

Sintesis 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai Agen Antikanker

(Synthesis of 1-(4-methoxybenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil as anticancer agent)

Ifada¹, Ayik Rosita Puspaningtyas¹, Ika Oktavianawati², Yuni Retnaningtyas¹, Nia Kristiningrum¹

¹. Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jember

². Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Jember

e-mail korespondensi : ifadaonly7@gmail.com

Abstract

A new compound from 5-fluorouracil (5-FU) derivatives, 1-(4-methoxybenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil has been synthesized in a two steps reaction, alkylation (5-FU and formaldehyde to form 1-hydroxymethyl-5-fluorouracil) and esterification (1-hydroxymethyl-5-fluorouracil and 4-methoxybenzoylchloride to form 1-(4-methoxybenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil). Reaction product purified by chromatography column, the product has been characterized for physical appearance is a yellowish white, crystal and melting range 168-169°C. Based on the FTIR and ¹H-NMR spectra, it showed that the purified product does not contain a single compound. This fact is supported by Thin Layer Chromatography (TLC) result showing two spots for the presence of 1-(4-methoxybenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil and 4-methoxybenzoate acid.

Keywords: 5-fluorouracil derivatives, anticancer, 1-(4-methoxybenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil, benzoylation.

Abstrak

Sebuah senyawa baru dari turunan 5-fluorourasil, 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil disintesis melalui dua tahap yaitu, alkilasi (5-FU dan formaldehid untuk membentuk 1-hidroksimetil-5-fluorourasil) dan esterifikasi (1-hidroksimetil-5-fluorourasil dan 4-metoksibenzoilklorida untuk membentuk 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil). Produk sintesis dimurnikan dengan kromatografi kolom, produk tersebut dikarakterisasi sifat fisika memiliki warna putih kekuningan, berbentuk kristal dan jarak lebur 168-169°C. Berdasarkan spektra FTIR dan ¹H-NMR, itu menunjukkan bahwa produk hasil pemurnian bukan senyawa tunggal. Hal ini didukung oleh hasil KLT menampilkan dua noda yaitu 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan asam 4-metoksibenzoat.

Kata kunci: turunan 5-fluorourasil, antikanker, 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, benzoilasi.

Pendahuluan

Kanker merupakan suatu penyakit pertumbuhan sel, yang terjadi karena adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Kerusakan sel yang terjadi dapat disebabkan oleh kelainan kongenital, karsinogen dan lingkungan hidup [1]. Menurut data WHO tahun 2008, kanker merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia, terhitung 7,6 juta kematian (sekitar 13% dari

seluruh kematian) pada 2008. Kasus tersebut diproyeksikan akan terus meningkat, dengan 13,1 juta kematian diperkirakan pada tahun 2030. Berdasarkan fakta yang terjadi mengenai perkembangan kanker yang sangat pesat maka dilakukan pengembangan obat untuk menangani penyakit kanker, dengan tujuan memperoleh obat dengan aktivitas yang lebih tinggi, toksisitas lebih rendah dan bekerja lebih selektif [2].

Salah satu obat yang sering digunakan dalam pengobatan kanker yaitu 5-Fluorourasil (5-FU) karena jarang menimbulkan efek samping. 5-FU merupakan suatu analog pirimidin (antimetabolit) yang mempunyai satu atom fluorin (F) yang stabil sebagai pengganti atom hidrogen pada posisi 5 cincin urasil [3, 4, 5].

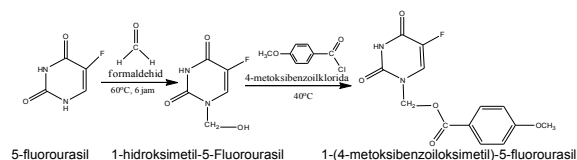
Beberapa penelitian telah dilakukan modifikasi 5-Fu di N-1 dan/atau N-3 untuk meningkatkan aktivitas diantaranya serangkaian modifikasi 5-Fu yang disubstitusikan asam amino, peptida, ester, fosfolipid, dan polimer [6, 7].

Pada penelitian terdahulu yaitu Tian et al. [6] telah dilakukan sintesis beberapa turunan 5-FU, namun senyawa hasil sintesis tidak menunjukkan aktivitas antikanker yang lebih tinggi dari 5-FU, hal ini dikarenakan $\log P > 2$. Berdasarkan hal tersebut peneliti mensintesis senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil yang merupakan turunan dari 5-fluorourasil dengan modifikasi rantai samping pada posisi N-1 dengan gugus yang lebih sederhana. Sintesis senyawa dilakukan dengan memodifikasi berdasarkan parameter hubungan struktur kimia dan aktivitas biologi (HKSA) secara teoritis.

Modifikasi dilakukan dengan mensubstitusikan gugus yang lebih bersifat nonpolar tanpa menghilangkan gugus aktifnya [8]. Salah satu caranya adalah dengan penambahan gugus benzen untuk meningkatkan lipofilitasnya sehingga diharapkan dapat dengan mudah menembus dinding sel. Penambahan gugus yang bersifat penarik elektron lebih kuat daripada hidrogen (-H) dengan menunjukkan efek induksi negatif yaitu metoksi (-OCH₃) digunakan untuk meningkatkan parameter elektronik yang berperan dalam interaksi obat-reseptor dan nantinya dapat memberikan respon biologis [9]. Substitusi gugus metoksi (-OCH₃) dilakukan pada posisi -para agar dapat memberikan pengaruh sifat sterik dari molekul obat sehingga dapat memperpanjang kerja obat dalam tubuh. Sel target dari 5-FU adalah DNA, maka kombinasi 5-FU dengan beberapa pengikat DNA antineoplastik umumnya melalui ikatan ester [2].

Senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil disintesis dengan metode reaksi benzoilasi untuk membentuk ester. Sintesis Tian dimana pada tahap pertama dilakukan dengan cara menambahkan formaldehid pada 5-Fluorourasil untuk membentuk 1-hidroksimetil-5-

Fluorourasil. Kemudian pada tahap kedua, senyawa 1-hidroksimetil-5-Fluorourasil direaksikan dengan asam karboksilat untuk membentuk ester. Namun penambahan asam karboksilat mempunyai kelemahan karena diperlukan katalis yaitu *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) dan *N,N'*-dimethylpyridin-4-amine (DMAP) yang pada akhir reaksi sulit untuk dipisahkan dari produk. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini sintesis pada tahap kedua yaitu esterifikasi dilakukan dengan penambahan derivat benzoilklorida yang sangat reaktif sehingga tidak memerlukan katalis selama reaksi (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi pembentukan senyawa 1-(4-metoksi benzoiloksimetil)-5-fluorourasil menggunakan derivat benzoilklorida

Pada penelitian ini hasil sintesis yang telah dimurnikan menggunakan kromatografi kolom kemudian dikarakterisasi yang meliputi uji organoleptis (warna dan bentuk), uji kemurnian dengan jarak lebur, serta identifikasi struktur dengan menggunakan *Fourier Transform InfraRed* (FTIR), *1H-Nuclear Magnetic Resonance* (1H-NMR).

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: seperangkat alat gelas (Pyrex), satu set alat refluks, mikropipet (Blaubrand® IntraEnd), stirer, neraca analitik digital (Sartorius), Electrothermal melting point apparatus Stuart SMP11, Agilent Technologies ¹HNMR 400 Hz, FTIR Shimadzu Type IRPrestige-21, lampu Ultra Violet (UV), Densitometer CAMAG, kamera digital.

Bahan yang digunakan antara lain: 5-fluorourasil (Merck) dan p-metoksibenzoil klorida (Merck), formaldehid (s.a.p), HCl (Sigma Aldrich), aseton (Merck), natrium bikarbonat (NaHCO₃), natrium sulfat anhidrat (s.a.p) (Na₂SO₄), etil asetat (J.T Blaker), heksan p.a (RDH), trietilamin (TEA) dan aquades, lempeng KLT Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

Sintesis

Sintesis senyawa 1-(4-metoksi benzoiloksimetil)-5-Fluorourasil dilakukan

menggunakan reaksi benzoilasi untuk membentuk ester, melalui 2 tahap. Pada tahap pertama dilakukan dengan mereaksikan 5-FU (0,0812 g, 0,625 mmol) dengan formaldehid (37%, 0,9687 mmol, 0,072 ml) dan 1,25 ml aquades pada labu alas bulat, yang kemudian direfluks pada suhu 60°C selama 6 jam untuk menghasilkan senyawa 1-hidroksimetil-5-fluorourasil. Hasil refluks diuapkan pada suhu kamar sampai pelarutnya habis, kemudian dilarutkan dengan 12,5 ml aseton dalam labu alas bulat [6].

Pada tahap kedua senyawa 1-hidroksimetil-5-fluorourasil yang telah dilarutkan dalam aseton ditambahkan 0,1 ml (0,6875 mmol) trietilamin. Selanjutnya dilakukan penambahan 4-metoksibenzoil klorida (0,0931 ml, 0,6875 mmol) dalam 5 ml aseton. Setelah pereaksi selesai ditambahkan, campuran dalam alas bulat direfluks pada suhu 40°C selama 6 jam.

Hasil refluks tahap 2 diuapkan sampai pelarutnya habis, kemudian ditambahkan 2,5 ml aquades dan 7,5 ml etil asetat maka akan terbentuk dua fase (fase minyak dan air). Kedua fase tersebut dicuci dengan ditambahkan HCl pH 3-4 dan NaHCO₃ pH 7-8. Fase organik yang tersisa diambil dan ditambahkan Natrium Sulfat anhidrat (Na₂SO₄). Selanjutnya, fase organik diuapkan pada suhu kamar, residu yang tersisa dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen heksana p.a : aseton dengan komposisi 6:4.

Karakterisasi hasil sintesis

Uji organoleptis, dilakukan dengan mengamati warna dan bentuk secara visual.

Uji kemurnian dengan uji jarak lebur, dengan menggunakan alat Electrothermal melting point apparatus Stuart SMP11. Senyawa hasil sintesis dimasukkan dalam pipa kapiler pada ujung yang terbuka. Selanjutnya zat dipadatkan sampai panjang 0,3-0,5 cm. Pipa kapiler yang telah diisi zat dimasukkan dalam Melting Point Apparatus Stuart SMP 11. Alat diatur supaya temperatur naik secara perlahan-lahan. Temperatur dicatat pada saat senyawa mengalami perubahan wujud dari serbuk menjadi cair mulai meleleh sampai meleleh sempurna. Suatu senyawa yang cukup murni harus memiliki rentang jarak lebur 1-2°C [10].

Identifikasi struktur senyawa menggunakan FTIR KBr

Identifikasi gugus fungsi menggunakan alat menggunakan spektrofotometer inframerah

Shimadzu FT-IR. maksimal bilangan gelombangnya adalah 4000 – 400 cm⁻¹. Untuk pengujian sampel padat maka dilakukan dengan pembuatan pellet KBr terlebih dahulu. Serbuk KBr ditimbang 100 mg. Sampel (bebas air) ditimbang 1-2mg. Serbuk KBr dan sampel dicampur dalam mortal agate, kemudian digerus sampai halus dan tercampur rata. Siapkan cetakan pellet, kemudian bagian sample base dan tablet frame dicuci dengan kloroform. Masukkan campuran dalam set cetakan pellet. Untuk meminimalkan kadar air maka cetakan pellet dihubungkan dengan pompa vacum. Pompa vacum tersebut dioperasikan selama 5 menit. Cetakan diletakkan pada pompa hidrolik, kemudian diberi tekanan sampai tanda 80. Setelah selesai pompa vacum dimatikan, kemudian tekanan diturunkan dalam cetakan dengan cara kran udara dibuka. Pellet KBr yang sudah terbentuk diletakkan pada tablet holder, kemudian dilakukan pengukuran dengan alat FTIR [11].

Identifikasi struktur senyawa menggunakan ¹H-NMR 400 Hz

Identifikasi struktur menggunakan alat Agilent Technologies 1H-NMR 400Hz pelarut yang digunakan aseton-d₆ (D₃CCOCD₃) dan TMS (tetrametilsilina) sebagai standar internal. Prosedur pengujiannya adalah menimbang 5-10 mg sampel dan dimasukkan ke dalam vial yang bersih dan kering. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL pelarut aseton-d₆ yang mengandung TMS. Sampel yang telah larut ditransfer menggunakan pipet pasteur ke dalam penyaring pipet pasteur yang ditempatkan dalam tube NMR. Gunakan penggaris untuk menyesuaikan volume terhadap panjang kolom yang benar. Kemudian tutup tube NMR dan nyalakan NMR untuk mengetahui spektra dari sampel [12].

Hasil Penelitian

Karakterisasi organoleptis meliputi bentuk dan warna dari senyawa produk sintesis. Senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil memiliki bentuk serbuk kristal yang berwarna putih kekuningan.

Setelah dilakukan uji organoleptis, kemudian dilakukan uji jarak lebur. Berdasarkan pengujian jarak lebur pada produk sintesis diketahui memiliki jarak lebur antara 168-169°C.

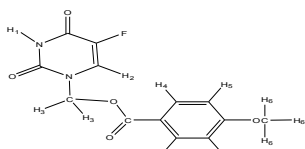
Identifikasi gugus fungsi menggunakan alat spektrofotometer inframerah FTIR Shimadzu Type IRPrestige-21 yaitu FTIR. Interpretasi spektrum yang muncul kemudian

dibandingkan dengan literatur. Perbandingan spektra produk hasil sintesis dengan teoritis ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Interpretasi spektra IR hasil produk berdasarkan literatur [3]

| Tipe vibrasi | Frekuensi secara teoritis (cm ⁻¹) | Frekuensi produk hasil sintesis (cm ⁻¹) |
|------------------------|---|---|
| Substitusi <i>para</i> | 850-800 | 832 |
| C=O amida | 1680-1630 | - |
| C=O ester | 1740-1715 1600-1450 | 1738 1513 |
| C=O karboksilat | 1730-1700 | 1713 |
| C-F | 1400-1000 | 1264 |
| -OH | 3400-3200 | 3421 |
| Ar-OCH ₃ | 1300-1000 | 1264-1017 |

Setelah dilakukan identifikasi dengan Spektroskopi IR, kemudian diidentifikasi dengan spektroskopi ¹H-NMR 400 Hz. Senyawa produk terlebih dahulu dilarutkan dalam aseton terdeuterasi (D₃CCOCD₃). Karakteristik spektra ¹H-NMR antara hasil percobaan, hasil *software ChemBio Office 2008* dan literatur ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 2.



Gambar 2. Kemungkinan struktur produk

Tabel 2. Karakteristik spektra ¹H-NMR antara hasil percobaan, hasil *software ChemBio Office 2008* dan literatur [13, 14]

| Proton dari gugus | Pergeseran kimia (ppm) hasil percobaan | Pergeseran kimia (ppm) hasil ChemBio Office 2008 | Pergeseran kimia (ppm) dari literatur | Multiplicitas |
|-------------------|--|--|---------------------------------------|---------------|
| H ₁ | 10,638 | 10,0 | 10,0 | Singlet |
| H ₂ | 8,040-8,060 | 8,04 | 6,35 | Doblet |
| H ₃ | 5,914 | 6,12 | 1,2 - 6,0 | Singlet |
| H ₄ | 7,031-7,057 | 6,80 | 6,5 - 8 | Doblet |
| H ₅ | 7,120-7,145 | 7,10 | 6,5 - 8 | Doblet |
| H ₆ | 3,892-3,944 | 3,83 | 3,5 - 4,5 | Singlet |

Pembahasan

Jumlah perbandingan rasio proton dihitung karena menunjukkan jumlah atom H

dalam senyawa yang diujikan. Dari hasil perhitungan berdasarkan nilai area dibawah puncak. Jumlah perbandingan rasio proton adalah 21, hal ini tidak sesuai dengan senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil yang memiliki rumus molekul C₁₃H₁₁FN₂O₅. Hal ini dikarenakan fraksi yang diidentifikasi tidak murni ditandai munculnya beberapa noda pada lempeng KLT hasil eluasi meskipun setelah dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom, noda yang tampak yaitu noda produk dan noda asam 4-metoksibenzoat.

Adanya senyawa asam 4-metoksibenzoat dalam hasil produk sintesis dikarenakan penggunaan aseton selama sintesis, dimungkinkan aseton mengandung air karena bukan merupakan asetonitril kering. Hal inilah yang menyebabkan 4-metoksibenzoiloksimetil berubah menjadi 4-metoksibenzoat, karena turunan benzoiloksimetil sangat reaktif. Senyawa produk letaknya sangat dekat dengan asam 4-metoksibenzoat serta setelah dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom namun keduanya tidak dapat terpisahkan. Hal ini terjadi karena adanya ikatan antara karbonil dari ester (senyawa produk) dengan gugus penarik elektron (-OCH₃) yang bersifat elektronegatif pada senyawa asam 4-metoksibenzoat bahkan sebaliknya terjadi ikatan antara karbonil dari senyawa 4-metoksibenzoat dengan gugus penarik elektron (-OCH₃) dari senyawa produk, hal ini menjelaskan senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sulit pisah dengan senyawa asam 4-metoksibenzoat sehingga pada spektra ¹H-NMR hasil produk sintesis terjadi peningkatan.

Pernyataan tersebut dapat diperkuat dengan melihat nilai area di bawah puncak -CH₂ yang sangat kecil yaitu 0,45 jika dibandingkan dengan -OCH₃ yang bernilai 4,87. Karena jumlah asam 4-metoksibenzoat dalam produk sintesis berlebih maka ikatan -CH₂ berlangsung secara lemah. Serta adanya pita air yang muncul pada spektra produk sintesis, maka kemungkinan terjadinya tautomerisasi dalam senyawa produk sehingga jumlah proton menjadi berlebih. Tautomerisasi yang terjadi pada senyawa produk sintesis yaitu perubahan gugus keton pada struktur 5-FU, karena adanya air yang menyumbangkan proton maka berubah menjadi bentuk alkohol vinilik (enol) [15].

Simpulan dan Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik beberapa kesimpulan, senyawa 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dapat disintesis melalui reaksi benzoilasi untuk membentuk ester, namun senyawa yang dihasilkan tidak murni. Organoleptis dari produk hasil sintesis merupakan serbuk kristal jarum yang berwarna putih kekuningan. Jarak lebur dari senyawa tersebut yaitu 168-169°C. Berdasarkan spektra yang dihasilkan FTIR dan ¹H-NMR menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah 1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil yang tidak murni.

Untuk penelitian lebih lanjut, penulis menyarankan perlu dilakukan optimasi metode supaya didapatkan hasil yang diinginkan, cara pemurnian yang lebih modern sehingga produk dapat dipisahkan dari hasil samping.

Daftar Pustaka

- [1] Sukardja IGD. *Onkologi Klinik edisi2*. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
- [2] Siswandono, Soekardjo B. *Prinsip-prinsip Rancangan Obat*. Surabaya: Airlangga University Press; 1998.
- [3] Siswandono dan Soekardjo B. *Kimia Medisinal*. Jilid 2 Edisi ke-2. Surabaya: Airlangga University Press; 2000b.
- [4] Mycek M J, Harvey R.A. dan Champe PC. 2007. *Farmakologi Ulasan Bergambar. Edisi 2*. Jakarta: Widya Medika.
- [5] Zhang N, Yin Y, Xu S-J, and Chen W-S. 5-Fluorouracil : Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*. 13, 1551-1569; 2008.
- [6] Tian ZY, Du GJ, Xie SQ, Zhao J, Ghao W Y, Wang CJ. Synthesis and Bioevaluation of 5-

Fluorouracil Derivatives. *Molecules*, 12, 2450-2457; 2007.

- [7] Dominguez JF, Marchal JA, Correa A, Carillo E, Boulaiz H, Aranega A, Gallo M A, and Espinosa A. Synthesis and Evaluation of New 5-Fluorouracil Antitumor Cell Differentiating Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:315–323; 2003.
- [8] Hanafi M., Anita Y, Putra AMJ, Darmawan A, Artanti N, Linar Z. Udin. Pengaruh Peningkatan Lipofilisitas Pada Senyawa Analog UK-3A Dalam Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker P-388. *JKTI*, Vol. 11 (01); 2009.
- [9] Siswandono dan Soekardjo B. *Kimia Medisinal*. Jilid 1 Edisi ke-2. Surabaya: Airlangga University Press; 2000a.
- [10] Bell CE. *Organic Chemistry Laboratory: Standard and Microscale Experiments* 2nd edition. San Diego: Saunders College Publishing; 1997.
- [11] Furriss BS, Hannaford AJH, Smith PWG, and Tatchell AR. *Vogel's textbook of practical organic chemistry 5th ed*. New York : John Wiley&Sons Inc; 1989.
- [12] Stall AMS, Gaddis BA, dan Davelinger ML. *Microscale and Miniscale Organic Chemistry Laboratory Experiments*. USA : Mc Graw Hill Companies Inc; 2000.
- [13] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. *Introduction of Spectroscopy, 3rd Ed*. USA: Thomson Learning Inc; 2001.
- [14] Anderson RJ, Bendell DJ, and Groundwater, PW. *Organic Spectroscopic Analysis*. Sunderland : University of Sunderland; 2004.
- [15] Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P. *Organic Chemistry*. New York: Oxford University Press; 2001.