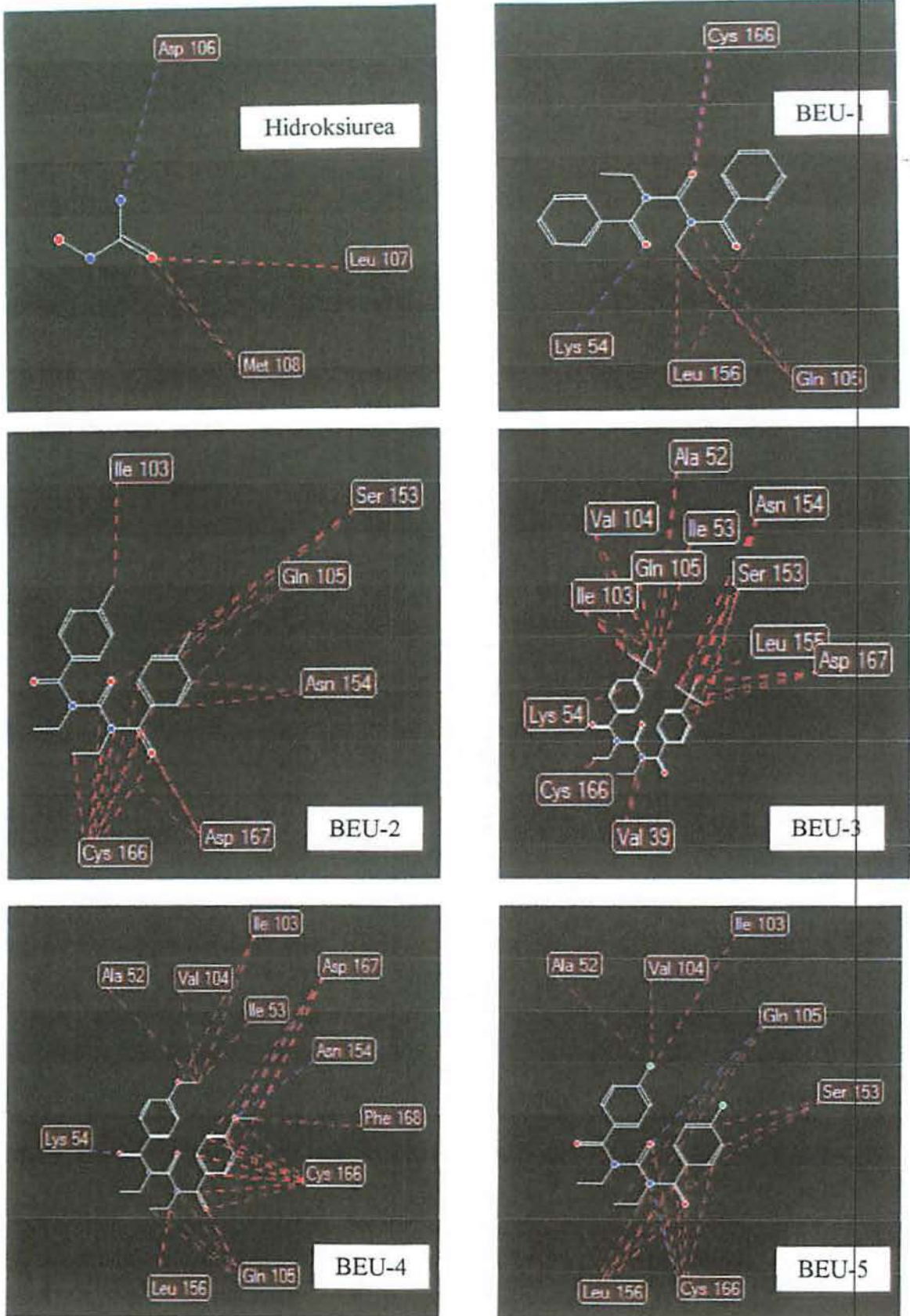


Gambar 5.19. Molekul-molekul senyawa BEU berinteraksi dengan asam amino (A) dalam *cavity-1* reseptor ITVO (B).

Keterangan :

warna kuning = BEU-1; warna biru muda = BEU-2;  
 warna ungu = BEU-3; warna putih = BEU-4;  
 warna biru tua = BEU-5.

Pada gambar 5.19. kelima senyawa turunan BEU berada dalam satu tempat yang sama, yaitu *cavity-1*. Asam amino yang terlibat dalam interaksi dengan senyawa turunan BEU ditampilkan pada gambar 5.20.



Gambar 5.20. Interaksi senyawa turunan BEU dengan asam amino dalam *cavity-1* reseptor ITVO menurut program Molegro 5.5.



**Tabel 5.11. Persentase sel yang hidup setelah pemberian sampel larutan senyawa uji**

<b>Senyawa : BEU-1</b>			
<b>Kadar (ppm)</b>	<b>Absorbansi</b>		<b>% sel hidup</b>
	<b>Rata-rata</b>	<b>Sampel-media*</b>	
150	0,341	0,269	109,2
200	0,331	0,259	105,0
250	0,314	0,242	98,0
300	0,306	0,234	94,9
400	0,283	0,211	85,5
500	0,260	0,188	76,2
600	0,237	0,165	66,9

<b>Senyawa : BEU-2</b>			
<b>Kadar (ppm)</b>	<b>Absorbansi</b>		<b>% sel hidup</b>
	<b>Rata-rata</b>	<b>Sampel-media*</b>	
50	0,202	0,130	52,7
100	0,194	0,122	49,5
150	0,155	0,083	33,6
200	0,143	0,071	28,8
250	0,112	0,040	16,2

<b>Senyawa : BEU-3</b>			
<b>Kadar (ppm)</b>	<b>Absorbansi</b>		<b>% sel hidup</b>
	<b>Rata-rata</b>	<b>Sampel-media*</b>	
150	0,357	0,285	115,4
200	0,337	0,265	107,6
250	0,322	0,250	101,3
300	0,299	0,227	92,0
400	0,260	0,188	76,2
500	0,221	0,149	60,4
600	0,182	0,110	44,6

<b>Senyawa : BEU-4</b>			
<b>Kadar (ppm)</b>	<b>Absorbansi</b>		<b>% sel hidup</b>
	<b>Rata-rata</b>	<b>Sampel-media*</b>	
50	0,367	0,295	119,6
100	0,305	0,233	94,3
150	0,263	0,191	77,4
200	0,242	0,170	69,0
250	0,138	0,066	26,9

Senyawa : BEU-5			
Kadar (ppm)	Absorbansi		% sel hidup
	Rata-rata	Sampel-media*	
150	0,314	0,242	98,1
200	0,303	0,231	93,5
250	0,292	0,220	89,3
300	0,283	0,211	85,5
400	0,262	0,190	77,0
500	0,244	0,172	69,7
600	0,225	0,153	62,0

Kontrol Positif = Hiroksiurea			
Kadar (ppm)	Absorbansi		% sel hidup
	Rata-rata	Sampel-media*	
150	0,323	0,251	101,7
200	0,318	0,246	99,7
250	0,312	0,240	97,3
300	0,307	0,235	95,3
400	0,297	0,225	91,2
500	0,287	0,215	87,2
600	0,276	0,204	82,7

\* rata-rata absorbansi kontrol media = 0,072  
 rata-rata absorbansi kontrol pelarut = 0,319

### 5.6.2. IC<sub>50</sub> sitotoksik

Dari data % sel yang hidup setelah pemberian 5 kadar tiap-tiap senyawa uji ditentukan nilai IC<sub>50</sub> aktivitas sitotoksik menggunakan analisis regresi probit. Hasil perhitungan IC<sub>50</sub> dapat dilihat pada tabel 5.12.

**Tabel 5.12. Nilai IC<sub>50</sub> senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea terhadap kultur sel MCF-7**

Senyawa	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
BEU-1	687,04
BEU-2	77,52
BEU-3	562,17
BEU-4	216,02
BEU-5	667,52
Hidroksiurea	885,60

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , semua turunan BEU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea. Salah satu senyawa yang aktivitasnya paling tinggi di antara 5 senyawa, yaitu BEU-2 dengan  $IC_{50}$  77,52  $\mu\text{g/mL}$ , mempunyai aktivitas 11 kali lebih tinggi dibanding hidroksiurea, sedangkan BEU-4 mempunyai aktivitas 4 kali lebih tinggi dibanding hidroksiurea.

### 5.7. Hubungan Struktur dan Aktivitas Antikanker

Dari data *docking score* (tabel 5.9) dan  $IC_{50}$  dapat dilihat bahwa senyawa BEU-2 dan BEU-4 yang mempunyai *docking score* jauh lebih rendah daripada hidroksiurea mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi dibanding hidroksiurea. Energi interaksi makin rendah, kompleks ligan-reseptor makin stabil sehingga dapat meningkatkan aktivitas biologisnya. *Docking score* merupakan total energi interaksi ligan reseptor yang dapat digunakan sebagai deskriptor 3D untuk sifat elektronik molekul senyawa. Untuk memperoleh hubungan kuantitatif antara struktur dan aktivitas (HKSA), yaitu hubungan antara MDS dan RS dengan aktivitas sitotoksik, maka perlu disintesis beberapa turunan BEU lagi karena untuk membuat persamaan HKSA dengan 3 sifat fisikokimia satu seri turunan senyawa diperlukan minimal 10 senyawa.

Perbedaan substituen di antara 5 senyawa turunan telah mengubah konformasi 3 dimensi molekul sehingga mempengaruhi interaksinya dengan reseptor. Senyawa yang dapat membentuk kompleks ligan-reseptor dengan nilai energi lebih rendah akan menghasilkan aktivitas biologis lebih tinggi.

Dari hasil penelitian tahap I telah dihasilkan 2 senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara (MCF-7) lebih tinggi dibanding hidroksiurea, obat kanker dari turunan urea yang masih digunakan saat ini. Setelah disintesis 5 senyawa turunan lagi dan dilakukan uji aktivitas pada Tahap II akan dipilih senyawa yang paling poten untuk dikembangkan sebagai obat antikanker payudara.

## **BAB VI**

### **RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA**

Pada Tahap II penelitian, rencana kerja yang akan dilakukan adalah :

#### **6.1. Pemodelan Molekul**

Pemodelan molekul 5 senyawa baru yang akan disintesis dilakukan menggunakan program komputer Molegro 5.5 untuk mempelajari interaksi ligan-reseptor secara *in silico*. Pada studi ini dieksplorasi interaksi senyawa dengan beberapa struktur reseptor selain ITVO yang berhubungan dengan aktivitas antikanker terhadap sel MCF-7 untuk ditentukan mana yang mempunyai korelasi paling baik dengan hasil uji aktivitas *in vitro*.

#### **6.2. Sintesis dan Penentuan Struktur 5 Senyawa Turunan 1,3-Dibenzoil-1,3-dietilurea**

Metode sintesis yang digunakan mengacu dari hasil penelitian tahap I. Pemeriksaan terhadap senyawa hasil sintesis yang meliputi :

- a. Uji kemurnian dengan penentuan titik lebur dan uji KLT
- b. Pemeriksaan spektra infra merah, NMR-<sup>1</sup>H dan NMR-<sup>13</sup>C, serta MS.

#### **6.3. Uji Aktivitas Antikanker**

Uji aktivitas antikanker ditentukan dengan metode hambatan pertumbuhan sel kanker terhadap kultur sel MCF-7 secara *in vitro*. Dari semua senyawa-senyawa yang aktivitasnya lebih tinggi dibanding hidroksiurea akan dipilih senyawa dengan aktivitas paling tinggi sebagai calon obat antikanker payudara.

#### **6.4. Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA)**

Setelah diperoleh data aktivitas biologis 10 senyawa hasil sintesis dilakukan analisis HKSA menggunakan sifat fisikokimia dan deskriptor struktur 3 dimensi yang diperoleh dengan bantuan program komputer ChemBioDraw Ultra, ACD/I-Lab, dan Molegro 5.5. Model HKSA yang dihasilkan dapat digunakan untuk merancang struktur senyawa baru yang lebih tinggi aktivitasnya.

#### **6.5. Penulisan Artikel ilmiah/Publikasi**

Penulisan artikel ilmiah/publikasi meliputi seluruh hasil penelitian yang diperoleh dari tahap I dan II penelitian.

## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

Dari hasil penelitian Tahap I dapat disimpulkan bahwa :

- a. Reaksi antara 1,3-dietilurea dengan benzoil klorida tersubstitusi dalam pelarut tetrahidrofuran dengan katalis piridin menghasilkan 5 senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea.
- b. Semua senyawa hasil sintesis mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea. Satu senyawa yang aktivitasnya paling tinggi, yaitu BEU-2, mempunyai aktivitas 11 kali lebih tinggi dibanding obat antikanker hidroksiurea sehingga dapat dikembangkan sebagai calon obat antikanker payudara.
- c. Aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 *in vitro* ( $IC_{50}$ ) berhubungan dengan kekuatan interaksi (*docking score*) terhadap reseptor ITVO secara *in silico*; senyawa turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea yang mempunyai *docking score* lebih rendah menghasilkan aktivitas sitotoksik *in vitro* lebih tinggi.

Saran yang dapat disampaikan sehubungan dengan kesimpulan hasil penelitian adalah :

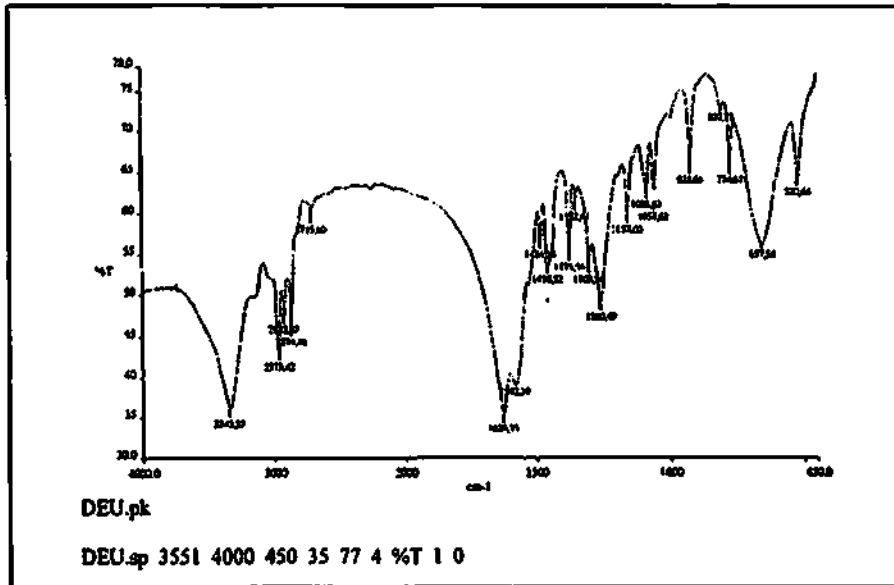
- a. Dilakukan sintesis 5 turunan 1,3-dibenzoil-1,3-dietilurea berikutnya untuk memperoleh 10 senyawa sehingga dapat dibuat model hubungan kuantitatif struktur-aktivitas (HKSA) antikankernya. Model HKSA digunakan untuk memilih senyawa yang paling poten dan selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk merancang senyawa turunan baru yang mempunyai aktivitas lebih tinggi lagi dibanding obat antikanker yang telah digunakan saat ini.
- b. Mengoptimasi prosedur sintesis untuk meningkatkan persentase hasil sintesis karena senyawa yang dihasilkan potensial sebagai obat antikanker.
- c. Melakukan studi aktivitas antikanker lebih lanjut dengan mencari model reseptor yang paling sesuai dengan hasil uji aktivitas sitotoksik agar diketahui mekanisme aksinya pada sel MCF-7.

## DAFTAR PUSTAKA

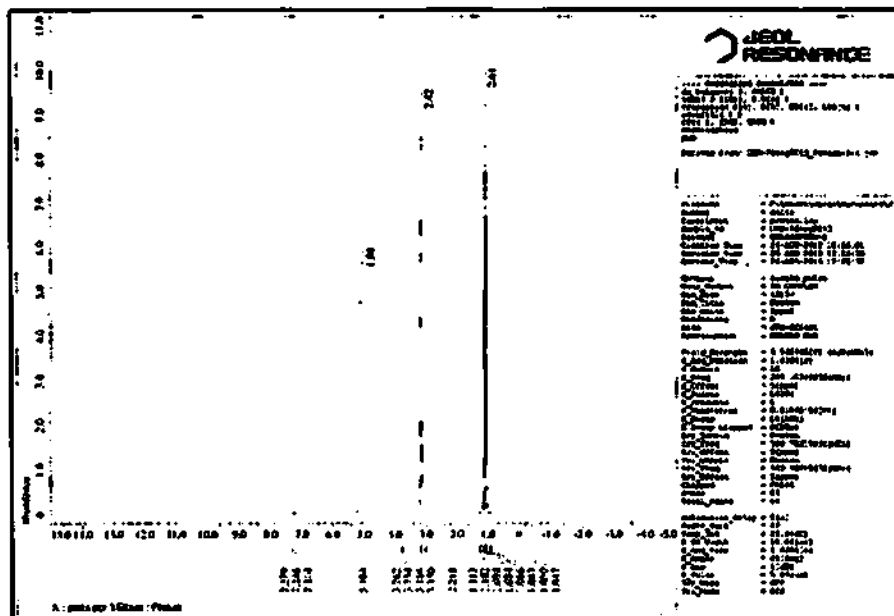
- Abraham, DJ. 2003. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, Sixth Edition, Volume 1: Drug Discovery, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Avendano C and Menendes J.C, 2008, **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**, Elsevier, Amsterdam: 13-18
- Campestre,C., Agamennone, M., Tortorella, P., Preziuso, S., Biasone,A., Gavuzzo,E., Pochetti,G., Mazza, F., Hiller, O., Tschesche, H., Consalvie, V., and Gallina, C.. 2006. *N*-Hydroxyurea as zinc binding group in matrix metalloproteinase inhibition: Mode of binding in a complex with MMP-8. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16 : 20–24.
- Clayden, J. , Greeves, N., Warren, S., Wothers, P., 2001. **Organic Chemistry**. Oxford University Press, New York. pp. 279-289.
- Diyah, N.W., Purwanto, Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., Susilowati, R. 2007. The Structure Modification And Analgesic Activities Of *O*-Benzoylsalicylic Acid Derivatives. **USM–UNAIR First Collaborative Conference**, Penang.
- Diyah, N.W., Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., 2013. Molecular Modeling And QSAR Of Ring-Substituted Benzoylurea Derivatives As Potential ntimeoplastic Agents, **Second Makassar International Symposium of Pharmaceutical Science**. Universitas Hasanuddin.
- DepKes RI, 2006. Departemen Kesehatan Bentuk Subdirektorat Kanker, **TEMPO Interaktif**, Diakses pada 14 Maret 2010.
- Fortin, S., Moreau, E., Patenaude, A., Desjardins, M. Lacroix, J., Rousseau, J.L.C., and Rene' C-Gaudreault, R. 2005. Optimized *N*-phenyl-*N*-(2-chloroethyl)ureas as potential antineoplastic agents: Synthesis and growth inhibition activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 13 : 6703–6712
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P., Shenkin, P.S., 2004. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **J. Med. Chem.** 47 (7), pp. 1739–1749.
- Hardjono, 2011, Modifikasi Struktur 1-(Benzoiloksi)urea dan Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas Sitotoksiknya. **Disertasi**. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kar, A. 2007. **Medicinal Chemistry**, 4<sup>th</sup> Ed., New Age International Ltd Publishers, New Delhi. pp. 794 – 810
- Klebe, G., Mietzner, T., 1994. A fast and efficient method to generate biologically relevant conformations. **J. Comput. Aided Mol.** 8 (5), pp. 583–606.
- Lacroix, M., Toillon, R.A., Leclercq, G., 2006. p53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, 13 (2), pp. 293-325.

- Ledirac, N., Delescluse, C., Lesca, P., Piechocki, MP., Hines, RN., de Sousa, G., Pralavorio, M., Rahmani, R., 2000. Diflubenzuron, a Benzoyl-Urea Insecticide, Is a Potent Inhibitor of TCDD-Induced CYP1A1 Expression in HepG2 Cell. **Toxicology and Applied Pharmacology Vol. 164.** pp. 273–279.
- Li, JN., Song, D., Lin, YH., Hu, QY., Yin, L., Bekesi, G., Holland, JF., Jiang, JD. 2003. Inhibition of Microtubule Polymerization by 3-Bromopropionylaminobenzoylurea (JIMB01), a New Cancericidal Tubulin Ligand. **Biochemical Pharmacology 65** : 1691–1699.
- McLaughlin JL, 1991, **Crown Gall Tumour on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation**, Academic Press Limited., London.
- McMurry, J., 2011. **Fundamentals of Organic Chemistry, Seventh Edition.** Brooks/Cole, Belmont. pp. 349.
- Meng., E.C., Shoichet, B.K., Kuntz, I.D., 2004. Automated docking with grid-based energy evaluation. **Journal of Computational Chemistry 13 (4)**., pp. 505–524.
- Moreau, E., Fortin, S., Lacroix, J., Patenaude, A. 2008. N-Phenyl-N0-(2-chloroethyl)ureas (CEUs) as potential antineoplastic agents. Part 3: Role of carbonyl groups in the covalent binding to the colchicine-binding site. **Bioorganic & Medicinal Chemistry 16** : 1206–1217
- Patrick, L., 2009. **Medicinal Chemistry 4<sup>th</sup> ed.** Oxford University Press, New York. pp. 377-397
- Platt, O.S. 2008. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med. 358 (13):** 1362–9.
- Purwanto, B.T., 2010. Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas Penekan Sistem Saraf Pusat Turunan N-Benzoil-N'-fenilurea. **Disertasi.** Universitas Airlangga.
- Saban, N. Bujak, M. 2009. Hydroxyurea and Hydroxamic Acid Derivatives as Antitumor Drugs. **Cancer Chemother Pharmacol. 64** : 213 – 221
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C., 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. **Clinical Cancer Research, 6**, pp. 4373-4380.
- Shweta, S., Khadabadi, Ganesh, T., 2012. In vitro Evaluation of Antimitotic, Antiproliferative, DNA fragmentation and Anticancer activity of Chloroform and Ethanol extracts of *Revia hypocrateriformis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease.** pp. S503-S508
- Silverstein R.M., Webster, F.X., and Kiemle D.J. 2005. **Spectrofotometric Identification of Organic Compound**, 7th Ed, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Siswandono. 1999. Sintesis Senyawa Baru Turunan Asil Dan Benzoil-N-Urea Untuk Optimalisasi Aktivitas Penekan Sistem Saraf Pusat. **Laporan Penelitian Riset Unggulan Terpadu VI**, Kementerian Ristek RI, LIPI., Jakarta.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000, **Kimia Medisinal**, Airlangga University Press, Surabaya.

**LAMPIRAN 1. Spektra IR (A) dan <sup>1</sup>H-NMR (B) senyawa 1,3-dietilurea serta spektrum IR Asam Benzoat (C)**

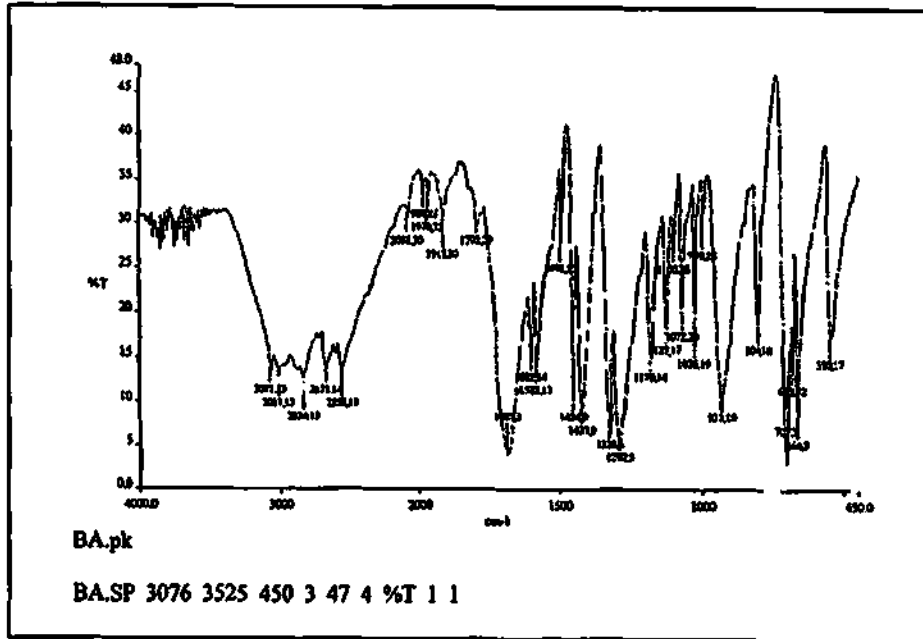


**A. Spektrum IR senyawa 1,3-dietilurea dalam peilet KBr**



**B. Spektrum <sup>1</sup>H-NMR (B) senyawa 1,3-dietilurea (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)**





**C. Spektrum IR senyawa Asam Benzoat dalam Pellet KBr**

**LAMPIRAN 2. Personalia Tenaga Peneliti****1. Ketua Peneliti**

- a. Nama Lengkap : Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, Apt., MSi.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 19661228 199203 2 002
- d. Disiplin ilmu/keahlian : Farmasi/ Kimia Medisinal
- e. Pangkat/Golongan : Penata Tk. I/III d
- f. Jabatan fungsional/struktural : Lektor
- g. Fakultas/Jurusan : Farmasi

**2. Anggota Peneliti I**

- a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. NIP : 19521002 198002 1 001
- d. Disiplin ilmu/keahlian : Farmasi/ Kimia Medisinal/ *drug design*
- e. Pangkat/Golongan : Pembina Utama / IV e
- f. Jabatan fungsional/ struktural : Guru Besar/ Ketua Program S3 Ilmu Farmasi
- g. Fakultas/Jurusan : Farmasi

**3. Anggota Peneliti II**

- a. Nama Lengkap : Dr. Juni Ekowati, Apt., MSi.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 19670601 199203 2 002
- d. Disiplin ilmu/ keahlian : Farmasi/ Sintesis
- e. Pangkat/Golongan : Pembina/ IV a
- f. Jabatan fungsional/struktural : Lektor Kepala
- g. Fakultas/Jurusan : Farmasi

- 4. Tenaga Laboran/Teknisi : Tukidjo/ Kimia Farmasi
- 5. Pekerja Lapangan/Pencacah : Gita Miranda, Dewi Rahmawati
- 6. Tenaga Administrasi (1 orang) : Sutanto