

# Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas Senyawa Turunan 3-Haloasilaminobenzoilurea sebagai Inhibitor Pembentukan Mikrotubulus

Qoonita Fadhilah dan \*Daryono Hadi Tjahjono

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

## Abstrak

Mikrotubulus (MT $\alpha$ ) telah diidentifikasi sebagai tempat kerja untuk pengobatan kanker dalam penghambatan pembelahan sel. Salah satu senyawa yang memiliki potensi antikanker yang bekerja pada situs ini adalah turunan 3-haloasilamino benzoilurea. Mekanisme kerja senyawa ini yaitu berikatan pada daerah colchicine binding site pada  $\beta$ -tubulin, dimana akan mengganggu pembentukan benang-benang mitotik mikrotubulus, memblokir siklus sel pada fase mitosis, yang berdampak pada apoptosis sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh persamaan Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA) terbaik, senyawa-senyawa baru yang memiliki aktivitas antikanker lebih tinggi dan afinitas yang lebih baik terhadap reseptor  $\beta$ -tubulin, dibandingkan dengan senyawa induknya. Dilakukan pemodelan dan optimasi geometri menggunakan Hyperchem. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai prediktor diikuti analisis statistik multilinear masing-masing menggunakan MOE 2007.09 dan SPSS Statistic 17.0 dan analisisnya divalidasi dengan metode Leave One Out. Setelah mendapatkan persamaan HKSA yang terbaik, dilakukan desain senyawa baru menurut skema Topliss. Derivat senyawa baru kemudian didocking pada reseptor  $\beta$ -tubulin untuk melihat afinitasnya terhadap reseptor. Persamaan HKSA terbaik untuk senyawa turunan 3-haloasilamino benzoilurea adalah  $IC_{50} = -15,077 (\pm 1,996) - 0,160 (\pm 0,055) AM1\_dipole + 0,016 (\pm 0,004) AM1\_HF + 0,521 (\pm 0,250) AM1\_LUMO + 0,038 (\pm 0,005) ASA\_H$  dengan 3 senyawa baru yang memiliki  $IC_{50}$  lebih rendah daripada senyawa induk.

**Kata kunci:** kanker, benzoilurea, HKSA, docking, mikrotubulus.

## Abstract

Microtubules (MT $\alpha$ ) has been identified as a rational site to inhibit the dividing of cancer cells in cancer therapy. One of the anticancer compounds that work at this site is 3-haloacylamino benzoylurea derivatives. The mechanism of this compound is to bind with the region of colchicine binding site at the  $\beta$ -tubules, which interferes the assembly of mitotic spindles of microtubules, followed by blocking the cell cycle at mitotic phase then caused the apoptosis of cancer cell. The present study is aimed to obtain the best Quantitative Structure and Activity Relationship (QSAR) equation of 3-haloacylamino benzoylurea derivatives, design its new derivatives that have a higher anticancer activity and higher affinity towards the  $\beta$ -tubulin receptor than its parent compound. Structure modeling and geometric optimization structure, were done by Hyperchem. The calculation of predictors' value was performed by MOE 2007.09, while multilinear statistical analysis was done with SPSS Statistic 17.0. The results were then validated by Leave One Out method. After the best QSAR equation has been obtained, the new derivatives were designed according to the Topliss scheme. New compounds were docked to the  $\beta$ -tubulin receptor to observe the binding affinity and energy. It was obtained that the best QSAR equation is  $IC_{50} = -15.077 (\pm 1.996) - 0.160 (\pm 0.055) AM1\_dipole + 0.016 (\pm 0.004) AM1\_HF + 0.521 (\pm 0.250) AM1\_LUMO + 0.038 (\pm 0.005) ASA\_H$ . 3 new derivatives have the  $IC_{50}$  lower than the parent compound.

**Keywords:** cancer, benzoylurea, QSAR, docking, microtubules.

## Pendahuluan

Data statistika *World Health Organization* menunjukkan bahwa kanker sudah menjadi penyakit utama yang menyebabkan kematian di dunia. Tercatat ada sebanyak 12,7 juta kasus kanker dan 7,6 juta jiwa diantaranya berakhir pada kematian, atau sekitar 13% dari angka kematian total pada tahun 2008. Di tahun 2011 tercatat 3,72 juta kasus kanker di kawasan Asia, dimana mayoritas terjadi di kawasan Asia Timur (WHO 2011).

Tingginya angka kematian yang disebabkan oleh kanker menyebabkan penelitian mengenai senyawa-senyawa antikanker semakin berkembang. Salah satunya adalah senyawa turunan 3-haloasilamino benzoilurea yang diteliti oleh Song (2008) Senyawa 3-haloasilamino benzoilurea ini bekerja sebagai antikanker dengan mekanisme yang terkait dengan siklus sel. Paclitaxel dan alkaloid vinca, yang merupakan senyawa antikanker dengan mekanisme serupa yang ditemukan lebih dulu, memiliki beberapa kekurangan antara lain efek samping yang neurotoksik, sulitnya untuk disintesis karena struktur besat yang berasal dari bahan alam, dan merupakan substrat dari P-glikoprotein yang dapat menginduksi *multidrug*

\* Penulis korespondensi. E-mail: daryonohadi@fa.itb.ac.id

*resistance* (MDR). Oleh karena itu, dalam penelitian-penelitian terbaru di bidang kimia medisinal, dicari suatu senyawa ukuran kecil yang mudah disintesis dan dapat digunakan sebagai obat, yang mampu berikatan dengan reseptor tubulin, salah satunya adalah senyawa combertastain A-4 (CA4) yang sudah memasuki uji klinik tahap II (Song 2008).

Hingga saat ini, belum dilakukan penelitian mengenai hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas (HKSA) senyawa turunan 3-haloasilamino benzoilurea sebagai antikanker. Penelitian hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan persamaan HKSA terbaik, merancang dan menemukan senyawa baru yang memiliki potensi antikanker lebih tinggi. Perancangan senyawa baru juga diharapkan dapat menghasilkan senyawa yang memiliki afinitas lebih tinggi terhadap reseptor protein  $\beta$ -tubulin.

## Percobaan

### Perangkat Lunak

*HyperChem® Release 8.0, Molecular Operating Environment (MOE 2007.09), SPSS Statistics 17.0, Argus Lab 4.0.1, Autodock Vina 1.5.4 revision 30, PyMOL Molecular Graphic System version 1.1 eval.*

### Perangkat Keras

*ACPI x86 – based PC dengan platform Intel® Pentium® Dual-Core; Processor: Dual-Core Processor T2080 - (1.73 GHz, 1MB L2 Cache, 533 MHz FSB); Operating System: Windows® 7 Professional; Memory: 1GB DDR2 667MHz RAM (x1)*

## Prosedur

### Optimasi geometri

Pemodelan struktur molekul dilakukan dengan menggunakan *software HyperChem® Release 8.0*. Pertama-tama dilakukan pemodelan struktur dua dimensi untuk beberapa molekul yang tertera dalam jurnal rujukan dengan perintah: *Build – Default element*. Pemilihan molekul ini didasarkan dari nilai  $IC_{50}$  yang dianggap memiliki aktivitas cukup baik sebagai anti kanker, yaitu dibawah  $3\mu M$ . Setelah itu masing-masing struktur ditambahkan atom H dan dilakukan pembentukan molekul tiga dimensi dengan ikatan dan konformasi yang sesuai dengan perintah *Build – Add H and Model Build*.

Molekul tiga dimensi yang telah dibuat dioptimasi geometri dengan metode Ab-initio basis minimal dan STO-3G. Optimasi geometri dilakukan dengan perintah *Compute – Geometry Optimization*. Masing-

masing molekul yang sudah dioptimasi lalu disimpan dalam ekstensi .mol.

### Perhitungan prediktor

Seri senyawa yang sudah dioptimasi lalu dihitung prediktor yang dianggap mampu mewakili aktivitasnya. Perhitungan prediktor dilakukan dengan menggunakan *software Molecular Operating Environment (MOE 2007.09)*. Seri senyawa yang sudah dioptimasi dipindahkan ke *database MOE* dengan perintah *Append to database*. Perhitungan prediktor dilakukan dengan perintah *Compute-Descriptor-Calculate*. Prediktor yang dipilih merupakan prediktor yang umum digunakan dalam penelitian HKSA, yaitu diperkirakan memiliki pengaruh besar terhadap senyawa antara lain energi total, energi elektronik, energi panas pembentukan, energi HOMO, energi LUMO, momendipol total, luas permukaan hidrofobik, koefisien partisi, globularitas, dan solubilitas.

### Analisis statistik

Seri senyawa dan prediktor yang sudah didapat dalam ekstensi .txt melalui *software Molecular Operating Environment (MOE 2007.09)* lalu dibuka dengan *Microsoft Office Excel* dan disimpan dalam ekstensi .xls. Setelah itu dilakukan analisis regresi multilinear menggunakan *software SPSS Statistic 17.0*. Nilai  $IC_{50}$  sebagai variabel bebas (sumbu Y) dipasangkan dengan nilai kombinasi beberapa prediktor sebagai variabel terikat (sumbu X). Nilai prediktor yang dipasangkan merupakan kombinasi dari dua, tiga, dan empat pasangan prediktor.

Dari model yang didapatkan dipilih model prediktor terbaik yang memenuhi persyaratan statistik dengan parameter  $r$ ,  $F_{hitung}/F_{tabel}$ , dan  $q^2$ . Model prediktor yang memenuhi persyaratan memiliki nilai  $r \geq 0.8$ ,  $F_{hitung}/F_{tabel} \geq 1$ , dan  $q^2 \geq 0.5$  yang menyatakan bahwa bahwa hipotesis nol ( $H_0$ ) ditolak, sedangkan hipotesis alternatif ( $H_A$ ) diterima pada aras 0,05 atau tingkat kepercayaan 95% (Scheffler 1987).

### Validasi model statistik

Validasi model statistik dilakukan untuk mendapatkan persamaan HKSA yang dapat diterima. Validasi dilakukan dengan metode *Leave One Out (LOO)*, dimana senyawa-senyawa yang memiliki nilai  $\$Z$ -SCORE diatas  $\geq 2,5$  dianggap sebagai pencilan dan harus dieliminasi satu persatu. Nilai  $\$Z$ -SCORE dihitung dengan menggunakan *software MOE 2007.09* dengan memasukkan perintah *QSAR model-fit-validate*. Setelah dilakukan validasi, lalu dilakukan kembali analisis statistik untuk menghitung nilai  $r$ ,  $F_{hitung}/F_{tabel}$ , dan  $q^2$ .

## Desain senyawa baru

Desain senyawa baru dilakukan dengan menambahkan substituen tertentu pada senyawa induk yang dipilih. Senyawa induk dipilih dari senyawa yang tidak tereliminasi yang memiliki aktivitas paling tinggi atau IC<sub>50</sub> paling rendah yaitu senyawa 11e dengan IC<sub>50</sub> 0,1 µM. Pemilihan substituen dilakukan dengan pendekatan skema Topliss yaitu dengan menambahkan substituen -Cl, -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -F, dan -CF<sub>3</sub> pada berbagai posisi (Song 2008). Setelah itu dihitung IC<sub>50</sub> senyawa baru dengan menggunakan persamaan HKSA terbaik yang sudah didapat dan dipilih senyawa baru yang memiliki nilai IC<sub>50</sub> lebih rendah dari senyawa induk.

## Docking

Senyawa baru yang terpilih dipelajari interaksinya dengan reseptor dengan melakukan molekular docking menggunakan *software Argus Lab 4.0.1* dan *Autodock Vina 1.5.4*. Parameter yang diamati untuk dengan *software Argus Lab 4.0.1* adalah perubahan energi bebas ( $\Delta G$ ) dan jumlah ikatan hydrogen yang terbentuk antara ligan dengan reseptor. Sedangkan pada *software Autodock Vina 1.5.4* parameter yang diamati adalah energi afinitas antara ligan dan reseptor. Hasil docking kemudian divisualisasi dengan *software PyMOL Molecular Graphic System version 1.1. eval*.

## Hasil dan Pembahasan

Perhitungan nilai prediktor untuk senyawa analog yang sudah dioptimasi dilakukan dengan menggunakan *software Molecular Operating Environment* (MOE 2007.09). Total digunakan 10 prediktor dengan jumlah 22 senyawa.

Hasil perhitungan nilai-nilai prediktor setiap senyawa ini lalu dianalisis statistik dengan cara regresi multilinear untuk melihat hubungan antara beberapa variabel bebas dengan satu variabel terikat. Analisis dilakukan terhadap variabel terikat yang berupa IC<sub>50</sub> (sumbu Y) dengan variabel bebas yang berupa nilai setiap prediktor (sumbu X). Kombinasi prediktor untuk regresi multilinear ini dapat dilakukan dengan melakukan kombinasi pasangan prediktor, yaitu 2, 3, dan 4 pasang untuk seluruh prediktor yang digunakan. Parameter yang didapat dalam regresi multilinear menggunakan program SPSS adalah nilai r dan Fhitung/ Ftabel. Persyaratan statistik dipenuhi bila nilai  $r \geq 0,8$  dan nilai F mengindikasikan tingkat signifikansi lebih baik dari 95% (Qubinyi 1993). Nilai r dan Fhitung didapat dari hasil analisis program SPSS sedangkan nilai Ftabel didapat menggunakan rumus:

$$F(1-P) = \text{FINV}(P, \text{dfq}, \text{dfv})$$

P adalah aras kepercayaan, dfq adalah k-1 dan dfv adalah n-k, k adalah jumlah variabel dan n adalah jumlah senyawa.

Setelah didapat persamaan yang paling baik lalu dihitung kuadrat koefisien validasi silang ( $q^2$ ) yang merupakan indikator performansidan stabilitas model terhadap keseluruhan senyawa yang dianalisis. Untuk model yang dapat dipercaya, kuadrat koefisien validasi silang  $q^2$  sebaiknya  $\geq 0,5$ , dicari dengan rumus

$$q^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Dimana  $y_i$  adalah aktivitas senyawa  $i$ ,  $\bar{y}$  adalah aktivitas eksperimen rata-rata,  $\hat{y}_i$  adalah aktivitas prediksi dari senyawa  $i$ , yang dikomputasi melalui persamaan regresi baru setiap penghilangan satu nilai data (Chen et al. 2008). Berdasarkan perhitungan data  $q^2$  didapat 6 senyawa yang memiliki nilai  $q^2$  yang memenuhi syarat, ditunjukkan oleh Tabel 1.

**Tabel 1.** Model kombinasi dengan nilai  $q^2 \geq 0.5$

No	Model	$q^2$	R	F <sub>hitung</sub> /F <sub>tabel</sub>
1	ASA_H, AM1_HF	0,694	0,850	3,967
2	AM1_HF, AM1_dipole, ASA_H	0,690	0,894	4,595
3	AM1_HF, AM1_E, ASA_H	0,755	0,880	3,970
4	AM1_HF, AM1_Eele, ASA_H	0,746	0,865	3,442
5	AM1_LUMO, AM1_HF, AM1_dipole, ASA_H	0,852	0,923	5,061
6	AM1_HOMO, ASA_H, AM1_dipole, AM1_HF	0,830	0,921	4,925

Dari ketiga parameter r, F<sub>hitung</sub>/F<sub>tabel</sub>, dan  $q^2$ , dipilih model prediktor terbaik yaitu yang paling mendekati persyaratan ketiga parameter tersebut yang merupakan kombinasi dari empat prediktor, yaitu AM1\_LUMO, AM1\_HF, AM1\_dipole, dan ASA\_H.

Untuk meningkatkan keabsahan data statistik, data harus divalidasi dengan melakukan validasi silang LOO (*Leave One Out*). Validasi silang dilakukan dengan menggunakan *software Molecular Operating Environment*, dengan menghitung nilai \$ZSCORE dari setiap senyawa. Nilai \$ZSCORE merupakan suatu nilai perbedaan absolut antara nilai model dan aktivitas observasi atau eksperimen, dibagi dengan

akar pangkat dua dari *mean square error* kumpulan data. Nilai \$ZSCORE yang  $\geq 2,5$  dianggap sebagai nilai pencilan, sehingga harus dieliminasi untuk meningkatkan kevalidan data statistik (Tutorial MOE 2007.09). Data nilai \$ZSCORE untuk 22 senyawa ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Nilai \$ZSCORE 22 Senyawa

No.	Senyawa	\$ZSCORE
1	10c	0,541
2	10g	1,073
3	10a	0,030
4	2	0,609
5	11e	1,362
6	11g	0,868
7	11h	0,106
8	11j	0,811
9	11l	0,193
10	11k	0,067
11	3	2,473
12	14b	1,363
13	19b	0,226
14	10i	1,265
15	11d	3,455
16	11f	2,508
17	10l	0,558
18	10m	0,319
19	11i	0,277
20	13a	3,369
21	13f	2,502
22	14c	0,055

Berdasarkan tabel 2 ditemukan bahwa senyawa 3, 11d, 11f, 13a, dan 13f memiliki nilai \$ZSCORE diatas 2.5, untuk itu, kelima senyawa ini dieliminasi dari perhitungan regresi multilinear. Persamaan HKSA terbaik ditentukan berdasarkan data yang ada, dengan parameter yang sudah memenuhi persyaratan statistik. Persamaan HKSA yang didapat adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = -15.077 (\pm 1.996) - 0.160 (\pm 0.055) AMI_{dipole} + 0.016 (\pm 0.004) AMI_{HF} + 0.521 (\pm 0.250) AMI_{LUMO} + 0.038 (\pm 0.005) ASA_H$$

dengan  $r^2 = 0,851$ ,  $F_{hitung}/F_{tabel} = 5,061$ , dan  $q^2 = 0,852$

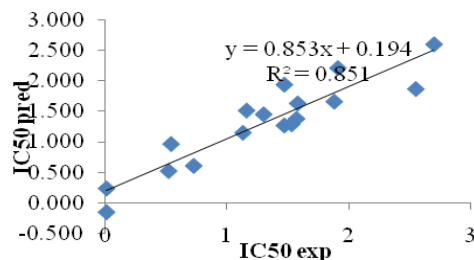
Dari persamaan HKSA terbaik, dapat diketahui bahwa aktivitas senyawa dipengaruhi oleh prediktor-prediktor antara lain momen dipol, energi LUMO, luas permukaan hidrofobik, dan panas pembentukan. Prediktor momen dipol dan energi LUMO dapat

digunakan sebagai parameter yang penting dalam desain senyawa baru, dimana penambahan suatu gugus penarik dan pendorong elektron akan mempengaruhi aktivitasnya. Dari persamaan dapat dilihat bahwa nilai energi momen dipol yang negatif, hal ini dapat ditafsirkan bahwa peningkatan momen dipol akan mampu meningkatkan aktivitas senyawa (menurunkan nilai  $IC_{50}$ ) sehingga dipilih senyawa-senyawa yang memiliki sifat keelektronegatifan besar dan bersifat elektrofilik sebagai substituen. Hal ini juga berkaitan dengan nilai energi LUMO yang positif, bahwa semakin kecil nilai energi LUMO maka kemungkinan terjadinya penyerangan elektrofilik semakin besar (Laguzzi et al. 1990). Untuk prediktor luas permukaan hidrofobik, nilai positif menyatakan bahwa semakin luas permukaan permukaan yang dapat diakses akan mengurangi aktivitas senyawa ini. Sedangkan nilai panas pembentukan yang positif berhubungan dengan energi bebas permukaan senyawa, bahwa semakin tinggi energi bebas permukaan maka semakin tidak stabil senyawa tersebut sehingga aktivitas akan menurun.

**Tabel 3.** Nilai  $IC_{50}$  prediksi dan eksperimen

No.	Senyawa	$IC_{50}$ eksperimen ( $\mu M$ ) (X)	$IC_{50}$ prediksi ( $\mu M$ ) (Y)
1	10c	1,47	1,939
2	10g	0,52	0,522
3	10a	1,47	1,270
4	2	0,725	0,606
5	11e	0,10	-0,153
6	11g	0,54	0,966
7	11h	1,16	1,514
8	11j	1,3	1,452
9	11l	1,57	1,379
10	11k	1,53	1,289
11	14b	0,10	0,236
12	19b	1,13	1,150

Setelah itu dilihat kedekatan antara nilai  $IC_{50}$  prediksi dengan  $IC_{50}$  hasil eksperimen dengan cara memplot kedua nilai tersebut, ditunjukkan oleh Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik hubungan nilai  $IC_{50}$  prediksi dan eksperimen.

Persamaan HKSA terbaik yang didapat digunakan untuk memprediksi nilai  $IC_{50}$  tiap senyawa berdasarkan nilai prediktor yang berpengaruh tersebut. Nilai dari  $IC_{50}$  hasil prediksi dapat dilihat pada Tabel 3.

Persamaan HKSA yang didapat menunjukkan hubungan antara empat prediktor yaitu momen dipol total (AM1\_dipole), panas pembentukan (AM1\_HF), energi LUMO (AM1\_LUMO), dan luas permukaan hidrofobik (ASA\_H) terhadap aktivitas dalam bentuk  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  sebagai indikator aktivitas dapat langsung digunakan analisis statistik karena data sebaran yang sudah cukup seragam dan baik secara statistik, sehingga tidak diperlukan perubahan ke dalam bentuk logaritma ( $\log IC_{50}$ ) karena membuat sebaran menjadi lebih acak (Hopkins 2008). Untuk melihat prediktor yang paling berpengaruh dapat ditentukan menggunakan *software SPSS Statistic 17.0* dengan melakukan analisis biavariansi yang hasilnya ditunjukkan oleh Tabel 4.

**Tabel 4.** Hubungan antara prediktor dan prediktor dengan  $IC_{50}$

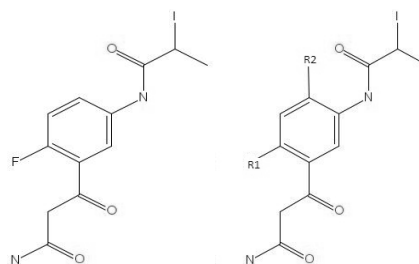
	A	B	C	D	E
$IC_{50}$	1	0,097	-0,201	-0,079	0,725
AM1_dipole		1	-0,378	0,086	0,494
AM1_HF			1	-0,051	-0,707
AM1_LUMO				1	-0,180
ASA_H					1

Dengan A adalah  $IC_{50}$ , B adalah AM1\_dipole, C adalah AM1\_HF, D adalah AM1\_LUMO, dan E adalah ASA\_H. Dari Tabel 4 dinyatakan bahwa prediktor yang memberikan kontribusi paling tinggi terhadap  $IC_{50}$  adalah ASA\_H atau luas permukaan hidrofobik senyawa dengan koefisien korelasi 0,725. Setelah ASA\_H, HF merupakan prediktor kedua yang paling memberikan kontribusi terhadap  $IC_{50}$ . Prediktor ASA\_H dan HF juga saling memberikan kontribusi yang tinggi satu sama lain dibandingkan dengan prediktor lainnya.

Desain senyawa baru dilakukan dengan cara penambahan substituen pada senyawa agar diharapkan mampu menghasilkan senyawa baru yang memiliki aktivitas yang lebih baik. Cara substitusi sendiri dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan penambahan substituen, pemanjangan rantai, simplifikasi struktur, ekspansi cincin, dan rigiditas. Dalam desain senyawa baru ini dilakukan metode substitusi dengan penambahan substituen, substituen dipilih dengan menggunakan pendekatan skema Topliss untuk substitusi aromatik dan kombinasi dua substituen X dan Y pada posisi yang berbeda-beda. Digunakan sembilan macam substituen yaitu  $-Cl$ ,  $-$

$NH_2$ ,  $-CH_3$ ,  $-OCH_3$ ,  $-C_4H_9$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-F$ , dan  $-CF_3$ .

Senyawa induk yang dipilih merupakan salah satu dari seri senyawa analog turunan benzoilurea yang digunakan yang tidak tereliminasi dengan pertimbangan utama yaitu memiliki  $IC_{50}$  yang paling rendah. Senyawa 14b dipilih sebagai senyawa induk dengan  $IC_{50}$  sebesar 0,1  $\mu M$ , yang strukturnya dapat dilihat di gambar 2.



**Gambar 2.** Struktur senyawa induk 14b dan posisi substitusi.

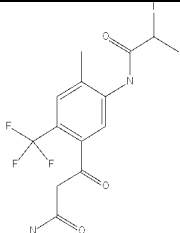
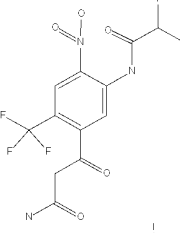
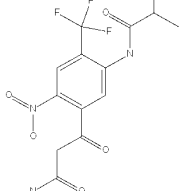
Pada senyawa induk, substitusi dapat dilakukan di cincin benzen pada posisi R1 dan R2 seperti pada gambar 5. Pemilihan tempat substitusi tersebut didasari pada hasil penelitian mengenai hubungan struktur dan aktivitas eksperimen, dimana penambahan gugus pendonor atau penarik elektron pada posisi tersebut memiliki pengaruh yang cukup signifikan pada aktivitas dan efek elektronik senyawa.

Total desain senyawa baru adalah 124 senyawa. Semua senyawa tersebut kemudian dioptimasi dengan *software HyperChem 8.0.3* dengan metode yang sama saat optimasi di awal yaitu *ab initio* Basis minimal, STO-3G dengan batas pengulangan (*iteration*) 100 dan batas keterpusatan (*convergence*) 0,01. Setelah optimasi nilai prediktor kembali dihitung menggunakan *software MOE 2007.09*. Nilai-nilai prediktor ini lalu dimasukkan kedalam persamaan HKSA terbaik yang sudah diperoleh sehingga ditemukan nilai  $IC_{50}$  prediksi untuk masing-masing senyawa. Dari 124 senyawa baru yang didesain, hanya ditemukan 3 senyawa yang memiliki nilai  $IC_{50}$  prediksi yang lebih rendah dibanding  $IC_{50}$  senyawa induk 14b (0.1  $\mu M$ ), ditunjukkan oleh Tabel 5.

Dalam tabel dapat dilihat bahwa penambahan substituen-substituen penarik elektron atau elektrofilik memiliki signifikansi dalam peningkatan aktivitas, hal ini sesuai dengan persamaan HKSA yang didapat bahwa aktivitas dipengaruhi oleh salah satunya adalah momen dipol, dimana aktivitas akan meningkat dengan meningkatnya momen dipol yang ditandai dengan harga prediktor AM1\_dipole yang negatif. Penambahan gugus penarik elektron juga berdampak

pada nilai prediktor AM1\_LUMO, dimana energi LUMO yang kecil akan meningkatkan kemungkinan terjadinya penarikan elektron.

**Tabel 5.** Senyawa Baru dan IC<sub>50</sub> Masing-Masing Senyawa

Senyawa Baru	Struktur	IC <sub>50</sub> eksperimen (μM)
A		0,00788
B		0,00192
C		0,00399

Tiga senyawa yang memiliki aktivitas lebih tinggi daripada senyawa induk kemudian diperkirakan interaksinya dengan reseptor dengan cara *docking*. Ligan yang digunakan adalah senyawa A, B, C, dan senyawa induk sebagai standar. Sedangkan target adalah reseptor beta tubulin dengan *pdb code* 1JFF. *Docking* dilakukan dengan menggunakan program *Arguslab 4.0.1* dan *Autodock Vina 1.5.4 revision 30*.

Hasil yang diberikan melalui *docking* dengan menggunakan program *Arguslab 4.0.1* berupa energi bebas ( $\Delta G$ ) dan profil ikatan hidrogen yang terbentuk berupa jumlah dan jarak ikatan dalam Angstrom, yang ditunjukkan oleh Tabel 11. Ukuran binding box yang digunakan adalah X = 53 Y= 57 Z= 57 dengan resolusi 0,4 Angstrom.

Suatu senyawa dikatakan memiliki interaksi lebih baik jika memiliki nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) yang lebih rendah, sehingga dikatakan interaksi ikatan antara ligan dan reseptor lebih stabil. Sedangkan jumlah dan jarak ikatan hidrogen berpengaruh pada kekuatan afinitas ikatan antara ligan dan reseptor. Ikatan hidrogen dapat terjadi jika jarak antara atom donor

dan atom akseptor lebih pendek dari jumlah jari-jari atomik atom akseptor ( $\pm 1,5 \text{ \AA}$ ), jari-jari atomik hidrogen ( $1,2 \text{ \AA}$ ), dan panjang ikatan antara atom donor dan hidrogen ( $\pm 1 \text{ \AA}$ ) atau sekitar  $3,5 \text{ \AA}$ . Jarak yang lebih panjang dari  $3,5 \text{ \AA}$  dianggap sebagai interaksi dipol-dipol. Ikatan hidrogen yang baik memiliki jarak  $\pm 2,8 \text{ \AA}$ .

**Tabel 6.** Profil Ikatan Hidrogen dan Energi Bebas Senyawa Baru dengan Reseptor Beta Tubulin

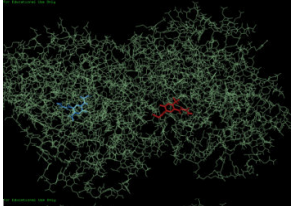
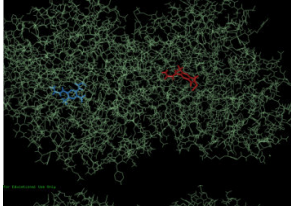
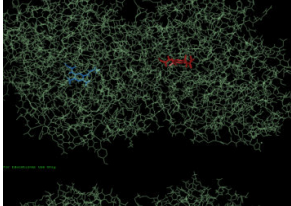
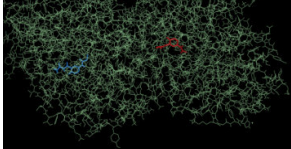
Senyawa	$\Delta G$ (Kcal/mol)	Jumlah Ikatan Hidrogen
A	-9,09968	2
B	-8,55321	6
C	-8,54442	7
Induk	-8,66573	6

*Docking* tahap selanjutnya dilakukan menggunakan *software Autodock Vina* untuk melihat parameter energi afinitas dan nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). *Docking* dengan menggunakan program ini memiliki keuntungan karena program akan otomatis mencari dimana *binding site* yang paling baik untuk suatu ligan sehingga disebut juga dengan istilah *blind docking*. Ukuran box yang digunakan adalah X = 45, Y = 58, dan Z = 60. Visualisasi hasil *docking* dilakukan dengan menggunakan *software PyMOL Molecular Graphic System version 1.1 eval*. Hasil *docking* dengan *Autodock* untuk senyawa baru dapat dilihat pada Tabel 7.

Dari Tabel 7 dapat dilihat hasil visualisasi *docking* ligan senyawa pada reseptor protein beta tubulin (hijau). Ligan yang ditunjukkan dengan warna merah merupakan posisi ligan setelah *docking* yang merupakan posisi paling stabil, dan warna biru merupakan posisi ligan sebelum *docking*. Afinitas yang diambil adalah nilai afinitas pada mode terbaik dengan nilai RMSD = 0,000.

Dalam kajian interaksi antara ligan dan reseptor ini dapat dilihat bahwa afinitas senyawa C paling baik dengan ikatan yang cukup stabil walaupun tidak sebaik senyawa induk, sedangkan senyawa A memiliki energi ikatan yang paling stabil, walaupun afinitasnya tidak sebaik senyawa induk. Pada kenyataannya, kemampuan berikatan suatu ligan dan reseptor tidak hanya dipengaruhi oleh ikatan hidrogen saja, tetapi juga adanya interaksi elektrostatik, hidrofobik, dan van der waals dan faktor-faktor sterik, sehingga hasil dari molekular *docking* ini merupakan tahap awal untuk melihat kemampuan dan kebolehhadiah berikatan antara ligan senyawa dengan reseptornya.

**Tabel 7.** Profil Afinitas Senyawa Baru Dengan Reseptor Beta Tubulin

Senyawa	Afinitas (Kcal/mol)	Hasil Docking Autodock
A	-7,0	
B	-7,2	
C	-7,5	
Induk	-7,2	

Laguzzi G, Bucci R, Grandinetti F, Speranza M, 1990, Gas-phase heteroaromatic substitution. 8. Electrophilic attack of ethyl cation on pyrrole, N-methylpyrrole, furan, and thiophene, *J. Am. Chem. Soc.* 11(2): 3064-3068.

Qubinyi H, 1993, Hansch Analysis and Related Approaches, In: Mannhold R, Krogsgaard-Larsen P, Timmerman H. (Eds.), VCH, Weinheim, 23-29.

Scheffler WC, 1987, Statistika untuk biologi, farmasi, kedokteran, dan ilmu yang bertautan, terjemahan Suroso, Penerbit ITB, Bandung, 170-182.

Song DQ, 2008, Benzoylurea Derivatives as a Novel Class of Antimitotic Agents: Synthesis, Anticancer Activity, and Structure-Activity Relationships, *J. Med. Chem.* 51(11): 3094-103. doi: 10.1021/jm070890u.

## Kesimpulan

Persamaan HKSA terbaik yang menggambarkan hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas senyawa turunan 3-haloasilamino benzoilurea adalah  $IC_{50} = -15,077 (\pm 1,996) -0,160 (\pm 0,055) AM1\_dipole + 0,016 (\pm 0,004) AM1\_HF + 0,521 (\pm 0,250) AM1\_LUMO + 0,038 (\pm 0,005) ASA\_H$ . Dari 124 senyawa baru yang berhasil didesain ditemukan 3 senyawa yang memiliki aktivitas lebih tinggi daripada senyawa induk yang ditandai dengan nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil, yaitu senyawa A, B, dan C.

## Daftar Pustaka

Hopkins WG, 2008, Bayesian analysis. In: A New View of Statistics, <http://www.sportsci.org/resource/stats/modelsdetail.html#hetero>. (Diakses pada 28 April 2012)