



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI
SENYAWA 1-(2-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (SEL MCF-7)**

SKRIPSI

Oleh

Meyladia Sukma Ayu

NIM 112210101013

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI
SENYAWA 1-(2-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (SEL MCF-7)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu Fakultas Farmasi dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Meyladia Sukma Ayu

NIM 112210101013

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

ii

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT Tuhan Pencipta Alam Semesta. Segala puji bagi Allah SWT;
2. Ibunda Sriwahyuni dan Ayahanda Husin Wajidi yang tercinta. *Sumber doa dan semangat yang tak pernah putus;*
3. Adikku tersayang Della Meyke Putri dan seluruh keluarga besar kediri;
4. Keluarga yogyakarta tercinta Adiyanto Riyawan, L.Niswa dan seluruh teman-teman yogya yang sudah bersedia dengan ikhlas membantu segala urusan penelitian di Yogyakarta. *Keluarga baru yang luar biasa*
4. Ibu Ayik Rosita P., S.Farm., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama, Bapak Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota. *Sumber pengalaman yang berharga;*
5. Sahabat-sahabat terbaikku Estika, icha, Fia, Puspita, Rara, Lintang, Mbak Ika, Prisma serta teman-teman farmasi angkatan 2011. *Motivator dan keluarga yang tak tergantikan;*
6. Keluarga kosan Muslimah khususnya untuk Dyah Ayu Choirunnisa, terima kasih sudah menjadi adik terbaik di jember;
7. Bapak dan Ibu Guru di SDN Tiru Lor 1, SMPN 1 Gurah, SMAN 2 Pare dan dosen-dosenku di Fakultas Farmasi Universitas Jember. *Pahlawan tanpa tanda jasa;*
8. Almamater Tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember. *Pelajaran hidup.*

MOTTO

“Gantungkan cita-citamu setinggi langit, bermimpilah setinggi langit. Jika engkau jatuh, engkau akan jatuh diantara bintang-bintang.”

(Soekarno)

“Strength does not come from physical capacity. It comes from an indomitable will.”

(Mahatma Gandhi)

“Manusia tidak merancang untuk gagal, mereka gagal untuk merancang.”

(William J. Siegel)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Meyladia Sukma Ayu

NIM : 112210101013

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 08 Juni 2015

Yang menyatakan,

(Meyladia Sukma Ayu)

NIM 112210101013

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA
1-(2-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

Oleh

**Meyladia Sukma Ayu
NIM. 112210101013**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Ayik Rosita P., S.Farm., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt.

PENGESAHAN

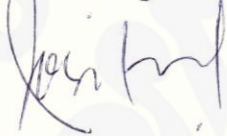
Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Senin, 08 Juni 2015

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Ayik Rosita P., S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP 198102012006042001

Dosen Pembimbing Anggota,

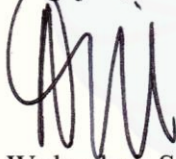


Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP 198410082008121004

Tim Penguji

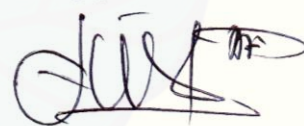
Dosen Penguji I,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 197604142002122001

Dosen Penguji II,

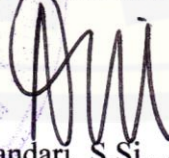


Fifteen Aprila F., S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP 198204152006042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7) ; Meyladia Sukma Ayu; 112210101013; 2015; 46 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU) merupakan salah satu turunan dari 5-fluorourasil (5-FU). Berdasarkan teori HKSA, pendekatan toplis, dan pemodelan molekuler, adanya substitusi benzena, ester, dan kloro pada struktur 5-FU dapat menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas antikanker jika dibandingkan dengan 5-FU dikarenakan adanya pengaruh parametrik lipofilik, elektronik, dan sterik (Siswandono & Soekardjo, 2008). Dengan demikian, diperkirakan 2-KFU memiliki aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan dengan 5-FU. 2-KFU telah berhasil disintesis oleh Febriany (2013) namun belum diketahui aktivitasnya terhadap sel kanker oleh karena itu dilakukan uji aktivitas antikanker menggunakan uji sitotoksik dan uji proliferasi terhadap sel kanker payudara.

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan sel kanker payudara *Michigan Cancer Foundation- 7* (MCF-7) untuk menguji aktivitas antikanker 2-KFU. Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian uji aktivitas antikanker secara *in vitro* selain itu sel kanker jenis ini mengekspresikan p53 *wildtype* sehingga sensitif terhadap agen antineoplastik (Fitria *et al.*, 2011).

Sebelum uji pendahuluan aktivitas antikanker, dilakukan sintesis ulang terhadap 2-KFU. Berdasarkan hasil sintesis menunjukkan hasil senyawa murni dan sama dengan yang disintesis oleh Febriany (2013).

Penelitian ini terdiri dari dua uji pendahuluan aktivitas antikanker yaitu uji sitotoksitas dengan metode MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-*

Diphenyltetrazolium Bromide) untuk mengetahui viabilitas sel dengan hasil akhir berupa data IC_{50} dilanjutkan dengan uji *doubling time* untuk mengetahui waktu proliferasi sel setelah diberi perlakuan. Dengan begitu dapat diketahui aktivitas antikanker payudara dari 2-KFU.

Uji yang pertama yaitu uji sitotoksitas metode MTT. Hasil uji sitotoksitas diperoleh data IC_{50} untuk 5-FU sebesar $4201,88 \pm 824,7266 \mu M$ dan untuk 2-KFU sebesar $196,205 \pm 14,5104 \mu M$. Berdasarkan literatur, nilai IC_{50} dikatakan poten apabila konsentrasinya $<50 \mu M$. (Boik & Newman, 2008). Dari data IC_{50} yang telah diperoleh kemudian dilanjutkan dengan uji t tidak berpasangan (*Independent t-test*) yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antara hasil IC_{50} dari 5-FU dan 2-KFU. Uji t dilakukan dengan menggunakan program SPSS 18.0 dengan taraf kepercayaan 95%. Dari hasil statistik IC_{50} 5-FU dan 2-KFU menunjukkan ada perbedaan yang signifikan. Dengan demikian dapat dilihat bahwa 2-KFU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih besar dibandingkan dengan 5-FU dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7.

Uji yang kedua yaitu uji proliferasi *doubling time*. Hasil dari uji *doubling time* yaitu 2-KFU mampu menghambat waktu proliferasi sel MCF-7 lebih panjang dari 5-FU. Pada 2-KFU untuk konsentrasi $0,5 IC_{50}$; $1 IC_{50}$ dan $1,5 IC_{50}$ waktu *doubling time*nya berturut-turut 197,4; 221,8; 278,5 jam dan untuk 5-FU berturut 185,9; 214,0; 220,6 jam. Berdasarkan literatur, *doubling time* (*doubling time*) sel kanker MCF-7 sekitar 24 jam (Sutherland *et al.*, 1983). Dengan demikian Sel Kanker MCF-7 yang diberi perlakuan Senyawa 5-KFU lebih lambat proliferasinya dibanding dengan 5-FU.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ayik Rosita P. S.Farm., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama, Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini;
3. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dosen Penguji I dan Fifteen Aprilia F., S.Farm., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji II yang telah bersedia menjadi Dosen Penguji dan memberikan saran serta kritik membangun bagi skripsi penulis;
4. Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Orang tua dan adik-adik tercinta dan seluruh keluarga untuk do’a, dukungan dan cintanya selama ini hingga terselesaikannya skripsi ini;
6. Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Unej dan Bu atin selaku teknisi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM atas bantuannya selama penelitian;
7. Teman-teman seperjuangan : Nur, awal, eka dan puspita. Ngelab bersama kalian sangat menyenangkan.

8. Teman-teman 9 stars: Estika, Prisma, Puspita, Lintang, Icha, Fia, Mbak Ika. Terima kasih telah menjadi keluarga kedua di jember, dan menjadi sahabat terbaik yang penuh dengan keceriaan. Dan tak lupa teman-teman farmasi 2011 (ASMEF) yang super kompak dengan jargonnya 'BISA';
9. Keluarga Kos Muslimah: Pak Rahmat selaku penjaga kos, Nisa, mbak pipit, yuli, dan masih banyak lagi. Terima kasih sudah menjadi tempat curhat selama menuntut ilmu di jember
10. Adiyanto Riyawan, laki-laki yang sangat baik dan sabar yang setia membantu dalam penelitian di yogyakarta. Serta temen paling baik di yogya L.Niswa yang sudah banyak memberi fasilitas pada saat penelitian di yogyakarta.
12. Seluruh teman-teman dan yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu;
13. Semua dosen serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga saran dan kritik dari semua pihak diterima dengan senang hati demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 08 Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	1
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Kanker	5
2.2 Tinjauan Kanker Payudara	6
2.3 Tinjauan tentang Senyawa 5-fluorourasil (5-FU)	8
2.4 Tinjauan tentang Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	10
2.5 Tinjauan tentang Sel Kanker Payudara MCF-7	12
2.6 Tinjauan tentang Uji Sitotoksik MTT	13
2.7 Tinjauan tentang Uji Proliferasi Doubling Time	14

BAB III. METODE PENELITIAN	15
3.1 Jenis Penelitian.....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.2.1 Tempat Penelitian	15
3.2.2 Waktu Penelitian.....	15
3.3 Rancangan Penelitian.....	16
3.4 Definisi Operasional.....	17
3.5 Variabel Penelitian.....	17
3.5.1 Variabel Bebas	17
3.5.2 Variabel Terikat	17
3.5.3 Variabel Terkendali	17
3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan	18
3.6.1 Alat.....	18
3.6.2 Bahan	18
3.7 Prosedur Penelitian.....	19
3.7.1 Sintesis Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	19
3.7.2 Preparasi Larutan uji.....	20
3.7.3 Uji Sitotoksik metode MTT.....	21
3.7.4 Uji Proliferasi metode <i>Doubling Time</i>	21
3.8 Analisis Data.....	22
3.8.1 Analisis Data Uji Sitotoksitas metode MTT	22
3.8.2 Analisis Data Uji Proliferasi metode <i>Doubling Time</i>	23
3.9 Alur Penelitian	24
3.9.1 Skema Rancangan Penelitian Aktivitas 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap sel Kanker payudara MCF-7	24
3.9.2 Preparasi Larutan Uji.....	25
3.9.3 Uji Sitotoksitas metode MTT.....	26
3.9.4 Uji Proliferasi metode <i>Doubling Time</i>	27

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Sintesis Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ...	28
4.2 Uji Sitotoksik 5-Fluorourasil dan Senyawa	
1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	34
4.3 Uji Proliferasi <i>Doubling Time</i> 5-Fluorourasil dan senyawa	
1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil pengujian jarak lebur fraksi A	30
Tabel 4.2 Nilai R_f dan nilai r (s,m) dan r (m,e) hasil uji <i>purity</i> fraksi A	31
Tabel 4.3 Perbandingan serapan FTIR antara senyawa hasil sintesis baru dengan hasil sintesis peneliti sebelumnya dan dari literatur	33
Tabel 4.4 Data IC_{50} senyawa 5-fluorourasil dan 1-(2- klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	35
Tabel 4.5 Hasil uji doubling time terhadap proliferasi sel kanker MCF-7	38

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Rumus struktur 5-FU.....	2
Gambar 2.1 Anatomi kelenjar mama manusia.....	8
Gambar 2.2 Mekanisme 5-FU dalam menghambat sel kanker.....	9
Gambar 2.3 Struktur 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.....	10
Gambar 2.4 Spektra NMR senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.....	11
Gambar 2.5 Spektra inframerah senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.....	11
Gambar 2.6 Morfologi Sel MCF-7	13
Gambar 4.1 Hasil penotolan setiap fraksi pada kromatografi kolom.....	29
Gambar 4.2 Spektra hasil uji <i>purity</i> menggunakan eluen 1	30
Gambar 4.3 Spektra hasil uji <i>purity</i> menggunakan eluen 2	31
Gambar 4.4 Spektra hasil uji <i>purity</i> menggunakan eluen 3	31
Gambar 4.5 Spektra Inframerah fraksi A.....	32
Gambar 4.6 Spektra Inframerah senyawa 2-KFU hasil sintesis Febriany	32
Gambar 4.7 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan 2-KFU	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Hasil uji pemurnian dengan menggunakan KLT-Densitometri...47	
A1. Gambar penotolan vial no. 21- 27	47
A2. Gambar penotolan fraksi A pada tiga eluen yang berbeda	47
A3. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:aseton 6: 4	48
A4. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:etil asetat 6: 4	48
A5. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:etil asetat: aseton 5: 3: 2	49
Lampiran B. Uji Sitotoksik metode MTT	49
B1. Perhitungan bahan untuk uji sitotoksik	49
B2. Perhitungan % Sel hidup senyawa 5-fluorourasil dan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.	51
B3. Hasil Analisis Probit.....	59
B4. Perhitungan SD dan CV (RSD).....	65
B5. Hasil Uji t Tidak Berpasangan.....	66
Lampiran C. <i>Uji Doubling Time</i>	68
C1. Penimbangan bahan untuk uji <i>doubling time</i>	68
C2. Perhitungan % Sel Hidup	69
C3. Perhitungan Jumlah Sel Hidup	74
C4. Perhitungan waktu doubling time.....	76
Lampiran D. Foto sel MCF-7.....	78
D1. Morfologi Sel MCF-7 sebelum perlakuan	78
D2. Morfologi Sel MCF-7 setelah diberi reagen MTT	78
D3. Morfologi Sel MCF-7 setelah diberi SDS 10%.....	79

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

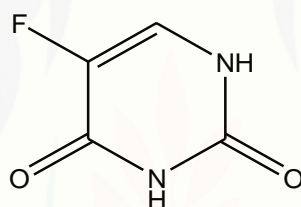
Kanker merupakan penyakit degeneratif yang dicirikan dengan keadaan sel yang tumbuh secara terus menerus tanpa kontrol dan mempunyai kemampuan untuk menyebar (bermetastasis) ke jaringan lain secara patologi. Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan merupakan penyakit pembunuh terbesar kedua setelah kardiovaskuler. Menurut WHO, Kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia dan berjumlah 7,4 juta kematian (sekitar 13% dari semua kematian) pada tahun 2004. Beberapa jenis kanker yang menyebabkan kematian meliputi kanker paru-paru (1,3 juta kematian / tahun), perut (803.000 kematian), kolorektal (639.000 kematian), hati (610.000 kematian), dan payudara (519.000 kematian). Kematian akibat kanker di seluruh dunia diproyeksikan akan terus meningkat, dengan perkiraan 11,5 juta kematian pada tahun 2030 (WHO, 2009).

Kanker payudara merupakan salah satu macam kanker yang frekuensi kejadiannya paling tinggi diantara kanker-kanker jenis lain yang sering menyerang wanita (Nurulita dan Siswanto, 2007). Menurut WHO pada tahun 2004 dilaporkan sebanyak 519.000 wanita meninggal disebabkan oleh kanker payudara. Menurut profil kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2007 kanker tertinggi yang diderita wanita Indonesia adalah kanker payudara dengan angka kejadian 26 per 100.000 perempuan. Insiden penyakit kanker di Indonesia belum dapat diketahui secara pasti karena belum ada registrasi kanker berbasis populasi (Menkes, 2007).

Tingginya mortalitas kanker di seluruh dunia, maka banyak terapi yang ditujukan kepada penyakit kanker terutama pemberian obat antikanker atau kemoterapi. Ada beberapa macam golongan yang telah banyak digunakan untuk terapi kanker, diantaranya yaitu golongan alkilator, antimetabolit, antibiotik,

hormon, dan isotop radioaktif (Siswandono & Soekardjo, 2008).

Salah satu agen antikanker yang sering digunakan dalam pengobatan kanker payudara, kolorektal dan lambung adalah 5-fluorourasil (5-FU) (Tian *et al.*, 2007). 5-Fluorourasil merupakan golongan antimetabolit yang banyak digunakan sejak tahun 1957 sebagai antikanker. 5-FU adalah senyawa organik aromatik heterosiklik dengan struktur mirip dengan molekul pirimidin dari DNA dan RNA, yang merupakan analog dari urasil dengan atom fluor pada posisi C-5 di tempat hidrogen. 5-FU dapat mengganggu metabolisme nukleosida dan dapat dimasukkan ke dalam RNA dan DNA, yang menyebabkan sitotoksitas dan kematian sel (Zhang *et al.* 2008). Berikut ini adalah gambar struktur 5-FU, yang dapat dilihat pada gambar 1.1.



Gambar 1.1 Rumus struktur 5-FU

Beberapa literatur telah melaporkan bahwa turunan 5-FU yang dihasilkan dari substitusi pada atom N struktur dasarnya dengan menggunakan asam amino, peptida, fosfolipid, ester dan polimer dapat memperbaiki sifat farmakologi dan farmakokinetika dari 5-FU sehingga dapat meningkatkan bioaktivitas, selektivitas, stabilitas metabolisme, dan absorpsinya, serta dapat menurunkan efek sampingnya. Sehingga dalam hal ini perlu dilakukan modifikasi struktur 5-FU sebagai agen antikanker yang lebih potensial (Tian *et al.*, 2007).

Penelitian sebelumnya telah meneliti beberapa turunan 5-FU diantaranya yaitu 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan telah berhasil disintesis. 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil merupakan senyawa turunan 5-FU yang disintesis dari senyawa 5-FU melalui reaksi alkilasi antara senyawa 5-FU dengan formaldehid kemudian dilanjutkan dengan reaksi esterifikasi/benzoilasi dengan 2-klorobenzoilklorida (Febriany, 2013). Berdasarkan teori HKSA, pendekatan toplis, dan pemodelan molekuler, adanya substitusi benzena, ester, dan

kloro pada struktur 5-FU dapat menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas antikanker jika dibandingkan dengan 5-FU dikarenakan adanya pengaruh parametrik lipofilik, elektronik, dan sterik (Siswandono & Soekardjo, 2008). Dengan demikian, diperkirakan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil memiliki aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan dengan 5-FU. Senyawa ini telah berhasil disintesis namun belum diketahui aktivitasnya terhadap sel kanker oleh karena itu dilakukan uji pendahuluan antikanker menggunakan uji sitotoksitas dan uji proliferasi terhadap sel kanker payudara.

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan sel kanker payudara *Michigan Cancer Foundation-7* (sel MCF-7) untuk menguji aktivitas antikanker senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil. Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian uji aktivitas antikanker secara *in vitro* selain itu sel kanker jenis ini mengekspresikan p53 *wildtype* sehingga sensitif terhadap agen antineoplastik (Fitria *et al.*, 2011).

Penelitian ini dimulai dengan uji sitotoksitas dengan metode MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) untuk mengetahui viabilitas sel dilanjutkan dengan uji *doubling time* untuk mengetahui waktu proliferasi sel dengan begitu dapat diketahui aktivitas antikanker payudara dari senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas sitotoksik melalui nilai IC_{50} senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (Sel MCF-7) dibandingkan dengan 5-FU?
2. Bagaimana proliferasi sel MCF-7 melalui *doubling time* terhadap senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai agen antikanker payudara dibandingkan dengan 5-FU?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui perbandingan nilai IC_{50} senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (Sel MCF-7) dibandingkan dengan 5-FU.
2. Mengetahui proliferasi sel MCF-7 terhadap senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai agen antikanker payudara dibandingkan 5-FU dengan melihat nilai *doubling timenya*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini antara lain:

1. Memberikan informasi mengenai potensi senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai antikanker melalui nilai IC_{50} .
2. Memberikan informasi mengenai cara menguji aktivitas senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai antikanker pada sel MCF-7.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Kanker

Pertumbuhan sel yang tidak normal sering dikenal dengan beberapa istilah seperti neoplasma (pertumbuhan baru), neoplasma jinak (tumor sederhana), neoplasma maligna (Kanker). Kanker adalah penyakit berpotensi fatal yang disebabkan oleh mutasi gen yang mengkode protein sel sehingga terjadi pertumbuhan sel yang abnormal yang dapat merusak jaringan normal di sekitarnya dan dapat menyebar ke organ vital dan mengakibatkan kematian (Alison, 2001).

Kanker adalah penyakit genetik yang kompleks yang disebabkan terutama oleh faktor lingkungan. Agen penyebab kanker (karsinogen) bisa berasal dari makanan, minuman, udara, bahan kimia dan sinar matahari (Alison, 2001).

Menurut WHO, kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia dan berjumlah 7,4 juta kematian (sekitar 13% dari semua kematian) pada tahun 2004. Beberapa jenis kanker yang menyebabkan kematian meliputi kanker paru-paru (1,3 juta kematian / tahun), perut (803.000 kematian), kolorektal (639.000 kematian), hati (610.000 kematian), payudara (519.000 kematian) Lebih dari 70% dari semua kematian akibat kanker terjadi di negara berpendapatan rendah dan menengah. Kematian akibat kanker di seluruh dunia diproyeksikan akan terus meningkat, dengan perkiraan 11,5 juta kematian pada tahun 2030 (WHO, 2009).

Sel kanker memiliki karakteristik sebagai berikut:

1. Sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri. Sinyal pertumbuhan diperlukan agar sel dapat terus membelah. Berbeda dari sel normal, sel kanker dapat tetap dan terus tumbuh.

2. Tidak sensitif terhadap sinyal antipertumbuhan. Sel kanker tidak merespon adanya sinyal yang dapat menghentikan terjadinya pertumbuhan dan pembelahan sel. Dengan demikian, sel kanker dapat terus membelah.
3. Sel kanker mampu menghindari dari mekanisme apoptosis. Apoptosis merupakan program bunuh diri sel ketika sel tersebut mengalami kerusakan, baik struktural maupun fungsional, yang tidak dapat ditolerir lagi. Namun sel kanker dapat menghindari dari kematian dengan mengemblok jalur terjadinya apoptosis di dalam sel.
4. Sel kanker memiliki potensi tak terbatas untuk mengadakan replikasi.
5. Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis untuk mencukupi kebutuhannya akan oksigen dan nutrisi. Pada tahap perkembangan tumor yang hiperproliferatif, sel-sel tumor akan mengekspresikan protein proangiogenik sehingga akan terbentuk cabang baru pada pembuluh darah yang menuju sel kanker yang kemudian akan mensuplai kebutuhan nutrisi dan oksigen dari sel kanker.
6. Sel kanker mampu menginvasi jaringan di sekitarnya dan bermetastasis (Hanahan dan Weinberg, 2011)

2.2 Tinjauan Kanker Payudara

Kanker payudara adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan berlebihan atau perkembangan tidak terkontrol dari sel-sel jaringan payudara. Payudara wanita terdiri dari lobulus (kelenjar susu), duktus (saluran susu), lemak dan jaringan ikat, pembuluh darah dan *limfe*. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal), beberapa bermula di lobulus (kanker lobular), serta sebagian kecil bermula di jaringan lain (Novianti dan Purnami, 2012). Kanker payudara merupakan jenis kanker yang sering ditemukan oleh kebanyakan wanita. Menurut WHO pada tahun 2004 dilaporkan sebanyak 519.000 wanita meninggal disebabkan oleh kanker payudara. Sedangkan di Indonesia menurut profil kesehatan Departemen Kesehatan

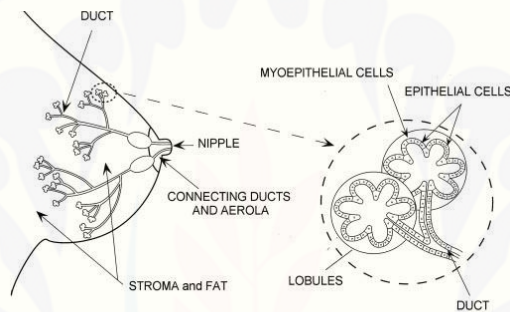
Republik Indonesia Tahun 2007 kanker tertinggi yang diderita wanita Indonesia adalah kanker payudara dengan angka kejadian 26 per 100.000 perempuan.

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang sering ditemui pada wanita di dunia, meliputi 16% dari semua jenis kanker yang diderita oleh wanita (Budiman *et al*, 2013). Kanker payudara pada wanita merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama di seluruh dunia. kanker ini paling umum di kalangan wanita baik di negara maju maupun negara berkembang. Satu dari sepuluh dari kanker baru yang didiagnosis di seluruh dunia setiap tahun adalah kanker payudara wanita. Kanker payudara penyebab utama kematian akibat kanker kalangan perempuan secara global. Pada tahun 2010 Lebih dari 1,5 juta kasus yang didiagnosis dan 500.000 pasien wanita di seluruh dunia meninggal. Penyebab kematian kedua setelah kanker paru-paru. Tingkat kejadian kanker payudara meningkat pesat di negara-negara berkembang (Ginsburg dan love, 2011).

Payudara terdiri dari dua kompartemen: bagian kelenjar, yang terlibat dalam produksi dan transportasi susu, *stroma* dan jaringan ikat. Kelenjar susu memiliki 15-20 lobus, dan dalam masing-masing *lobus* terdapat banyak *lobulus* kecil yang dapat menghasilkan susu. *Lobulus* dihubungkan oleh saluran kecil yang disebut dengan *ductus*, dan semua saluran mengarah ke puting. Sel-sel yang membentuk saluran dan *lobulus* adalah sel-sel epitel yang fungsi utamanya adalah untuk memproduksi dan mengeluarkan berbagai konstituen susu. Selain itu, sel-sel epitel dikelilingi oleh lapisan sel mioepitel, yang melekat pada membran basal. Di sekeliling *lobulus* dan *ductus*, jaringan ikat dan jaringan lemak terdiri dari fibroblast, dengan matriks ekstraselular dan adiposit yang berlimpah. Selain itu, pembuluh darah dan pembuluh getah bening yang mengalir kelenjar susu dan serabut saraf terutama sensorik dan simpatik juga ada (Hondermarck, 2003). Gambar anatomi kelenjar mama dapat dilihat pada gambar 2.1

Kebanyakan tumor payudara terjadi di epitel, sehingga sebagian besar tumor payudara ganas diklasifikasikan sebagai karsinoma (tumor ganas epitel). Sarkoma (tumor ganas yang timbul dari jaringan ikat) jarang diamati pada payudara. Ada

dua kelas utama kanker payudara yaitu : karsinoma in situ ditandai dengan tumor sel lokal baik di dalam saluran (karsinoma duktal in situ) atau di lobulus (karsinoma lobular in situ), tanpa invasi melalui membran basal ke sekitar stroma. Sebaliknya untuk karsinoma invasif, sebagian membran atau seluruhnya hancur dan sel-sel kanker secara progresif menyerang jaringan sekitarnya, akhirnya mengarah pada sel-sel metastasis. Sekitar 65-80% dari semua kasus kanker payudara merupakan Karsinoma duktal invasif dan 5-15% kasus termasuk karsinoma lobular invasif, sementara bentuk lain seperti mucinous, medullar, tubular, dan karsinoma apokrin jarang sering terjadi yaitu sekitar 0,1-4% (Hondermarck, 2003).



Gambar 2.1 Anatomi kelenjar mama manusia (Sumber : Hondermarck, 2003).

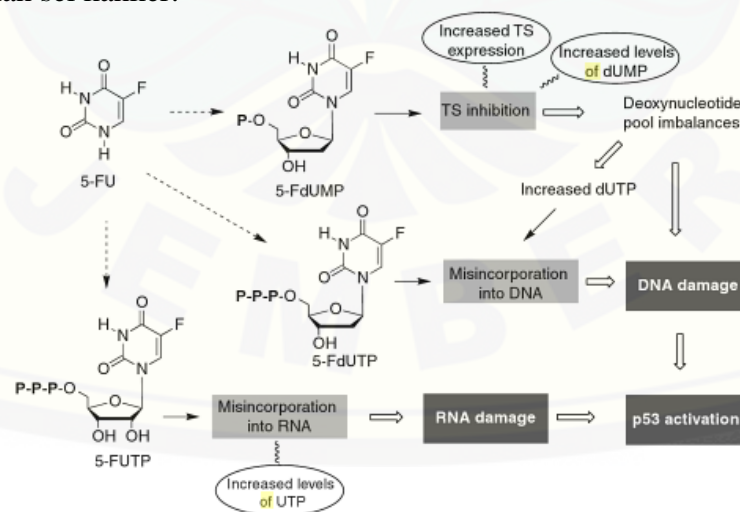
2.3 Tinjauan tentang Senyawa 5-Fluorourasil (5-FU)

Sejak 50 tahun yang lalu, 5-fluorourasil (5-FU) telah menjadi kunci obat antikanker yang memiliki aktivitas antitumor yang luas, serta bersifat sinergisme dengan obat antikanker lainnya. (Miura *et al.*, 2010). 5-Fluorourasil (5-FU) adalah senyawa yang memiliki rumus molekul $C_4H_3FN_2O_2$ dan memiliki nama IUPAC 5-fluoro-1H-pyrimidine-2,4-dione. 5-FU memiliki massa molar $130.077\text{g/mol} \approx 130.08\text{ g/mol}$, Log P -1.32 , MR $26.12\text{ cm}^3/\text{mol}$ atau $25.78\text{ cm}^3/\text{mol}$ (WolframAlpha, 2011). Senyawa ini memiliki titik didih dan titik leleh yang cukup besar yaitu 347°C pada tekanan 1 atm dan $282-286^\circ\text{C}$, serta memiliki nilai ClogP, CMR dan pKa sebesar 0.577, 2.7081 dan 8,020. 5-Fu merupakan senyawa yang sangat larut dalam air yaitu 12.2 g/L 20°C dan memiliki densitas sebesar 1.557 g/cm^3 . Sedangkan dari segi organoleptisnya, 5-FU merupakan serbuk

kristal putih dan memiliki bau yang lemah. 5-FU merupakan prototipe antimetabolit pirimidin yang bekerja dengan menghambat enzim Timidilat Sintetase (TS).

5-FU merupakan obat antikanker atau agen kemoterapi untuk pengobatan tumor payudara dan kanker saluran Gastrointestinal (GI), termasuk kanker kolorektal lanjut (Febriany, 2013). 5-FU biasa diberikan secara IV (intravena) dan dalam bentuk sediaan topikal. Absorpsi obat dalam saluran cerna rendah sehingga diberikan secara intravena. 5-fluorourasil biasanya digunakan untuk pengobatan tumbuh tumor padat, seperti kolorektal, payudara, ovarium, pankreas, dan kanker lambung (Akbari dan Javar, 2013). 5-fluorourasil efektif terhadap sel MCF7 setelah 24 dan 48 jam. Setelah 24 jam pemberian 5-FU terhadap sel MCF-7, dengan konsentrasi 1,3 μg / ml dapat menghambat 50% dari sel, dan setelah 48 jam, dalam konsentrasi 0,38 μg / ml dapat menghambat 50% dari sel. (Akbari dan Javar, 2013)

5-fluorourasil diubah menjadi tiga metabolit aktif utama yaitu: monofosfat fluorodeoxyuridine (FdUMP), trifosfat fluorodeoxyuridine (FdUTP) dan fluorouridine trifosfat (FUTP). Metabolit aktif tersebut akan mengganggu sintesis RNA dan menghambat enzim timidilat sintase (TS) yang dapat merusak DNA sel (Longley *et al.*, 2003). Berikut ini adalah mekanisme 5-FU dalam menghambat pertumbuhan sel kanker:

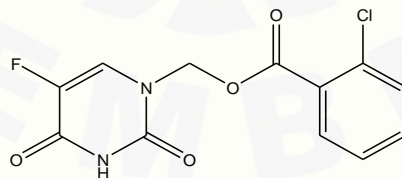


Gambar 2.2 Mekanisme 5-FU dalam menghambat sel kanker
(Sumber : Avendano dan Menendes, 2008)

Timidilat sintase mengkatalisis reduksi metilasi dUMP menjadi deoksitimidin monofosfat (dTMP), dengan mereduksi FOLAT 5,10-methylenetetrahydrofolate (CH₂THF) sebagai donor metil. reaksi ini yang diperlukan untuk replikasi dan perbaikan. Metabolit aktif 5-Fu yaitu FdUMP mengikat situs nukleotida dari TS, membentuk kompleks yang stabil, sehingga akan menghalangi pengikatan substrat normal dUMP dengan begitu akan menghambat sintesis dTMP. Hal ini menyebabkan ketidakseimbangan deoksinukleotida (dNTP) dan peningkatan kadar deoxyuridine trifosfat (dUTP), yang keduanya akan menyebabkan kerusakan DNA. Ketika ikatan FdUMP dengan TS stabil, TS tidak mampu lagi mengikat mRNA dan menekan translasi, sehingga terjadi peningkatan ekspresi protein. (Longley *et al.*, 2003). Ketika terjadi kerusakan DNA dan RNA akan mengakibatkan terjadinya aktivasi dari p53. Gen *p53* berperan dalam pengaturan siklus sel dengan mengontrol sejumlah gen untuk apoptosis jika terjadi kerusakan berat (Syarifudin, 2007).

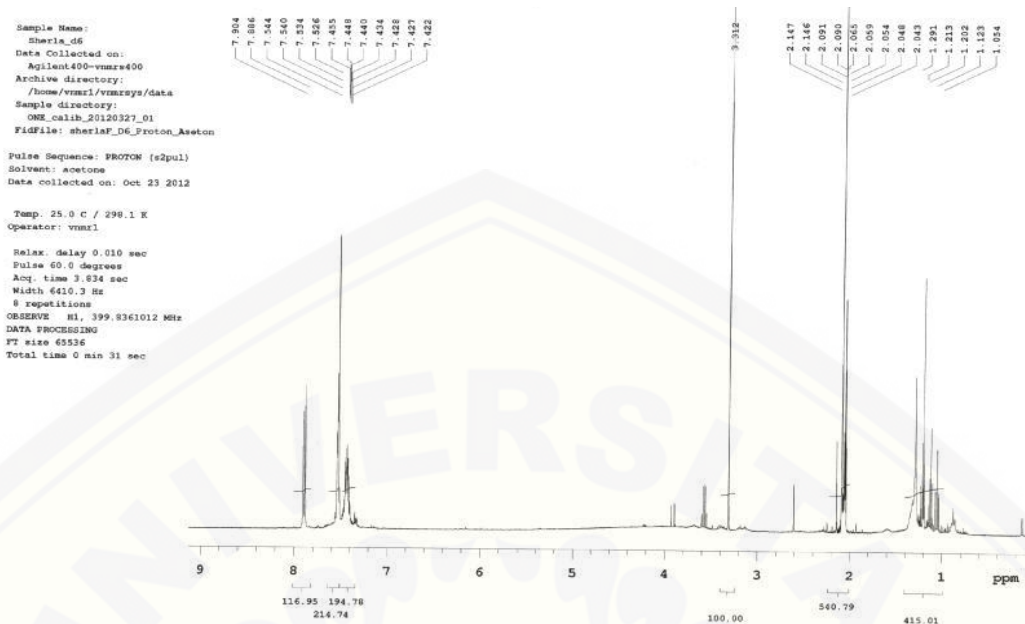
2.4 Tinjauan tentang Senyawa 1-(2-Klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil

Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU) merupakan salah satu turunan dari 5-fluorourasil. Senyawa ini berbentuk serbuk kristal berwarna putih kekuningan (kuning pucat) yang memiliki jarak lebur 193-194⁰C. Struktur senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.3. Spektra NMR senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil Gambar 2.4, Spektra inframerah senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dapat dilihat pada Gambar 2.5.

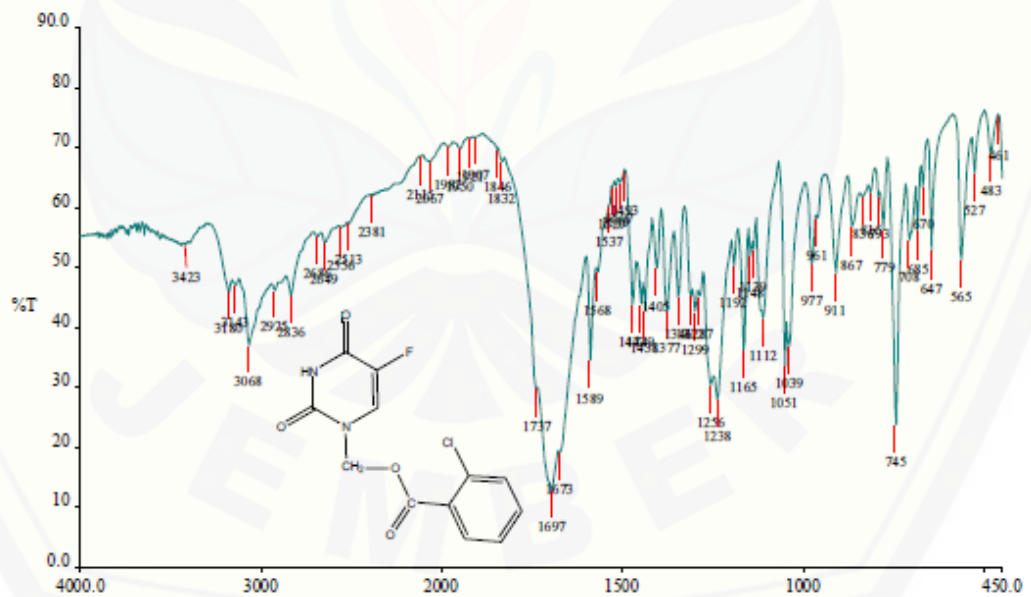


Gambar 2.3 Struktur 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

(Sumber : Febriany, 2013)



Gambar 2.4 Spektra NMR senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (Sumber : Febriany, 2013)

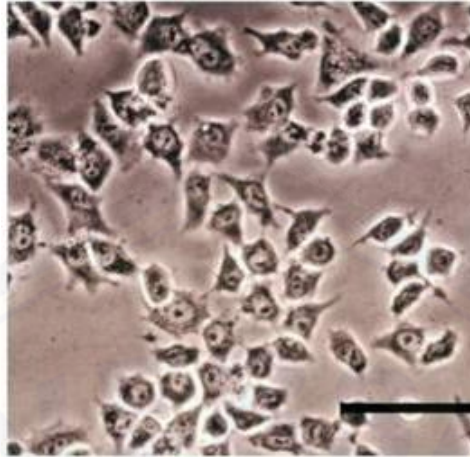


Gambar 2.5 Spektra inframerah senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (Sumber : Febriany, 2013)

2.5 Tinjauan tentang Sel kanker payudara MCF-7

Sel *Michigan Cancer Foundation-7*(MCF-7) merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diisolasi pertama kali pada tahun 1970 diambil dari jaringan payudara *malignant adenocarcinoma* seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif. Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara *monolayer* dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara *in vitro* karena bentuknya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia (Widowati dan Mudahar, 2009).

Sel MCF-7 berasal dari efusi pleura pasien dengan metastasis kanker payudara (Simstein *et al.*, 2013). Alasan digunakan sel MCF-7 karena sel MCF-7 sangat baik dalam model *in vitro* untuk mempelajari mekanisme kemoresistensi yang berhubungan dengan kerentanan apoptosis. Sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Meiyanto *et al.*, 2008). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mempunyai karakteristik yang mirip dengan Hep G2, dimana sel kanker jenis ini mengekspresikan *wildtype* p53 (Fitria *et al.*, 2011). Selain itu sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten terhadap doxorubicin, tidak mengekspresikan caspase-3, sel MCF-7 dapat mengalami apoptosis melalui aktivasi berurutan caspases-9, -7, dan -6, overekspresi Bcl-2, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2, sel MCF-7 ekspresi rendah terhadap P55(TNFR1), sel MCF-7 menginduksi apoptosis melalui TNF α , mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α) (Simstein *et al.*, 2013). Gambar morfologi dari sel MCF-7 dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Morfologi Sel MCF-7
(Sumber : Lokhov dan Balashova, 2010)

2.6 Tinjauan tentang uji Sitotoksik MTT

Viabilitas sel dan uji sitotoksitas digunakan untuk skrining dan tes sitotoksitas suatu obat atau bahan kimia. Pengukuran viabilitas sel dan proliferasi merupakan bentuk dasar untuk berbagai uji in vitro dalam mengetahui respon populasi sel terhadap faktor eksternal.(ATCC, 2011).

Uji *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5 diphenyltetrazolium bromide* (Uji MTT) banyak digunakan untuk mengevaluasi viabilitas sel dalam kultur (Abe dan Matsuki, 2000). Uji MTT merupakan metode kolorimetri yang didasarkan pada perubahan warna kuning *garam tetrazolium-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* yang larut air menjadi warna biru kristal formazan yang tidak larut air akibat enzim succinat-dehidrogenase mitokondria (Sylvester, 2011). Penurunan reduksi MTT dapat digunakan sebagai indeks kerusakan sel (Abe dan Matsuki, 2000). Jumlah produk formazan diukur menggunakan spektrofotometer untuk menghitung viabilitas relatif sel. Absorbansi secara langsung proporsional dengan konsentrasi larutan biru formazan. Diasumsikan bahwa reaksi tersebut hanya terjadi pada sel yang hidup dengan mitokondria yang fungsional. Diasumsikan juga bahwa jumlah formazan yang terbentuk selama

periode tertentu secara langsung proporsional dengan jumlah sel yang hidup tiap sumuran. MTT assay merupakan metode yang tepat, reliable, dan kuantitatif untuk mengukur proliferasi dan viabilitas sel (Sylvester, 2011).

2.7 Tinjauan tentang uji Proliferasi *Doubling Time*

Sifat antiproliferasi ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol sel. *Cell cycle progression* merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferasi suatu sel kanker. Senyawa yang dapat menunda *doubling time* sel, diduga dapat menghambat genen atau protein yang meregulasi daur sel. Penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time*. Hambatan proliferasi sel dilihat dari nilai *slope* pada kurva waktu inkubasi vs viabilitas sel atau dihitung dengan cara ekstrapolasi. *Slope* yang lebih kecil menunjukkan perpanjangan *doubling time* (Utami, 2011).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

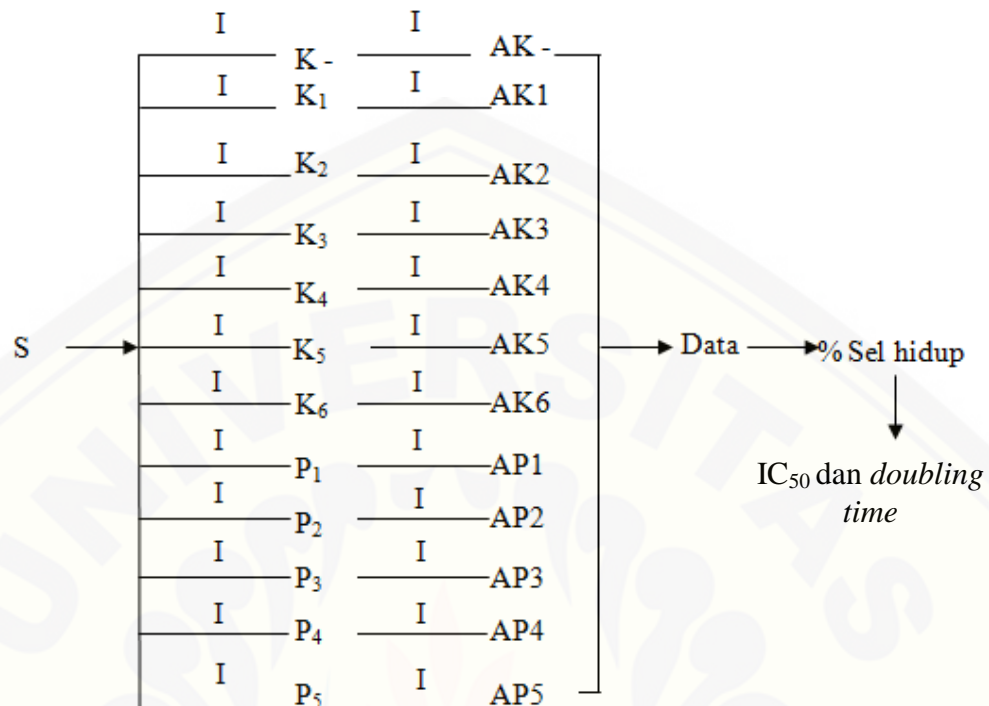
3.2.1 Tempat penelitian

- a. Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk memproduksi senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.
- b. Laboratorium Dasar Bersama (LDB) Universitas Airlangga untuk pemisahan/pemurnian senyawa produk dengan kromatografi kolom dan untuk identifikasi struktur senyawa dengan FTIR *Shimadzu Type IRPrestige-21* dan Hitachi® R-1900 *Permanent Magnet*.
- c. Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk uji kemurnian senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan menggunakan Densitometer winCATS Camag.
- d. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Universitas Gadjah Mada untuk uji sitotoksisitas dan uji proliferasi.

3.2.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2014 sampai bulan april 2015.

3.3 Rancangan Penelitian



Keterangan :

S =Sel Kanker Payudara MCF-7

I =Inkubasi Sel Kanker Payudara MCF-7

K(-) =Kontrol negatif berupa media kultur(DMEM)

K_{1,2,3,4,5,6} =Kontrol positif senyawa 5-FU konsentrasi 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM , 500 μM , 5000 μM

P_{1,2,3,4,5} =Perlakuan senyawa 2-KFU konsentrasi 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM , 500 μM

AK(-) =Absorbansi Kontrol negatif berupa media kultur(DMEM).

AK_{1,2,3,4,5,6} =Absorbansi Kontrol positif senyawa 5-FU konsentrasi 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM , 500 μM , 5000 μM

AP_{1,2,3,4,5} =Absorbansi Senyawa 2-KFU konsentrasi 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM , 500 μM

3.4 Definisi Operasional

Nilai IC_{50} yang didapatkan dari uji sitotoksik merupakan parameter aktivitas dari senyawa uji yaitu senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil, yang kemudian dibandingkan dengan IC_{50} dari 5-Fu. IC_{50} adalah konsentrasi senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil yang dapat membunuh 50% jumlah sel kanker payudara. Nilai IC_{50} dikatakan poten dengan konsentrasi $<50\mu M$. (Boik & Newman, 2008).

Doubling time adalah salah satu metode yang digunakan untuk memprediksi kecepatan pertumbuhan sel kanker (proliferasi sel). Hambatan proliferasi sel dilihat dari nilai *slope* pada kurva waktu inkubasi vs jumlah sel hidup atau dihitung dengan cara ekstrapolasi. Slope yang lebih kecil menunjukkan perpanjangan *doubling time* (Utami, 2011).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi senyawa uji 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil. Konsentrasi senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $0,5\ \mu M$, $5\ \mu M$, $50\ \mu M$, $250\ \mu M$, $500\ \mu M$.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dan *doubling time* sel kanker payudara MCF-7 setelah diberi perlakuan dengan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah jenis sel kanker, cara kultur sel kanker, metode pengujian.

3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.6.1 Alat

- a. Alat untuk sintesis : *beaker glass* (50 mL dan 250 mL) Iwaki Pyrex, erlenmeyer 100 mL (Schoot Duran), *ball* pipet; batang pengaduk, pipet tetes, pipet volume (1mL, 4mL dan 5 mL), gelas ukur (10 mL dan 50 mL) Iwaki Pyrex, vial, corong, chamber, 1 set alat refluks (kondensor dan labu alas bulat leher dua Schoot Duran), corong pisah (Schoot Duran), mikropipet, (Blaubrand® IntraEnd), stirer, neraca analitik digital (Sartorius), *Electrothermal melting point apparatus* Stuart SMP11, FTIR Shimadzu *Type IRPrestige-21*, lampu Ultra Violet (UV), pengering, kamera digital, *Electrothermal melting point apparatus* Stuart SMP11, scanner Densitometer winCATS Camag dan perangkat komputer dengan program winCATS.
- b. Alat yang digunakan dalam uji sitotoksik dan *doubling time* : Inkubator CO₂ 5% (Heraeus Kendro Laboratories, Germany), inverted microscope (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm, Germany), mikropipet (VWR Brand), ELISA reader (Bio-Rad *microplate reader Benchmark*, Jepang), timbangan analitik (Sartorius), vortex (Thermolyne, Sybron), sentrifus (Universal 320 R Hettich), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan), *Tissue culture dish* diameter 10 cm(Iwaki, asahi glass co.,Japan), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), tip kuning dan tip biru (Sorenson, Bio science Inc), *microplate* (96 well, Iwaki, asahi glass co.,Japan), eppendorf, dan tabung pengencer.

3.6.2 Bahan

- a. Bahan untuk sintesis : 5-fluorourasil 99% (Merck), 2-klorobenzoilklorida (Merck) dan formaldehid 37% (s.a.p), aseton p.a (Merck), aquades, trietilamin (TEA), HCl (Sigma Aldrich), NaHCO₃, Natrium Sulfat Anhidrat (s.a.p), heksan p.a (RDH), etil asetat p.a (J.T. Baker) dan lempeng KLT Silica gel 60 F254 (Merck).

- b. Bahan untuk uji sitotoksik dan doubling time : Sel MCF-7 (Laboratorium Parasitologi Kedokteran UGM), DMEM (Nacalay, Japan), FBS 10% (PAA), 5-Fluorouracil (5-FU) (Ebewe, dari PT. Ferron Par Pharmaceutical Cikarang, Indonesia), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Sigma, Aldrich, Germany), penicillin and streptomycin (Gibco), Tripsin (Sigma), *3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) (Sigma).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sintesis Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

Pada penelitian ini, sintesis senyawa target 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dilakukan melalui dua tahap yaitu mereaksikan 5-Fu dengan formaldehid menghasilkan alkohol 1-hidroksimetil-5-fluorourasil (tahap 1) kemudian direaksikan dengan 2-klorobenzoilklorida menghasilkan 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (tahap 2). Mula-mula, 5-Fu sebanyak 1,5 g (11,531 mmol) dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher dua kemudian ditambahkan 0,493 mL (17,819 mmol) formaldehid 37% dan 11,531 mL aquadest. Campuran ini kemudian direfluks dalam *waterbath* dengan suhu dalam labu sebesar 60°C dan distirrer selama 6 jam. Setelah proses refluks selesai, hasil refluks diuapkan pada suhu kamar sampai terbentuk endapan kering 1-hidroksimetil-5-fluorourasil (Puspaningtyas, 2011; Tian *et al.*, 2007). Hasil endapan tahap 1 (dalam labu alas bulat) kemudian ditambahkan aseton p.a sebanyak 230,62 mL(b) dan TEA (trietilamin) sebanyak 1,846 mL. Setelah itu, campuran ini diletakkan dalam *icebath* kemudian ditetesi dengan campuran 1,625 ml 2-klorobenzoilklorida dan 92,248 mL aseton(a) yang berada dalam corong pisah. Penetesan ini dilakukan dengan kecepatan konstan dan disertai dengan penggojogan pada labu alas bulat hingga larutan 2-klorobenzoilklorida dan aseton habis. Selanjutnya, hasil campuran tersebut direfluks pada suhu 40°C dan distirrer selama 6 jam (tahap 2). Setelah refluks selesai, hasil tahap 2 diuapkan pelarutnya (aseton) pada suhu kamar sampai endapan kering (Puspaningtyas, 2011). Tahapan

selanjutnya adalah endapan hasil refluks tahap 2 dilarutkan dalam 46,124 mL aquadest dan 138,372 mL etil asetat.

Hasil campuran kemudian dituangkan ke dalam corong pisah hingga terbentuk 2 fase yaitu fase air dan minyak kemudian dicuci dengan HCl encer pH 3-4 185 mL sebanyak 3 kali dan larutan NaHCO_3 pH 7-8 185 mL sebanyak 3 kali. Pada setiap pencucian baik dengan HCl maupun NaHCO_3 , fase air dibuang dan fase etil asetat yang merupakan fase minyak dikumpulkan. Fase etil asetat yang terkumpul kemudian ditampung ke dalam wadah lain lalu ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat untuk menarik fase air yang tersisa (Puspaningtyas, 2011). Fase etil asetat yang telah bebas air dipisahkan dengan cara dekantasi. Na_2SO_4 anhidrat yang telah terhidrasi oleh molekul air akan mengendap di dasar wadah. Fase etil asetat yang telah bebas air kemudian diuapkan pada suhu kamar sampai terbentuk kristal kering (Febriany, 2013). Kristal ini yang telah terbentuk dipurifikasi menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa yang murni dengan eluen heksan:aseton 6:4. Kemudian diuji kemurniannya dengan menggunakan *melting point tester* dan KLT Densitometri. Dilanjutkan dengan identifikasi struktur menggunakan FTIR (Febriany, 2013).

3.7.2 Preparasi Larutan Uji

Senyawa 5-Fluorourasil ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 2,602 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 40 μl dan ditambahkan PBS sampai 400 μl sehingga diperoleh larutan stock 5-Fluorourasil dengan konsentrasi 50000 μM . Kemudian dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi larutan 5-Fluorourasil sebesar 0,5 , 5 ,50, 250, 500, 5000 μM .

Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 0,6 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 40 μl dan ditambahkan PBS sampai 360 μl sehingga diperoleh larutan stock -(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan konsentrasi 5000 μM . Kemudian

dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi larutan -(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebesar 0,5, 5, 50, 250, 500 μM .

3.7.3 Uji Sitotoksik metode MTT

Sel MCF-7 dengan kepadatan 5×10^3 sel/100 μl MK dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 wellplate. Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media. Kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Diambil *plate* yang berisi sel dari inkubator CO_2 , dibuang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Kemudian dimasukkan 100 μl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* dan tiriskan sisa cairan dengan tisu. Kemudian ditambahkan senyawa 5-Fluorourasil dan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan kadar yang sudah dipreparasi ke dalam sumuran (triplo), inkubasi di dalam inkubator CO_2 selama 24 jam. Sambil menunggu proses inkubasi, disiapkan reagen MTT dan ditambahkan reagen MTT 100 μL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO_2 . Kemudian ditambahkan larutan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 μL . Bungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Menghidupkan ELISA reader, tunggu proses progressing hingga selesai. Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam ELISA reader Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan λ 595 nm. Buat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi. Hitung prosentase sel hidup dan analisis harga IC_{50} dengan SPSS (Probit/Logit) (CCRC, 2009).

3.7.4 Uji Proliferasi sel (*Doubling Time*)

Sel MCF-7 sebanyak 5×10^3 sel/100 μ l MK dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 wellplate. Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media. Kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Diambil *plate* yang berisi sel dari inkubator CO₂, dibuang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Kemudian dimasukkan 100 μ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* dan tiriskan sisa cairan dengan tisu. Kemudian ditambahkan senyawa 5-Fluorourasil dan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan kadar 0,5xIC₅₀, 1xIC₅₀, 1,5xIC₅₀ ke dalam sumuran (triplo) sebanyak 100 μ l, inkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 24,48 dan 72 jam. Sambil menunggu proses inkubasi, disiapkan reagen MTT dan ditambahkan reagen MTT 100 μ L ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO₂. Kemudian ditambahkan larutan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 μ L. Bungkus *plate* dengan kertas atau alumunium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Menghidupkan ELISA reader, tunggu proses progressing hingga selesai. Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam ELISA reader Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader dengan λ 595 nm. Setelah semua sumuran terbaca, tekan tombol STOP dan matikan ELISA reader. Hitung viabilitas sel untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi. (CCRC, 2009).

3.8 Analisis Data

3.8.1 Analisis Data Uji Sitotoksik metode MTT

Data hasil uji sitotoksisitas berupa absorbansi 3 macam kontrol dan senyawa uji meliputi :

- a. Kontrol sel berisi media kultur + sel
- b. Kontrol media berisi media kultur

c. Senyawa uji berisi media kultur + sel + senyawa uji

Absorbansi yang telah diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persen sel hidup dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}) \times 100\%}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})}$$

Setelah diperoleh % sel hidup kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} dengan menggunakan probit pada SPSS 18.0 (CCRC, 2009). Kemudian dilakukan uji t tidak berpasangan dengan menggunakan program SPSS versi 18.0. untuk mengetahui perbedaan signifikan antara hasil dari perlakuan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan control positif (5-fluorourasil. Data dinyatakan signifikan apabila nilai $\alpha < 0,05$ (Ping *et al*, 2013; Siritantikorn *et al*, 2007).

3.8.2 Uji Proliferasi sel (*Doubling Time*)

Untuk melihat aktifitas proliferasi sel MCF-7 pada perlakuan senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil maka dilakukan uji *doubling time*. Hasil uji terhadap sel MCF-7 memperlihatkan bahwa perlakuan dengan 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil ($0,5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$, $1,5 \times IC_{50}$) mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7 pada jam ke 24, 48 dan 72 secara signifikan terhadap kontrol. Buat grafik waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup (utami, 2011). Kemudian ditentukan persamaan garis dengan memplotkan antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. Selanjutnya dicari *doubling time* dengan rumus:

$$\text{Doubling Time (jam)} = \frac{Y - A}{B}$$

Keterangan :

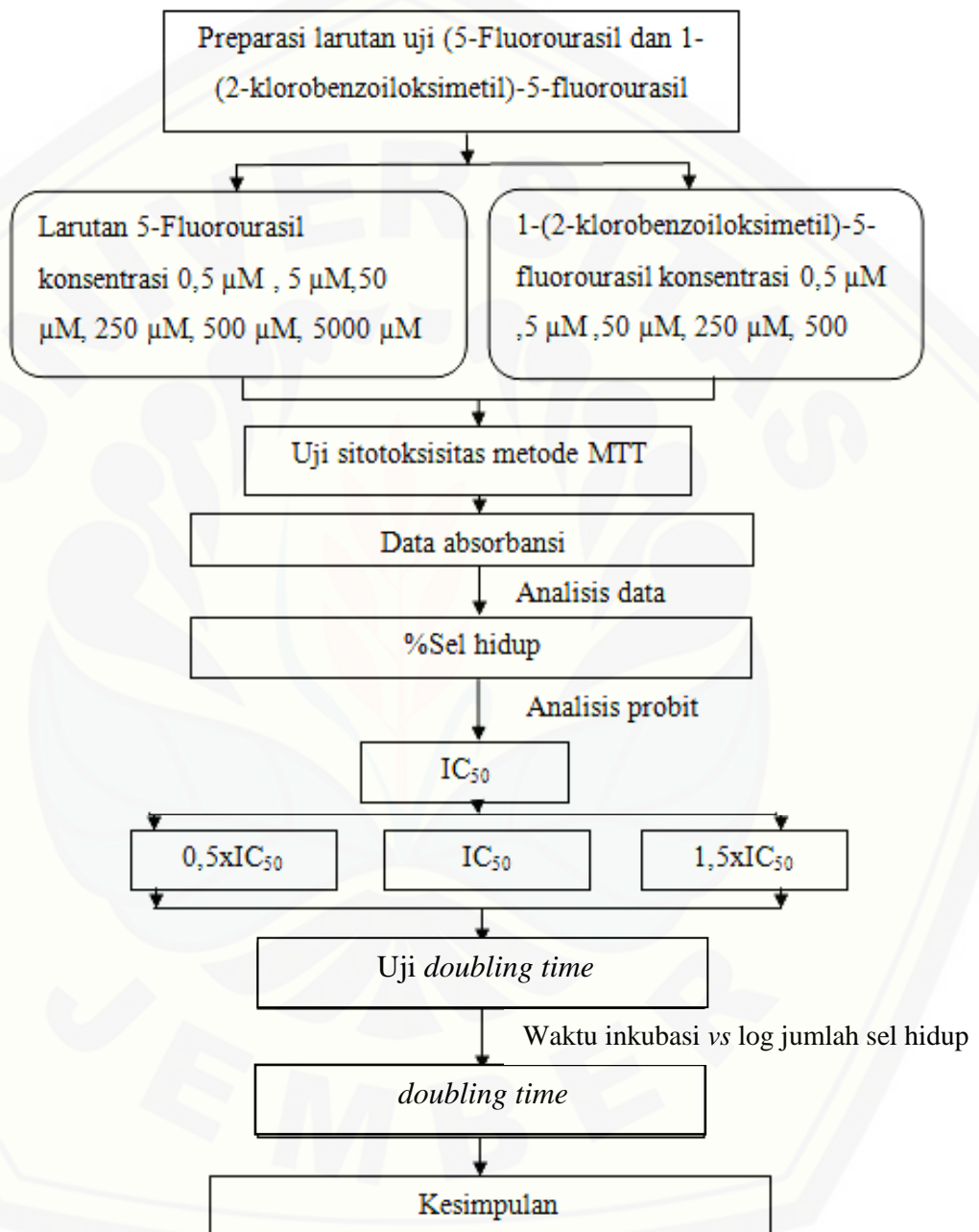
Y = log (2 x jumlah sel hidup awal);

A = intersep;

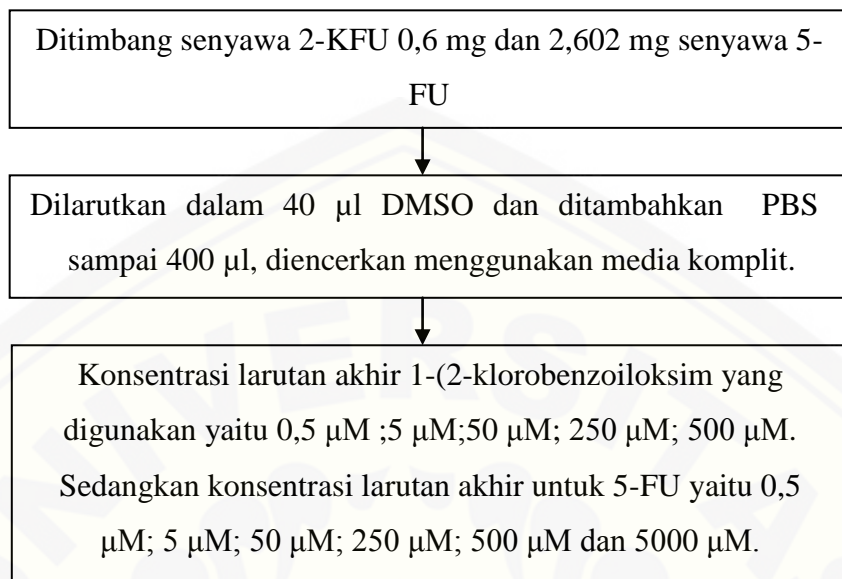
B= slope (Nurani, 2011).

3.9 Alur Penelitian

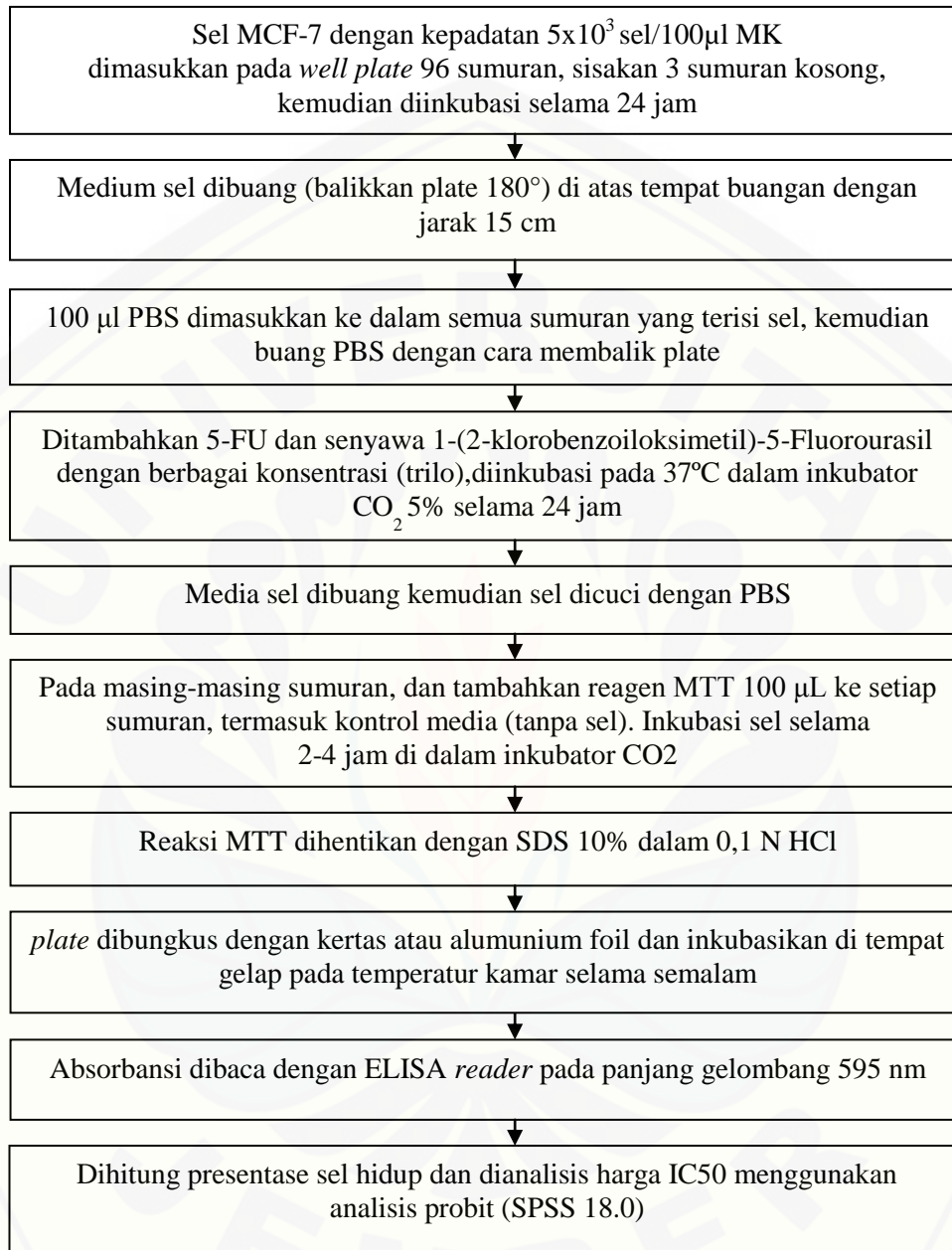
3.9.1 Skema Rancangan Penelitian Aktivitas 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap sel Kanker payudara MCF-7

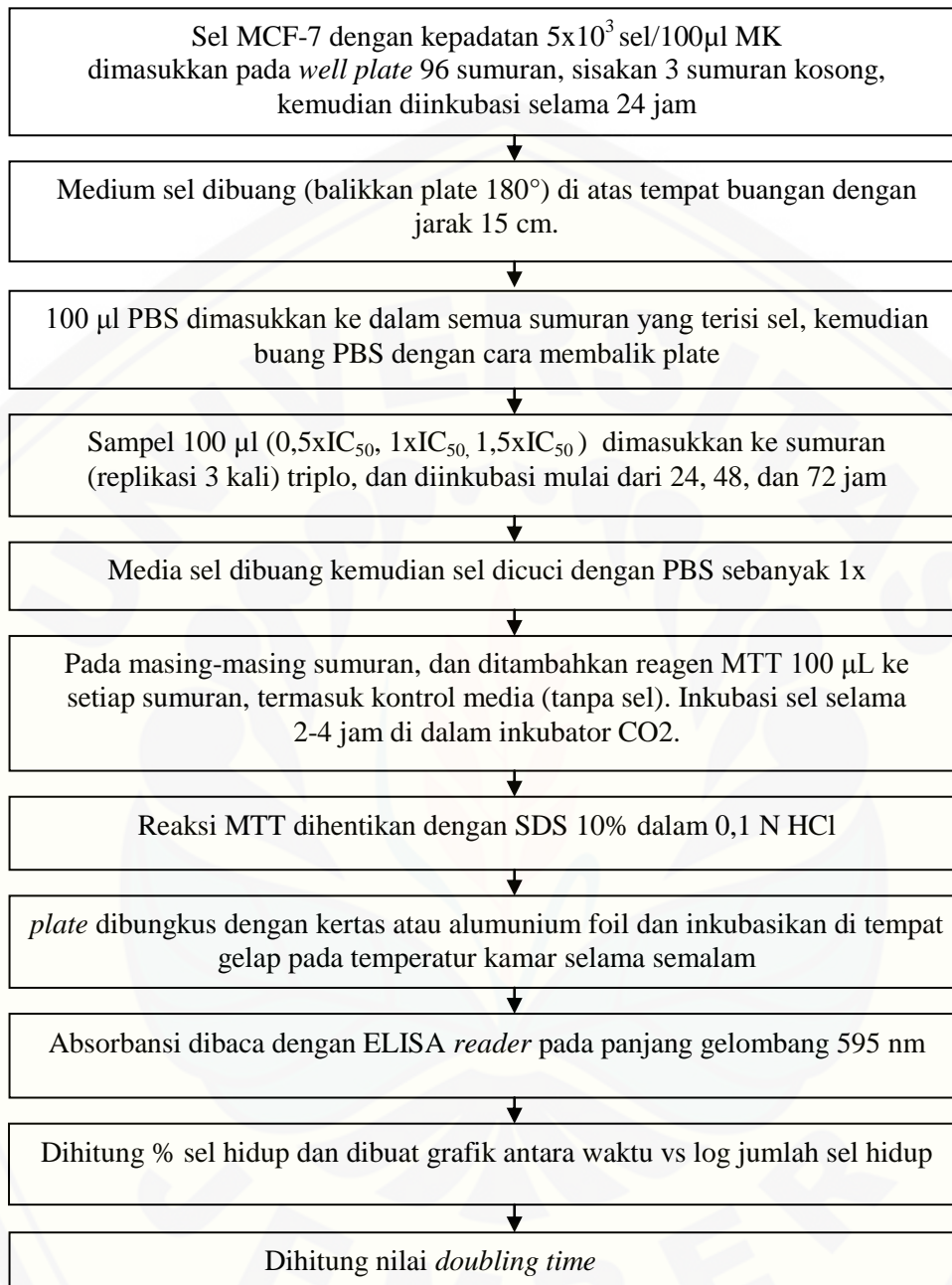


3.9.2 Preparasi Larutan Uji



3.9.3 Uji Sitotoksik metode MTT



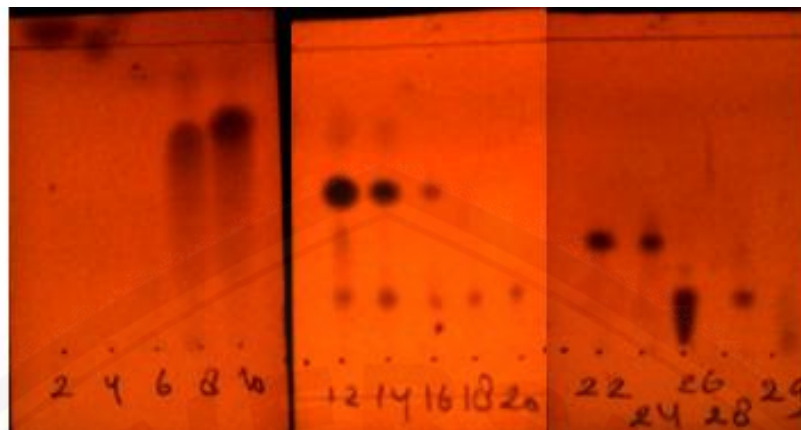
3.9.4 Uji Proliferasi metode *Doubling Time*

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan uji pendahuluan yaitu uji sitotoksik dan uji proliferasi untuk mengetahui aktivitas antikanker turunan 5-Fluorourasil (5-FU) yaitu senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU). Senyawa 2-KFU telah berhasil disintesis oleh Febriany (2013) namun belum diketahui aktivitasnya. Tahapan uji dimulai dengan mensintesis senyawa 2-KFU, kemudian dilanjutkan dengan proses kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa yang murni dan diuji kemurniannya dengan uji jarak lebur dan KLT-Densitometri. Kemudian untuk memastikan senyawa sesuai dengan hasil sintesis Febriany (2013) dilakukan karakterisasi senyawa meliputi identifikasi struktur menggunakan FTIR. Setelah diperoleh senyawa 2-KFU kemudian dilanjutkan dengan uji sitotoksik menggunakan metode MTT dan diperoleh nilai IC_{50} . Kemudian dilanjutkan dengan uji *doubling time* untuk mengetahui pengaruh senyawa uji terhadap waktu proliferasi sel kanker payudara MCF-7.

4.1 Sintesis Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU)

Senyawa 2-KFU disintesis dengan menggunakan tahapan reaksi sesuai dengan yang dilakukan oleh Febriany (2013). Hasil dari tahap akhir sintesis berupa kristal kering (Febriany, 2013). Kristal kering dimurnikan menggunakan kromatografi kolom cair-padat dengan pelarut campuran heksan : aseton (6:4). Hasil penampungan setiap fraksi diuji dengan lempeng KLT untuk melihat jenis noda yang dihasilkan. Hasil penotolan setiap fraksi dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Hasil penotolan setiap fraksi pada kromatografi kolom

Berdasarkan Gambar 4.1 terlihat bahwa noda pada vial 2-4 hanya mengandung eluen, vial 6 mengandung satu senyawa dengan R_f 0,73, vial 8-10 mengandung dua senyawa dengan R_f 0,59 dan 0,76, vial 12-14 mengandung tiga senyawa dengan R_f 0,20, 0,56 dan 0,74, vial 16 mengandung dua senyawa dengan R_f 0,20 dan 0,58, vial 18-20 mengandung satu senyawa dengan R_f 0,23, vial 22-24 mengandung satu senyawa dengan R_f 0,40, vial 26-28 mengandung satu senyawa tetapi noda yang terbentuk *tailing* dengan R_f 0,16. Pengelompokan vial dilakukan berdasarkan nilai R_f yang sama. Nilai R_f yang sama dianggap mengandung senyawa yang sama. Dari beberapa fraksi yang diperoleh dipilih fraksi nomor vial 22-24 (Fraksi A) karena memiliki nilai R_f yang sama dengan hasil sintesis Febriany (2013). Kemudian Fraksi A diuji kemurniannya dengan menggunakan *melting point tester* (Uji jarak lebur) dan KLT-Densitometri. Setelah itu dilanjutkan dengan identifikasi struktur menggunakan FTIR untuk memastikan bahwa Fraksi A merupakan senyawa 2-KFU.

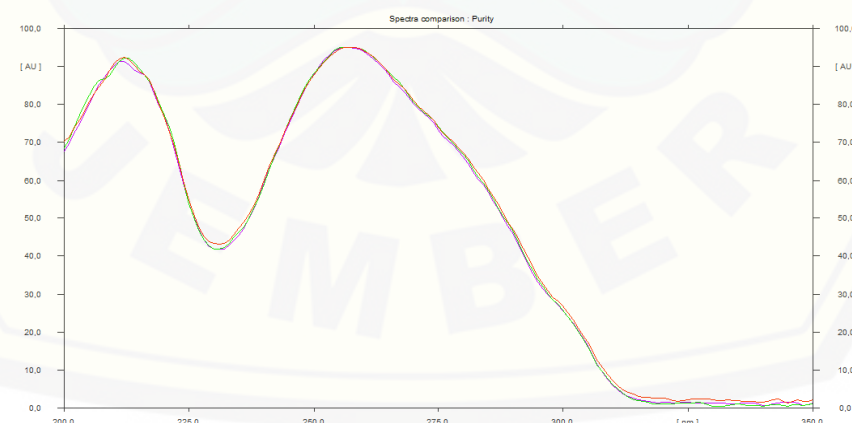
Hasil dari uji jarak lebur untuk fraksi A sama dengan hasil dari sintesis Febriany (2013) yaitu memiliki jarak lebur 193-194⁰C dalam tiga kali replikasi (Febriany, 2013). Data hasil pengujian jarak lebur dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pengujian jarak lebur fraksi A

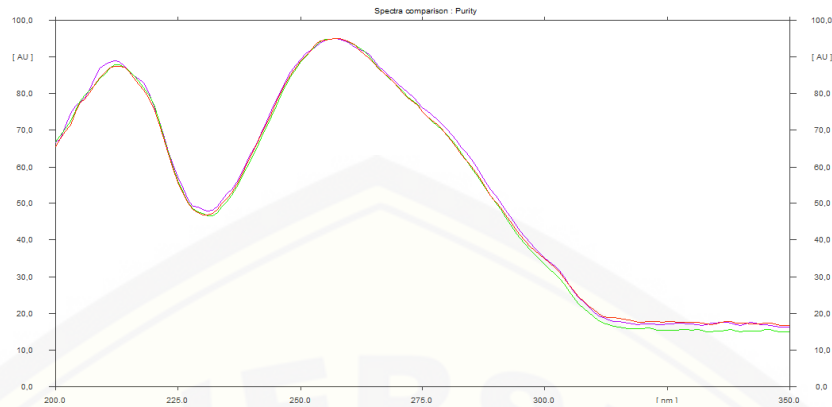
Replikasi	Jarak Lebur
1	193-194 ⁰ C
2	193-194 ⁰ C
3	193-194 ⁰ C
Rata-rata	193-194 ⁰ C

Uji kemurnian selanjutnya yaitu dengan KLT-Densitometri. Senyawa diekstraksi dengan tiga eluen yang berbeda kepolarannya yaitu eluen heksan:aseton 6:4 (Eluen 1), heksan:etil asetat 6:4 (Eluen 2) dan heksan:etil asetat:aseton 5:3:2 (Eluen 3) dengan fase diam silica gel 60 F 254 dan detektor lampu UV 254 nm (Puspaningtyas, A., 2011). Kemudian lempeng hasil eluasi dari tiga eluen tersebut diuji *purity* dengan menggunakan densitometer.

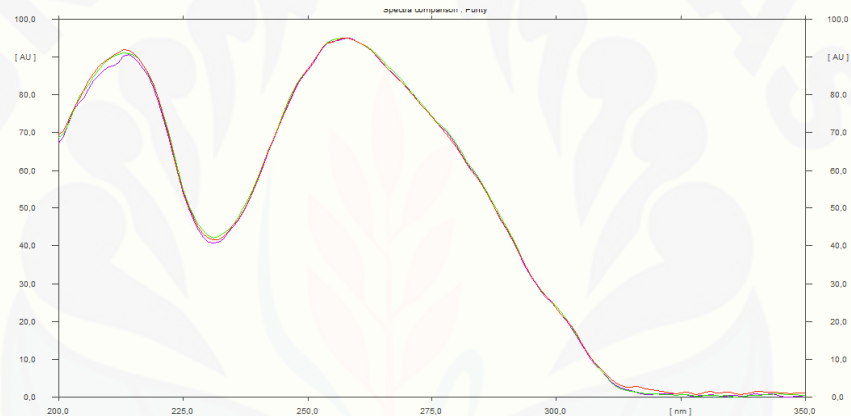
Nilai *purity* dikatakan bagus (*ok*) jika mempunyai nilai $r(s,m) \geq 0,999$ dan $r(m,e) \geq 0,999$. Pada spektra densitometer *s* merupakan *start* (awal) puncak kromatogram, *m* merupakan *medium* (puncak) puncak kromatogram dan *e* merupakan *end* (akhir) puncak kromatogram. Spektra hasil uji *purity* menggunakan eluen 1 dapat dilihat pada Gambar 4.2, Spektra hasil uji *purity* menggunakan eluen 2 dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Spektra hasil uji *purity* menggunakan eluen 3 dapat dilihat pada Gambar 4.4. Nilai R_f dan nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ hasil uji *purity* yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 4.2.



Gambar 4.2 Spektra hasil uji *purity* fraksi A menggunakan eluen 1 (heksan:aseton 6:4)



Gambar 4.3 Spektra hasil uji *purity* fraksi A menggunakan eluen 2 (heksan:etil asetat 6:4)

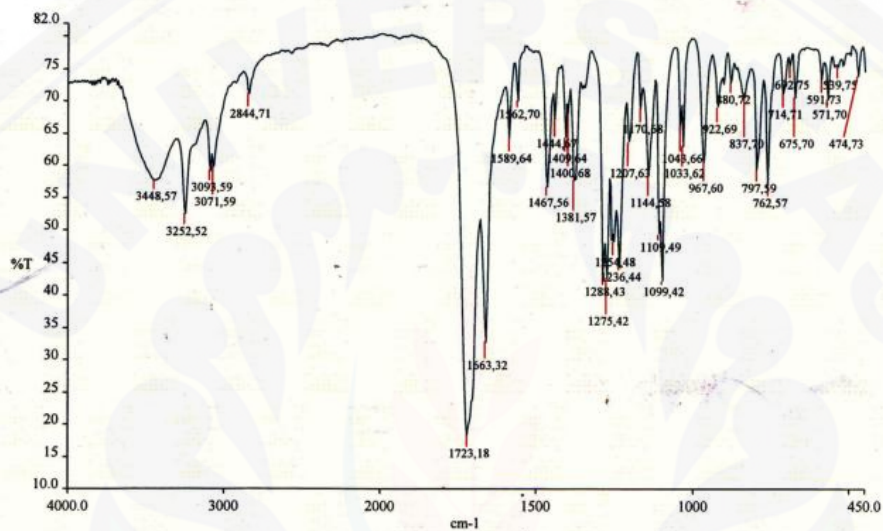


Gambar 4.4 Spektra hasil uji *purity* fraksi A menggunakan eluen 3 (heksan:etil asetat: aseton 5:3:2)

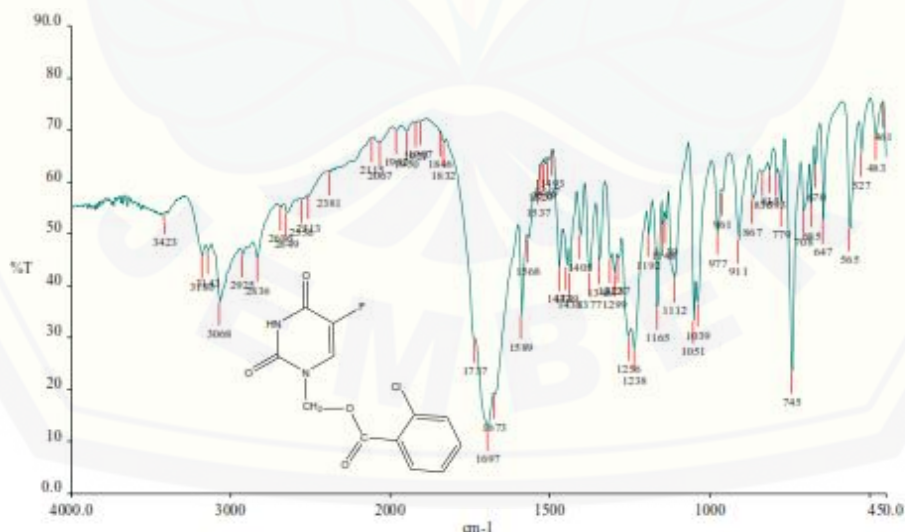
Tabel 4.2 Nilai R_f dan nilai r (s,m) dan r (m,e) hasil uji *purity* fraksi A

Jenis eluen	R_f	Rata-rata R_f	R (s,m)	R (m,e)	<i>Purity</i>
Eluen 1	0,41	0,40	0,999895	0,999648	ok
	0,40		0,999790	0,999447	ok
	0,40		0,999900	0,999399	ok
Eluen 2	0,49	0,48	0,999784	0,999346	ok
	0,48		0,999731	0,999536	ok
	0,48		0,999844	0,999473	ok
Eluen 3	0,43	0,44	0,999856	0,999450	ok
	0,44		0,999792	0,999224	ok
	0,45		0,999879	0,999453	ok

Dari Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa nilai r (s,m) dan r (m,e) hasil uji *purity* $\geq 0,999$ sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi A murni secara densito. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi struktur menggunakan FTIR untuk memastikan bahwa Fraksi A merupakan senyawa 2-KFU. Gambar Spektra Inframerah senyawa fraksi A dapat dilihat pada Gambar 4.5. Gambar Spektra Inframerah senyawa 2-KFU hasil sintesis Febriany (2013) dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.5 Spektra Inframerah fraksi A



Gambar 4.6 Spektra Inframerah senyawa 2-KFU hasil sintesis febriany (sumber : Febriany, 2013)

Serapan yang muncul pada Gambar 4.5 kemudian dibandingkan dengan serapan yang muncul pada Gambar 4.6. Perbandingan serapan antara kedua spektra dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Perbandingan serapan FTIR antara fraksi A dengan hasil sintesis Febriany dan dari literatur (Pavia *et al.*, 2001)

Tipe Vibrasi	Frekuensi (cm-1) dari literatur (Pavia <i>et al.</i>, 2001)	Frekuensi (cm-1) dari penelitian sebelumnya (Febriany, 2013)	Frekuensi (cm-1) dari sintesis baru
C=O amida	1680-1630	1673	1663,32
O-H	3650-3200	3439	3448,57
C-F	1400-1000	1051	1043,66
C-Cl ring	1100-1035	1039	1033,62
C=O ester	1750-1730	1737	1723,18
C=C	1680-1600 (m-w) 1600-1450 (m-s)	1589-1493	1589,64
Orto- disubstitusi benzen	750 (s)	745	762,57

Pada Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa seluruh gugus fungsi dalam struktur senyawa hasil muncul pada frekuensi sesuai dengan literatur meskipun serapan-serapan yang muncul terjadi sedikit pergeseran dikarenakan alat yang digunakan sebelumnya pernah mengalami kerusakan, selain itu waktu identifikasi senyawa juga berbeda. Namun hasil yang didapat masih masuk dalam rentang serapan secara literatur Pavia *et al.*, (2001). Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa fraksi A benar-benar senyawa 2-KFU yang sama dengan senyawa yang disintesis oleh Febriany (2013).

4.2 Uji sitotoksik 5-FU dan 2-KFU terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 menggunakan metode MTT

Uji sitotoksitas adalah prosedur *screening standart* untuk menilai sitotoksitas suatu bahan obat. Salah satu metode uji sitotoksitas yang sering digunakan yaitu dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Uji ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup (Meizarini, Asti. 2005).

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yang berwarna kuning akan direduksi menjadi garam formazan yang berwarna ungu oleh enzim *suksinat dehidrogenase* yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup, reaksi dibiarkan terjadi selama 4 jam. Waktu inkubasi yang lebih lama akan mengakibatkan peningkatan intensitas warna dan peningkatan sensitivitas sampai titik tertentu. Namun, waktu inkubasi terbatas karena sifat reagen deteksi sitotoksik membutuhkan energi (ekivalen dengan reduksi NADH) dari sel untuk menghasilkan sinyal. Pada populasi sel dalam pertumbuhan fase log, jumlah produk formazan umumnya sebanding dengan jumlah sel yang hidup secara metabolik. Namun kondisi tertentu dapat mengubah metabolisme sel yang kemungkinan akan mempengaruhi laju reduksi MTT menjadi formazan. Misalnya, ketika sel-sel dalam keadaan konfluen sehingga pertumbuhan sel menjadi terhambat, dengan begitu metabolisme sel menjadi lambat dan reduksi MTT akan rendah. Situasi tersebut akan menyebabkan hilangnya linearitas antara absorbansi dengan jumlah sel (Riss *et al.*, 2013). Sel yang mati akan kehilangan kemampuan untuk mengkonversi MTT menjadi formazan, sehingga perubahan warna yang terjadi berfungsi sebagai penanda bahwa sel masih hidup (Riss *et al.*, 2013).

Formazan terakumulasi sebagai endapan yang tidak larut di dalam sel. Formazan harus dilarutkan sebelum pembacaan absorbansi. Untuk melarutkan

formazan ditambahkan reagen stopper. Reagen stopper tersebut akan melisiskan membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel dan melarutkan garam formazan tersebut. Salah satu reagen stopper yang sering digunakan dalam uji sitotoksitas metode MTT yaitu SDS 10% dalam HCl 0,01N. SDS 10% dalam HCl 0,01N merupakan reagen yang sangat baik untuk melarutkan garam formazan. Garam formazan yang telah larut akan berwarna kekuning-kuningan sehingga lebih mudah dalam pengamatan. Selain itu penggunaan stopper SDS juga dapat menghindari hilangnya kristal formazan akibat pencucian dengan PBS karena penggunaan stopper SDS langsung dalam kultur media tanpa harus dilakukan pencucian terlebih dahulu (Septisetyani *et al.*, 2014).

Hasil uji sitotoksitas berupa data absorbansi yang kemudian dikonversi menjadi % sel hidup. Kemudian nilai IC_{50} dihitung dengan analisis probit menggunakan program SPSS 18.0. Nilai IC_{50} ini merupakan gambaran efek sitotoksik senyawa yang diberikan senyawa uji, yaitu kadar yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50% (Fitria *et al.*, 2011). Data IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Data IC_{50} senyawa 5-FU dan 2-KFU

No.	Senyawa	IC_{50} (μ M)	Rata-rata \pm SD	CV(RSD)
1	5-FU	3291,156	4201,88 \pm 824,7266	19,628
		4416,184		
		4898,302		
		210,807		
2	2-KFU	196,021	196,205 \pm 14,5104	7,396
		181,788		

Hasil replikasi menunjukkan nilai yang presisi dengan nilai Standar Deviasi Relatif (RSD) sebesar 19,628 % untuk 5-FU dan 7,396 % untuk 2-KFU. Rentang syarat RSD untuk sampel biologis yaitu < 30 % (Vanderperren *et al.*, 2004). Dari Tabel 4.4 terlihat bahwa senyawa 2-KFU memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar 196,205 μ M dan untuk senyawa 5-FU sebesar

4201,88 μM . Berdasarkan literatur, IC_{50} dikatakan poten apabila konsentrasinya $<50 \mu\text{M}$ (Boik & Newman, 2008). Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa 5-FU dan senyawa 2-KFU belum bisa dikatakan sebagai agen antikanker yang poten. Namun, aktivitas sitotoksik senyawa 2-KFU lebih besar dari 5-FU.

Dari data IC_{50} yang telah diperoleh kemudian dilanjutkan dengan uji t tidak berpasangan (*Independent t-test*) yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antara senyawa 5-FU dan 2-KFU. Uji t dilakukan dengan menggunakan program SPSS 18.0 dengan taraf kepercayaan 95%. Adanya perbedaan signifikan diantara kedua senyawa ditunjukkan dengan nilai α (sig) <0.05 . Dengan demikian dari hasil statistik IC_{50} senyawa 5-FU dan 2-KFU menunjukkan ada perbedaan yang signifikan dengan nilai α (sig) sebesar 0,014.

Dengan demikian dapat dilihat bahwa senyawa 2-KFU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi dibandingkan dengan 5-FU dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7. Hal ini dikarenakan senyawa 2-KFU memiliki lipofilitas atau Log P yang lebih tinggi dari 5-FU yaitu sebesar 1,37 dan dibawah 2 (Febriany, 2013). Sehingga senyawa 2-KFU lebih mudah menembus membran biologis untuk mencapai reseptor target. Substitusi gugus ester dan kloro bertujuan untuk meningkatkan sifat keelektronikan yang berhubungan dengan ikatan terhadap reseptor, sehingga aktivitasnya meningkat karena gugus ester dan kloro memiliki sifat sebagai penarik elektron. Gugus kloro pada posisi –*orto* bertujuan untuk meningkatkan sifat sterik dari senyawa dikarenakan posisi –*orto* dapat bertindak sebagai deaktivasi dari cincin benzoil sehingga akan memperpanjang kerja obat dengan melindungi gugus senyawa induk dari serangan metabolik. Karena senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dapat aktif jika mengalami metabolisme (Siswandono & Soekardjo, 2008; Avendano dan Menendes, 2008).

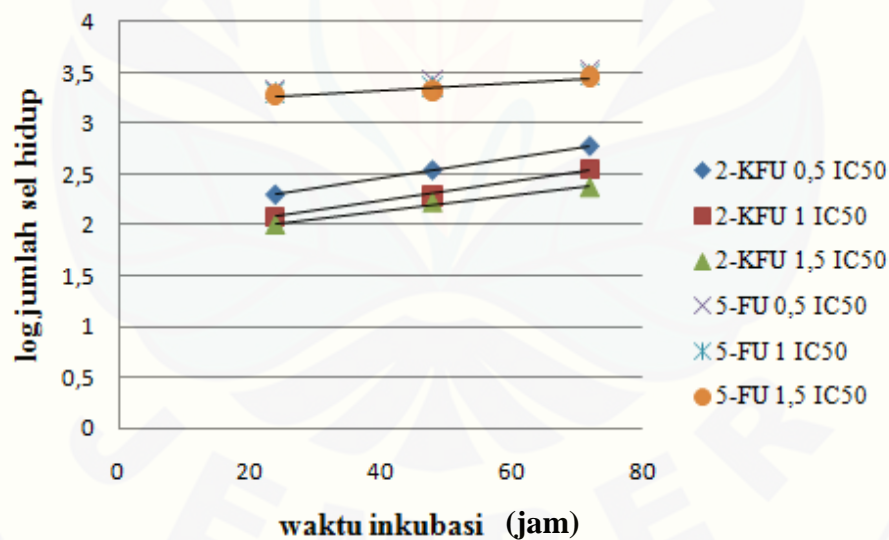
Sifat sitotoksik dapat dikaitkan dengan kemampuan senyawa untuk memacu terjadinya *cell cycle arrest* atau memacu apoptosis sel kanker, untuk itu perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut dengan uji *doubling time* dan pengecatan DNA. Namun dalam penelitian ini hanya dilakukan uji *doubling time* karena

diperkirakan bahwa sifat sitotoksik dari 2-KFU berkaitan dengan terjadinya *cell cycle arrest*.

4.3 Efek Penghambatan Proliferasi dari 5-FU dan 2-KFU pada Sel Kanker Payudara MCF-7 Menggunakan Uji *Doubling Time*

Cell cycle progression merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferasi suatu sel kanker. Penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time* dengan menggunakan metode MTT.

Pemilihan kadar dari larutan uji yang digunakan adalah 0,5 IC₅₀, 1 IC₅₀ dan 1,5 IC₅₀ agar sel dapat diamati pertumbuhannya serta morfologinya karena sel tidak banyak yang mati. Hasil uji *doubling time* terhadap proliferasi sel kanker MCF-7 dapat dilihat pada Tabel 4.6. Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan 2-KFU dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.7 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan 2-KFU

Tabel 4.5 Hasil uji *doubling time* terhadap proliferasi sel kanker MCF-7

Senyawa	Konsentrasi (μM)	Persamaan waktu vs log jumlah sel hidup	Waktu doubling time(jam)
2-KFU	100 (0,5IC ₅₀)	$Y = 9,771 \times 10^{-3} X + 2,071$	197,4
	200(1 IC ₅₀)	$Y = 9,708 \times 10^{-3} X + 1,847$	221,8
	300(1,5IC ₅₀)	$Y = 7,813 \times 10^{-3} X + 1,824$	278,5
	2100(0,5IC ₅₀)	$Y = 4,167 \times 10^{-3} X + 3,225$	185,9
5-FU	4200(1 IC ₅₀)	$Y = 3,729 \times 10^{-3} X + 3,202$	214,0
	6300(1,5IC ₅₀)	$Y = 3,771 \times 10^{-3} X + 3,168$	220,6

Dalam penentuan *doubling time* jumlah sel pada waktu inkubasi jam ke-0 tidak digunakan dalam pembuatan persamaan, karena pada waktu ini sel masih dalam masa adaptasi sehingga tidak representatif menggambarkan kinetika pertumbuhan sel yang sesungguhnya.

Doubling time merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. Berdasarkan literatur, *doubling time* sel kanker MCF-7 sekitar 24 jam (Sutherland *et al.*, 1983). Dari Tabel 4.5 dapat dilihat semakin tinggi konsentrasi senyawa, penghambatan proliferasinya juga semakin besar dan waktu *doubling time* sel kanker payudara MCF-7 yang diberi perlakuan senyawa 2-KFU lebih panjang dari 5-FU. Nilai *doubling time* senyawa 2-KFU untuk konsentrasi 0,5 IC₅₀ (100 μM) sebesar 197,4 jam, konsentrasi 1IC₅₀ (200 μM) sebesar 221,8 jam dan untuk konsentrasi 1,5 IC₅₀ (300 μM) sebesar 278,5 jam. Sedangkan untuk 5-FU untuk konsentrasi 0,5 IC₅₀ (2100 μM) sebesar 185,9 jam, konsentrasi 1IC₅₀ (4200 μM) sebesar 214,0 jam dan konsentrasi 1,5 IC₅₀ (6300 μM) sebesar 220,6 jam. Dengan demikian senyawa 2-KFU mampu menghambat proliferasi sel kanker MCF-7 $\frac{1}{2}$ kali lebih lama daripada 5-FU. Hal ini dikarenakan senyawa 2-KFU memiliki lipofilitas atau Log P yang lebih tinggi dari 5-FU yaitu sebesar 1,37 dan dibawah 2 (Febriany, 2013). Sehingga senyawa 2-KFU lebih mudah menembus membran biologis untuk mencapai reseptor target.

Mekanisme 2-KFU dalam menghambat proliferasi sel MCF-7 diperkirakan dengan menghambat enzim timidilat sintase. Enzim timidilat sintase

merupakan katalis reaksi reduksi metilasi deoksiuridin monofosfat (dUMP) menjadi deoksitimidin monofosfat (dTMP). Reaksi ini yang diperlukan untuk replikasi dan perbaikan DNA sel. Jika enzim timidilat sintase dihambat maka akan terjadi ketidakseimbangan deoksinukleotida yang kemudian menyebabkan kerusakan DNA. Enzim timidilat sintase dihasilkan pada daur sel fase G1 yang kemudian diperlukan untuk menginisiasi fase S. Jika enzim timidilat sintase dihambat maka siklus sel akan berhenti pada fase G1, dengan begitu proliferasi sel akan terhambat (Longley *et al.*, 2003).

Pada tiap tahap dari *cell cycle* baik G1, S, G2 dan M akan ada mekanisme kontrol/ *check point* yang sebagian besar melibatkan protein p53. Jika terjadi kerusakan DNA, p53 akan menginduksi terjadinya *cell cycle arrest* (Longley *et al.*, 2003). Respon tersebut bertujuan memberikan waktu untuk memperbaiki kerusakan DNA (Hanahan & Weinberg, 2000). Namun jika kerusakan DNA tidak bisa diperbaiki, p53 akan menginduksi terjadinya kematian sel yang dinamakan apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang sudah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan yaitu:

1. Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU) memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dari pada 5-fluorourasil (5-FU) dengan nilai rata-rata IC_{50} 2-KFU sebesar 196,205 μM dan untuk 5-FU sebesar 4201,88 μM .
2. Senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (2-KFU) mampu menghambat waktu proliferasi sel MCF-7 $\frac{1}{2}$ kali lebih lama dari 5-fluorourasil (5-FU). Pada 2-KFU untuk konsentrasi 0,5 IC_{50} ; 1 IC_{50} dan 1,5 IC_{50} waktu *doubling timenya* berturut-turut 197,4; 221,8; 278,5 jam dan untuk 5-FU berturut-turut 185,9; 214,0; 220,6 jam.

5.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut, peneliti menyarankan untuk :

1. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan sel kanker lain, antibodi maupun sel normal untuk mengetahui selektifitas senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil.
2. Perlunya dilakukan uji aktivitas antikanker secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, K. & Matsuki, N. 2000. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, 38: 325–329.
- Akbari, R. & Javar, H.A. 2013. Efficacy of Capecitabine and 5- Fluorouracil (5-FU) on The Human Breast Cancer Cell Line (MCF7)– Effect of Concentration. *American Journal of Research Communication* 1 (16): 75-91.
- Alison, M.R. 2001. *Cancer*, Encyclopedia of Life Sciences, pp. 1-8.
- Avendano,C. & Menendez, J.C. 2008. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Ed 1st. UK: Elsevier.
- ATCC. 2011. MTT Cell Proliferation Assay. <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx> [5 Januari 2015]
- Boik, J.C & Newman, R.A. 2008. Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds. *BMC Pharmacology* 2008, 8:12
- Budiman, A., Khambri, D. & Bachtiar, H. 2013. Faktor Yang Mempengaruhi Kepatuhan Berobat Pasien Yang Diterapi Dengan Tamoxifen Setelah Operasi Kanker Payudara. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2013;2(1).
- CCRC. 2009a. *Prosedur Tetap Uji Pengamatan Proliferasi Sel (Doubling Time)*. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/15-uji-doubling-time.pdf> [20 September 2014].

- CCRC. 2009b. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/10_sop-uji_sitotoksik-metode-mtt.pdf [20 September 2014].
- Chairio, novi. 2011. "Optimasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri pada Penetapan Kadar Nikotin dalam Fraksi Kloroform Ekstrak Etanolik Daun Tembakau". Tidak diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Febriany, Sherla. 2013. "Sintesis 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Sebagai Pengembangan Obat Kanker". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Fitria, M., Armandari, I., Septhea, D.B. Ikawati, A.H.M., & Meiyanto, E. 2011. Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) Berefek Sitotoksik dan Menginduksi Apoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7. *Bionatura – Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik*. Vol. 13, No. 2, Juli 2011 : 101 – 107.
- Ginsburg, O.M. & Love, R.R. 2011. Breast Cancer: A Neglected Disease for the Majority of Affected Women Worldwide. *Breast J.* 2011 May-Jun; 17(3): 289–295.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell* 100: 57-70.
- Hondermarck, Hubert. 2003. Breast Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics* 2.5.
- Lokhov, P.G. & Balashova, E.E. 2010. Cellular Cancer Vaccines: an Update on the Development of Vaccines Generated from Cell Surface Antigens. *Journal of Cancer* 2010.
- Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Cancer Res.* 3 (5): 330-338.

- Meiyanto,E., Susidarti,R.A., Handayani, S. & Rahmi, F. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19 (1): 12 – 19.
- Menkes. 2007. Pedoman Teknis Pengendalian Kanker Payudara dan Kanker Leher Rahim. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 796/MENKES/SK/VII/2010.
- Meizarini, Asti. 2005. Sitotoksisitas bahan restorasi cyanoacrylate pada variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan MTT assay. *Maj. Ked. Gigi.* (Dent. J.), Vol. 38. No. 1 Januari 2005: 20–24.
- Miura, K., *et al.* 2010. 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers* 2010, 2, 1717-1730.
- Novianti, F.A. & Purnami,S.W. 2012. Analisis Diagnosis Pasien Kanker Payudara Menggunakan Regresi Logistik Dan Support Vector Machine (SVM) Berdasarkan Hasil Mamografi. *Jurnal Sains Dan Seni ITS* .vol.1:hal147-52.
- Nurani,L.H. 2011. Uji Sitotoksisitas, Antiproliferatif, Dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi p53 Dan Bcl2 Dari Fraksi Etanol Infusa Daun Teh (*Camellia Sinensis* (L.) O.K.) Terhadap Sel Hela. *Majalah Obat Tradisional*, 16(1), 14 – 21, 2011.
- Nurulita, N.A. & Siswanto,A. 2007. Efek sitotoksik dan antiproliferatif ekstrak kloroform buah mahkota dewa terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 3(4): 168–75.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., & Kriz, G.S. 2001. *Introduction to Spectroscopy 3rd Edition: Guide for Student of Organic Chemistry*. Washington : Thomson Learning Inc.
- Ping, K.Y., Darah, I., Chen, Y. & Sasidharan, S. 2013. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirta* in MCF-7 cell line model using comet assay. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(9): 692-696.

- Puspaningtyas, A.R. 2011. *Modifikasi Struktur 5-FU dan Uji sitotoksik turunan 1-(benzoioksimetil)-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.
- Retnaningtyas, Y., Wulandari, L. & Erliana, F. 2012. Development and validation of TLC densitometry method for the determination of Gliclazide in tablet dosage form. *International Current Pharmaceutical Journal* 2012, 1(10): 332-335.
- Riss, T.L., *et al.* 2013. *Cell Viability Assays*. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065. [19 Mei 2015].
- Ritmaleni & Nurcahyani, W. 2006. Sintesis 4-fenil-3,4-tetrahidro-indeno.[2,1]-pirimidin-2-on (LR-1). *Dalam : Majalah Farmasi Indonesia*, Vol.17(3), 2006, p 149 – 155.
- Septisetyani, E.P., Ningrum, R.A., Romadhani, Y., Wisnuwardhani, P.H. & Santoso, A. 2014. Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazan solvent and comparison of 3-(4,-5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay with wst-1 assay in MCF-7 cells. *Indonesian j. Pharm.* Vol. 25 no. 4 : 245 – 254.
- Simstein, Rebecca., Burow,M., Parker,A., Weldon,C. & Beckman,B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003 228: 995.
- Siriantikorn, A.,*et al.* 2007. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355 (2007) 592–596.
- Siswandono & Soekardjo, B. 2000a. *Kimia Medisinal*. Jilid 1 Edisi ke-2. Surabaya :Airlangga University Press.
- Siswandono & Soekardjo, B. 2000b. *Kimia Medisinal*. Jilid 2 Edisi ke-2. Surabaya :Airlangga University Press.

- Sutherland, R.L, Hall, R.E. & Taylor, L.W. Cell Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Mammary Carcinoma Cells in Culture and Effects of Tamoxifen on Exponentially Growing and Plateau-Phase Cells. *Cancer research* 43,3998-4006, September 1983.
- Syaifudin, M. 2007.Gen Penekan Tumor *p53*, Kanker dan Radiasi Pengion. *Buletin Alara, Volume 8 Nomor 3, April 2007,119 – 128*.
- Sylvester, P.W. 2011. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Methods in Molecular Biology*, 716: 157-168.
- Tian, Z.Y., Du, G.J., Xie, S.Q., Zhao, J., Gao, W.Y. & Wang, C.J. 2007. Syntesis and Bioevaluation of 5-Fluorouracil Derivates. *Molecules*, Vol.12, 2007, p 2450-2457.
- Utami, Dwi. 2011. Aktivitas Antiproliferasi Isolat 4 Ekstrak Petroleum Eter Daun *Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada Sel Kanker Serviks Manusia (Hela). *Molekul*, Vol. 6. No. 2. Nopember, 2011: 57 – 65.
- Vanderperren, H., *et al.* 2004. TEQ-value determinations of animal feed; emphasis on the CALUX bioassay validation. *Talanta* 63 (2004) 1277–1280.
- WHO. 2009. *Cancers* [serial on line] http://www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_cancers_en.pdf. [5 Januari 2015]
- Widowati, L. & Mudahar, H. 2009. Uji aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhoniumflagelliforme* (Lood) Bi) terhadap Sel Kanker Payudara *MCF-7 In Vitro*. *Media Litbang Kesehatan*, 19 (1): 9-14.
- WolframAlpha. 2011. *5-fluorouracil*. [serial on line] <http://www.wolframalpha.com/input/?i=5-fluorouracil>. [24 Desember 2014].

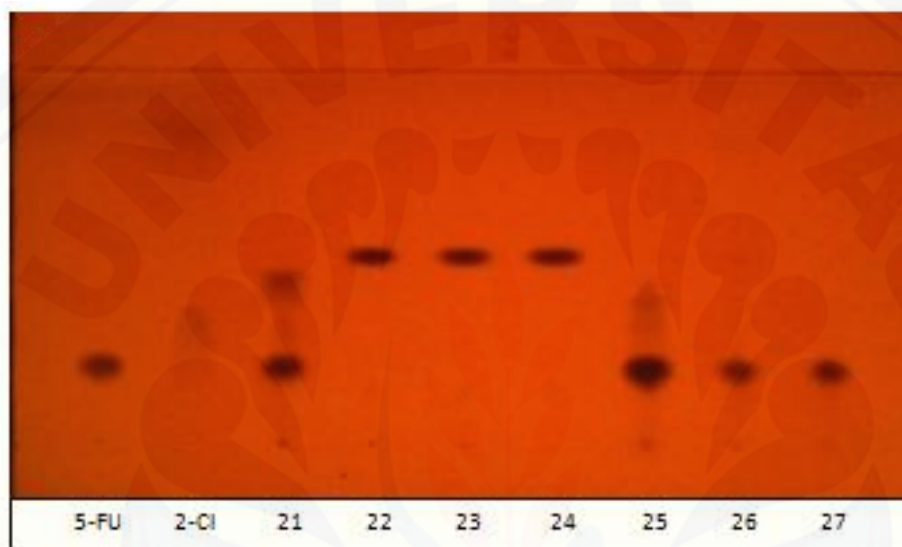
Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.J., & Chen, W.S. 2008. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, Vol. 200 (13), p 1551-1569.



LAMPIRAN

A. Hasil uji pemurnian dengan menggunakan KLT-Densitometri

A1. Gambar penotolan vial no.21-27



A2. Gambar penotolan fraksi A pada tiga eluen yang berbeda



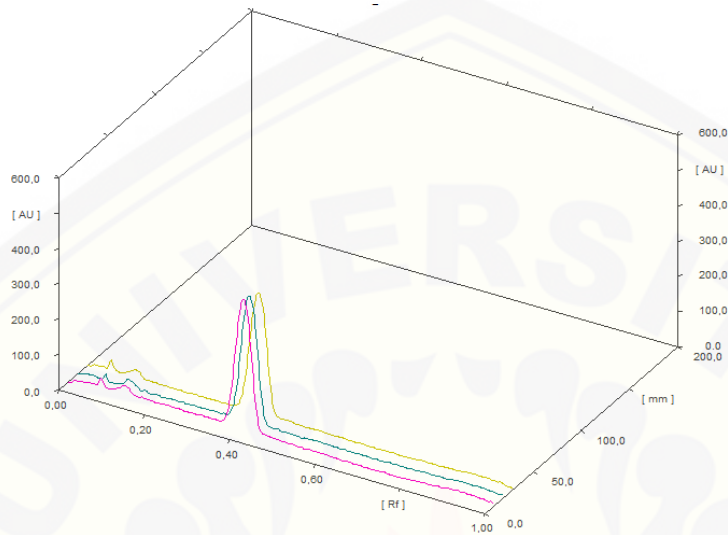
Eluen heksan:aseton
6:4

Eluen heksan:etil asetat
6:4

Eluen heksan:etil asetat:
aseton 5:3:2

A3. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:aseton 6:4

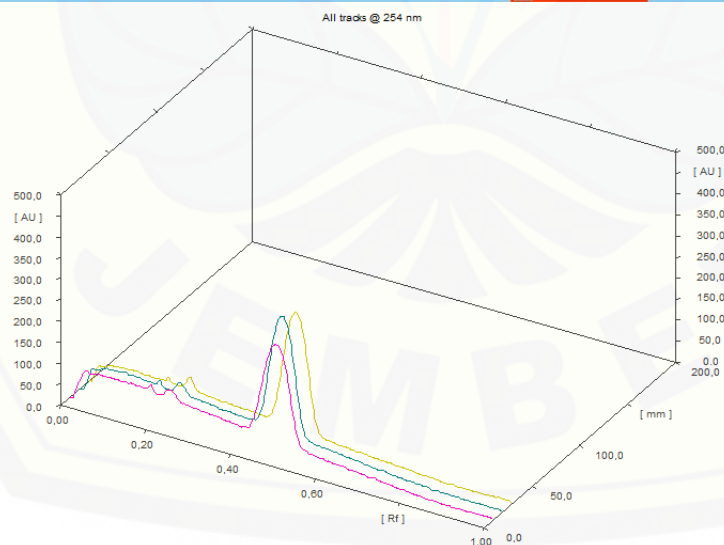
Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,41	Substance 3	479 AU @ 256 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999895	0,999648	ok
2	0,40	Substance 3	480 AU @ 255 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999790	0,999447	ok
3	0,40	Substance 3	467 AU @ 257 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999900	0,999399	ok



Gambar spektra kromatogram hasil densito menggunakan eluen heksan:aseton 6:4

A4. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:etil asetat 6:4

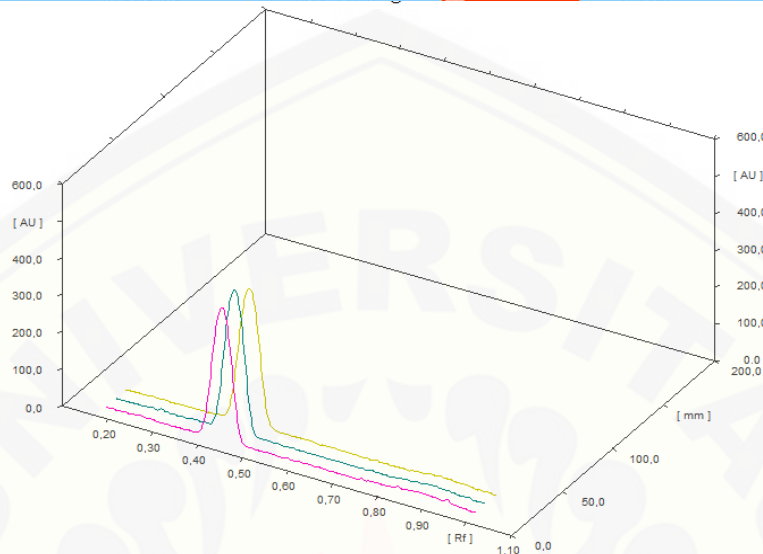
Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,49	AutoGenerated4	398 AU @ 257 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999784	0,999346	ok
2	0,48	AutoGenerated4	471 AU @ 258 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999731	0,999536	ok
3	0,49	AutoGenerated4	476 AU @ 257 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999844	0,999473	ok



Gambar spektra kromatogram hasil densito menggunakan eluen heksan:etil aseta 6:4

A5. Hasil uji pemurnian dengan eluen heksan:etil asetat: aseton 5:3:2

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,43	AutoGenerated4	469 AU @ 258 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999856	0,999450	ok
2	0,44	AutoGenerated4	507 AU @ 257 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999792	0,999224	ok
3	0,45	AutoGenerated4	492 AU @ 257 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999879	0,999453	ok



Gambar spektra kromatogram hasil densito menggunakan eluen heksan: etil asetat: aseton 5:3:2

Lampiran B. Uji Sitotoksik metode MTT

B1. Perhitungan bahan untuk uji sitotoksik

-5-FU (0,5 μM; 5 μM; 50 μM; 250 μM; 500 μM; 5000 μM)

Larutan induk 50.000 μM

$$50.000 \mu\text{M} = \frac{m}{130,08 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{l}}$$

$$m = 2,6016 \text{ mg} \longrightarrow +\text{DMSO } 40 \mu\text{l}, +\text{ad PBS } 400 \mu\text{l}$$

$$5000 \mu\text{M} = \frac{x}{400 \mu\text{l}} \times 50000 \mu\text{M}$$

$$x = 40 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$500 \mu\text{M} = \frac{x}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$x = 40 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$250 \mu\text{M} = \frac{x}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$\longrightarrow +\text{Media Komplit } 380 \mu\text{l}$$

$$x = 20 \mu\text{l}$$

$$50 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 500 \mu\text{M}$$

$$x = 40 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$5\mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 50 \mu\text{M}$$

$$x = 20 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$0,5 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 5\mu\text{M}$$

$$x = 20 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

- 2-KFU (0,5 μM ;5 μM ;50 μM ;250 μM ;500 μM)

Larutan induk 5000 μM

$$5000 \mu\text{M} = \frac{m}{298,65 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{l}}$$

$$m = 0,6 \text{ mg} \longrightarrow +\text{DMSO } 40 \mu\text{l}, + \text{ad PBS } 400 \mu\text{l}$$

$$500 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$x = 40 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$250 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$x = 20 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 380 \mu\text{l}$$

$$50 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 500 \mu\text{M}$$

$$x = 40 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$5\mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 50 \mu\text{M}$$

$$x = 20 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

$$0,5 \mu\text{M} = \frac{x}{400\mu\text{l}} \times 5\mu\text{M}$$

$$x = 20 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 360 \mu\text{l}$$

- Media Komplit 100 ml

FBS 10 %

Fungion 0,5%

Penstrep 2%

DMEM 87,5%

$$\text{FBS} = \frac{10}{100} \times 100 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$$

$$\text{Fungion} = \frac{0,5}{100} \times 100 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}$$

$$\text{Penstrep} = \frac{2}{100} \times 100 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$$

$$\text{DMEM} = \frac{87,5}{100} \times 100 \text{ ml} = 87,5 \text{ ml}$$

- Larutan MTT

Ditimbang MTT 50 mg dilarutkan dalam PBS ad 10 ml

$$\text{MTT}(5\text{mg/ml PBS}) = 1 \text{ ml}$$

$$\text{Media komplit} = 9 \text{ ml}$$

10 ml

B2. Perhitungan % Sel hidup senyawa 5-FU dan senyawa 2-KFU

- 5-FU

Replikasi 1

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,404	0,412	0,422	0,4127	98,49 %
5	0,400	0,353	0,433	0,3953	93,01 %
50	0,388	0,363	0,367	0,3727	85,89 %
250	0,300	0,417	0,360	0,3590	81,57 %
500	0,240	0,372	-	0,3060	64,88%
5000	0,283	0,192	-	0,2375	43,31%
Kontrol media	0,090	0,102	0,108	0,1000	-
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,4175	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{\sum \text{abs}}{n} = \frac{0,394+0,441}{2} = \frac{0,8350}{2} = 0,4175$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{\sum \text{abs}}{n} = \frac{0,090+0,102+0,108}{3} = \frac{0,3000}{3} = 0,1000$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,404+0,412+0,422}{3} = \frac{1,238}{3} = 0,4127$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,400+0,353+0,433}{3} = \frac{1,186}{3} = 0,3953$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,388+0,363+0,367}{3} = \frac{1,118}{3} = 0,3727$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,300+0,417+0,360}{3} = \frac{1,077}{3} = 0,3590$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,240+0,372}{2} = \frac{0,612}{2} = 0,3060$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,283+0,192}{2} = \frac{0,475}{2} = 0,2375$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,4127-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,3127}{0,3175} \times 100\% = 98,49 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,3953-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,2953}{0,3175} \times 100\% = 93,01 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,3727-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,2727}{0,3175} \times 100\% = 85,89 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,3590-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,2590}{0,3175} \times 100\% = 81,57 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,3060-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,1040}{0,3175} \times 100\% = 64,88\%$$

$$\% \text{ sel hidup (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,2375-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100\% = \frac{0,1375}{0,3175} \times 100\% = 43,31\%$$

Replikasi 2**Tabel hasil perhitungan % sel hidup**

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,781	0,766	-	0,7735	93,21%
5	0,757	0,757	-	0,7570	90,85%
50	0,717	0,669	0,726	0,7040	83,29%
250	0,679	0,644	0,641	0,6547	76,24 %
500	0,549	0,530	0,679	0,5860	66,43 %
5000	0,427	0,415	0,434	0,4253	43,47%
Kontrol media	0,119	0,116	0,127	0,1210	-
Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,8210	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{0,834+0,808}{2} = \frac{1,642}{2} = 0,8210$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,119+0,116+0,127}{3} = \frac{0,3620}{3} = 0,1210$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,781+0,766}{2} = \frac{1,547}{2} = 0,7735$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,757+0,757}{2} = \frac{1,514}{2} = 0,7570$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,717+0,669+0,726}{3} = \frac{2,112}{3} = 0,7040$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,679+0,644+0,641}{3} = \frac{1,964}{3} = 0,6547$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,549+0,530+0,679}{3} = \frac{1,758}{3} = 0,5860$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,427+0,415+0,434}{3} = \frac{1,276}{3} = 0,4253$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,7735-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,6525}{0,7000} \times 100\% = 93,21\%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,7570-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,6360}{0,7000} \times 100\% = 90,85\%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,7040-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,5830}{0,7000} \times 100\% = 83,29\%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,6547-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,5337}{0,7000} \times 100\% = 76,24 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,5860-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,4650}{0,7000} \times 100\% = 66,43 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,4253-0,1210}{0,8210-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,3043}{0,7} \times 100\% = 43,47\%$$

Replikasi 3

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,800	0,895	-	0,8475	97,34 %
5	0,790	0,791	-	0,7905	89,56 %
50	0,780	0,743	0,728	0,7503	84,04 %
250	0,719	0,702	0,718	0,7130	78,99 %
500	0,673	0,603	0,546	0,6073	64,53 %
5000	0,506	0,518	0,438	0,4873	48,16 %
Kontrol media	0,129	0,132	0,142	0,1343	-
Kontrol sel	0,864	0,870		0,8675	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{0,864+0,870}{2} = \frac{1,735}{2} = 0,8675$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,129+0,132+0,142}{3} = \frac{0,4030}{3} = 0,1343$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,800+0,895}{2} = \frac{1,695}{2} = 0,8475$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,790+0,791}{2} = \frac{1,581}{2} = 0,7905$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,780+0,743+0,728}{3} = \frac{2,251}{3} = 0,7503$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,719+0,702+0,718}{3} = \frac{2,139}{3} = 0,7130$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,673+0,603+0,546}{3} = \frac{1,822}{3} = 0,6073$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,506+0,518+0,438}{3} = \frac{1,462}{3} = 0,4873$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,8475 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,7135}{0,7330} \times 100\% = 97,34 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,7905 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,6565}{0,7330} \times 100\% = 89,56 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,7503 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,6160}{0,7330} \times 100\% = 84,04 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,7130 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,5790}{0,7330} \times 100\% = 78,99 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,6073 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,4730}{0,7330} \times 100\% = 64,53 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5000 } \mu\text{M)} = \frac{0,4873 - 0,1343}{0,8675 - 0,1343} \times 100 \% = \frac{0,3530}{0,7330} \times 100\% = 48,16 \%$$

- 2-KFU

Replikasi 1

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,788	0,794	0,822	0,8013	84,50 %
5	0,674	0,812	0,648	0,7113	73,32 %
50	0,631	0,609	0,575	0,6050	60,15 %
250	0,564	0,559	0,525	0,5493	53,19 %
500	0,396	0,397	0,540	0,4443	40,14 %
Kontrol media	0,125	0,120	0,118	0,1210	-
Kontrol sel	0,932	0,910	0,935	0,9257	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{0,932 + 0,910 + 0,935}{3} = \frac{2,777}{3} = 0,9257$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,125 + 0,120 + 0,118}{3} = \frac{0,3630}{3} = 0,1210$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,788 + 0,794 + 0,822}{3} = \frac{2,404}{3} = 0,8013$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,674 + 0,812 + 0,648}{3} = \frac{2,134}{3} = 0,7113$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,631+0,609+0,575}{3} = \frac{1,815}{3} = 0,6050$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,564+0,559+0,525}{3} = \frac{1,648}{3} = 0,5493$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,396+0,397+0,540}{3} = \frac{1,333}{3} = 0,4443$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,8013-0,1210}{0,9257-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,6800}{0,8047} \times 100\% = 84,50 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,7113-0,1210}{0,9257-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,5900}{0,8047} \times 100\% = 73,32 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,6050-0,1210}{0,9257-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,4840}{0,8047} \times 100\% = 60,15 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,5493-0,121}{0,9257-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,4280}{0,8047} \times 100\% = 53,19 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,4443-0,121}{0,9257-0,1210} \times 100 \% = \frac{0,3230}{0,8047} \times 100\% = 40,14 \%$$

Replikasi 2

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,384	0,408	0,390	0,3940	92,59 %
5	0,369	0,367	0,402	0,3793	87,97 %
50	0,369	0,379	0,273	0,3403	75,69 %
250	0,283	0,266	0,192	0,2470	46,29 %
500	0,247	0,189	0,173	0,2030	32,44 %
Kontrol media	0,090	0,102	0,108	0,1000	-
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,4175	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{0,394+0,441}{2} = \frac{0,8350}{2} = 0,4175$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,090+0,102+0,108}{3} = \frac{0,3}{3} = 0,1000$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,384+0,408+0,390}{3} = \frac{1,182}{3} = 0,3940$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,369+0,367+0,402}{3} = \frac{1,138}{3} = 0,3793$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,369+0,379+0,273}{3} = \frac{1,021}{3} = 0,3403$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,283+0,266+0,192}{3} = \frac{0,741}{3} = 0,2470$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,247+0,189+0,173}{3} = \frac{0,609}{3} = 0,2030$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,3940-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100 \% = \frac{0,2940}{0,3175} \times 100 \% = 92,59 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,3793-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100 \% = \frac{0,2793}{0,3175} \times 100 \% = 87,97 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,3403-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100 \% = \frac{0,2403}{0,3175} \times 100 \% = 75,69 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,2470-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100 \% = \frac{0,1470}{0,3175} \times 100 \% = 46,29 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,2030-0,1000}{0,4175-0,1000} \times 100 \% = \frac{0,1030}{0,3175} \times 100 \% = 32,44 \%$$

Replikasi 3

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5	0,769	0,729	0,739	0,7457	89,61 %
5	0,681	0,647	0,664	0,6640	77,44 %
50	0,579	0,546	0,576	0,5670	62,99 %
250	0,532	0,439	0,450	0,4737	49,09 %
500	0,422	0,400	0,388	0,4033	38,6 %
Kontrol media	0,147	0,141	0,144	0,1440	
Kontrol sel	0,706	0,925	-	0,8155	

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{0,706+0,925}{2} = 0,8155$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,147+0,141+0,144}{3} = 0,1440$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,769+0,729+0,739}{3} = \frac{2,237}{3} = 0,7457$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,681+0,647+0,664}{3} = \frac{1,992}{3} = 0,6640$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,579+0,546+0,576}{3} = \frac{1,701}{3} = 0,5670$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,532+0,439+0,450}{3} = \frac{1,421}{3} = 0,4737$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,422+0,400+0,388}{3} = \frac{1,21}{3} = 0,4033$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 } \mu\text{M)} = \frac{0,7457-0,1440}{0,8155-0,1440} \times 100 \% = \frac{0,6017}{0,6715} \times 100\% = 89,61 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (5 } \mu\text{M)} = \frac{0,6640-0,1440}{0,8155-0,1440} \times 100 \% = \frac{0,5200}{0,6715} \times 100\% = 77,44 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (50 } \mu\text{M)} = \frac{0,5670-0,1440}{0,8155-0,1440} \times 100 \% = \frac{0,4230}{0,6715} \times 100\% = 62,99 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (250 } \mu\text{M)} = \frac{0,4737-0,1440}{0,8155-0,1440} \times 100 \% = \frac{0,3297}{0,6715} \times 100\% = 49,09 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (500 } \mu\text{M)} = \frac{0,4033-0,1440}{0,8155-0,1440} \times 100 \% = \frac{0,259}{0,6715} \times 100\% = 38,6 \%$$

B.3 Hasil Analisis Probit

- 5-FU

Replikasi 1

		95% Confidence Limits for konsentrasi			Limits for log (konsentrasi)
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	,010	35287592,931	4439273,974	8,054E8	7,548
	,020	11894847,225	1794006,048	2,055E8	7,075
	,030	5966546,513	1009107,456	86425547,946	6,776
	,040	3550738,274	654353,371	45064119,555	6,550
	,050	2327928,278	459917,167	26539531,120	6,367
	,060	1625214,707	340606,593	16914796,090	6,211
	,070	1185980,803	261710,415	11397617,293	6,074
	,080	894458,000	206678,914	8005034,696	5,952
	,090	692046,060	166723,053	5805827,009	5,840
	,100	546472,295	136791,380	4320246,802	5,738
	,150	205548,344	60200,608	1272736,181	5,313
	,200	94495,757	31283,906	482922,664	4,975
	,250	48513,871	17802,016	210756,720	4,686
	,300	26659,029	10704,071	100332,051	4,426
	,350	15307,193	6662,723	50573,588	4,185
	,400	9041,880	4235,041	26486,713	3,956
	,450	5433,129	2720,680	14224,526	3,735
	,500	3291,156	1750,708	7756,370	3,517
	,550	1993,640	1118,340	4260,452	3,300
	,600	1197,948	701,960	2341,784	3,078
	,650	707,622	427,336	1280,559	2,850
	,700	406,305	247,874	692,667	2,609
	,750	223,270	133,640	367,753	2,349
	,800	114,626	64,669	188,734	2,059
	,850	52,697	26,596	90,487	1,722
	,900	19,821	8,327	37,472	1,297
	,910	15,652	6,260	30,430	1,195
	,920	12,110	4,585	24,308	1,083
	,930	9,133	3,251	19,017	,961
	,940	6,665	2,210	14,481	,824
	,950	4,653	1,421	10,631	,668
	,960	3,051	,844	7,408	,484
	,970	1,815	,444	4,763	,259
	,980	,911	,188	2,655	-,041
	,990	,307	,049	1,062	-,513

Replikasi 2

		95 % Confidence Limits for konsentrasi			Limits for log (konsentrasi)
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	,010	8,080E8	44477022,176	7,835E10	8,907
	,020	1,953E8	13912716,294	1,254E10	8,291
	,030	79344739,353	6651648,914	3,924E9	7,900
	,040	40290891,699	3816664,945	1,638E9	7,605
	,050	23217068,052	2428464,665	8,048E8	7,366
	,060	14522480,274	1652380,449	4,397E8	7,162
	,070	9624482,060	1178713,798	2,589E8	6,983
	,080	6658947,288	870929,863	1,611E8	6,823
	,090	4763406,381	661291,164	1,047E8	6,678
	,100	3499417,378	513156,682	70406758,768	6,544
	,150	976165,240	179265,979	13646018,389	5,990
	,200	353872,039	77514,801	3713201,605	5,549
	,250	148178,278	37662,372	1218731,994	5,171
	,300	67806,831	19642,507	449369,323	4,831
	,350	32859,868	10711,026	178843,901	4,517
	,400	16524,714	6000,896	74902,638	4,218
	,450	8497,690	3408,600	32433,931	3,929
	,500	4416,184	1940,225	14329,915	3,645
	,550	2295,057	1093,686	6393,275	3,361
	,600	1180,213	602,023	2856,704	3,072
	,650	593,511	317,614	1270,535	2,773
	,700	287,621	156,384	560,013	2,469
	,750	131,616	69,224	243,288	2,119
	,800	55,112	26,217	102,441	1,741
	,850	19,979	7,913	39,937	1,301
	,900	5,573	1,649	12,972	,746
	,910	4,094	1,123	9,947	,612
	,920	2,929	,738	7,469	,467
	,930	2,026	,464	5,461	,307
	,940	1,343	,276	3,856	,128
	,950	,840	,152	2,598	-,076
	,960	,484	,076	1,638	-,315
	,970	,246	,032	,931	-,609
	,980	,100	,010	,441	-1,001
	,990	,024	,002	,136	-1,617

Replikasi 3

		95 % Confidence Limits for konsentrasi			Limits for log (konsentrasi)
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	,010	4,109E8	26732402,855	3,028E10	8,614
	,020	1,088E8	9001554,817	5,467E9	8,037
	,030	46850231,753	4509759,344	1,846E9	7,671
	,040	24850862,107	2680412,908	8,163E8	7,395
	,050	14837098,387	1755078,049	4,204E8	7,171
	,060	9565247,082	1223699,258	2,390E8	6,981
	,070	6509250,694	891809,511	1,457E8	6,814
	,080	4611630,515	671703,503	93544261,462	6,664
	,090	3370774,667	519000,449	62531259,933	6,528
	,100	2525960,970	409267,116	43165687,635	6,402
	,150	764959,395	152831,138	9319847,183	5,884
	,200	296020,594	69693,778	2762661,835	5,471
	,250	131096,506	35450,253	975647,465	5,118
	,300	63085,554	19270,197	384101,281	4,800
	,350	32030,925	10922,224	162388,339	4,506
	,400	16836,438	6350,446	71994,640	4,226
	,450	9036,611	3741,056	32921,269	3,956
	,500	4898,302	2209,071	15334,117	3,690
	,550	2655,129	1293,433	7203,144	3,424
	,600	1425,086	741,497	3384,724	3,154
	,650	749,069	409,313	1580,578	2,875
	,700	380,331	212,432	729,770	2,580
	,750	183,021	100,149	331,267	2,263
	,800	81,053	40,894	145,731	1,909
	,850	31,366	13,498	59,684	1,496
	,900	9,499	3,146	20,648	,978
	,910	7,118	2,199	16,081	,852
	,920	5,203	1,487	12,280	,716
	,930	3,686	,966	9,147	,567
	,940	2,508	,595	6,596	,399
	,950	1,617	,342	4,552	,209
	,960	,965	,178	2,951	-,015
	,970	,512	,079	1,737	-,291
	,980	,220	,027	,861	-,657
	,990	,058	,005	,287	-1,234

- 2-KFU

Replikasi 1

	95 % Confidence Limits for konsentrasi			Limits for log (konsentrasi)
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT ,010	1,909E8	6103068,466	8,523E10	8,281
,020	38271825,105	1730779,592	9,153E9	7,583
,030	13803715,404	777419,382	2,224E9	7,140
,040	6409619,290	425558,733	7,675E8	6,807
,050	3434228,719	260568,747	3,231E8	6,536
,060	2019124,424	171575,601	1,548E8	6,305
,070	1267400,889	118911,566	81222903,797	6,103
,080	835264,615	85613,627	46601632,237	5,922
,090	571649,783	63486,302	26982395,449	5,757
,100	403207,785	48199,995	16649160,298	5,606
,150	95029,776	15364,807	2261697,094	4,978
,200	30130,624	6165,468	464886,914	4,479
,250	11247,031	2802,959	120232,424	4,051
,300	4642,024	1372,799	35905,019	3,667
,350	2044,410	703,082	11806,445	3,311
,400	938,915	368,676	4153,113	2,973
,450	442,246	194,365	1535,127	2,646
,500	210,807	101,047	590,534	2,324
,550	100,486	50,564	236,009	2,002
,600	47,331	23,614	98,479	1,675
,650	21,737	9,967	43,036	1,337
,700	9,573	3,717	19,433	,981
,750	3,951	1,204	8,774	,597
,800	1,475	,328	3,785	,169
,850	,468	,070	1,467	-,330
,900	,110	,010	,466	-,958
,910	,078	,006	,345	-1,109
,920	,053	,004	,255	-1,274
,930	,035	,002	,183	-1,455
,940	,022	,001	,126	-1,657
,950	,013	,001	,083	-1,888
,960	,007	,000	,051	-2,159
,970	,003	,000	,028	-2,492
,980	,001	,000	,012	-2,935
,990	,000	,000	,003	-3,633

Replikasi 2

		95% Confidence Limits for konsentrasi			Confidence Limits for log (konsentrasi)
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	,010	540813,325	16893,839	1,405E11	5,733
	,020	213729,522	9219,318	1,603E10	5,330
	,030	118592,687	6265,267	4,051E9	5,074
	,040	76142,050	4679,249	1,441E9	4,882
	,050	53100,044	3686,693	6,225E8	4,725
	,060	39071,811	3007,175	3,049E8	4,592
	,070	29856,969	2513,497	1,632E8	4,475
	,080	23466,552	2139,320	93274806,339	4,370
	,090	18850,506	1846,563	56124840,616	4,275
	,100	15408,467	1611,767	35181545,010	4,188
	,150	6686,845	911,703	5121760,755	3,825
	,200	3444,194	573,610	1119059,158	3,537
	,250	1949,372	381,201	306878,301	3,290
	,300	1169,251	260,766	97254,456	3,068
	,350	728,121	180,583	34058,614	2,862
	,400	464,527	124,895	12839,219	2,667
	,450	300,718	85,099	5132,285	2,478
	,500	196,021	56,200	2160,733	2,292
	,550	127,775	35,224	958,537	2,106
	,600	82,717	20,395	450,889	1,918
	,650	52,772	10,581	226,592	1,722
	,700	32,862	4,779	121,862	1,517
	,750	19,711	1,832	68,798	1,295
	,800	11,156	,577	39,838	1,048
	,850	5,746	,139	22,691	,759
	,900	2,494	,022	11,922	,397
	,910	2,038	,014	10,275	,309
	,920	1,637	,008	8,763	,214
	,930	1,287	,005	7,372	,110
	,940	,983	,003	6,093	-,007
	,950	,724	,001	4,915	-,140
	,960	,505	,001	3,830	-,297
	,970	,324	,000	2,829	-,489
	,980	,180	,000	1,900	-,745
	,990	,071	,000	1,023	-1,148

Replikasi 3

		95 % Confidence Limits for konsentrasi			Limits for log (konsentrasi)
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT	,010	8410888,699	797237,430	3,628E8	6,925
	,020	2388744,018	285780,742	70546594,727	6,378
	,030	1074789,913	148943,384	24979628,601	6,031
	,040	589392,797	91183,055	11444776,174	5,770
	,050	361549,314	61151,887	6067816,083	5,558
	,060	238517,518	43511,127	3536755,469	5,378
	,070	165625,794	32276,589	2203792,751	5,219
	,080	119483,119	24697,012	1443210,906	5,077
	,090	88782,147	19356,780	982260,243	4,948
	,100	67545,824	15464,888	689437,065	4,830
	,150	21778,925	6090,079	159627,493	4,338
	,200	8858,465	2892,092	50103,888	3,947
	,250	4094,412	1520,136	18621,359	3,612
	,300	2047,394	848,890	7694,286	3,311
	,350	1077,182	491,655	3413,502	3,032
	,400	585,637	290,415	1591,616	2,768
	,450	324,763	172,548	769,377	2,512
	,500	181,788	101,732	382,270	2,260
	,550	101,756	58,635	194,290	2,008
	,600	56,429	32,473	100,758	1,751
	,650	30,679	16,963	53,124	1,487
	,700	16,141	8,211	28,201	1,208
	,750	8,071	3,613	14,788	,907
	,800	3,731	1,404	7,436	,572
	,850	1,517	,455	3,422	,181
	,900	,489	,108	1,317	-,310
	,910	,372	,076	1,048	-,429
	,920	,277	,052	,818	-,558
	,930	,200	,034	,624	-,700
	,940	,139	,021	,461	-,858
	,950	,091	,012	,327	-1,039
	,960	,056	,007	,219	-1,251
	,970	,031	,003	,133	-1,512
	,980	,014	,001	,069	-1,859
	,990	,004	,000	,025	-2,406

B4. Perhitungan SD dan CV(RSD)Tabel Data IC₅₀ senyawa 5-FU dan 2-KFU

No.	Senyawa	IC ₅₀ (x)	$\bar{x} \pm SD$	CV(RSD)
1	5-FU	3291,156	4201,88±824,7266	19,628
		4416,184		
		4898,302		
2	2-KFU	210,807	196,205± 14,5104	7,396
		196,021		
		181,788		

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}}$$

- 5-Fluorourasil

$$SD = \sqrt{\frac{(3291,156 - 4201,88)^2 + (4416,184 - 4201,88)^2 + (4898,302 - 4201,88)^2}{3-1}}$$

$$= 824,7266$$

$$CV = \frac{824,7266}{4201,88} \times 100\% = 19,628\%$$

- 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

$$SD = \sqrt{\frac{(210,807 - 196,205)^2 + (196,021 - 196,205)^2 + (181,788 - 196,205)^2}{3-1}}$$

$$= 14,5104$$

$$CV = \frac{14,5104}{196,205} \times 100\% = 7,396\%$$

B5. Hasil Uji t Tidak Berpasangan**Uji normalitas**

Tests of Normality

senyawa		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50	1,000	,269	3	.	,949	3	,567
	2,000	,176	3	.	1,000	3	,979

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan:

- Senyawa 1 : 5-Fluorourasil
- Senyawa 2 : 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

P value uji shapiro wilk pada senyawa 1 sebesar $0,567 > 0,05$ dan pada kelompok 2 sebesar $0,979 > 0,05$. Karena nilai α value semua $> 0,05$ maka kedua kelompok sama-sama berdistribusi normal berdasarkan uji Shapiro wilk.

Group Statistics

senyawa		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC50	1,000	3	4201,88067	824,726625	476,156139
	2,000	3	196,20533	14,510378	8,377571

Tabel di atas menunjukkan rata-rata IC₅₀ tiap senyawa, yaitu pada senyawa 5-Fluorourasil sebesar 4201,88067 sedangkan untuk senyawa 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebesar 196,20533.

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
IC50	Equal variances assumed	8,411	,044	8,411	4
	Equal variances not assumed			8,411	2,001

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
IC50	Equal variances assumed	,001	4005,675333	476,229831
	Equal variances not assumed	,014	4005,675333	476,229831

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	2683,449350	5327,901317
	Equal variances not assumed	1957,838195	6053,512472

Nilai sig(2-tailed) atau p value sebesar $0,014 < 0,05$. Karena $< 0,05$ maka ada perbedaan yang bermakna secara statistik atau signifikan pada probabilitas 0,05.

Lampiran C. Uji Doubling Time**C1. Penimbangan bahan untuk uji doubling time**

- 5-Fluorourasil (2100 μM , 4200 μM , 6300 μM)

Dibuat Larutan induk 5-FU dengan konsentrasi 20.000 μM , kemudian dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi 2100 μM , 4200 μM , 6300 μM .

BM 5-FU = **130,08 g/mol**

Volume larutan = 1000 μl

$$20.000 \mu\text{M} = \frac{m}{130,08 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{1000 \mu\text{l}}$$

$$m = 2,6016 \text{ mg} \longrightarrow +\text{DMSO } 100 \mu\text{l}, + \text{PBS}$$

$$2100 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20.000 \mu\text{M}$$

$$x = 105 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 895 \mu\text{l}$$

$$4200 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20.000 \mu\text{M}$$

$$x = 210 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 790 \mu\text{l}$$

$$6300 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20.000 \mu\text{M}$$

$$x = 315 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 685 \mu\text{l}$$

- 1-(2-klorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil (100 μM , 200 μM , 300 μM)

Dibuat Larutan induk 2-KFU dengan konsentrasi 2000 μM , kemudian dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi 100 μM , 200 μM , 300 μM .

BM 5-FU = **298,65 g/mol**

Volume larutan = 400 μl

$$2000 \mu\text{M} = \frac{m}{298,65 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{l}}$$

$$m = 0,238 \text{ mg} \longrightarrow +\text{DMSO } 40 \mu\text{l}, + \text{PBS}$$

$$100 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 50 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 950 \mu\text{l}$$

$$200 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 100 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 900 \mu\text{l}$$

$$300 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 150 \mu\text{l} \longrightarrow +\text{Media Komplit } 850 \mu\text{l}$$

C2. Perhitungan % Sel Hidup

- 5-FU

Inkubasi 24 Jam

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	0,790	0,925	0,953	0,8893	42,52 %
1 IC ₅₀	0,893	0,869	0,777	0,8463	40,12 %
1,5 IC ₅₀	0,790	0,817	0,803	0,8033	37,72 %
Kontrol media	0,123	0,128	0,132	0,1277	-
Kontrol sel	2,073	2,241	1,442	1,919	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,073+2,241+1,442}{3} = \frac{5,756}{3} = 1,919$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{\sum \text{abs}}{n} = \frac{0,123+0,128+0,132}{3} = \frac{0,3830}{3} = 0,1277$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,790+0,925+0,953}{3} = \frac{2,668}{3} = 0,8893$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1IC}_{50}\text{)} = \frac{0,893+0,869+0,777}{3} = \frac{2,539}{3} = 0,8463$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5IC}_{50}\text{)} = \frac{0,790+0,817+0,803}{3} = \frac{2,410}{3} = 0,8033$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,8893-0,1277}{1,919-0,1277} \times 100 \% = \frac{0,7616}{1,7913} \times 100 \% = 42,52\%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}) = \frac{0,8463-0,1277}{1,919-0,1277} \times 100 \% = \frac{0,7186}{1,7913} \times 100\% = 40,12 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}) = \frac{0,8033-0,1277}{1,919-0,1277} \times 100 \% = \frac{0,6756}{1,7913} \times 100\% = 37,72 \%$$

Inkubasi 48 Jam

Tabel hasil perhitungan % sel hidup

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	1,116	1,108	1,165	1,129	52,77 %
1 IC ₅₀	1,033	1,017	0,954	1,001	45,99 %
1,5 IC ₅₀	0,974	0,862	0,907	0,9143	41,39 %
Kontrol media	0,135	0,127	0,136	0,1327	-
Kontrol sel	2,276	1,884	1,904	2,021	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,276+1,884+1,904}{3} = \frac{6,064}{3} = 2,021$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,135+0,127+0,136}{3} = \frac{0,3980}{3} = 0,1327$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}) = \frac{1,116+1,108+1,165}{3} = \frac{3,389}{3} = 1,129$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1IC}_{50}) = \frac{1,033+1,017+0,954}{3} = \frac{3,004}{3} = 1,001$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5IC}_{50}) = \frac{0,974+0,862+0,907}{3} = \frac{2,743}{3} = 0,9143$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}) = \frac{1,129-0,1327}{2,021-0,1327} \times 100 \% = \frac{0,9963}{1,888} \times 100\% = 52,77 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}) = \frac{1,001-0,1327}{2,021-0,1327} \times 100 \% = \frac{0,8683}{1,888} \times 100\% = 45,99 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}) = \frac{0,9143-0,1327}{2,021-0,1327} \times 100 \% = \frac{0,7816}{1,888} \times 100\% = 41,39 \%$$

Inkubasi 72 Jam**Tabel hasil perhitungan % sel hidup**

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	1,696	1,837	1,570	1,701	67,34 %
1 IC ₅₀	1,511	1,564	1,579	1,551	60,53 %
1,5 IC ₅₀	1,423	1,421	1,589	1,478	57,21 %
Kontrol media	0,232	0,218	0,210	0,2200	-
Kontrol sel	2,249	2,458	2,249	2,419	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,552+2,458+2,249}{3} = \frac{7,259}{3} = 2,419$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,232+0,218+0,210}{3} = \frac{0,6600}{3} = 0,2200$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,696+1,837+1,570}{3} = \frac{5,103}{3} = 1,701$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,511+1,564+1,579}{3} = \frac{4,654}{3} = 1,551$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,589+1,421+1,423}{3} = \frac{4,433}{3} = 1,478$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,701-0,2200}{2,419-0,2200} \times 100 \% = \frac{1,481}{2,199} \times 100\% = 67,34 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,551-0,2200}{2,419-0,2200} \times 100 \% = \frac{1,331}{2,199} \times 100\% = 60,53 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{1,478-0,2200}{2,419-0,2200} \times 100 \% = \frac{1,258}{2,199} \times 100\% = 57,21$$

- 2-KFU

Inkubasi 24 Jam**Tabel hasil perhitungan % sel hidup**

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	0,214	0,192	0,186	0,1973	4,032 %
1 IC ₅₀	0,164	0,174	0,168	0,1687	2,459 %
1,5 IC ₅₀	0,163	0,152	0,166	0,1603	1,997 %
Kontrol media	0,121	0,124	0,127	0,1240	-
Kontrol sel	2,094	2,282	1,449	1,942	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,094+2,282+1,449}{3} = \frac{5,825}{3} = 1,942$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,121+0,124+0,127}{3} = \frac{0,3720}{3} = 0,1240$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,214+0,192+0,186}{3} = \frac{0,5920}{3} = 0,1973$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,164+0,174+0,168}{3} = \frac{0,5060}{3} = 0,1687$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,163+0,152+0,166}{3} = \frac{0,4810}{3} = 0,1603$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,1973-0,1240}{1,942-0,1240} \times 100 \% = \frac{0,0733}{1,818} \times 100\% = 4,032 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,1687-0,1240}{1,942-0,1240} \times 100 \% = \frac{0,0447}{1,818} \times 100\% = 2,459 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,1603-0,1240}{1,942-0,1240} \times 100 \% = \frac{0,0363}{1,818} \times 100\% = 1,997 \%$$

48 Jam**Tabel hasil perhitungan % sel hidup**

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	0,273	0,268	0,246	1,129	6,972 %
1 IC ₅₀	0,202	0,211	0,204	1,001	3,943 %
1,5 IC ₅₀	0,189	0,203	0,192	0,9143	3,355 %
Kontrol media	0,135	0,126	0,135	0,1320	-
Kontrol sel	2,276	1,884	1,904	2,001	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,276+1,884+1,904}{3} = \frac{6,003}{3} = 2,001$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,135+0,126+0,135}{3} = \frac{0,396}{3} = 0,1320$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,273+0,268+0,246}{3} = \frac{0,7870}{3} = 0,2623$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,202+0,211+0,204}{3} = \frac{0,6170}{3} = 0,2057$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,189+0,203+0,192}{3} = \frac{0,5840}{3} = 0,1947$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,2623-0,1320}{2,001-0,1320} \times 100 \% = \frac{0,1303}{1,869} \times 100\% = 6,972 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,2057-0,1320}{2,001-0,1320} \times 100 \% = \frac{0,0737}{1,869} \times 100\% = 3,943 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,1947-0,1320}{2,001-0,1320} \times 100 \% = \frac{0,0627}{1,869} \times 100\% = 3,355 \%$$

72 Jam**Tabel hasil perhitungan % sel hidup**

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata (\bar{x})	% Sel hidup
0,5 IC ₅₀	0,510	0,485	0,493	0,4960	11,89 %
1 IC ₅₀	0,412	0,347	0,404	0,3877	7,176 %
1,5 IC ₅₀	0,332	0,316	0,347	0,3317	4,736 %
Kontrol media	2,586	0,221	0,215	0,2230	-
Kontrol sel	2,276	2,651	2,318	2,518	-

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol sel} = \frac{2,586+2,651+2,318}{3} = \frac{7,555}{3} = 2,518$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs kontrol media} = \frac{0,233+0,221+0,215}{3} = \frac{0,669}{3} = 0,2230$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,510+0,485+0,493}{3} = \frac{1,488}{3} = 0,4960$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,412+0,347+0,404}{3} = \frac{1,163}{3} = 0,3877$$

$$\text{Perhitungan } \bar{x} \text{ abs (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,332+0,316+0,347}{3} = \frac{0,995}{3} = 0,3317$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\bar{x} \text{ Abs perlakuan} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}}{\bar{x} \text{ Abs kontrol sel} - \bar{x} \text{ Abs kontrol media}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (0,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,4960-0,2230}{2,518-0,2230} \times 100 \% = \frac{0,2730}{2,295} \times 100\% = 11,89 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,3877-0,2230}{2,518-0,2230} \times 100 \% = \frac{0,1647}{2,295} \times 100\% = 7,176 \%$$

$$\% \text{ sel hidup (1,5 IC}_{50}\text{)} = \frac{0,3317-0,2230}{2,518-0,2230} \times 100 \% = \frac{0,1087}{2,295} \times 100\% = 4,736 \%$$

C3. Perhitungan Jumlah Sel Hidup

- 5-FU

Tabel hasil perhitungan jumlah sel hidup

Waktu inkubasi	Konsentrasi	% Sel hidup (%)	Jumlah sel hidup (sel)
24 Jam	0,5 IC ₅₀	42,52	2126
	1 IC ₅₀	40,12	2006
	1,5 IC ₅₀	37,72	1886
48 jam	0,5 IC ₅₀	52,77	2639
	1 IC ₅₀	45,99	2299
	1,5 IC ₅₀	41,39	2069
72 jam	0,5 IC ₅₀	67,34	3367
	1 IC ₅₀	60,53	3027
	1,5 IC ₅₀	57,21	2860

$$\text{Jumlah Sel} = \frac{\% \text{ sel hidup}}{100} \times \text{jumlah sel awal}$$

Jumlah sel awal = 5000 sel (hasil pembulatan)

24 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 42,52 \% = \frac{42,52}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2126 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1 IC}_{50}) = 40,12 \% = \frac{40,12}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2006 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1,5 IC}_{50}) = 37,72 \% = \frac{37,72}{100} \times 5000 \text{ sel} = 1886 \text{ sel}$$

48 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 52,77 \% = \frac{52,77}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2639 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1 IC}_{50}) = 45,99 \% = \frac{45,99}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2299 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1,5 IC}_{50}) = 41,39 \% = \frac{41,39}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2069 \text{ sel}$$

72 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 67,349 \% = \frac{67,34}{100} \times 5000 \text{ sel} = 3367 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1 IC}_{50}) = 60,543 \% = \frac{60,53}{100} \times 5000 \text{ sel} = 3027 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1,5 IC}_{50}) = 57,193 \% = \frac{57,21}{100} \times 5000 \text{ sel} = 2860 \text{ sel}$$

- 2-KFU

Tabel hasil perhitungan jumlah sel hidup

Waktu inkubasi	Konsentrasi	% Sel hidup (%)	Jumlah sel hidup (sel)
24 Jam	0,5 IC ₅₀	4,032	201,6
	1 IC ₅₀	2,459	122,9
	1,5 IC ₅₀	1,997	99,85
48 jam	0,5 IC ₅₀	6,972	348,6
	1 IC ₅₀	3,943	197,2
	1,5 IC ₅₀	3,355	167,8
72 jam	0,5 IC ₅₀	11,89	594,5
	1 IC ₅₀	7,176	358,8
	1,5 IC ₅₀	4,736	236,8

24 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 4,032 \% = \frac{4,032}{100} \times 5000 = 201,6 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1 IC}_{50}) = 2,459 \% = \frac{2,459}{100} \times 5000 = 122,9 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1,5 IC}_{50}) = 1,997 \% = \frac{1,997}{100} \times 5000 = 99,85 \text{ sel}$$

48 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 6,972 \% = \frac{6,972}{100} \times 5000 = 348,6 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1 IC}_{50}) = 3,943 \% = \frac{3,943}{100} \times 5000 = 197,2 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (1,5 IC}_{50}) = 3,355 \% = \frac{3,355}{100} \times 5000 = 167,8 \text{ sel}$$

72 Jam

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 11,89 \% = \frac{11,89}{100} \times 5000 = 594,5 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 7,176 \% = \frac{7,176}{100} \times 5000 = 358,8 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (0,5 IC}_{50}) = 4,736 \% = \frac{4,736}{100} \times 5000 = 236,8 \text{ sel}$$

C4. Perhitungan waktu doubling time**Tabel Hasil Perhitungan *Doubling time***

Senyawa	Konsentrasi	Log Jumlah Sel Hidup			Persamaan waktu vs log jumlah sel hidup	slope	<i>doubling time</i>
		24	48	72			
2-KFU	0,5IC ₅₀	2,305	2,541	2,774	Y= 9,771x10 ⁻³ X+2,071	9,771x10 ⁻³	197,4
	1 IC ₅₀	2,089	2,295	2,555	Y= 9,708 x10 ⁻³ X+1,847	9,708 x10 ⁻³	221,8
	1,5IC ₅₀	1,999	2,224	2,374	Y= 7,813 x10 ⁻³ X+1,824	7,813 x10 ⁻³	278,5
5-FU	0,5IC ₅₀	3,327	3,422	3,527	Y= 4,167 x10 ⁻³ X+3,225	4,167 x10 ⁻³	185,9
	1 IC ₅₀	3,302	3,362	3,481	Y= 3,729x10 ⁻³ X+3,202	3,729x10 ⁻³	214,0
	1,5IC ₅₀	3,275	3,316	3,456	Y= 3,771 x10 ⁻³ X+3,168	3,771 x10 ⁻³	220,6

Persamaan garis (waktu vs log jumlah sel hidup) , Y= bx+a

$$\text{Doubling Time} = \frac{Y - A}{B}$$

Y = log (2 x jumlah sel hidup awal), jumlah sel awal 5000 sel (hasil pembulatan)

- 5-FU

Doubling time konsentrasi 0,5 IC₅₀

$$Y = 4,167 \times 10^{-3} X + 3,225$$

$$\text{Log } 10000 = 4,167 \times 10^{-3} X + 3,225$$

$$4 = 4,167 \times 10^{-3} X + 3,225$$

$$x = 185,9 \text{ jam}$$

Doubling time konsentrasi 1 IC₅₀

$$Y = 3,729 \times 10^{-3} X + 3,202$$

$$\text{Log } 10000 = 3,729 \times 10^{-3} X + 3,202$$

$$4 = 3,729 \times 10^{-3} X + 3,202$$

$$x = 214,0 \text{ jam}$$

Doubling time konsentrasi 1,5 IC₅₀

$$Y = 3,771 \times 10^{-3} X + 3,168$$

$$\text{Log } 10000 = 3,771 \times 10^{-3} X + 3,168$$

$$4 = 3,771 \times 10^{-3} X + 3,168$$

$$x = 220,6 \text{ jam}$$

- 2-KFU

Doubling time konsentrasi 0,5 IC₅₀

$$Y = 9,771 \times 10^{-3} X + 2,071$$

$$\text{Log } 10000 = 9,771 \times 10^{-3} X + 2,071$$

$$4 = 9,771 \times 10^{-3} X + 2,071$$

$$x = 197,4 \text{ jam}$$

Doubling time konsentrasi 1 IC₅₀

$$Y = 9,708 \times 10^{-3} X + 1,847$$

$$\text{Log } 10000 = 9,708 \times 10^{-3} X + 1,847$$

$$4 = 9,708 \times 10^{-3} X + 1,847$$

$$x = 221,8 \text{ jam}$$

Doubling time konsentrasi 1,5 IC₅₀

$$Y = 7,813 \times 10^{-3} X + 1,824$$

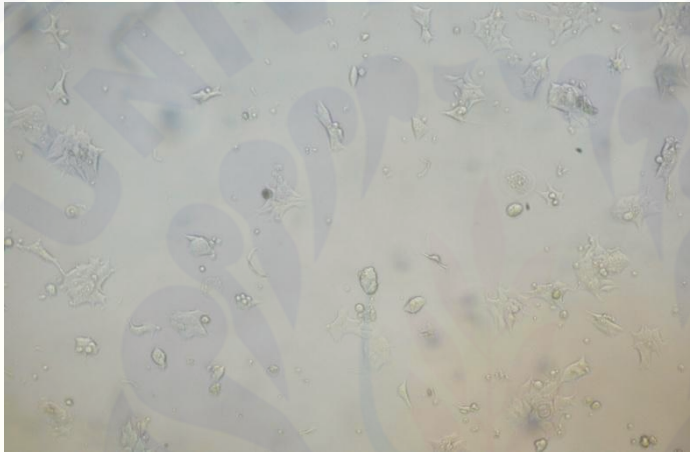
$$\text{Log } 10000 = 7,813 \times 10^{-3} X + 1,824$$

$$4 = 7,813 \times 10^{-3} X + 1,824$$

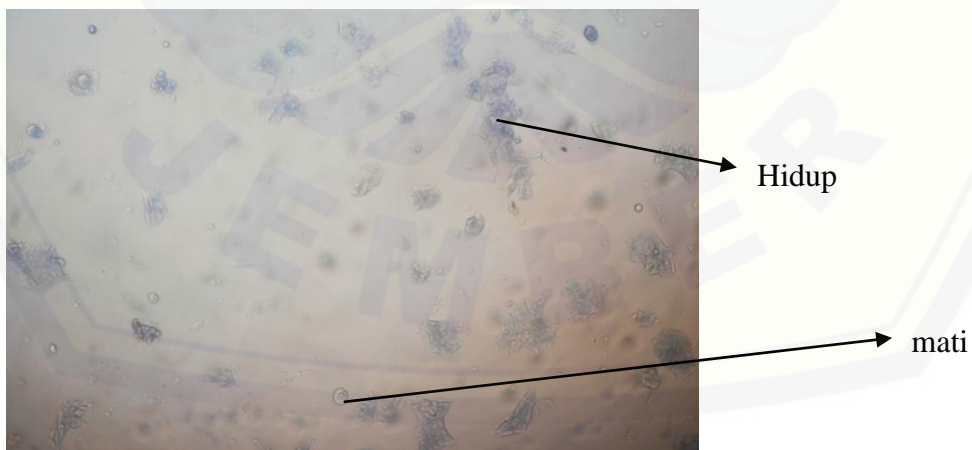
$$x = 278,5 \text{ jam}$$

Lampiran D. Foto sel MCF-7

D1. Morfologi Sel MCF-7 sebelum perlakuan



D2. Morfologi Sel MCF-7 setelah diberi reagen MTT



D3. Morfologi Sel MCF-7 setelah diberi SDS 10%

