

Studi Aktivitas Antioksidan Senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan Metode *Molecular Docking* dan Metode DPPH

(*Antioxidant Activity of 1-(p-chlorobenzoyloxymethyl)-5-Fluorouracyl Using Molecular Docking and DPPH Method*)

Brahmansyah Diar Rosiarto, Ayik Rosita Puspaningtyas, Diana Holiday

Fakultas Farmasi Universitas Jember

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

e-mail korespondensi: sketsaboydiar@gmail.com

Abstract

Cellular damage caused by reactive oxygen species (ROS) free radical and antioxidant activity has an important role as free radical scavenging in body. This study was carried out to evaluate *in vitro* antioxidant and ligand affinity toward human ROS receptor (PDB code: 3ZBF). In DPPH method, 1-(*p*-chlorobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil dissolved in ethyl acetate, while 5-fluorouracil and ascorbic acid as standard dissolved in methanol. The free radical scavenging activity was measured spectrometrically with maximum wavelength at 512 nm. DPPH method show that ascorbic acid have strong antioxidant activity ($IC_{50} = 19.092$ ppm), while 1-(*p*-chlorobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil ($IC_{50} = -2,500,245$ ppm) and 5-fluorouracil ($IC_{50} = -4,998$ ppm) have not antioxidant activity. Molecular docking (*in silico*) toward human ROS receptor was indicate 1-(*p*-chlorobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil ($K_i = -6.2 \pm 0.04$ kkal/mol) has best activity than ascorbic acid ($K_i = -4.8 \pm 0.19$ kkal/mol) and 5-fluorouracil ($K_i = -4.6 \pm$ kkal/mol).

Keywords: 1-(*p*-chlorobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil, 5-Fluorouracyl, antioxidants, DPPH, molecular docking

Abstrak

Kerusakan sel disebabkan oleh radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) dan aktivitas antioksidan mempunyai peran penting sebagai pengikat radikal bebas di dalam tubuh. Studi ini dilakukan untuk menguji antioksidan secara *in vitro* dan afinitas ligan terhadap reseptor ROS pada manusia (kode PDB : 3ZBF). Pada metode DPPH, 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dilarutkan dalam etil asetat, sedangkan 5-fluorourasil dan asam askorbat yang digunakan sebagai standar dilarutkan dalam metanol. Aktivitas pengikatan radikal bebas yang diukur menggunakan spektrofotometer, dengan panjang gelombang maksimum pada 512 nm. Metode DPPH menunjukkan bahwa asam askorbat memiliki aktivitas antioksidan yang kuat ($IC_{50} = 19,092$ ppm), sedangkan 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ($IC_{50} = -2.500.245$ ppm) dan 5-fluorourasil ($IC_{50} = -4.998$ ppm) tidak memiliki aktivitas antioksidan. Pada docking molekuler (*in silico*) pada reseptor ROS manusia mengindikasikan 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ($K_i = -6,2 \pm 0,04$ kkal.mol) memiliki aktivitas terbaik dibandingkan dengan asam askorbat ($K_i = -4,8 \pm 0,19$ kkal/mol) dan 5-fluorourasil ($K_i = -4,6 \pm$ kkal/mol).

Kata kunci: 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, 5-Fluorourasil, antioksidan, DPPH, docking molekuler

Pendahuluan

Radikal bebas adalah setiap molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat reaktif dan dengan mudah menjadi reaksi yang tidak terkontrol, menghasilkan ikatan silang (*cross-link*) pada DNA, protein, lipida atau kerusakan oksidatif pada gugus fungsional yang penting pada biomolekul. Radikal bebas juga berperan dalam patologi dari berbagai penyakit degeneratif yakni kanker, aterosklerosis, rematik, jantung koroner, katarak, dan penyakit degeneratif saraf seperti parkinson [1]. Salah satu bentuk dari radikal bebas adalah ROS. ROS (*reactive oxygen species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang menyebabkan mutasi DNA dan selanjutnya bisa memicu terjadinya kanker sehingga dalam hal ini antioksidan sangat diperlukan untuk mencegah atau menghambat terjadinya reaksi oksidasi berantai dari ROS [2].

Antioksidan merupakan zat yang dapat mencegah atau menghambat terjadinya reaksi oksidasi berantai pada suatu molekul [3]. Zat antioksidan mempunyai kemampuan untuk menstabilkan atau mendeaktivasi radikal bebas sebelum menyerang sel sehingga zat ini sangat penting untuk melindungi sel dari kerusakan [4].

Senyawa 5-Fluorourasil (5-Fu) merupakan obat antikanker yang telah lama digunakan dan disintesis pertama kali pada tahun 1957 [5]. Di berbagai negara, kemoterapi 5-Fluorourasil telah digunakan secara luas untuk terapi kanker payudara, kanker kolorektal, kanker pankreas, dan kanker lambung [6].

Pada penelitian Christova (2003) menyatakan bahwa 5-Fu tidak menginduksi aktivitas HO sebagai agen penghasil ROS. Beberapa penelitian lainnya menunjukkan obat antikanker salah satu mekanisme harus memiliki jalur penghambatan ROS (antioksidan). Pengembangan 5-Fu telah dilakukan dengan mensintesis 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil [7].

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan sintesis 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan diuji sitotoksik dimana aktivitasnya lebih tinggi daripada 5-Fu sendiri. Nilai IC₅₀ 5-Fu sebesar 2517,268 μ M dan turunan 5-Fu (1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil) sebesar 215,978 μ M, namun belum memiliki data efek farmakologi sebagai antioksidan untuk menekan *human* ROS (radikal bebas di dalam tubuh manusia) [8]. Pada penelitian ini dilakukan uji antioksidan senyawa

1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil secara *in vitro* (biologis) dengan metode DPPH dan prediksi afinitas dengan molekuler *docking*. Molekuler *docking* 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dilakukan dengan program *Autodock* dengan reseptor *Human ROS1* pada sel kanker manusia.

Metode Penelitian

Studi aktivitas antioksidan senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember pada April 2013 sampai selesai.

Bahan yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dalam penelitian ini adalah: metanol p.a 90% (Sigma Aldrich), etil asetat p.a (Sigma Aldrich), DPPH (Sigma Aldrich), curasil (Kalbe Farma), asam askorbat (Brataco), 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800) dan laptop Intel(R) Core(TM) i3-3217U CPU @ 1.80 GHz 1.80 GHz dengan RAM 4 GB OS 32 bit dilengkapi dengan software *autodock vina*, *MGL Tools 1.5.4*, *Phyton 2.5*, *Pymol*, *ChemOffice 2008* versi trial dan *SPSS 16.0*.

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan *docking* menggunakan program *Autodock Vina* diawali dengan mengunduh protein dengan kode 3ZBF dari *protein databank* (PDB) [9,10]. Protein yang didapat dipreparasi dengan cara menghilangkan air, memberikan *charges*, memasang atom hidrogen. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya penghambatan pengikatan ligan dengan reseptor. Preparasi ini menggunakan program *MGL Tools 1.5.4*. Preparasi ligan diawali dengan membuatnya menggunakan *ChemOffice 2008* lalu diminimalisasi energi dengan menggunakan *Molecular Mechanical Force Field 94* (MMFF94) [11]. Minimalisasi energi dilakukan bertujuan agar mendapatkan bentuk ligan yang terbaik sehingga saat didocking memberikan hasil yang optimal. Kemudian dilakukan *docking* menggunakan *Autodock Vina*, dari *docking* didapatkan nilai Ki. Semakin kecil nilai Ki maka semakin kuat ikatan antara ligan dan reseptor [12]. Visualisasi hasil *docking* menggunakan program *Phyton 2.5*.

Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH dilakukan dengan membuat larutan DPPH 0,1 mg/ml dengan pelarut metanol. Dibuat berbagai konsentrasi senyawa uji 1-(*p*-

klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm dan 500 ppm dengan pelarut etil asetat p.a. Dibuat 5-Fu (Curasil) dengan konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm dan 500 ppm dengan pelarut metanol p.a. Dibuat asam askorbat dengan konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm dengan pelarut metanol p.a. Masing-masing diambil 1 ml lalu ditambahkan 2 ml DPPH. Campuran didiamkan selama 30 menit dan disimpan dalam ruang gelap lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dihitung % inhibisi 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, asam askorbat dan 5-fluorourasil dengan menggunakan rumus:

$$\text{persentase Inhibisi} = \frac{[Ab-Aa]}{[Ab]} \times 100$$

keterangan:

Ab: Absorbansi blanko (terdiri dari semua reagen kecuali senyawa uji)

Aa: Absorbansi senyawa uji

Menghitung nilai IC₅₀ dengan cara memasukkan nilai persentase inhibisi ke dalam persamaan regresi linear [13,14].

Hasil Penelitian

Hasil *docking* dapat dilihat pada Tabel 1 yang mana nilai *Ki* terbaik dari senyawa asam askorbat, 5-fluorourasil, 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, dan crizotinib secara berturut-turut adalah -4,8 kkal/mol, -4,6 kkal/mol, -6,2 kkal/mol dan -8,4 kkal/mol.

Uji aktivitas antioksidan sampel dengan metode *docking* molekuler selanjutnya dianalisis secara statistik dengan uji Mann-Whitney. Hasil statistik antara asam askorbat, 5-fluorourasil, dan 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil menunjukkan hasil signifikansi (nilai *p*) <0,05. Oleh karena nilai *p* < 0,05 maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar afinitas masing-masing sampel [15].

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 2. Dimana didapatkan IC₅₀ rata-rata dari asam askorbat, 5-Fluorourasil dan 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil secara berturut-turut sebesar 19,092 ppm, -4.998 ppm dan -2.500.245 ppm.

Tabel 1. Hasil molekuler *docking* terhadap reseptor 3ZBF

| Model | Ki Rata-rata (kkal/mol) ± RMSD | | | |
|-------|--------------------------------|--------------------|--|----------------------------|
| | Asam askorbat | 5-Fu | 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil | Crizotinib (Native Ligand) |
| 1 | -4,8 ± 0,19 | -4,6 ± 0,00 | -6,2 ± 0,04 | -8,4 ± 0,00 |
| 2 | -4,4 ± 0,13 | -4,5 ± 0,04 | -6,2 ± 0,05 | -8,3 ± 0,03 |
| 3 | -4,3 ± 0,07 | -4,5 ± 0,00 | -6,1 ± 0,10 | -8,3 ± 0,05 |
| 4 | -4,2 ± 0,08 | -4,1 ± 0,05 | -6,0 ± 0,07 | -8,2 ± 0,05 |
| 5 | -4,2 ± 0,07 | -4,1 ± 0,00 | -5,9 ± 0,04 | -8,1 ± 0,21 |
| 6 | -4,1 ± 0,08 | -4,1 ± 0,04 | -5,9 ± 0,05 | -7,7 ± 0,09 |
| 7 | -4,1 ± 0,07 | -4,1 ± 0,07 | -5,8 ± 0,05 | -7,6 ± 0,09 |
| 8 | -4,1 ± 0,06 | -4,0 ± 0,03 | -5,8 ± 0,04 | -7,5 ± 0,10 |
| 9 | -4,1 ± 0,05 | -4,0 ± 0,03 | -5,8 ± 0,05 | -7,4 ± 0,06 |

Tabel 2. IC₅₀ senyawa asam askorbat, 5-Fluorourasil dan 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

| Replikasi | IC ₅₀ (ppm) | | |
|-----------|------------------------|--------|---|
| | Asam Askorbat | 5-Fu | 1-(<i>p</i> -klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil |
| 1 | 19,153 | -4.057 | -2.678.130 |
| 2 | 20,585 | -4.242 | -2.323.084 |
| 3 | 19,874 | -3.409 | -2.499.520 |
| Rata-rata | 19,092 | -4.998 | -2.500.245 |

Uji DPPH antar sampel asam askorbat, 5-fluorourasil, dan 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil selanjutnya dianalisis secara statistik sedangkan uji t-test. Hasil statistik menunjukkan nilai $p < 0,05$, maka dapat dikatakan terdapat perbedaan bermakna antar IC₅₀ masing – masing sampel [15].

Pembahasan

Nilai K_i yang dievaluasi merupakan hasil *docking* terhadap reseptor antioksidan dimana nilai yang diambil adalah nilai paling rendah, karena nilai K_i menunjukkan arah yang sebaliknya dari proses pengikatan. Semakin kecil nilai K_i maka afinitas atau kekuatan pengikatan antara *ligand*-reseptor semakin besar. Dilihat dari hasil *docking* yang telah diperoleh yaitu nilai K_i terbaik dari senyawa asam askorbat, 5-fluorourasil, 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, dan crizotinib berturut-turut adalah -4,8 kkal/mol, -4,6 kkal/mol, -6,2 kkal/mol dan -8,4 kkal/mol. Hasil ini menunjukkan bahwa afinitas asam askorbat terhadap reseptor *human ROS1 kinase complex in Crizotinib* (3ZBF) lebih besar daripada 5-fluorourasil, tetapi lebih kecil dari 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil. Dapat dikatakan senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil memiliki afinitas terhadap reseptor 3ZBF yang lebih baik daripada asam askorbat dan senyawa induknya yaitu 5-fluorourasil. Senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil juga memiliki afinitas yang paling mendekati afinitas ligan asli reseptor 3ZBF yakni crizotinib. Nilai K_i pada *docking* juga dipengaruhi oleh banyaknya *rotatable bond* pada suatu molekul. Semakin banyak rantai yang dapat berotasi maka semakin mudah atau fleksibel

suatu molekul untuk berikatan kuat dengan reseptor [12].

Hasil yang didapat selain K_i adalah nilai RMSD yang mana nilai ini menjelaskan jarak antara satu model dengan model yang lain. RMSD juga sebagai parameter validasi *docking* dari 10 kali replikasi didapatkan nilai RMSD < 2 yang menunjukkan *docking* ini telah valid [12,16,17].

Untuk uji antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Dapat dilihat dari nilai IC₅₀ rata-rata dari 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan 5-fluorourasil seperti pada Tabel 2, keduanya memiliki nilai IC₅₀ yang bernilai minus. Ada 2 alasan yang dapat menyebabkan hal tersebut. Yang pertama adalah cara kerja dari 5-fluorourasil itu sendiri yang merupakan obat golongan antimetabolit, sehingga harus mengalami metabolisme terlebih dahulu agar bisa berubah menjadi bentuk aktifnya [18]. Untuk 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dimungkinkan juga memiliki sifat atau mekanisme kerja yang sama seperti senyawa induknya (5-fluorourasil), sehingga saat diuji tidak memberikan efek terhadap DPPH. Alasan yang kedua adalah adanya halogen pada posisi para dapat menurunkan aktivitas antioksidan suatu senyawa dikarenakan adanya halangan sterik, yang mana pada posisi para akan meningkatkan halangan sterik suatu senyawa sehingga reaktifitas dari senyawa tersebut semakin berkurang. Sifat fisika kimia lainnya yang berpengaruh adalah semakin meningkatnya elektronegativitas suatu atom halogen maka semakin meningkat pula aktivitas antioksidannya [19].

Simpulan dan Saran

Senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil memiliki afinitas terhadap reseptor antioksidan (*human ROS*) menggunakan metodologi *docking* molekuler dengan *Autodock*, bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan. Nilai IC₅₀ yang diperoleh senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil menunjukkan hasil negatif, sehingga menunjukkan tidak memiliki aktivitas antioksidan. Saran yang dapat penulis berikan yaitu perlu dilakukan penelitian antioksidan selain DPPH untuk menguji aktivitas antioksidan senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan pengujian *in vitro* dengan imunositokimia.

Daftar Pustaka

- [1] Miguel M, Cordero MD. Oxidative Stress and Disease. Croatia: InTech; 2012.
- [2] Yuslinda E, Mukhtar H, Khairunnisa. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Beberapa Ekstrak Sayur-Sayuran Segar dan Dikukus dengan Metode DPPH. Scientia. 2012 Feb; 2 (1): 1-5.
- [3] Pavlovic V, Cekic S, Rankovic G, Stoiljkovic N. Antioxidant and Pro-Oxidant Effect Of Ascorbic Acid. Acta Medica Medianae. 2005; 44 (1): 65-68.
- [4] Percival M. Antioxidants. Clinical Nutrition Insights. 1998; 31: 1-4.
- [5] Tian Z, Du G, Xie S, Zhao J, Gao W, Wang C. Synthesis and Bioevaluation of 5-Fluorouracil Derivatives. Molecules. 2007 Nov; 12: 2450-2457.
- [6] Zhou WM, He RR, Ye JT, Zhang N, Liu DY. Synthesis and Biological Evaluation of New 5-Fluorouracil Substituted Ampelopsin Derivatives. Molecules. 2010 Mar; 15: 2114-2123.
- [7] Christova T, Gorneva G, Taxirov S, Setchenska M. Effect of 5-Fluorouracil and Cobalt Chloride on Antioxidant Enzymes and Heme Oxygenase in the Livers of Lewis Lung Carcinoma-Bearing Mice. Bulgarian Academy of Sciences. 2003: 93-98.
- [8] Puspaningtyas, AR. Modifikasi Struktur 5-Fu dan Uji Sitotoksik Turunan 1-(benzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Hasil Modifikasi terhadap Sel Kanker MCF- 7 (Sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker). Tesis. Surabaya: Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; 2011.
- [9] Rutgers dan UCSD. An Information Portal to Biological Macromolecular Structures Protein Data Bank; 2013 [cited 2013 Mei 5] Available from: www.pdb.org.
- [10] Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng Y, Brooun A, Friboulet L, Huang D, Falk MD, Timofeevski S, Wilner KD, Lockerman EL, Khan TM, Mahmood S, Gainor JF, Digumarthy SR, Stone JR, Mino-Kenudson M, Christensen JG, Lafrate AJ, Engelman JA, Shaw AT. Acquired Resistance to Crizotinib from a Mutation in CD74-ROS1. The New England Journal of Medicine. 2013 Jun; 2395-2401.
- [11] Varma CK. Molecular Mechanical Force Fields. Biochemistry Stanford University.. 2001 Dec; 218: 1-11.
- [12] Trott O, Olson JA. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. Journal Comput Chem. 2010 Jan; 31(2): 455-461.
- [13] Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. Journal Science Technol. 2004 Mar; 26(2): 211-219.
- [14] Sunarni T. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa Kecambah dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae. Jurnal Farmasi Indonesia. 2005; 2 (2): 53-61.
- [15] Dahlan MS. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Yogyakarta: Arkans; 2001.
- [16] Bursulaya BD, Totrov M, Abagyan R, Brooks CL. Comparative Study of Several Algorithms for Flexible Ligand Docking. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2003 Nov; 17: 755-763.
- [17] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. Journal Computation Chemistry. 1998 Jun; 19 (14): 1639-1662.
- [18] Zhang N, Yin Y, Xu S, Chen W. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. Review Open Acces Molecules. 2008 Aug; 13: 1551-1569.
- [19] Shirinzadeh H, Eren B, Gurer-Orhan H, Suzen S, Ozden S. Novel Indole-Based Analogs of Melatonin: Synthesis and in Vitro Antioxidant Activity Studies. Molecules. 2010 Mar; 15: 2187-2202.