

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker merupakan penyakit mematikan terbesar ke-2 di dunia setelah kardiovaskular. Kanker membunuh 7,6 juta jiwa pada tahun 2005, tiga perempatnya terjadi di negara dengan penghasilan rendah hingga menengah. Pada tahun 2015, jumlah tersebut diperkirakan berkembang hingga mencapai 9 juta jiwa dan akan meningkat lagi hingga 11,5 juta pada tahun 2030 (Chan, 2007).

Penyakit kanker masih menjadi salah satu penyakit mematikan di Indonesia. Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan adanya peningkatan angka pasien kanker dari tahun 2010 ke 2013. Salah satu penyebabnya adalah semakin meningkatnya gaya hidup modern yang tidak sehat (Depkes, 2014). Hasil Riset tersebut juga menyatakan prevalensi kanker di Indonesia adalah 1,4 per 1000 penduduk, artinya pada tahun 2013 terdapat sekitar 3 juta orang pasien kanker di seluruh Indonesia (Depkes, 2014).

Kanker merupakan bentuk umum dari suatu kelompok besar penyakit yang dapat menginfeksi setiap bagian tubuh. Istilah lainnya adalah tumor ganas dan neoplasma. Ciri-ciri yang dapat digambarkan adalah pertumbuhan yang cepat dari sel yang abnormal melebihi keadaan normalnya, dan dapat menyerang bagian tubuh yang lain di sekitarnya dan menyebar ke organ yang lain. Proses tersebut dinamakan metastasis. Metastasis merupakan penyebab utama kematian sel akibat kanker (WHO, 2014).

Menurut data dari GLOBOCAN IARC, menyebutkan bahwa terdapat 14,1 juta penduduk dunia mengalami kanker, 8,2 juta meninggal akibat kanker, dan 32,6 juta orang mengidap kanker (diagnosis dilakukan 5 tahun akhir ini) pada tahun 2012. Di negara berkembang, 57% (8 juta) orang mengidap kanker, 65% (5,3 juta) orang dari pengidap kanker tersebut meninggal dan prevalensi kanker sebanyak 48% (15,6 juta) orang pada 5 tahun terakhir terjadi di daerah kurang berkembang (IARC WHO, 2012).

Pengobatan kanker yang umum digunakan adalah kemoterapi. Tujuan utama kemoterapi kanker adalah merusak secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Penghambat *dihydrofolate reductase* (DHFR) telah lama diketahui sebagai target utama dalam pengembangan sebagai kemoterapi kanker (Al-Rashood dkk, 2014).

Asam folat dan metabolitnya (yang disebut sebagai folat) merupakan koenzim dari beberapa transformasi biokimia esensial. Utamanya folat terlibat dalam transfer satu unit karbon pada sintesis *de novo* dari asam timidilat dan nukleotida purin (Avendano dan Menendez, 2008). Dipandang dari sudut biologi, defisiensi folat terutama akan memperlihatkan gangguan pertumbuhan akibat pembentukan nukleotida purin dan pirimidin. Gangguan ini menyebabkan kegagalan sintesis DNA dan hambatan mitosis sel (Gunawan, 2012). Enzim yang dipengaruhi folat jelas digunakan sebagai target kemoterapi kanker, tetapi hingga tahun 1980 hanya DHFR, enzim yang digunakan dalam target utama kemoterapi (Avendano dan Menendez, 2008).

Pada tubuh mamalia, asam folat direduksi oleh DHFR menjadi asam tetrahidrofolat (THF) melalui dua langkah serta menggunakan NADPH sebagai kofaktor. Hasil transformasi lanjutan dari THF yaitu 5,10-metilen-THF; 5,10-metenil-THF; 5-formil-THF; dan 10-formil-THF, yang dikenal sebagai asam folinat dan terlibat pada transfer satu unit karbon. Penghambat DHFR memicu kematian sel berdasarkan peran esensial dari asam folinat pada sintesis timidilat dan basa purin. Penghambat DHFR yang paling poten adalah analog asam folat yang berbeda ligan alami yang memiliki gugus 2,4-diaminopirimidin, seperti pada aminopterin dan metotreksat (Avendano dan Menendez, 2008).

Metotreksat (MTX), merupakan penghambat dihidrofolat reduktase telah digunakan secara klinik lebih dari 50 tahun dan menjadi obat yang paling sering digunakan untuk pengobatan kanker (Zhang dkk, 2008). MTX mengikat sisi aktif dari DHFR lebih kuat dari pada substrat alami oleh faktor 10^4 karena adanya gugus amino yang menggantikan gugus hidroksi pada posisi 4, yang meningkatkan ikatan dasar dari cincin pirimidin (Thurston, 2007). Sejumlah turunan folat telah disintesis sebagai antagonis yang potensial. Dengan beberapa modifikasi struktur seperti pada cincin pteridin, turunan benzena, atau rantai samping glutamat (Zhang dkk, 2008). Oleh karena itu, dilakukan modifikasi senyawa turunan asam folat yang dapat menghambat DHFR, sehingga diperoleh senyawa baru yang lebih aktif, selektif dengan efek samping minimal dan tidak resisten terhadap sel tumor yang diinginkan.

Dalam pengembangan obat melalui modifikasi molekul diperlukan adanya senyawa penuntun (*lead compound*), dengan

harapan diperoleh senyawa baru yang lebih aktif dan selektif dengan efek samping serta toksisitas yang rendah. Senyawa penuntun adalah senyawa yang digunakan sebagai pangkal tolak modifikasi molekul. Ada beberapa pendekatan dalam mencari dan menemukan senyawa penuntun dalam proses pengembangan obat. Salah satunya adalah dari studi endokrinologi pada manusia. Asam folat merupakan salah satu senyawa antagonis spesifik dalam proses metabolisme dan biokatalis (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Modifikasi senyawa penuntun dilakukan dengan cara memasukkan gugus-gugus tertentu dengan harapan mengubah sifat lipofilitas, elektronik, dan sterik molekul senyawa. Sifat lipofilitas berkaitan dengan kemampuan senyawa dalam penembusan membran barrier sel tubuh. Sifat elektronik berkaitan dengan kemampuan senyawa mengalami ionisasi ataupun mengalami oksidasi-reduksi berdasarkan sifat kimianya. Sedangkan, sifat sterik berhubungan dengan tempat aksi (*site*) pada reseptor. Untuk meningkatkan sifat lipofilitas dapat dilakukan dengan modifikasi gugus yang lebih lipofil atau non polar. Untuk meningkatkan sifat elektronik dapat dilakukan modifikasi gugus yang berifat elektronegatif (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Pada penelitian ini, senyawa penuntun yang digunakan adalah asam folat. Senyawa ini memiliki gugus farmakofor yang berupa cincin 2,4-diaminopirimidin. Senyawa ini akan dikembangkan menjadi senyawa baru yaitu asam 10-N-(2-klorobenzoil)folat dengan cara mereaksikannya dengan 2-klorobenzoil klorida. Mekanisme reaksi sintesis yang terjadi adalah reaksi asilasi.

Asam folat mengandung gugus-gugus amin primer, amin sekunder, dan amida. Dari hasil penentuan nilai pKa asam folat dengan program komputer maestro (schrodinger) didapatkan bahwa gugus amin sekunder mempunyai sifat nukleofil yang paling besar, sehingga diharapkan reaksi substitusi nukleofil akan terjadi pada gugus tersebut.

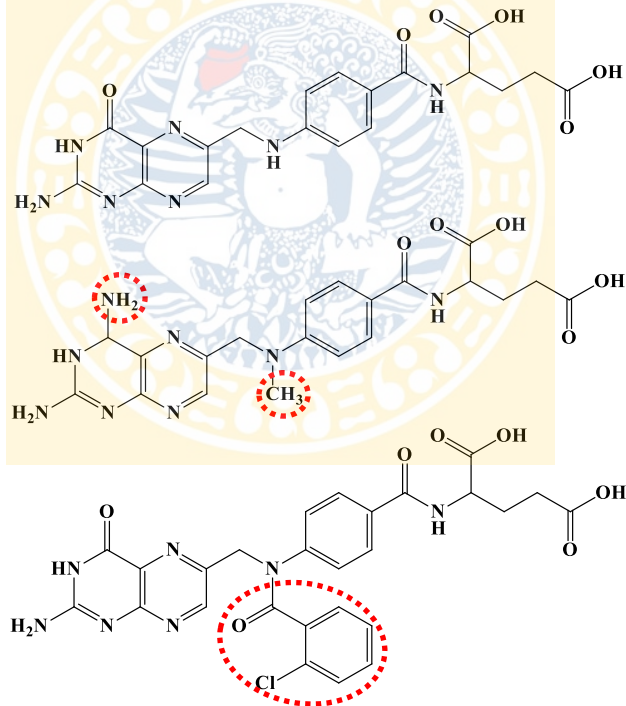
Selain dengan pendekatan sifat fisikokimia, pendekatan kolektif lain yang dapat dilakukan untuk menguji kelayakan senyawa turunan asam folat untuk disintesis yaitu uji *in silico*. Uji *in silico* merupakan uji yang menggunakan komputerisasi sebagai alat uji (berupa *software*). Uji *in silico* pada pengembangan obat diperlukan untuk melihat gambaran senyawa berinteraksi dengan reseptor untuk memprediksi aktivitas sebelum dilakukan sintesis senyawa. Pada penelitian ini, senyawa dugaan hasil sintesis akan diuji terlebih dahulu secara *in silico* untuk memprediksi aktivitasnya dengan senyawa pembanding metotreksat yang secara klinis telah digunakan sebagai pengobatan antikanker. Uji *in silico* dilakukan menggunakan program komputer *virtual docking*. Program yang digunakan adalah *Molegro Virtual Docker* (MVD) karena dapat membantu memvisualisasi dari model interaksi molekul dengan hambatan yang kecil. Parameter yang digunakan adalah *rerank score* yang dapat menunjukkan energi yang dibutuhkan untuk ikatan antara senyawa ligan dengan reseptor (MVD *User Manual*, 2011). Semakin rendah nilai *rerank score* maka energi yang dibutuhkan ikatan antara senyawa-reseptor semakin kecil dan semakin stabil ikatan senyawa tersebut. Hal ini dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas senyawa tersebut.

Pada uji *in silico* ini digunakan reseptor *dihydrofolate reductase* (DHFR) yang dapat diunduh dari situs “*protein data bank*”. Ada beberapa reseptor *dihydrofolate reductase* antara lain adalah reseptor kode 1DLS, 3DFR, 1DDR, 1DDS. Dalam penelitian ini dipilih reseptor kode 1DDS karena memiliki ligan metotreksat dan merupakan molekul protein pada efek denaturasi (Dunbar dkk, 1997).

Sintesis senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat menggunakan reaksi Schotten-Baumann yang dimodifikasi dengan mereaksikan asam folat dengan 2-klorobenzoil klorida berdasarkan mekanisme reaksi asilasi dalam pelarut tetrahidrofur (THF). Asam folat memiliki gugus amin sekunder yang bersifat nukleofil, sedangkan 2-klorobenzoil klorida memiliki atom C karbonil, sehingga terjadi reaksi substitusi asil nukleofilik. Senyawa hasil sintesis kemudian dilakukan uji kualitatif yaitu dengan pemeriksaan organoleptis, uji kemurnian dan konfirmasi struktur. Untuk uji kemurnian senyawa menggunakan metode penentuan jarak lebur dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Untuk konfirmasi struktur senyawa menggunakan metode spektroskopi Inframerah dan spektroskopi ¹H-NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

Setelah diketahui kebenaran struktur senyawa hasil sintesis tersebut dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik secara *in vitro*. Studi obat secara *in vitro* pada percobaan dengan menggunakan organ yang terisolasi, pengaruh dari transpor, perubahan kimia, metabolisme dan ekskresi obat menjadi minimal dan distribusi menjadi lebih sederhana, sehingga diharapkan hubungan struktur-aktivitas menjadi lebih jelas. Dengan sistem uji *in vitro* yang baik, akan didapat informasi tentang sifat kimia obat yang berperan

terhadap aktivitas, bagian struktur molekul obat yang berinteraksi dengan reseptor (gugus fungsi) dan penyebab dari efek. Sifat kimia obat merupakan bagian yang penting untuk terjadinya efek biologis (Siswandono dan Soekardjo, 1998). Pengujian dilakukan pada kultur sel HeLa dengan metode MTT atau 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium bromida. Penentuan aktivitas senyawa dihitung IC_{50} dari uji statistik menggunakan analisis probit. Struktur kimia dari senyawa asam folat, metotreksat, dan asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat dapat dilihat pada Gambar 1.1



Gambar 1.1 (dari atas ke bawah): struktur Asam Folat, Metotreksat, dan Asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat secara *in silico* mempunyai aktivitas sitotoksik lebih besar dibanding metotreksat?
- 2) Apakah senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat dapat disintesis melalui reaksi substitusi asil nukleofilik terhadap asam folat oleh 2-klorobenzoil klorida?
- 3) Apakah senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat mempunyai aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dengan metode MTT terhadap kultur sel HeLa yang lebih besar dibanding metotreksat?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian adalah :

- 1) Membandingkan aktivitas sitotoksik secara *in silico* dari senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat dengan metotreksat.
- 2) Memperoleh senyawa target melalui hasil reaksi antara asam folat dan 2-klorobenzoil klorida.
- 3) Membandingkan aktivitas sitotoksik senyawa asam 10-*N*-(2-klorobenzoil)folat dan metotreksat secara *in vitro* dengan metode MTT terhadap kultur sel HeLa.

1.4 Manfaat Penelitian

Mendapatkan senyawa baru turunan asam folat yang memiliki aktivitas sitotoksik lebih besar dibanding dengan metotreksat