



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

**SKRIPSI**

Oleh

**Puspita Arum Wijayanti**

**NIM 112210101025**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



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

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Puspita Arum Wijayanti**

**NIM 112210101025**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, karunia dan hidayah-Nya dalam menjalani perkuliahan sampai akhirnya saya mampu menyelesaikan skripsi ini.
2. Ayahanda Agus Arifin dan Ibunda Retno Sri Prastiwi tercinta yang telah memberikan doa, dukungan, pengorbanan, dan kasih sayang yang tak terhingga.
3. Kakakku tersayang Asri Wulandari, Guritna Adi Nugraha, dan Budi Setiyawan yang selalu memberikan semangat dan doa dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S. Farm., Apt., M. Farm. dan Bapak Dian Agung Pangaribowo, S. Farm., Apt., M. Farm. yang telah dengan sabar membimbing, memberikan saran dan bantuan dalam pengerjaan skripsi hingga terselesaikanya skripsi ini.
5. Sahabat-sahabat terbaikku Estika, Icha, Fia, Mey, Rara, Lintang, Mbak Ika, Prisma serta teman-teman farmasi angkatan 2011.
6. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

Ilmu itu lebih baik daripada harta. Ilmu menjaga engkau dan engkau menjaga harta.

Ilmu itu penghukum (hakim) dan harta terhukum. Harta itu kurang apabila dibelanjakan tapi ilmu bertambah bila dibelanjakan.<sup>1</sup>

No thief, however skillful, can rob one of knowledge, and that is why knowledge is the best and safest treasure to acquire.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Ali bin Abi Thalib

<sup>2</sup> L.Frank Baum. 1998. *The Lost Princess of Oz*. United States: Books of Wonder.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Puspita Arum Wijayanti

NIM : 112210101025

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “*Uji Sitotoksisitas Dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf- 7*” adalah benar- benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 8 Juni 2015

Yang menyatakan,

Puspita Arum Wijayanti

NIM 112210101025

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Puspita Arum Wijayanti**

**NIM 112210101025**

Pembimbing:

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

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



**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “*Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin, 8 Juni 2015

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

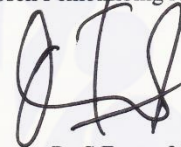
Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



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

NIP. 198102012006042001

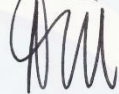


Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP. 198410082008121004

Tim Penguji

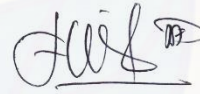
Penguji I,



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

NIP. 197604142002122001

Penguji II,



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

NIP. 198204152006042002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

NIP. 197604142002122001

**RINGKASAN**

**Uji Sitotoksitas Dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf- 7** ; Puspita Arum Wijayanti; 112210101025; 2015; 48 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Senyawa 1-(4-trifluorometil benzoiloksimetil)-5-fluorourasil atau TFU merupakan salah satu agen antikanker turunan dari senyawa 5- Fluorourasil. TFU disintesis berdasarkan hasil pendekatan HKSA yaitu dengan menambahkan alkil, benzen, ester serta gugus CF<sub>3</sub> pada posisi N-1 dari senyawa induk 5-Fluorourasil oleh Ernawati (2013). Penambahan substituen tersebut akan meningkatkan lipofilitas serta keserasian senyawa TFU dengan reseptor sehingga diperkirakan aktivitasnya meningkat. Namun pengujian terhadap efek sitotoksik dan proliferasinya belum dilakukan.

Pada penelitian ini, senyawa TFU diuji aktivitas sitotoksik serta efek penghambatan proliferasi dengan menggunakan sel kanker payudara MCF-7. Pengujian sitotoksik serta uji proliferasi pada sel MCF- 7 dilakukan sebagai uji aktivitas pendahuluan senyawa antikanker. Sel MCF-7 dipilih karena sel ini mengekspresikan p53 *wild type* sehingga sensitif terhadap agen antikanker (Crawford dan Bowen, 2002; Alkhalaf *et al.*, 2002).

Penelitian ini diawali dengan melakukan sintesis senyawa TFU sesuai dengan prosedur yang telah dilakukan oleh Ernawati (2013). Senyawa hasil sintesis kemudian dimurnikan dengan kromatografi kolom, uji kemurnian dengan KLT,



pengujian jarak lebur dan dilakukan karakterisasi senyawa dengan FTIR KBr. Hasil sintesis pada penelitian ini terbukti sama dengan hasil sintesis oleh Ernawati (2013).

Pengujian sitotoksik dan proliferasi dilakukan dengan metode yang sama yaitu metode MTT menggunakan pereaksi *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide*. Hasil uji sitotoksik merupakan  $IC_{50}$  yang kemudian digunakan untuk menentukan konsentrasi uji proliferasi atau *doubling time*. Pengujian sitotoksik maupun *doubling time* dilakukan pada senyawa TFU dan 5-FU sebagai kontrol positif.

Hasil uji sitotoksik senyawa TFU diperoleh hasil  $IC_{50}$  sebesar  $401,03 \pm 0,370$   $\mu$ M sementara senyawa 5-FU memiliki  $IC_{50}$  sebesar  $4216,32 \pm 800,28$   $\mu$ M. Dari 3 kali replikasi yang diperoleh kemudian dilakukan uji t tidak berpasangan dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat perbedaan bermakna antara kedua senyawa menggunakan *software* SPSS ver 18.0. Berdasarkan hasil uji t diketahui bahwa 5-FU dan TFU memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai  $\alpha$  (sig) sebesar 0,014. Dengan demikian dapat dilihat bahwa TFU mempunyai aktivitas sitotoksik lebih tinggi dibandingkan dengan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Hasil uji proliferasi diperoleh nilai *doubling time* TFU yang lebih besar dibandingkan senyawa 5-FU. Hal ini menunjukkan bahwa TFU mampu menghambat waktu proliferasi sel MCF-7 lebih lama dari 5-FU. TFU dengan konsentrasi uji  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , dan  $1 \frac{1}{2} IC_{50}$  memiliki nilai *doubling time* berturut-turut 359.66; 364.39; 448.40 jam sedangkan 5-FU memiliki nilai *doubling time* berturut-turut 184.45; 214,00; 220,63 jam. Waktu yang diperlukan sel MCF-7 untuk berproliferasi adalah selama  $\pm 24$  jam (Sutherland *et al.*, 1983). Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa TFU mampu memperpanjang waktu proliferasi sel MCF-7 lebih lama dua kali lipat dari senyawa 5-FU.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Uji Sitotoksitas Dan Proliferasi Senyawa 1-(4-Trifluorometilbenzooiloksimetil)-5-Fluorourasil Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf- 7*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan fasilitas berbagai pihak, maka dengan terselesaikannya skripsi ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari., S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Ayik Rosita P., S.Farm., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah dengan sabar membimbing dan mengarahkan penulis selama penyelesaian skripsi;
3. Ibu Lestyo Wulandari., S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Fifteen Aprila Fajrin., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II yang telah banyak memberikan masukan untuk perbaikan skripsi ini;
4. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan serta pengalaman yang berguna dalam menyelesaikan skripsi;

5. Mbak Hani serta Ibu Wayan selaku teknisi di Laboratorium Kimia Farmasi atas semua bantuan selama pengerjaan skripsi;
6. Ibu Suprihatin selaku teknisi di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada atas bantuan dan bimbingan selama penulis mengerjakan penelitian ini;
7. Ayah, Ibu, dan ketiga kakaku yang telah memberikan perhatian, kasih sayang serta dukungan moral dan doa selama ini;
8. Segenap keluarga tercinta yang selalu memberikan motivasi dan doa kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
9. Teman- teman seperjuangan : Meyladia, Eka, Awalia, dan Nurhidayati yang selalu memberikan bantuan dan motivasi selama kebersamaan kita dalam melakukan penelitian;
10. Sahabat- sahabatku (Prisma, Estika, Rara, Lintang, Meyladia, Icha, Ika, Alifia, Fitria, Tiwi, Yeni, Zuhro, Vita dan Habibi) yang selalu memberikan semangat kepada penulis selama penyelesaian skripsi;
11. Seluruh teman- teman ASMEF 2011 yang selalu memberikan motivasi;
12. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat

Jember, 8 Juni 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1    Latar Belakang.....	1
1.2    Rumusan Masalah .....	4
1.3    Tujuan Penelitian.....	4
1.4    Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1    Kanker .....	5
2.2    Kanker Payudara .....	5
2.3    Antikanker .....	6
2.4    5- Fluorourasil .....	8

2.5	1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-FU atau TFU.....	11
2.6	Galur Sel MCF-7 .....	14
2.7	Uji Sitotoksitas.....	15
2.8	Uji <i>Doubling Time</i> .....	16
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>		<b>17</b>
3.1	Jenis Penelitian .....	17
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian .....	17
3.2.1	Tempat Penelitian .....	17
3.2.2	Waktu Penelitian.....	17
3.3	Rancangan Penelitian .....	18
3.4	Variabel Penelitian .....	19
3.4.1	Variabel Bebas.....	19
3.4.2	Variabel Terikat.....	20
3.4.3	Variabel Terkendali .....	20
3.5	Definisi Operasional Variabel .....	20
3.6	Alat dan Bahan yang Digunakan.....	20
3.6.1	Alat .....	20
3.6.2	Bahan .....	21
3.7	Prosedur Penelitian.....	22
3.7.1	Sintesis Senyawa TFU.....	22
3.7.2	Preparasi Larutan Senyawa TFU.....	23
3.7.3	Uji Sitotoksitas Metode MTT .....	23
3.7.4	Uji Proliferasi Sel ( <i>Doubling Time</i> ).....	24
3.8	Analisis Data .....	25
3.8.1	Uji Sitotoksitas.....	25
3.8.2	Uji <i>Doubling Time</i> .....	26
3.9	Skema Penelitian .....	27
3.9.1	Alur Penelitian Aktivitas TFU terhadap Sel MCF-7 .....	27



3.9.2	Preparasi Larutan Sampel .....	27
3.9.3	Uji Sitotoksitas .....	28
3.9.4	Uji <i>Doubling Time</i> .....	29
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
4.1	Sintesis dan Pemurnian Senyawa TFU .....	31
4.2	Uji Kemurnian Senyawa TFU .....	32
4.3	Identifikasi Struktur Senyawa TFU .....	34
4.4	Uji Sitotoksik .....	37
4.5	Uji Proliferasi Sel ( <i>Doubling Time</i> ) .....	39
<b>BAB 5</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>43</b>
5.1	Kesimpulan .....	43
5.2.	Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>44</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>49</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Karakteristik FTIR .....	14
Tabel 2.2 Karakteristik Spektra Senyawa TFU dengan H-NMR 500 Mhz .....	14
Tabel 4.1 Hasil Uji Kemurnian dengan Metode KLT.....	32
Tabel 4.2 Hasil Uji <i>Purity</i> dengan Eluen Heksan: Aseton (6:4).....	33
Tabel 4.3 Hasil Uji Jarak Lebur Kristal Produk Sintesis Senyawa TFU .....	34
Tabel 4.4 Perbandingan Interpretasi Spektra IR Produk Hasil Percobaan dengan Literatur Dan Hasil Sintesis Ernawati (2013).....	36
Tabel 4.5 Rata- rata Nilai IC <sub>50</sub> TFU dan Senyawa 5-FU .....	38
Tabel 4.6 Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa TFU dan 5-FU Terhadap Sel MCF-7.....	40

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur 5-FU .....	9
Gambar 2.2 Mekanisme Kerja 5-FU .....	10
Gambar 2.3 Mekanisme 5-FU dalam Penghambatan Timidilat Sintase .....	11
Gambar 2.4 Struktur Senyawa TFU .....	12
Gambar 2.5 Spektra FTIR Senyawa TFU .....	13
Gambar 2.6 Spektra H-NMR Senyawa TFU dengan H-NMR 500 Hz .....	13
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian Uji Sitotoksik Dan Uji Proliferasi Senyawa TFU Terhadap Sel Kanker Payudara MCF- 7 .....	18
Gambar 3.2 Alur Penelitian Aktivitas Senyawa TFU terhadap Sel MCF-7 .....	27
Gambar 3.3 Skema Alur Preparasi Larutan Sampel Dan Pembanding .....	27
Gambar 3.4 Skema Alur Uji Sitotoksik Senyawa TFU .....	28
Gambar 3.5 Skema Alur Pengujian <i>Doubling Time</i> .....	29
Gambar 4.1 Hasil Eluasi Seluruh Vial Setelah Pemurnian Kromatografi Kolom ...	31
Gambar 4.2 Perbandingan Spektra antara Hasil Sintesis Kali Ini dengan Hasil Sintesis Ernawati, (2013) .....	33
Gambar 4.3 Spektra IR senyawa TFU .....	35
Gambar 4.4 Spektra IR Senyawa TFU Hasil Sintesis Ernawati, (2013) .....	36
Gambar 4.5 Kurva Kinetika Proliferasi Sel MCF-7 dengan Perlakuan TFU dan 5-FU .....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>A. Hasil KLT Densitometri .....</b>	<b>49</b>
A.1 Gambar Lempeng KLT Campuran Vial 12-16 pada 3 Eluen .....	49
A.2 Gambar Lempeng KLT Fraksi 12-16 pada Eluen Heksan: aseton (6:4) ...	49
A.3 Gambar Kromatogram Fraksi 12-16 pada Eluen Heksan: aseton (6:4) .....	50
A.4 Gambar Kromatogram Campuran Vial 12-16 pada Eluen Heksan: aseton (6:4).....	50
<b>B. Perhitungan Bahan Uji Sitotoksik .....</b>	<b>51</b>
B.1 Preparasi Lartan Senyawa 5-FU .....	51
B.2 Preparasi Larutan Senyawa TFU .....	51
B.3 Pembuatan Media Komplit 100 ml.....	52
B.4 Pembuatan Larutan MTT .....	53
<b>C. Hasil Uji Sitotoksik .....</b>	<b>53</b>
C.1 Perhitungan Hasil Uji Sitotoksik Senyawa 5-FU.....	53
C.2 Perhitungan Hasil Uji Sitotoksik Senyawa TFU .....	56
C.3 Rata- rata Nilai IC <sub>50</sub> Senyawa 5-FU dan TFU .....	60
<b>D. Hasil Analisis Probit .....</b>	<b>61</b>
D.1 Hasil Analisis Probit Senyawa 5-FU .....	61
D.2 Hasil Analisis Probit Senyawa TFU .....	64
<b>E. Hasil Uji t Tidak Berpasangan.....</b>	<b>67</b>
<b>F. Preparasi Uji <i>Doubling Time</i> .....</b>	<b>68</b>
F.1 Preparasi Larutan Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU .....	68
F.2 Preparasi Larutan Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa TFU .....	68
<b>G. Perhitungan Hasil Uji <i>Doubling Time</i> .....</b>	<b>69</b>
G.1 Perhitungan Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU.....	69

G.2	Perhitungan Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa TFU.....	71
<b>H.</b>	<b>Grafik Uji <i>Doubling Time</i>.....</b>	<b>73</b>
H.1	Grafik Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU .....	73
H.2	Grafik Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa TFU.....	75
<b>I.</b>	<b>Foto Sel MCF-7 .....</b>	<b>77</b>
I.1	Sel MCF-7 Setelah Perlakuan TFU .....	77
I.2	Sel MCF-7 Setelah Perlakuan TFU dan MTT .....	78
I.3	Bentuk Kristal Formazan di dalam Sel Hidup .....	78

## BAB 1. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kanker merupakan suatu istilah yang digunakan untuk sekelompok penyakit yang ditandai dengan hilangnya kontrol terhadap pertumbuhan, pembelahan, dan penyebaran sejumlah sel, memicu terbentuknya tumor yang menyerang dan merusak jaringan di sekitarnya (Avendaño and Menéndez, 2008).

Menurut data WHO tahun 2013, insiden kanker meningkat dari 12,7 juta kasus pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta kasus pada tahun 2012. Jumlah kematian meningkat dari 7,6 juta orang tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012 (IARC, 2013). Kanker menjadi penyebab kematian nomor 2 di dunia sebesar 13% setelah penyakit kardiovaskular. Pada 2030 diperkirakan insiden kanker dapat mencapai 26 juta orang dan 17 juta diantaranya meninggal akibat kanker, terlebih untuk negara miskin dan berkembang kejadiannya akan lebih cepat. Berdasarkan data statistik yang dikeluarkan WHO pada tahun 2013, jenis kanker yang paling sering terjadi adalah kanker paru- paru, payudara, dan kolorektal. WHO juga menekankan bahwa kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita yang menderita kanker. Pada tahun 2012 terjadi peningkatan jumlah penderita kanker payudara sebesar 20%, sementara jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker payudara meningkat sebesar 14% dibandingkan tahun 2008 (IARC, 2013). Di Indonesia, kematian akibat penyakit kanker payudara sebesar 21,4 % pada tahun 2012 (WHO, 2014).

Salah satu penanganan penyakit kanker payudara adalah dengan melakukan kemoterapi. Kemoterapi pada pasien kanker payudara stadium awal terbukti dapat memperpanjang lama hidup pasien sebesar 15 tahun lebih lama dari perkiraan



(EBCTCG, 2005). Pada kanker payudara stadium II kombinasi kemoterapi juga sangat bermanfaat. Menurut data statistik di negara maju, 17% pasien kanker sembuh dengan kemoterapi. Bila ditambah dengan pembedahan dini, 50% pasien kanker dapat disembuhkan (Gunawan *et al.*, 2009).

Ketepatan dalam pemilihan agen kemoterapi akan memberikan peningkatan efektivitas dalam kemoterapi. Agen kemoterapi yang ideal diharapkan bisa memberantas sel-sel kanker tanpa merusak jaringan-jaringan normal. Namun, saat ini dari berbagai macam agen kemoterapi yang ada, efektivitasnya masih belum maksimal dalam mengobati kanker terutama kanker payudara. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan senyawa obat baru yang memiliki aktivitas antikanker yang lebih tinggi tetapi memiliki toksisitas lebih rendah serta bersifat lebih selektif untuk menangani penyakit kanker. Salah satu metode dalam pengembangan senyawa obat baru tersebut adalah dengan mengacu pada hubungan kuantitatif struktur-aktivitas (HKSA). Pengembangan senyawa obat baru dengan pendekatan HKSA memiliki beberapa keuntungan diantaranya adalah dapat menghemat biaya penelitian karena dapat mengurangi *trial and error* selama pengembangan untuk mendapatkan senyawa obat baru dengan aktivitas yang lebih poten (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Salah satu pengembangan senyawa antikanker baru adalah pengembangan turunan 5-Fluorourasil atau 5-FU. 5-FU hingga saat menjadi salah satu *first line* dalam kemoterapi penyakit kanker payudara invasif ataupun non invasive. 5-FU kerap dikombinasikan dalam penggunaannya contohnya FAC (5-Fluorourasil, Doksorubisin, dan Siklospamid) (MD Anderson Cancer Center, 2013).

Pada penelitian sebelumnya, Ernawati (2013) telah berhasil mensintesis senyawa 1-(4-trifluorometil benzoiloksimetil)-5-fluorourasil atau TFU dengan bantuan pendekatan HKSA terhadap senyawa induk 5-FU. 5-FU merupakan antimetabolit yang hingga saat ini secara luas masih digunakan sebagai obat antikanker. Obat ini memiliki peranan penting dalam pengobatan kanker kolorektal, payudara, ovarium, pankreas, dan lambung (Avendano and Menendez, 2008; Tian *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).



Senyawa TFU merupakan modifikasi obat antikanker 5-FU. Modifikasi dilakukan dengan substitusi alkil, benzena, ester, dan  $\text{CF}_3$  pada posisi N-1 sehingga menghasilkan senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil. Berdasarkan pendekatan HKSA, penambahan gugus alkil dan benzen dapat meningkatkan parameter lipofilik yang memudahkan penembusan membran sehingga meningkatkan pengikatan obat pada reseptornya. Peningkatan tersebut dapat meningkatkan aktivitas antikanker senyawa TFU. Atom  $\text{CF}_3$  dan ester merupakan parameter elektronik yang berpengaruh dalam keserasian interaksi dengan reseptor sehingga juga akan meningkatkan aktivitas antikankernya. Substitusi pada posisi N1 akan meningkatkan halangan sterik. Halangan sterik merupakan perisai yang dapat menstabilkan ikatan antara obat dan meningkatkan aktivitasnya. Atom  $\text{CF}_3$  memiliki nilai tetapan substituen Hansch-Fujita ( $\pi$ ) dan nilai tetapan elektronik Hammet ( $\sigma$ ) yang positif sehingga akan meningkatkan sifat lipofilik dan elektronik. Peningkatan sifat lipofilik dan elektronik juga akan meningkatkan aktivitas antikanker senyawa tersebut (Siswandono dan Soekardjo, 2000; Tian *et al.*, 2007).

Berdasarkan analisis HKSA di atas, senyawa TFU diperkirakan memiliki aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan 5-FU. Namun, pengujian terhadap aktivitas antikanker senyawa tersebut belum dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas sitotoksik dan uji proliferasi senyawa TFU terhadap sel kanker payudara (MCF-7). Pengujian sitotoksik serta uji proliferasi (Uji *Doubling time*) pada sel MCF-7 dilakukan sebagai uji aktivitas pendahuluan senyawa antikanker. Sel kanker payudara yang digunakan adalah sel MCF-7 karena sel ini mengekspresikan p53 *wild type* sehingga sensitif terhadap agen antikanker (Crawford dan Bowen, 2002; Alkhalaf *et al.*, 2002). Uji sitotoksik yang dilakukan akan menghasilkan nilai  $\text{IC}_{50}$  dari senyawa TFU yang dapat menggambarkan aktivitas antikankernya.  $\text{IC}_{50}$  merupakan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat 50% populasi sel. Uji *Doubling time* akan menghasilkan nilai *Doubling time* yang dapat memberikan gambaran kemampuan senyawa TFU dalam menghambat penggandaan sel kanker MCF-7.

**B. Rumusan Masalah**

Dari uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana  $IC_{50}$  senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dibandingkan dengan  $IC_{50}$  senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7?
2. Bagaimana efek senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dibandingkan senyawa 5-FU terhadap proliferasi sel kanker MCF-7?

**C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui  $IC_{50}$  senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dibandingkan dengan  $IC_{50}$  senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Mengetahui efek senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dibandingkan efek senyawa 5-FU terhadap proliferasi sel kanker payudara MCF-7.

**D. Manfaat Penelitian**

Diharapkan dengan melakukan uji sitotoksik serta uji proliferasi dapat diperoleh hasil uji pendahuluan terhadap aktivitas senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil pada sel kanker payudara MCF-7 dalam rangka menemukan senyawa obat baru dengan aktivitas antikanker yang lebih poten.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kanker

Kanker ialah suatu penyakit sel yang memiliki ciri- ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler. Sel kanker mengganggu tuan rumah karena menyebabkan desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran jaringan tempat tumor berkembang, dan gangguan sistemik lain akibat dari pertumbuhan sel kanker (Gunawan *et al.*,2009). Sel kanker memiliki kemampuan untuk berproliferasi berulang kali dan mampu bermigrasi ke berbagai tempat dalam tubuh dan menempati berbagai macam organ atau metastasis. Sel tumor yang mampu membentuk koloni tersendiri atau bersifat *clonogenic* memiliki ciri- ciri kromosom yang abnormal sehingga mampu bertahan hidup pada lingkungan inang multiselulernya. Sifat invasive, metastasis dan juga abnormalitas metabolit yang dimiliki oleh sel tumor dapat menyebabkan penyakit kanker bahkan berujung pada kematian kecuali sel tersebut dapat dieradikasi dengan terapi pengobatan (Katzung *et al.*, 2012)

### 2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara adalah tumor ganas yang menyerang jaringan payudara yang berasal dari kelenjar, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara. Kanker payudara terjadi karena hilangnya kontrol atas proliferasi sel dan apoptosis sehingga sel berproliferasi terus menerus tanpa ada batas kematian. Hilangnya fungsi apoptosis menyebabkan ketidakmampuan mendeteksi kerusakan sel akibat kerusakan DNA. Apabila terjadi mutasi p53 maka fungsi sebagai pendeteksi kerusakan

DNA menjadi hilang, sehingga sel-sel abnormal berproliferasi terus menerus (Nugrahaningsih, 2004).

### 2.3 Antikanker

Obat antikanker ialah senyawa kemoterapetik yang ditujukan untuk pengobatan kanker. Obat antikanker sering disebut juga sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau antineoplasma. Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif yaitu menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Sebagian besar antikanker menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas, karena menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat misalnya sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna, folikel rambut dan jaringan limfosit. Terapi kanker dapat dikatakan berhasil baik jika dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Ditinjau dari siklus sel, obat antikanker dapat digolongkan ke dalam 2 golongan yaitu *cell-cycle specific* (CCS) dan *cell-cycle non specific* (CCNS).

#### a. CCS

Zat CCS merupakan zat yang bersifat toksisitas selektif terhadap fase-fase tertentu dari siklus sel, misalnya vinkristin, vinblastin, merkaptopurin, hidroksiurea, metrotreksat dan asparaginase. Zat CSS terbukti efektif terhadap kanker yang berproliferasi cepat misalnya kanker sel darah (Gunawan *et al.*, 2009).

#### b. CCNS

Zat CCNS merupakan zat yang tidak bersifat toksisitas selektif terhadap fase-fase dari siklus sel, misalnya zat alkilator, antibiotik antikanker, sisplatin, prokarbazin, dan nitrosourea. Banyak zat yang tergolong CCNS tapi lebih efektif terhadap sel yang berproliferasi dan terhadap sel-sel yang sedang dalam fase siklus tertentu (Gunawan *et al.*, 2009).



Antikanker dikelompokkan menjadi beberapa golongan berdasarkan mekanisme kerjanya. Beberapa golongan antikanker tersebut antara lain alkilator, antimetabolit, produk alamiah, hormon dan antagonis, serta golongan lain lain (Gunawan *et al.*, 2009)

#### 1. Alkilator

Sejumlah senyawa mempunyai mekanisme yang menunjukkan terjadinya alkilasi. Obat-obat tersebut adalah prokarbazin, dekarbazin, altretamin (heksametilmelamin), dan sisplatin (Katzung *et al.*, 2012). Berbagai alkilator menunjukkan persamaan cara kerja yaitu melalui pembentukan ion karbonium (alkil) atau kompleks lain yang sangat reaktif. Gugus alkil ini kemudian berikatan secara kovalen dengan berbagai nukleofilik penting dalam tubuh misalnya fosfat, amino, sulfhidril, hidroksil, karboksil atau gugus imidazol. Efek sitotoksik maupun efek sampingnya berhubungan langsung dengan terjadinya alkilasi DNA ini (Gunawan *et al.*, 2012).

#### 2. 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. Contohnya adalah 5-FU (Gunawan *et al.*, 2012).

Jalur biokimia yang paling mudah dipengaruhi antimetabolit adalah sintesis nukleotid dan asam nukleat. Dalam beberapa hal, jika suatu enzim diketahui mempunyai efek utama pada jalur replikasi sel, hambatan pada reaksi yang dikataliskan terbukti merupakan obat antikanker (Katzung *et al.*, 2012).

#### 3. Produk alamiah

Berbagai obat yang berasal dari alam (tumbuhan dan hewan) digunakan sebagai antikanker, antara lain alkaloid vinka, taksan, epipodofilotoksin, dan kamptotesin. Sebagai contoh, alkaloid vinka (vinkristin

dan vinblastin) berikatan secara spesifik dengan tubulin, komponen protein mikrotubulus, spindle mitotik, dan memblok polimerisasinya. Akibatnya terjadi disolusi mikrotubulus, sehingga sel terhenti dalam metafase (Gunawan *et al*, 2012).

#### 4. Antibiotik

Penapisan produk mikrobial telah memberikan penemuan sejumlah inhibitor pertumbuhan yang ternyata dapat digunakan dalam kemoterapi kanker. Banyak diantara antibiotik ini terikat pada DNA secara interkalasi antara basa spesifik dan menghambat sintesis RNA atau DNA baru (atau keduanya), menyebabkan rantai DNA terputus dan mengganggu replikasi sel. Obat-obat antibiotik yang ada sekarang merupakan hasil dari berbagai jamur tanah *Streptomyces*, termasuk diantaranya antrasiklin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin, dan plikamisin (Katzung *et al.*, 2012)

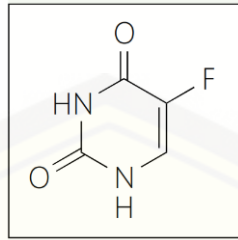
#### 5. Hormon dan antagonis

Berbagai hormon steroid digunakan pada pengobatan kanker. Antara lain kortikosteroid (prednisone, deksametason), hormon progestin (hidroksi progesterone kaproat, medroksiprogesteron asetat), estrogen (megestrol asetat, dietilstilbestrol, etinil estradiol), dan androgen (testosterone propionat, fluoksimesteron). Hormon-hormon tersebut biasanya digunakan untuk tumor endometrium, payudara, prostat, dan limfoma (Gunawan *et al*, 2012).

### 2.4 5- Fluorourasil

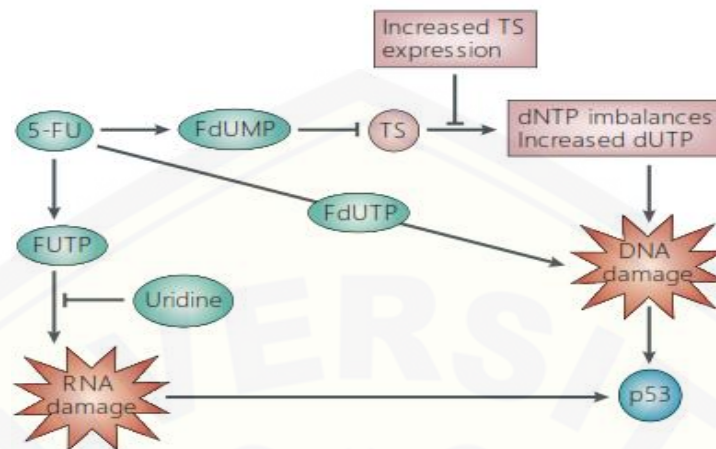
5- Fluorourasil atau 5-FU adalah analog dari urasil dengan substitusi atom fluoro pada posisi C-5 seperti pada Gambar 2.1. Senyawa ini merupakan golongan antimetabolit dan telah digunakan secara luas dalam terapi berbagai penyakit kanker, terutama kanker kolorektal dan kanker payudara (Sun *et al.*, 2013) .





Gambar 2.4. Struktur 5-FU (Sumber:Longley *et al.*, 2003)

5-FU masuk ke dalam sel secara cepat melalui mekanisme transpor terfasilitasi yang sama dengan urasil. Mekanisme kerja dari senyawa 5-FU adalah sebagai antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim timidilat sintase (TS) (Gambar 2.2.). 5-FU akan diubah secara intraseluler menjadi 3 metabolit aktif utama yaitu fluorouridin trifosfat (FUTP), fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), dan fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP). Metabolit aktif tersebut akan mengganggu sintesis RNA dan kerja timidilat sintase (TS). Enzim yang dapat membatasi kerja 5-FU adalah dihidropirimidin dehidrogenase (DPD) yang akan mengubah 5-FU menjadi dihidrofluorourasil (DHFU) (Longley *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2014). Mekanisme antikanker dari 5-FU terutama melalui penghambatan TS. TS merupakan enzim yang mengkatalisis biosintesis timidilat yang terlibat dalam pengaturan sintesis protein dan proses apoptosis (Sun *et al.*, 2013). TS mengkatalisis metilasi deoksiuridin monofosfat (dUMP) menjadi deoksitimidin monofosfat (dTMP) dengan senyawa 5,10-metilentetrahidrofolat (CH<sub>2</sub>THF) sebagai donor metil dan selanjutnya berperan dalam reaksi timidilat untuk menjaga replikasi dan perbaikan DNA (Zhang *et al.*, 2008).

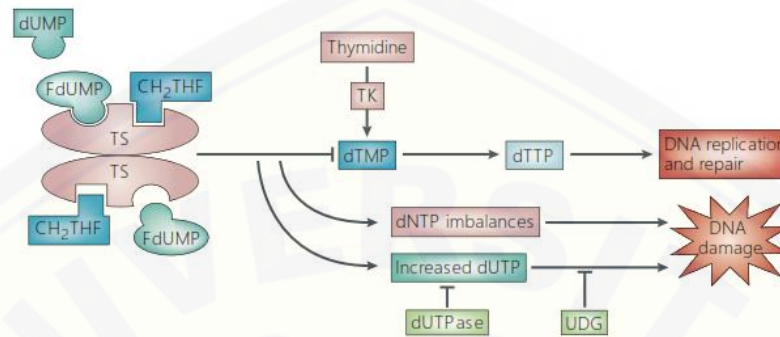


Gambar 2.2 Mekanisme Kerja 5-FU (Sumber: Longley *et al.*, 2003)

Fungsi dari protein TS adalah sebagai dimer yaitu subunit yang mengandung daerah pengikatan nukleotida dan daerah pengikatan  $\text{CH}_2\text{THF}$ . Metabolit 5-FU yaitu FdUMP kemudian akan berikatan pada daerah pengikatan nukleotida pada TS membentuk kompleks yang stabil dengan enzim dan  $\text{CH}_2\text{THF}$  sehingga akan menghalangi pengikatan substrat normal yaitu dUMP dan menghambat sintesis dTMP (Gambar 2.3). Terjadinya penurunan dTMP akan menyebabkan penurunan deoksitimidin trifosfat (dTTP), sehingga kadar deoksinukleotid yang lain (dATP, dGTP, dan dCTP) menjadi terganggu atau terjadi ketidakseimbangan. Ketidakseimbangan nukleotid tersebut (rasio dATP/dTTP) akan menyebabkan gangguan pada sintesis dan perbaikan DNA. Selain itu, penghambatan TS akan menyebabkan akumulasi dari dUMP sehingga akan memicu peningkatan kadar dUTP. dUTP dan metabolit 5-Fu lainnya yaitu FdUTP dapat bergabung dengan DNA yang dapat menyebabkan pemutusan rantai DNA dan kematian sel. Perbaikan kerusakan DNA oleh enzim urasil-DNA-glikosilase (UDG) tidak akan berguna ketika rasio antara FdUTP/dTTP tinggi (Longley *et al.*, 2003; Malet-Martino and Martino, 2002)

Mekanisme lain dari senyawa 5-FU sebagai antikanker adalah melalui Penggabungan dengan RNA dan DNA. 5-FU sebagai analog pirimidin dapat

bergabung pada RNA dan DNA pada tempat urasil atau timin. Sehingga biosintesis dan fungsi normal asam nukleat terganggu (Zhang *et al.*, 2008)



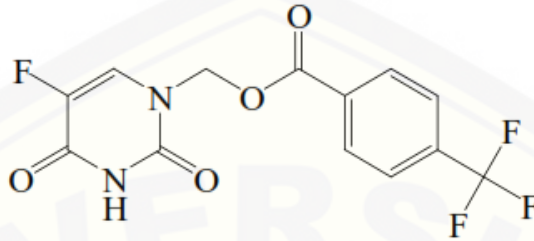
Gambar 2.3 Mekanisme kerja 5-FU dalam penghambatan TS (Sumber: Longley *et al.*, 2003)

Berdasarkan Gambar 2.3. Dengan mekanisme yang sama, transformasi dari 5-FUDP yang merupakan metabolit dari 5-FU dan diubah menjadi trifosfat memungkinkan *misincorporation* dari fluoronukleotida menjadi RNA, sehingga menyebabkan efek besar pada metabolisme dan kelangsungan hidup sel. Baik penghambatan TS maupun *misincorporation* dari metabolit 5-FU mengakibatkan DNA yang terbentuk berada dalam stabilisasi p53 yaitu penekan tumor yang mempertahankan integritas DNA dengan mengaktifkan gen yang menahan siklus sel sebagai respons terhadap kerusakan DNA atau memicu apoptosis (Avendano and Menendez, 2008). Kerusakan DNA akan memicu ekspresi gen p53 *wild type* dan kemudian p21. p53 merupakan gen penekan tumor untuk menjaga integritas DNA melalui aktivasi gen CDKN1A dan GADD45 $\alpha$  (gen respon kerusakan). Hal tersebut menyebabkan terjadinya *cycle arrest*. p53 dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi gen proapoptosis seperti FAS dan BAX dan akan menurunkan gen anti apoptosis seperti BCL2 (Daniel B. Longley *et al.*, 2003)

## 2.5 1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-FU atau TFU

Senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-FU atau TFU hasil sintesis pada penelitian sebelumnya memiliki karakteristik berbentuk kristal jarum berwarna

putih, rendemen rata-rata sebesar 4,444 %, log P sebesar 1,86 dan jarak lebur 172-174 °C (Ernawati, 2013). Struktur senyawa TFU dapat dilihat pada Gambar 2.4.

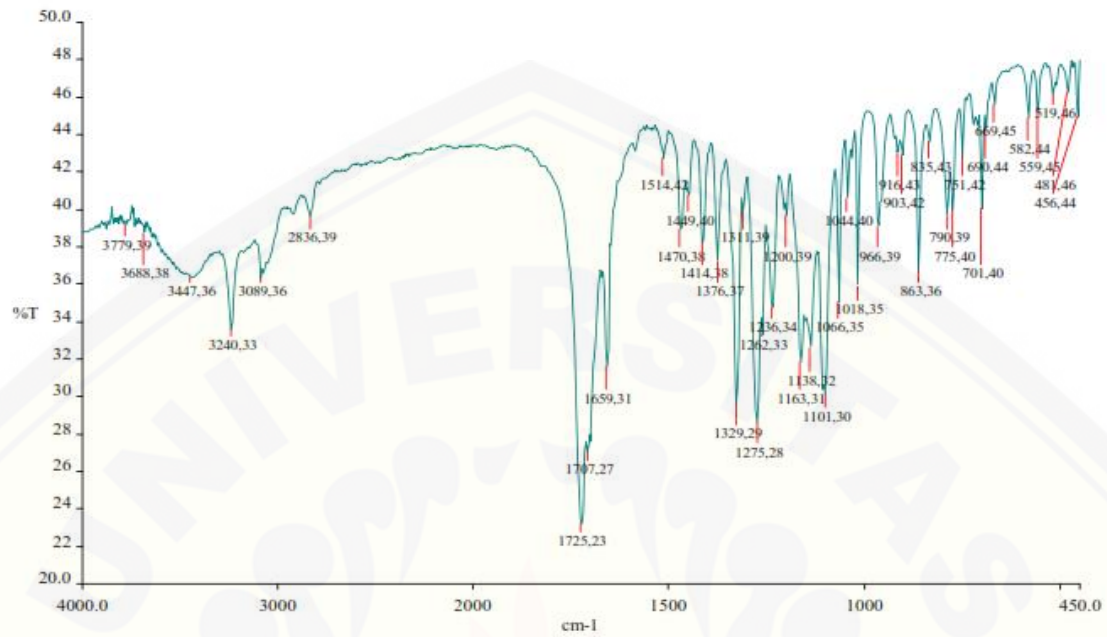


Gambar 2.4. Struktur senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-FU atau TFU (Sumber: Ernawati, 2013)

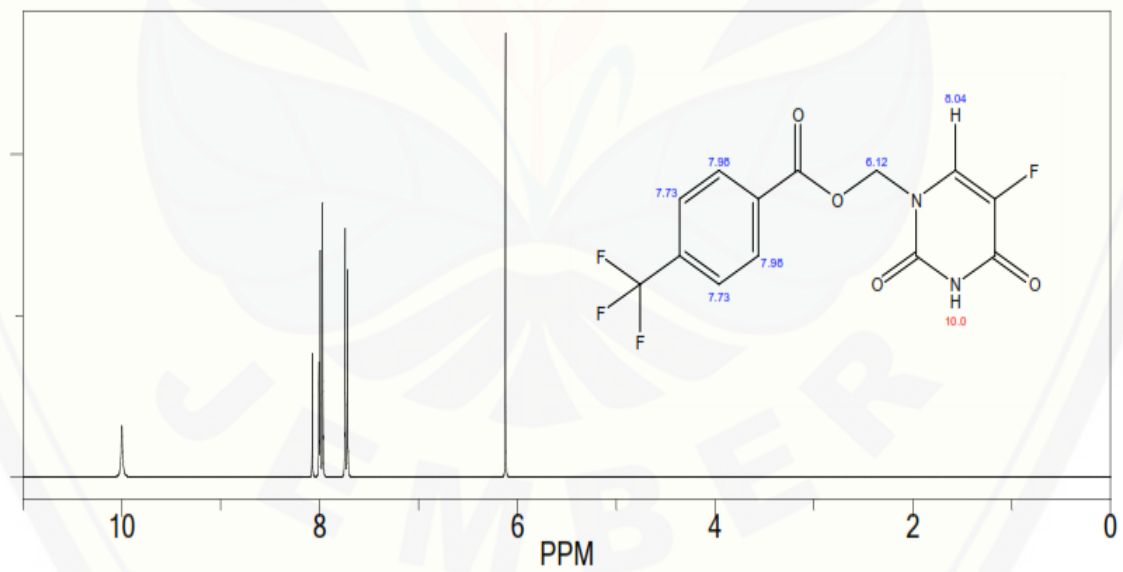
Senyawa TFU merupakan modifikasi obat antikanker 5-Fluorourasil (5-FU) dengan melakukan substitusi alkil, benzena, ester, dan  $\text{CF}_3$  pada posisi N-1 sehingga menghasilkan senyawa TFU. Berdasarkan pendekatan HKSA, gugus alkil dan benzena merupakan parameter lipofilik yang memudahkan penembusan membran sehingga meningkatkan pengikatan obat pada reseptornya sehingga aktivitas antikanker senyawa tersebut juga akan meningkat. Atom  $\text{CF}_3$  dan ester merupakan parameter elektronik yang berpengaruh dalam keserasian interaksi dengan reseptor sehingga juga akan meningkatkan aktivitas antikankernya. Substitusi pada posisi N1 akan meningkatkan halangan sterik. Halangan sterik merupakan perisai yang dapat menstabilkan ikatan antara obat dan meningkatkan aktivitasnya (Ernawati, 2013). Atom  $\text{CF}_3$  memiliki nilai tetapan substituen Hansch-Fujita ( $\pi$ ) dan nilai tetapan elektronik Hammet ( $\sigma$ ) yang positif. Nilai positif pada kedua parameter tersebut menyebabkan peningkatan sifat lipofilik dan elektronik. Dimana peningkatan sifat lipofilik dan elektronik akan meningkatkan aktivitas antikankernya (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Identifikasi produk hasil sintesis yang telah dilakukan oleh Ernawati (2013) dengan menggunakan  $^1\text{H-NMR}$  dan FTIR-KBr menunjukkan bahwa hasil sintesis mengandung senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-FU. Berikut ini merupakan hasil analisis FTIR dan H-NMR dari senyawa yang telah berhasil disintesis:





Gambar 2.5. Spektra FTIR senyawa TFU (Sumber: Ernawati, 2013)



Gambar 2.6. Spektra H-NMR senyawa TFU dengan H-NMR 500 MHz (Sumber: Ernawati, 2013)

Tabel 2.1 Karakteristik spektra FTIR (Sumber: Ernawati, 2013)

Tipe Vibrasi	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> )
N-H sekunder	3447,6
C-O ester	1275,28
C-F	1376,37
C=O ester terkonjugasi	1725,23
Cincin aromatis terdisubstitusi pada posisi para	835, 43
C=O	1659, 31
Antifluorida	1236, 34
Polifluoroalkana	1329,29

Tabel 2.2 Karakteristik spektra senyawa TFU dengan H-NMR 500 MHz (Sumber: Ernawati, 2013)

Proton	Pergeseran Kimia	Multiplisitas
H1(NH)	10,6676	Singlet
H2 (CH)	7,8957	Doublet
H3 (CH)	8,2420	Doublet
H4 (CH)	7,9112	Doublet
H5 (CH)	8,2576	Doublet
H6 & H7 (CH <sub>2</sub> )	6,0110	Singlet
H8 (H)	8,1097-8,1227	Doublet

## 2.6 Galur Sel MCF-7

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. Akronim dari MCF-7 yaitu *Michigan Cancer Foundation 7* (Dwitaharyani, 2012). Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara *in vitro* karena bentuknya terbaik dari



semua jenis sel kanker payudara manusia (Widowati dan Mudahar, 2009; Sinaga and Wiryanti, 2011).

Sel MCF-7 dipilih sebagai dalam penelitian ini karena merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan gen *p53 wild type* sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi (Crawford dan WD, 2002; Alkhalaf and El-Mowafy, 2003). Sel MCF-7 sangat baik dalam model *in vitro* untuk mempelajari mekanisme kemoresistensi yang berhubungan dengan kerentanan apoptosis (Meiyanto et al., 2008).

## 2.7 Uji Sitotoksitas

Salah satu metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan adalah dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT). Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Uji ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup (Meizarini, 2008).

*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) merupakan pereaksi dalam uji *colorimetric* untuk mengukur perubahan warna yang digunakan pada uji sitotoksik dan uji proliferasi sel suatu senyawa yang berpotensi menimbulkan toksisitas ataupun yang berpotensi sebagai senyawa obat. MTT berupa larutan berwarna kuning yang akan berubah menjadi formazan yang tidak larut. MTT akan direduksi oleh metabolisme aktif dari suatu sel sehingga berubah warna menjadi ungu formazan di mitokondria yang akan terakumulasi di dalam sel (Ahmadian *et al.*, 2009; Talupula, 2011). Laju reduksi MTT proporsional dengan laju proliferasi dari sel. Kemampuan sel untuk mereduksi MTT menjadi formazan menggambarkan aktivitas dan integritas dari mitokondria yang disimpulkan sebagai ukuran viabilitas atau jumlah sel yang hidup (Beena *et al.*, 2011)

## 2.8 Uji Doubling Time

*Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan diri menjadi dua kalinya. Waktu *doubling time* ditentukan dengan ekstrapolasi dari waktu vs log jumlah sel hidup. Uji *doubling time* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa uji untuk menghambat proliferasi sel. Senyawa yang mampu memperpanjang waktu *doubling time* menunjukkan kemampuan senyawa tersebut untuk menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme *cell cycle arrest*, *cell cycle delay* atau apoptosis. Uji *doubling time* dilakukan dengan menghitung jumlah sel hidup yang diberi perlakuan dengan senyawa uji dalam setiap satuan waktu (Meiyanto, 2008).

Pengujian *doubling time* ini juga dilakukan dengan metode MTT yaitu dengan prinsip perubahan warna reagen MTT dari warna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Perubahan tersebut kemudian diukur dengan *microplate reader* dan absorbansi yang diperoleh proporsional terhadap jumlah sel yang hidup (Beena *et al.*, 2011).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas sitotoksik dan proliferasi senyawa TFU sel kanker payudara (MCF-7) secara in vitro merupakan *eksperimental laboratories*.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

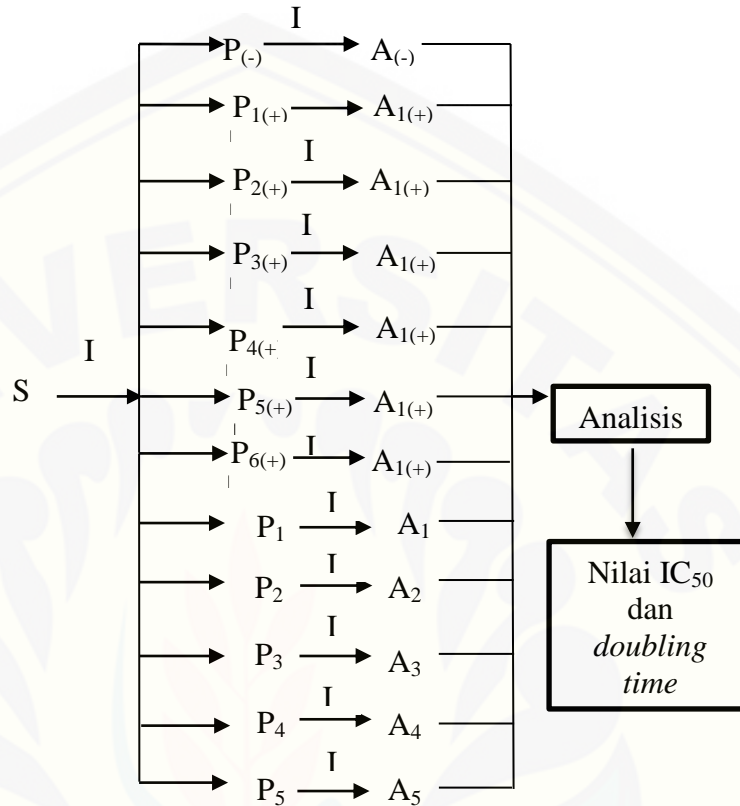
#### 3.2.1 Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk sintesis senyawa TFU.
- b. Laboratorium Kimia Universitas Airlangga untuk pemurnian senyawa produk dengan kromatografi kolom.
- c. Laboratorium Dasar Bersama (LDB) Universitas Airlangga untuk identifikasi struktur senyawa dengan FTIR.
- d. Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk uji kemurnian senyawa TFU dengan menggunakan Densitometer winCATS Camag.
- e. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk uji sitotoksik dan uji proliferasi.

#### 3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2014 sampai Maret 2015.

### 3.3 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian uji sitotoksik dan uji proliferasi senyawa TFU terhadap sel kanker payudara MCF- 7

Keterangan :

S : Kultur sel MCF-7

P<sub>(-)</sub> : Kontrol negatif berupa media kultur

P<sub>1(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 0,5  $\mu\text{M}$

P<sub>2(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 5  $\mu\text{M}$

P<sub>3(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 50  $\mu\text{M}$

P<sub>4(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 250  $\mu\text{M}$

P<sub>5(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 500  $\mu\text{M}$

P<sub>6(+)</sub> : Kontrol positif berupa senyawa 5-FU konsentrasi 5000  $\mu\text{M}$

P<sub>1</sub> : Perlakuan senyawa TFU konsentrasi 0,5  $\mu\text{M}$

- P<sub>2</sub> : Perlakuan senyawa TFU konsentrasi 5 µM  
P<sub>3</sub> : Perlakuan senyawa TFU konsentrasi 50 µM  
P<sub>4</sub> : Perlakuan senyawa TFU konsentrasi 250 µM  
P<sub>5</sub> : Perlakuan senyawa TFU konsentrasi 500 µM  
A<sub>(-)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol negatif  
A<sub>1(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 1  
A<sub>2(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 2  
A<sub>3(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 3  
A<sub>4(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 4  
A<sub>5(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 5  
A<sub>6(+)</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif 6  
A<sub>1</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 1  
A<sub>2</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 2  
A<sub>3</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 3  
A<sub>4</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 4  
A<sub>5</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 5  
I : Inkubasi

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi senyawa TFU yaitu 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.



### 3.4.2 Variabel Terikat

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

### 3.4.3 Variabel Terkendali

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

## 3.5 Definisi Operasional Variabel

Parameter yang digunakan dalam uji sitotoksitas adalah  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah konsentrasi senyawa TFU yang menyebabkan kematian 50% populasi sel (Meiyanto, 2008).  $IC_{50}$  senyawa TFU terhadap sel MCF-7 yang kemudian dibandingkan dengan  $IC_{50}$  senyawa 5-FU. Nilai  $IC_{50}$  dikatakan poten dengan konsentrasi  $<50\mu\text{M}$ . (Boik & Newman, 2008).

Uji *doubling time* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa uji untuk menghambat proliferasi sel. *Doubling time* dilakukan pada berbagai lama waktu inkubasi. Waktu *doubling time* ditentukan dengan ekstrapolasi dari waktu vs log jumlah sel hidup (Meiyanto, 2008).

## 3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan

### 3.6.1 Alat

- a. Alat untuk sintesis : *beaker glass* 50 mL dan 250 mL (Iwaki Pyrex) ; erlenmeyer 100 mL (Schoot Duran); *ball filler*; batang pengaduk; pipet tetes; pipet volume 1 mL, 4 mL dan 5 mL; gelas ukur 10 mL dan 50 mL (Iwaki Pyrex), vial, corong, *chamber*, 1 set alat refluks (kondensor dan labu alas

bulat leher dua Schoot Duran), corong pisah (Schoot Duran), mikropipet, (Blaubrand® IntraEnd), *stirer*, neraca analitik digital (Sartorius), FTIR KBr *Perkin Elmer-Spectrum One KBr-pa e-merck*, lampu Ultra Violet (UV), pengering, kamera digital, *Electrothermal melting point apparatus Stuart SMP11*, *scanner* Densitometer winCATS Camag dan perangkat komputer dengan program winCATS.

- b. Alat yang digunakan dalam uji sitotoksik dan *doubling time* : Inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Heraeus Kendro Laboratories, Germany), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm, Germany), mikropipet (VWR Brand), *microplate reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark*, Jepang), timbangan analitik (Sartorius), vortex (Thermolyne, Sybron), sentrifus (Universal 320 R Hettich), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), *microplate (96 well*, Iwaki, asahi glass co.,Japan), eppendorf, dan tabung pengencer.

### 3.6.2 Bahan

- a. Bahan untuk sintesis : 5-fluorourasil 99% (Merck), 4-Trifluorometil benzoilklorida (Merck) dan formaldehida 37% (s.a.p), aseton p.a (Merck), aquades, trietilamin (TEA), HCl (Sigma Aldrich), NaHCO<sub>3</sub>, Natrium Sulfat Anhidrat (s.a.p), heksan p.a (RDH), etil asetat p.a (J.T. Baker) dan lempeng KLT Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).
- b. Bahan untuk uji sitotoksik dan *doubling time* : Sel MCF-7 (Koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada), DMEM (Nacalay, Japan), FBS 10% (PAA), 5-Fluorourasil (5-FU) (Ebewe, dari PT. Ferron Par Pharmaceutical Cikarang, Indonesia), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, Aldrich, Germany), penicillin and streptomycin (Gibco),

Tripsin (Sigma), 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma).

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Sintesis Senyawa TFU

Pada penelitian ini, sintesis senyawa TFU dilakukan melalui dua tahap yaitu mereaksikan 5-FU dengan formaldehid untuk menghasilkan alkohol 1-hidroksimetil-5-fluorourasil (tahap 1) kemudian hasil reaksi tahap 1 direaksikan dengan 4-trifluorometilbenzoilklorida menghasilkan senyawa TFU (tahap 2). 5-Fu sebanyak 1,5 g (11,531 mmol) dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher dua kemudian ditambahkan 0,493 mL (17,819 mmol) formaldehida dan 11,531 mL aquadest. Campuran ini kemudian direfluks dalam *waterbath* dengan suhu dalam labu sebesar 60<sup>0</sup>C dan distirrer selama 6 jam. Setelah proses refluks selesai, hasil refluks diuapkan pada suhu kamar sampai terbentuk endapan kering 1-hidroksimetil-5-fluorourasil (Puspaningtyas, 2011; Tian *et al.*, 2007).

Tahap kedua, ditambahkan 1,846 mL trietilamin (TEA) pada hasil tahap 1 yang sudah dilarutkan dalam 230,62 mL aseton (larutan A) dan direaksikan dengan 1,8 g 4-(trifluorometil)benzoilklorida yang sudah dilarutkan dalam 92,248 mL aseton (larutan B). Reaksi dilakukan dengan memasukkan larutan B pada corong pisah sedangkan larutan A direndam dalam *ice bath*. Larutan B diteteskan melalui corong pisah setetes demi setetes ke dalam larutan A selama 30 menit hingga habis sambil larutan A distirrer (Puspaningtyas, 2011). Campuran tersebut distirrer dalam *ice bath* selama 11 jam.

Hasil stirer diuapkan pada lemari asam hingga pelarut habis, kemudian endapan yang terbentuk ditambah dengan 46,124 mL air dan 138,372 mL etil asetat sehingga terbentuk dua fase yaitu fase organik dan air. Kedua fase tersebut dicuci dengan 18,5 mL HCl pH 3-4 dan dipisahkan dengan corong pisah. Fase yang diambil adalah fase organik. Pencucian dengan HCl dilakukan sebanyak tiga

kali. Fase organik yang telah dicuci dengan HCl kemudian dicuci dengan 18,5 mL NaHCO<sub>3</sub> pH 7-8 dan dipisahkan dengan corong pisah. Fase yang diambil adalah fase organik. Pencucian dengan NaHCO<sub>3</sub> juga dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil pencucian dibebaskan dari air menggunakan natrium sulfat anhidrat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat). Fase organik yang dihasilkan diuapkan pada suhu lemari asam sampai pelarut habis (Puspaningtyas, 2011). Setelah terbentuk Kristal kemudian dimurnikan dengan metode kromatografi kolom dengan eluen heksan: aseton (6:4) dan hasil kolom tersebut kemudian diuji kemurniannya dengan KLT dan jarak lebur serta dilakukan karakterisasi senyawa dengan FTIR KBr (Ernawati, 2013).

### 3.7.2 Preparasi Larutan Senyawa TFU

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

Senyawa TFU ditimbang dengan neraca analitik sebanyak 0,66 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 40 µl dan ditambahkan PBS sampai 360 µl sehingga diperoleh larutan induk TFU dengan konsentrasi 5000 µM. Kemudian dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi larutan TFU sebesar 0,5, 5, 50, 250, 500 µM.

### 3.7.3 Uji Sitotoksisitas Metode MTT

Sel MCF-7 dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/100 µl MK dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 wellplate. Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media. Kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Diambil *plate* yang berisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, dibuang media sel (balikkan



*plate* 180°) secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Kemudian dimasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* dan tiriskan sisa cairan dengan tisu. Kemudian ditambahkan senyawa 5-FU dan senyawa TFU dengan konsentrasi sesuai dengan preparasi ke dalam sumuran (triplo), inkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam.

Setelah 24 jam ditambahkan reagen MTT 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Kemudian ditambahkan larutan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 µL. Bungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. *Plate* tersebut kemudian dibaca absorbansinya dengan *microplate reader*. Menghidupkan *microplate reader*, tunggu proses progressing hingga selesai. Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam *microplate reader*. Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan *microplate reader* pada λ 595 nm. Buat grafik absorbansi (setelah dikurangi kontrol media) vs konsentrasi. Hitung prosentase sel hidup dan analisis harga IC<sub>50</sub> dengan SPSS (Probit/Logit) (CCRC, 2009).

#### 3.7.4 Uji Proliferasi Sel (*Doubling Time*)

Sel MCF-7 sebanyak  $5 \times 10^3$  sel/100µl MK dimasukkan ke dalam sumuran pada 96 wellplate. Sisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media. Kemudian sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Diambil *plate* yang berisi sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, dibuang media sel (balikkan *plate* 180°) di atas tempat secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Kemudian dimasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik *plate* dan tiriskan sisa cairan dengan tisu. Kemudian ditambahkan senyawa 5-FU dan senyawa TFU dengan kadar  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, dan  $1 \frac{1}{2}$



IC<sub>50</sub> ke dalam sumuran (triplo) sebanyak 100µl, inkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24, 48, dan 72 jam. Sambil menunggu proses inkubasi, disiapkan reagen MTT dan ditambahkan reagen MTT 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Kemudian ditambahkan larutan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl sebanyak 100 µL. Bungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Menghidupkan *microplate reader*, tunggu proses progressing hingga selesai. Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Masukkan ke dalam *microplate reader* Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan *microplate reader* pada λ 595 nm. Setelah semua sumuran terbaca, tekan tombol STOP dan matikan *microplate reader*. Hitung viabilitas sel untuk masing-masing seri konsentrasi dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi. (CCRC, 2009).

### 3.8 Analisis Data

Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik dan proliferasi sel 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 Sitotoksisitas

% sel hidup yang diperoleh dari persamaan di atas kemudian digunakan untuk menghitung IC<sub>50</sub>. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan probit pada *software* SPSS versi 18.0 (CCRC, 2009). Kemudian dilakukan uji t tidak berpasangan dengan menggunakan program SPSS versi 18.0.

Syarat untuk melakukan uji t tidak berpasangan adalah melakukan uji normalitas. Uji normalitas Shapiro-Wilk dipilih untuk n < 50 dengan α > 0,05. Uji

t dilakukan untuk mengetahui perbedaan signifikan antara hasil dari perlakuan senyawa TFU dengan kontrol positif yaitu senyawa 5-FU. Data dinyatakan signifikan apabila nilai  $\alpha < 0,05$

### 3.8.2 Uji *Doubling Time*

Aktivitas antiproliferasi ditunjukkan melalui *doubling time* yang dinyatakan sebagai waktu yang menghambat penggandaan sel kanker (Meiyanto, 2008). Kemudian ditentukan persamaan garis dengan memplotkan antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. Selanjutnya dicari *doubling time* dengan rumus:

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

Keterangan :

Y = log 2 x jumlah sel hidup awal;

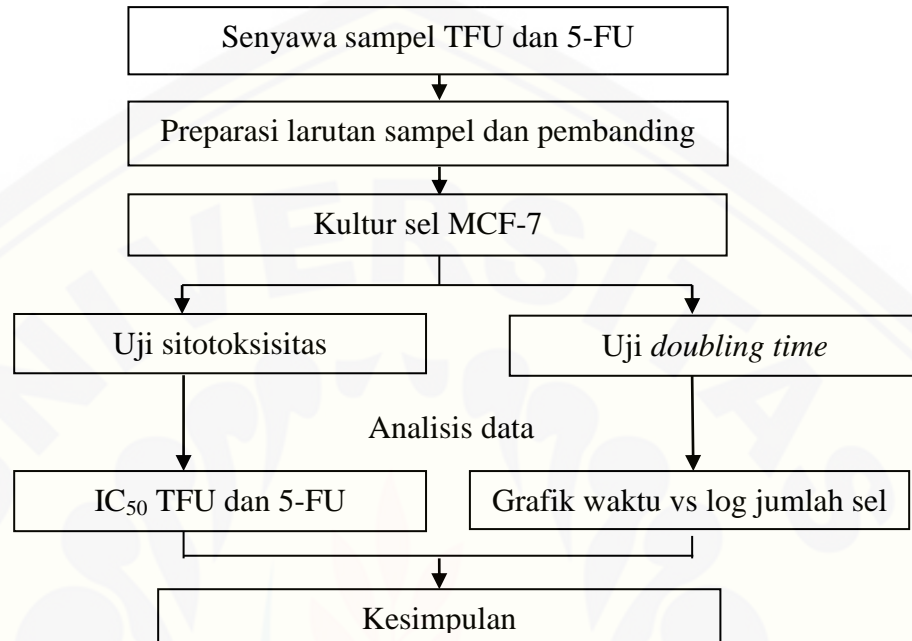
A = intersep;

B= slope (Nurani, 2011).

Kinetika proliferasi sel dilihat dari nilai *slope* pada kurva. Semakin kecil *Slope* maka semakin lama perpanjangan *doubling time* (Nurulita dan Siswanto, 2007)

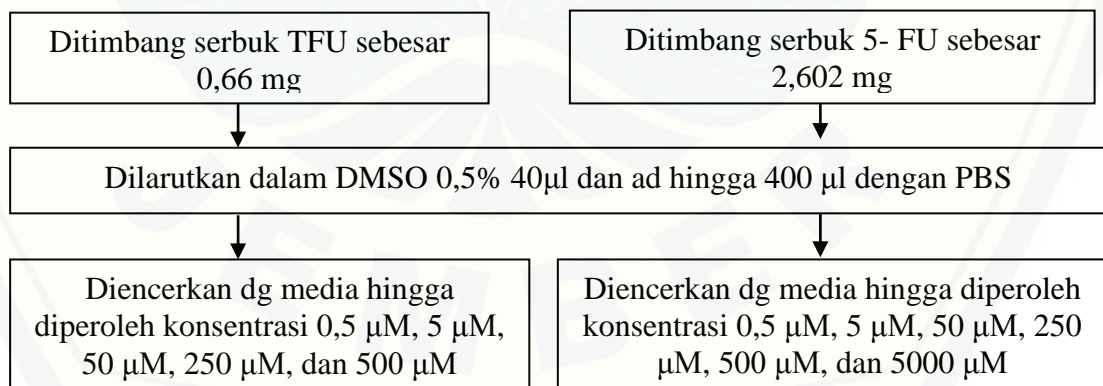
### 3.9 Skema Penelitian

#### 3.9.1 Alur Penelitian Aktivitas Senyawa TFU terhadap Sel MCF-7



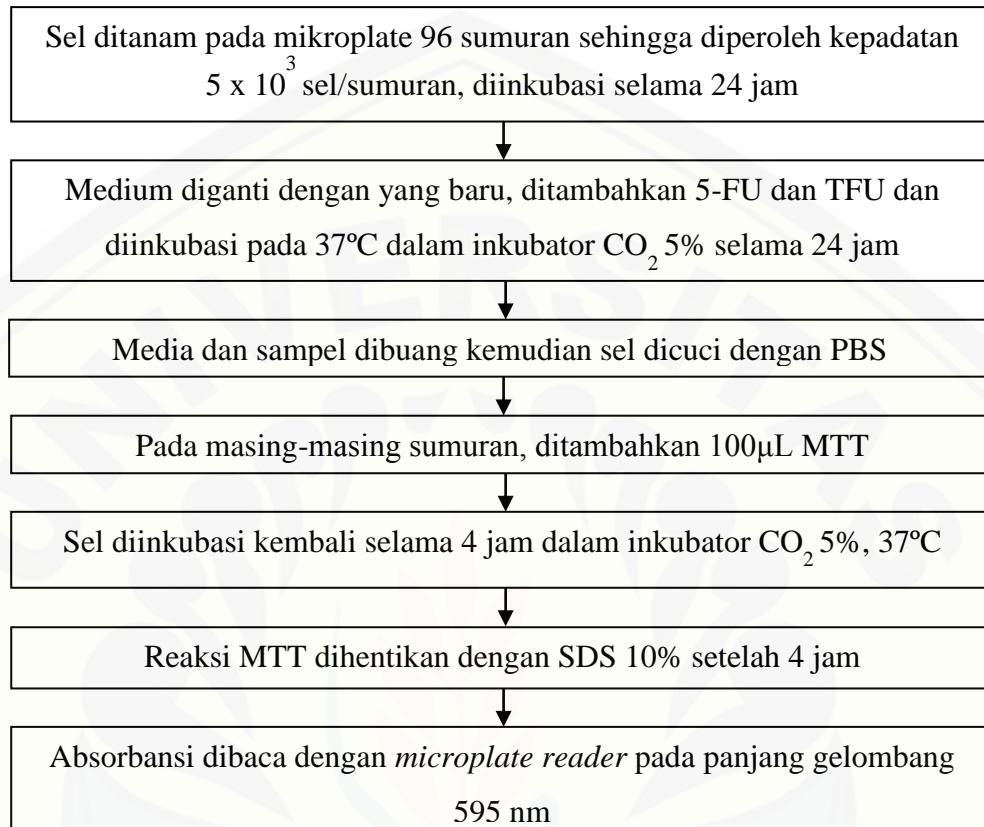
Gambar 3.2. Alur Penelitian Aktivitas Senyawa TFU terhadap Sel MCF-7

#### 3.9.2 Preparasi Larutan Sampel

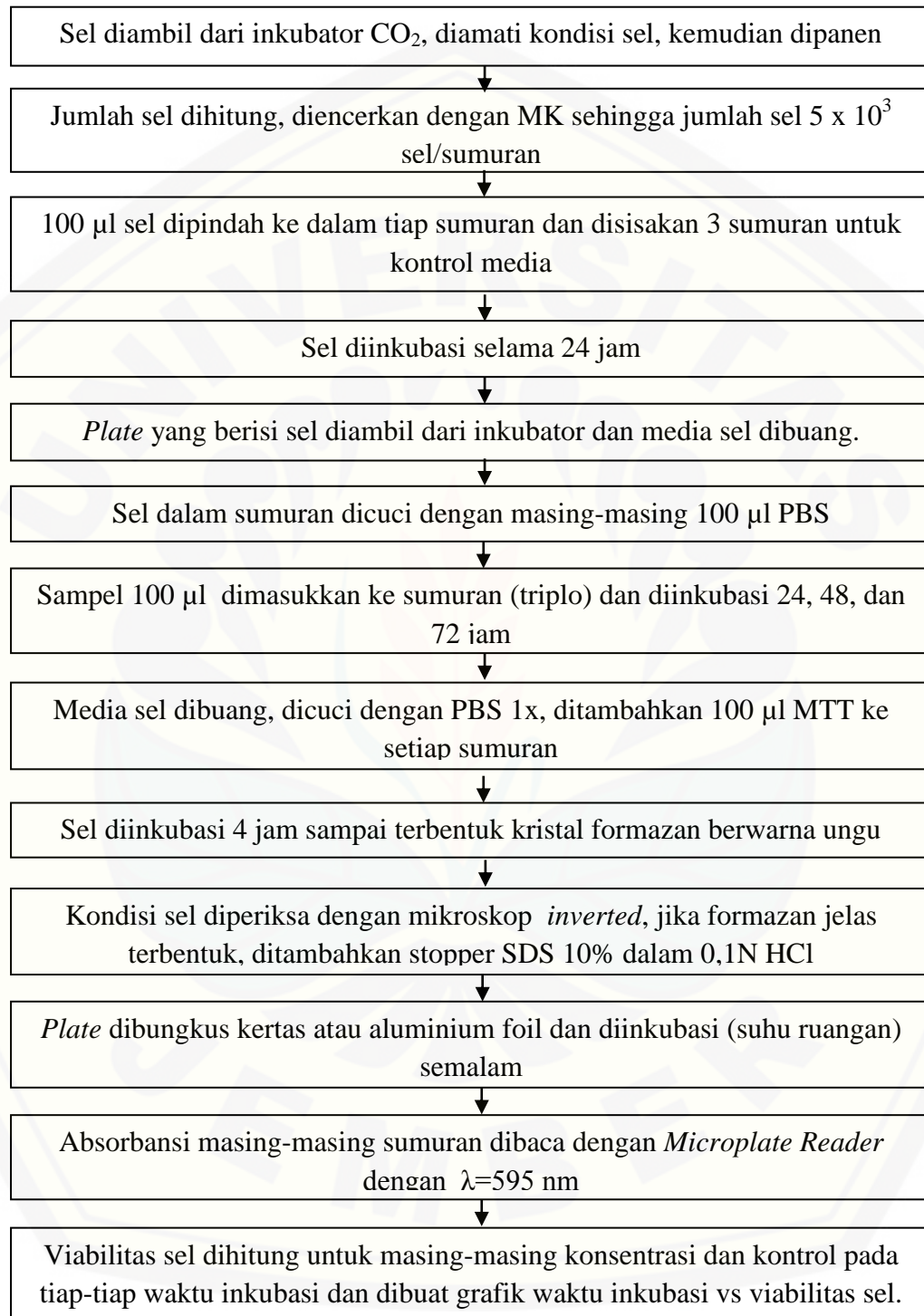


Gambar 3.3. Skema Alur preparasi larutan sampel dan pembeding

## 3.9.3 Uji Sitotoksitas



Gambar 3.4. Skema alur uji sitotoksik senyawa TFU

3.9.4 Uji *Doubling Time*Gambar 3.5. Skema alur pengujian *Doubling Time*



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

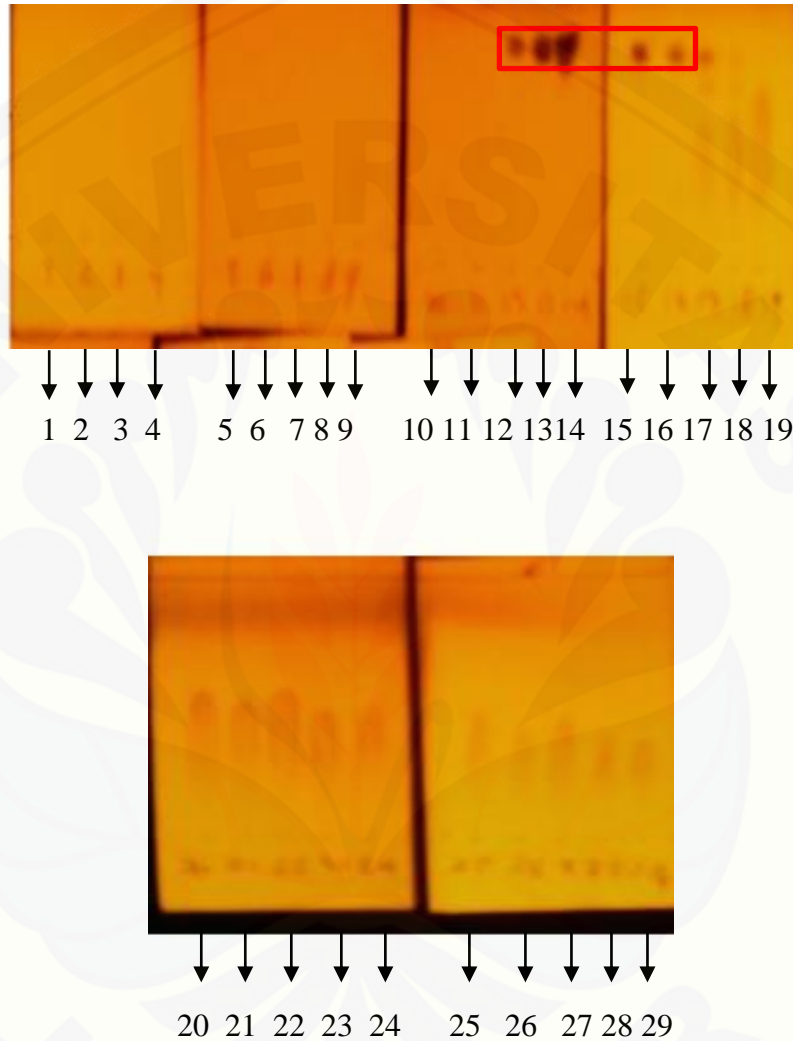
Pada penelitian ini dilakukan pengujian sitotoksitas dan efek antiproliferasi (*doubling time*) senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (TFU) terhadap sel kanker payudara MCF-7. Sebelum dilakukan uji sitotoksik dan proliferasi tahapan pertama yang dilakukan adalah proses sintesis serta pemurnian senyawa TFU berdasarkan prosedur yang telah dilakukan oleh Ernawati (2013) pada penelitian sebelumnya. Tahapan berikutnya dilanjutkan dengan melakukan karakterisasi senyawa TFU menggunakan FTIR-KBr dan pengujian kemurnian menggunakan jarak lebur serta KLT-densitometri. Senyawa hasil yang sudah terbukti merupakan TFU kemudian diuji sitotoksik dan *doubling time*. Kedua pengujian tersebut dilakukan menggunakan metode MTT

### 4.1 Sintesis dan Pemurnian Senyawa TFU

Sintesis senyawa TFU dilakukan berdasarkan prosedur sintesis yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Ernawati (2013). Hasil sintesis tersebut kemudian dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak yang telah dioptimasi pada penelitian sebelumnya oleh Ernawati (2013) yaitu heksana:aseton (6:4) dan diperoleh 29 vial fraksi.

Setelah didapatkan 29 vial fraksi kemudian ditotolkan pada lempeng KLT untuk melihat noda yang terbentuk. Kemudian dari penotolan tersebut dipilih satu kelompok fraksi yang menghasilkan satu noda dan dianggap memiliki senyawa yang sama. Kelompok fraksi tersebut adalah kelompok vial nomor 12-16. Kelompok fraksi

dengan nomor vial 12-16 tersebut kemudian diuji kemurniannya dengan KLT densitometri, jarak lebur dan diidentifikasi strukturnya menggunakan FTIR KBr. Lempeng eluasi seluruh vial dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1. Hasil eluasi seluruh vial setelah pemurnian kromatografi kolom dengan eluen heksan: aseton (6:4)

## 4.2 Uji Kemurnian Senyawa TFU

Uji kemurnian dilakukan untuk memastikan bahwa dalam kristal produk hanya mengandung satu jenis senyawa yaitu TFU. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode KLT serta jarak lebur.

Uji kemurnian dengan metode KLT dilakukan pada kelompok fraksi dengan nomor vial 12-16. Pengujian dilakukan dengan menotolkan kelompok fraksi tersebut pada lempeng KLT kemudian dieluasi dengan 3 eluen yang berbeda. kepolaranya (Gritter *and* Schwarting dalam Chasani *et al.*, 2010). Komposisi pelarut untuk eluen<sub>1</sub> heksan: aseton (6:4) (Ernawati, 2013); eluen<sub>2</sub> heksan:etil asetat (6:4); eluen<sub>3</sub> heksan:etil asetat:aseton (5:3:2) (Puspaningtyas, 2011). Penampak noda yang digunakan adalah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm, adanya satu noda dapat membuktikan bahwa hasil sintesis tersebut merupakan senyawa tunggal. Data kromatografi lapis tipis (KLT) dari kelompok fraksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1.

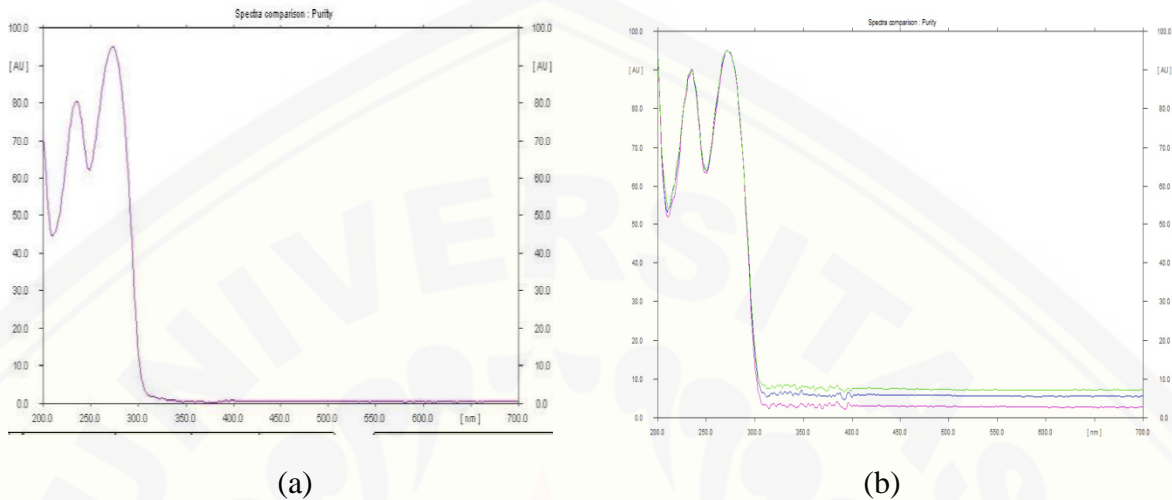
Tabel 4.1. Hasil uji kemurnian dengan metode KLT

Replikasi	Rf		
	Eluen <sub>1</sub>	Eluen <sub>2</sub>	Eluen <sub>3</sub>
1	0,40	0,43	0,68
2	0,40	0,42	0,67
3	0,41	0,42	0,67
<b>Rata- rata</b>	<b>0,40</b>	<b>0,42</b>	<b>0,67</b>

Dari data uji KLT tersebut dapat diamati bahwa hanya terdapat satu noda pada lempeng KLT setelah dieluasi dengan 3 komposisi eluen yang berbeda sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah senyawa tunggal. Gambar lempeng KLT dapat dilihat pada Lampiran A1.

Lempeng KLT yang dieluasi dengan eluen optimum yaitu heksan: aseton (6:4) kemudian *discaning* dengan densitometer untuk dilihat spektranya serta kemurniannya. Spektra yang dihasilkan kemudian dibandingkan dengan spektra hasil sintesis pada penelitian sebelumnya oleh Ernawati, (2013) yang juga dieluasi dengan eluen optimal

heksan:aseton (6:4). Perbandingan spektra antara hasil sintesis kali ini dengan hasil sintesis pada penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Perbandingan spektra antara hasil sintesis kali ini dengan hasil sintesis pada penelitian sebelumnya. (a) Spektra hasil sintesis pada penelitian oleh Ernawati (2013); (b) Spektra hasil sintesis pada penelitian ini

Berdasarkan Gambar 4.2 spektra yang dihasilkan oleh produk sintesis kali ini identik dengan spektra produk pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ernawati (2013). Uji *purity* dilakukan dengan cara membandingkan spektra pada posisi awal, tengah dan akhir puncak (Wulandari *et al.*, 2013). Suatu senyawa dinyatakan murni apabila nilai  $r(s,m) > 0,999$  dan nilai  $r(m,e) > 0,999$ . Nilai *purity* hasil sintesis pada eluen optimal heksan:aseton (6:4) dapat dilihat pada Tabel 4.2. Berdasarkan nilai pada Tabel 4.2 maka *purity* dapat dikatakan murni. Sementara itu, kromatogram campuran fraksi 12-16 dengan eluen heksan:aseton (6:4) dapat dilihat pada Lampiran A4.

Tabel 4.2 Hasil uji *purity* dengan eluen heksan:aseton (6:4)

Replikasi	$r(s,m)$	$r(m,e)$
1	0,999843	0,999822
2	0,999899	0,999682
3	0,999872	0,999857

Pengujian kemurnian juga dilakukan berdasarkan jarak lebur yang dimiliki senyawa produk hasil sintesis. Uji jarak lebur dilakukan dengan memasukkan kristal hasil sintesis ke dalam pipa kapiler hingga ketinggian  $\pm 0,3-0,5$  cm. Pipa kapiler kemudian dimasukan dalam alat *melting point apparatus*, dan diukur jarak leburnya. Suatu senyawa dikatakan murni apabila memiliki rentang jarak lebur  $1-2^{\circ}\text{C}$  yang dihitung sejak senyawa tersebut mulai melebur hingga melebur sempurna (Ritmaleni *et al.*,2011).

Berdasarkan hasil pengujian jarak lebur diketahui bahwa kristal produk hasil sintesis memiliki jarak lebur  $172- 174^{\circ}\text{C}$ . Pengujian jarak lebur dilakukan sebanyak tiga kali replikasi untuk memastikan kepresisian hasil yang diperoleh. Data pengujian jarak lebur dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil uji jarak lebur Kristal produk sintesis senyawa TFU

Replikasi	Jarak Lebur
1	$172- 174^{\circ}\text{C}$
2	$172- 174^{\circ}\text{C}$
3	$172- 174^{\circ}\text{C}$
Rata- rata	$172- 174^{\circ}\text{C}$

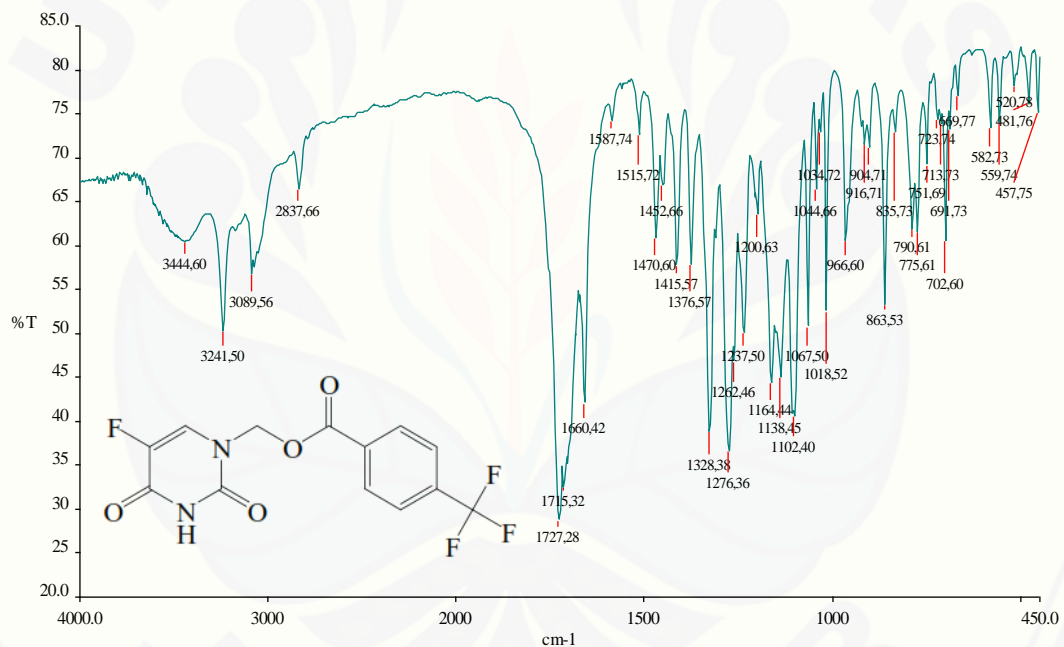
Suatu senyawa dapat dikatakan murni apabila memiliki jarak lebur sebesar  $2^{\circ}\text{C}$  (Ritmaleni *et al.*,2011). Berdasarkan Tabel 4.3 dapat dilihat bahwa jarak lebur yang dimiliki kristal produk hasil sintesis sebesar  $2^{\circ}\text{C}$  yaitu antara  $172- 174^{\circ}\text{C}$  sehingga senyawa produk dikatakan murni.

### 4.3 Identifikasi Struktur Senyawa TFU

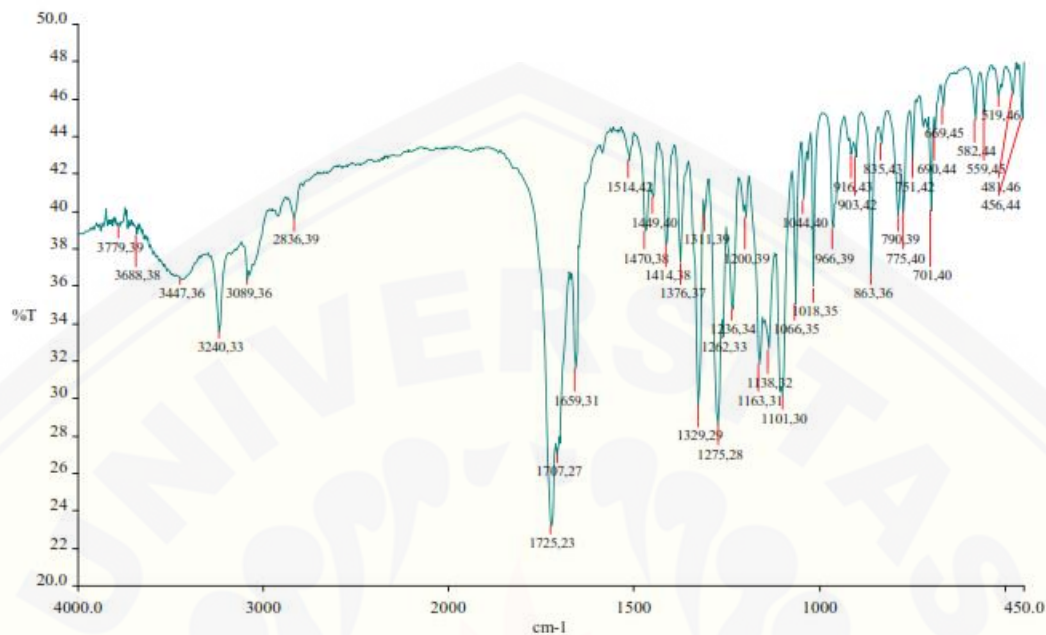
Identifikasi struktur senyawa bertujuan untuk memastikan produk hasil sintesis yang telah dimurnikan melalui metode kromatografi kolom merupakan senyawa TFU. Proses identifikasi ini dilakukan dengan menggunakan FTIR KBr pada campuran kelompok fraksi dengan nomor vial 12-16.



FTIR KBr mampu menunjukkan gugus- gugus fungsional yang terdapat dalam senyawa yang diidentifikasi. Alat ini dapat menunjukkan panjang gelombang yang spesifik pada tiap gugus fungsional. Spektra yang dihasilkan dari identifikasi struktur menggunakan FTIR KBr kemudian diinterpretasikan dan dibandingkan dengan literatur serta dibandingkan dengan hasil sintesis Ernawati (2013). Spektra hasil identifikasi ditunjukkan pada Gambar 4.3, sedangkan spektra hasil sintesis Ernawati (2013) dapat dilihat pada gambar 4.4. Perbandingan antara interpretasi spektra hasil sintesis dengan literatur dan hasil sintesis Ernawati (2013) dapat dilihat pada tabel 4.4.



Gambar 4.3. Spektra IR senyawa 1-(4-(trifluorometilbenzoyloksimetil)-5-fluorourasil



Gambar 4.4. Spektra IR senyawa TFU hasil sintesis Ernawati (2013) (Sumber: Ernawati, 2013).

Tabel 4.4. Perbandingan Interpretasi spektra IR produk hasil percobaan dengan literatur dan hasil sintesis pada penelitian sebelumnya (Ernawati, 2013; Coates, 2000; Pavia *et al.*, 2009)

Type Vibrasi	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> ) dari Percobaan	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> ) dari Ernawati	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> ) dari Literatur
N-H sekunder	3444,60	3347,36	3300-3500
C- O ester	1276,36	1275,28	1000-1300
C-F	1376,57	1376,37	1000-1400
C = O ester terkonjugasi	1727,28	1725,23	1725-1750
Cincin aromatis terdistribusi pada posisi para	835,73	835,43	800-850
C= O	1660,42	1659,31	1630-1850
Arilfluorida	1237,50	1236,34	1100-1250
Polifluoroalkana	1328,38	1329,29	1100-1350

Pada Tabel 4.4. dapat dilihat bahwa seluruh gugus fungsi dalam struktur senyawa hasil sintesis muncul pada frekuensi yang sesuai dengan literatur dan penelitian sebelumnya walaupun terdapat sedikit pergeseran frekuensi yang disebabkan oleh perbedaan waktu dan alat yang digunakan. Berdasarkan interpretasi tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis merupakan senyawa 1-(4-trifluorometilbenzoioksimetil)-5-fluorourasil atau TFU.

#### 4.4 Uji Sitotoksik

Senyawa TFU yang teruji kemurnian dan strukturnya kemudian digunakan dalam pengujian sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan pembanding atau kontrol positif berupa senyawa 5-FU. Pengujian sitotoksik ini dilakukan dengan metode MTT. Uji ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup (Meizarini, 2008).

MTT merupakan suatu reagen yang memiliki warna kuning dan akan tereduksi di dalam mitokondria sel hidup menjadi kristal formazan yang berwarna ungu (Ahmadian *et al.*, 2009; Talupula, 2011). Kuantitas warna ungu formazan yang dihasilkan oleh sel dengan perlakuan senyawa TFU maupun 5-FU diukur dengan menggunakan *microplate reader*. Absorbansi yang dihasilkan kemudian dikonversikan ke dalam % sel hidup atau % viabilitas. Absorbansi tersebut bersifat proporsional terhadap % viabilitas, karena laju reduksi MTT menjadi kristal formazan linier terhadap jumlah sel yang hidup pada sumuran tersebut.

Persentase sel hidup yang diperoleh kemudian digunakan untuk mencari nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang dapat menghambat 50% dari populasi sel. Nilai  $IC_{50}$  tersebut digunakan untuk memperkirakan potensi senyawa TFU dibandingkan dengan 5-fluorourasil terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Uji sitotoksik dilakukan untuk masing- masing senyawa sebanyak 3 kali replikasi kemudian dilanjutkan dengan uji t tidak berpasangan untuk membandingkan potensi kedua senyawa berdasarkan nilai signifikansinya. Data absorbansi dan persentase sel

hidup hasil uji sitotoksik senyawa TFU serta 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 dapat dilihat pada Lampiran C. Sementara itu, data hasil uji sitotoksik senyawa TFU serta 5-FU dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. Rata- rata nilai  $IC_{50}$  TFU dan senyawa 5-fluorourasil

Senyawa	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )			$IC_{50} \pm SD$	RSD (%)
	R1	R2	R3		
5-FU	3334,12	4419,2	4895,62	4216,32 $\pm$ 800,28a	18,98
TFU	400,63	401,12	401,35	401,03 $\pm$ 0,370b	0,09

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang bermakna berdasarkan uji t dengan taraf  $\alpha = 5\%$ .

Berdasarkan Tabel 4.5  $IC_{50}$  senyawa 5-FU dari 3 kali replikasi berturut- turut adalah 3334,12  $\mu M$ ; 4419,2  $\mu M$ ; dan 4895,62  $\mu M$ . Nilai RSD dari ketiga replikasi tersebut juga telah memenuhi persyaratan yaitu 18,98 %, dengan kriteria nilai RSD untuk pengujian bioaktivitas berbasis sel adalah  $< 30\%$  (*Commission directive* dalam Vanderperren *et al.*, 2004).

Nilai  $IC_{50}$  senyawa TFU berdasarkan Tabel 4.5 dalam 3 kali replikasi berturut- turut adalah 400,63  $\mu M$ ; 401,12  $\mu M$ ; dan 401,35  $\mu M$ . Nilai RSD dari replikasi tersebut memenuhi persyaratan yaitu 0.09 %, dengan kriteria nilai RSD untuk pengujian bioaktivitas berbasis sel adalah  $< 30\%$  (*Commission directive* dalam Vanderperren *et al.*, 2004). Kurva konsentrasi *vs* % viabilitas senyawa 5-FU dan senyawa TFU dapat dilihat pada Lampiran C.

Setelah diperoleh  $IC_{50}$  pada masing- masing replikasi, kemudian dilakukan analisis data menggunakan uji t tidak berpasangan. Sebelum dilakukan uji t tidak berpasangan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas. Uji normalitas digunakan untuk melihat apakah sebaran data yang dimiliki normal.

Uji normalitas Shapiro-Wilk yang telah dilakukan memberikan hasil nilai signifikansi atau nilai  $p = 0.577$  untuk kelompok 5-FU dan  $p = 0,598$  untuk kelompok TFU. Karena nilai  $p > 0,05$ , maka dapat diambil kesimpulan bahwa sebaran data kelompok 5-FU maupun kelompok TFU adalah normal.



Dua kelompok data tersebut kemudian dibandingkan dengan menggunakan uji t tidak berpasangan. Diperoleh hasil signifikansi atau nilai  $p = 0,014$ . karena nilai  $p < 0,05$  maka diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara efek sitotoksik senyawa 5-FU dengan senyawa TFU, dimana efek sitotoksik senyawa TFU lebih tinggi apabila dibandingkan dengan efek sitotoksik senyawa 5-FU. Data hasil uji normalitas dan uji t dapat dilihat pada Lampiran D.

Berdasarkan Tabel 4.5 dapat dilihat rata-rata nilai  $IC_{50}$  senyawa TFU yaitu sebesar  $401,03 \mu M \pm 0,370$ . yang jauh lebih rendah dibandingkan rata-rata nilai  $IC_{50}$  senyawa 5-FU yaitu sebesar  $4216,32 \mu M \pm 800,28$ . Nilai  $IC_{50}$  senyawa TFU yang jauh lebih rendah dari 5-FU menunjukkan bahwa senyawa TFU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan 5-FU. Aktivitas sitotoksik TFU menjadi lebih baik dibandingkan dengan 5-FU karena pada senyawa TFU memiliki substituen berupa senyawa ester dan alkil  $CF_3$  yang memiliki nilai elektronegativitas yang lebih besar sehingga ikatan senyawa TFU dengan reseptor lebih kuat. Substitusi pada posisi para juga meningkatkan parameter sterik sehingga interaksinya dengan reseptor lebih serasi. Gugus benzen yang dimiliki senyawa TFU meningkatkan lipofilitas senyawa sehingga penembusan obat melalui membran biologis lebih baik dibandingkan senyawa 5-FU (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

#### 4.5 Uji Proliferasi Sel (*Doubling Time*)

Pengujian efek antiproliferasi senyawa TFU dan 5-FU dilakukan dengan metode *doubling time*. *Doubling time* dilakukan dengan metode MTT sama seperti uji sitotoksik. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi uji yaitu  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , dan  $1 \frac{1}{2} IC_{50}$  dengan waktu inkubasi selama 24, 48 dan 72 jam. Setelah diperoleh hasil berupa data absorbansi kemudian jumlah sel hidup dihitung dan dibuat kurva antara waktu inkubasi dengan log jumlah sel hidup. Hasil akhir yang diperoleh adalah nilai *doubling time* dalam satuan jam. Hasil uji *doubling time* dapat dilihat pada Tabel 4.6.



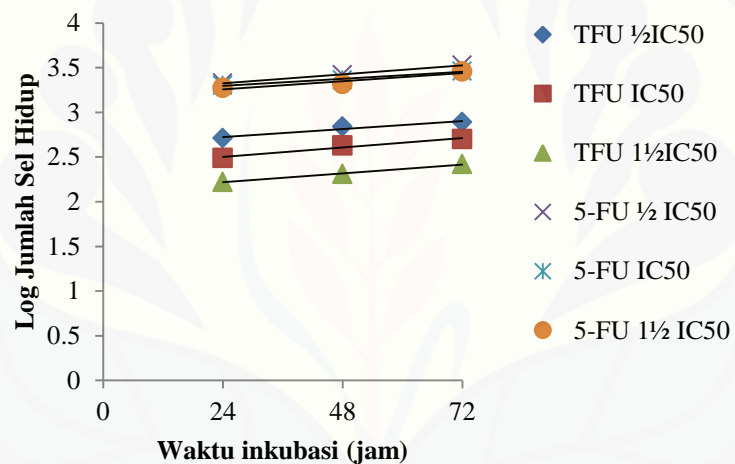
Berdasarkan hasil pengujian pada Tabel 4.6 nilai *doubling time* senyawa TFU jauh lebih besar dibandingkan dengan nilai *doubling time* senyawa 5-FU. Hal ini membuktikan bahwa senyawa TFU memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel MCF-7 yang lebih baik dibandingkan dengan senyawa 5-FU. Aktivitas penghambatan TFU dikatakan lebih baik karena waktu yang diperlukan sel untuk berproliferasi pada perlakuan senyawa TFU jauh lebih lama dibandingkan dengan sel yang mendapat perlakuan 5-FU. Senyawa TFU dan senyawa 5-FU keduanya menunjukkan peningkatan nilai *doubling time* seiring dengan bertambahnya konsentrasi. hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin besar pula aktivitas penghambatan terhadap proliferasi sel kanker MCF-7. Grafik yang menunjukkan kinetika proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan 5-FU dan TFU dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Tabel 4.6 Hasil uji *doubling time* senyawa TFU dan 5-FU terhadap sel MCF-7

Senyawa	Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Persamaan Regresi Waktu Inkubasi vs Jumlah Sel	<i>Doubling Time (Jam)</i>
TFU	$\frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	$y = 0,0038x + 2,6333$	359,66
	IC <sub>50</sub>	$y = 0,0044x + 2,3967$	364,39
	$1 \frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	$y = 0,0042x + 2,1167$	448,40
5FU	$\frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	$y = 0,0042x + 3,2253$	184,45
	IC <sub>50</sub>	$y = 0,0033x + 3,2167$	214,00
	$1 \frac{1}{2}$ IC <sub>50</sub>	$y = 0,0038x + 3,1680$	220,63

Sel MCF-7 memiliki lama waktu penggandaan diri dalam keadaan normal adalah  $\pm 24$  jam (Sutherland *et al.*, 1983). Namun dengan diberikan perlakuan senyawa TFU terbukti dapat menghambat proliferasi sel dua kali lebih lama daripada 5-FU sehingga *doubling time* menjadi lebih lama. Kemungkinan mekanisme penghambatan dari senyawa TFU adalah sama dengan 5-FU yaitu pada siklus sel melalui *cell cycle arrest* dengan cara menghambat enzim Timidilat Sintetase. Penghambatan terhadap enzim tersebut akan menyebabkan terjadinya kerusakan DNA. *Cell cycle arrest* akan terjadi akibat aktivitas p53 sebagai salah satu kontrol

terhadap siklus sel ketika terjadi kerusakan atau kesalahan dalam siklus sel misalnya ada DNA yang rusak. Respon ini, bertujuan untuk memberikan waktu reparasi atas kerusakan yang terjadi. Namun, apabila kesalahan tidak mampu dibenahi maka sel akan mati. Mekanisme kontrol/ *check point* belangsung pada tiap tahapan pada siklus sel dari mulai G1, S, G2 dan M. Protein p53 akan melakukan mekanisme kontrolnya pada fase G1 menuju S sehingga ketika *cell cycle arrest* terjadi maka siklus sel akan berhenti di fase G1 (Foster, 2008). Penghambatan proliferasi sel bisa saja terjadi dikarenakan *cell cycle arrest*, *cell cycle delay* maupun apoptosis sehingga untuk mengetahui mekanisme pasti penghambatan proliferasi senyawa TFU perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 4.5 Kurva kinetika proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan TFU dan 5-FU

## BAB 5 PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan antara lain:

1. Senyawa TFU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $401,03 \pm 0,370 \mu M$  dibandingkan aktivitas sitotoksik senyawa 5-FU dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $4216,32 \pm 800,28 \mu M$  terhadap sel kanker payudara MCF-7.
2. Senyawa TFU memiliki kemampuan menghambat kinetika proliferasi sel kanker payudara MCF-7 lebih besar dua kali lipat dibandingkan dengan senyawa 5-FU dengan nilai *doubling time* senyawa TFU dengan konsentrasi  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $1\frac{1}{2} IC_{50}$  secara berturut-turut sebesar 359,66; 364,39; 448,40 jam sedangkan 5-FU memiliki nilai *doubling time* berturut-turut 184,45; 214,00; 220,63 jam.

### 5.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme pasti aktivitas sitotoksik senyawa TFU melalui uji apoptosis dan uji selektivitas baik menggunakan sel kanker lain ataupun dengan sel normal.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Ahmadian, S., Barar, J., Saei, A.A., Fakhree, M.A., & Omid, Y., 2009. Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: MTT assay. *J Vis*: Vol. 26:1191
- Alkhalaf, M., El-Mowafy, A., & Karam, S., 2002. Growth Inhibition Of MCF-7 Human Breast Cancer Cells By Progesterone Is Associated With Cell Differentiation And Phosphorylation Of Akt Protein. *Eur. J. Cancer Prev.* Vol. 11: 481–488.
- Alkhalaf, M., & El-Mowafy, A.M. 2003. Overexpression Of Wild-Type P53 Gene Renders MCF-7 Breast Cancer Cells More Sensitive To The Antiproliferative Effect Of Progesterone. *J Endocrinol.* Vol. 179: 55–62.
- Al-Saeedi, F.J. 2014. Study Of The Cytotoxicity Of Asiaticoside On Rats And Tumour Cells. *BMC Cancer.* Vol. 14: 220-233.
- Avendano, C., Menendez, J.C., 2008. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs.* Elsevier.
- Beena, P., Purnima, S., & Kokilavani, R. 2011. In Vitro Hepatoprotective Activity of Ethanolic Extract of *Coldenia procumbens* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* Vol. 3 (2): 144–149.
- Boik, J.C & Newman, R.A. 2008. Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds. *BMC Pharmacology.* Vol. 8:1-13

Crawford, K.W & Bowen,W.D. 2002. Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines. *Cancer Research*. Vol. 6: 313- 322.

CCRC. 2009a. *Prosedur Tetap Uji Pengamatan Proliferasi Sel (Doubling Time)*. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/15-uji-doubling-time.pdf> [20 September 2014]

CCRC. 2009b. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*.[http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/10\\_sop-uji\\_sitotoksik-metode-mtt.pdf](http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/10_sop-uji_sitotoksik-metode-mtt.pdf) [20 September 2014].

Chasani, Vaulina, Iswanto, & Rahayu. 2010. Hidrasi Ikatan Rangkap C7-8 Senyawa Kalanon Dan Uji Sitotoksitasnya terhadap Sel Leukemia L1210. *Molekul*. Vol. 5(1): 41-49.

Coates, John. 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Chichester: John Wiley & Sons Ltd

Departemen Kesehatan RI. 2014. *Hilangkan Mitos Tentang Kanker*. <http://www.depkes.go.id/article/print/201407070001/hilangkan-mitos-tentang-kanker.html>. [24 Desember 2014]

Dwitaharyani, M., 2012. Nanopropolis Sebagai Penghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara MCF-7. *Institut Pertanian Bogor*, 3–4.

*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. 2005. Effects Of Chemotherapy And Hormonal Therapy For Early Breast Cancer On Recurrence And 15-Year Survival: An Overview Of The Randomised Trials. *Lancet* . Vol. 365: 1687–1717.



- Ernawati, N. 2013. "Sintesis 1-(4-Trifluorometilbenzoioksimetil)-5fluorourasil Sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker".(Skripsi Tidak Diterbitkan). Jember: Univesitas Jember
- Foster, I. 2008. Cancer: Cell Cycle Defect. *Radiography*. Vol. 14: 144-149.
- Gunawan, S. G., Nafrialdi, R. S., & Elysabeth (Eds.). 2009. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- IARC (*International Agency for Research on Cancer*). 2013. *Latest World Cancer Statistics Global Cancer Burden Rises To 14.1 Million New Cases In 2012: Marked Increase In Breast Cancers Must Be Addressed*. WHO: Geneva.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., & Trevor, A.J., 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*, 12th ed. Lange Medical Publications, San Francisco.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., & Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms Of Action And Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* . Vol. 3: 330–338.
- Malet- Martino, M., & Martino, R., 2002. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A Review. *The Oncologist*. Vol. 7: 288–323.
- MD Anderson Cancer Center. 2013. *Breast Cancer Treatment Algorithm*. The University of Texas: Texas.
- Meiyanto, Susidarti, Handayani, & Rahmi. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca Catechu L.*) Mampu Menghambat Proliferasi Dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 19 (1): 12 – 19.
- Meizarini, A., 2008. Sitotoksisitas Bahan Restorasi Cyanoacrylate Pada Variasi Perbandingan Powder Dan Liquid Menggunakan MTT Assay. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. Vol. 38 (1): 20-24.

- Nugrahaningsih, 2004. *Ekspresi Protein Bel-2 pada Kanker Mamma*. <http://www.mediamedika.net/archives/271.html>. [24 Desember 2014].
- Nurani,L.H. 2011. Uji Sitotoksisitas, Antiproliferatif, Dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi P53 Dan Bcl2 Dari Fraksi Etanol Infusa Daun Teh (*Camellia Sinensis* (L.) O.K.) Terhadap Sel Hela. *Majalah Obat Tradisional*. Vol. 16(1), 14 – 21.
- Nurulita, N.A. & Siswanto,A. 2007. Efek Sitotoksik Dan Antiproliferatif Ekstrak Kloroform Buah Mahkota Dewa Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 3(4): 168–75.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., & Kriz, G.S. 2001. *Introduction to Spectroscopy 3rd Edition: Guide for Student of Organic Chemistry*. Washington : Thomson Learning Inc
- Puspaningtyas, A.R., 2011. "Modifikasi Struktur 5-FU dan Uji Sitotoksisitas turunan 1-(benzoioksimetil)-5-Fluorourasil Hasil Modifikasi terhadap Sel Kanker MCF- 7 (Sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker)".(Tesis Tidak diterbitkan). Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ritmaleni, Anitasari, Susanti, Rumiwati, & Sismindari. 2011. Sintesis dan uji sitotoksisitas senyawa LR-2 pada sel kanker payudara T47D. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 22(1), 21 – 3
- Sinaga, E., & Wiryanti, I., 2011. Perbandingan Daya Sitotoksik Ekstrak Rimpang 3 Jenis Tumbuhan Zingiberaceae Terhadap Sel Kanker Mcf-7. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 5(3):125-133.
- Siswandono & Soekardjo. 2000. *Kimia Medisinal edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Sun, Zhou, Hu, Shan, Zhang, & Li. 2013. Novel 5-Fluorouracil Derivatives: Synthesis and Cytotoxic Activity of 2-Butoxy-4-Substituted 5-Fluoropyrimidines. *Bull. Korean Chem. Soc*. Vol. 34 (5): 1349- 1354.

- Sutherland, R.L, Hall, R.E. & Taylor, L.W. 1938. 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*. Vol. 43: 3998-4006.
- Talupula, B.K., 2011. Cytotoxicity of PBN spin trap on A204 cells. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research*. Vol. 2: 9– 17.
- Tian, Du, Xie, Zhao, Gao, & Wang. 2007. Synthesis and Bioevaluation of 5-Fluorouracil Derivatives. *Molecules*. Vol.12: 2450–2457.
- Weiss, Fraser, Rubio-Ruiz, Myers, Crispin, Dawson, Brunton, Patton, Carragher, & Unciti-Broceta. 2014. N-Alkynyl Derivatives Of 5-Fluorouracil: Susceptibility To Palladium-Mediated Dealkylation And Toxicity In Cancer Cell Culture. *Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. Vol. 2: 1–9.
- WHO. 2014. Cancer Country Profile 2014. <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/id.html>. [24 Desember 2014].
- Widowati, L. & Mudahar, H. 2009. Uji aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhoniumflagelliforme* (Lood) Bi) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 *In Vitro*. *Media Litbang Kesehatan*. Vol. 19 (1): 9-14
- Wulandari, L., Retnaningtyas, Y., & Mustafidah, D. 2013. Pengembangan dan Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri Untuk Penetapan Kadar Teofilin dan Efedrin Hidroklorida Secara Simultan Pada Sediaan Tablet. *KTI*. Vol. 15 (1) : 15-21.
- Vanderperren, Van Wouwe, Behets, Windal, Van Overmeire, & Fontaine. 2004. TEQ-value determinations of animal feed; emphasis on the CALUX bioassay validation. *Talanta*. Vol.63 : 1277–1280

Zhang, Yin, Xu, & Chen. 2008. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*. Vol.13: 1551– 1569.



LAMPIRAN

**A. Hasil KLT-Densitometri**

**A.1. Gambar Lempeng KLT Campuran Vial 12-16 pada 3 Eluen Berbeda**



Eluen  
heksan:aseton (6:4)

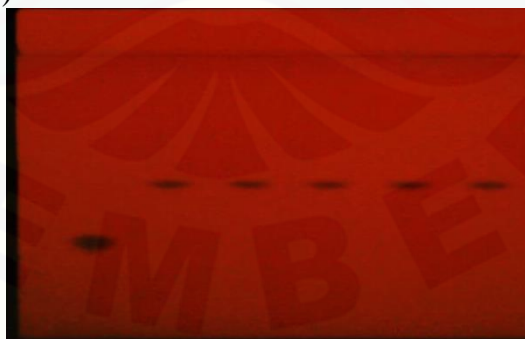


Eluen heksan:etil  
asetat: aseton (5:3:2)



Eluen heksan:etil asetat  
(6:4)

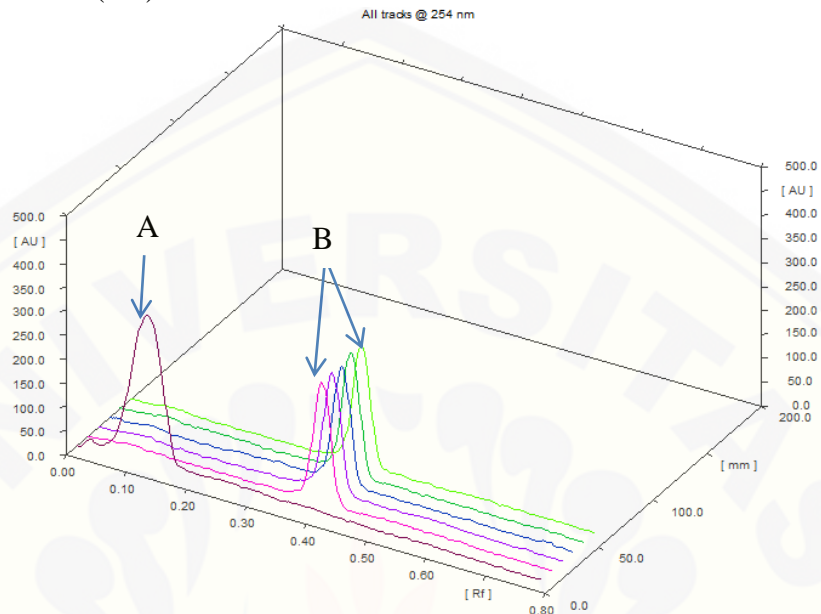
**A.2. Gambar Lempeng KLT Fraksi 12-16 dan Pembanding 5-FU dengan Eluen Haksan: aseton (6:4)**



↓   ↓   ↓   ↓   ↓   ↓  
5-FU   12   13   14   15   16



A.3. Gambar Kromatogram Fraksi 12-16 dan Pembanding 5-FU dengan Eluen Haksan: aseton (6:4)

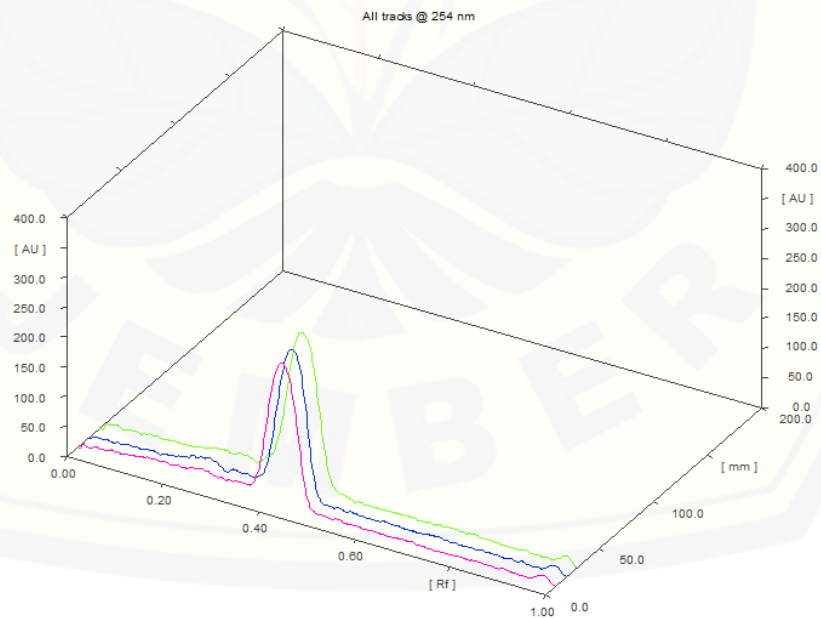


Keterangan:

A: *Track 1* adalah kromatogram 5-FU

B: *Track 2, 3, 4, 5, 6* adalah kromatogram fraksi 12, 13, 14, 15, 16

A.4. Gambar Kromatogram Campuran Fraksi 12-16 dengan Eluen Haksan: aseton (6:4)



**B. Perhitungan Bahan Uji Sitotoksik****B.1. Preparasi Larutan Uji Senyawa 5-FU**

Penimbangan larutan induk senyawa 5-FU:

$$\mu\text{M} = \frac{\text{massa}(mg)}{BM(\frac{g}{mol})} \times \frac{10^6}{\text{Volume}(\mu\text{l})}$$

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

$$m = 2,6016 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan Induk 50.000  $\mu\text{M}$  = 2,6016 mg +DMSO 40  $\mu\text{l}$ , + ad PBS 400  $\mu\text{l}$

Pengenceran larutan induk :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**B.2. Preparasi Larutan Uji Senyawa TFU**

Penimbangan larutan induk senyawa TFU :

$$\mu\text{M} = \frac{\text{massa}(mg)}{BM(\frac{g}{mol})} \times \frac{10^6}{\text{Volume}(\mu\text{l})}$$

$$5000 \mu\text{M} = \frac{m}{3324,04 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{l}}$$

$$m = 0,66 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan Induk  $5000 \mu\text{M} = 0,66 \text{ mg} + \text{DMSO } 40 \mu\text{l}$ , + ad PBS  $400 \mu\text{l}$

Pengenceran larutan induk:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### B.3. Komposisi Media Komplit (MK) 100 ml

FBS 10 %

Fungion 0,5%

Penstrep 2%

DMEM 87,5%

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

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

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

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

#### B.4. Pembuatan Larutan MTT

Ditimbang MTT 50 mg dilarutkan dalam PBS ad 10 ml

MTT(5mg/ml PBS) = 1 ml

Media komplit = 9 ml

---

10 ml

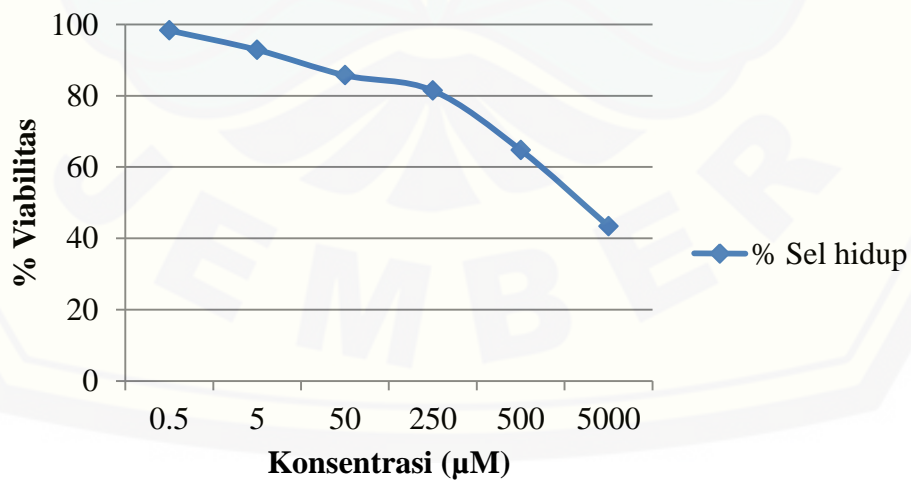
### C. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksik

#### C.1. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksik Senyawa 5-FU

##### 1. Replikasi 1

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> (µM)
0,5	0,404	0,412	0,422	0,413	98,3	3334,12
5	0,400	0,353	0,433	0,395	92,9	
50	0,388	0,363	0,367	0,373	85,7	
250	0,300	0,417	0,360	0,359	81,5	
500	0,250	0,372	-	0,311	64,8	
5000	0,283	0,192	-	0,238	43,4	
Kontrol media	0,090	0,102	0,108	0,100	-	
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,418	-	

Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:



Contoh perhitungan :

Rata- rata absorbansi diperoleh dengan persamaan berikut:

$$\text{Rata- rata Absorbansi} = \frac{\text{Abs 1} + \text{Abs 2} + \text{Abs n}}{n}$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol sel} = \frac{0,394 + 0,441}{2} = 0,418$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol media} = \frac{0,090 + 0,102 + 0,108}{3} = 0,100$$

% sel hidup pada tiap-tiap konsentrasi uji dihitung dengan persamaan berikut:

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

Konsentrasi 0,5  $\mu\text{M}$  :

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,404 + 0,412 + 0,422}{3} = \frac{1,24}{3} = 0,413$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,413 - 0,100}{0,418 - 0,100} \times 100 \% = 98,3\%$$

Konsentrasi 5  $\mu\text{M}$

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,400 + 0,353 + 0,433}{3} = \frac{1,19}{3} = 0,395$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,395 - 0,100}{0,418 - 0,100} \times 100 \% = 92,9\%$$

Konsentrasi 50  $\mu\text{M}$

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,388 + 0,363 + 0,367}{3} = \frac{1,12}{3} = 0,373$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,373 - 0,100}{0,418 - 0,100} \times 100 \% = 85,7\%$$

Konsentrasi 250  $\mu\text{M}$

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,300 + 0,417 + 0,360}{3} = \frac{1,08}{3} = 0,395$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,359 - 0,100}{0,418 - 0,100} \times 100 \% = 81,5\%$$



Konsentrasi 500  $\mu\text{M}$ 

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,240+0,372}{2} = \frac{0,612}{2} = 0,306$$

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{0,306-0,100}{0,418-0,100} \times 100 \% = 64,8 \%$$

Konsentrasi 5000  $\mu\text{M}$ 

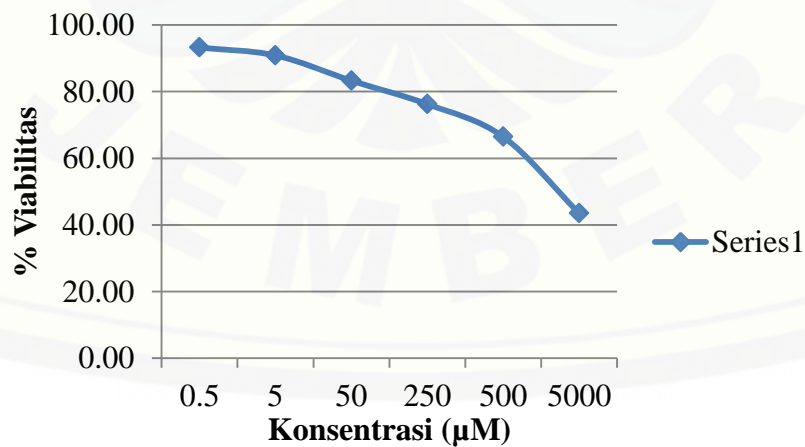
$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,283+0,192}{2} = \frac{0,475}{2} = 0,236$$

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{0,236-0,100}{0,418-0,100} \times 100 \% = 43,4\%$$

## 2. Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi	Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
0,5	0,781	0,766	-	0,774	93,2
5	0,757	0,757	-	0,757	90,9
50	0,717	0,669	0,726	0,704	83,3
250	0,679	0,644	0,641	0,655	76,2
500	0,549	0,53	0,679	0,586	66,4
5000	0,427	0,415	0,434	0,425	43,4
Kontrol	0,119	0,116	0,127	0,121	-
Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,821	-

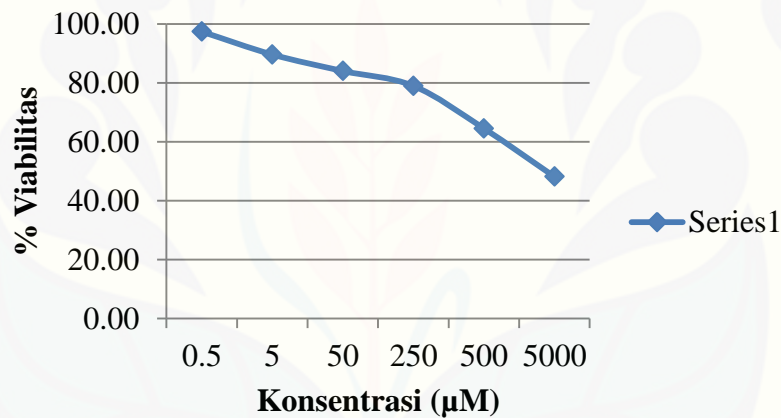
Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:



## 3. Replikasi 3

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
0,5	0,800	0,895	-	0,848	97,3	
5	0,790	0,791	-	0,791	89,6	
50	0,780	0,743	0,728	0,750	84,0	
250	0,719	0,702	0,718	0,713	78,9	
500	0,673	0,603	0,546	0,607	64,6	4895,62
5000	0,506	0,518	0,438	0,487	48,2	
Kontrol	0,129	0,132	0,142	0,134	-	
Kontrol sel	0,864	0,870		0,867	-	

Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:

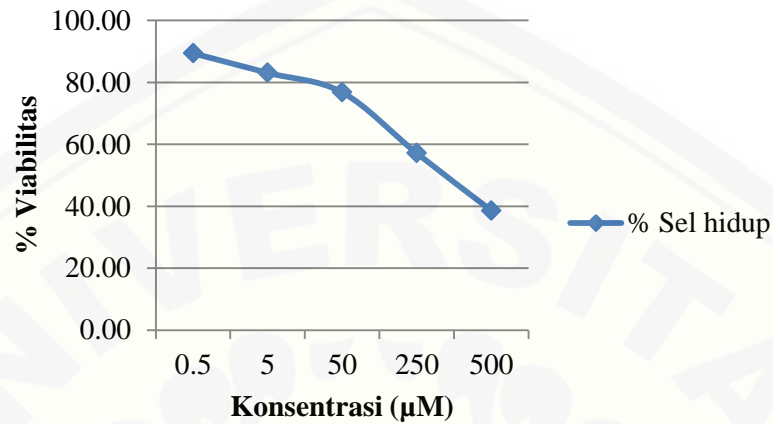


## C.2. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksik Senyawa TFU

## 1. Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
0,5	0,719	0,803	0,711	0,744	89,4	
5	0,731	0,710	0,665	0,702	83,1	
50	0,658	0,645	0,676	0,660	76,8	
250	0,559	0,536	0,488	0,528	57,1	400,63
500	0,400	0,388	0,422	0,403	38,6	
Kontrol	0,147	0,141	0,144	0,144	-	
Kontrol sel	0,706	0,925	-	0,816	-	

Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:



Contoh Perhitungan :

Rata- rata absorbansi diperoleh dengan persamaan berikut:

$$\text{Rata- rata Absorbansi} = \frac{\text{Abs 1} + \text{Abs 2} + \text{Abs } n}{n}$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol sel} = \frac{0,706 + 0,925}{2} = 0,816$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol media} = \frac{0,147 + 0,141 + 0,144}{3} = 0,144$$

% sel hidup pada tiap-tiap konsentrasi uji diperoleh dengan persamaan berikut:

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

Konsentrasi 0,5 µM

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,719 + 0,803 + 0,711}{3} = 0,744$$

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{0,744 - 0,144}{0,816 - 0,144} \times 100 \% = 89,4 \%$$

Konsentrasi 5  $\mu\text{M}$ 

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,731+0,710+0,665}{3} = 0,702$$

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{0,702-0,144}{0,816-0,144} \times 100 \% = 83,1 \%$$

Konsentrasi 50  $\mu\text{M}$ 

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,658+0,645+0,676}{3} = 0,660$$

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{0,660-0,144}{0,816-0,144} \times 100 \% = 76,8\%$$

Konsentrasi 250  $\mu\text{M}$ 

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,559+0,536+0,488}{3} = 0,528$$

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{0,528-0,144}{0,816-0,144} \times 100 \% = 57,1 \%$$

Konsentrasi 500  $\mu\text{M}$ 

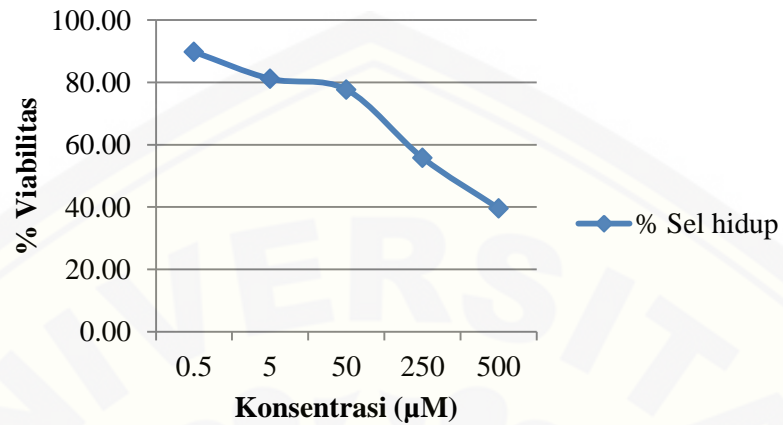
$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,422+0,400+0,388}{3} = 0,403$$

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{0,403-0,144}{0,816-0,144} \times 100 \% = 38,6 \%$$

## 2. Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
0,5	0,380	0,381	0,393	0,3847	89,8	
5	0,353	0,363	0,356	0,3573	81,2	
50	0,360	0,353	0,326	0,3463	77,7	
250	0,278	0,256	0,297	0,2770	55,8	401,12
500	0,240	0,211	0,211	0,2255	39,6	
Kontrol	0,090	0,102	0,108	0,100	-	
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,417	-	

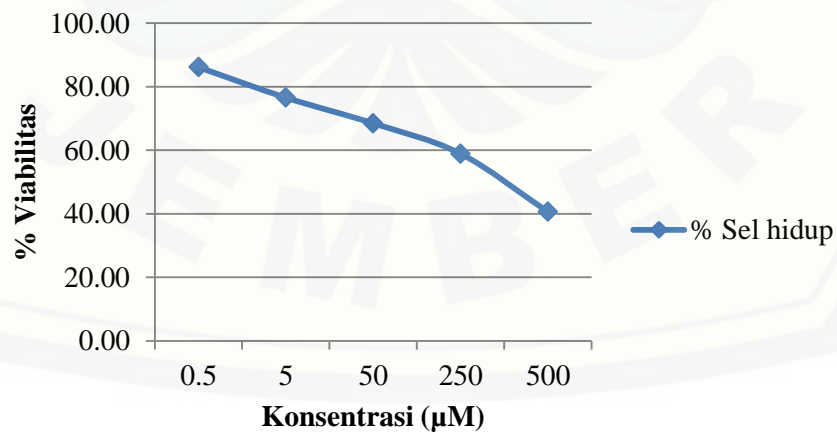
Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:



3. Replikasi 3

Konsentrasi (µM)	Absorbansi		Rerata	% Sel hidup	IC <sub>50</sub> (µM)
0,5	0,738	0,711	0,722	86,1	
5	0,641	0,635	0,657	76,6	
50	0,689	0,546	0,565	68,5	
250	0,537	0,533	0,533	58,9	401,35
500	0,411	0,407	0,405	40,6	
Kontrol	0,119	0,116	0,121	-	
Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,821	

Grafik antara % sel hidup vs konsentrasi:





C.3. Rata- rata Nilai IC<sub>50</sub> Senyawa 5-FU dan TFU

Senyawa	IC50			Rata- Rata	SD	RSD (%)
	R1	R2	R3			
5FU	3334,12	4419,20	4895,62	4216,32	800,3	19 %
TFU	400,63	401,12	401,35	401,03	0,370	0,09 %

SD (Standar Deviasi) dapat dihitung dengan persamaan berikut ini:

$$SD = \sqrt{\frac{(IC50_1 - \text{Rata-rata IC50})^2 + (IC50_n - \text{Rata-rata IC50})^2 + \dots}{n-1}}$$

Sementara itu RSD dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$RSD = \frac{SD}{\text{Rata-rata IC50}} \times 100\%$$

## 1. Perhitungan SD dan RSD senyawa 5-FU

$$SD = \sqrt{\frac{(3334,12 - 4216,31)^2 + (4419,2 - 4216,31)^2 + (4895,62 - 4216,31)^2}{3-1}}$$

$$= 800,3$$

$$RSD = \frac{800,3}{4216,32} \times 100\%$$

$$= 19 \%$$

## 2. Perhitungan SD dan RSD senyawa TFU

$$SD = \sqrt{\frac{(400,63 - 401,03)^2 + (401,12 - 401,03)^2 + (401,35 - 401,03)^2}{3-1}}$$

$$= 0,370$$

$$RSD = \frac{0,370}{401,03} \times 100\%$$

$$= 0,09\%$$

**D. Hasil Analisis Probit**

## D.1. Hasil Analisis Probit Senyawa 5-FU

## 1. Replikasi 1

		Confidence Limits			95% Confidence Limits for log <sup>a</sup> (KONS)
Probability		95% Confidence Limits for KONS			Estimate
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	.010	40243510.939	4904996.429	9.678E8	7.605
	.020	13378421.631	1960467.230	2.424E8	7.126
	.030	6651882.733	1095046.117	1.007E8	6.823
	.040	3932450.145	706349.040	52064859.355	6.595
	.050	2564330.220	494339.254	30441833.272	6.409
	.060	1782063.654	364765.457	19283028.522	6.251
	.070	1295220.276	279377.720	12923572.952	6.112
	.080	973334.575	219999.741	9033101.325	5.988
	.090	750611.140	177006.548	6522781.256	5.875
	.100	590934.062	144880.479	4834193.381	5.772
	.150	219515.254	63129.535	1400547.736	5.341
	.200	99920.654	32547.299	524415.016	5.000
	.250	50864.316	18395.380	226277.214	4.706
	.300	27737.849	10993.332	106627.818	4.443
	.350	15814.251	6803.938	53242.507	4.199
	.400	9278.837	4301.407	27636.704	3.967
	.450	5539.383	2748.758	14714.990	3.743
	.500	3334.119	1759.517	7956.572	3.523
	.550	2006.785	1117.991	4334.149	3.303
	.600	1198.033	697.855	2362.526	3.078
	.650	702.932	422.306	1281.128	2.847
	.700	400.765	243.320	687.166	2.603
	.750	218.549	130.155	361.765	2.340
	.800	111.252	62.380	184.080	2.046
	.850	50.640	25.346	87.459	1.704
	.900	18.811	7.809	35.835	1.274

a. Logarithm base = 10.

2. Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for KONS			95% Confidence Limits for log (KONS) <sup>a</sup>
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
	PROBIT			
.010	8.097E8	44545993.459	7.861E10	8.908
.020	1.957E8	13932575.564	1.258E10	8.292
.030	79494279.973	6660623.405	3.935E9	7.900
.040	40363475.358	3821589.959	1.642E9	7.606
.050	23257322.160	2431482.194	8.070E8	7.367
.060	14546823.098	1654366.388	4.409E8	7.163
.070	9640128.742	1180088.398	2.595E8	6.984
.080	6669471.769	871917.713	1.615E8	6.824
.090	4770739.088	662022.028	1.049E8	6.679
.100	3504671.874	513710.113	70568386.545	6.545
.150	977478.032	179439.495	13673993.290	5.990
.200	354303.880	77583.029	3720088.720	5.549
.250	148343.278	37692.694	1220788.133	5.171
.300	67875.832	19657.000	450059.735	4.832
.350	32890.387	10718.264	179093.664	4.517
.400	16538.668	6004.599	74997.282	4.219
.450	8504.173	3410.512	32470.730	3.930
.500	4419.199	1941.207	14344.348	3.645
.550	2296.439	1094.179	6398.896	3.361
.600	1180.828	602.262	2858.843	3.072
.650	593.770	317.722	1271.316	2.774
.700	287.721	156.427	560.281	2.459
.750	131.650	69.237	243.370	2.119
.800	55.120	26.219	102.463	1.741
.850	19.979	7.912	39.940	1.301
.900	5.572	1.649	12.971	.746

a. Logarithm base = 10.

3. Replikasi 3

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for KONS			95% Confidence Limits for log (KONS) <sup>a</sup>
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate
PROBIT .010	4.105E8	26716293.849	3.024E10	8.613
.020	1.087E8	8996304.358	5.460E9	8.036
.030	46813151.302	4507184.004	1.844E9	7.670
.040	24831614.057	2678906.822	8.153E8	7.395
.050	14825810.694	1754104.961	4.199E8	7.171
.060	9558082.172	1223028.523	2.387E8	6.980
.070	6504441.781	891325.623	1.455E8	6.813
.080	4608265.955	671342.359	93441324.358	6.664
.090	3368343.617	518723.732	62463482.832	6.527
.100	2524158.667	409050.589	43119557.571	6.402
.150	764437.981	152752.862	9310475.840	5.883
.200	295826.322	69659.001	2760023.225	5.471
.250	131013.321	35432.955	974758.094	5.117
.300	63046.756	19260.979	383766.281	4.800
.350	32011.805	10917.093	162252.703	4.505
.400	16826.677	6347.510	71937.065	4.226
.450	9031.522	3739.351	32896.097	3.956
<b>.500</b>	<b>4895.624</b>	2208.077	15322.938	3.690
.550	2653.720	1292.856	7198.159	3.424
.600	1424.353	741.167	3382.516	3.154
.650	748.697	409.131	1579.616	2.874
.700	380.149	212.336	729.362	2.580
.750	182.937	100.104	331.099	2.262
.800	81.018	40.876	145.665	1.909
.850	31.353	13.492	59.659	1.496
.900	9.495	3.144	20.641	.977

a. Logarithm base = 10.



D.2. Hasil Analisis Probit Seyawa TFU

1. Replikasi 1

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log (kons) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	
PROBIT <sup>a</sup>	.010	20277287.998	84442.817	5.405E20	7.307	4.927
	.020	5698601.057	39474.381	7.492E18	6.756	4.596
	.030	2546987.450	24320.194	4.971E17	6.406	4.386
	.040	1389709.289	16873.500	6.467E16	6.143	4.227
	.050	849010.120	12521.860	1.232E16	5.929	4.098
	.060	558156.278	9707.089	3.006E15	5.747	3.987
	.070	386402.309	7759.843	8.733E14	5.587	3.890
	.080	277992.445	6346.592	2.889E14	5.444	3.803
	.090	206050.705	5283.303	1.057E14	5.314	3.723
	.100	156408.459	4460.553	4.190E13	5.194	3.649
	.150	49955.613	2199.510	9.152E11	4.699	3.342
	.200	20168.995	1241.866	4.424E10	4.305	3.094
	.250	9261.324	752.731	3.323E9	3.967	2.877
	.300	4604.339	474.458	3.288E8	3.663	2.676
	.350	2409.483	304.781	39141674.208	3.382	2.484
	.400	1303.321	196.319	5298715.061	3.115	2.293
	.450	719.199	124.686	787482.840	2.857	2.096
	.500	400.628	76.374	125977.292	2.603	1.883
	.550	223.168	43.562	21642.397	2.349	1.639
	.600	123.149	21.753	4091.023	2.090	1.338
	.650	66.613	8.558	906.754	1.824	.932
	.700	34.859	2.316	256.228	1.542	.365
	.750	17.330	.394	93.866	1.239	-.404
	.800	7.959	.041	40.906	.901	-1.385
	.850	3.213	.002	18.866	.507	-2.613
	.900	1.026	.000	8.155	.011	-4.217
	.910	.779	.000	6.742	-.108	-4.609
	.920	.577	.000	5.503	-.239	-5.037
	.930	.415	.000	4.417	-.382	-5.510
	.940	.288	.000	3.469	-.541	-6.039
	.950	.189	.000	2.643	-.723	-6.644
	.960	.115	.000	1.929	-.937	-7.357
	.970	.063	.000	1.316	-1.201	-8.235



2. Replikasi 2

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log (Konsentrasi) <sup>b</sup>	
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound
PROBIT <sup>a</sup> .010	23826844.992	95500.809	3.522E20	7.377	4.980
.020	6571673.671	44033.573	5.056E18	6.818	4.644
.030	2902437.878	26894.176	3.430E17	6.463	4.430
.040	1569551.845	18538.031	4.537E16	6.196	4.268
.050	951923.658	13684.520	8.760E15	5.979	4.136
.060	621946.923	10560.860	2.162E15	5.794	4.024
.070	428230.000	8409.256	6.345E14	5.632	3.925
.080	306589.412	6853.650	2.118E14	5.487	3.836
.090	226243.639	5687.286	7.812E13	5.355	3.755
.100	171036.128	4787.619	3.121E13	5.233	3.680
.150	53714.671	2332.622	7.031E11	4.730	3.368
.200	21395.798	1304.699	3.483E10	4.330	3.116
.250	9713.287	784.569	2.671E9	3.987	2.895
.300	4779.423	491.086	2.693E8	3.679	2.691
.350	2477.286	313.479	32613711.325	3.394	2.496
.400	1327.884	200.753	4486479.877	3.123	2.303
.450	726.344	126.815	677071.312	2.861	2.103
<b>.500</b>	<b>401.124</b>	77.283	109936.515	2.603	1.888
.550	221.521	43.865	19165.808	2.345	1.642
.600	121.171	21.797	3676.944	2.083	1.338
.650	64.950	8.534	827.343	1.813	.931
.700	33.665	2.302	237.020	1.527	.362
.750	16.565	.393	87.603	1.219	-.405
.800	7.520	.042	38.272	.876	-1.382
.850	2.995	.003	17.600	.476	-2.602
.900	.941	.000	7.548	-.027	-4.194
.910	.711	.000	6.226	-.148	-4.583
.920	.525	.000	5.068	-.280	-5.008
.930	.376	.000	4.057	-.425	-5.477
.940	.259	.000	3.175	-.587	-6.002
.950	.169	.000	2.410	-.772	-6.602
.960	.103	.000	1.750	-.989	-7.309
.970	.055	.000	1.187	-1.256	-8.181

3. Replikasi 3

Probability		Confidence Limits			95% Confidence Limits for log (Konsentrasi)
		95% Confidence Limits for Konsentrasi			
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	.010	3.134E8	8825064.247	1.852E11	8.496
	.020	63923085.454	2547400.993	2.012E10	7.806
	.030	23311118.078	1157241.505	4.925E9	7.368
	.040	10914443.143	638924.846	1.709E9	7.038
	.050	5887470.021	393967.683	7.228E8	6.770
	.060	3481421.354	260979.334	3.476E8	6.542
	.070	2196313.222	181836.675	1.830E8	6.342
	.080	1453993.070	131547.007	1.030E8	6.163
	.090	999192.129	97977.184	61112181.184	6.000
	.100	707435.770	74689.802	37796923.986	5.850
	.150	169357.453	24224.875	5182200.374	5.229
	.200	54368.384	9863.288	1072194.016	4.735
	.250	20511.787	4544.892	278588.252	4.312
	.300	8547.290	2256.006	83432.152	3.932
	.350	3797.866	1172.083	27455.118	3.580
	.400	1758.944	624.805	9637.007	3.245
	.450	835.266	336.212	3538.560	2.922
	.500	401.352	179.678	1342.340	2.604
	.550	192.853	93.505	522.926	2.285
	.600	91.580	46.120	209.477	1.962
	.650	42.414	20.799	86.915	1.628
	.700	18.846	8.260	37.416	1.275
	.750	7.853	2.807	16.367	.895
	.800	2.963	.791	6.954	.472
	.850	.951	.173	2.686	-.022
	.900	.228	.025	.840	-.643
	.910	.161	.015	.637	-.793
	.920	.111	.009	.472	-.956
	.930	.073	.005	.339	-1.135
	.940	.046	.003	.235	-1.335
	.950	.027	.001	.155	-1.563
	.960	.015	.001	.095	-1.831
	.970	.007	.000	.052	-2.161
	.980	.003	.000	.024	-2.599
	.990	.001	.000	.007	-3.289

**E. Hasil Uji t Tidak Berpasangan**

## 1. Uji Normalitas Shapiro-Wilk

**Tests of Normality**

Senyawa		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50	5-FU	.267	3	.	.952	3	.577
	TFU	.262	3	.	.956	3	.598

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan:

Syarat penerimaan  $\alpha > 0,05$

$\alpha$  senyawa 5-FU = 0,577 sementara  $\alpha$  senyawa TFU = 0,598, Keduanya  $> 0,05$  sehingga data dianggap normal,

## 2. Uji T Tidak Berpasangan

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means		
		Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
IC50	Equal variances assumed	.001	3815.27933	462.04125
	Equal variances not assumed	.014	3815.27933	462.04125

**Independent Samples Test**

		t-test for Equality of Means	
		95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper
IC50	Equal variances assumed	2532.44717	5098.11150
	Equal variances not assumed	1827.27711	5803.28156

Keterangan :

Syarat  $\alpha < 0,05$

Nilai sig (2-tailed) atau  $\alpha = 0,014$ , Disimpulkan ada perbedaan bermakna secara statistik antara IC<sub>50</sub> TFU dan IC<sub>50</sub> 5-FU,

**F. Preparasi Uji *Doubling Time*****F.1. Preparasi Larutan Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU**

Penimbangan larutan induk senyawa 5-FU:

$$\mu\text{M} = \frac{\text{massa}(mg)}{BM(\frac{g}{mol})} \times \frac{10^6}{\text{Volume}(\mu\text{l})}$$

$$20,000 \mu\text{M} = \frac{m}{130,08 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{1000 \mu\text{l}}$$

$$m = 2,6016 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan induk 20,000  $\mu\text{M}$  = 2,6016 mg +DMSO 100  $\mu\text{l}$ , + PBS 900  $\mu\text{l}$

Pengenceran larutan induk:

$$2100 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20,000 \mu\text{M}$$

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

$$4200 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20,000 \mu\text{M}$$

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

$$6300 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 20,000 \mu\text{M}$$

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

**F.2. Preparasi Larutan Uji *Doubling Time* Senyawa TFU**

Penimbangan larutan induk senyawa TFU:

$$\mu\text{M} = \frac{\text{massa}(mg)}{BM(\frac{g}{mol})} \times \frac{10^6}{\text{Volume}(\mu\text{l})}$$

$$2000 \mu\text{M} = \frac{m}{332,04 \text{ g/mol}} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{l}}$$

$$m = 0,265 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan induk 2000  $\mu\text{M}$  = 0,265 mg +DMSO 40  $\mu\text{l}$ , + PBS 360  $\mu\text{l}$

Pengenceran larutan induk:

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

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

$$400 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 200 \mu\text{l} + \text{Media Komplit } 800 \mu\text{l}$$

$$600 \mu\text{M} = \frac{x}{1000\mu\text{l}} \times 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 300 \mu\text{l} + \text{Media Komplit } 700 \mu\text{l}$$

## G. Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa

### G.1. Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU

#### 1. Inkubasi 24 Jam

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata- rata	% Viabilitas
2100	0,790	0,925	0,953	0,889	42,5 %
4200	0,893	0,869	0,777	0,846	40,1 %
6300	0,790	0,817	0,803	0,803	37,7 %
Kontrol Media	0,123	0,128	0,127	0,128	-
Kontrol Sel	2,073	2,241	1,442	1,919	-

Contoh Perhitungan :

Perhitungan absorbansi rata- rata kontrol sel dan media:

$$\text{Rata- rata Absorbansi} = \frac{\text{Abs } 1 + \text{Abs } 2 + \text{Abs } n}{n}$$

$$\text{Rata- rata Absorbansi kontrol sel} = \frac{2,073 + 2,241 + 1,442}{3} = \frac{5,76}{3} = 1,918$$

$$\text{Rata- rata Absorbansi kontrol media} = \frac{0,123 + 0,128 + 0,132}{3} = \frac{0,383}{3} = 0,128$$

Perhitungan % sel hidup dari absorbansi rata- rata dihitung dengan persamaan berikut:

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

Konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (2100  $\mu\text{M}$ )

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,790 + 0,925 + 0,953}{3} = \frac{2,668}{3} = 0,889$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,889 - 0,128}{1,918 - 0,128} \times 100 \% = 42,5\%$$



Konsentrasu IC<sub>50</sub> (4200 µM)

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,893+0,869+0,777}{3} = \frac{2,539}{3} = 0,846$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,846-0,128}{1,918-0,128} \times 100 \% = 40,1 \%$$

Konsentrasi 1 ½ IC<sub>50</sub> (6300 µM)

$$\text{Rata- rata absorbansi} = \frac{0,790+0,817+0,803}{3} = \frac{2,410}{3} = 0,803$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,803-0,128}{1,92-0,128} \times 100 \% = 37,7 \%$$

Perhitungan Jumlah Sel Hidup :

Perhitungan jumlah sel hidup diperoleh dengan mengalikan % sel hidup yang diperoleh pada masing- masing konsentrasi dengan jumlah sel awal seperti persamaan berikut:

$$\text{Jumlah sel hidup} = \% \text{ sel hidup} \times 5000 \text{ sel (dibulatkan)}$$

Konsentrasi ½ IC<sub>50</sub> (2100 µM)

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{42,5}{100} \times 5000 = 2124,5 \text{ sel}$$

Konsentrasi IC<sub>50</sub> (4200 µM)

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{40,1}{100} \times 5000 = 2005,4 \text{ sel}$$

Konsentrasi 1½ IC<sub>50</sub> (6300 µM)

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{37,7}{100} \times 5000 = 1885,35$$

2. Inkubasi 48 Jam

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rata- Rata	% Viabilitas
200	1,116	1,108	1,165	1,129	52,8%
400	1,033	1,107	0,954	1,001	45,9%
600	0,974	0,862	0,907	0,914	41,4%
Kontrol Media	0,135	0,127	0,136	0,133	-
Kontrol Sel	2,276	1,884	1,904	2,021	-

## 3. Inkubasi 72 Jam

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rata- Rata	% Viabilitas
2100	1,696	1,837	1,570	1,170	67,4%
4200	1,511	1,564	1,579	1,551	60,5%
6300	1,589	1,421	1,423	1,478	57,2%
Kontrol Media	0,232	0,218	0,210	0,220	-
Kontrol Sel	2,552	2,458	2,249	2,419	-

G.2. Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa TFU

## 1. Inkubasi 24 Jam

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rata- rata	% Viabilitas
200	0,285	0,318	0,334	0,312	10,4%
400	0,192	0,191	0,195	0,193	3,78%
600	0,172	0,195	0,184	0,184	3,28%
Kontrol Media	0,121	0,124	0,127	0,124	-
Kontrol Sel	2,094	2,282	1,449	1,942	-

Contoh Perhitungan :

Perhitungan absorbansi rata- rata kontrol sel dan media

$$\text{Rata- rata Absorbansi} = \frac{\text{Abs 1} + \text{Abs 2} + \text{Abs n}}{n}$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol sel} = \frac{2,094 + 2,282 + 1,449}{3} = \frac{5,825}{3} = 1,941$$

$$\text{Rata- rata absorbansi kontrol media} = \frac{0,121 + 0,124 + 0,127}{3} = \frac{0,372}{3} = 0,124$$

Perhitungan % sel hidup dari absorbansi rata- rata dihitung dengan persamaan berikut:

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

Konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (200  $\mu$ M)

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,285+0,318+0,334}{3} = 0,312$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,312-0,124}{1,941-0,124} \times 100 \% = 10,4\%$$

Konsentrasi IC<sub>50</sub> (400  $\mu$ M)

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,164+0,174+0,168}{3} = 0,192$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,192-0,124}{1,941-0,124} \times 100 \% = 3,78 \%$$

Konsentrasi  $1\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (600  $\mu$ M)

$$\text{Rata-rata absorbansi} = \frac{0,163+0,152+0,166}{3} = 0,138$$

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{0,183-0,124}{1,941-0,124} \times 100 \% = 3,28 \%$$

Perhitungan Jumlah Sel Hidup :

Perhitungan jumlah sel hidup diperoleh dengan mengalikan % sel hidup yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi dengan jumlah sel awal seperti persamaan berikut:

$$\text{Jumlah sel hidup} = \% \text{ sel hidup} \times 5000 \text{ sel (dibulatkan)}$$

Konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (200  $\mu$ M)

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{10,36}{100} \times 5000 = 518,1 \text{ sel}$$

Konsentrasi IC<sub>50</sub> (400  $\mu$ M)

$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{6,12}{100} \times 5000 = 306,3 \text{ sel}$$

Konsentrasi  $1\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> (600  $\mu$ M)

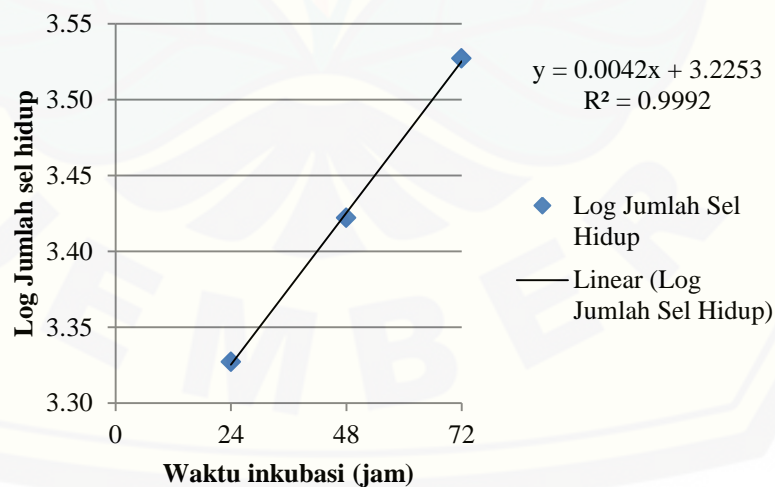
$$\text{Jumlah sel hidup} = \frac{3,28}{100} \times 5000 = 164,1 \text{ sel}$$

## 2. Inkubasi 48 Jam

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata- Rata	% Viabilitas
200	0,367	0,412	0,405	0,395	13,9%
400	0,307	0,279	0,291	0,292	8,45%
600	0,211	0,211	0,21	0,211	4,13%
Kontrol Media	0,135	0,127	0,136	0,133	-
Kontrol Sel	2,276	1,884	1,904	2,021	-

## 3. Inkubasi 72 Jam

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata- rata	% Viabilitas
200	0,572	0,603	0,552	0,576	15,5%
400	0,458	0,450	0,450	0,453	10,1%
600	0,307	0,367	0,346	0,340	5,23%
Kontrol Media	0,223	0,215	0,221	0,220	-
Kontrol Sel	2,586	2,651	2,318	2,518	-

H. Grafik Uji *Doubling Time*H.1. Grafik *Doubling Time* Senyawa 5-FU1. Konsentrasi  $\frac{1}{2}$   $\text{IC}_{50}$ 

Contoh perhitungan nilai *Doubling time*:

Nilai *Doubling time* diperoleh dengan memasukkan 2 kali log jumlah sel hidup awal ke dalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva log jumlah sel hidup vs waktu inkubasi. Nilai *Doubling time* dihitung tiap konsentrasi uji dan dalam satuan jam. Berikut ini merupakan persamaan untuk mencari nilai *Doubling time*

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

- Y = Log 2 kali jumlah sel awal (Log 10000 sel)  
 b = slope  
 x = nilai *Doubling time* (jam)  
 a = intercept

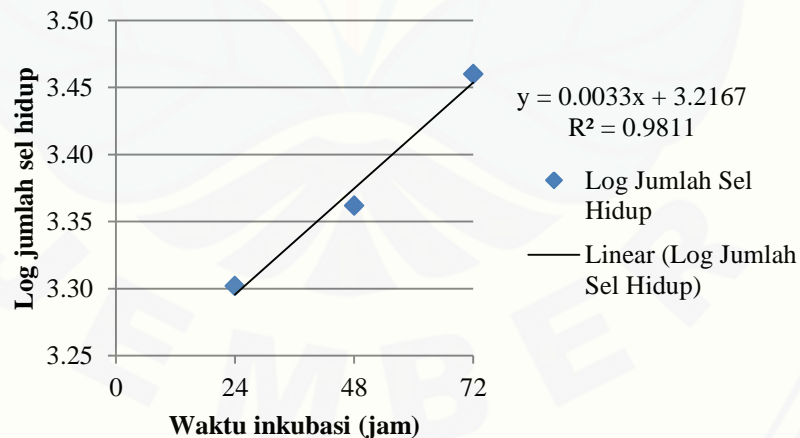
$$y = 0,0042x + 3,2253$$

$$\text{Log } 10000 = 0,0042x + 3,2253$$

$$3 = 0,0042x + 3,2253$$

$$x = 184,45 \text{ jam}$$

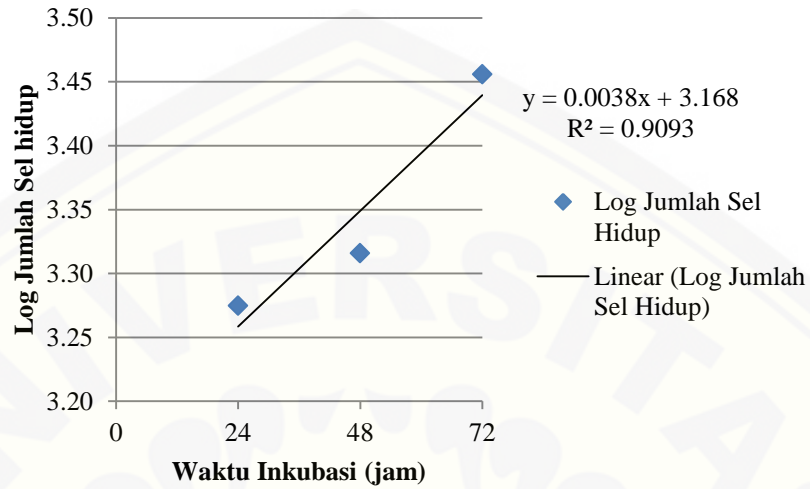
## 2. Konsentrasi IC<sub>50</sub>



Persamaan :

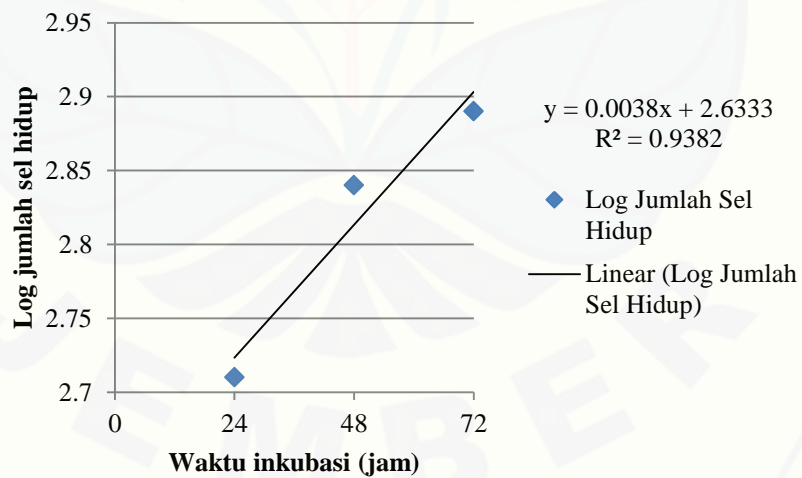
$$y = 0.0033x + 3.2167$$



3. Konsentrasi  $1\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>

Persamaan :

$$y = 0.0038x + 3.168$$

H.2. Grafik *Doubling Time* Senyawa 5-FU1. Konsentrasi  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>

Contoh perhitungan nilai *Doubling time*:

Nilai *Doubling time* diperoleh dengan memasukkan 2 kali log jumlah sel hidup awal ke dalam persamaan regresi yang diperoleh dari kurva log jumlah sel hidup vs waktu inkubasi. Nilai *Doubling time* dihitung tiap konsentrasi uji dan dalam satuan jam. Berikut ini merupakan persamaan untuk mencari nilai *Doubling time*

$$Y = bx + a$$

Keterangan:

- Y = Log 2 kali jumlah sel awal (Log 10000 sel)  
 b = slope  
 x = nilai *Doubling time* (jam)  
 a = intercept

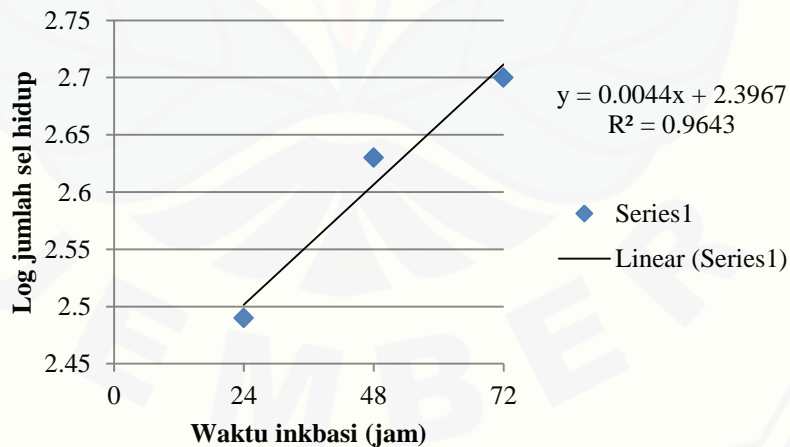
$$y = 0,0038x + 2,6333$$

$$\text{Log } 10000 = 0,0038x + 2,6333$$

$$3 = 0,0038x + 2,6333$$

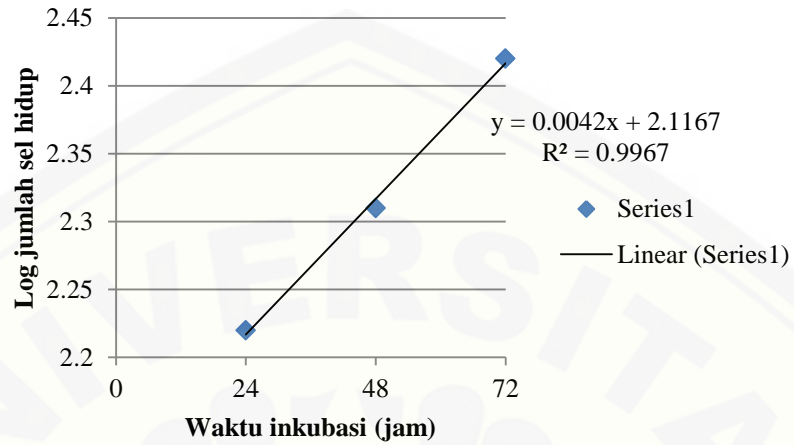
$$x = 359,66 \text{ jam}$$

## 2. Konsentrasi IC<sub>50</sub>



Persamaan :

$$y = 0.0044x + 2.3967$$

3. Konsentrasi  $1\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>

Persamaan:

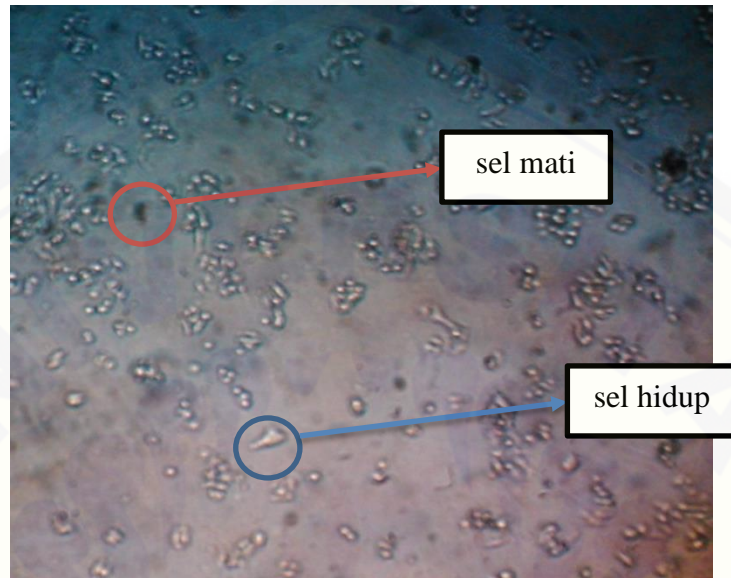
$$y = 0.0042x + 2.1167$$

**I. Foto Sel MCF-7**

## I.1 Sel MCF-7 sebelum perlakuan



I.2 Sel MCF-7 setelah Perlakuan TFU



I.3 Bentuk Kristal Formazan didalam sel

