

**Kode>Nama Rumpun Ilmu: 112/MIPA
Kimia**

EXECUTIVE SUMMARY

PENELITIAN HIBAH BERSAING



**PENGEMBANGAN OBAT TURUNAN 5-FLUOROURASIL
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER**

Tahun ke dua dari rencana 2 tahun

Oleh :

**IKA OKTAVIANAWATI, S.Si, M.Sc (0001108005)
AYIK ROSITA PUSPANGTYAS, S.Farm, M.Farm, Apt. (0001028102)**

**UNIVERSITAS JEMBER
DESEMBER, 2014**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : PENGEMBANGAN OBAT TURUNAN 5-FLUOROURASIL
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER DENGAN PENDEKATAN
MOLEKULER

Peneliti / Pelaksana
Nama Lengkap : IKA OKTAVIANAWATI S.Si, M.Sc
NIDN : 0001108005
Jabatan Fungsional :
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 08133628911
Surel (e-mail) : bag_cha@yahoo.com

Anggota Peneliti (1)
Nama Lengkap : AYIK ROSITA PUSPANGTYAS S.Farm.,Apt.,M.Farm.
NIDN : 0001028102
Perguruan Tinggi : Universitas Jember

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra :
Alamat :
Penanggung Jawab :
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 32.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp. 105.976.000,00

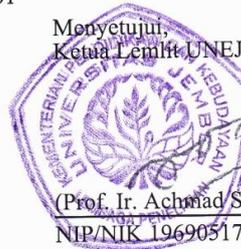


Mengetahui
Dekan FMIPA

(Prof. Drs. Kusno, DEA, PhD)
NIP/NIK 196401081986021001

Jember, 23 - 11 - 2014,
Ketua Peneliti,

(IKA OKTAVIANAWATI S.Si, M.Sc)
NIP/NIK198010012003122001



Menyetujui,
Ketua Lemlit UNEJ

(Prof. Ir. Achmad Subagio, MAgr, PhD)
NIP/NIK 196905171992011001

PENGEMBANGAN OBAT TURUNAN 5-FLUOROURASIL SEBAGAI AGEN ANTIKANKER DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER

Oktavianawati, I.¹⁾, Puspaningtyas, A.R.²⁾

¹⁾Fakultas MIPA, Universitas Jember, Jember

²⁾Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember

Corresponding author. Email : bag_cha@yahoo.com, Tel/Fax : 08133628911/0331-334293

ABSTRAK

5-Fluorourasil (5-Fu) merupakan obat antikanker golongan antimetabolit yang bekerja menginduksi apoptosis dengan cara menghambat biosintesis asam timidilat. Pengembangan obat 5-Fu menjadi turunannya dilakukan dengan harapan memiliki aktivitas lebih tinggi dan efek samping lebih rendah dibandingkan obat dipasaran dimana penelitian ini dilakukan selama 2 tahun. Pada Tahun I, 7 Turunan 5-fluorourasil, (**4a**); 2-klorobenzoil-5Fu (**4b**); 3-nitrobenzoil-5Fu (**4c**); 4-metoksibenzoil-5Fu (**4d**); 4-trifluorometilbenzoil-5Fu (**4e**); 3,4-diklorobenzoil-5Fu (**4f**); dan 4-nitrobenzoil-5Fu (**4g**) disintesis melalui dua tahap reaksi. Tahap pertama merupakan reaksi alkilasi antara 5-fluorourasil, formaldehid dan aquadest untuk menghasilkan 1-hidroksimetil-5-fluorourasil. Tahap kedua ialah reaksi benzoilasi untuk menghasilkan senyawa target (**4a-4g**). Senyawa target dimurnikan dengan kromatografi kolom. Senyawa hasil pemurnian dikarakterisasi dan diidentifikasi dengan ¹HNMR and FTIR KBr. Spektra ¹HNMR and FTIR KBr menunjukkan bahwa senyawa target (**4a-4g**) murni berhasil disintesis. Pada Tahun II, dilakukan uji *in silico* dengan pemodelan molekuler menunjukkan bahwa 3-NO₂-benzoil-5-Fluorourasil memiliki afinitas ikatan lebih baik dibandingkan 5-Fluorourasil dan turunan lainnya dengan hasil *MolDockScore* yaitu -107.037. Nilai prediksi selaras dengan hasil uji sitotoksitas dan hambatan ekspresi COX-2 dimana IC₅₀ 3-NO₂-benzoil-5-Fluorourasil yaitu 348,398 µM paling baik diantara turunan 5-Fluorourasil lainnya.

Kata Kunci: 5-fluorourasil, *drug development*, antikanker, benzoilasi.

ABSTRACT

*5-Fluorouracil (5-Fu) is an antimetabolite class of anticancer agents that work induces apoptosis by inhibiting thymidilic acid biosynthesis. Drug Development of 5-fluorouracil will be happen that have been higher activity and lower side effect than drugs on market in which the study was conducted during 2 years. The first years, synthesis of 5-fluorouracil derivatives, (**4a**); 2-chlorobenzoyl-5Fu (**4b**); 3-nitrobenzoyl-5Fu (**4c**); 4-methoxybenzoyl-5Fu (**4d**); 4-trifluoromethylbenzoyl-5Fu (**4e**); 3,4-dichlorobenzoyl-5Fu (**4f**); dan 4-nitrobenzoyl-5Fu (**4g**) were synthesized by two steps reaction. The first step is alkylation reaction between 5-fluorouracil, formaldehyde and aquadest to produce 1-hydroxymethyl-5-fluorouracil. The second step is benzoylation reaction to produce the target compound (**4a-4g**). Target compound purified by column chromatography. Purified compound characterized and identified by ¹HNMR and FTIR KBr. Spectra of ¹HNMR and FTIR KBr showed that pure target compounds (**4a-4g**) was successfully synthesized. The second year, *in silico* study shows 3-Nitrobenzoyl-5Fu (**4c**) that have better binding affinity than 5-Fu and other derivatives with *MoldockScore* -107.037. Predictive value of *in silico* study in line with cytotoxicity test*

and inhibition of COX-2 expression which the best of IC50 was 3-NO2-benzoyl-5-Fluorourasil among other 5-Fu derivatives with 348,398 μ M.

Keywords: *5-fluorouracil, drug development, anticancer, benzoylation*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker yang banyak terjadi pada wanita yang menyebabkan kematian selain kanker serviks (leher rahim). Kanker payudara dapat terjadi pada pria maupun wanita, hanya saja prevalensi pada wanita jauh lebih tinggi. Diperkirakan pada tahun 2003 di Amerika, terdapat 212.920 kasus baru kanker payudara pada wanita dan 1.720 kasus baru pada pria, dengan 40.970 kasus kematian pada wanita dan 460 kasus kematian pada pria yaitu sekitar 15% dari seluruh kanker yang terjadi di Amerika (Gondhowiardjo, 2004). Di Indonesia, kanker jenis ini menduduki urutan kedua berdasar frekuensi kejadian. Data Laboratorium Patologi Anatomi Indonesia (1998) menunjukkan frekuensi kanker payudara sebesar 11% di antara kanker yang diderita perempuan di Indonesia. Realita ini didukung oleh beberapa faktor resiko yang penting, misalnya gaya hidup masyarakat serta keadaan lingkungan yang terus mengalami pergeseran (Salmon and Sartorrelli, 1998).

5-Fluorourasil (5-Fu) adalah obat kanker antimetabolit yang telah lama digunakan dan telah disintesis sejak tahun 1957 dan banyak dimanfaatkan di dunia untuk pengobatan penyakit kanker karena jarang menimbulkan efek samping. Obat ini umumnya digunakan untuk kanker payudara, kanker rektal serta kanker lambung dimana mekanismenya menghambat enzim timidilat sintase dan telah banyak digunakan untuk terapi kanker secara klinis (Avendan˜o and Mene´ndez, 2008).

Namun berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa produk obat 5-Fu memiliki efikasi rendah dan tingkat toksisitas yang relatif tinggi (Pan, *et al.*, 2011). Sehingga perlu dilakukan modifikasi struktur 5-Fu sebagai agen antikanker yang lebih potensial dan bersahabat. Penelitian ini akan mengkaji pengembangan turunan 5-Fu baru yang diharapkan memiliki efisiensi tinggi dan tingkat toksisitas yang rendah.

Langkah awal yang dapat dilakukan dalam upaya merancang dan mengembangkan obat baru untuk penyakit kanker adalah dengan mengembangkan obat yang telah diketahui struktur molekul dan aktivitas biologisnya, untuk dijadikan senyawa penuntun atas dasar penalaran yang sistematis dan rasional dengan mengurangi faktor coba-coba seminimal mungkin. Selanjutnya dari senyawa penuntun

tersebut dikembangkan modifikasi struktur molekulnya kemudian senyawa baru atau turunan tersebut diuji aktivitas biologisnya (Siswandono, 2000).

Beberapa literatur telah melaporkan bahwa turunan 5-Fu dihasilkan dari substitusi pada atom *N* struktur dasarnya menggunakan asam amino, peptida, fosfolipid, ester dan polimer. Senyawa-senyawa tersebut dapat memperbaiki sifat farmakologi dan farmakokinetika dari 5-Fu sehingga dapat meningkatkan bioaktivitas, selektifitas, stabilitas metabolisme, dan absorpsinya, serta dapat menurunkan efek sampingnya (Tian *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2009). Contoh dari modifikasi turunan 5-Fu yang kedua atom *N*-nya disubstitusi yaitu emitefur yang telah melalui *clinical trial* (Avendaño and Mene´ndez, 2008).

Berdasarkan Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA) pada obat-obat untuk antikanker diutamakan substitusi pada posisi *para* karena dapat memberikan efektifitas yang lebih baik secara absorpsi, metabolisme, dan farmakokinetiknya (Siswandono and Soekardjo, 1998). Substituen yang bervariasi diharapkan dapat mempengaruhi sifat lipofilik, elektronik dan sterik senyawa. Peningkatan sifat lipofilik diharapkan dapat meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis sel kanker dengan memasukkan gugus-gugus non polar seperti cincin aromatik. Sedangkan peningkatan sifat elektronik diharapkan dapat berperan pada proses interaksi obat dengan reseptor sel kanker karena mempengaruhi ionisasi dan polarisasi senyawa obat sehingga meningkatkan efektifitas biologis secara keseluruhan dengan memasukkan substituen yang bersifat elektronegatif seperti halogen. Faktor lain yang juga berpengaruh adalah faktor sterik karena berhubungan dengan keserasian interaksi molekul senyawa dengan reseptor dalam sel. Dengan adanya efek sterik maka akan membantu orientasi obat secara benar untuk berikatan maksimum dan meningkatkan aktivitas yang berfungsi seperti perisai dan mendorong terjadinya interaksi ideal (Siswandono, 2000).

Berdasarkan keterangan diatas, maka dalam penelitian ini akan disintesis serangkaian turunan 5-Fu dengan berbagai variasi substituen benzoil pada berbagai posisi substitusi. Senyawa hasil sintesis yang diperoleh kemudian diuji kemurniannya dan dilakukan penentuan struktur dengan FTIR dan ¹H NMR. Penentuan aktivitas antikanker turunan 5-fluorourasil dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) dan hambatan ekspresi COX-2 dimana sel-sel kanker juga merangsang keluarnya prostaglandin E2 (PgE2), merangsang Bcl-2 dan dapat menghambat apoptosis. Kelebihan ekspresi COX-2 dapat meningkatkan angiogenesis dan proliferasi sel, yang keduanya berperan pada fenotif tumor agresif (King, 2000; Tian *et.al*, 2006).

Secara ringkas penelitian ini diharapkan dapat memproduksi beberapa senyawa baru yang mempunyai aktivitas sitotoksik/antikanker secara *in vitro* dan hambatan ekspresi COX-2 yang lebih besar dibandingkan 5-Fu. Serangkaian informasi yang bermanfaat tentang hubungan antara struktur dan aktivitas dapat dikembangkan lebih lanjut untuk turunan 5-Fu supaya didapatkan senyawa sitotoksik atau antikanker baru serta hambatan COX-2 yang lebih efektif dan dijadikan suatu model untuk penemuan senyawa baru turunan 5-Fu.

METODE PENELITIAN

Alat

Camera digital, kaca obyektif, kaca penutup, kertas label, alat tulis, timbangan analitik, *Laminar Air Flow Cabinet*, dan imunohistokimia, Inkubator CO₂ (Heraceus), sentrifus (Universal 320 R Hettich), sonikator, *laminar air flow cabinet* Esco Class II BSC, mikropipet (Gilson), autoklaf, hemositometer (Nebauer), mikroskop *inverted* (Olympus CH-2), ELISA *reader* (SLT 240 ATC), mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80), kamera digital (Canon Power Shoot S 40, 4,0 mega pixels), Multi Mikropipet Biorad

Bahan

Hydrogen peroksidase dalam metanol, serum kambing normal, primer Antibodi COX-2 (Novo Castra), *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4, avidin, biotin, antibodi Ig G biotinisasi sekunder (Novo Castra), konjugat Avidin terhadap peroksidase "*horseradish*" (Novo Castra), khromogen 3,3-diaminobenzidine (Novo Castra), air deionisasi, dan hematoksilin (Dako), Sel kanker payudara MCF-7 koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, DMEM (Gibco), natrium bikarbonat (Sigma) dan hepes (Sigma); media penumbuh DMEM-serum: media DMEM, *fetal bovine serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), penisilin-streptomisin 1% v/v (Gibco), fungison 0,5% v/v (Gibco), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) 20% (Sigma); media kultur DMEM: FBS 10 %, penisilin-streptomisin 1% dan

fungison 0,5% dalam media DMEM; reagen MTT: MTT (3-(4,5-dimetil tiazol- 2-il (-2,5- difenil tetrazolium bromida))) 20 mg dalam 6 ml PBS (Sigma); *stopper*: SDS 10% dalam HCl 0,01 N (Merck), *96-well plate*, tabung 5 ml steril, pipet tips (0,2-1000 ml) steril, filter unit 0,22 μm Millex-GV (Millipore), trypan blue stain 0,25% (Gibco)

Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

a. Pembuatan larutan uji

Senyawa 5-fluorourasil dan senyawa hasil modifikasi ditimbang dengan neraca analitis dengan seksama yaitu 5-fluorourasil sebanyak 6,5 mg, 1-(benzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebanyak 1,4 mg, 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebanyak 1,4 mg, 1-(*p*-bromobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebanyak 1,4 mg dan 1-(*p*-fluorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebanyak 1,4 mg. Masing-masing sampel dilarutkan dalam 100 μl DMSO kemudian diadkan dengan PBS sampai 1000 μl (5000 μM). Kemudian diencerkan menggunakan medium DMEM. Konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan berturut turut : 0,5, 5, 50, 250 dan 500 μM . Khusus untuk 5-fluorourasil konsentrasinya adalah 0,5, 5, 50, 500 dan 5000 μM .

Ke dalam tiap sumur yang telah diisi sel ditambahkan sejumlah tertentu media dan sampel dari masing-masing larutan induknya sesuai dengan perhitungan untuk variasi konsentrasi seperti tertera pada tabel 3.1. dengan replikasi sebanyak 3 kali. Sumur berkode C diisi media (DMSO dalam media DMEM) dan sel tanpa sampel sebanyak 100 μl dan sumur berkode M dikosongkan. Plat diinkubasikan kembali dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi akhir yang dimaksudkan adalah konsentrasi yang diperoleh dalam sumuran uji. Untuk tujuan skrining, penentuan konsentrasi dilakukan secara *trial and error*, setelah mendapatkan perkiraan harga IC₅₀, dilakukan optimasi dan ditentukan konsentrasi sebagaimana disebutkan di atas.

Tabel 1. Jumlah media dan sampel yang ditambahkan dalam tiap sumur untuk variasi konsentrasi dalam uji sitotoksitas terhadap sel karsinoma payudara MCF-7.

Media yang ditambahkan (μl)	Volume sampel (μl)	Kode sumur
450	50	1,6,11,16,21
450	50	2,7,12,17,22
450	50	3,8,13,18,23
450	50	4,9,14,19,24
450	50	5,10,15,20,25,26

b. Propagasi dan panen sel kanker payudara MCF-7

Sel yang disimpan dalam *t-flask* (botol dengan mulut berposisi miring) yang telah dikultur dilihat di bawah mikroskop untuk melihat kesiapan sel untuk dipanen. Pemanenan ideal dilakukan jika sel terlihat *confluent* (sekitar 70-80% sel terlihat memenuhi dinding botol). Setelah sel menunjukkan kesiapannya, media dalam botol dibuang kemudian dilakukan pembilasan dengan PBS, didekantasi dan diulang sampai dua kali. Ditambahkan larutan tripsin dalam PBS sebanyak 100 µl kemudian botol dimasukkan dalam inkubator CO₂ selama 3 menit dengan tutup terbuka sedikit. Dilakukan pengamatan dengan mikroskop untuk melihat apakah sel sudah tidak melekat lagi pada dinding botol. Larutan media ditambahkan sebanyak 5 ml dan dilakukan resuspensi dengan pipet agar sel tidak bergerombol. Larutan sel dipindahkan ke dalam tabung 10 ml kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Media didekantasi kemudian ditambahkan media baru sebanyak 2 ml dan diresuspensi. Sel dihitung dengan haemositometer (sebelumnya dilakukan pengenceran sebanyak 10 kali dan ditambahkan tripan biru 0,4% dan langsung diamati sekitar 2-3 menit dan tidak boleh lebih dari waktu tersebut). Setelah jumlah sel diketahui dilakukan pengenceran dengan menambahkan sejumlah media yang dibutuhkan hingga volume larutan 10 ml (untuk uji menggunakan 1 buah plat 96 sumur). Jumlah sel yang digunakan dalam uji sitotoksitas adalah sebanyak 5x10³ sel/ml dalam tiap *well* (Tian *et al.*, 2007).

Tabel 2. Plat 96 sumur diberi kode pada bagian tutupnya

M	M	M	C	C	C	1	1	1	2	2	2
3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6
7	7	7	8	8	8	9	9	9	10	10	10
11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14
15	15	15	16	16	16	17	17	17	18	18	18
19	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22
23	23	23	24	24	24	25	25	25	26	26	26

Keterangan :

M : dikosongkan, tanpa pemberian sel

C : berisi sel dan media (DMSO dalam media DMEM) tanpa sampel (kontrol)

1-5 : 5-fluorourasil pada berbagai konsentrasi

6-26 : turunan 5-Fluorourasil dalam berbagai konsentrasi

Larutan berisi sel karsinoma payudara MCF-7 dalam media DMEM dipipet ke dalam di atas masing-masing sebanyak 100 µl tiap sumur, kecuali sumur dengan kode

M dikosongkan yang digunakan sebagai blanko untuk diisi dengan larutan MTT saja. Plat berisi sel tersebut diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C selama 24 jam.

c. Uji sitotoksitas Senyawa Uji dengan Metode MTT

Sel didistribusikan ke dalam sumuran pada *96-well plate* kemudian ditambahkan 5-fluorourasil dan senyawa hasil modifikasi dengan 6 seri kadar yang berbeda kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator. Pada akhir inkubasi, cairan tiap sumur dipipet dan dibuang lalu dibilas dengan larutan PBS kira-kira 100 µl dan digoyang-goyang. Larutan PBS tersebut kemudian dibuang kembali. Ke dalam masing-masing sumuran kemudian ditambahkan 100 µl MTT 5 mg/ml dalam medium DMEM. Enzim yang dimiliki oleh sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu atau biru. Reaksi ini dihentikan dengan penambahan reagen *stopper* (detergen SDS 10%) 4-6 jam setelah pemberian MTT dan diresuspensi dengan pipet, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar dan disimpan di tempat gelap. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550-600 nm. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan dalam persentase kehidupan sel kanker payudara MCF-7. Dari hasil uji ini dapat diketahui sampel mana yang paling aktif dengan membandingkan nilai IC₅₀-nya (Stoddard II *et al*, 2008; Mosmann, 1983).

d Pemodelan molekular

Dilakukan pemodelan molekular dan analisis pemasukan menggunakan komputer. Struktur 5-Fluorourasil dan turunannya sebagai ligan digambar dengan program Chemoffice 2008 sedangkan struktur tiga dimensi timidilat sintase sebagai reseptor diambil dari website Protein Data Bank (PDB). Selanjutnya dilakukan analisis pemasukan (*docking*) ligan-protein menggunakan program *Molegro Virtual Docker 2008* (Cooper, G.M dan Hausman, R.E., 2004; Thomsen R, and Christensen M.H., 2006).

e. Pengamatan kinetika proliferasi sel terhadap pemberian senyawa uji

Sel didistribusikan ke dalam *96 well plate* kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Selanjutnya ditambahkan senyawa uji dan inkubasi dilanjutkan selama 0, 24, 48 dan 72 jam. Pada akhir inkubasi, sel dicuci, diberi media baru dan ditambah 15 µl MTT. Diinkubasi kembali selama 4-6 jam pada suhu 37°C sampai terbentuk formazan. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stopper, lalu diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang

gelombang 550-600 nm. Hasil absorbansi yang terbaca dikonversikan dalam jumlah sel (Mosmann, 1983).

e. Pengolahan dan Analisis Data

Uji sitotoksitas

Data hasil uji sitotoksitas yang berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kehidupan} = \frac{\text{absorbansi sumuran uji} - \text{absorbansi kontrol media} \times 100}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \%$$

Kemudian dilakukan penghitungan IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) dengan menggunakan probit pada SPSS 18.0 yang menggambarkan hubungan antara % kehidupan sel kanker payudara MCF-7 dengan konsentrasi sampel uji (Firdayani, 2009; Boik, J.C and Newman, R.A., 2008). Selanjutnya dilihat apakah ada perbedaan bermakna pada nilai IC_{50} antara senyawa induk dengan turunannya menggunakan Anova satu arah dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai probabilitas (signifikansi) $< 0,05$.

Pengamatan kinetika proliferasi sel

Data absorbansi yang diperoleh dari pembacaan ELISA *reader* dikonversikan menjadi jumlah sel yang hidup. Kemudian, dari data ini dibuat profil hubungan antara jumlah sel hidup dan waktu inkubasi. Dari profil ini dibuat persamaan regresi linear yang digunakan untuk menghitung *doubling time* sel. *Slope* dari persamaan ini menggambarkan kinetika pertumbuhan sel. Dari hasil *doubling time* dapat dilihat turunan 5-fluorourasil yang mana yang memberikan hasil terbaik. *Doubling time* merupakan waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk tumbuh menjadi dua kali lipatnya dimana uji ini dilakukan untuk mengetahui efek suatu senyawa uji terhadap kinetika proliferasi sel secara *in vitro* setelah penambahan suatu senyawa uji dan ditentukan jumlah sel hidup (Setyawan A, 2006)

f. Pemeriksaan COX-2 menggunakan metode imunohistokimia

Dalam penelitian ini pengamatan uji penekanan ekspresi enzim COX-2 dilakukan dengan cara immunositokimia metode *Labeled Streptavidin Biotin* (LSAB) yang kemudian dianalisa secara kualitatif dan kuantitatif. Ke dalam suspensi sel pada setiap sumuran yang berbeda (kepadatan sel 5×10^5 sel/ sumuran) ditambahkan 1000 μ l sampel dalam media kultur DMEM. Pada kelompok kontrol, 1000 μ l sampel diganti

dengan 1000 µl media kultur. Selanjutnya plate diinkubasikan dalam inkubator 5% CO₂ selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Sel yang telah diinkubasi selama 24 jam dibuat apusan pada gelas objek. Dilakukan fiksasi aseton selama 10 menit pada apusan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali 5 menit. Dilakukan peroksidase blok (preparat direndam dalam 3% hidrogen peroksidase) selama 5 menit. Dicuci tepinya, dijaga jangan mengenai sampel, dilanjutkan dengan pemberian Primer Antibodi Monoklonal anti COX-2 pengenceran 1:50, didiamkan selama 30 menit, dicuci. Kemudian diberi *peroxydase labeled polymer* dan didiamkan selama 30 menit, dicuci. Preparat diinkubasi dalam substrat kromogen dengan DAB selama 10 menit, bilas dengan aquades, kemudian dicelupkan 10 x selama 20 detik ke dalam Hematoksilin Meyer sebagai *counter stain*. Cuci dengan aquades 2-5 menit. Dilakukan *mounting* dengan EZ mount (alkohol, xyluol, ditetesi etilen) kemudian ditutup *deck glass*. Ekspresi COX-2 pada *cell line* kanker payudara MCF-7 diamati menggunakan mikroskop cahaya binokuler perbesaran lemah dan difoto menggunakan kamera digital. *Cell line* yang mengekspresikan COX-2 akan memberikan warna coklat pada sitoplasma, sedangkan yang tidak mengekspresikan akan berwarna keunguan. Penghitungan dilakukan per sepuluh lapang pandang yang dinyatakan dalam satuan persen (%). Hasil pulasan imunohistokimia COX-2 adalah tampilan pulasan warna coklat pada sitoplasma sel epitel yang dinyatakan :

Negatif, bila tidak berhasil menampilkan warna coklat, dimana pada saat proses yang sama control (+) menampilkan warna coklat dengan pewarnaan kromogen DAB.

Positif, bila terlihat tampilan pulasan warna coklat pada sitoplasma sel dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400X pada 5 lokasi lampangan pandang dan pada saat yang sama control (+) juga menampilkan warna yang sama.

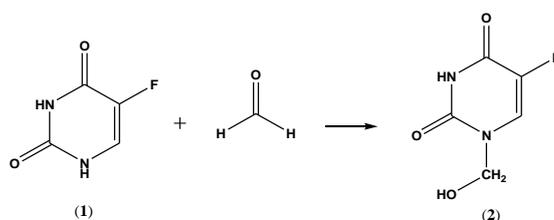
Analisis Data dilakukan statistik *Anava* (analisis varians) satu arah. Untuk menilai hipotesis statistik, terlebih dahulu ditentukan harga p hitung yang akan dibandingkan dengan harga tingkat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) dan dilanjutkan dengan LSD untuk melihat perbedaan bermakna yang bermakna antar kelompok dengan harga $p \leq 0,05$ dimana untuk mengetahui pengaruh perbedaan aktivitas dari senyawa hasil sintesis turunan 5-fluorourasil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian pada Tahun I yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan bahwasanya senyawa turunan 5-Fu, diantaranya senyawa **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4f**, dan **4g**, dapat disintesis menggunakan metode benzoilasi (Pavia D.L, Lampman G.M, Kriz G.S., 2001). Kondisi dan lama waktu reaksi sintesis pada tahap 2 telah dioptimasi. Berdasarkan data FTIR dan ¹HNMR fraksi-fraksi tersebut, diperoleh kesimpulan bahwasanya semua turunan 5-Fu bisa disintesis menggunakan metode yang diusulkan pada penelitian ini dimana yang pada tahun kedua dilakukan scale up (produksi skala besar). Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis tujuh senyawa turunan 5-fluorourasil (5-Fu) melalui dua tahapan reaksi yaitu antara 5-fluorourasil dengan formaldehid melalui reaksi alkilasi, yang kemudian dilanjutkan dengan reaksi esterifikasi dengan benzoilklorida berbagai substituen. Setelah proses sintesis dilakukan, dilanjutkan dengan optimasi eluen. Optimasi kondisi sintesis dilakukan melalui optimasi waktu refluks tahap 2 (esterifikasi). Proses selanjutnya adalah purifikasi menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa murni yang kemudian diuji aktivitas biologisnya.

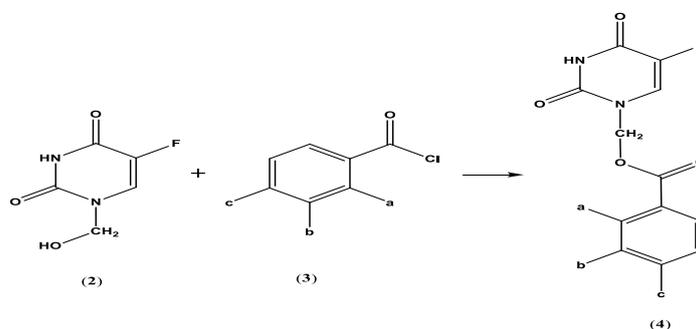
Proses Sintesis Turunan 5-Fu

Metode sintesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkilasi (melalui pembentukan alkohol) dan esterifikasi (dengan reaksi benzoilasi). Alkilasi terjadi antara 5-Fu dengan formaldehid. Formaldehid yang digunakan adalah formaldehid dengan kadar 37% (formalin) sesuai dengan sintesis Tian (2007). Secara stoikiometrik, masing-masing reagen berbanding 1 ekivalen, namun untuk menyempurnakan reaksi, formaldehid yang digunakan lebih menjadi 1,5 ekivalen. Mekanisme reaksi yang terjadi pada tahap pertama adalah pembentukan 1-hidroksimetil-5-fluorourasil adalah substitusi nukleofilik, yaitu penyerangan atom C karbonil dari formaldehid oleh elektron bebas N nomor 1 dari senyawa 5-fluorourasil (Gambar 1).



Gambar 1. Reaksi tahap 1: pembentukan 1-hidroksimetil-5-fluorourasil (2)

Pada tahap kedua akan terbentuk turunan 5-Fu dengan mekanisme reaksi adisi nukleofilik dan eliminasi ion klorida dengan substituen benzoil klorida (Gambar 5.2). Reaksi ini terjadi antara produk tahap 1 yaitu 1-hidroksimetil-5-fluorourasil dengan substituen benzoil klorida masing-masing 1 ekivalen, namun untuk menjaga reaksi yang sempurna maka substituen benzoil klorida ditingkatkan menjadi 1,1 ekivalen. Benzoil klorida dengan variasi substituen merupakan senyawa yang sangat reaktif, dan mudah terhidrolisis menjadi bentuk asam benzoatnya apabila kontak dengan molekul H₂O. Hal ini dikarenakan -Cl adalah *leaving group* yang baik dan -OH sebagai nukleofil untuk menggantikan posisi -Cl sesuai pada Clayden *et. al.*, 2001.



Gambar 2 Reaksi tahap 2 pembentukan turunan 5-fluorourasil dengan substituen benzoil klorida.

Senyawa (3):

- 3a** : a = H; b = Cl; c = H : 3-kloro benzoil klorida
- 3b** : a = Cl; b = H; c = H : 2-kloro benzoil klorida
- 3c** : a = H; b = NO₂; c = H : 3-nitro benzoil klorida
- 3d** : a = H; b = H; c = OCH₃ : 4-metoksi benzoil klorida
- 3e** : a = H; b = H; c = CF₃ : 4-trifluorometil benzoil klorida
- 3f** : a = H; b = Cl; c = Cl : 3,4-dikloro benzoil klorida
- 3g** : a = H; b = H; c = NO₂ : 4-nitro benzoil klorida

Senyawa (4):

- 4a** : a = H; b = Cl; c = H : 1-(3-klorobenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4b** : a = Cl; b = H; c = H : 1-(2-klorobenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4c** : a = H; b = NO₂; c = H : 1-(3-nitrobenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4d** : a = H; b = H; c = OCH₃ : 1-(4-metoksibenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4e** : a = H; b = H; c = CF₃ : 1-(4-trifluorometilbenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4f** : a = H; b = Cl; c = Cl : 1-(3,4-diklorobenzoil oksimetil)-5-fluorourasil
- 4g** : a = H; b = H; c = NO₂ : 1-(4-nitrobenzoil oksimetil)-5-fluorourasil

Hasil dari sintesis senyawa **4a-4g** tersebut dapat dilihat perwakilannya dalam gambar 3.



Gambar . Produk sintesis perwakilan senyawa **4a-4g**

Selanjutnya berdasarkan hasil tahun I maka eluen optimum dipilih heksan:aseton (6:4) dan kondisi optimum senyawa **4a-4g** tertera pada tabel 3. Berdasarkan hasil FTIR dan H NMR menunjukkan senyawa **4a-4g** berhasil disintesis (Pavia et al, 2001).

Tabel 3. Hasil optimasi eluen heksana:aseton terhadap pemisahan produk turunan 5-Fu

Produk turunan 5-Fu	Rs dari Eluen	
	Heksana:Aseton 7:3	Heksana:Aseton 6:4
4a	1,04 (tailing)	1,00
4b	0,70	1,67
4c	0,59	2,97
4d	1,41	2,40
4e	0,94	1,57
4f	0,66	1,33
4g	1,17	2,17

Tabel 4. Hasil optimasi lama waktu reaksi tahap 2 pada sintesis turunan 5-Fu

Produk turunan 5-Fu	Kondisi reaksi (suhu)	Lama waktu reaksi (jam)
4a	Refluks (40°C)	6
4b	Refluks (40°C)	6
4c	Refluks (40°C)	6
4d	Refluks (40°C)	6
4e	Icebath (0°C)	11
4f	Icebath (0°C)	17
4g	Refluks (40°C)	6

Senyawa murni ini akan dikarakterisasi menggunakan uji bentuk dan warnaserta uji jarak lebur. Data hasil uji bentuk, warna senyawa, dan jarak lebur dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data karakter fisik dari senyawa produk turunan 5-Fu

Senyawa Produk Sintesis	Jarak Lebur (°C)	Kondisi Fisik
4a	166 – 167	Serbuk hablur, vonim
4b	193 – 194	Serbuk kuning pucat
4c	116 – 117	Serbuk kuning pucat
4d	168 – 169	Kristal jarum putih kekuningan
4e	172 – 174	Kristal jarum putih
4f	184 – 186	Serbuk putih
4g	209 – 211	Kristal seperti benang putih

Pemodelan Molekuler

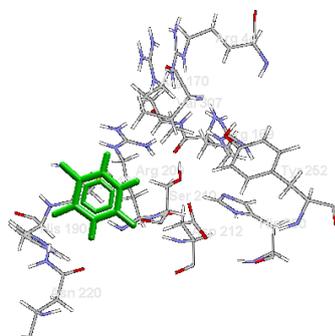
Interaksi antara senyawa 5-Fluorourasil dan derivatnya sebagai ligan dengan timidilat sintetase dengan kode Protein Data Bank (3IHH) pada protein A pada cavity

445.9 dapat diprediksi menggunakan komputer program *Molegro Virtual Docker* (MVD). Pada saat pemasukan atau penempatan (*docking*) molekul 3-NO₂-benzoil-5-Fluorourasil ke dalam timidilat sintetase di dapat data energi minimum yang ditunjukkan dengan *MoldockScore* adalah sebesar -107.037. Ketika turunan 5-Fluorourasil (3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil) diganti dengan 5-Fluorourasil yang diketahui energinya semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa sesungguhnya turunan 5-Fluorourasil tersebut lebih stabil dalam berikatan dengan timidilat sintetase dibanding 5-Fluorourasil. Hal ini didukung dengan data RMSD yang menunjukkan bahwa nilai derivat 5-Fluorourasil lebih rendah daripada 5-Fluorourasil yang artinya jarak antara molekul dengan ikatan semakin kecil sehingga ikatan kompleks antara ligan (turunan 5-Fluorourasil) dan reseptor lebih stabil daripada senyawa induknya yaitu 5-Fluorourasil (Thomsen R, and Christensen M.H., 2006). Hasil perhitungan komputer dengan program *Molegro Virtual Docker* ada pada Tabel 6.

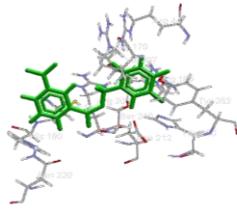
Tabel 6. Data Hasil Skoring pemasukan molekul (*docking*) 5-Fluorourasil dan turunannya ke dalam reseptor timidilat sintetase

No	Nama senyawa	Moldock Score	Rerank score	RMSD	H Bond
1	5Fu	-49.3579	-44.9057	10.7734	2.06925
2	4OCH ₃ -benzoil-5Fu	-94.7341	-83.1684	4.41588	-6.68667
3	4CF ₃ -benzoil-5Fu	-106.451	-89.5018	3.57275	-7.11513
4	4NO ₂ -benzoil-5Fu	-98.4017	-73.4861	4.64255	-3.75619
5	3NO ₂ -benzoil-5Fu	-107.037	-88.539	6.17805	-17.5061
6	2Cl-benzoil-5Fu	-91.738	-75.3737	3.80177	-5.51456
7	3Cl-benzoil-5Fu	-93.5583	-79.0215	4.4551	-13.5376
8	3,4Cl-benzoil-5Fu	-91.4459	-78.0782	7.07141	-4.56515

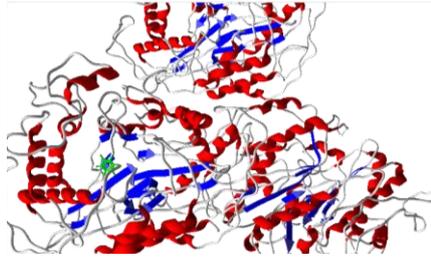
Pemodelan molekular untuk melihat interaksi senyawa 5-Fluorourasil dan turunannya disajikan dalam gambar-gambar berikut ini.



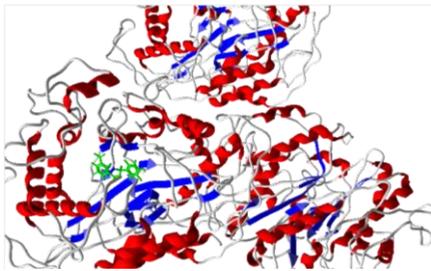
Gambar 4. Pemodelan molekular *pose organized* senyawa 5-Fluorourasil dalam target reseptor timidilat sintetase



Gambar 5. Pemodelan molekular *pose organized* senyawa 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil dalam target reseptor timidilat sintetase



Gambar 6. Pemodelan molekular *pita sekunder* senyawa 5-Fluorourasil dalam target reseptor timidilat sintetase



Gambar 5.7. Pemodelan molekular *pita sekunder* senyawa 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil dalam target reseptor timidilat sintetase

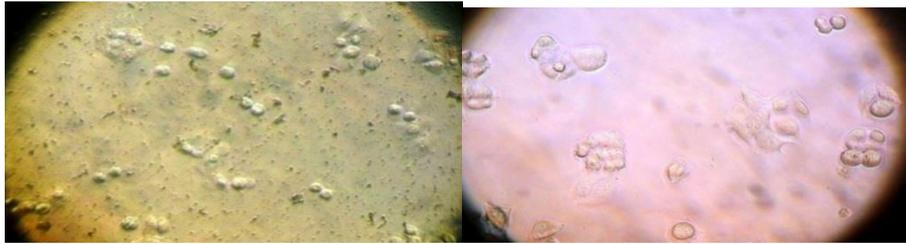
Dari gambar dan table hasil pemodelan molekuler menunjukkan bahwa turunan 5-Fluorourasil yaitu 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil memiliki afinitas ikatan lebih baik dibandingkan 5-Fluorourasil, maupun turunan 5-Fluorourasil lainnya yang didukung dengan hasil *MolDockScore* yaitu -107.037 dan *pose organized* yaitu visualisasi 3 dimensi yang sesuai dengan *active site/cavity* dari reseptor timidilat sintetase. Selain *MolDockScore* nilai kestabilan ikatan antara ligan dan reseptor juga didukung dengan data *RerankScore*, *H.Bond*, dan *RMSD* dimana semakin kecil nilainya maka ikatannya semakin stabil (Nadendla, Rama Rao. 2004).

Hasil Uji Sitotoksisitas 5-Fluorourasil dan Turunannya terhadap Sel MCF-7

Data absorbansi dan persentase kematian sel hasil uji sitotoksisitas 5-fluorourasil dan turunannya terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT ditampilkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji Sitotoksisitas 5-Fluorourasil dan turunannya terhadap sel kanker payudara MCF 7 dengan metode MTT

No	Senyawa	Konsentrasi (µM)	Viabilitas sel (%)
1	Kontrol	-	-
2	Media	-	-
3	5-Fluorourasil	0,5	96.85
		5	90.55
		50	76.38
		250	69.29
		500	82.68
		5000	72.44
4	1-(3-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	75.41
		5	62.99
		50	77.16
		250	69.29
		500	49.61
5	1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	82.68
		5	68.50
		50	62.57
		250	51.97
		500	61.42
6	1-(4-metoksibenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	77.95
		5	73.23
		50	77.95
		250	38.58
		500	51.18
7	1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	83.30
		5	91.75
		50	92.48
		250	66.27
		500	35.37
8	1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	88.98
		5	74.81
		50	66.93
		250	86.62
		500	77.95
9	1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	67.72
		5	72.23
		50	74.02
		250	58.27
		500	43.31
10	1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	0,5	66.93
		5	62.99
		50	74.02
		250	53.54
		500	44.88



(1)

(2)

Gambar 8. Penampakan morfologi sel MCF 7 yang mati (1) dan yang hidup (2) dalam sumuran setelah inkubasi

Data hasil uji sitotoksitas 5-fluorourasil dan turunannya terhadap sel kanker MCF-7 selanjutnya dianalisis regresi probit menggunakan program SPSS 16.0 untuk menentukan nilai IC_{50} dari masing-masing senyawa. Data IC_{50} tersebut dapat dilihat pada Tabel 8. berikut ini

Tabel 8. Nilai IC_{50} 5-Fluorourasil dan turunannya terhadap sel kanker MCF 7

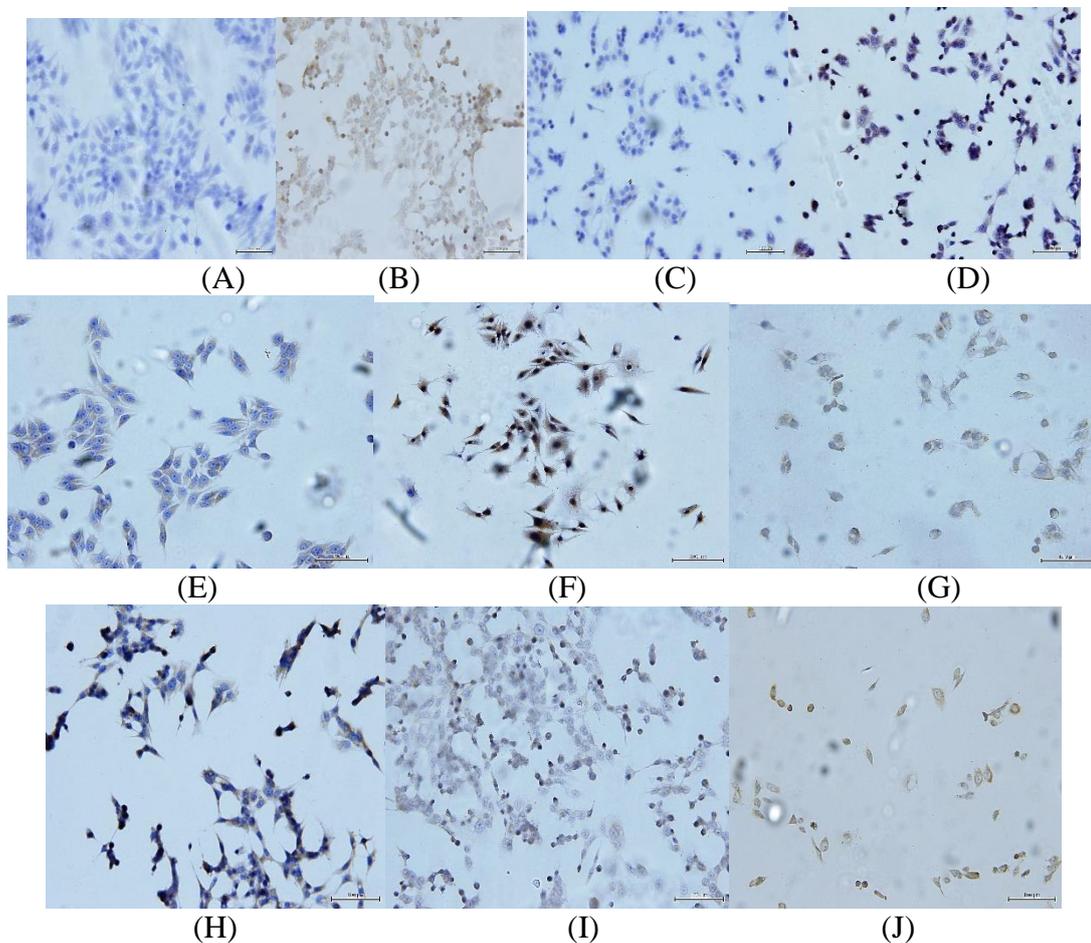
No	Senyawa	IC_{50} (μM)
1	5-Fluorourasil	1983.141
2	1-(3-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	348.398
3	1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	374.842
4	1-(4-metoksibenzoioksimetil)-5-fluorourasil	765,349
5	1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-fluorourasil	474,001
6	1-(3,4-diklorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	538.743
7	1-(3-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	413.435
8	1-(2-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	803.215

Dilihat dari Hasil IC_{50} menunjukkan bahwa turunan 5-Fu memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding 5-Fu sendiri. Hasil uji sitotoksitas selaras dengan uji in silico dimana aktivitas 3-Nitro-5-Fu dengan IC_{50} 348.398 μM lebih tinggi dibandingkan 5 -Fu dan turunan lainnya dengan mekanisme apoptosis. Dengan harga IC_{50} yang cukup baik yaitu 187 $\mu g/ml$ atau sekitar 700 μM , maka senyawa berpotensi untuk dijadikan salah satu alternatif dalam pengobatan kanker payudara (Tyagi *et al.*, 2004). Berdasarkan uji statistik Anova one way pada Tabel 8. terdapat perbedaan bermakna pada IC_{50} antar kelompok.

Pengaruh 5 Fluorourasil dan Turunannya Terhadap Ekspresi Protein COX-2 Pada Sel MCF 7 Secara Imunositokimia

Dalam penelitian ini pengamatan uji penekanan ekspresi enzim COX-2 dilakukan dengan cara imunositokimia metode *Labeled Streptavidin Biotin* (LSAB) yang

kemudian dianalisa secara kualitatif dan kuantitatif. Dari analisis secara kualitatif dapat terlihat bahwa dengan penambahan sampel uji 5-Fluorourasil dan turunannya pada MCF 7 sel-sel yang mengekspresikan COX-2 positif semakin sedikit, menunjukkan bahwa telah terjadi penurunan ekspresi enzim COX-2 pada sel MCF 7. Hasil pengecatan immunositokimia dapat dilihat pada Gambar 9. Selanjutnya, dilakukan analisis kuantitatif untuk mengetahui jumlah penekanan ekspresi enzim COX-2 oleh sampel uji yaitu 5-Fluorourasil dan turunannya. Kuantifikasi penekanan ekspresi enzim COX-2 dilakukan dengan terlebih dahulu menghitung ekspresi protein COX-2 pada lima lapang pandang. Hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 9.



Gambar 9. Hasil pengecatan immunositokimia terhadap COX-2 dengan sel MCF 7 pada pengamatan dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 200 X. A. blangko; kelompok tanpa senyawa uji dan tanpa pengecatan antibodi spesifik COX-2, (B) sel dengan antibody COX-2, (C) 5-Fluorourasil, (D) 1-(3-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (E) 1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (F) 1-(4-metoksibenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (G)1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (H)1-(3,4-diklorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (I)1-(3-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil, (J)1-(2-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil. Warna coklat menunjukkan hasil positif COX-2, warna biru menunjukkan hasil negatif COX-2.

Tabel 9. Data skoring pengamatan berdasarkan metode pengamatan 5 lapang pandang pada MCF 7 yang diberi 5-Fluorourasil dan turunannya dengan pewarnaan imunositokimia menggunakan antibodi COX-2

Kelompok	Skoring
Kontrol	0
Kontrol antibodi	262
5-Fluorourasil	83
1-(3-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	63
1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	3
1-(4-metoksibenzoioksimetil)-5-fluorourasil	128
1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-fluorourasil	14
1-(3,4-diklorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	195
1-(3-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	262
1-(2-klorobenzoioksimetil)-5-fluorourasil	42

Pada Tabel 9 terlihat bahwa pemberian sampel uji 5-Fluorourasil dan turunannya memberikan rata-rata penekanan ekspresi COX-2 yang semakin meningkat. Sedangkan pada kontrol rata-rata penekanan enzim adalah sebesar 0. Selanjutnya data penekanan ekspresi enzim COX-2 pada masing-masing kelompok perlakuan dan kontrol dianalisis secara statistik menggunakan analisis statistik parametrik ANOVA satu arah dilanjutkan dengan uji LSD. Analisis statistik menunjukkan penekanan ekspresi enzim COX-2 pada berbagai kelompok perlakuan kontrol memberikan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Pemberian sampel uji yang diberikan mampu memberikan peningkatan penekanan ekspresi enzim COX-2 secara signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Dengan demikian pemberian sampel uji 5-Fluorourasil dan turunannya dikatakan mempunyai kemampuan dalam penekanan ekspresi enzim COX-2 pada dosis IC50. Enzim COX-2 merupakan enzim yang bertanggung jawab terhadap respon inflamasi dan produksi prostaglandin (Leahy *et al.*, 2000) dan terekspresi tinggi dalam sel tumor (Abukhalaf, 2004). Prostaglandin dilaporkan berperan dalam upregulasi VEGF dan menginduksi angiogenesis pada sel tumor (Akarasereenont *et al.*, 2002). Penekanan produksi prostaglandin PGE2 akan menurunkan ekspresi Bcl-2, suatu antiapoptosis (Shacter and Weitzman, 2002). Dengan demikian diduga, aktivitas sampel uji 5-Fluorourasil dan turunannya sebagai antiinflamasi dan antikanker diperantarai oleh penghambatan COX-2 sebagai salah satu mekanismenya. Sampel uji turunan 5-Fluorourasil nampaknya memiliki potensi yang lebih besar dalam penekanan ekspresi COX-2 dibandingkan dengan 5-Fluorourasil sendiri terutama untuk 3-nitrobenzoioksimetil-5-fluorourasil dan 4-nitrobenzoioksimetil-5-fluorourasil lebih potensial untuk dikembangkan

sebagai obat, penekan ekspresi COX-2. Berdasarkan uji statistik Anova one way pada Tabel 9 terdapat perbedaan bermakna pada uji imunositokimia COX-2 antar kelompok.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa turunan 5-Fu, diantaranya senyawa **4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, dan 4g**, dapat disintesis menggunakan metode benzoilasi. Kondisi dan lama waktu reaksi sintesis pada tahap 2 telah dioptimasi. Berdasarkan data FTIR dan ¹HNMR fraksi-fraksi tersebut, diperoleh kesimpulan bahwasanya semua turunan 5-Fu bisa disintesis menggunakan metode yang diusulkan pada penelitian Tahun I ini dimana yang pada tahun kedua dilakukan scale up (produksi skala besar) dan uji aktivitas. Dari gambar dan tabel hasil pemodelan molekuler menunjukkan bahwa turunan 5-Fluorourasil yaitu 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil memiliki afinitas ikatan lebih baik dibandingkan 5-Fluorourasil, maupun turunan 5-Fluorourasil lainnya yang didukung dengan hasil *MolDockScore* yaitu -107.037 dan *pose organized* yaitu visualisasi 3 dimensi yang sesuai dengan *active site/cavity* dari reseptor timidilat sintetase. Selain *MolDockScore* nilai kestabilan ikatan antara ligan dan reseptor juga didukung dengan data *RerankScore*, *H.Bond*, dan *RMSD* dimana semakin kecil nilainya maka ikatannya semakin stabil. Nilai IC₅₀ 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil didukung dengan nilai prediksi in silico dengan Moldock Score paling stabil. Hasil imunositokimia COX-2 juga mendukung 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil memberikan hasil penekanan ekspresi lebih baik dibanding turunan lainnya maupun 5-Fluorourasil. Hasil penelitian 2 tahun ini diharapkan menjadi penelitian awal dalam penemuan obat baru untuk kanker payudara sebelum ke uji in vivo dan uji klinik. Oleh karena itu perlu adanya penelitian lanjutan dari hasil sintesis dan uji aktivitas in vitro turunan 5-Fluorourasil ini

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Universitas Jember melalui Penelitian Desentralisasi Tahun Anggaran 2014 yang telah mendanai Program Penelitian Hibah Bersaing ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abukhalaf, I.K., von Deutsch, D.A., Bayorh, M.A., 2004, Cyclooxygenase Inhibitors, Disease-odifying Antirheumatic Agents,and Drugs Used in Gout, dalam *Handbook of Drug Interaction A Clinical and Forensic Guide*, 2004, 337-365, Homana Press, New Jersey

2. Akarasereenont, P.C ., Techatraisak, K., Thaworn, A., and Chotewuttakorn, S., 2002, The expression of COX-2 in VEGF-treated endothelial cells is mediated through protein tyrosine kinase, *Mediators Inflamm.*, 11 (1), 17-24
3. Avendan˜o, C., and Mene´ndez, J. C., 2008. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Ed 1st , UK: Elsevier Ltd., pp. 18-31
4. Boik, J.C and Newman, R.A., 2008. Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds, *BMC Pharmacology*, Open Access, <http://www.biomedcentral.com/1472-2210/8/12>
5. Firdayani. 2009. Modifikasi Struktur Timokuinon dan Uji Sitotoksitasnya Terhadap Sel Karsinoma Hepatoseluler HepG2 (ATCC HB-8065), *Tesis*, Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
6. Gondhowiardjo, S., 2004. Proliferasi Sel dan Keganasan. *Majalah Kedokteran Indonesia* 7 (54) : 289-299
7. Leahy, K.M., Ornberg, R.L., Wang, Y., Zweifel, B.S., Koki, A.T., dan Masferrer, J.L., 2002, Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo, *Cancer Res.*, 62, 625–631
8. Mosmann T, 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J.Immunol. Meth* 65 : 55-63
9. Nadendla, Rama Rao. 2004. Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug and Molecular Docking. India: *General article* (diakses tanggal 29 september 2012)
10. Pavia D.L, Lampman G.M, Kriz G.S., 2001. *Introduction of Spectroscopy*, 3rd Ed, USA : Thomson Learning Inc
11. Salmon, S. E., and Sartorelli, A. C., 1998. Kemoterapi Kanker. *In: Katzung, B. G* (Eds). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. edisi ke-6, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran
12. Setyawan, A. 2006. Uji Antiproliferasi Fraksi Diklormetana Daun Cangkring (*Erythrina fusca* lour.) terhadap Sel Kanker Leher Rahim (Sel Hela) : Tinjauan terhadap Fraksi V, XI, dan XVI, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta
13. Shacter, E., and Weitzman, S.A., 2002, Chronic Inflammation and Cancer, *Oncology*, 16(2), 217-232.

14. Siswandono, Soekardjo, B, 2000. *Prinsip-Prinsip Rancangan Obat*. Surabaya: Airlangga University Press., pp.1-5
15. Thomsen R, and Christensen M.H., 2006. MolDock: A new technique for high-accuracy docking. *J Med Chem*, 49:3315-3321.
16. Tian, Z. Y., Du, G. J., Xie, S. Q., Zhao, J., Gao, W. Y., and Wang, C. J., 2007. Synthesis and Bioevaluation of 5-Fluorouracil Derivatives. *Molecules* 12 : 2450-2457
17. Xiong, J., Zhu, H. F., Zhao, Y. J., Lan, Y. J., Jiang, J. W., Yang, J. J., and Zhang, S. F.,2009. Synthesis and Antitumor Activity of Amino Acid Ester Derivatives Containing 5-Fluorouracil. *Molecules* 14 : 3142-3152
18. Zhang, F.M., Yao, X. J., Tian, X and Tu, Y. Q., 2006. Synthesis and Biological Evaluation of New 4 β -5-Fu-substituted 4'-Demethylepipodophyllotoxin Derivatives. *Molecules* 11 : 849-857
19. Zuo, D. S., Jiang, T., Guan, H. S., Wang, K. Q., Qi, X., and Shi, Z., 2001. Synthesis, Structure and Antitumor Activity of Dibutyltin Oxide Complexes with 5-Fluorouracil Derivatives. Crystal Structure of [(5-Fluorouracil)-1-CH₂CH₂COOSn(*n*-Bu)₂]₂O. *Molecules* 6 : 647-654.