



UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA 1-(4-NITROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)

SKRIPSI

Oleh

Eka Mustika Wati

NIM 1122101017

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA 1-(4-NITROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (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

Eka Mustika Wati

NIM 1122101017

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Alkhamdulillah atas ridho Allah SWT, saya mempersembahkan skripsi ini untuk:

1. Allah SWT yang selalu melimpahkan nikmat yang tak terhingga kepada penulis dan yang selalu menjadi curahan hati penulis.
2. Ayahanda Agus Suroho dan Ibunda Muspiyah yang memberikan cinta, dukungan, doa, dan pengorbanan tanpa henti di setiap langkah penulis. Tak lupa, adek Bimo Nur Cahyo tercinta yang selalu menghibur dan memberikan perhatian kepada penulis.
3. Kakek, nenek, dan semua sanak saudara yang selalu memberi dukungan dan perhatian kepada penulis.
4. Guru-guru dan teman-teman di TK Wijaya Kusuma, SDN Petamanan, SMPN 1 Pasuruan, SMAN 1 Pasuruan yang telah memberikan pelajaran dan pengalaman yang sangat berharga.
5. Teman-teman senasib 'Asmef' terutama teman-teman seperjuangan Meyladia, Nurhidayati, Puspita dan Awalia, serta teman-teman penghuni laboratorium Kimia.
6. Dosen, mahasiswa dan staf Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTO

“Jadikanlah Allah sebagai kekasih sejati dalam hidupmu”
Orang-orang yang beriman sangat mencintai Allah
(Terjemahan QS. al-Baqarah: 165)

“Build your dreams, or someone else will hire you to build theirs”
(Farrah Gray)

“Agar dapat mengambil keputusan yang tepat dalam hidup ini, anda harus mendengar jiwa anda. Untuk dapat melakukannya, anda perlu merasakan kesunyian yang ditakuti oleh sebagian besar orang, karena dalam kesunyian anda dapat mendengar kebenaran dan melihat pemecahan-pemecahan”
(Deepak Chopra)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Eka Mustika Wati

NIM : 112210101017

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juni 2015

Yang menyatakan,

(Eka Mustika Wati)

NIM 112210101017

SKRIPSI

UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA 1-(4-NITROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)

Oleh

Eka Mustika Wati

NIM 112210101017

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 10 Juni 2015

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

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

NIP 198102012006042001

NIP 198410082008121004

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M. Si.

Diana Holiday, S.F., Apt., M.Farm.

NIP 197806092005012004

NIP 197812212005012002

Mengesahkan
Dekan,

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

NIP 197604142002122001

ABSTRACT

*1-(4-nitrobenzoyloxymethyl)-5-fluorouracil (4-NFU) is a derivative of anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU) which has been substituted by alkyl, ester, benzene, and nitro groups at N1 position. 4-NFU has been synthesized but its activities have not been tested. This research aims to compare the cytotoxicity and antiproliferative activity between 4-NFU and 5-FU on MCF-7 cells. The cytotoxicity and antiproliferative activity were studied by MTT assay. The cytotoxicity study was done for 24 hours. The antiproliferative study was done for 24, 48, and 72 hours. The result showed that cytotoxicity activity of 4-NFU ($IC_{50} = 134.039 \mu M$) was higher than 5-FU ($IC_{50} = 4211.508 \mu M$) on MCF-7 cells. Based on the statistical analysis of the unpaired *t* test, there was a significant difference between IC_{50} of 4-NFU and 5-FU ($\alpha < 0.05$). The antiproliferative study showed that there was a growth inhibition on MCF-7 cells. The doubling time value of 4-NFU was 290.51 hours at $\frac{1}{2} IC_{50}$; 350.97 hours at IC_{50} ; and 418.2 hours at $1\frac{1}{2} IC_{50}$. The doubling time value of 5-FU was 185.99 hours at $\frac{1}{2} IC_{50}$; 214 hours at IC_{50} ; and 220.63 hours at $1\frac{1}{2} IC_{50}$. The doubling time value of 4-NFU was higher than 5-FU so that antiproliferative activity of 4-NFU was higher than 5-FU on MCF-7 cells.*

Keywords: *1-(4-nitrobenzoyloxymethyl)-5-Fluorouracil, MCF-7, cytotoxicity, proliferation.*

RINGKASAN

Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7); Eka Mustika Wati, 112210101017; 2015; 53 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Senyawa 1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-Fluorourasil (4-NFU) merupakan turunan dari obat antikanker 5-fluorourasil (5-FU) karena telah dimodifikasi dengan cara disubstitusi alkil, ester, benzena, dan gugus nitro pada posisi N1 oleh Kurnia (2013). Sintesis 4-NFU telah berhasil dilakukan oleh Kurnia (2013), namun pengujian terhadap aktivitasnya belum dilakukan. Oleh karena itu, peneliti akan melakukan uji aktivitas antikanker pendahuluan berupa uji sitotoksitas dan proliferasi terhadap senyawa 4-NFU secara *in vitro* menggunakan kultur sel kanker payudara MCF-7. Adapun tujuan yang hendak dicapai, diantaranya: (1) menentukan nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7, (2) mengetahui aktivitas sitotoksitas senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro* dibandingkan senyawa 5-FU, dan (3) mengetahui nilai *doubling time* pada proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dari senyawa 4-NFU dibandingkan senyawa 5-FU.

Penelitian ini dimulai dengan sintesis ulang senyawa 4-NFU dimana setelah dilakukan uji kemurnian dan identifikasi struktur, didapatkan hasil sintesis yang sama dengan senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Uji aktivitas sitotoksik dan proliferasi senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara (MCF-7) secara *in vitro* merupakan penelitian *experimental laboratories*, dimana uji sitotoksitas untuk mendapatkan nilai *Inhibition Concentration 50* (IC_{50}) dan uji proliferasi untuk mendapatkan nilai *doubling time* dilakukan dengan menggunakan metode garam tetrazolium (MTT). Pada uji sitotoksitas, persentase viabilitas sel

dianalisis probit untuk menentukan nilai IC_{50} . Setelah itu, nilai IC_{50} dianalisis statistik uji T tidak berpasangan dengan program SPSS 18.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU.

Pada uji proliferasi, konsentrasi yang digunakan berdasarkan pada nilai IC_{50} , yaitu $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$. Setelah sel kanker payudara MCF-7 diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam, kemudian viabilitas sel dihitung untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi dan dibuat grafik waktu inkubasi vs log viabilitas sel untuk mengetahui nilai *doubling time* sehingga dapat dibandingkan nilai *doubling time* antara kontrol sel, senyawa 4-NFU, dan 5-FU.

Berdasarkan hasil uji sitotoksitas, senyawa 4-NFU memiliki nilai IC_{50} sebesar 134,039 μM sedangkan senyawa 5-FU sebesar 4211,508 μM terhadap sel kanker payudara MCF-7, dimana setelah dianalisis statistik uji T tidak berpasangan, diperoleh harga $\alpha = 0,012$ ($\alpha < 0,05$) sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU. Sedangkan dari hasil uji proliferasi, menunjukkan bahwa kontrol sel memiliki nilai *doubling time* tercepat. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan proliferasi sel dapat diperlambat dengan pemberian senyawa 4-NFU dan 5-FU, dimana senyawa 4-NFU menunjukkan penghambatan terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang lebih besar daripada senyawa 5-FU karena nilai *doubling time* sel setelah pemberian senyawa 4-NFU lebih besar daripada setelah pemberian senyawa 5-FU. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi senyawa 4-NFU dan 5-FU maka semakin besar kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang semakin lama. Oleh karena itu, berdasarkan nilai IC_{50} dan *doubling time* dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksitas dan antiproliferasi yang lebih baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 daripada senyawa 5-FU.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada Allah SWT. Atas limpahan rahmat dan barokahnya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7).” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang mendalam kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
2. Ibu Ayik Rosita P., S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberi kesempatan, bimbingan, arahan dan bahan hingga terselesainya penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Bapak Dian Agung Pangaribowo., S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu untuk membantu penulis menyelesaikan skripsi ini.
4. Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si. dan Ibu Diana Holidah, S.F., Apt., M.Farm. selaku anggota tim penguji yang telah meluangkan waktu dan sarannya untuk menguji skripsi ini.
5. Ayahanda Agus Surono, ibunda Muspiyah, dan adik Bimo Nur Cahyo tercinta yang telah memberikan kasih sayang dan doa tak terhingga kepada penulis.
6. Special thanks to Khoirunnopi Sastra Wijaya atas cinta, perhatian, kasih sayang, dan pengertiannya selama ini hingga skripsi ini dapat terselesaikan.

7. Sahabat-sahabat seperjuangan Meyladia, Nurhidayati, Puspita, dan Awalia yang selalu membantu dan memberi semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Sahabat-sahabat dikosan, terutama Cila, Eli, Sendy, Siska, Dinda, Aulia, dan Dyah. Terimakasih atas perhatian yang diberikan.
9. Teman-teman “Asmef” yang telah memberi banyak pengalaman berharga. Terimakasih atas waktu-waktu yang berharga yang selama ini kita lalui bersama.
10. Teknisi laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang dengan sabar membantu peneliti dalam melaksanakan penelitian.
11. Semua pihak yang telah membantu, menyumbangkan doa, ide, dan semangat demi kelancaran pembuatan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satupersatu.

Penulisan skripsi ini merupakan suatu tahapan dalam proses belajar untuk menghasilkan sesuatu yang bermanfaat. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik dari berbagai pihak untuk pengembangan skripsi ini ke arah yang lebih baik. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kanker	5
2.2 Kanker Payudara	6
2.3 Antikanker	7

2.4	5-Fluorourasil	9
2.5	1-(4-nitrobenzoioksimetil)-5-Fluorourasil	10
2.6	Sel <i>Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7)</i>	13
2.7	Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi	14
BAB 3. METODE PENELITIAN.....		16
3.1	Jenis Penelitian.....	16
3.2	Rancangan Penelitian	16
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.4	Definisi Operasional Variabel.....	17
3.5	Variabel Penelitian.....	17
3.5.1	Variabel Bebas	17
3.5.2	Variabel Terikat.....	18
3.5.3	Variabel Terkendali	18
3.6	Alat dan Bahan yang Digunakan.....	18
3.6.1	Alat.....	18
3.6.2	Bahan	19
3.7	Prosedur Penelitian.....	19
3.7.1	Sintesis Senyawa 4-NFU	19
3.7.2	Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis.....	20
3.7.3	Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis.....	21
3.7.4	Preparasi Larutan Senyawa 4-NFU dan 5-FU.....	21
3.7.2	Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT	22
3.7.3	Uji Pengamatan Proliferasi Sel (<i>Doubling Time</i>).....	23
3.8	Analisis Data.....	23
3.8.1	Uji Sitotoksisitas.....	24
3.8.2	Uji Proliferasi	24
3.8.3	Analisis Statistik.....	24
3.9	Skema Penelitian	25
3.9.1	Sintesis senyawa 4-NFU	25

3.9.2	Alur Preparasi Larutan Senyawa 4-NFU dan 5-FU .	26
3.9.3	Alur Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT	27
3.9.4	Alur Uji Pengamatan Proliferasi Sel (<i>Doubling Time</i>)	28
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT-Densitometri)	30
4.2	Uji Kemurnian dengan Penentuan Jarak Leleh	35
4.3	Identifikasi Struktur Senyawa 4-NFU	36
4.4	Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT	38
4.5	Uji Pengamatan Proliferasi Sel (<i>Doubling Time</i>)	41
BAB 5.	PENUTUP	46
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran	46
	DAFTAR PUSTAKA	48
	LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Perbandingan pergeseran kimia antara hasil percobaan dan literatur.....	12
2.2 Interpretasi spektra IR senyawa 4-NFU	13
4.1 % Rendemen senyawa hasil sintesis.....	29
4.2 Nilai Rf, korelasi r (s,m), dan r (m,e) senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 pada tiap eluen.....	32
4.3 Hasil uji jarak leleh senyawa 4-NFU dalam vial 6-15.....	35
4.4 Perbandingan spektra IR senyawa 4-NFU hasil percobaan dengan literatur	37
4.5 Nilai IC ₅₀ senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7	40
4.6 Hasil uji <i>doubling time</i> senyawa 4-NFU dan s-FU dengan metode MTT...	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur 5-Fluorourasil	2
2.2 Mekanisme Aksi Antitumor 5-FU	9
2.3 Struktur 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-FU	10
2.4 Spektra Hasil Analisis ¹ H-NMR dari Fraksi 11-17	11
2.5 Spektra Hasil Analisis FTIR-KBr Vial 11-17	12
2.6 Sel MCF-7 Perbesaran 10x	14
4.1 Hasil analisis KLT dari fraksi-fraksi kromatografi kolom	30
4.2 Hasil analisis KLT dengan tiga eluen berbeda	31
4.3 Perbandingan spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15, 5-FU, asam benzoat, dan 4-nitrobenzoilklorida	33
4.4 Spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15	34
4.5 Spektra densitometri senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013)	34
4.6 Spektra IR hasil sintesis FTIR-KBr senyawa 4-NFU dalam vial 6-15	36
4.7 Spektra IR hasil sintesis FTIR-KBr senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013)	37
4.8 Kurva persamaan konsentrasi sampel vs persentase sel hidup senyawa 5-FU	39
4.9 Kurva persamaan konsentrasi sampel vs persentase sel hidup senyawa 4-NFU	39
4.10 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 4-NFU dan 5-FU	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Bobot Penimbangan Bahan	54
B. Perhitungan Rendemen Senyawa Produk	55
C. Spektra densitometri	56
D. Perhitungan Pembuatan Larutan 4-NFU dan 5-FU	57
D.1 Uji sitotoksisitas.....	57
D.2 Uji Proliferasi.....	58
E. Hasil Uji Sitotoksisitas.....	59
E.1 Perhitungan % sel hidup.....	59
E.2 Foto sel kanker payudara MCF-7.....	62
E.3 Hasil analisis probit	63
E.4 Hasil analisis uji T tidak berpasangan	71
F. Hasil Uji Proliferasi	72
F.1 Perhitungan jumlah sel hidup	72
F.2 Perhitungan nilai <i>doubling time</i>	74
F.3 Foto sel kanker payudara MCF-7 setelah diberi perlakuan	75
G. Spesifikasi 5-FU	76

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

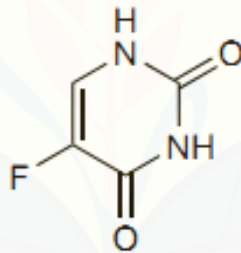
Kanker adalah penyakit yang dicirikan dengan hilangnya kontrol pertumbuhan, pembagian, dan penyebaran sekelompok sel yang kemudian dapat menginvasif dan menghancurkan jaringan-jaringan di sekitarnya. Sel-sel yang mengalami perubahan tersebut juga dapat menyebar ke wilayah tubuh lain melalui proses yang disebut metastasis (Avendano dan Menendez, 2008). Kanker merupakan salah satu penyakit yang paling sulit ditangani dan bertanggung jawab terhadap kurang lebih 13% kematian di seluruh dunia. Sekitar 14,1 juta kasus kanker terjadi pada tahun 2012 dan diperkirakan akan meningkat menjadi 23,6 juta kasus setiap tahunnya hingga tahun 2030 (WHO, 2014). Menurut Riset Kesehatan Dasar (2013) dapat dikatakan bahwa prevalensi penyakit kanker di Indonesia sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang.

Kanker payudara merupakan penyebab kematian tersering pada wanita dengan jumlah kematian sebanyak 522.000 pada tahun 2012. Selain itu, pada tahun 2012 juga terdapat kasus kanker payudara sebanyak 1,7 juta kasus, dimana kasus kanker payudara lebih banyak terjadi di negara berkembang dan dapat terjadi mulai dari umur kurang dari 40 tahun hingga lebih dari 65 tahun (IARC, 2013; American Cancer Society, 2013). Menurut Youlden *et al.*, (2014) dapat dikatakan bahwa terdapat 48.998 kasus kanker payudara dengan jumlah kematian sebesar 19.750 di Indonesia pada tahun 2012.

Kanker dapat diatasi dengan cara melakukan pendekatan sistemik seperti kemoterapi. Menurut statistik di negara maju, 17% pasien kanker sembuh dengan kemoterapi. Bila ditambah dengan pembedahan dini, 50% pasien kanker dapat disembuhkan (Nafrialdi dan Gan, 2012).

Obat antikanker yang mempunyai aktivitas biologis tertentu dapat digunakan sebagai senyawa penuntun untuk pengembangan obat baru dengan cara substitusi gugus-gugus tertentu sehingga didapatkan senyawa yang lebih poten dibandingkan senyawa induknya. Setelah itu, dapat dilakukan penelitian yang lebih mendalam terhadap senyawa baru tersebut dengan melakukan percobaan farmakologi berupa uji aktivitas (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Senyawa antikanker dapat digolongkan menjadi senyawa pengalkilasi, antimetabolit, antikanker produk alamiah, antibiotik, dan hormon. 5-Fluorourasil (5-FU) merupakan salah satu obat antikanker golongan antimetabolit yang masih banyak digunakan baik secara tunggal maupun kombinasi, dimana mekanisme 5-FU sebagai antikanker yaitu mengaktifasi p53 yang bertindak sebagai gen yang menekan pertumbuhan tumor dengan cara memicu apoptosis. Sejak tahun 1957, 5-FU telah memainkan peran penting dalam pengobatan kanker usus besar, gastrointestinal, payudara, kepala, dan leher (Zhang *et al.*, 2008).



Gambar 1.1 Struktur 5-Fluorourasil (Sumber: Sweetman, 2009)

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa adanya substitusi asam amino, peptida, fosfolipid, dan polimer pada posisi N1 dan/atau N3 dapat meningkatkan sifat farmakologi dan farmakokinetik (Tian *et al.*, 2007). Kurnia (2013) melakukan modifikasi obat antikanker 5-FU pada posisi N1 membentuk senyawa turunannya yaitu 1-(4-nitrobenzoyloximetil)-5-Fluorourasil (4-NFU), dimana senyawa tersebut telah disubstitusi alkil, ester, benzene, dan gugus nitro pada posisi N1. Sintesis 4-NFU telah berhasil dilakukan namun pengujian terhadap aktivitasnya belum dilakukan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Kurnia (2013) maka peneliti akan melakukan uji aktivitas antikanker pendahuluan berupa uji sitotoksitas dan proliferasi secara *in vitro* terhadap senyawa 4-NFU karena setelah dianalisis HKSA dan pendekatan Topliss, senyawa 4-NFU menunjukkan peningkatan aktivitas yang dipengaruhi oleh parametrik lipofilik, elektronik, dan sterik dengan adanya penambahan gugus nitro dan benzene pada posisi para (Kurnia, 2013). Uji sitotoksitas merupakan uji pendahuluan secara *in vitro* menggunakan kultur sel kanker untuk mengetahui sifat toksik suatu senyawa terhadap sel kanker sedangkan uji proliferasi adalah uji untuk mengetahui kemampuan senyawa dalam menghambat proliferasi sel kanker (Fotakis dan Timbrell, 2006; Meiyanto *et al.*, 2007).

Uji sitotoksitas dan proliferasi terhadap 4-NFU dilakukan terhadap sel kanker payudara MCF-7. Sel MCF-7 biasa digunakan untuk berbagai penelitian kanker payudara secara *in vitro* karena memiliki beberapa karakteristik yang sama dengan epitel payudara terkait kemampuan memproses estrogen dalam bentuk estradiol untuk berikatan dengan reseptor estrogen di dalam sitoplasma. Selain itu, gen p53 pada sel MCF-7 belum bermutasi (Pfeiffer, 2004; Schafer, 2000).

Uji sitotoksitas untuk mendapatkan nilai *Inhibition Concentration 50* (IC₅₀) dan uji proliferasi untuk mendapatkan nilai *doubling time* dilakukan dengan menggunakan metode garam tetrazolium (MTT). Aktivitas sitotoksitas dinyatakan dalam IC₅₀ yang menunjukkan nilai konsentrasi yang dapat menyebabkan sel hidup sebanyak 50% dari populasi sel. Nilai IC₅₀ dapat diperoleh dari analisis probit menggunakan SPSS 18.0. Setelah itu, nilai IC₅₀ dianalisis statistik uji T tidak berpasangan dengan program SPSS 18.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara IC₅₀ senyawa 4-NFU dan 5-FU. Sedangkan untuk uji *doubling time*, % sel hidup dihitung untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi dan dibuat grafik antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup untuk mengetahui nilai *doubling time*. Setelah itu, dapat dibandingkan nilai *doubling time* antara kontrol sel, senyawa 4-NFU, dan 5-FU (CCRC, 2009; Sinaga *et al.*, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah:

1. Berapa nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 yang ditunjukkan dari % sel hidup?
2. Bagaimana aktivitas sitotoksisitas senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro* dibandingkan senyawa 5-FU?
3. Bagaimana nilai *doubling time* pada proliferasi sel kanker payudara MCF-7 terhadap senyawa 4-NFU dibandingkan senyawa 5-FU?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Menentukan nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 yang ditunjukkan dari % sel hidup.
2. Mengetahui aktivitas sitotoksisitas senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro* dibandingkan senyawa 5-FU.
3. Mengetahui nilai *doubling time* pada proliferasi sel kanker payudara MCF-7 terhadap senyawa 4-NFU dibandingkan senyawa 5-FU.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan sumbangan terhadap ilmu pengetahuan tentang aktivitas senyawa obat baru (4-NFU) sebagai agen sitotoksisitas/antikanker yang telah diuji aktivitasnya secara *in vitro* menggunakan sel kanker payudara MCF-7 baik viabilitas (sel hidup) maupun proliferasinya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker ialah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler (Nafrialdi dan Gan, 2012). Apapun sebabnya, kanker pada dasarnya adalah suatu penyakit sel yang ditandai dengan suatu pergeseran pada mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel (Katzung, 1997). Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut:

- a. Pertumbuhan berlebihan
- b. Gangguan diferensiasi sel dan jaringan
- c. Bersifat invasif yaitu mampu tumbuh di jaringan sekitarnya
- d. Bersifat metastatik, menyebar ke tempat lain, dan menyebabkan pertumbuhan baru
- e. Memiliki heriditas bawaan yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker
- f. Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Nafrialdi dan Gan, 2012).

Kanker disebabkan adanya genom abnormal, yang terjadi karena adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Adanya gen abnormal ini menimbulkan salah atur. Gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel itu disebut protoonkogen dan gen penekan tumor, terdapat pada semua kromosom dan banyak jumlahnya. Protoonkogen yang telah mengalami perubahan dapat menimbulkan kanker disebut onkogen (Sukardja, 2000).

2.2 Kanker Payudara

Menurut Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2014) dapat dikatakan bahwa kanker payudara berada di urutan kedua yang paling sering ditemukan pada wanita, setelah kanker mulut rahim. Ada beberapa tipe kanker payudara, diantaranya:

a. *Ductal Carcinoma In Situ* (DCIS)

DCIS diartikan dengan munculnya sel-sel abnormal yang melapisi saluran payudara tanpa adanya pertumbuhan di sepanjang dinding duktus hingga jaringan payudara sehingga disebut juga kanker payudara non-invasif.

b. *Invasive Ductal Carcinoma* (IDC)

IDC merupakan kanker payudara yang paling umum. Sel yang melapisi saluran payudara mengalami abnormal, kemudian sel-sel abnormal tersebut menerobos dinding duktus dan menyerang jaringan payudara sehingga sel-sel kanker dapat menyebar ke kelenjar getah bening terdekat atau bagian lain dari tubuh.

c. *Invasive Lobular Carcinoma* (ILC)

Kanker mulai terjadi pada sel-sel yang melapisi kelenjar susu (lobulus). Sel-sel abnormal tumbuh melalui dinding lobulus, kemudian dapat menyebar ke kelenjar getah bening terdekat atau bagian lain dari tubuh.

d. *Inflammatory Breast Cancer* (IBC)

IBC merupakan tipe yang jarang ditemui dari kanker payudara invasif. Pada penderita IBC, tidak ditemui benjolan tunggal atau tumor. Akan tetapi, kulit payudara terlihat merah, lebih tebal, dan terasa hangat (American Cancer Society, 2014).

Regimen kemoterapi untuk kanker payudara yang sering digunakan adalah doxorubisin, 5-fluorourasil, cyclophosphamide, adriamycin, dan paklitaksel. Ada 3 pengaruh penting pada kanker payudara, diantaranya:

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya kanker payudara. Kelainan ini diketahui terletak dilokus kecil di kromosom 17q21 pada kanker payudara yang timbul saat usia muda.

b. Hormon

Kelebihan hormon estrogen endogen atau lebih tepatnya terjadi ketidakseimbangan hormon terlihat jelas pada kanker payudara. Faktor resiko seperti masa reproduksi yang lama dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan estrogen pada siklus menstruasi, dimana apabila hormon estrogen berlebihan dapat memicu terjadinya kanker payudara.

c. Faktor lingkungan dan gaya hidup

Alkohol, diet tinggi lemak, dan infeksi virus dapat mempengaruhi onkogen dan gen penekan tumor dari kanker payudara (Shodiq, 2011).

2.3 Antikanker

Cara terapi kanker ada bermacam-macam, seperti operasi, radioterapi, kemoterapi, hormonoterapi, imunoterapi, bioterapi, dan terapi lain-lain. Pada umumnya terapi yang diberikan kepada penderita kanker ialah cara *sequential* yaitu setelah selesai dengan cara terapi yang satu, kalau perlu diikuti cara terapi yang lain. Terapi yang bermacam-macam tersebut jarang diberikan sekaligus dalam waktu yang bersamaan karena umumnya penderita tidak mampu menahan efek samping dari pemberian terapi sekaligus tersebut. Selain itu, pemberian terapi baik operasi, radioterapi atau kemoterapi akan menurunkan imunitas penderita (Sukardja, 2000).

Segolongan obat-obatan dapat menghambat pertumbuhan kanker bahkan ada yang dapat membunuh sel kanker. Obat itu disebut sitostatika atau obat antikanker. Obat antikanker terutama bekerja pada *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) yang merupakan komponen utama gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Cara kerjanya terhadap sel kanker sebagai berikut:

- a. Menghambat atau mengganggu sintesa DNA dan *Ribonucleic Acid* (RNA)
- b. Merusak replikasi DNA
- c. Mengganggu transkripsi DNA oleh RNA
- d. Mengganggu kerja gen (Sukardja, 2000)

Klasifikasi obat antikanker umumnya didasarkan atas cara kerja obat itu dalam dalam siklus pertumbuhan sel. Berikut klasifikasi obat antikanker:

a. Alkilasi

Sejumlah senyawa mempunyai mekanisme yang menunjukkan terjadinya alkilasi. Obat-obat tersebut adalah prokarbazin, dekarbazin, altretamin (heksametilmelamin), dan sisplatin (Katzung, 1997).

b. Antimetabolit

Antipurin dan antipirimidin mengambil tempat purin dan pirimidin dalam pembentukan nukleosida, sehingga mengganggu berbagai reaksi penting dalam tubuh. Penggunaannya sebagai obat kanker didasarkan atas kenyataan bahwa metabolisme purin dan pirimidin lebih tinggi pada sel kanker daripada sel normal (Nafrialdi dan Gan, 2012).

c. Produk alamiah

Berbagai obat yang berasal dari alam (tumbuhan dan hewan) digunakan sebagai antikanker, antara lain alkaloid vinka, taksan, epipodofilotoksin, dan kamptotesin (Nafrialdi dan Gan, 2012).

d. Antibiotik

Penapisan produk mikrobial telah memberikan penemuan sejumlah inhibitor pertumbuhan yang ternyata dapat digunakan dalam kemoterapi kanker. Obat-obat antibiotik yang ada sekarang merupakan hasil dari berbagai jamur tanah *Streptomyces*, termasuk diantaranya antrasiklin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin, dan plikamisin (Katzung, 1997).

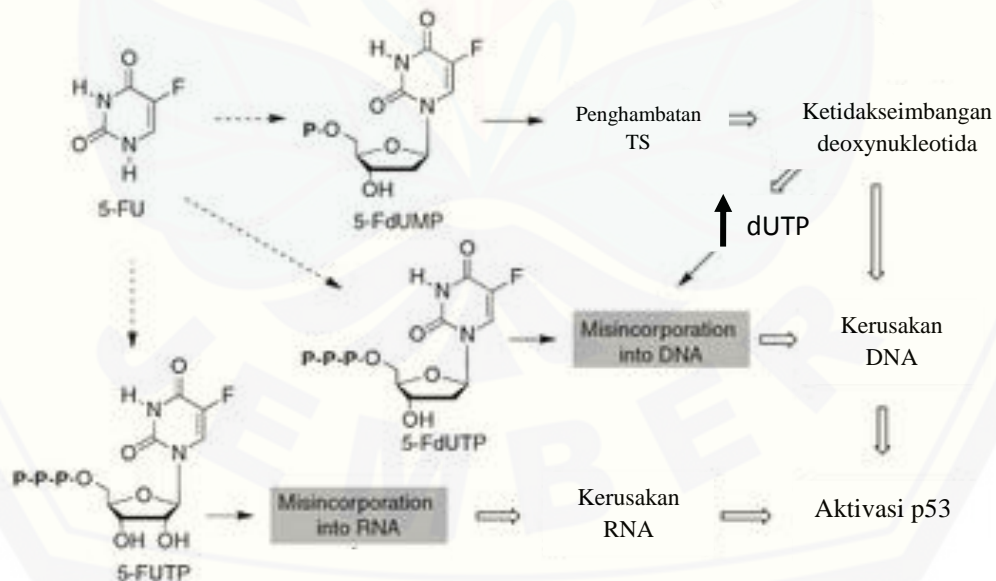
e. Hormon dan antagonis

Berbagai hormon steroid digunakan pada pengobatan kanker. Antara lain kortikosteroid (prednison), hormon progesterin (hidroksi progesteron kaproat), estrogen (megestrol asetat), dan androgen (testosteron propionat). Hormon-hormon tersebut biasanya digunakan untuk tumor endometrium, payudara, prostat, dan limfoma (Nafrialdi dan Gan, 2012).

2.4 5-Fluorourasil

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 yang menggantikan tempat hidrogen. Karena strukturnya itulah, 5-FU dapat mengganggu metabolisme nukleosida dan dapat bergabung dengan RNA maupun DNA untuk memicu sitotoksitas dan kematian sel (Zhang *et al.*, 2008). 5-FU berbentuk serbuk kristal berwarna putih dan harus terhindar dari cahaya. 5-FU sedikit larut dalam air dan alkohol, dimana kadar 1% dalam larutan berair memiliki pH 4,5-5,0 (Sweetman, 2009)

5-FU merupakan analog pirimidin urasil yang dapat memasuki sel dengan mekanisme transport seperti urasil. Gambar 2.1 menunjukkan bahwa 5-FU diubah secara intraselular menjadi beberapa metabolit aktif, yaitu *Fluorodeoxyuridine Monofosfat* (FdUMP), *Trifosfat Fluorodeoxyuridine* (FdUTP), dan *Trifosfat Fluorouridine* (FUTP). Metabolit aktif tersebut mengganggu aksi *Thymidylate Synthase* (TS), sintesis RNA, dan DNA (Avendano dan Menendez, 2008).

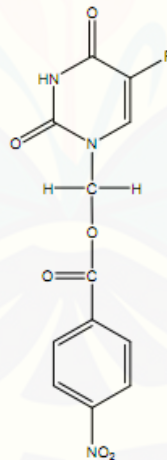


Gambar 2.1 Mekanisme aksi antitumor 5-FU (Sumber: Avendano dan Menendez, 2008)

Adanya metabolit FdUTP dan peningkatan jumlah dUTP dapat bertindak sebagai substrat palsu polimerase DNA dan mengakibatkan kesalahan penggabungan pada DNA. Selain itu, adanya metabolit FUTP dapat mengganggu fungsi normal dari RNA. Adanya penghambatan TS dan *misincorporation* oleh metabolit 5-FU mengakibatkan DNA yang terbentuk berada dalam stabilisasi p53 yaitu penekan tumor yang mempertahankan integritas DNA (Avendano dan Menendez, 2008; Longley *et al.*, 2003).

Deteksi DNA yang mengalami kerusakan diatur oleh gen penekan tumor p53. Saat terjadi kerusakan DNA, p53 menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan. Jika perbaikan DNA berhasil, maka proliferasi sel akan dilanjutkan untuk memelihara massa sel. Namun, apabila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi program kematian sel (apoptosis) (Siu *et al.*, 1999).

2.5 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil

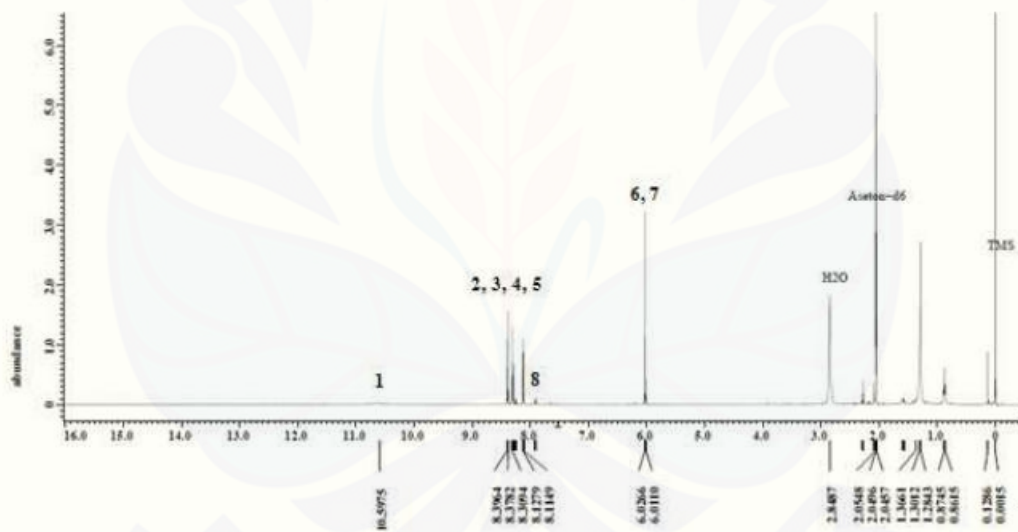


Gambar 2.2 Struktur senyawa 4-NFU (Sumber: Kurnia, 2013)

Gambar 2.2 merupakan struktur senyawa 4-NFU. Senyawa 4-NFU dapat disintesis melalui reaksi substitusi antara senyawa 5-FU dengan formaldehid yang

dilanjutkan dengan reaksi esterifikasi dengan 4-nitrobenzoilklorida. 4-NFU memiliki beberapa karakteristik, diantaranya berupa kristal putih, berbentuk benang, tidak berbau, memiliki rendemen rata-rata sebesar 21,5596 %, dan memiliki jarak lebur 209-211°C (Kurnia, 2013).

4-NFU merupakan turunan 5-FU yang sudah disubstitusi alkil, ester, benzene, dan gugus nitro pada posisi N1 dimana berdasarkan analisis HKSA dan pendekatan Topliss menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas dikarenakan adanya pengaruh parametrik lipofilik, elektronik, dan sterik dengan adanya penambahan gugus nitro dan benzene (Kurnia, 2013). Identifikasi produk hasil sintesis senyawa 4-NFU yang telah dilakukan oleh Kurnia (2013) dengan menggunakan $^1\text{H-NMR}$ dan FTIR-KBr menunjukkan bahwa hasil sintesis mengandung senyawa 4-NFU.

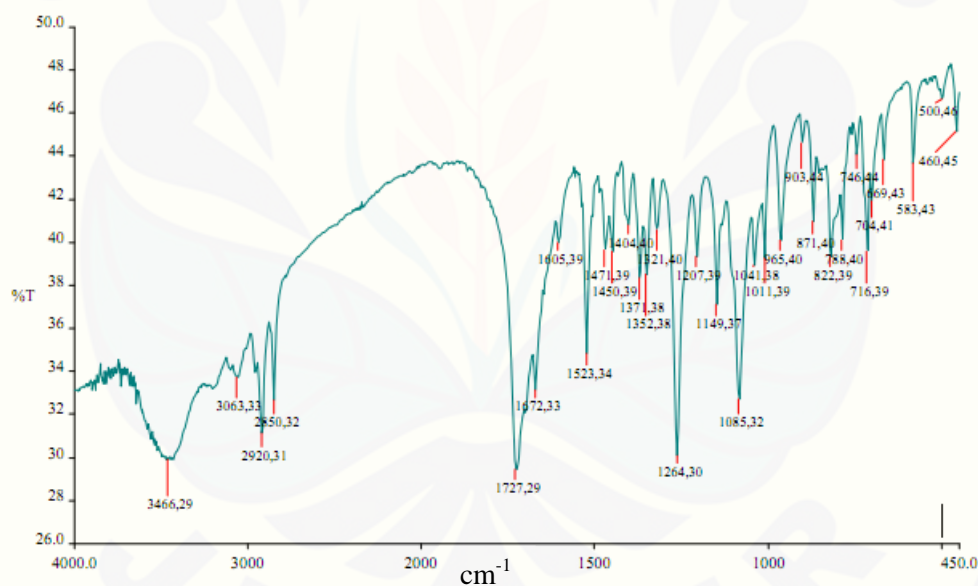


Gambar 2.3 Spektra hasil analisis $^1\text{H-NMR}$ dari fraksi 11-17 (Sumber: Kurnia, 2013)

Tabel 2.1 Perbandingan pergeseran kimia antara hasil percobaan dan literatur

Proton	Pergeseran Kimia (ppm)		Multiplisitas
	Hasil Percobaan	Literatur	
H1 (NH)	10,5975	10,0	Singlet
H2 (CH)	8,2874-8,2965	6,5-8,0	Multiplet
H3 (CH)	8,3743-8,3834	6,5-8,0	Multiplet
H4 (CH)	8,3056-8,3146	6,5-8,0	Multiplet
H5 (CH)	8,3925-8,4015	6,5-8,0	Multiplet
H6 & H7 (CH ₂)	6,0110-6,0266	4,93	Doublet
H8 (CH)	8,1110-8,1279	6,5 – 8,0	Multiplet

Sumber: Kurnia (2013)



Gambar 2.4 Spektra hasil analisis FTIR-KBr vial 11-17 (Sumber: Kurnia, 2013)

Senyawa 4-NFU merupakan senyawa ester. Pada Gambar 2.4 dan Tabel 2.2 dapat dilihat bahwa rentang frekuensi senyawa ester adalah $1750-1725\text{ cm}^{-1}$ dan pada spektra hasil analisis terdapat pita pada frekuensi 1727 cm^{-1} . N-H amida memiliki rentang frekuensi $3500-3150\text{ cm}^{-1}$. Adanya N-H amida menandakan bahwa substituen

terikat pada N1, bukan pada N3 yang ditunjukkan pada spektra dengan frekuensi 3466 cm^{-1} . Selain itu, gugus nitro (rentang frekuensi 1555–1485/1355–1320 cm^{-1}) ditunjukkan oleh spektra yang memberikan pita frekuensi 1352 cm^{-1}) (Kurnia, 2013).

Tabel 2.2 Interpretasi spektra IR senyawa 4-NFU

Tipe Ikatan	Frekuensi (cm^{-1})	
	Literatur	Percobaan
C=O Ester	1750-1725	1727
C-O Ester	1310-1250	1264
N-H (amida)	3500-3150	3466
C=O (amida)	1680-1630	1672
Senyawa nitro aromatis	1555–1485/1355–1320	1523; 1352; 1321
C-F	1150-1000	1149

Sumber: Kurnia (2013)

2.6 Sel *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7)

Kultur sel kanker dapat digunakan sebagai model biologi untuk menentukan sifat-sifat biologisnya dan analisis obat-obatan sebagai agen antikanker (Arya *et al.*, 2011). Kultur sel MCF-7 merupakan kultur sel kanker payudara yang umum digunakan dalam uji aktivitas antikanker secara *in vitro* (Sinaga *et al.*, 2011). Sel ini pertama kali diisolasi pada tahun 1970, diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun bergolongan darah O dengan RH positif (Dwitarhayani, 2012).



Gambar 2.5 Sel MCF-7 perbesaran 10x
Keterangan : (a) Sel MCF-7 (Sumber: Dwitarhayani, 2012)

Biakan sel MCF-7 memiliki kemampuan untuk memproses estrogen dalam bentuk estradiol agar berikatan dengan reseptor estrogen dalam sitoplasma sehingga membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel (Foster, 2001; Pfeiffer, 2004). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan gen *p53 wild type* (belum bermutasi) sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi. Apabila gen *p53* sudah bermutasi, maka gen *p53* tidak bisa mengikat elemen respon pada DNA sehingga dapat menghilangkan kemampuan gen *p53* untuk mengatur siklus sel (Schafer, 2000). Dalam pertumbuhannya, sel MCF-7 akan membentuk kultur selapis pada labu kultur yang ditumbuhkan dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Widowati & Mudahar, 2009).

Sel MCF-7 merupakan sel *adherent*, yang akan tumbuh melekat. Sel ini dapat ditumbuhkan pada media yang mengandung *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), DMEM, *Fetal Bovine Serum* (FBS), dan antibiotik antimikotik (Dwitarhayani, 2012).

2.7 Uji Sitotoksisitas dan Proliferasi

Pengujian aktivitas antikanker pendahuluan dapat berupa uji sitotoksisitas dan proliferasi. Sitotoksisitas merupakan kematian sel oleh komponen-komponen kimia atau mediator sel (sel T sitotoksik). Sitotoksisitas biasa digunakan sebagai pedoman

di dalam laboratorium untuk mendeteksi kematian sel, tanpa melihat mekanismenya (Osthoff, 2008). Uji sitotoksitas secara *in vitro* penting untuk menentukan respon dari sel normal dan kanker terhadap adanya agen terapi (Mirzayans, 2007).

Uji proliferasi adalah uji untuk mengetahui besarnya penghambatan pertumbuhan kultur sel kanker setelah pemberian senyawa uji. Setelah itu, jumlah sel yang hidup diukur dengan menggunakan hemositometer, *counter cell* elektronik atau dengan uji enzimatik pada tiap waktu inkubasi tertentu (Baguley *et al.*, 2002). Hasil dari uji proliferasi adalah nilai *doubling time*. *Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kalinya. Waktu penggandaan ditentukan dengan ekstrapolasi dari waktu *vs* log jumlah sel hidup. Senyawa yang mampu memperpanjang waktu penggandaan, menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme *cell cycle arrest* (Meiyanto *et al.*, 2007).

Salah satu metode untuk menilai aktivitas sitotoksitas dan antiproliferasi suatu senyawa uji adalah dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Metode MTT merupakan metode kolorimetrik yang sensitif, kuantitatif, dan terpercaya untuk mengukur viabilitas, proliferasi, dan aktivitas sel. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel (Doyle dan Griffiths, 1998; Meizarini, 2008).

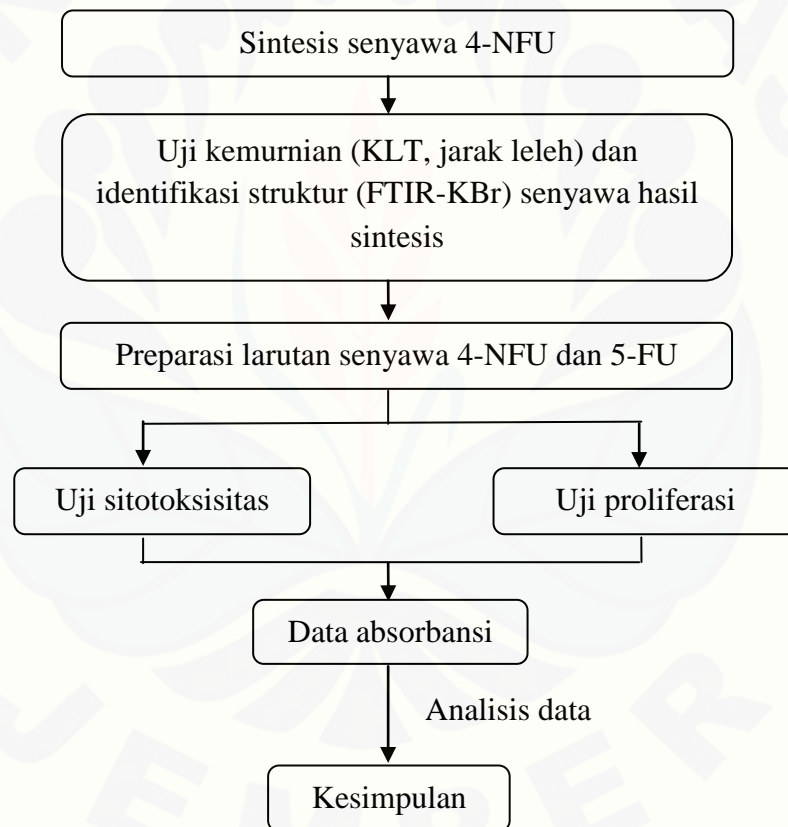
MTT assay didasarkan atas reduksi garam tetrazolium (MTT) yang berwarna kuning oleh aktivitas enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup sehingga membentuk formazan berwarna biru yang dapat dikuantitatifikasi dengan menggunakan ELISA reader (Fotakis dan Timbrell, 2006). Uji MTT dapat digunakan untuk menguji sitotoksitas karena hanya metabolik sel yang aktif dapat mereduksi garam menjadi produk formazan. Oleh karena itu, sel-sel yang mati tidak mengganggu tingkat absorbansi MTT (Keepers *et al.*, 1991).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas sitotoksik dan proliferasi senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara (MCF-7) secara *in vitro* merupakan penelitian *experimental laboratories*.

3.2 Rancangan Penelitian



3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Adapun laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk sintesis, uji kemurnian, dan identifikasi struktur senyawa 4-NFU.
- b. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk uji sitotoksik dan proliferasi.

Penelitian dilakukan dari Juli 2014 sampai dengan Juni 2015.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Parameter uji sitotoksik adalah IC_{50} sedangkan parameter uji proliferasi adalah waktu penggandaan (*doubling time*) sel kanker payudara MCF-7.

- a. IC_{50} adalah konsentrasi senyawa yang dapat menyebabkan sel hidup sebanyak 50% dari populasi sel kanker payudara MCF-7, dimana IC_{50} dapat dihitung dengan menggunakan analisis probit (Meiyanto *et al.*, 2008). Suatu senyawa dinyatakan sebagai senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik poten apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$, moderat sitotoksik apabila $IC_{50} = 21-200 \mu\text{g/ml}$, aktivitas sitotoksik rendah apabila $IC_{50} = 201-500 \mu\text{g/ml}$, dan tidak memiliki aktivitas sitotoksik apabila $IC_{50} \geq 501 \mu\text{g/ml}$ (Geran *et al.*, 1978).
- b. *Doubling time* adalah waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipatnya (Meiyanto *et al.*, 2008), dimana sel kanker payudara MCF-7 secara normal memiliki *doubling time* selama 24 jam (Sutherland *et al.*, 1983).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi senyawa. Pada uji sitotoksitas, konsentrasi senyawa 4-NFU yang digunakan sebesar 0,5 μM ; 5 μM ; 50 μM ; 250 μM , dan 500 μM dan konsentrasi kontrol positif (5-FU) yaitu 0,5 μM ; 5 μM ;

50 μM ; 250 μM ; 500 μM ; dan 5000 μM . Pada uji proliferasi, konsentrasi yang digunakan sebesar $\frac{1}{2}$ IC_{50} , IC_{50} , dan $1\frac{1}{2}$ IC_{50} dari hasil uji sitotoksitas.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} dan *doubling time* senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 yang dibandingkan dengan 5-FU.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah jenis sel kanker, media kultur, cara kultur sel kanker, metode pengujian, dan suhu inkubasi.

3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam sintesis dan uji kemurnian, antara lain beaker glass (50 mL dan 250 mL) Iwaki Pyrex, erlenmeyer 100 mL, bola pipet, pipet volume (1 mL, 2 mL dan 5 mL), batang pengaduk, pipet tetes, seperangkat alat reflux, vial, corong pisah Schoot Duran, gelas ukur (10 mL dan 50 mL) Iwaki Pyrex, corong & labu alas bulat dua leher Schoot Duran, chamber, mikropipet (Blaubrand® IntraEnd), stirer, oven, lampu Ultra Violet (UV), pengering, Electrothermal melting point apparatus, dan FTIR Perkin Elmer-Spectrum One.

Alat yang digunakan dalam uji sitotoksitas dan proliferasi, antara lain autoklaf (Hirayama HV-25 020585175, Hirayama Manufacturing Co., Jepang), *Labconco purifier class II biosafety cabinet* (Delta Series, Labconco Corporation, Missouri, USA), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), timbangan mikro, mikropipet (Pipetman^R neo Gilson, France), *ELISA reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark serial no. 11565*, Jepang), mikroskop cahaya (Nikon YS 100, Japan), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan), sentrifus (Sorvall, MC 12 V 9700869), dan vortex (Maxi Mix II, Thermolyne type

37600 mixer, Iowa, USA). Selain alat-alat di atas, alat habis pakai yang digunakan dalam kerja *in vitro* antara lain: *microtube* 1 ml, *yellow tip* dan *blue tip* (Brand), *96-well plate* (Nunc), dan aluminium foil.

3.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam sintesis dan uji kemurnian, antara lain 5-fluorourasil $\geq 99,0\%$ prosintesis (Merck/818505), 4-nitrobenzoilklorida p.a $\geq 97,5\%$ (Sigma-Aldrich/112208), formaldehid, aseton p.a (Merck), aquades, trietilamin (Merck/808352), silika gel 60 F254, heksana p.a (Merck), aseton p.a (Merck), dan asam benzoat p.a $\geq 99,0\%$ (Merck/82225701).

Bahan yang digunakan dalam uji sitotoksitas dan proliferasi, antara lain sel MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) (DMSO 99,5% pro GC), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), DMEM, MTT (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), dan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) (Merck-Schuchardt, Dr.Th.Schuchardt & Co, D-85662 Hobenbrunn, Germany).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sintesis Senyawa 4-NFU (Kurnia, 2013)

Sintesis senyawa 4-NFU dilakukan melalui dua tahap. Tahap 1 dilakukan dengan mereaksikan 5-FU (0,08125 g; 0,625 mmol) dengan formaldehid (37%, 0,072 mL, 0,97 mmol) dan 0,625 mL aquadest menggunakan metode refluks pada suhu 60 °C selama 6 jam untuk menghasilkan 1-hidroksimetil-5-fluorourasil. Hasil refluks kemudian diuapkan pada suhu ruangan sampai kering. Residu yang dihasilkan dilarutkan dalam 12,5 mL aseton.

Tahap 2 dilakukan dengan menambahkan 12,5 mL tahap 1 dengan 0,1 mL (0,687 mmol) trietilamin (TEA) (larutan A) dalam labu alas bulat yang direndam dalam *ice bath*. 0,1276 g 4-nitrobenzoilklorida dilarutkan dalam 5 mL aseton (larutan B) kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Larutan B diteteskan secara

perlahan dan konstan ke dalam labu alas bulat yang berisi larutan A sampai habis. Selanjutnya, campuran direfluks selama 6 jam.

Hasil refluks diuapkan pada suhu ruangan hingga pelarut habis. Residu yang terbentuk ditambah 2,5 mL aquadest dan 7,5 mL etil asetat sehingga terbentuk dua fase yaitu fase minyak dan fase air. Campuran kemudian ditambah 10 mL HCl (pH 3-4) dan dipisahkan dengan corong pisah. Fase yang diambil adalah fase etil asetat (bagian atas). Pencucian dengan HCl dilakukan sebanyak tiga kali. Fase etil asetat yang telah dicuci dengan HCl kemudian dicuci dengan 10 mL NaHCO_3 (pH 7-8). Fase yang diambil adalah fase etil asetat (bagian atas). Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali. Fase yang diambil kemudian ditambah dengan Na_2SO_4 anhidrat untuk menarik sisa air. Na_2SO_4 yang mengendap dipisahkan dari fase etil asetat dengan cara dekantasi. Fase etil asetat yang dihasilkan kemudian dikeringkan pada suhu ruangan.

Residu hasil pengeringan dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen heksana:aseton (6:4). Kristal yang terbentuk dikeringkan dalam desikator kemudian ditimbang dan dihitung rendemen yang dihasilkan.

3.7.2 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis (Puspaningtyas, 2011)

a. Uji kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT-Densitometri)

Senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam aseton kemudian ditotolkan pada lempeng KLT (silica gel F 254). Lempeng KLT dieluasi dengan tiga eluen yang berbeda, yaitu heksana:aseton (6:4); heksana:etil asetat:aseton (5:3:2); dan heksana:aseton (7:3). Hasil eluasi KLT diamati di bawah lampu UV. Pada eluasi dengan eluen heksana:aseton (6:4), eluasi dilakukan terhadap senyawa 4-NFU, 5-FU, asam benzoat, dan 4-nitrobenzoilklorida. Adanya noda tunggal dianalisis dengan densitometri untuk melihat kemurniannya (*purity*).

b. Uji Kemurnian dengan Penentuan Jarak Leleh

Uji jarak leleh dilakukan dengan menggunakan alat *Electrothermal Melting Point Apparatus* Stuart SMP 11. Senyawa hasil sintesis dimasukkan ke dalam pipa

kapiler, kemudian dimasukkan ke dalam *Melting Point Apparatus* Stuart SMP 11. Alat diatur supaya temperatur naik secara perlahan-lahan. Temperatur dicatat pada saat senyawa mengalami perubahan wujud dari bentuk serbuk menjadi cair sampai meleleh keseluruhan. Suatu senyawa dikatakan murni jika memiliki jarak leleh 1-2 °C (Lefevre, 2004).

3.7.3 Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis (Kurnia, 2013)

Serbuk senyawa hasil sintesis digerus bersama KBr hingga homogen dan harus bebas air, kemudian dikempa. Pelet KBr yang diperoleh, kemudian diidentifikasi gugus-gugusnya dengan spektrofotometer Fourier Transform InfraRed (FTIR) Perkin Elmer-Spectrum One pada panjang gelombang 400-4000 cm^{-1} . Selanjutnya, spektrum IR dari senyawa tersebut diinterpretasi.

3.7.4 Preparasi Larutan Senyawa 4-NFU dan 5-FU (Puspaningtyas, 2011)

a. Uji sitotoksitas

Ditimbang 0,62 mg senyawa 4-NFU dan dilarutkan dalam 40 μl DMSO. Kemudian, ditambahkan PBS sampai 400 μl (5000 μM). Selanjutnya, diencerkan menggunakan media kultur hingga diperoleh konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan yaitu 0,5 μM ; 5 μM ; 50 μM ; 250 μM ; dan 500 μM .

Ditimbang 2,602 mg senyawa 5-FU dan dilarutkan dalam 40 μl DMSO. Kemudian, ditambahkan dengan PBS sampai 400 μl (50000 μM). Selanjutnya, diencerkan menggunakan media kultur hingga diperoleh konsentrasi larutan pembanding akhir yang digunakan yaitu 0,5 μM ; 5 μM ; 50 μM ; 250 μM ; 500 μM ; dan 5000 μM .

b. Uji proliferasi

Ditimbang 0,467 mg senyawa 4-NFU dan dilarutkan dalam 100 μl DMSO. Kemudian, ditambahkan PBS sampai 1000 μl (1500 μM). Selanjutnya, diencerkan

menggunakan media kultur hingga diperoleh konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan yaitu $\frac{1}{2} IC_{50} = 67,5 \mu M$; $IC_{50} = 135 \mu M$; dan $1\frac{1}{2} IC_{50} = 202,5 \mu M$.

Ditimbang 2,602 mg senyawa 5-FU dan dilarutkan dalam 100 μl DMSO. Kemudian, ditambahkan dengan PBS sampai 1000 μl (20000 μM). Selanjutnya, diencerkan menggunakan media kultur hingga diperoleh konsentrasi larutan pembanding akhir yang digunakan yaitu $\frac{1}{2} IC_{50} = 2100 \mu M$; $IC_{50} = 4200 \mu M$; dan $1\frac{1}{2} IC_{50} = 6300 \mu M$.

3.7.5 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT (Sinaga *et al.*, 2011)

Sel dengan konsentrasi 5×10^3 sel/100 μl didistribusikan ke dalam sumuran (menggunakan *96-well plate*) sebanyak 100 μl pada tiap sumuran dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, 37 °C agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Sel dalam sumuran dicuci, masing-masing dengan 100 μl PBS, kemudian PBS dibuang, dan ditiriskan sisa cairan dengan tisu. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100 μl larutan dari masing-masing konsentrasi senyawa uji dan pembanding, lalu diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur dibuang dengan jalan disedot hati-hati dan sel dicuci dengan 100 μl PBS.

Pada masing-masing sumuran, kemudian ditambahkan 100 μL campuran media kultur dan larutan MTT 5 mg/mL. Sel diinkubasi kembali selama 6 jam dalam inkubator CO₂ 5%, 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu-biru tua. Reaksi MTT dihentikan dengan *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl, lalu *plate* digoyang di atas *shaker* selama 10 menit, kemudian diinkubasi pada suhu kamar dalam ruang gelap selama semalam. Selanjutnya, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dikonversi ke dalam persen sel hidup. IC_{50} dihitung dengan analisis Probit menggunakan SPSS 18.0. Setelah itu, nilai IC_{50} dianalisis statistik uji T tidak berpasangan dengan program SPSS 18.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara senyawa uji dan pembanding.

3.7.6 Uji Pengamatan Proliferasi Sel (*doubling time*) (CCRC, 2009)

Sel dengan konsentrasi 5×10^3 sel/100 μ l didistribusikan ke dalam sumuran (menggunakan *96-well plate*) sebanyak 100 μ l pada tiap sumuran dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, 37 °C agar sel beradaptasi dan menempel di sumuran. Sel dalam sumuran dicuci, masing-masing dengan 100 μ l PBS, kemudian PBS dibuang, dan ditiriskan sisa cairan dengan tisu. 100 μ l larutan senyawa uji dan pembanding dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan $1\frac{1}{2}$ IC₅₀ dimasukkan ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo), kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂, 37 °C. Lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 24, 48, dan 72 jam. Setelah itu, media sel dibuang, dicuci dengan PBS sebanyak 1x, lalu ditambahkan 100 μ l campuran media kultur dan reagen MTT 0,5 mg/ml ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).

Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 2-4 jam, kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*, jika formazan telah jelas terbentuk, *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl. *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap (suhu ruangan) semalam dan keesokan harinya, *plate* di-*shaker* selama 10 menit. Pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka kemudian dimasukkan ke dalam ELISA reader. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan *ELISA reader* pada $\lambda=595$ nm. Viabilitas sel dihitung untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi. Setelah itu, dapat dibuat grafik waktu inkubasi vs viabilitas sel untuk memperoleh persamaan regresi sehingga dapat ditentukan nilai *doubling time*.

3.8 Analisis Data

Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dan uji proliferasi dikonversi ke dalam persen sel hidup menggunakan rumus berikut:

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

3.8.1 Uji Sitotoksitas

Aktivitas sitotoksitas senyawa dinyatakan dalam IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi senyawa yang dapat menyebabkan sel hidup sebanyak 50% dari populasi sel kanker payudara MCF-7. Setelah % sel hidup dihitung untuk tiap konsentrasi uji, maka dapat dilakukan analisis probit untuk menentukan nilai IC_{50} (Meiyanto *et al.*, 2008).

3.8.2 Uji Proliferasi

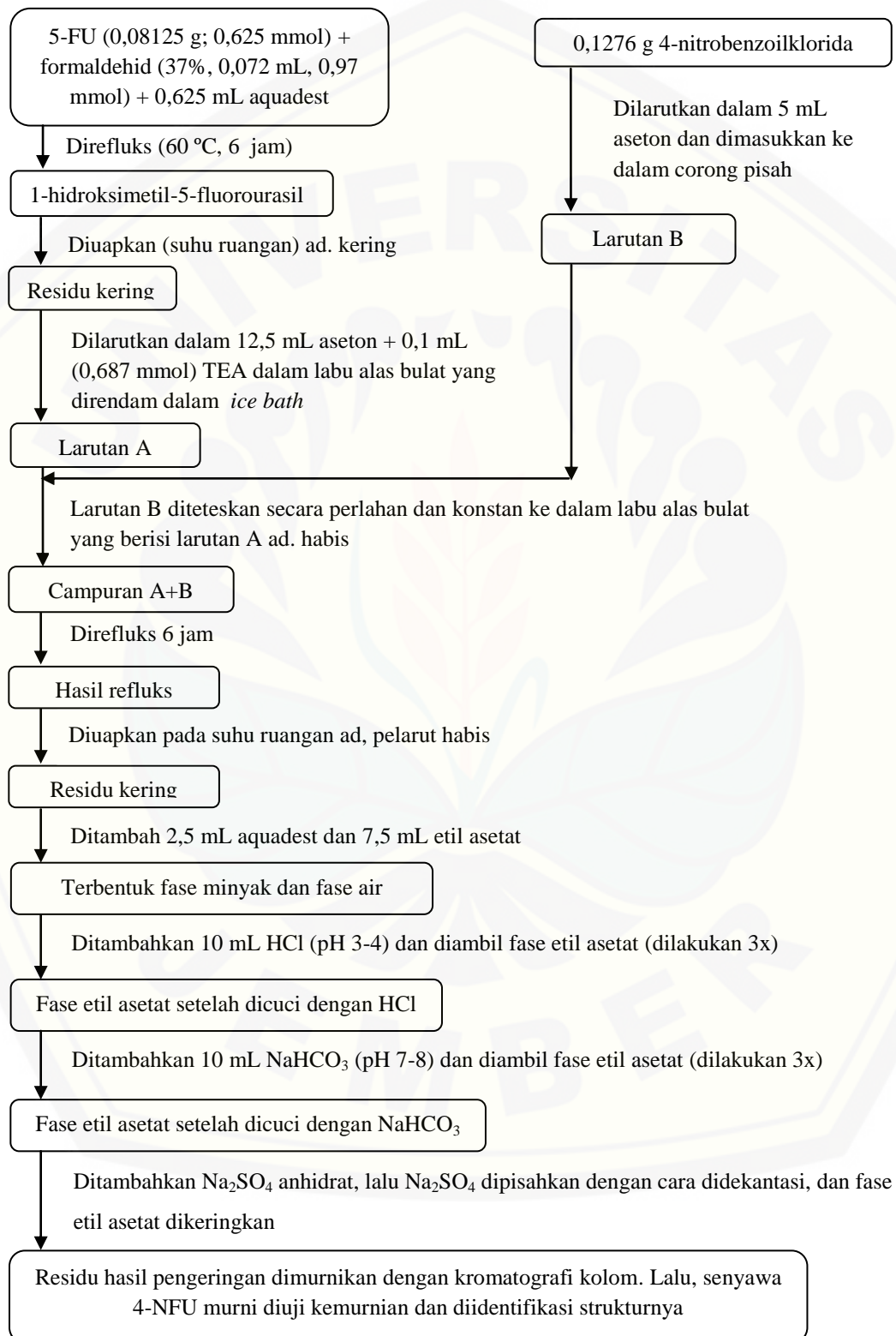
Aktivitas antiproliferasi senyawa uji ditunjukkan melalui nilai *doubling time* yaitu waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk tumbuh menjadi dua kali lipatnya setelah penambahan senyawa uji (Meiyanto *et al.*, 2008). Setelah % sel hidup dihitung untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi, kemudian dibuat grafik antara waktu inkubasi *vs* log jumlah sel hidup. Nilai *doubling time* dapat diperoleh dengan cara memasukkan nilai log jumlah dua kali sel awal sebagai nilai *y* pada persamaan regresi linear antara waktu inkubasi *vs* log jumlah sel hidup (Nurani, 2011).

3.8.3 Analisis Statistik

Hasil uji sitotoksik dianalisis dengan analisis probit menggunakan SPSS 18.0 untuk menentukan nilai IC_{50} . Setelah itu, nilai IC_{50} dianalisis statistik uji T tidak berpasangan dengan taraf kepercayaan 95% pada program SPSS 18.0 untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara senyawa uji dan pembanding. Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai probabilitas (signifikansi) $< 0,05$.

3.9 Skema Penelitian

3.9.1 Sintesis Senyawa 4-NFU



3.9.2 Alur Preparasi Larutan Senyawa 4-NFU dan 5-FU

a. Uji sitotoksitas

Ditimbang 0,62 mg senyawa 4-NFU dan 2,602 mg senyawa 5-FU

Dilartukan dalam 40 μ l DMSO dan ditambahkan PBS sampai 400 μ l, lalu diencerkan menggunakan media kultur

Diperoleh konsentrasi larutan akhir 4-NFU yaitu 0,5 μ M; 5 μ M; 50 μ M; 250 μ M; dan 500 μ M. Sedangkan konsentrasi larutan akhir 5-FU yaitu 0,5 μ M; 5 μ M; 50 μ M; 250 μ M; 500; dan 5000 μ M

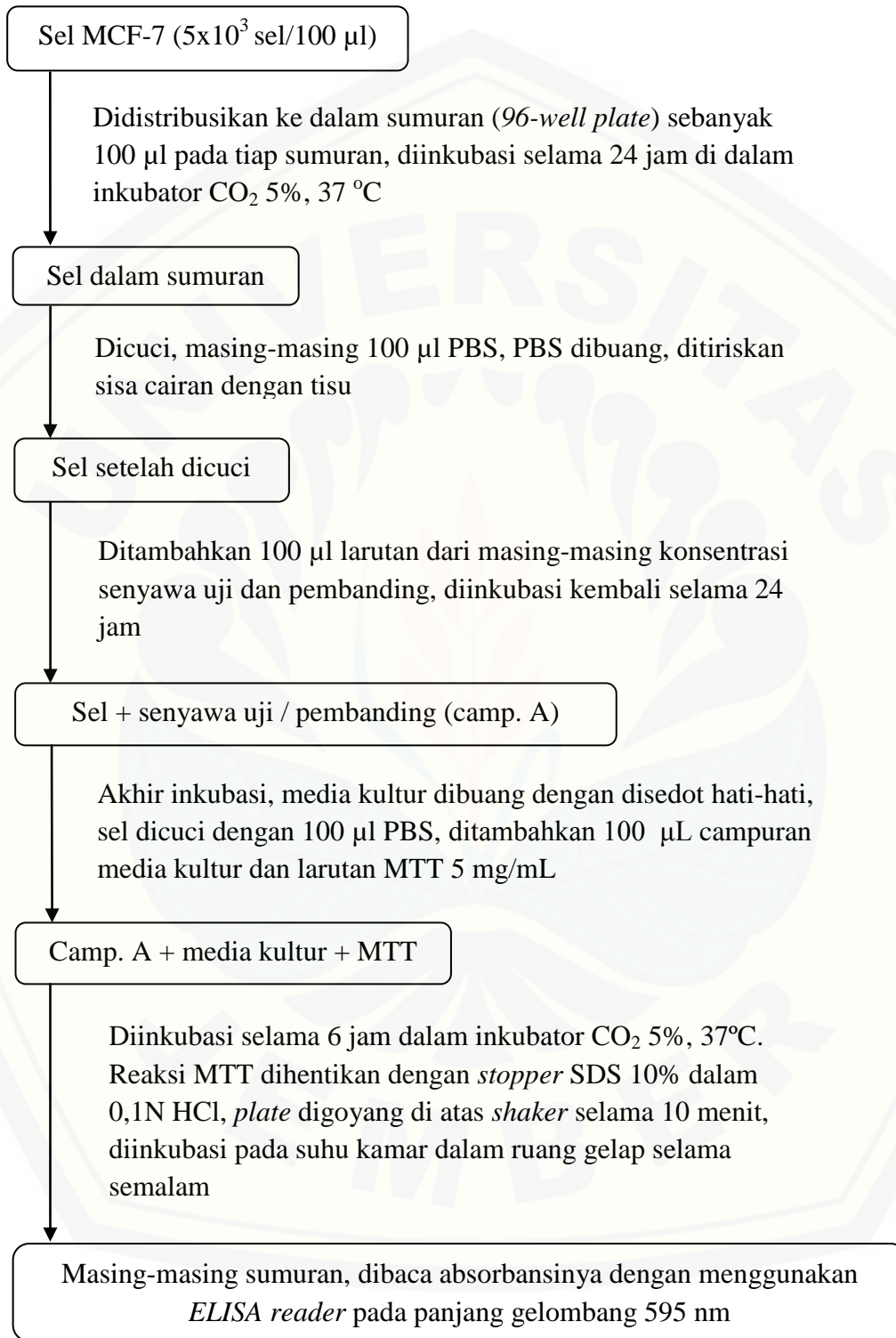
b. Uji proliferasi

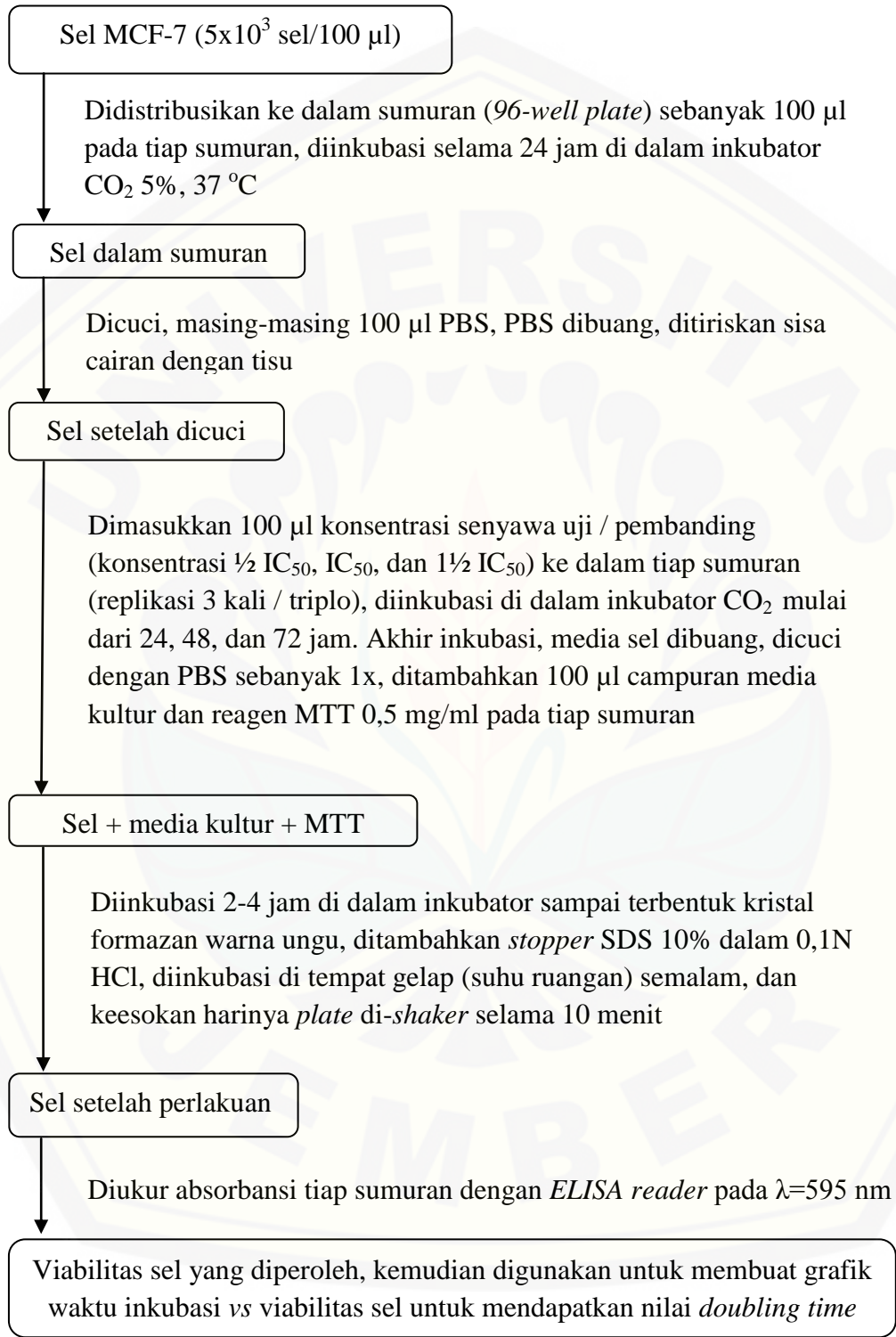
Ditimbang 0,467 mg senyawa 4-NFU dan 2,602 mg senyawa 5-FU

Dilartukan dalam 100 μ l DMSO dan ditambahkan PBS sampai 1000 μ l, lalu diencerkan menggunakan media kultur

Diperoleh konsentrasi larutan akhir 4-NFU yaitu $\frac{1}{2}$ IC_{50} = 67,5 μ M; IC_{50} = 135 μ M; dan $1\frac{1}{2}$ IC_{50} = 202,5 μ M. Sedangkan konsentrasi larutan akhir 5-FU yaitu $\frac{1}{2}$ IC_{50} = 2100 μ M; IC_{50} = 4200 μ M; dan $1\frac{1}{2}$ IC_{50} = 6300 μ M

3.9.3 Alur Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT



3.9.4 Alur Uji Pengamatan Proliferasi Sel (*doubling time*)

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, peneliti melakukan sintesis senyawa uji 4-NFU terlebih dahulu sebelum melakukan uji sitotoksitas dan proliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7. Dari proses sintesis yang mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Kurnia (2013), diperoleh rendemen senyawa hasil sintesis seperti pada Tabel 4.1. Setelah itu, dilakukan pemurnian rendemen senyawa hasil sintesis dengan menggunakan kromatografi kolom sehingga diperoleh rendemen senyawa hasil pemurnian sebesar 9,020 % b/b. Pada Tabel 4.1 dapat dilihat bahwa % RSD (Relative Standart Deviation) untuk rendemen senyawa hasil sintesis sudah dapat dikatakan presisi karena rendemen senyawa hasil sintesis dinyatakan presisi apabila % RSD < 2% (Setiawan, 2014).

Tabel 4.1 % Rendemen senyawa hasil sintesis

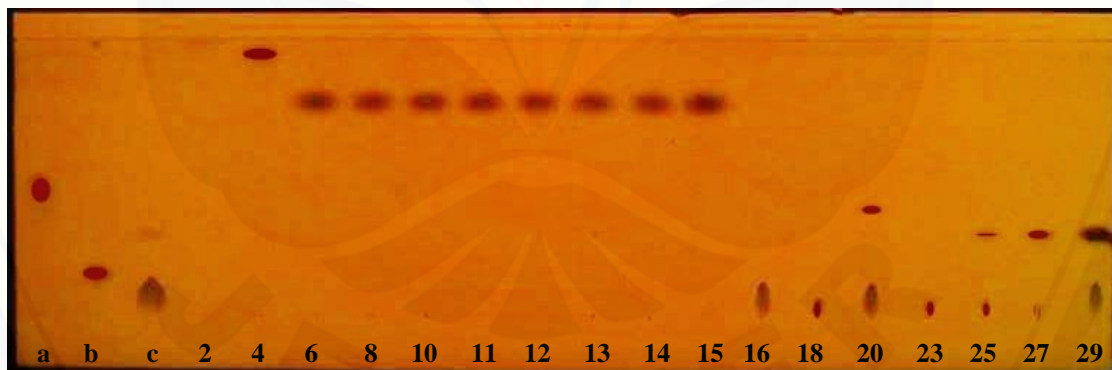
Replikasi	% Rendemen senyawa hasil sintesis (% b/b)
1	24,974
2	25,595
Rerata ± SD	25,285 ± 0,439
% RSD	1,735

Rendemen senyawa hasil pemurnian harus diuji kemurnian dan diidentifikasi strukturnya untuk memastikan bahwa senyawa tersebut telah benar-benar murni dan memiliki karakteristik yang sama dengan senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tapis (KLT-Densitometri) dan penentuan jarak leleh, sedangkan identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Fourier Transform InfraRed (FTIR-KBr). Setelah dilakukan uji kemurnian dan identifikasi struktur

senyawa hasil pemurnian, maka dapat dilakukan uji sitotoksisitas dan proliferasi terhadap sel kanker payudara MCF-7.

4.1 Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT-Densitometri)

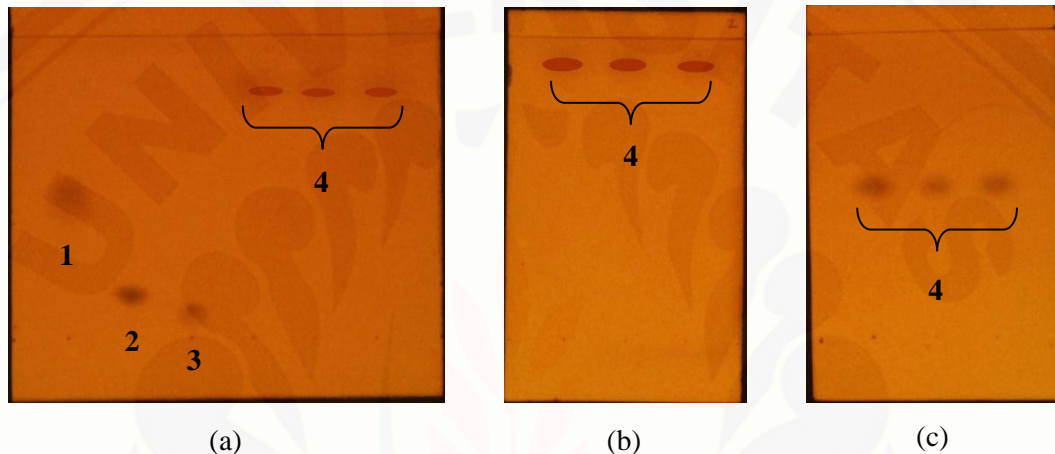
Rendemen senyawa hasil sintesis dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom sehingga diperoleh fraksi-fraksi yang ditampung dalam vial 1-29. Masing-masing vial dilakukan analisis KLT untuk mengetahui fraksi mana yang memiliki satu noda sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa target. Berdasarkan hasil analisis KLT dari fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom seperti yang terdapat pada Gambar 4.1, tampungan vial yang menunjukkan satu noda adalah vial 6-15. Kemudian, tampungan vial 6-15 disatukan untuk dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT-Densitometri sehingga dapat diketahui apakah senyawa 4-NFU dalam vial 6-15 memang benar hanya terdiri dari satu noda dan memiliki spektra yang sama dengan senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Gambar analisis KLT hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut ini.



Gambar 4.1 Hasil analisis KLT dari fraksi-fraksi kromatografi kolom
Keterangan: (a) Asam benzoat; (b) 5-FU; dan (c) 4-nitrobenzoilklorida

Pada uji kemurnian dengan KLT-Densitometri, senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 dianalisis KLT dengan tiga eluen yang memiliki komposisi berbeda (Pratiwi dan Ersam, 2013). Eluen yang digunakan yaitu heksana:aseton (6:4);

heksana:etil asetat:aseton (5:3:2); dan heksana:aseton (7:3) (Puspaningtyas, 2011; Kurnia 2013). Adanya satu noda pada masing-masing eluasi menunjukkan bahwa senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 hanya mengandung satu senyawa. Dari hasil analisis KLT, kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan densitometri untuk mengetahui nilai Rf dan spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15.



(a) Eluen heksana:aseton (6:4); (b) heksana:etil asetat:aseton (5:3:2); (c) heksana:aseton (7:3)

Gambar 4.2 Hasil analisis KLT dengan tiga eluen berbeda

Keterangan: (1) Asam benzoat; (2) 5-FU; (3) 4-nitrobenzoilklorida; (4) senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15

Hasil analisis KLT senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 dengan tiga eluen yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.2 sedangkan nilai Rf, korelasi r (s,m), dan r (m,e) dapat dilihat pada Tabel 4.2. Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa hanya terdapat satu noda pada masing-masing lempeng KLT setelah dieluasi dengan tiga eluen yang berbeda sehingga dapat dikatakan bahwa dalam vial 6-15 hanya terdapat satu senyawa. Berdasarkan Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa nilai Rf pada tiga kali replikasi untuk tiap eluen memiliki nilai yang hampir sama. Pada analisis densitometri juga dapat diketahui kemurnian (*purity*) dari suatu senyawa. Uji kemurnian dilakukan dengan cara spektra senyawa di-*scan* pada tiga posisi, yaitu *start*, *maximal*, dan *end*. Pada spektra densitometri, *s* merupakan *start* (awal) spektra,

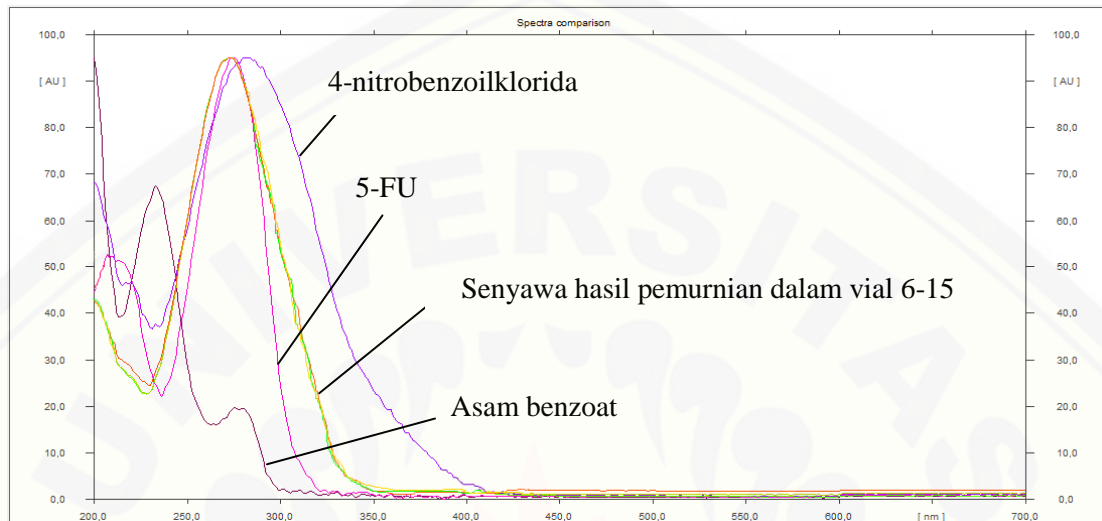
m merupakan *maximal* (puncak) spektra, dan *end* merupakan (akhir) spektra. Dari Tabel 4.2, dapat dilihat bahwa semua nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ lebih besar dari 0,99 yang berarti bahwa spektra tersebut dari satu senyawa sehingga senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 memiliki *purity* (ok) dan dapat dikatakan sebagai senyawa murni.

Tabel 4.2 Nilai R_f , korelasi $r(s,m)$, dan $r(m,e)$ senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 pada tiap eluen

Eluen	Replikasi	R_f	$r(s,m)$	$r(m,e)$
heksana:aseton (6:4)	1	0,77	0,999814	0,999658
	2	0,77	0,999836	0,999641
	3	0,77	0,999805	0,999667
heksana:etil asetat:aseton (5:3:2)	1	0,83	0,999239	0,998910
	2	0,82	0,999607	0,997851
	3	0,82	0,999400	0,997850
heksana:aseton (7:3)	1	0,49	0,999766	0,998598
	2	0,49	0,999844	0,998163
	3	0,49	0,999817	0,997908

Pada Gambar 4.2(a) dapat dilihat bahwa eluasi tidak hanya dilakukan terhadap senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 saja, tetapi juga pada senyawa asam benzoat, 5-FU, dan 4-nitrobenzoilklorida. Senyawa-senyawa tersebut dianalisis KLT pada satu lempeng yang sama dengan menggunakan eluen hasil optimasi Kurnia (2013) yaitu heksana:aseton (6:4), kemudian dianalisis dengan menggunakan densitometri agar dapat dibandingkan spektra dari masing-masing senyawa sehingga dapat diketahui apakah senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 merupakan senyawa target atau merupakan senyawa bahan baku. Gambar spektra senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15, 5-FU, asam benzoat, dan 4-nitrobenzoilklorida dapat dilihat pada Gambar 4.3. Dari spektra tersebut, dapat dilihat bahwa tiap senyawa

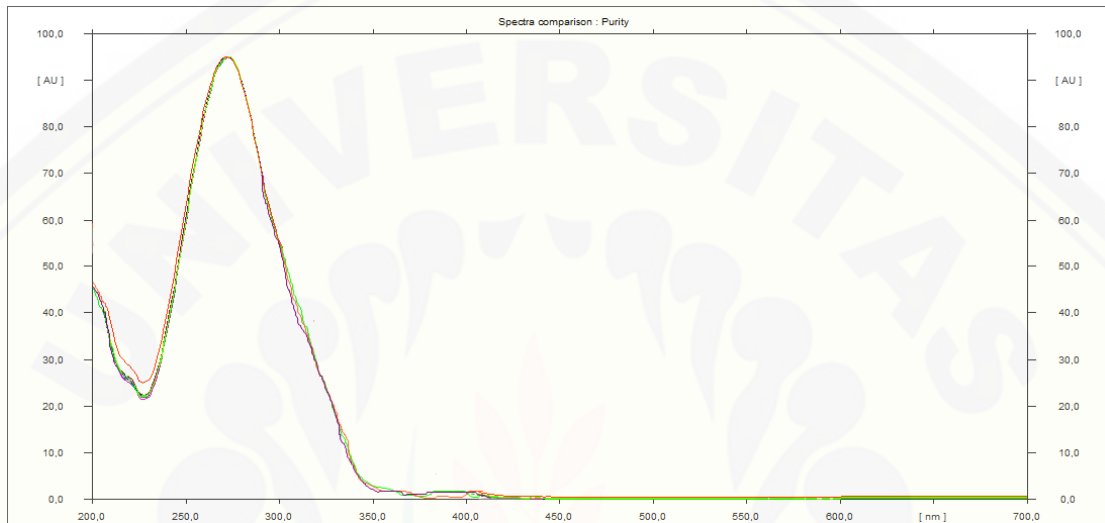
memiliki spektra yang berbeda sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 bukan merupakan senyawa bahan baku.



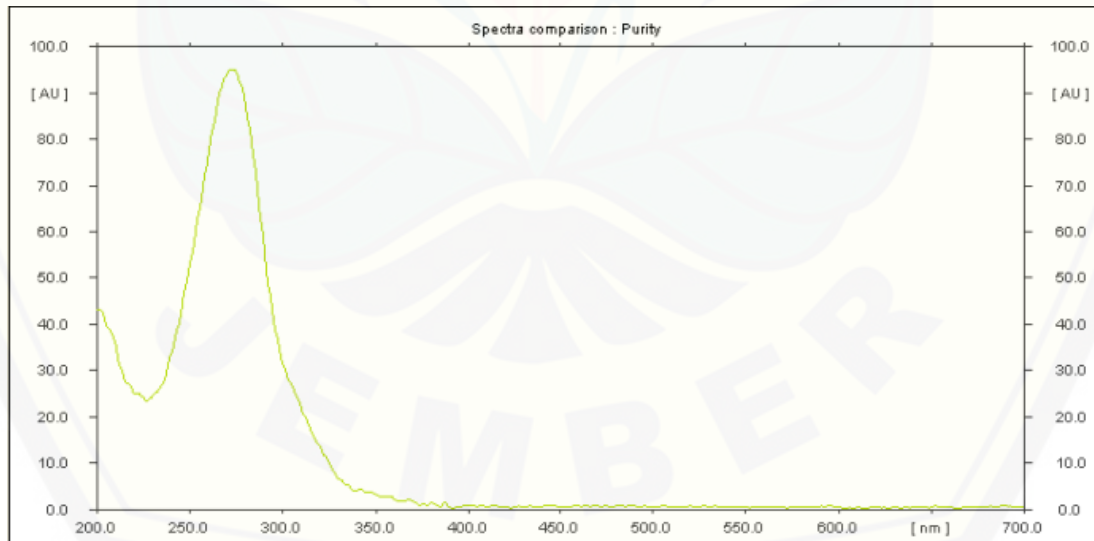
Gambar 4.3 Perbandingan spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15, 5-FU, asam benzoat, dan 4-nitrobenzoilklorida

Setelah dipastikan bahwa senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 bukan merupakan senyawa bahan baku, kemudian dapat dilakukan uji identitas. Tujuannya adalah untuk memastikan bahwa senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 merupakan senyawa yang sama dengan senyawa yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Uji identitas tidak bisa dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan KLT-Densitometri untuk menentukan nilai $r(s,a)$ karena tidak adanya standart senyawa 4-NFU milik Kurnia (2013) yang telah disintesis sebelumnya. Selain itu, dari penelitian Kurnia (2013) hanya terdapat spektra densitometri senyawa 4-NFU yang dapat dijadikan sebagai patokan untuk melakukan uji identitas. Oleh karena itu, uji identitas hanya bisa dilakukan secara kualitatif dengan cara membandingkan spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 dengan spektra densitometri senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013) berdasarkan kisaran panjang gelombang maksimumnya seperti pada penelitian yang telah dilakukan oleh Zainab (2013). Menurut Zainab (2013) dapat dikatakan bahwa uji

identitas dapat dilakukan secara kualitatif berdasarkan kesamaan panjang gelombang maksimum antara spektra senyawa uji dan senyawa standart. Apabila kedua spektra tersebut memiliki kisaran panjang gelombang maksimum yang sama maka dapat dikatakan bahwa keduanya merupakan senyawa yang sama.



Gambar 4.4 Spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15



Gambar 4.5 Spektra densitometri senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013)

Spektra densitometri senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 dan senyawa 4-NFU hasil sintesis Kurnia (2013) ditunjukkan pada Gambar 4.4 dan Gambar 4.5. Dari kedua gambar tersebut, apabila dilihat dari kisaran panjang gelombang maksimumnya (puncak) maka senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 memiliki spektra densitometri yang mirip dengan spektra senyawa 4-NFU yang telah berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Selain itu, kemiripan spektra juga dapat dilihat dari kisaran panjang gelombang pada posisi *start* (awal) dan *end* (akhir) antara spektra senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 dan spektra senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa senyawa hasil pemurnian dalam vial 6-15 merupakan senyawa 4-NFU.

4.2 Uji Kemurnian dengan Penentuan Jarak Leleh

Uji kemurnian senyawa 4-NFU hasil sintesis dapat dilakukan dengan uji jarak leleh menggunakan alat *melting point tester*. Menurut Levefre (2004) dikatakan bahwa suatu senyawa organik murni memiliki jarak leleh 1-2 °C. Hasil uji jarak leleh senyawa 4-NFU dalam vial 6-15 dapat dilihat pada Tabel 4.3 berikut ini.

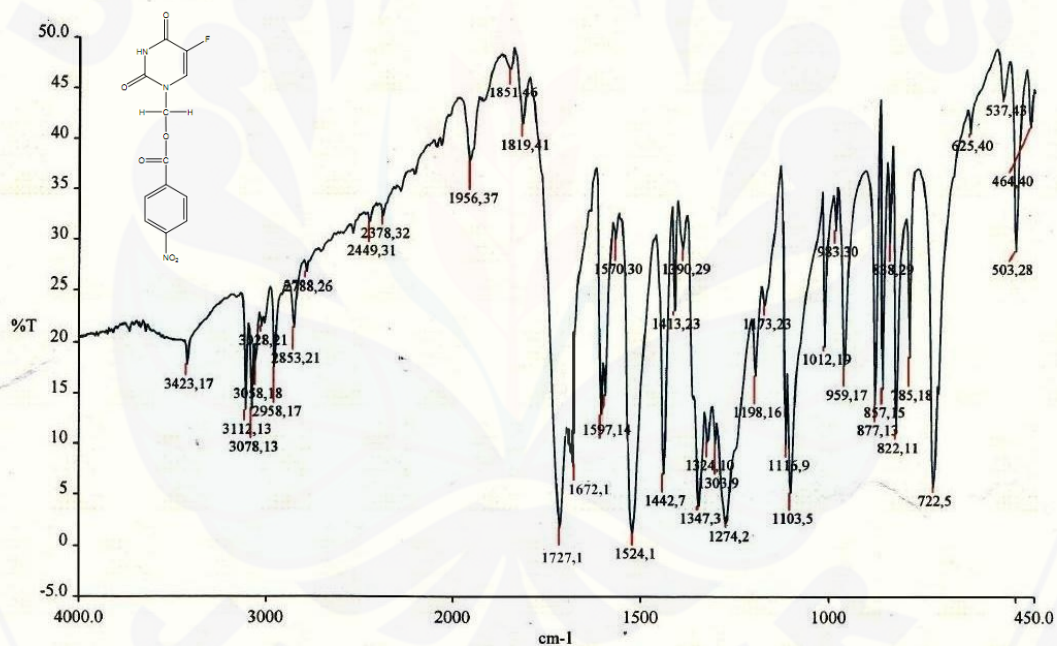
Tabel 4.3 Hasil uji jarak leleh senyawa 4-NFU dalam vial 6-15

Replikasi	Jarak leleh (°C)
1	209-211
2	209-211
3	209-211
Rerata	209-211

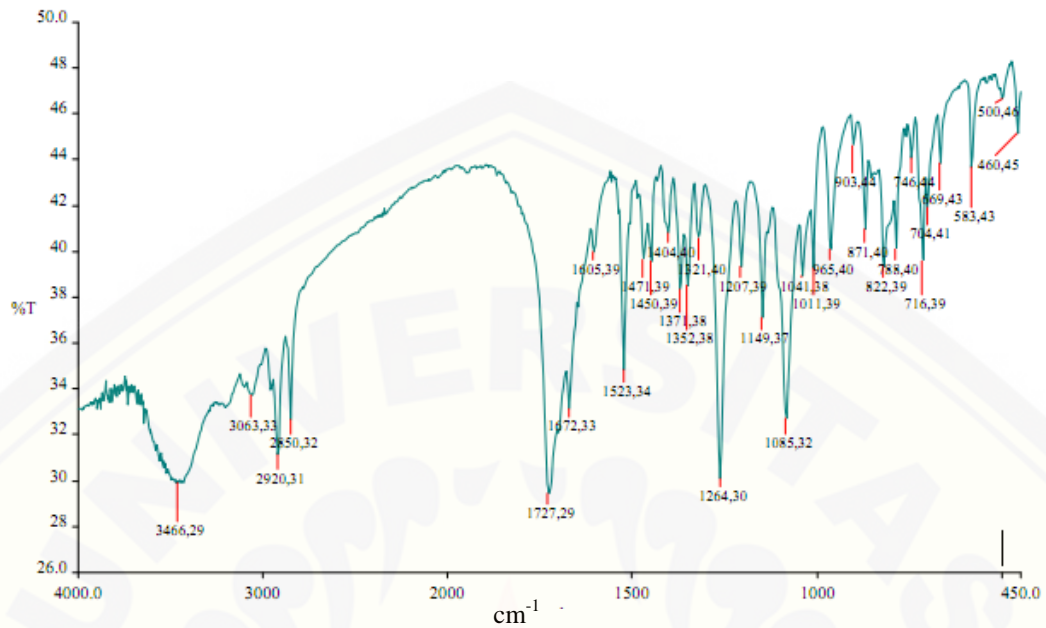
Berdasarkan Tabel 4.3, dapat dilihat bahwa senyawa 4-NFU dalam vial 6-15 memiliki jarak leleh rata-rata 209-211 °C sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa 4-NFU murni karena memiliki jarak leleh tidak lebih dari 2 °C. Selain itu, jarak leleh senyawa 4-NFU dalam vial 6-15 sudah sesuai dengan jarak leleh senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013).

4.3 Identifikasi Struktur Senyawa 4-NFU

Pada penelitian ini, identifikasi struktur senyawa 4-NFU hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer FTIR-KBr. Spektra Infra Red (IR) senyawa 4-NFU dalam vial 6-15, spektra IR senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013), dan perbandingan spektra hasil percobaan dengan literatur dapat dilihat pada Gambar 4.6; Gambar 4.7; dan Tabel 4.4. Pada Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa gugus-gugus penting yang harus dimiliki senyawa 4-NFU sudah ada dan sesuai dengan hasil pengujian FT-IR senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013). Namun, terdapat beberapa gugus yang mengalami pergeseran panjang gelombang.



Gambar 4.6 Spektra IR hasil analisis FTIR-KBr senyawa 4-NFU dalam vial 6-15



Gambar 4.7 Spektra IR hasil analisis FTIR-KBr senyawa 4-NFU yang berhasil disintesis oleh Kurnia (2013)

Tabel 4.4 Perbandingan spektra IR senyawa 4-NFU hasil percobaan dengan literatur dan hasil penelitian Kurnia (2013)

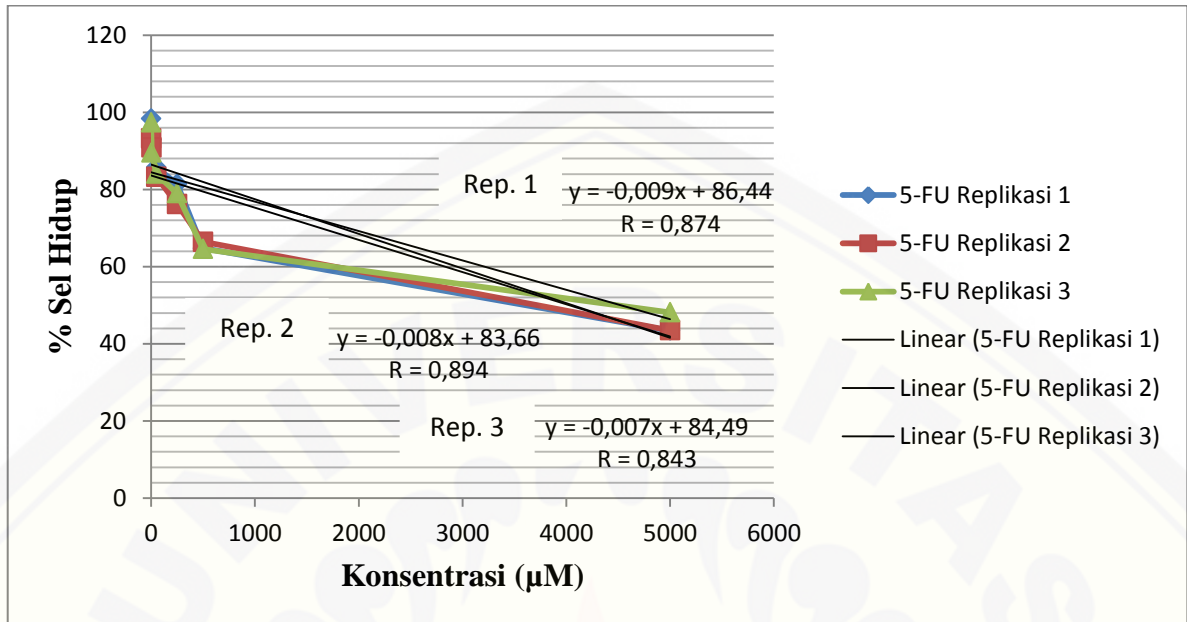
Tipe Ikatan	Frekuensi (cm^{-1})		
	Literatur (Coates, 2000)	Penelitian (Kurnia, 2013)	Percobaan
C=O Ester	1750-1725	1727	1727
C-O Ester	1310-1250	1264	1274
N-H (amida)	3500-3150	3466	3423
C=O (amida)	1680-1630	1672	1672
Senyawa nitro aromatis	1555-1485/ 1355-1320	1523; 1352; 1321	1524; 1347; 1324
C-F	1150-1000	1149	1103

Senyawa 4-NFU merupakan senyawa ester. Rentang frekuensi senyawa ester adalah $1750-1725\text{ cm}^{-1}$. Pada spektra hasil analisis terdapat pita pada frekuensi 1727 cm^{-1} sehingga dapat dipastikan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan senyawa ester. N-H amida memiliki rentang frekuensi $3500-3150\text{ cm}^{-1}$. Adanya N-H amida menandakan bahwa substituen terikat pada N1, bukan pada N3. Pada spektra hasil analisis terdapat pita frekuensi 3423 cm^{-1} sehingga dapat dipastikan bahwa substitusi 4-nitrobenzoioksimetil memang tersubstitusi di posisi N1 pada 5-FU sesuai target. Selain itu, gugus nitro (rentang frekuensi $1555-1485\text{ cm}^{-1}$) pada senyawa target ditunjukkan oleh spektra yang memberikan pita frekuensi 1524 cm^{-1} .

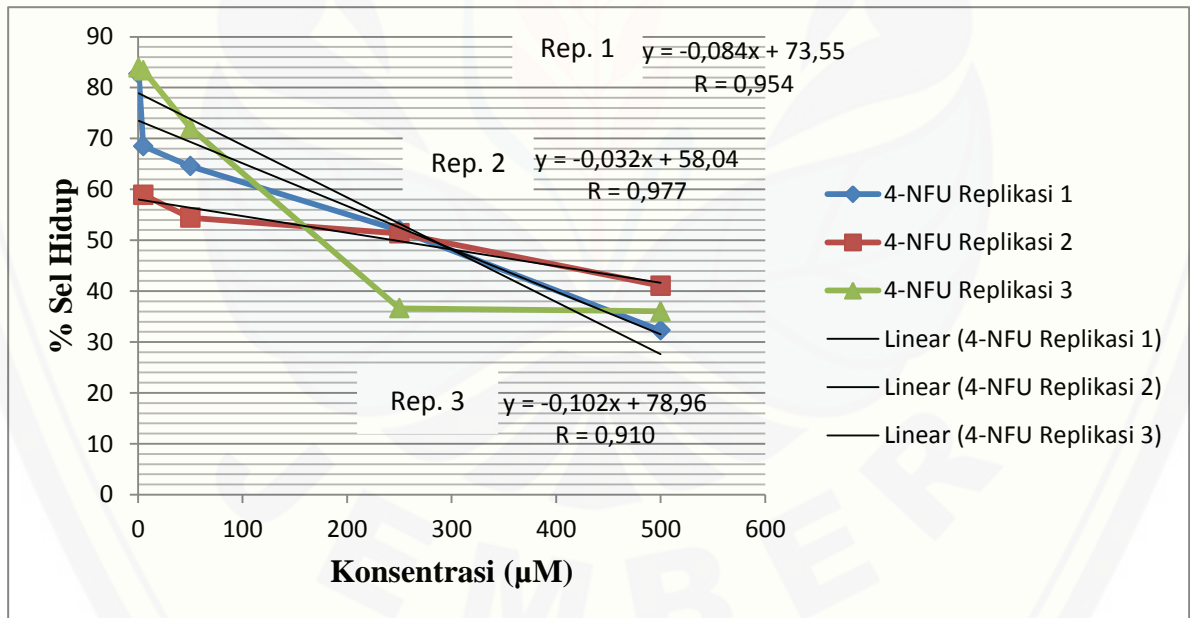
4.4 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metode MTT

Uji sitotoksisitas dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ketoksikan senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7. Metode yang digunakan dalam uji sitotoksisitas ini adalah metode MTT. Pengujian menggunakan metode MTT didasarkan pada kemampuan enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup untuk mengubah substrat 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning dan tidak larut menjadi kristal formazan berwarna ungu yang larut air. Jumlah kristal formazan yang terbentuk secara langsung akan proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Semakin berwarna ungu maka semakin banyak sel yang hidup (Doyle dan Griffiths, 1998).

Pengamatan aktivitas sitotoksisitas pada sel kanker payudara MCF-7 dilakukan dengan tiga kali replikasi yaitu dengan cara menghitung persentase sel hidup. Kemudian, konsentrasi sampel *vs* persentase sel hidup yang diperoleh dianalisis probit untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang dapat menyebabkan sel hidup sebanyak 50% dari populasi sel kanker dan diharapkan sisanya mati. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi potensi senyawa uji sebagai agen sitotoksik.



Gambar 4.8 Kurva persamaan konsentrasi sampel vs persentase sel hidup senyawa 5-FU



Gambar 4.9 Kurva persamaan konsentrasi sampel vs persentase sel hidup senyawa 4-NFU

Kurva persamaan konsentrasi sampel vs persentase sel hidup dan nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 ditampilkan pada

Gambar 4.8; Gambar 4.9; dan Tabel 4.5. Pada Gambar 4.8 dan Gambar 4.9 dapat dilihat bahwa nilai r hasil percobaan lebih besar dari nilai r tabel, dimana nilai r tabel untuk $n=6$ sebesar 0,811; $n=5$ sebesar 0,878; dan $n=4$ sebesar 0,950 (Suliyanto, 2012). Apabila nilai r hasil percobaan lebih besar dari nilai r tabel maka data yang diperoleh dari hasil percobaan sudah dapat diterima.

Tabel 4.5 Nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7

Senyawa	IC_{50} (μM)				
	Replikasi			Rerata \pm SD	% RSD
	1	2	3		
4-NFU	141,336	116,355	144,427	134,039 \pm 15,393	11,484
5-FU	3334,119	4419,199	4881,207	4211,508 \pm 794,180	18,857

Perhitungan untuk mendapatkan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Lampiran E.1 dan E.3. Pada Tabel 4.5 dapat dilihat bahwa senyawa 4-NFU memiliki nilai rerata IC_{50} yang lebih kecil daripada senyawa 5-FU, dimana nilai rerata IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU berturut-turut adalah 134,039 μM dan 4211,508 μM . Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksitas yang lebih baik daripada senyawa 5-FU. Menurut Vanderperren *et al.* (2004) dapat dikatakan bahwa uji aktivitas biologi menggunakan kultur sel dapat dinyatakan presisi apabila memiliki nilai %RSD < 30%. Oleh karena itu, hasil pengujian sitotoksitas berupa nilai IC_{50} pada Tabel 4.5 sudah dapat dikatakan presisi.

Nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU yang telah diperoleh dari uji sitotoksitas, kemudian dapat dibandingkan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU. Analisis tersebut dilakukan dengan menggunakan statistik uji T tidak berpasangan dengan taraf kepercayaan 95% pada program SPSS 18.0, dimana perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai probabilitas (signifikansi) < 0,05.

Berdasarkan nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU, diperoleh harga $\alpha = 0,012$ ($\alpha < 0,05$) setelah dianalisis statistik uji T tidak berpasangan sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU. Selain itu, nilai IC_{50} senyawa 4-NFU ($134,039 \mu M = 41,716 \mu g/ml$) termasuk dalam kategori senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksitas moderat karena nilai IC_{50} antara 21-200 $\mu g/ml$ sedangkan nilai IC_{50} senyawa 5-FU ($4211,508 \mu M = 463,590 \mu g/ml$) termasuk dalam kategori senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik yang lemah karena nilai IC_{50} antara 201-500 $\mu g/ml$ (Geran *et al.*, 1978).

Senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksitas yang lebih baik dibandingkan senyawa 5-FU karena adanya peningkatan sifat lipofilitas, elektronik, dan sterik. Peningkatan lipofilitas terjadi karena adanya gugus nonpolar yaitu cincin aromatis sehingga mempengaruhi proses transpor pasif antarkompartemen berdasarkan koefisien partisi lemak/air. Adanya gugus nitro dan ester sebagai substituen dapat meningkatkan efek elektronik dari senyawa 4-NFU, dimana efek elektronik tersebut dapat mempengaruhi ionisasi senyawa 4-NFU sehingga berdampak pada mudahnya senyawa 4-NFU melewati membran dan kuatnya ikatan antara senyawa 4-NFU dengan reseptor. Selain itu, posisi para pada benzoil dapat meningkatkan halangan sterik yang berhubungan dengan kesesuaian ikatan senyawa 4-NFU dengan reseptor (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

4.5 Uji Pengamatan Proliferasi Sel (*doubling time*)

Uji proliferasi dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa 4-NFU dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Pada uji proliferasi (uji *doubling time*), konsentrasi senyawa 4-NFU dan 5-FU yang digunakan mengacu pada nilai IC_{50} , yaitu $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$. Nilai IC_{50} senyawa 4-NFU sebesar $134,039 \mu M$ sedangkan senyawa 5-FU sebesar $4211,508 \mu M$. Namun, untuk memudahkan dalam proses pemipetan saat pengenceran senyawa maka IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU yang digunakan untuk uji *doubling time* berturut-turut adalah $135 \mu M$ dan $4200 \mu M$. Oleh karena itu, konsentrasi senyawa 4-NFU yang digunakan

untuk uji *doubling time*, yaitu $\frac{1}{2} IC_{50} = 67,5 \mu M$; $IC_{50} = 135 \mu M$; dan $1\frac{1}{2} IC_{50} = 202,5 \mu M$ sedangkan untuk senyawa 5-FU, yaitu $\frac{1}{2} IC_{50} = 2100 \mu M$; $IC_{50} = 4200 \mu M$; dan $1\frac{1}{2} IC_{50} = 6300 \mu M$.

Pada akhir inkubasi yaitu pada jam ke-24, 48, dan 72 dapat dihitung log jumlah sel hidup sehingga dari data tersebut dapat dibuat persamaan regresi antara waktu inkubasi dengan log jumlah sel hidup. Selanjutnya, dari persamaan regresi tersebut dapat digunakan untuk menghitung nilai *doubling time*. *Doubling time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipatnya. Harga *doubling time* diperoleh dari nilai log dua kali jumlah sel awal sebagai Y ($Y = 4$) dikurangi harga intersep dari persamaan regresi, kemudian dibagi dengan *slopenya*. Nilai *doubling time* yang telah diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui kemampuan senyawa 4-NFU dan 5-FU dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 dengan cara membandingkan nilai *doubling time* senyawa 4-NFU dan 5-FU dengan nilai *doubling time* kontrol. Pada pengujian ini, nilai *doubling time* kontrol sel berbeda antara senyawa 4-NFU dan 5-FU. Hal itu disebabkan karena uji *doubling time* antara senyawa 4-NFU dan 5-FU dilakukan pada *well-plate* yang berbeda. Hasil uji *doubling time* senyawa 4-NFU dan 5-FU dengan metode MTT disajikan pada Tabel 4.6 dimana perhitungan untuk menghasilkan nilai *doubling time* dapat dilihat pada Lampiran F.1 dan F.2.

Tabel 4.6 Hasil uji *doubling time* senyawa 4-NFU dan 5-FU dengan metode MTT

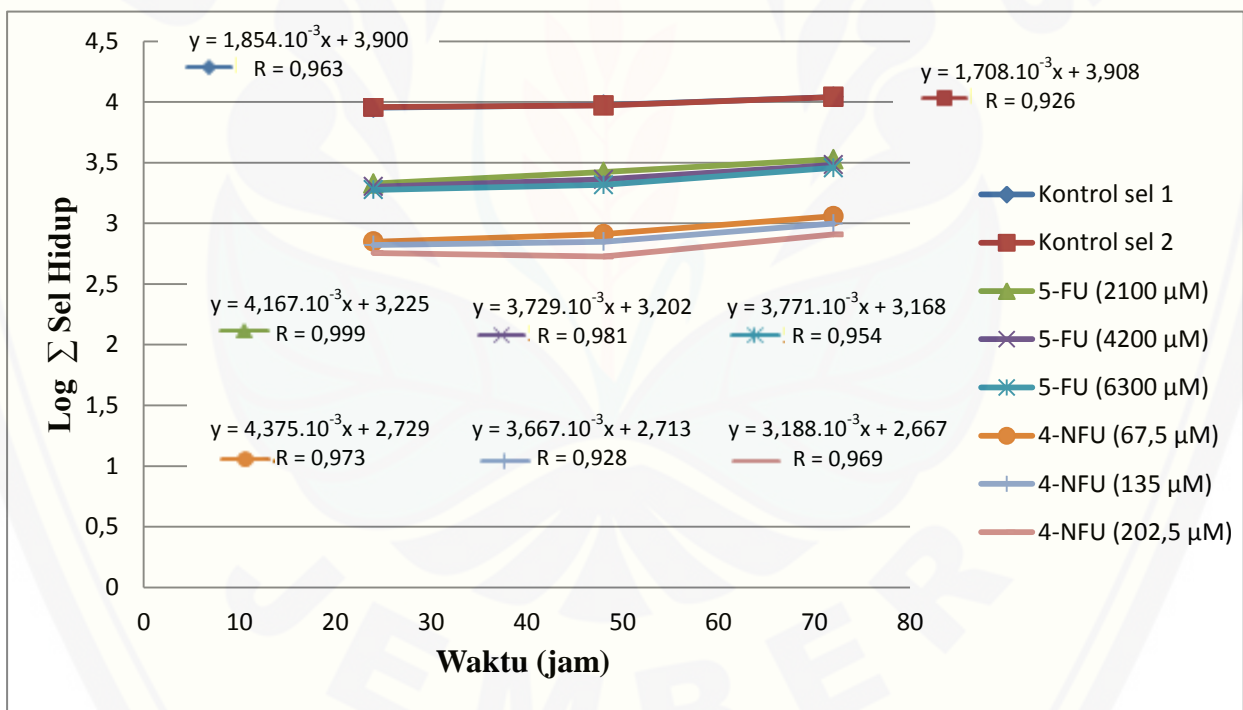
Senyawa	Konsentrasi (μM)	<i>Doubling Time</i> (jam)
4-NFU	67,5	290,51
	135	350,97
	202,5	418,20
Kontrol sel 1	-	53,86
5-FU	2100	185,99
	4200	214,00
	6300	220,63
Kontrol sel 2	-	53,94

Berdasarkan Tabel 4.6 dapat dilihat bahwa kontrol sel memiliki nilai *doubling time* tercepat. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan proliferasi sel dapat diperlambat dengan pemberian senyawa 4-NFU dan 5-FU, dimana senyawa 4-NFU menunjukkan penghambatan terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang lebih besar daripada senyawa 5-FU karena nilai *doubling time* sel setelah pemberian senyawa 4-NFU lebih besar daripada setelah pemberian senyawa 5-FU. Pemberian senyawa 4-NFU dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 dilakukan dengan tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan $1\frac{1}{2}$ IC₅₀ sehingga dapat dibandingkan nilai *doubling time* senyawa 4-NFU dan 5-FU pada tiga konsentrasi tersebut. Nilai *doubling time* senyawa 4-NFU pada konsentrasi 67,5 µM; 135 µM; dan 202,5 µM berturut-turut adalah 290,51 jam; 350,97 jam; dan 418,20 jam sedangkan nilai *doubling time* senyawa 5-FU pada konsentrasi 2100 µM; 4200 µM; dan 6300 µM berturut-turut adalah 185,09 jam; 214 jam; dan 220,63 jam. Dari nilai *doubling time* tersebut, dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa 4-NFU dan 5-FU maka semakin besar kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang semakin lama.

Kemampuan penghambatan proliferasi sel dapat dikaitkan dengan mekanisme *cell cycle arrest* yaitu adanya kerusakan DNA atau RNA akan memicu aktivasi gen p53 sehingga siklus sel akan terhenti sementara untuk proses perbaikan DNA atau RNA tersebut. Apabila kerusakannya cukup parah dan tidak bisa diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis atau bunuh diri. Namun, mekanisme penghambatan proliferasi sel belum diketahui secara pasti sehingga untuk mengetahuinya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut (Siu *et al.*, 1999).

Gambar 4.10 merupakan kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 4-NFU dan 5-FU. Pada Gambar 4.10 dapat dilihat persamaan regresi dari masing-masing perlakuan. Dari tiap persamaan regresi dapat diketahui nilai *r* untuk mengetahui linieritas dari suatu kurva persamaan regresi. Menurut Suliyanto (2012) dikatakan bahwa untuk persamaan dengan $n=3$, nilai *r* tabel sebesar 0,997. Namun,

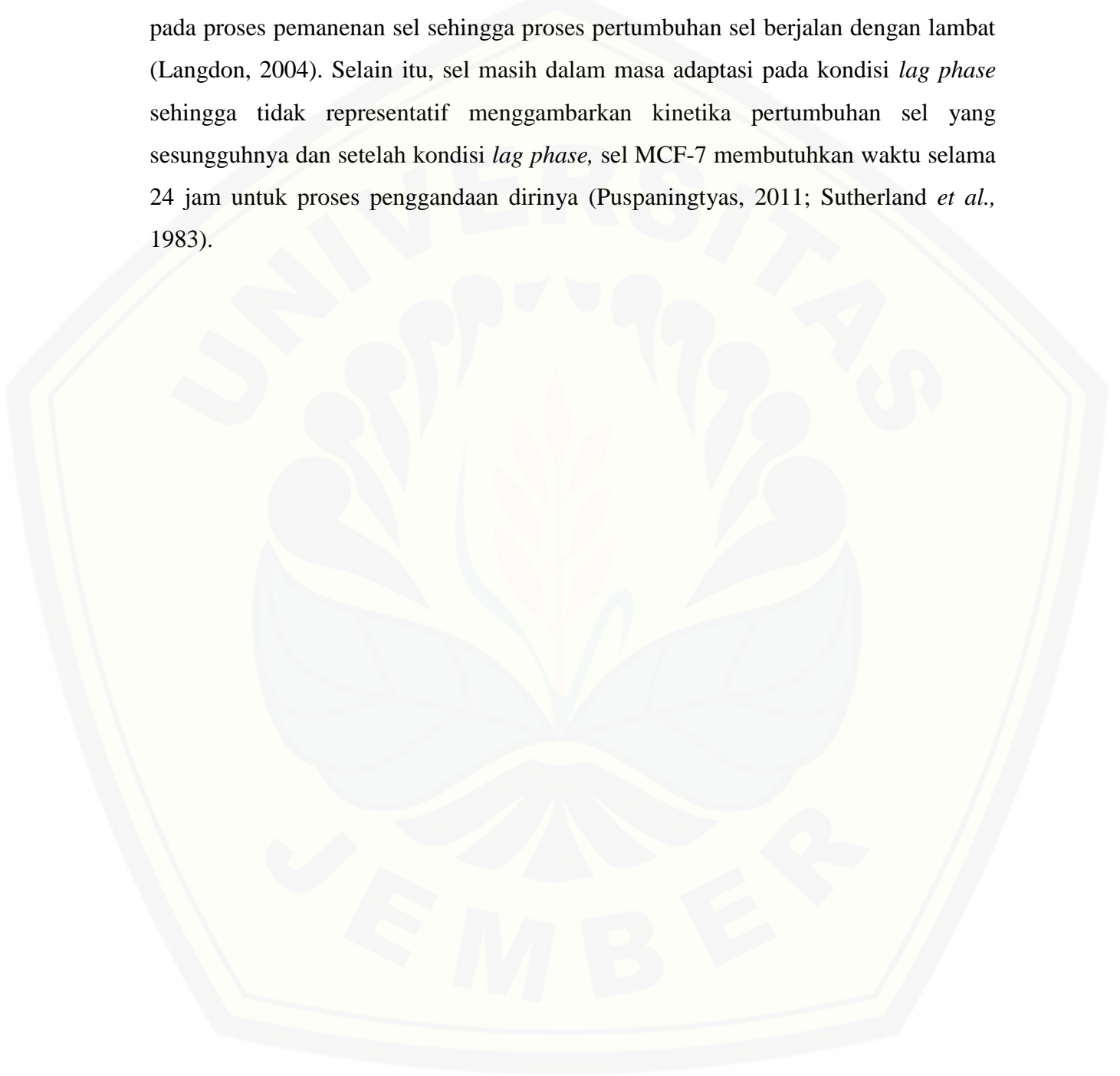
pada hasil uji *doubling time* hanya 5-FU dengan konsentrasi 2100 μM ($\frac{1}{2}$ IC_{50}) yang memiliki linieritas bagus karena nilai r lebih besar dari nilai r tabel sedangkan untuk perlakuan yang lain, nilai r hasil percobaan lebih kecil dari nilai r tabel. Nilai r hasil percobaan yang lebih rendah dari nilai r tabel juga terjadi pada penelitian yang dilakukan oleh Mujahid dan Muchtasjar (2014) serta Nurani (2011). Hal tersebut disebabkan karena uji *doubling time* merupakan uji aktivitas biologis dengan menggunakan kultur sel dan sering kali terjadi ketidakpastian sel kanker payudara MCF-7 yang dapat bertahan hidup setelah pemberian senyawa uji seiring dengan bertambahnya waktu karena adanya pengaruh kondisi lingkungan saat inkubasi sehingga sulit untuk dihasilkan jumlah sel hidup yang proporsional dengan bertambahnya waktu atau hasilnya kurang linier (Langdon, 2004).



Gambar 4.10 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 4-NFU dan 5-FU

Pada penentuan nilai *doubling time*, jumlah sel pada waktu inkubasi jam ke-0 tidak digunakan dalam pembuatan persamaan regresi kinetika proliferasi karena pada

jam ke-0 sel masih berada pada kondisi *lag phase*. Kondisi *lag phase* adalah kondisi pemulihan sel setelah sel mengalami kerusakan akibat penambahan enzim tripsin pada proses pemanenan sel sehingga proses pertumbuhan sel berjalan dengan lambat (Langdon, 2004). Selain itu, sel masih dalam masa adaptasi pada kondisi *lag phase* sehingga tidak representatif menggambarkan kinetika pertumbuhan sel yang sesungguhnya dan setelah kondisi *lag phase*, sel MCF-7 membutuhkan waktu selama 24 jam untuk proses penggandaan dirinya (Puspaningtyas, 2011; Sutherland *et al.*, 1983).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan:

1. Senyawa 4-NFU memiliki nilai IC_{50} sebesar 134,039 μ M sedangkan senyawa 5-FU sebesar 4211,508 μ M terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Senyawa 4-NFU memiliki aktivitas sitotoksitas yang lebih baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 daripada senyawa 5-FU karena nilai IC_{50} senyawa 4-NFU (134,039 μ M) lebih kecil daripada senyawa 5-FU (4211,508 μ M), dimana setelah dianalisis statistik uji T tidak berpasangan, diperoleh harga $\alpha = 0,012$ ($\alpha < 0,05$) sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU.
3. Nilai *doubling time* senyawa 4-NFU pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$ berturut-turut adalah 290,51 jam; 350,97 jam; dan 418,20 jam sedangkan nilai *doubling time* senyawa 5-FU pada konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} , dan $1\frac{1}{2} IC_{50}$ berturut-turut adalah 185,09 jam; 214 jam; dan 220,63 jam. Dari nilai *doubling time* tersebut, dapat dikatakan bahwa senyawa 4-NFU memiliki aktivitas penghambatan terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7 yang lebih baik daripada senyawa 5-FU karena nilai *doubling time* sel setelah pemberian senyawa 4-NFU lebih besar daripada setelah pemberian senyawa 5-FU.

5.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut, penulis menyarankan:

1. Uji apoptosis senyawa 4-NFU terhadap sel kanker payudara MCF-7 untuk mengetahui morfologi dan jumlah sel mati setelah diberi senyawa 4-NFU.

2. Uji imunositokimia senyawa 4-NFU untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen tersebut.



DAFTAR PUSTAKA

- Arya, Kashyap, Tikka, Sharma, Kumari, Verma, dan Sharma. 2011. Human Cancer Cell Lines- A Brief Communication. *J. Chem. Pharm. Res.*, 3 (6): 514-520.
- American Cancer Society. 2013. *Breast Cancer: Facts and Figures 2013-2014*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- American Cancer Society. 2014. *Breast Cancer Overview*. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003090-pdf.pdf> [24 Maret 2015].
- Avendano, C. dan Menendez, J. C. 2008. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Amsterdam: Elsevier.
- Baguley, B. C., Hicks, K. O., dan Wilson, W. R. 2002. *Anticancer Drug Development*. New Zealand: Academic Press.
- Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM (CCRC). 2009. *Prosedur Tetap Uji Pengamatan Proliferasi Sel (Doubling Time)*. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/15-uji-doubling-time.pdf> [23 Januari 2014].
- Coates, J. 2000. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.
- Doyle, A. dan Griffiths, J. B. 1998. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Dwitarhayani, M. 2012. *Nanopropolis Sebagai Penghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara MCF-7*. Skripsi. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- Foster, Henley, Ahamed, dan Wimalasena. 2001. Estrogens and Cell-Cycle Regulation in Breast Cancer. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 7 (12): 320-327.
- Fotakis, G. dan Timbrell, J. A. 2006. In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride. *Toxicology Letters*, 160: 171–177.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., dan Macdonald, M. M. 1972. Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, 3 (2): 1-103.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2013. *Latest World Cancer Stastics*. http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf [29 Maret 2015]
- Katzung, B. G. 1997. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Alih bahasa oleh Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran UNSRI. Jakarta: EGC.
- Keepers, Pizao, Peters, Ark-otte, Winograd, dan Pinedo. 1991. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. *Eur J Cancer*, 7 (27): 897-900.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar, Riskesdas 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kementerian Kesehatan RI. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kurnia, N. D. M. 2013. *Sintesis 1-(4-nitrobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker*. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- Langdon, S. P. 2004. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa: *Humana Press Inc.*
- Lefevre, J. W. 2004. *Measuring the Melting Points of Compounds and Mixtures*. USA: United States Copyright Act.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., dan Johnston, P. G. 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Cancer Res.*, 3 (5): 330-338.
- Meiyanto, E., Rahmi, F., dan Riyanto, S. 2007. Efek Sitotoksik Fraksi Semipolar Ekstrak Metanolik Kulit Batang Cangkring (*Erythrina Fusca Lour*) Terhadap Sel HeLa. *Majalah Obat Tradisional*, 11 (41): 1-11.
- Meiyanto, Susidarti, Handayani, dan Rahmi. 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.
- Meizarini, A. 2008. Sitotoksitas Bahan Restorasi Cyanoacrylate pada Variasi Perbandingan Powder dan Liquid Menggunakan MTT Assay. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 38 (1): 20-24.
- Mirzayans, Andrais, Scott, Tessier, dan Murray. 2007. A sensitive Assay for the Evaluation of Cytotoxicity and Its Pharmacologic Modulation in Human Solid Tumor Derived Cell Lines Exposed to Cancer Therapeutic Agents. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 10 (2): 298-311.
- Mujahid, I. dan Muchtasjar, B. 2014. Uji Proliverasi dan Uji Apoptosis *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst sebagai Antikanker Serviks. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian LPPM UMP*, 2 (1): 58-62
- Nafrialdi dan Gan, S. 2012. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

- Nurani, L. H. 2011. Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*, Lour) Terhadap Sel Mieloma. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1): 11-21.
- Osthoff, K. S. 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity, and Cell Proliferation*. Germany: Roche Diagnostics GmbH.
- Pfeiffer, T. J. 2004. *Phytoestrogens May Inhibit Proliferation of MCF-7 Cells, An Estrogen-Responsive Breast Adenocarcinoma Cell Line*. Tesis. Worcester: Worcester Polytechnic Institute.
- Pratiwi, A. dan Ersam, T. 2013. Uji Kemurnian Dua Senyawa dari Ekstrak Metanol Kayu Batang *Garcinia cylindrocarpa*. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2 (2): 72-75.
- Puspaningtyas, A. Y. 2011. *Modifikasi Struktur 5-FU dan Uji Sitotoksik Turunan 1-(benzoiloksimetil)-5-fluorourasil Hasil Modifikasi Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 (Sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker)*. Tesis. Surabaya: Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Schafer, Lee, O'Regan, Yao, dan Jordan. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-Stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research*, 6: 4373–4380.
- Setiawan, W. R. 2014. Sintesis Asam 2-(2-(4-bromo-*N*-(2,6-diklorofenil)benzamida)fenil)asetat Sebagai Kandidat Obat Penghambatan COX (Cyclooxygenase). Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Shodiq, M. A. 2011. *Pengaruh Kombinasi Cyclophosphamide-Transfer Factor Terhadap Skor Sel T CD4⁺ pada Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H*.

Tesis. Semarang: Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Sinaga, E., Suprihatin, dan Wiryanti, I. 2011. Perbandingan Daya Sitotoksik Ekstrak Rimpang 3 Jenis Tumbuhan Zingiberaceae Terhadap Sel Kanker MCF-7. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 5 (3): 125-133.

Siswandono dan Soekardjo, B. 2008. *Kimia Medisinal Jilid 1*. Edisi Kedua. Surabaya: Airlangga University Press.

Siu, W. Y., Yam, C. H., dan Poon, R. Y. C. 1999. G1 Versus G2 Cell Cycle Arrest After Adriamycin-Induced Damage in Mouse Swiss3T3 Cells. *FEBS Letters*, 461: 299-305.

Sukardja, I. D. G. 2000. *Onkologi Klinik*. (Edisi Kedua). Surabaya: Airlangga University Press.

Suliyanto. 2012. *Analisis Statistik: Pendekatan Praktis dengan Microsoft Excel*. Yogyakarta: CV Andi offset.

Sutherland, R. L., Hall, R. E., dan Taylor I. W. 1983. 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.

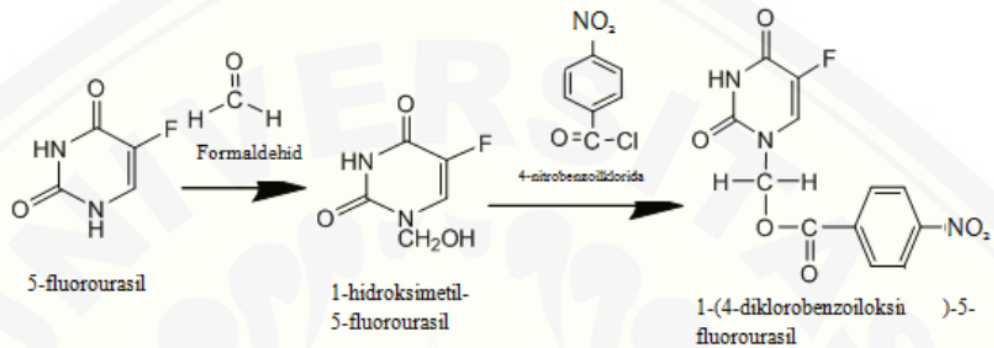
Sweetman, S. C. 2009. *Martindale: The Complete Drug Reference*. Thirty-sixth Edition. USA: Pharmaceutical Press.

Tian, Du, Xie, Zhan, Gan, dan Wang. 2007. Synthesis and Bioevaluation of 5-Fluorouracil Derivatives. *Molecules*, 12: 2450-2457.

- Vanderperren, Wouwe, Behets, Windal, Overmeire, dan Fontaine. 2004. TEQ-value Determinations of Animal Feed, Emphasis on the CALUX Bioassay Validation. *Elsevier*, 63: 1277-1280.
- Widowati, L. dan Mudahar, H., 2009. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium Flagelliforme* (Lood) Bl) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 in vitro. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 1 (29): 9-14.
- World Health Organization. 2014. World Cancer Factsheet. *International Agency for Research on Cancer*.
- Youlden, Cramb, Yip, dan Baade. 2014. Incidence and Mortality of Female Breast Cancer in the Asia-Pacific Region. *Cancer Bio Med*, 11 (2): 101-118.
- Zaenab. 2013. Pengaruh Konsentrasi Etanol Sebagai Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Naftokinon dalam Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis L.*). *Pharmaciana*, 3 (2): 63-68.
- Zhang, Yin, Xu, dan Chen. 2008. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, 18: 1551-1569.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Perhitungan Bobot Penimbangan Bahan



(mmol)	5-FU +	Formaldehid	→	1-hidroksimetil-5-FU +	4-nitrobenzoil klorida	→	4-NFU
(M)	11,532	17,898					
(R)	11,532	11,532	(M)	11,532	12,685	-	
(S)	-	6,366	(R)	11,532	11,532	11,532	
			(S)	-	1,153	11,532	

Massa = BM x mol

Bobot jenis (BJ) = $\frac{\text{massa}}{\text{volume}}$

mol = $\frac{\text{massa}}{\text{BM}}$

Volume = $\frac{\text{massa}}{\text{BJ}}$

1. 5-FU (BM = 130,077 g/mol)

$$\text{mol 5FU} = \frac{1,5 \text{ g}}{130,077 \text{ g/mol}} = 11,532 \text{ mmol}$$

2. Formaldehid (BJ = 1,09 g/ml; BM = 30,03 g/mol)

$$\text{Massa} = 17,898 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \times 30,03 \text{ g/mol} = 0,537 \text{ g}$$

$$\text{Formaldehid 37\% b/b} = \frac{0,537 \text{ g}}{37 \text{ g}} \times 100 \text{ g} = 1,451 \text{ g}$$

$$\text{Volume} = \frac{1,451 \text{ g}}{1,09 \text{ g/ml}} = 1,332 \text{ ml}$$

$$3. \text{ Aquadest} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 0,625 \text{ ml} = 11,532 \text{ ml}$$

$$4. \text{ Trietilamin (BM} = 101 \text{ g/mol; BJ} = 0,0694 \text{ g/ml)}$$

$$\text{Massa} = 12,676 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \times 101 \text{ g/mol} = 1,280 \text{ g}$$

$$\text{Volume} = \frac{1,280 \text{ g}}{0,0694 \text{ g/ml}} = 18,448 \text{ ml}$$

$$5. \text{ Aseton untuk residu} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 12,5 \text{ ml} = 230,64 \text{ ml}$$

$$6. \text{ 4-nitrobenzoilklorida (BM} = 185,56 \text{ g/mol)}$$

$$\text{Massa} = 12,676 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \times 185,56 \text{ g/mol} = 2,352 \text{ g}$$

$$7. \text{ Aseton untuk 4nitrobenzoilklorida} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 5 \text{ ml} = 92,256 \text{ ml}$$

$$8. \text{ HCl} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 10 \text{ ml} = 184,512 \text{ ml} \times 3 = 553,536 \text{ ml}$$

$$9. \text{ NaHCO}_3 = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 10 \text{ ml} = 184,512 \text{ ml} \times 3 = 553,536 \text{ ml}$$

$$10. \text{ Etil asetat} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 7,5 \text{ ml} = 138,384 \text{ ml}$$

$$11. \text{ Aquadest untuk pencucian} = \frac{11,532 \text{ mmol}}{0,625 \text{ mmol}} \times 2,5 \text{ ml} = 46,128 \text{ ml}$$

LAMPIRAN B. Perhitungan Rendemen Senyawa Produk

$$\text{BM 4-NFU} = 311,22 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa produk teoritis} = 11,532 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \times 311,22 \text{ g/mol} = 3,589 \text{ g}$$

Rendemen produk hasil sintesis

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot hasil sintesis}}{\text{bobot teoritis}} \times 100\%$$

$$\text{Replikasi 1} = \frac{0,8963 \text{ g}}{3,589 \text{ g}} \times 100\% = 24,974 \% \text{ b/b}$$

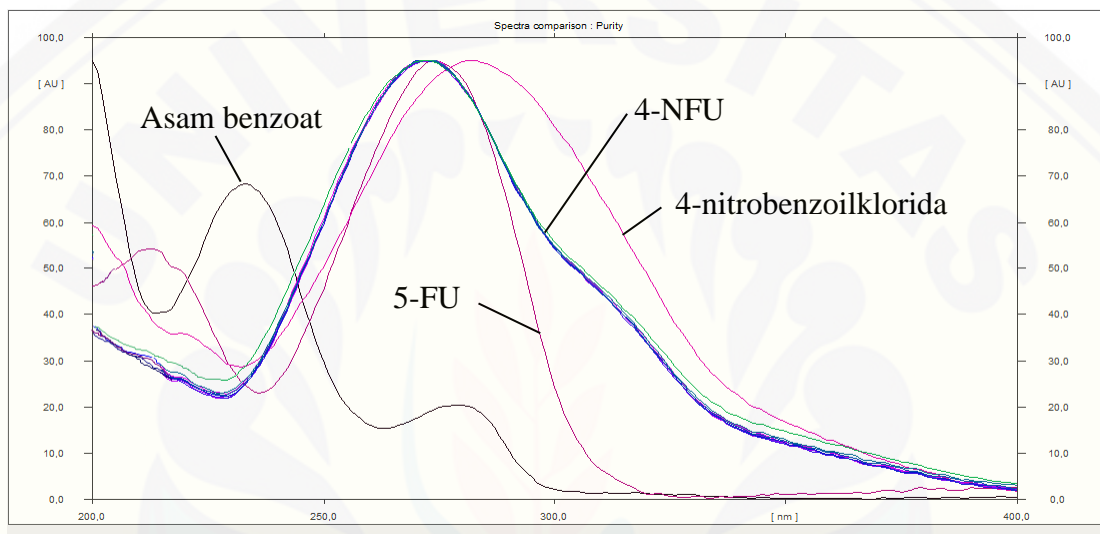
$$\text{Replikasi 2} = \frac{0,9186 \text{ g}}{3,589 \text{ g}} \times 100\% = 25,595 \% \text{ b/b}$$

Rendemen hasil pemurnian dengan kromatografi kolom

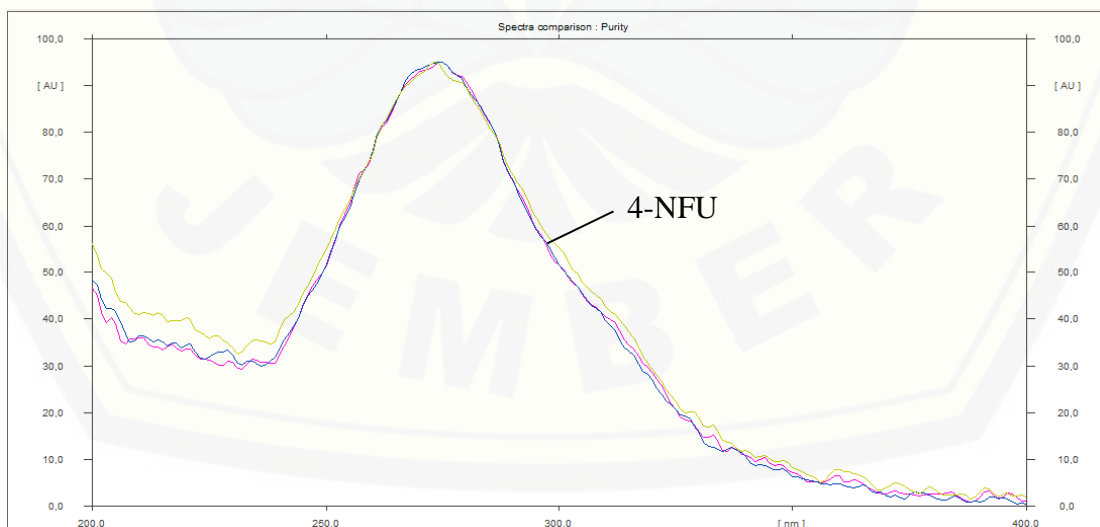
$$\% \text{ Rendemen} = \frac{0,6475 \text{ g}}{7,178 \text{ g}} \times 100\% = 9,020 \% \text{ b/b}$$

LAMPIRAN C. Spektra Densitometri

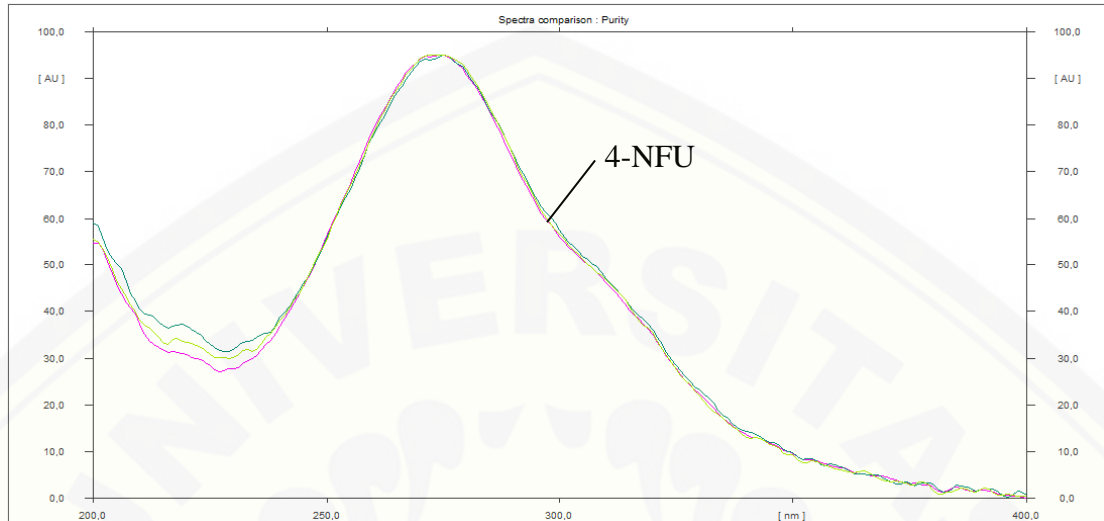
1. Hasil analisis KLT dari fraksi-fraksi kromatografi kolom dengan eluen heksana:aseton (6:4)



2. Eluen heksana:etil asetat:aseton (5:3:2)



3. Eluen heksana:aseton (7:3)

**LAMPIRAN D. Perhitungan Pembuatan Larutan 4-NFU dan 5-FU****D.1 Uji sitotoksisitas**

$$\text{Molaritas (M)} = \frac{\text{massa (mg)} \times 1000000}{\text{BM} \times \text{volume } (\mu\text{l})}$$

$$\text{Massa (mg)} = \frac{\text{molaritas (M)} \times \text{BM} \times \text{volume } (\mu\text{l})}{1000000}$$

1. Senyawa 4-NFU

Untuk membuat larutan induk 5000 μM , dibutuhkan senyawa 4-NFU:

$$\text{Massa} = \frac{0,005 \text{ M} \times 311,22 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 400 \mu\text{l}}{1000000} = 0,622 \text{ mg}$$

Pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan konsentrasi 0,5; 5; 50; 250; dan 500 μM .

$$500 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$250 \mu\text{M} = \frac{20 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$50 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 500 \mu\text{M}$$

$$5 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 50 \mu\text{M}$$

$$0,5 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5 \mu\text{M}$$

2. Senyawa 5-FU

Untuk membuat larutan induk 50000 μM , dibutuhkan senyawa 5-FU:

$$\text{Massa} = \frac{0,05 \text{ M} \times 130,077 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 400 \mu\text{l}}{1000000} = 2,602 \text{ mg}$$

Pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan konsentrasi 0,5; 5; 50; 250; 500; dan 5000 μM .

$$5000 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 50000 \mu\text{M}$$

$$500 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$250 \mu\text{M} = \frac{20 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5000 \mu\text{M}$$

$$50 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 500 \mu\text{M}$$

$$5 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 50 \mu\text{M}$$

$$0,5 \mu\text{M} = \frac{40 \mu\text{l}}{400 \mu\text{l}} \times 5 \mu\text{M}$$

D.2 Uji proliferasi

1. Senyawa 4-NFU

Rerata nilai IC_{50} 4-NFU = 134,039 μM , namun dibulatkan menjadi 135 μM agar memudahkan dalam proses pemipetan saat pengenceran.

Untuk membuat larutan induk 1500 μM , dibutuhkan senyawa 4-NFU:

$$\text{Massa} = \frac{0,0015 \text{ M} \times 311,22 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1000 \mu\text{l}}{1000000} = 0,467 \text{ mg}$$

Pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan konsentrasi 67,5; 135; dan 202,5 μM .

$$202,5 \mu\text{M} = \frac{135 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 1500 \mu\text{M}$$

$$135 \mu\text{M} = \frac{90 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 1500 \mu\text{M}$$

$$67,5 \mu\text{M} = \frac{45 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 1500 \mu\text{M}$$

2. Senyawa 5-FU

Rerata nilai IC_{50} 5-FU = 4211,508 μM , namun dibulatkan menjadi 4200 μM agar memudahkan dalam proses pipetasi saat pengenceran.

Untuk membuat larutan induk 4200 μM , dibutuhkan senyawa 5-FU:

$$\text{Massa} = \frac{0,02 \text{ M} \times 311,22 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1000 \mu\text{l}}{1000000} = 2,602 \text{ mg}$$

Pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan konsentrasi 2100; 4200; dan 6300 μM .

$$6300 \mu\text{M} = \frac{315 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 20000 \mu\text{M}$$

$$4200 \mu\text{M} = \frac{210 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 20000 \mu\text{M}$$

$$2100 \mu\text{M} = \frac{105 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times 20000 \mu\text{M}$$

LAMPIRAN E. Hasil Uji Sitotoksitas

E.1 Perhitungan % sel hidup

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

1. Senyawa 4-NFU

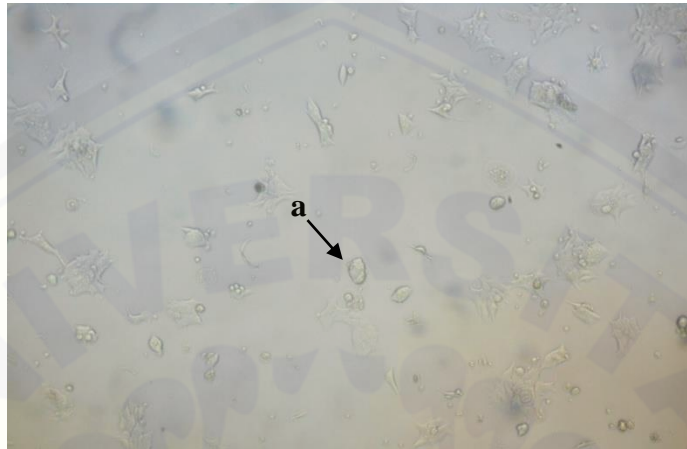
Replikasi	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% Sel hidup
		1	2	3	Rerata	
I	0,5	0,242	0,248	0,236	0,242	82,68
	5	0,201	0,233	0,237	0,224	68,50
	50	0,248	0,208	0,200	0,219	64,57
	250	0,211	0,193	0,204	0,203	51,97
	500	0,192	0,169	0,174	0,178	32,28
	Kontrol sel	0,259	0,268	-	0,264	-
	Kontrol media	0,149	0,131	0,130	0,137	-
II	0,5	0,168	0,273	0,249	0,230	30,92
	5	0,295	0,326	0,339	0,320	58,92
	50	0,310	0,290	0,309	0,303	54,42
	250	0,290	0,286	0,300	0,292	51,35
	500	0,270	0,295	0,197	0,254	41,08
	Kontrol sel	0,438	0,506	-	0,472	-
	Kontrol media	0,101	0,104	0,101	0,102	-
III	0,5	0,707	0,735	0,675	0,706	83,93
	5	0,719	0,720	0,673	0,704	83,40
	50	0,649	0,649	0,587	0,628	72,08
	250	0,424	0,359	0,388	0,390	36,63
	500	0,371	0,371	0,417	0,386	36,04
	Kontrol sel	0,706	0,925	-	0,816	-
	Kontrol media	0,147	0,141	0,144	0,144	-

2. Senyawa 5-FU

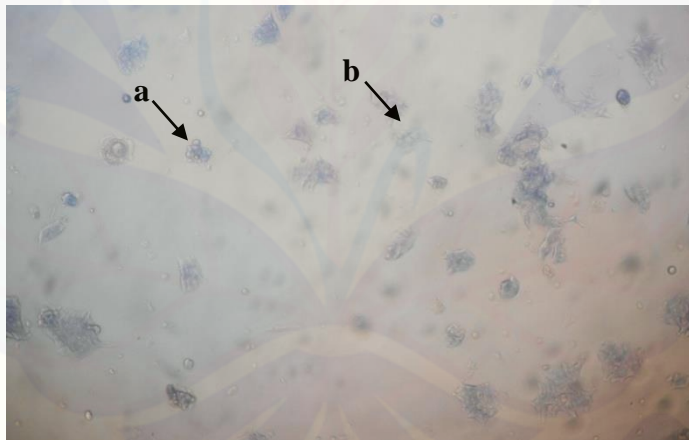
Replikasi	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% Sel hidup
		1	2	3	Rerata	
I	0,5	0,404	0,412	0,422	0,413	98,32
	5	0,400	0,353	0,433	0,395	92,87
	50	0,388	0,363	0,367	0,373	85,74
	250	0,300	0,417	0,360	0,359	81,45
	500	0,240	0,372	-	0,306	64,78
	5000	0,283	0,192	-	0,238	43,40
	Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,418	-
	Kontrol media	0,090	0,102	0,108	0,100	-
II	0,5	0,781	0,766	-	0,774	93,21
	5	0,757	0,757	-	0,757	90,86
	50	0,717	0,669	0,726	0,704	83,29
	250	0,679	0,644	0,641	0,655	76,24
	500	0,549	0,530	0,679	0,586	66,43
	5000	0,427	0,415	0,434	0,425	43,48
	Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,821	-
	Kontrol media	0,119	0,116	0,127	0,121	-
III	0,5	0,800	0,895	-	0,848	97,34
	5	0,790	0,791	-	0,791	89,56
	50	0,780	0,742	0,728	0,750	84,08
	250	0,719	0,702	0,718	0,713	78,99
	500	0,673	0,603	0,546	0,607	64,57
	5000	0,506	0,518	0,438	0,487	48,16
	Kontrol sel	0,864	0,870	-	0,867	-
	Kontrol media	0,129	0,132	0,142	0,134	-

E.2 Foto sel kanker payudara MCF-7

1. Foto sel kanker payudara MCF-7 sebelum diberi senyawa uji



2. Foto sel kanker payudara MCF-7 setelah diberi senyawa uji dan reagen MTT



Keterangan: (a) Sel MCF-7 hidup; (b) Sel MCF-7 mati

E.3 Hasil analisis probit

1. Senyawa 4-NFU

- Replikasi 1

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a						
,010	1,053E8	187076,966	1,175E24	8,023	5,272	24,070
,020	2,160E7	72917,899	4,875E21	7,334	4,863	21,688
,030	7903664,487	40018,556	1,505E20	6,898	4,602	20,178
,040	3710271,427	25445,657	1,101E19	6,569	4,406	19,042
,050	2005668,059	17586,232	1,314E18	6,302	4,245	18,119
,060	1188161,081	12829,517	2,154E17	6,075	4,108	17,333
,070	750765,434	9722,304	4,415E16	5,876	3,988	16,645
,080	497727,079	7578,967	1,069E16	5,697	3,880	16,029
,090	342484,435	6038,762	2,945E15	5,535	3,781	15,469
,100	242771,108	4896,092	8,993E14	5,385	3,690	14,954
,150	58406,285	2037,199	6,680E12	4,766	3,309	12,825
,200	18823,774	1000,818	1,376E11	4,275	3,000	11,139
,250	7125,683	535,390	5,000E9	3,853	2,729	9,699
,300	2978,277	299,244	2,598E8	3,474	2,476	8,415
,350	1327,069	169,824	1,724E7	3,123	2,230	7,237
,400	616,256	95,223	1369240,342	2,790	1,979	6,136
,450	293,394	50,888	126222,548	2,467	1,707	5,101
,500	141,336	24,397	13604,472	2,150	1,387	4,134
,550	68,085	9,386	1827,193	1,833	,972	3,262
,600	32,415	2,446	345,398	1,511	,388	2,538
,650	15,053	,383	98,229	1,178	-,417	1,992
,700	6,707	,037	38,022	,827	-1,429	1,580
,750	2,803	,002	17,181	,448	-2,621	1,235
,800	1,061	,000	8,111	,026	-4,006	,909

,850	,342	,000	3,682	-,466	-5,658	,566
,900	,082	,000	1,452	-1,085	-7,764	,162
,910	,058	,000	1,167	-1,234	-8,275	,067
,920	,040	,000	,922	-1,396	-8,831	-,035
,930	,027	,000	,713	-1,575	-9,444	-,147
,940	,017	,000	,536	-1,774	-10,129	-,271
,950	,010	,000	,388	-2,002	-10,911	-,411
,960	,005	,000	,266	-2,269	-11,831	-,575
,970	,003	,000	,168	-2,597	-12,963	-,774
,980	,001	,000	,092	-3,034	-14,470	-1,038
,990	,000	,000	,035	-3,722	-16,849	-1,451

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

- Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for						
	95% Confidence Limits for konsentrasi			log(konsentrasi) ^a			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	,010	1,726E14	3,698E8	1,302E80	14,237	8,568	80,115
	,020	6,470E12	6,181E7	1,232E71	12,811	7,791	71,091
	,030	8,054E11	1,985E7	2,321E65	11,906	7,298	65,366
	,040	1,680E11	8440724,682	1,146E61	11,225	6,926	61,059
	,050	4,695E10	4208352,609	3,603E57	10,672	6,624	57,557
	,060	1,586E10	2326273,800	3,763E54	10,200	6,367	54,575
	,070	6,124E9	1382836,401	9,156E51	9,787	6,141	51,962
	,080	2,613E9	867699,567	4,184E49	9,417	5,938	49,622
	,090	1,204E9	567749,928	3,115E47	9,081	5,754	47,493
	,100	5,899E8	384111,884	3,424E45	8,771	5,584	45,535
	,150	3,079E7	75867,349	2,669E37	7,488	4,880	37,426
	,200	2945202,324	20748,025	9,667E30	6,469	4,317	30,985

,250	393268,863	6755,865	2,909E25	5,595	3,830	25,464
,300	64480,497	2430,824	3,247E20	4,809	3,386	20,512
,350	12071,656	919,188	8,582E15	4,082	2,963	15,934
,400	2461,995	346,173	4,101E11	3,391	2,539	11,613
,450	528,738	114,841	3,172E7	2,723	2,060	7,501
,500	116,355	16,173	6836,396	2,066	1,209	3,835
,550	25,605	,028	118,670	1,408	-1,549	2,074
,600	5,499	,000	29,588	,740	-5,536	1,471
,650	1,122	,000	10,454	,050	-9,829	1,019
,700	,210	,000	3,862	-,678	-14,397	,587
,750	,034	,000	1,374	-1,463	-19,344	,138
,800	,005	,000	,445	-2,338	-24,863	-,352
,850	,000	,000	,121	-3,357	-31,303	-,916
,900	,000	,000	,024	-4,639	-39,410	-1,622
,910	,000	,000	,016	-4,949	-41,368	-1,792
,920	,000	,000	,011	-5,285	-43,496	-1,976
,930	,000	,000	,007	-5,655	-45,836	-2,179
,940	,000	,000	,004	-6,069	-48,450	-2,405
,950	,000	,000	,002	-6,540	-51,431	-2,662
,960	,000	,000	,001	-7,094	-54,934	-2,965
,970	,000	,000	,000	-7,774	-59,240	-3,336
,980	,000	,000	,000	-8,679	-64,965	-3,830
,990	,000	,000	,000	-10,106	-73,988	-4,607

a. Logarithm base = 10.

- Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi					
	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a ,010	4144865,658	19021,629	5,869E29	6,618	4,279	29,769

,020	1244923,933	9603,308	6,937E26	6,095	3,982	26,841
,030	580386,490	6205,568	9,663E24	5,764	3,793	24,985
,040	326887,854	4459,282	3,888E23	5,514	3,649	23,590
,050	204926,164	3403,054	2,854E22	5,312	3,532	22,455
,060	137715,108	2700,236	3,093E21	5,139	3,431	21,490
,070	97192,170	2202,099	4,414E20	4,988	3,343	20,645
,080	71140,208	1832,775	7,728E19	4,852	3,263	19,888
,090	53563,459	1549,543	1,586E19	4,729	3,190	19,200
,100	41249,624	1326,538	3,694E18	4,615	3,123	18,567
,150	13986,608	689,415	8,965E15	4,146	2,838	15,953
,200	5921,118	402,420	7,624E13	3,772	2,605	13,882
,250	2832,292	248,451	1,303E12	3,452	2,395	12,115
,300	1460,594	157,106	3,457E10	3,165	2,196	10,539
,350	790,711	99,313	1,238E9	2,898	1,997	9,093
,400	441,696	61,174	5,525E7	2,645	1,787	7,742
,450	251,447	35,411	2947947,456	2,400	1,549	6,470
,500	144,427	18,095	188284,034	2,160	1,258	5,275
,550	82,956	7,257	15323,206	1,919	,861	4,185
,600	47,225	1,873	1833,714	1,674	,273	3,263
,650	26,380	,255	370,779	1,421	-,594	2,569
,700	14,281	,018	120,602	1,155	-1,751	2,081
,750	7,365	,001	52,375	,867	-3,164	1,719
,800	3,523	,000	25,937	,547	-4,836	1,414
,850	1,491	,000	13,182	,174	-6,846	1,120
,900	,506	,000	6,239	-,296	-9,421	,795
,910	,389	,000	5,259	-,410	-10,047	,721
,920	,293	,000	4,383	-,533	-10,728	,642
,930	,215	,000	3,597	-,668	-11,479	,556
,940	,151	,000	2,895	-,820	-12,319	,462
,950	,102	,000	2,268	-,992	-13,278	,356
,960	,064	,000	1,709	-1,195	-14,407	,233
,970	,036	,000	1,213	-1,444	-15,797	,084

,980	,017	,000	,773	-1,776	-17,647	-,112
,990	,005	,000	,384	-2,298	-20,568	-,415

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

2. Senyawa 5-FU

- Replikasi 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
	PROBIT					
,010	4,024E7	4904996,429	9,678E8	7,605	6,691	8,986
,020	1,338E7	1960467,230	2,424E8	7,126	6,292	8,384
,030	6651882,733	1095046,117	1,007E8	6,823	6,039	8,003
,040	3932450,145	706349,040	5,206E7	6,595	5,849	7,717
,050	2564330,220	494339,254	3,044E7	6,409	5,694	7,483
,060	1782063,654	364765,457	1,928E7	6,251	5,562	7,285
,070	1295220,276	279377,720	1,292E7	6,112	5,446	7,111
,080	973334,575	219999,741	9033101,325	5,988	5,342	6,956
,090	750611,140	177006,548	6522781,256	5,875	5,248	6,814
,100	590934,062	144880,479	4834193,381	5,772	5,161	6,684
,150	219515,254	63129,535	1400547,736	5,341	4,800	6,146
,200	99920,654	32547,299	524415,016	5,000	4,513	5,720
,250	50864,316	18395,380	226277,214	4,706	4,265	5,355
,300	27737,849	10993,332	106627,818	4,443	4,041	5,028
,350	15814,251	6803,938	53242,507	4,199	3,833	4,726
,400	9278,837	4301,407	27636,704	3,967	3,634	4,441
,450	5539,383	2748,758	14714,990	3,743	3,439	4,168
,500	3334,119	1759,517	7956,572	3,523	3,245	3,901
,550	2006,785	1117,991	4334,149	3,303	3,048	3,637
,600	1198,033	697,855	2362,526	3,078	2,844	3,373

,650	702,932	422,306	1281,128	2,847	2,626	3,108
,700	400,765	243,320	687,166	2,603	2,386	2,837
,750	218,549	130,155	361,765	2,340	2,114	2,558
,800	111,252	62,380	184,080	2,046	1,795	2,265
,850	50,640	25,346	87,459	1,704	1,404	1,942
,900	18,811	7,809	35,835	1,274	,893	1,554
,910	14,810	5,848	29,027	1,171	,767	1,463
,920	11,421	4,265	23,125	1,058	,630	1,364
,930	8,583	3,009	18,039	,934	,478	1,256
,940	6,238	2,035	13,691	,795	,309	1,136
,950	4,335	1,301	10,014	,637	,114	1,001
,960	2,827	,767	6,948	,451	-,115	,842
,970	1,671	,400	4,443	,223	-,398	,648
,980	,831	,168	2,459	-,080	-,775	,391
,990	,276	,042	,973	-,559	-1,372	-,012

a. Logarithm base = 10.

- Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ,010	8,097E8	4,455E7	7,861E10	8,908	7,649	10,895
,020	1,957E8	1,393E7	1,258E10	8,292	7,144	10,100
,030	7,949E7	6660623,405	3,935E9	7,900	6,824	9,595
,040	4,036E7	3821589,959	1,642E9	7,606	6,582	9,215
,050	2,326E7	2431482,194	8,070E8	7,367	6,386	8,907
,060	1,455E7	1654366,388	4,409E8	7,163	6,219	8,644
,070	9640128,742	1180088,398	2,595E8	6,984	6,072	8,414
,080	6669471,769	871917,713	1,615E8	6,824	5,940	8,208
,090	4770739,088	662022,028	1,049E8	6,679	5,821	8,021

,100	3504671,874	513710,113	7,057E7	6,545	5,711	7,849
,150	977478,032	179439,495	1,367E7	5,990	5,254	7,136
,200	354303,880	77583,029	3720088,720	5,549	4,890	6,571
,250	148343,278	37692,694	1220788,133	5,171	4,576	6,087
,300	67875,832	19657,000	450059,735	4,832	4,294	5,653
,350	32890,387	10718,264	179093,664	4,517	4,030	5,253
,400	16538,668	6004,599	74997,282	4,219	3,778	4,875
,450	8504,173	3410,512	32470,730	3,930	3,533	4,511
,500	4419,199	1941,207	14344,348	3,645	3,288	4,157
,550	2296,439	1094,179	6398,896	3,361	3,039	3,806
,600	1180,828	602,262	2858,843	3,072	2,780	3,456
,650	593,770	317,722	1271,316	2,774	2,502	3,104
,700	287,721	156,427	560,281	2,459	2,194	2,748
,750	131,650	69,237	243,370	2,119	1,840	2,386
,800	55,120	26,219	102,463	1,741	1,419	2,011
,850	19,979	7,912	39,940	1,301	,898	1,601
,900	5,572	1,649	12,971	,746	,217	1,113
,910	4,094	1,122	9,946	,612	,050	,998
,920	2,928	,737	7,468	,467	-,132	,873
,930	2,026	,464	5,460	,307	-,334	,737
,940	1,343	,276	3,855	,128	-,559	,586
,950	,840	,152	2,598	-,076	-,818	,415
,960	,484	,075	1,637	-,315	-1,122	,214
,970	,246	,032	,931	-,610	-1,498	-,031
,980	,100	,010	,441	-1,001	-1,998	-,356
,990	,024	,002	,136	-1,618	-2,789	-,866

a. Logarithm base = 10.

- Replikasi 3

Probability		Confidence Limits					
		95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	,010	4,067E8	2,654E7	2,980E10	8,609	7,424	10,474
	,020	1,078E8	8942168,122	5,388E9	8,033	6,951	9,731
	,030	4,644E7	4481530,462	1,821E9	7,667	6,651	9,260
	,040	2,464E7	2664316,092	8,055E8	7,392	6,426	8,906
	,050	1,472E7	1744901,007	4,150E8	7,168	6,242	8,618
	,060	9489503,944	1216818,770	2,360E8	6,977	6,085	8,373
	,070	6459167,981	886932,686	1,439E8	6,810	5,948	8,158
	,080	4577075,418	668123,064	9,246E7	6,661	5,825	7,966
	,090	3346133,799	516299,135	6,182E7	6,525	5,713	7,791
	,100	2507921,122	407184,234	4,269E7	6,399	5,610	7,630
	,150	760029,720	152126,389	9227434,842	5,881	5,182	6,965
	,200	294277,113	69398,829	2737740,623	5,469	4,841	6,437
	,250	130386,795	35311,731	967596,986	5,115	4,548	5,986
	,300	62771,014	19200,497	381197,848	4,798	4,283	5,581
	,350	31883,922	10885,647	161265,301	4,504	4,037	5,208
	,400	16765,505	6330,785	71540,827	4,224	3,801	4,855
	,450	9001,831	3730,382	32733,332	3,954	3,572	4,515
	,500	4881,207	2203,291	15255,598	3,689	3,343	4,183
	,550	2646,815	1290,351	7170,519	3,423	3,111	3,856
	,600	1421,143	739,904	3371,437	3,153	2,869	3,528
	,650	747,279	408,534	1575,358	2,873	2,611	3,197
	,700	379,573	212,085	727,829	2,579	2,327	2,862
	,750	182,735	100,020	330,600	2,262	2,000	2,519
	,800	80,965	40,861	145,528	1,908	1,611	2,163
	,850	31,349	13,496	59,636	1,496	1,130	1,776
	,900	9,500	3,148	20,644	,978	,498	1,315
	,910	7,121	2,201	16,080	,853	,343	1,206

,920	5,206	1,489	12,281	,716	,173	1,089
,930	3,689	,967	9,149	,567	-,014	,961
,940	2,511	,596	6,599	,400	-,225	,819
,950	1,619	,343	4,555	,209	-,465	,659
,960	,967	,178	2,954	-,015	-,749	,470
,970	,513	,080	1,739	-,290	-1,099	,240
,980	,221	,027	,863	-,656	-1,566	-,064
,990	,059	,005	,287	-1,232	-2,304	-,542

a. Logarithm base = 10.

E.4 Hasil analisis uji T tidak berpasangan

Tests of Normality

senyawa	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50 4NFU	,349	3	.	,831	3	,192
5FU	,270	3	.	,949	3	,564

a. Lilliefors Significance Correction

Pada uji *test of normality* Shapiro-Wilk, nilai IC₅₀ senyawa 4-NFU memiliki nilai p = 0,192 sedangkan nilai IC₅₀ senyawa 5-FU memiliki nilai p = 0,564. Karena nilai p > 0,05 maka dapat diambil kesimpulan bahwa nilai IC₅₀ senyawa 4-NFU maupun 5-FU memiliki sebaran normal.

Group Statistics

Senyawa	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
IC50 4-NFU	3	134,0393	15,39287	8,88707
5-FU	3	4211,5083	794,18000	458,52004

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	8,384	,044	-8,891	4	,001	-4077,469	458,60616	-5350,76	-2804,17
	Equal variances not assumed			-8,891	2,002	,012	-4077,469	458,60616	-6049,27	-2105,66

Pada kotak *Leuvene's test*, nilai $p = 0,044$. Karena nilai $p < 0,05$ maka varians data dua kelompok tidak sama sehingga untuk melihat hasil uji T memakai hasil pada baris kedua. Oleh karena nilai $\alpha = 0,012$ ($\alpha < 0,05$) maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara nilai IC_{50} senyawa 4-NFU dan 5-FU, dimana nilai IC_{50} senyawa 4-NFU lebih rendah daripada senyawa 5-FU.

LAMPIRAN F. Hasil Uji Proliferasi

F.1 Perhitungan jumlah sel hidup

1. Senyawa 4-NFU

Hari	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% Sel hidup	Σ Sel Hidup
		1	2	3	Rerata		
1	67,5	0,326	0,410	0,403	0,380	14,08	704,07
	135	0,374	0,333	0,388	0,365	13,26	662,82
	202,5	0,331	0,325	0,336	0,331	11,39	569,31
	Kontrol sel	2,094	2,282	1,449	1,942	181,8	9090
	Kontrol media	0,121	0,124	0,127	0,124	-	-
2	67,5	0,417	0,446	0,444	0,436	16,27	813,27
	135	0,369	0,402	0,416	0,396	14,11	705,37
	202,5	0,416	0,340	0,345	0,367	12,57	628,68
	Kontrol sel	2,243	1,845	1,915	2,001	186,9	9345
	Kontrol media	0,135	0,126	0,135	0,132	-	-
3	67,5	0,724	0,719	0,724	0,722	22,83	1141,67
	135	0,641	0,635	0,694	0,657	19,85	992,42
	202,5	0,572	0,603	0,552	0,576	16,17	808,33
	Kontrol sel	2,552	2,458	2,249	2,420	220	11000
	Kontrol media	0,232	0,218	0,210	0,220	-	-

2. Senyawa 5-FU

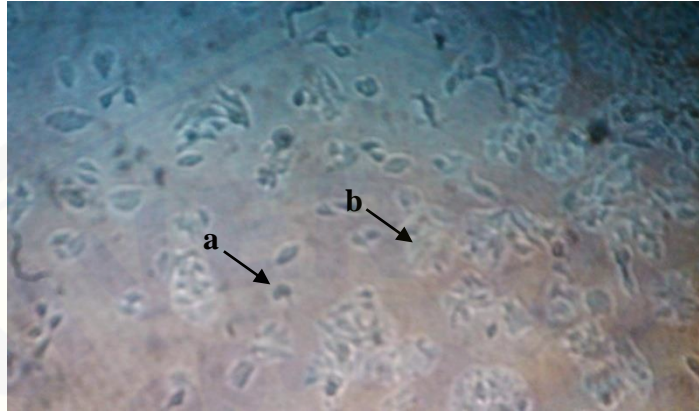
Hari	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% Sel hidup	Σ Sel Hidup
		1	2	3	Rerata		
1	2100	0,790	0,925	0,953	0,889	42,49	2124,5
	4200	0,893	0,869	0,777	0,846	40,09	2004,5
	6300	0,798	0,817	0,803	0,803	37,69	1884,4
	Kontrol sel	2,073	2,241	1,442	1,919	179,1	8955
	Kontrol media	0,123	0,128	0,132	0,128	-	-
2	2100	1,116	1,108	1,165	1,130	52,81	2640,5
	4200	1,033	1,017	0,954	1,001	45,97	2298,7
	6300	0,974	0,862	0,907	0,914	41,37	2068,5
	Kontrol sel	2,276	1,884	1,904	2,021	188,8	9440
	Kontrol media	0,135	0,127	0,136	0,133	-	-
3	2100	1,696	1,837	1,570	1,701	67,32	3366
	4200	1,511	1,564	1,579	1,551	60,52	3025,8
	6300	1,509	1,421	1,423	1,478	57,18	2859
	Kontrol sel	2,552	2,458	2,249	2,420	220	11000
	Kontrol media	0,232	0,218	0,210	0,220	-	-

F.2 Perhitungan nilai *doubling time*

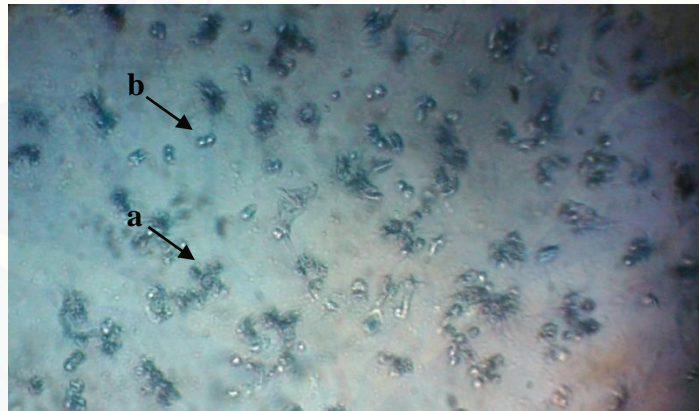
Senyawa	Konsentrasi (μM)	Log jumlah sel			Persamaan waktu vs log Σ sel hidup	R	<i>Doubling Time</i> (jam)
		24	48	72			
4-NFU	67,5	2,848	2,910	3,058	$Y = 4,375 \cdot 10^{-3}x + 2,729$	0,973	290,51
	135	2,821	2,848	2,997	$Y = 3,667 \cdot 10^{-3}x + 2,713$	0,928	350,97
	202,5	2,755	2,798	2,908	$Y = 3,188 \cdot 10^{-3}x + 2,667$	0,969	418,20
Kontrol sel 4-NFU	-	3,959	3,971	4,041	$Y = 1,708 \cdot 10^{-3}x + 3,908$	0,926	53,86
5-FU	2100	3,327	3,422	3,527	$Y = 4,167 \cdot 10^{-3}x + 3,225$	0,999	185,99
	4200	3,302	3,362	3,460	$Y = 3,729 \cdot 10^{-3}x + 3,202$	0,981	214,00
	6300	3,275	3,316	3,456	$Y = 3,771 \cdot 10^{-3}x + 3,168$	0,954	220,63
Kontrol sel 5-FU	-	3,952	3,975	4,041	$Y = 1,854 \cdot 10^{-3}x + 3,900$	0,963	53,94

F.3 Foto sel kanker payudara MCF-7 setelah diberi perlakuan

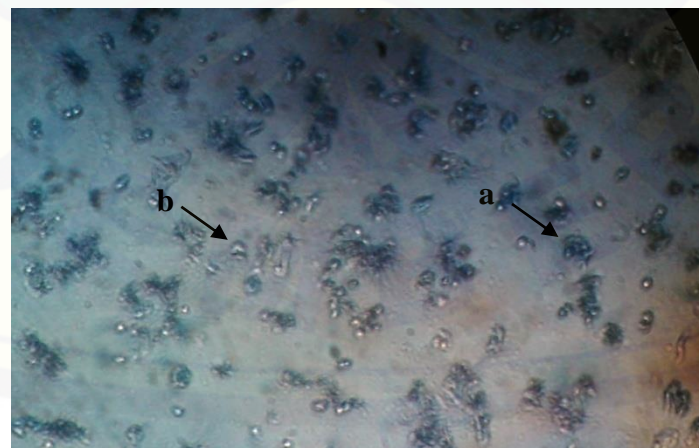
1. Waktu inkubasi 24 jam



2. Waktu inkubasi 48 jam




3. Waktu inkubasi 72 jam



Keterangan: (a) Sel MCF-7 hidup; (b) Sel MCF-7 mati

LAMPIRAN G. Spesifikasi 5-FU



Specification

8.18505.0005 5-Fluorouracil for synthesis

Specification		
Assay (HPLC, area%)	≥ 99.0	% (a/o)
Identity (IR)	passes test	

Dr. Oliver Schramel
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
EMD Millipore Corporation - A division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321
8AUSA000000000000-V 2490 Date: 16.03.2013

Page 1 of 1