



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA
1-(3-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

SKRIPSI

Oleh

**Awalia Annisafira
NIM 112210101065**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA
1-(3-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

SKRIPSI

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

Oleh

**Awalia Annisafira
NIM 112210101065**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu terhebat Dra.Siti Mustamaroh dan Ayah terhebat Suharno,S.Pd yang telah banyak memberikan dukungan dan pengorbanan baik berupa dukungan finansial, fisik maupun batin;
2. Adik tersayang Asyhar Masyhuda yang telah memberikan dorongan semangat;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

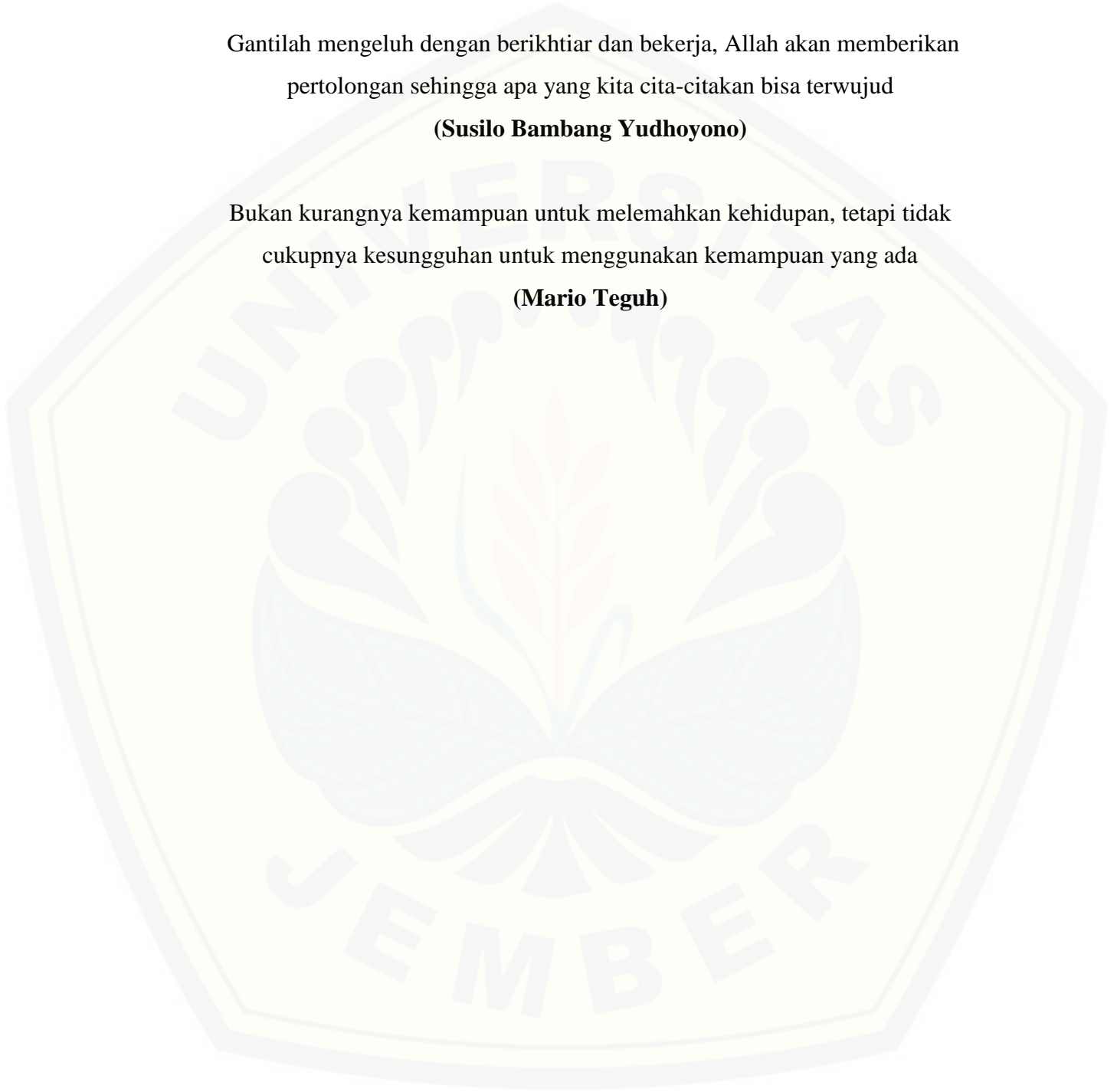
MOTTO

Gantilah mengeluh dengan berikhtiar dan bekerja, Allah akan memberikan pertolongan sehingga apa yang kita cita-citakan bisa terwujud

(Susilo Bambang Yudhoyono)

Bukan kurangnya kemampuan untuk melemahkan kehidupan, tetapi tidak cukupnya kesungguhan untuk menggunakan kemampuan yang ada

(Mario Teguh)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Awalia Annisafira

NIM : 112210101065

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)”** adalah hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 18 Mei 2015

Yang menyatakan,

(Awalia Annisafira)

NIM 112210101065

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA
1-(3-KLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL TERHADAP
SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

Oleh

Awalia Annisafira

NIM 112210101065

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul **“Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)”** telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari : Senin
Tanggal : 18 Mei 2015
Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Ayik Rosita P.,S.Farm.,M.Farm.,Apt.
NIP. 198102012006042001

Dosen Penguji I,

Endah Puspitasari,S.Farm.,M.Sc.,Apt.
NIP. 198107232006042002

Dosen Pembimbing Anggota,

Dian Agung P.,S.Farm.,M.Farm.,Apt.
NIP. 198410082008121004

Dosen Penguji II,

Lestyo Wulandari,S.Si.,Apt.,M.Farm.
NIP. 197604142002122001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7); Awalia Annisafira, 112210101065; 2015: 45 Halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker merupakan penyakit yang terjadi akibat pembelahan sel yang tidak terkendali sehingga menyebabkan mutasi gen, kerusakan jaringan dan organ. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, kanker payudara merupakan jenis kanker dengan prevalensi tertinggi dengan proporsi sebesar 28,7%. Penderita kanker yang semakin meningkat menyebabkan kebutuhan obat antikanker semakin tinggi sehingga dibutuhkan sintesis obat baru dengan cara pengembangan obat dan usaha penemuan obat baru dengan cara modifikasi struktur.

5-fluorourasil (5-FU) merupakan salah satu senyawa antimetabolit yang berpotensi sebagai antikanker. Berdasarkan teori HKSA dan pendekatan Topliss, penambahan alkil benzena, ester, dan Cl pada posisi *-meta* melalui sintesis ester dengan 3-klorobenzoilklorida dapat meningkatkan aktivitas senyawa turunan 5-fluorourasil yaitu 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (3-CIFU). Senyawa tersebut telah dilakukan sintesis namun belum dilakukan uji aktivitas terhadap sel kanker. Tujuan penelitian adalah untuk menentukan nilai IC_{50} senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7, mendapatkan aktivitas sitotoksik senyawa 3-CIFU sebagai antikanker pada sel MCF-7 dibandingkan senyawa 5-FU dan menentukan nilai *doubling time* pada pengamatan kinetika proliferasi sel MCF-7 senyawa 3-CIFU dibandingkan senyawa 5-FU.

Tahapan uji aktivitas terbagi menjadi 2 tahap yaitu uji sitotoksitas dan uji *doubling time*. Sebelum dilakukan uji aktivitas, senyawa dilakukan pemurnian secara kromatografi kolom, KLT-Densitometri, jarak lebur dan identifikasi senyawa secara FTIR-KBr. Uji kemurnian secara KLT-Densitometri, uji jarak lebur dan identifikasi struktur menggunakan FTIR-KBr menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis fraksi

20-28 dapat dikatakan murni dan merupakan senyawa 3-CIFU karena menghasilkan noda tunggal pada eluen-1 heksan:aseton (6:4) dengan R_f rata-rata 0,43, eluen-2 heksan:etil asetat (6:4) dengan R_f rata-rata 0,42 dan eluen-3 heksan:etil asetat:aseton (5:3:2) dengan R_f rata-rata 0,74, memiliki noda tunggal pada KLT dua arah, memiliki spektra dengan panjang gelombang maksimum yang sama dengan sintesis sebelumnya (Aswika, 2012), memiliki puncak berbeda dengan senyawa pembanding dan memiliki nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ 0,99. Senyawa memiliki jarak lebur 166-167°C dan identifikasi struktur menggunakan FTIR-KBr menunjukkan bahwa senyawa produk adalah senyawa 3-CIFU.

Pada uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7, senyawa 3-CIFU (IC_{50} rata-rata = 894,320 μ M) memiliki aktivitas lebih besar dibandingkan senyawa 5-FU (IC_{50} rata-rata = 4213,709 μ M). Aktivitas keduanya memiliki perbedaan bermakna secara statistik dengan nilai $p = 0,02$ ($p < 0,05$). Tahap selanjutnya yaitu uji *doubling time* dengan menggunakan konsentrasi 0,5 IC_{50} , 1 IC_{50} , dan 1,5 IC_{50} . Nilai *doubling time* senyawa 5-FU dengan konsentrasi 0,5 IC_{50} = 185,985 jam, 1 IC_{50} = 213,730 jam, 1,5 IC_{50} = 220,631 jam dengan kontrol sel 53,937 jam dan nilai *doubling time* senyawa 3-CIFU dengan konsentrasi 0,5 IC_{50} = 209,845 jam, 1 IC_{50} = 224,457 jam, 1,5 IC_{50} = 239,005 jam dengan kontrol sel 50,695 jam. Nilai *doubling time* yang besar pada senyawa 3-CIFU menunjukkan penghambatan proliferasi sel MCF-7 lebih besar daripada senyawa 5-FU.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, karunia, kekuatan, kesehatan, dan kemudahan dalam menjalankan perkuliahan sampai akhirnya mampu menyelesaikan skripsi;
2. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ayik Rosita P., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi;
4. Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dosen Penguji II yang telah banyak memberikan saran positif demi kebaikan skripsi;
5. Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Orang tua, adik dan seluruh keluarga tercinta untuk doa dan dukungannya selama ini hingga terselesaikannya skripsi ini;
7. Rekan satu tim Meyladia Sukma Ayu, Nurhidayati Fadhilah, Puspita Arum Wijayanti, dan Eka Mustika yang selalu berusaha kompak dan semangat dalam menjalani lika-liku penelitian skripsi;

8. Wahyu Relly Setiawan, S.Farm yang telah memberikan motivasi, dorongan dan dukungan;
9. Bu Atin selaku teknisi Laboratorium Parasitologi UGM yang telah membimbing dan memberi arahan kepada penulis selama penelitian;
10. Bu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Unej yang telah membimbing penulis selama penelitian;
11. Teman seperjuangan Farmasi Unej 2011 (ASMEF) yang telah memberikan semangat, pengalaman, dukungan dan motivasi selama kuliah;
12. Teman-teman kos Kaldema yang telah banyak membantu dan perhatian kepada penulis selama berada di Jember;
13. Semua pihak yang telah membantu baik dalam perkuliahan, penelitian maupun penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan sehingga diharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2015

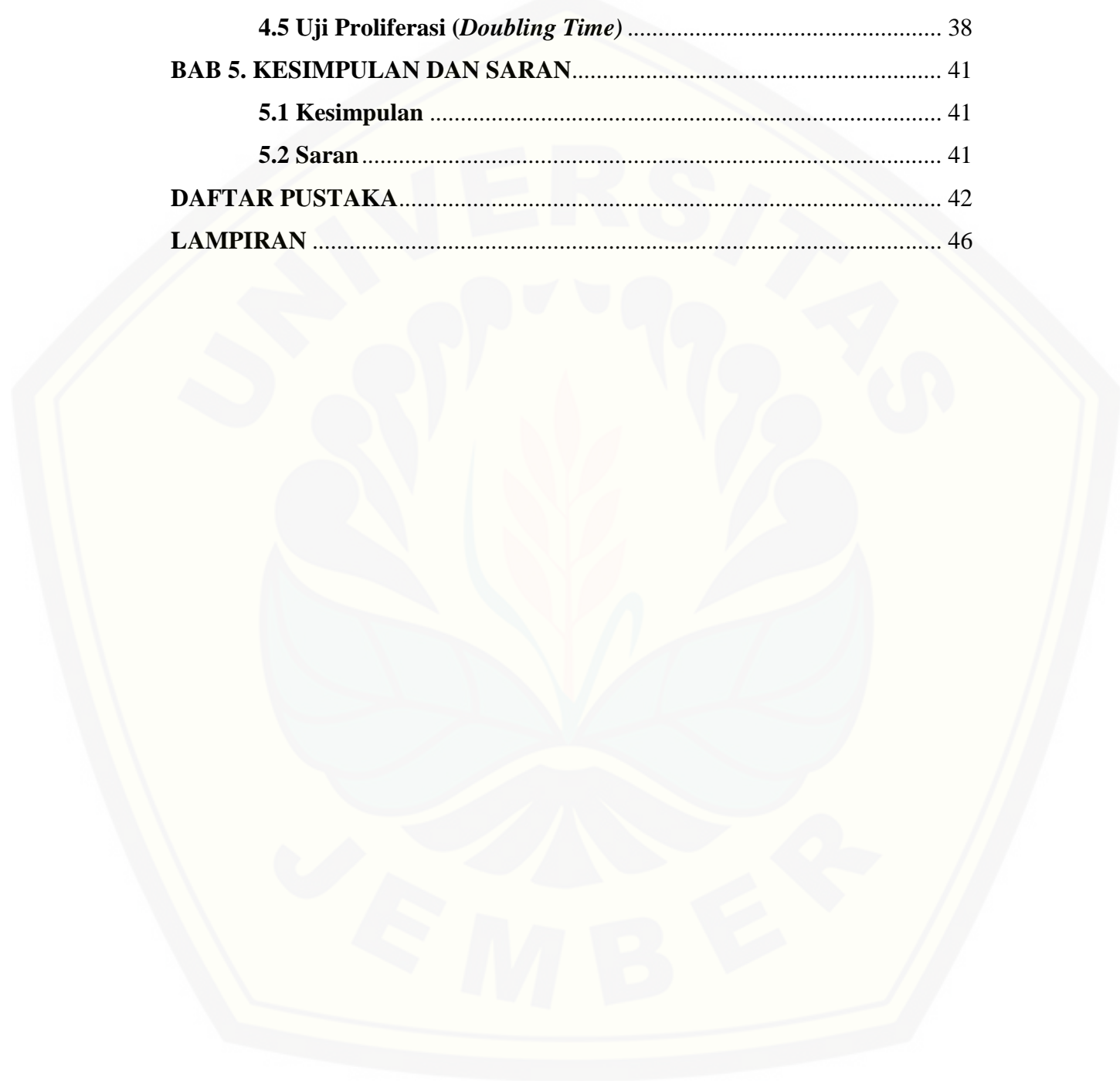
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kanker	5
2.2 Kanker Payudara	7
2.2 Obat Antikanker	8
2.3 5-fluorourasil	11
2.4 1-(3-Klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil	13
2.5 MCF-7 Cell Line	16
2.6 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT dan Uji Doubling Time	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	20

3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Rancangan Penelitian	20
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.3.1 Tempat Penelitian	20
3.3.2 Waktu Penelitian	21
3.4 Definisi Operasional	21
3.4.1 Uji Sitotoksisitas	21
3.4.2 Uji Proliferasi (<i>Doubling Time</i>)	21
3.5 Variabel Penelitian	22
3.5.1 Variabel Bebas	22
3.5.2 Variabel Terikat	22
3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan	22
3.6.1 Alat	22
3.6.2 Bahan	22
3.7 Prosedur Penelitian	23
3.6.1 Pembuatan Larutan Sampel dan Pembanding	23
3.6.2 Uji Sitotoksisitas	23
3.6.3 Uji Proliferasi (<i>Doubling Time</i>)	24
3.8 Analisis Data	25
3.8.1 Uji Sitotoksisitas	25
3.8.2 Uji Proliferasi (<i>Doubling Time</i>)	25
3.8.3 Analisis Statistik	26
3.9 Skema Penelitian	26
3.9.1 Pembuatan Larutan Sampel dan Pembanding	26
3.9.2 Uji Sitotoksisitas	27
3.9.3 Uji Proliferasi (<i>Doubling Time</i>)	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Uji Kemurnian Senyawa dengan KLT-Densitometri	29
4.2 Uji Jarak Lebur	33

4.3 Identifikasi Struktur dengan FTIR-KBr.....	34
4.4 Uji Sitotoksitas	36
4.5 Uji Proliferasi (<i>Doubling Time</i>)	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Hubungan siklus sel dengan obat golongan utama.....	9
2.2 Perbandingan karakteristik spektrum inframerah antara senyawa 3-CIFU dengan literatur	15
2.3 Perbandingan spektrum proton NMR antara senyawa 3-CIFU dengan literatur.....	16
4.1 Data Kromatografi Lapis Tipis (KLT) senyawa hasil sintesis	31
4.2 Hasil pengukuran jarak lebur.....	34
4.3 Perbandingan karakteristik spektrum inframerah antara senyawa 3-CIFU dengan literatur	35
4.4 Hasil uji sitotoksitas senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT.....	37
4.5 Hasil uji <i>doubling time</i> senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7 ...	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1.1 Struktur 5-FU.....	2
2.1 Skema karsinogenesis.....	6
2.2 Siklus sel.....	8
2.3 Struktur 5-FU.....	11
2.4 Mekanisme kerja 5-FU	13
2.5 Struktur 3-CIFU	13
2.6 Spektrum inframerah identifikasi gugus fungsi senyawa 3-CIFU menggunakan FTIR-KBr	14
2.7 Spektrum uji identifikasi struktur senyawa 3-CIFU menggunakan spektroskopi ¹ HNMR	16
2.8 Sel MCF-7	17
2.9 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan	18
3.1 Bagan rancangan penelitian.....	20
4.1 Hasil eluasi kromatografi kolom fraksi 2-28.....	30
4.2 Spektra hasil kromatografi kolom	30
4.3 Hasil KLT produk hasil sintesis	31
4.4 Hasil KLT dua dimensi senyawa hasil sintesis.....	32
4.5 Spektra senyawa fraksi 20-28 menggunakan fase gerak heksan:aseton (6:4), heksan:etil asetat (6:4), heksan:etil asetat:aseton (5:3:2) dan spektra senyawa CIFU Aswika (2012).....	32
4.6 Perbandingan kromatogram noda asam benzoat, 5-FU, 3-klorobenzoil- klorida dan fraksi 20-28.....	33
4.7 Spektrum inframerah identifikasi gugus fungsi senyawa 3-CIFU menggunakan FTIR-KBr.	34
4.8 Profil viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan dengan senyawa 5-FU dan 3-CIFU.....	37

4.9 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan 3-CIFU.....40



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Nilai korelasi hasil uji <i>purity</i> dengan KLT-Densitometri.....	46
B. Pembuatan larutan uji sitotoksisitas senyawa (5-FU dan 3-CIFU).....	47
C. Pembuatan larutan uji <i>doubling time</i> senyawa (5-FU dan 3-CIFU)	49
D. Perhitungan hasil uji sitotoksisitas.....	51
E. Perhitungan hasil uji <i>doubling time</i>	54
F. Hasil perhitungan IC_{50} menggunakan probit	56
G. Hasil analisis uji t.....	66
H. <i>Certificate of analysis</i> (COA) 5-FU	67

BAB 1. PENDAHULUAN

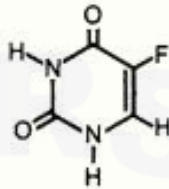
1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang terjadi akibat pembelahan sel yang tidak terkendali sehingga menyebabkan mutasi gen, kerusakan jaringan dan organ. Kanker merupakan salah satu penyebab kematian di seluruh dunia, 25% penduduk Amerika Serikat diperkirakan dalam perjalanan hidupnya akan memperoleh diagnosa kanker dan setiap harinya ditemukan satu juta pasien kanker baru (Mycek, 2001). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, prevalensi tumor/kanker di Indonesia adalah 1,4 per 1000 penduduk. Berdasarkan data tersebut, kanker payudara merupakan jenis kanker tertinggi pada pasien rawat inap maupun rawat jalan di seluruh rumah sakit di Indonesia, dengan proporsi sebesar 28,7% (Depkes RI, 2013).

Semakin berkembangnya jaman, penderita kanker semakin meningkat dan kebutuhan obat antikanker semakin tinggi (Depkes RI, 2013). Peningkatan kebutuhan obat antikanker ini menyebabkan dibutuhkannya sintesis obat baru dengan cara pengembangan obat dan usaha penemuan obat baru dengan cara modifikasi struktur (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Mekanisme kerja obat-obat kanker menurut Mycek (2001) di antaranya adalah antimetabolit (5-fluorourasil), antibiotik yang berinteraksi dengan DNA (plikamisin), zat alkilator (nitrosurea), inhibitor mikrotubulus (vinkristin, vinblastin), hormon steroid dan antagonisnya (esterogen), dan obat kemoterapi lain (prokarbazin, L-asparaginase, dan interferon).

5-fluorourasil (5-FU) merupakan salah satu senyawa antimetabolit yang berpotensi sebagai antikanker dimana pertama kali disintesis pada tahun 1957 (Tian *et al.*, 2007). 5-FU bekerja secara antagonis dengan pirimidin terhadap aktivitas enzim timidilat sintetase (TS). 5-FU merupakan prodrug, metabolisme 5-FU menghasilkan fluoridin-5 -trifosfat (FUTP) yang bergabung ke dalam RNA sehingga

mempengaruhi fungsinya, dan fluorodeoksiuridilat (FdUMP) yang menghambat replikasi DNA (Longley *et al.*, 2003). Aktivitas 5-FU dalam pemacuan apoptosis dapat melalui jalur p53, hal ini dibuktikan dengan 5-FU yang dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker yang mengalami defisiensi (Levrero *et al.*, 2000).



Gambar 1.1. Struktur 5-FU (Malet-Martino dan Martino, 2002)

Aswika (2012) telah mensintesis senyawa antikanker baru yaitu 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (3-CIFU) yang merupakan turunan dari 5-FU melalui substitusi gugus alkil benzena, ester dan kloro pada posisi *-meta* melalui sintesis ester dengan 3-klorobenzoilklorida karena sifat benzoil yang lebih reaktif dan tidak memerlukan katalis. Senyawa 3-CIFU telah dilakukan sintesis namun belum dilakukan uji aktivitas terhadap sel kanker.

Berdasarkan teori HKSA dan pendekatan Topliss, penambahan alkil benzena, ester, dan Cl pada posisi *-meta* melalui sintesis ester dengan 3-klorobenzoilklorida dapat meningkatkan aktivitas senyawa turunan 5-FU berdasarkan peningkatan sifat lipofilik, sterik dan elektronik (Aswika, 2012). Sehingga perlu dibuktikan melalui uji aktivitasnya terhadap sel kanker.

Uji aktivitas senyawa 3-CIFU sebagai antikanker menggunakan sel kanker payudara (MCF-7) yang umum digunakan dalam uji aktivitas antikanker secara *in vitro*. Sel MCF-7 adalah sel kanker dimana p53 belum bermutasi karena mekanisme 5-FU umumnya melalui jalur transduksi p53 (Crawford, 2002). Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara monolayer dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara (Liu, 2006).

Berdasarkan uraian di atas, maka timbul pemikiran dalam menguji aktivitas senyawa 3-CIFU secara *in vitro* sebagai antikanker menggunakan sel MCF-7 untuk mendapatkan nilai IC_{50} menggunakan uji sitotoksitas dan nilai *doubling time* pada pengamatan kinetika proliferasi sel MCF-7 menggunakan metode MTT. Aktivitas sitotoksik dinyatakan dalam nilai IC_{50} (konsentrasi terkecil yang menyebabkan kematian sel sebanyak 50% dari populasi) yang dihitung menggunakan probit. Sedangkan nilai *doubling time* dihitung dengan menggunakan hasil regresi linear antara kurva waktu inkubasi (jam) vs log jumlah sel hidup. Hasil uji sitotoksitas dianalisis menggunakan uji t sedangkan hasil uji *doubling time* senyawa 3-CIFU dibandingkan dengan senyawa 5-FU menggunakan grafik waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapa nilai IC_{50} senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7?
2. Bagaimana aktivitas sitotoksik senyawa 3-CIFU sebagai antikanker pada sel MCF-7 dibandingkan senyawa 5-FU?
3. Bagaimana nilai *doubling time* pada pengamatan kinetika proliferasi sel MCF-7 senyawa 3-CIFU dibandingkan senyawa 5-FU?

1.3 Tujuan Penelitian

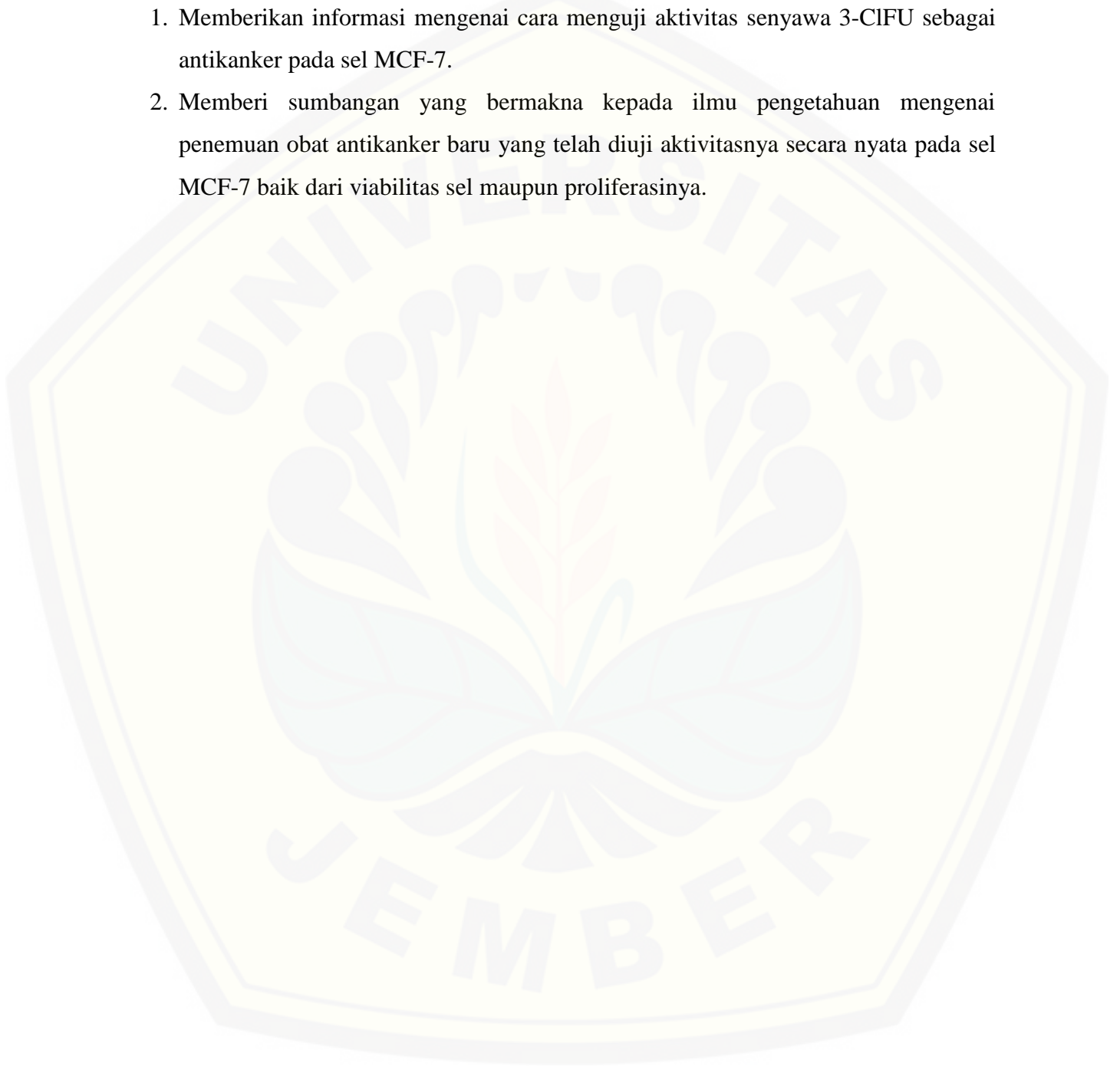
Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan nilai IC_{50} senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7.
2. Mendapatkan aktivitas sitotoksik senyawa 3-CIFU sebagai antikanker pada sel MCF-7 dibandingkan senyawa 5-FU.
3. Menentukan nilai *doubling time* pada pengamatan kinetika proliferasi sel MCF-7 senyawa 3-CIFU dibandingkan senyawa 5-FU.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai cara menguji aktivitas senyawa 3-CIFU sebagai antikanker pada sel MCF-7.
2. Memberi sumbangan yang bermakna kepada ilmu pengetahuan mengenai penemuan obat antikanker baru yang telah diuji aktivitasnya secara nyata pada sel MCF-7 baik dari viabilitas sel maupun proliferasinya.



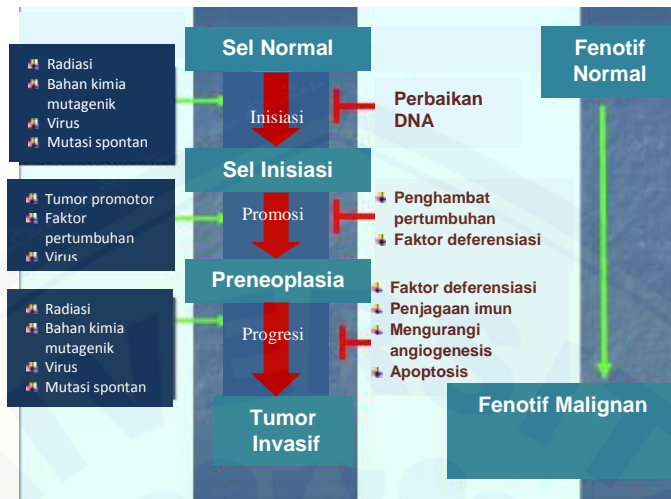
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker adalah suatu penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler. Sifat umum dari kanker antara lain pertumbuhan berlebihan, gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan, bersifat *invasive*, bersifat metastatik, memiliki hereditas bawaan, dan pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Nafrialdi dan Gan, 2012).

Sel kanker mengganggu tubuh karena menyebabkan desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran jaringan tempat tumor berkembang atau bermetastasis dan gangguan sistemik lain sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (Nafrialdi dan Gan, 2012).

Perubahan sel normal menjadi sel kanker melalui 3 tahap yaitu tahap inisiasi, promosi dan progresi. Pada tahap inisiasi diawali dengan kegagalan mekanisme DNA *repair* sehingga paparan inisiator yang memulai pertumbuhan sel yang abnormal seperti hormon, radiasi, mutasi spontan dan bahan kimia mutagenik pada sel yang terinisiasi menyebabkan terjadinya perubahan urutan nukleotida DNA protoonkogen sehingga ekspresi gen berubah meskipun jaringan masih terlihat normal. Pada tahap promosi dipicu oleh promosi seperti tumor promotor, *growth* faktor, virus sehingga terbentuk sel-sel yang polimorfis dan anaplastik. Pada tahap progresi ditandai dengan adanya invasi sel ganas ke membran basalis atau kapsul (Sjamsuhidayat, 1997).



Gambar 2.1 Skema Karsinogenesis (Pusztai *et al.*, 1996)

Perubahan keganasan melibatkan beberapa gen yaitu onkogen, gen penekan tumor, gen yang berperan dalam perbaikan DNA (*DNA repair* gen), dan gen pengatur apoptosis (Sjamsuhidayat, 1997). Onkogen adalah gen yang berkaitan dengan terjadinya transformasi neoplastik. Onkogen ini berasal dari protoonkogen yang mengalami mutasi. Protoonkogen adalah gen yang mengatur proliferasi normal. Perubahan yang dialami protoonkogen seluler pada aktivasi menjadi onkogen selalu bersifat mengaktivasi, artinya mereka menstimuli suatu fungsi sel yang mengakibatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel (Tannock, 1998).

Gen penekan tumor berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan sel, apabila diaktifkan maka akan menghentikan siklus pembelahan sel, sehingga dapat mencegah pembelahan sel selanjutnya. Tetapi apabila gen penekan tumor malfungsi disebabkan mutasi, maka sel abnormal yang terus membelah diri tidak menanggapi pesan *growth inhibitor* yang dikeluarkan oleh sel sekitarnya untuk menghentikan pembelahan sehingga terjadi proses malignansi. Contoh gen penekan tumor adalah gen Rb, p53, DCC (*Deleted in Cell Colorectal Carcinoma*), APC (*Adenomatous Polyposis Colli*), WT-1 (*Wilm's Tumor-1*), NF-1 (*Neurofibromatosis type-1*) dan NF-2 (*Neurofibromatosis type-2*) (Pusztai *et al.*, 1996).

Apoptosis ialah kematian sel terprogram yang terjadi baik pada beberapa proses fisiologik maupun proses neoplasma. Penumpukan sel pada neoplasma tidak hanya terjadi sebagai akibat aktivasi gen perangsang pertumbuhan atau tidak aktifnya gen penekan tumor, tetapi juga oleh karena mutasi gen pengatur apoptosis (Pusztai *et al.*, 1996).

2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling sering diderita wanita dan merupakan penyebab kematian tertinggi pada wanita di seluruh dunia. Kanker payudara pada umumnya bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma. Berdasarkan asal dan karakter histologinya kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu *in situ* karsinoma dan *invasive* karsinoma. *In situ* karsinoma dikarakterisasi oleh lokalisasi sel kanker baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma di sekelilingnya. Sebaliknya pada *invasive* karsinoma, membran basal akan rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik (Hondermarck, 2003).

Penyebab kanker payudara sangat beragam, tetapi ada sejumlah faktor risiko yang dihubungkan dengan perkembangan penyakit ini yaitu asap rokok, konsumsi alkohol, umur pada saat menstruasi pertama, umur saat melahirkan pertama, lemak pada makanan, dan sejarah keluarga tentang ada tidaknya anggota keluarga yang menderita penyakit ini (Macdonald dan Ford, 1997).

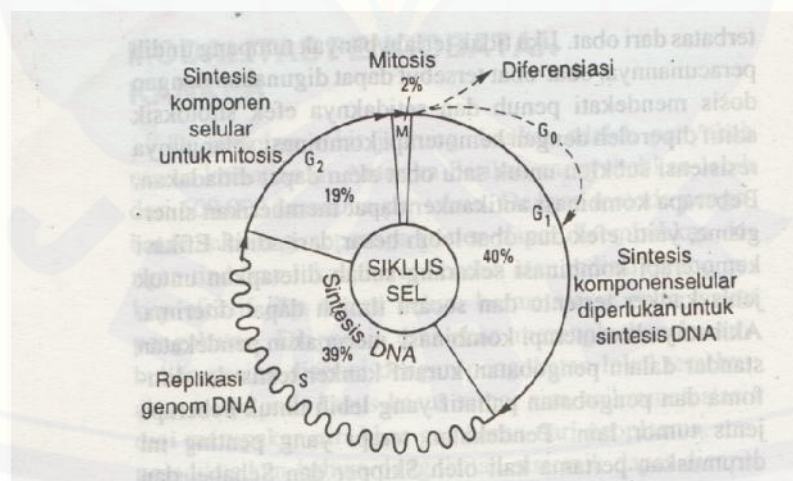
Sel kanker payudara dapat tumbuh menjadi benjolan sebesar 1 cm² dalam waktu 8-12 tahun (Lipton, 2007). Perkembangan kanker diperkirakan dari perubahan sel pertama kali sampai kemudian terlihat melalui mammografi memerlukan waktu 6 sampai 8 tahun. Pada kanker yang ganas, benjolan ini bersifat solid, keras, tidak beraturan, dan non mobile. Pada kasus yang lebih berat dapat terjadi edema kulit,

kemerahan, dan rasa panas pada jaringan payudara (Tubiana-Hulin dan Gardner, 2009).

2.3 Obat Antikanker

Obat-obatan antikanker memiliki masing-masing kemampuan yang diperlukan untuk mengganggu pertumbuhan dan perkembangan kanker. Penggunaan obat-obat antikanker telah dikembangkan dan sedang dalam uji klinis atau dalam beberapa kasus telah disetujui untuk penggunaan klinis dalam mengobati bentuk-bentuk dari kanker manusia. Selain itu, obat yang diteliti sedang dikembangkan untuk masing-masing menargetkan untuk memiliki karakteristik dan keunggulan yang menjanjikan sebagai terapi kanker (Hanahan dan Weinberg, 2011).

Klasifikasi obat kanker umumnya didasarkan atas cara kerja obat itu dalam fase siklus pertumbuhan sel (Sukadja, 2000). Banyak obat antikanker yang efektif bekerja pada sel yang sedang menjalani siklus disebut obat sel siklus spesifik (CCS). Grup kedua yang disebut obat sel siklus non-spesifik (CCNS) dapat membersihkan sel tumor yang baik sedang dalam siklus atau sedang istirahat pada kompartemen G_0 . Obat CCNS dapat membunuh baik sel G_0 atau sel-sel siklus (meskipun sel-sel yang sedang mengalami siklus lebih sensitif) (Katzung, 1997).



Gambar 2.2 Siklus sel (Katzung, 1997)

Tabel 2.1 Hubungan siklus sel dengan obat golongan utama

Obat-obat siklus sel spesifik	Obat-obat siklus sel non-spesifik
Antimetabolit (azasitidin, sitarabin, fluorourasil, merkaptopurin, metotreksat, tioguanin)	Alkilator (busulfan, siklofostamid, mekloreteamin, melfalan, tiotepa)
Antibiotik peptida bleomisin	Antibiotik (daktinomisin, daunorubisin, doksorubisin, plikamisin, mitomisin)
Alkaloid pedofilin (etoposid, VP-16, teniposid, VM-26)	Cisplatin
Alkaloid tanaman (vinkristin, vinblastin, plaklitasel)	Nitrosurea (BCNU, CCNU, metil CCNU)

Klasifikasi obat-obatan antikanker dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Alkilator

Obat alkilator bekerja sebagai sitotoksik dengan cara terikat kovalen pada golongan nukleofilik konstituen berbagai jenis sel (Mycek, 2001). Efek sitotoksik dan efek sampingnya berhubungan langsung dengan alkilasi DNA. Retensi sel kanker terhadap alkilator dapat terjadi melalui berbagai mekanisme antara lain peningkatan kemampuan memperbaiki DNA yang rusak (*DNA repair*), penurunan permeabilitas sel terhadap alkilator dan peningkatan produksi *glutathione* yang dapat menonaktifkan zat alkilator (Nafrialdi dan Gan, 2012). Obat yang termasuk golongan ini antara lain karmustin, lomustin, mekloreteamin, siklofosfamid, ifosfamid dan streptozotosin (Mycek, 2001).

2. Antimetabolit

Antimetabolit secara struktural berhubungan dengan komponen sel yang normal. Umumnya obat ini mengganggu tersedianya purin atau pirimidin prekursor nukleotida yang normal dengan menghambat sintesisnya atau kompetisi pada sintesis DNA atau RNA. Efek sitotoksik maksimalnya adalah pada fase S dan karena itu sel siklus spesifik. Obat yang termasuk golongan ini antara lain sitarabin, fludarabin, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin, metotreksat, 6-tioguanin (Mycek, 2001).

3. Antibiotik

Antibiotik ini bekerja dengan terikat pada DNA secara interkalasi antara basa spesifik dan menghambat sintesis DNA atau RNA baru (atau keduanya), menyebabkan rantai DNA terputus dan mengganggu replikasi sel. Obat-obat ini termasuk golongan spesifik siklus sel. Obat yang termasuk golongan ini antara lain antrasiklin, aktinomisin, bleomisin, mitomisin, dan plikamisin (Mycek, 2001).

4. Produk alamiah

Obat antikanker golongan ini berasal dari alam (hewan dan tumbuhan). Obat yang termasuk golongan ini antara lain alkaloid vinka, taksan, epipodofilotoksin, kamptotesin dan enzim (Nafrialdi dan Gan, 2012).

5. Hormon steroid dan antagonisnya

Pengobatan hormon pada tumor yang responsif biasanya bersifat paliatif. Untuk hormon steroid agar berpengaruh pada suatu sel, sel tersebut harus mempunyai reseptor sitolitik yang spesifik untuk hormone yang bersangkutan (Mycek, 2001). Berbagai hormon steroid yang digunakan pada pengobatan kanker antara lain kortikosteroid (prednison, deksametason), hormon progestin (hidroksi progesteron kaproat, medroksi progesteron asetat), esterogen (megestrol asetat, dietilstibestrol, etinil estradiol), dan androgen (testosteron propionat, fluoksimesteron) (Nafrialdi dan Gan, 2012).

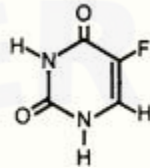
6. Lain-lain

Obat antikanker selain golongan diatas antara lain cisplatin, karboplatin, etoposid, interferon dan prokarbazin (Mycek, 2001).

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Terapi kanker dikatakan berhasil baik apabila dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker yang ganas dan tidak mengganggu sel normal yang berpoliferasi (Nafrialdi dan Gan, 2012).

2.4 5-fluorourasil

5-fluorourasil disebut juga fluorourasil, 5-FU, 5-fluoro-2,4 (3H,3H)-pirimidinon yang memiliki rumus molekul $C_4H_3FN_2O_2$, berat molekul 130,08 gram/mol, rentang titik didih sebesar $236,6\text{ }^\circ\text{C}$ pada 760 mmHg, dan titik lebur sebesar $105,94\text{ }^\circ\text{C}$. Log P sebesar -0,9 dan MR $25,78\text{ cm}^3/\text{mol}$ (Chemoffice, 2004).



Gambar 2.3. Stuktur 5-FU (Malet-Martino dan Martino, 2002)

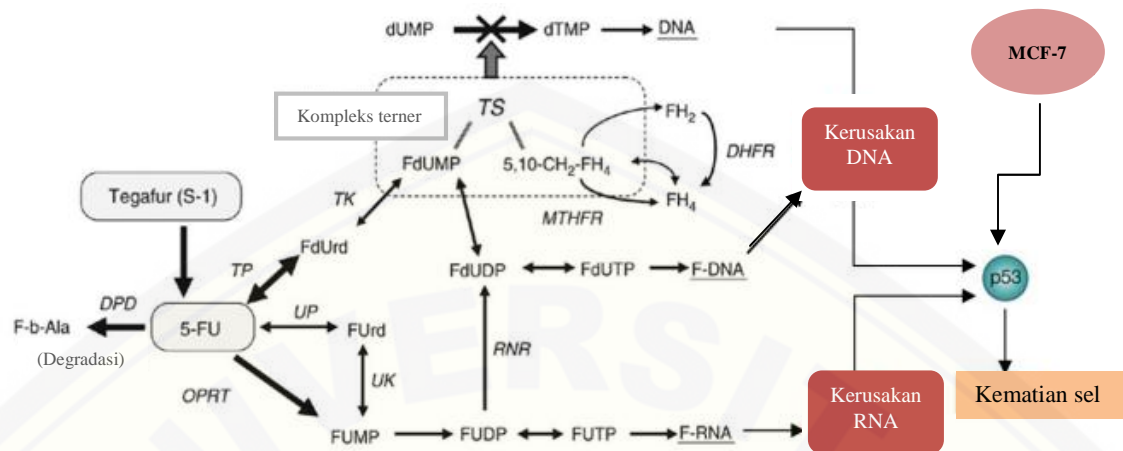
5-FU berasal dari senyawa urasil yang bertindak antagonis pirimidin (Nafrialdi dan Gan, 2012). 5-FU dimetabolisme melalui 2 rute yaitu anabolik dan katabolik. Pada rute anabolik, terdapat 3 mekanisme kerja 5-FU dalam membunuh sel kanker. Pertama inkorporasi dengan RNA. Kedua, inkorporasi dengan DNA. Ketiga dengan menghambat *thymidylat synthase* (TS) yang mengakibatkan sel kanker tidak dapat melakukan replikasi maupun perbaikan DNA (Malet-Martino dan Martino, 2002).

5-FU dikonversi menjadi 3 metabolit aktif utama yaitu *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP). Mekanisme utama aktivasi 5-FU adalah konversi menjadi *fluorouridine monophosphate* (FUMP) juga secara langsung oleh *orotate phosphoribosyl transferase* (OPRT), atau secara tidak langsung via *fluorouridine* (FUrd) melalui aksi berurutan dari *uridine phosphorylase* (UP) dan *uridine kinase* (UK). FUMP kemudian difosforilasi menjadi *fluorouridine diphosphate* (FUDP), yang dapat juga difosforilasi lebih lanjut menjadi metabolit aktif *fluorouridine triphosphate* (FUTP), atau dikonversi menjadi *fluorodeoxyuridine diphosphate* (FdUDP) oleh *ribonucleotide reductase* (RNR). Di sisi lain, FdUDP dapat pula di fosforilasi atau didefosforilasi menjadi metabolit aktif masing-masing FdUTP dan

FdUMP. Jalur aktivasi alternatif lainnya melibatkan *thymidine phosphorylase* (TP) yang mengkatalisis konversi 5-FU menjadi *fluorodeoxyuridine* (FdUrd), kemudian difosforilasi oleh *thymidine kinase* (TK) dan menjadi *thymidylate synthase* (TS) inhibitor, FdUMP. Ada pula enzim *dihydropyrimidine dehydrogenase* (DPD) yang mengkonversi 5-FU menjadi *dihydrofluorouracil* yang tidak aktif. (DHFU) adalah *rate-limiting step* katabolisme 5-FU pada sel normal dan sel tumor, dan proporsi dari pengrusakan menjadi metabolit tidak aktif mencapai 80% (Longley *et al.*, 2003).

Metabolisme 5-FU menghasilkan FUTP yang bergabung ke dalam RNA dan mempengaruhi fungsinya menyebabkan kerusakan RNA, FdUMP akan menghambat replikasi DNA mengakibatkan terjadinya induksi apoptosis karena penghambatan sintesis DNA yang disebabkan sel kekurangan deoksitimidin trifosfat (dTTP). Penggabungan FdUTP ke dalam DNA selama sintesis DNA dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan pengkodean dan akhirnya terjadi kematian sel (Longley *et al.*, 2003).

Kerusakan DNA dapat memicu aktivasi dari protein p53 *wild type* yang memegang peranan penting dalam DNA *repair*. Protein p53 akan merangsang keluarnya p21 yang menyebabkan terjadinya *cell cycle arrest*. p53 dapat merangsang apoptosis dengan merangsang ekspresi dari gen pro apoptosis seperti *Bax* dan menurunkan gen anti apoptosis seperti *Bcl-2* (Longley *et al.*, 2003). Mekanisme kerja 5-FU dapat dijelaskan pada Gambar 2.4.

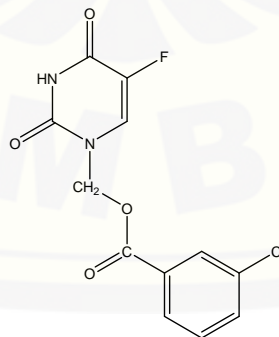


DPD (dihydropyrimidine); TP(thymidine phosphorylase); OPRT(orotate phosphoribosyl transferase); UP(uridine phosphorylase); UK(uridine kinase); RNR(ribonucleotide reductase) ; TK(tymidine kinase) ; MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase) ; DHFR (dihydrofolate reductase); FdUrd(flurodeoxyuridine); FUrđ(flurouridine) ; FUMP (flurouridine monophosphate); FUTP(flurouridine triphosphate); FdUDP (flurodeoxyuridine diphosphate); FdUTP(flurodeoxyuridine triphosphate); FdUMP (flurodeoxyuridine monophosphate)

Gambar 2.4 Mekanisme kerja 5-FU (Matsubara et al., 2008 ; Longley *et al*, 2003).

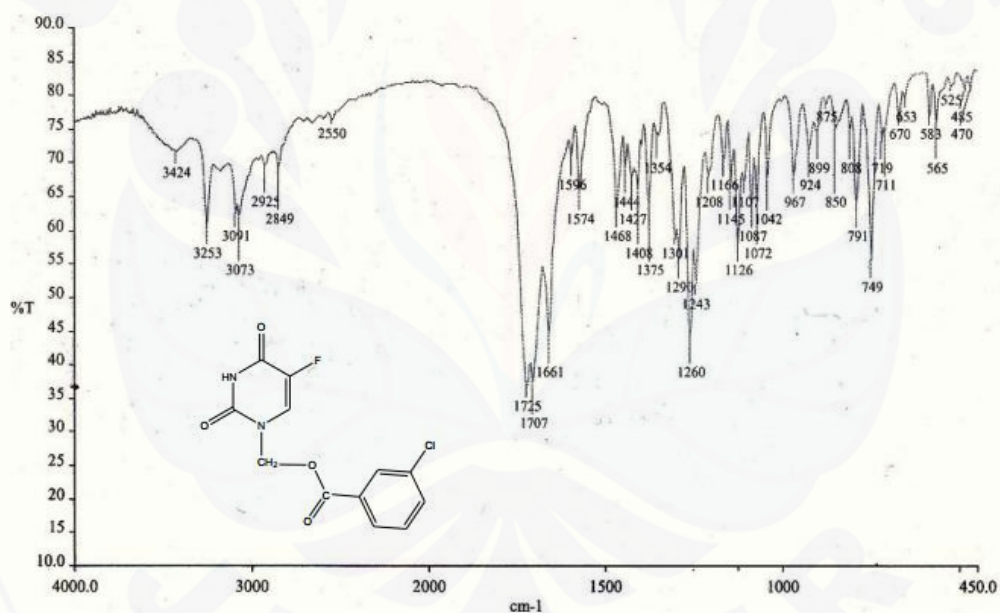
2.5 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil

Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (3-CIFU) merupakan turunan dari senyawa 5-FU. Memiliki rumus molekul $C_{12}H_{17}O_4N_2FCl$. Berbentuk serbuk hablur dan voluminous yang berwarna putih kekuningan. Memiliki jarak lebur rentang $166-167^{\circ}C$ (Aswika, 2012). Struktur senyawa 3-CIFU dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur 3-CIFU (Aswika, 2012)

Senyawa 3-CIFU merupakan senyawa yang disintesis melalui substitusi gugus alkil benzena, ester dan kloro pada posisi *-meta* melalui sintesis ester dengan 3-klorobenzoilklorida. Senyawa ini disintesis dari 5-FU melalui metode alkilasi (pembentukan alkohol) antara 5-FU dengan formaldehid dan esterifikasi (dengan reaksi benzoilasi). Berdasarkan analisis HKSA dan pendekatan Topliss yang dilakukan oleh Aswika (2012), senyawa 3-CIFU memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan senyawa 5-FU dikarenakan adanya peningkatan sifat lipofilik, sterik dan elektronik. Senyawa hasil sintesis yang diidentifikasi menggunakan FTIR-KBr dan ^1H NMR menunjukkan bahwa hasil sintesis mengandung senyawa 3-CIFU. Spektra FTIR senyawa 3-CIFU dapat dilihat pada Gambar 2.6 sedangkan spektra ^1H NMR senyawa 3-CIFU dapat dilihat pada Gambar 2.7.



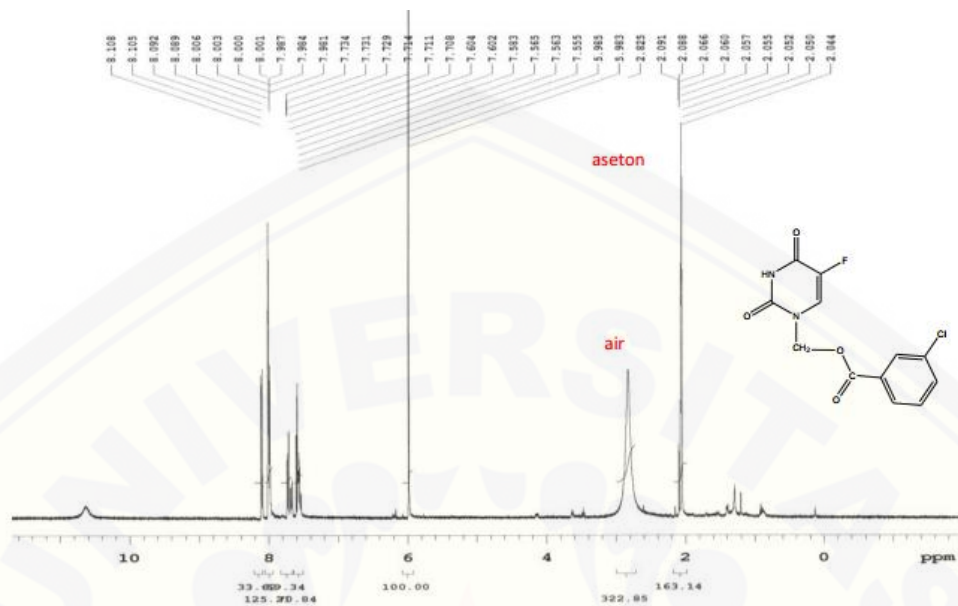
Gambar 2.6 Spektrum inframerah identifikasi gugus fungsi senyawa 3-CIFU menggunakan FTIR-KBr (Aswika, 2012)

Tabel 2.2 Perbandingan karakteristik spektrum inframerah antara senyawa 3-CIFU dengan literatur (Aswika, 2012)

Gugus fungsi	Bilangan gelombang senyawa (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang teoritis (cm ⁻¹)
C=O amida	1661	1680-1630
N-H	3424	3500-3100
C-F	1072	1400-1000
N-C	1260	1350-1000
C=O ester	1707	1730-1705
C-Cl	791	785-540
	m = 850	m = 900-860
Substitusi <i>-meta</i>	s = 670, 653	s = 810-750
	str = 791	str = 720-670
C=C aromatis	1468	1600 & 1475
C-H aromatis	3073	3150-3050
C=C alkena sp ²	3254	>3000

Ket: m = medium, s = small, str = strong

Senyawa 3-CIFU merupakan senyawa ester yang ditandai dengan adanya transmittan pada gugus C=O ester pada bilangan gelombang 1707 cm⁻¹, C-Cl pada 791 cm⁻¹, dan substitusi Cl pada posisi *-meta* pada m = 850 cm⁻¹, s = 670, 653 cm⁻¹, str = 791 cm⁻¹ menandakan bahwa produk akhir 3-CIFU sudah terbentuk, walaupun transmittan kurang spesifik karena terjadi pergeseran pada beberapa bilangan gelombang antara senyawa dan teoritis. Namun beberapa bilangan gelombang senyawa 3-CIFU memenuhi kriteria dari bilangan gelombang secara teoritis. Identifikasi menggunakan ¹HNMR dilakukan untuk memperjelas kebenaran senyawa. Hasil menunjukkan bahwa terdapat kemiripan spektra antara senyawa 3-CIFU dengan teoritis.



Gambar 2.7 Spektra uji identifikasi struktur senyawa 3-CIFU menggunakan spektroskopi ¹HNMR (Aswika, 2012)

Tabel 2.3 Perbandingan spektrum proton NMR antara senyawa 3-CIFU dengan literatur (Aswika, 2012)

Proton dari gugus	Pergeseran kimia hasil (ppm)	Pergeseran kimia teoritis (ppm)	Multiplisitas
N-H	10,6	5-9	Singlet
-CH ₂ -	6	6,1	Singlet
=CH-	7,58	6,35	Triplet
H aromatis	8,0	7,89	Doublet
H aromatis	7,72	7,35	Doublet
H aromatis	8,0	7,51	Doublet
H aromatis	8,1	8,01	Doublet

2.6 MCF-7 Cell Line

Sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) merupakan sel epitel kanker payudara yang diisolasi dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif. *Cell line* MCF-7 memiliki beberapa perbedaan karakteristik dari epitelium payudara lainnya termasuk kemampuan untuk memproses estradiol melalui sitoplasma estrogen reseptor, sel MCF-7 merupakan sel

yang berkembang sebagai reseptor estrogen (ER/Estrogen Reseptor) dalam kanker payudara. Sel MCF-7 dikultur dengan menggunakan media kultur DMEM atau RPMI yang mengandung 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan antibiotik *Penicillin-Streptomycin* 1%. Fungsi media dalam pertumbuhan sel adalah untuk menyediakan nutrisi dan energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel (Dwitarhayani, 2012).

Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten terhadap agen kemoterapi, mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2, dan tidak mengekspresikan caspase-3. Sel MCF-7 tergolong *cell line adherent* yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER-) dan resisten terhadap *doxorubicin* (Onuki *et al.*, 2003).



Gambar 2.8. Sel MCF-7 (Dwitarhayani, 2012).

Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan gen p53 *wild type* (Crawford, 2002). Pada peristiwa stres sel antara lain kerusakan DNA, hipoksia, stres oksidatif maupun onkogen akan menginduksi berbagai mediator *upstream* untuk aktivasi p53. Jalur penting sebagai *downstream* aktivasi p53 antara lain dengan mengaktivasi perbaikan DNA yang rusak, menahan siklus sel pada titik *G1/S regulation point* saat terjadi kerusakan DNA dan mengontrol proses apoptosis jika kerusakan DNA tidak lagi dapat diperbaiki (Melnikova, 2006).

2.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT dan Uji *Doubling Time*

Uji sitotoksitas merupakan uji yang digunakan untuk mengevaluasi daya sitotoksik suatu senyawa yang akan digunakan sebagai bahan obat menggunakan kultur sel secara *in vitro*. Dasar uji sitotoksitas adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik. Kemampuan untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai tidak hilangnya kemampuan metabolik atau proliferasi dan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, meningkatnya jumlah protein atau DNA yang disintesis (Aisyah, 2008).

Uji sitotoksitas secara *in vitro* menggunakan sel primer maupun sub kultur sel yang merupakan turunan dari sel primer yang sering disebut *cell line*. *Cell line* yang digunakan dalam uji sitotoksitas bisa berasal dari sel kanker manusia maupun hewan. Sel kanker hewan yang digunakan untuk uji sitotoksitas harus memiliki kesamaan sifat dan karakteristik dengan sel kanker manusia (Husniati, 2008).

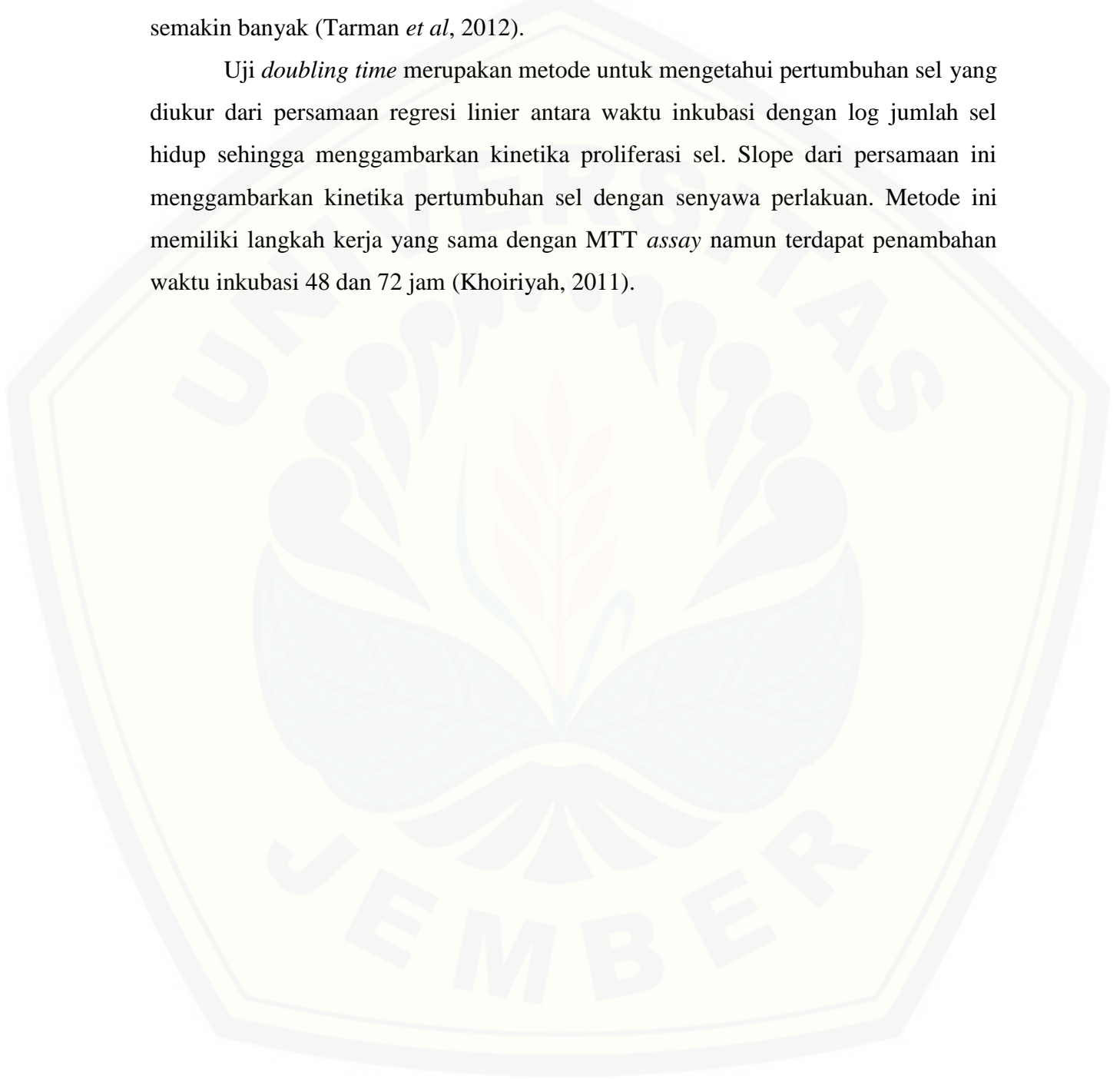
Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader (Tarman *et al*, 2012). Reaksi reduksi MTT menjadi formazan dijelaskan pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan

Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (Tarman *et al*, 2012).

Uji *doubling time* merupakan metode untuk mengetahui pertumbuhan sel yang diukur dari persamaan regresi linier antara waktu inkubasi dengan log jumlah sel hidup sehingga menggambarkan kinetika proliferasi sel. Slope dari persamaan ini menggambarkan kinetika pertumbuhan sel dengan senyawa perlakuan. Metode ini memiliki langkah kerja yang sama dengan MTT *assay* namun terdapat penambahan waktu inkubasi 48 dan 72 jam (Khoiriyah, 2011).

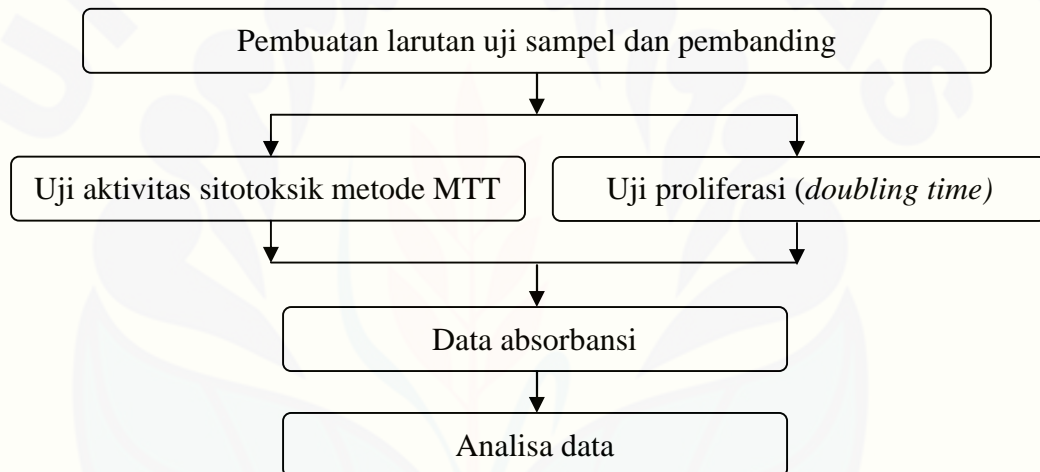


BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas senyawa 3-CIFU sebagai antikanker diujikan pada sel kanker payudara MCF-7 secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik.

3.2 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan rancangan penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat penelitian

Laboratorium yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk melakukan preparasi sampel senyawa 3-CIFU.
- Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk melakukan uji sitotoksik dan uji proliferasi (*doubling time*).

3.3.2 Waktu penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2014 sampai dengan April 2015.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Uji Sitotoksisitas

Penghambatan sel MCF-7 dengan adanya senyawa 3-CIFU ditunjukkan dengan adanya % sel hidup. Perhitungan sel MCF-7 yang hidup adalah sebagai berikut:

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

Data % sel hidup dianalisis dengan analisis probit untuk mendapatkan nilai IC_{50} (konsentrasi terkecil yang menyebabkan kematian sel sebanyak 50% dari populasi) (Nurani, 2011). Senyawa dikatakan memiliki efek sitotoksik jika nilai $IC_{50} \leq 50 \mu\text{M}$ (Boik, 2008).

3.4.2 Uji Proliferasi (*Doubling Time*)

Doubling time merupakan waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk tumbuh menjadi dua kali lipatnya. Perhitungan hasil uji proliferasi sel dilakukan dengan membuat grafik antara waktu inkubasi (jam) vs log jumlah sel hidup kemudian dibuat persamaan regresi liniernya. Nilai *doubling time* dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan : $Y = \log (2 \times \text{jumlah sel hidup awal})$; $A = \text{intersep}$; $B = \text{slope}$ (Nurani, 2011).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi senyawa uji 3-CIFU yaitu 50 μM , 250 μM , 500 μM , 750 μM dan 1000 μM dan konsentrasi kontrol positif (5-FU) yaitu 0,5 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM , 500 μM dan 5000 μM .

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai IC_{50} dan *doubling time* senyawa 3-CIFU terhadap sel MCF-7 dibandingkan dengan senyawa 5-FU.

3.6 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.6.1 Alat

Alat yang diperlukan untuk uji sitotoksik dan uji proliferasi antara lain: Inkubator CO_2 5% (Heraeus, Kendro Laboratories, Germany), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm, Germany), mikropipet (VWR Brand), *ELISA reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark*, Jepang), timbangan analitik (Sartorius), vortex (Thermolyne, Sybron), sentrifus (Universal 320 R Hettich), dan kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan).

Selain alat-alat di atas, alat habis pakai yang digunakan dalam kerja *in vitro* antara lain: *Tissue culture dish* diameter 10 cm (Iwaki, asahi glass co., Japan), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), *yellow tip* dan *blue tip* (Sorenson, Bio science Inc), *microplate* (96 well, Iwaki, asahi glass co., Japan) dan tabung pengencer.

3.6.2 Bahan

Sedangkan bahan yang digunakan dalam uji sitotoksik dan uji poliferasi adalah senyawa 5-FU, senyawa 3-CIFU, sel MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, DMSO (DMSO 99,5% pro GC), *phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA),

Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), *foetal bovine serum* (FBS) (Gibco, Invitrogen USA), tripsin 0,25% (Gibco, Invitrogen, Canada), reagen MTT (0,5 mg/mL) (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), natrium dodesil sulfat (SDS, Merck-Schuchardt, Dr.Th.Schuchardt & Co, D-85662), antibiotik penisilin-streptomisin (Gibco, Invitrogen, Canada), antifungi *amphotericin B solution* (25 µg/ml) (Coisson, USA), HCl 0,1 N (Merck), akua steril, tissue makan, dan alumunium foil.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Larutan Uji Sampel dan Pembanding

Senyawa uji 3-CIFU ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan seksama sebanyak 0,600 mg. Sampel dilarutkan dalam 40 µl DMSO dan 360 µl PBS 1x sampai larut (5000 µM) menggunakan vortex. Kemudian diencerkan menggunakan medium DMEM sampai mendapatkan konsentrasi akhir yaitu 50 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM dan 1000 µM.

Senyawa pembanding 5-FU ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan seksama sebanyak 2,602 mg. Sampel dilarutkan dalam 40 µl DMSO dan 360 µl PBS 1x sampai larut (50000 µM) menggunakan vortex. Kemudian diencerkan menggunakan medium DMEM sampai mendapatkan konsentrasi akhir yaitu 0,5 µM, 5 µM, 50 µM, 250 µM, 500 µM dan 5000 µM. Penggunaan DMSO terbanyak yaitu pada konsentrasi 5000 µM sebanyak 1%. Penggunaan DMSO maksimal dalam pada setiap perlakuan adalah 1% karena DMSO memiliki efek toksik terhadap sel (Fajarningsih *et al.*, 2008)

3.7.2 Uji Sitotoksisitas

Sebelum dilakukan uji sitotoksisitas, sel MCF-7 dilakukan pemeliharaan dan pemanenan. Sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media penumbuh *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung *foetal bovine serum* (FBS) 10 % (v/v),

Antifungi *amphotericin B solution* 0,5 % dan antibiotik penisilin-streptomisin 2 % (v/v). Sel dipanen dari *culture disk* dengan tripsin 0,25 % (Kumala *et al.*, 2009).

Sel MCF-7 dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Keesokannya media dibuang, dicuci dengan PBS, kemudian ditambahkan senyawa uji (3-CIFU dan 5-FU) pada berbagai konsentrasi dalam 100 μ l media komplet DMEM secara triplo. Untuk kontrol media sel ditambahkan 100 μ l media komplet DMEM, dan untuk kontrol sel (tanpa sel) tidak diisikan media (sumuran kosong). Kemudian dilakukan inkubasi di dalam inkubator CO_2 5% dalam waktu 24 jam. Jika belum terlihat efek sitotoksik, maka diinkubasi kembali selama 24 jam (waktu inkubasi total: 24-48 jam) (Nurani, 2011).

Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan dengan cara mengambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL), diencerkan dengan MK sampai 10 mL. Setelah terlihat efek sitotoksik, media sel dibuang dan dicuci dengan larutan PBS 1x sebanyak 100 μ l. Reagen MTT (0,5 mg/mL) ditambahkan sebanyak 100 μ L ke setiap sumuran, termasuk kontrol sel (tanpa sel). Kemudian sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator CO_2 5% sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan larutan stopper 100 μ L (SDS 10% dalam 0,1 N HCl). *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Kemudian dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader pada $\lambda = 595$ nm (Nurani, 2011).

3.7.3 Uji Proliferasi (*Doubling Time*)

Sel MCF-7 dengan konsentrasi 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Keesokannya media dibuang, dicuci dengan PBS, kemudian ditambahkan senyawa uji (3-CIFU dan 5-FU) dengan konsentrasi 0,5 IC_{50} , 1 IC_{50} dan 1,5 IC_{50} dalam 100 μ l media komplet DMEM secara triplo (Puspaningtyas, 2011). Untuk kontrol media sel ditambahkan 100 μ l media

komplit DMEM, dan untuk kontrol sel (tanpa sel) tidak diisikan media (sumuran kosong). Kemudian dilakukan inkubasi di dalam inkubator CO₂ 5%. Lama inkubasi berbeda-beda mulai 24, 48 dan 72 jam (Nurani, 2011).

Reagen MTT disiapkan untuk perlakuan dengan cara mengambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL), diencerkan dengan MK sampai 10 mL. Setelah terlihat efek sitotoksik, media sel dibuang dan dicuci dengan larutan PBS 1x sebanyak 100 µl. Reagen MTT ditambahkan sebanyak 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol sel (tanpa sel). Kemudian sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator CO₂ 5% sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan larutan stopper 100 µL (SDS 10% dalam 0,1 N HCl). *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Kemudian dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader pada =595 nm (Nurani, 2011).

3.8 Analisa Data

3.8.1 Uji Sitotoksisitas

Data hasil uji sitotoksisitas yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dihitung rata-rata tiap konsentrasi, lalu dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

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

Data % sel hidup dianalisis menggunakan probit untuk mendapatkan nilai IC₅₀ (Nurani, 2011).

3.8.2 Uji Proliferasi (*Doubling Time*)

Data hasil uji *doubling time* yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran tiap waktu inkubasi dihitung rata-rata tiap konsentrasi, lalu dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

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

Data yang dihasilkan dibuat kurva antara waktu inkubasi (jam) vs log jumlah sel hidup kemudian dicari persamaan regresi liniernya. Nilai *doubling time* dihitung menggunakan rumus:

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

Keterangan : Y = log (2 x jumlah sel hidup awal); A ≡ *intersep*; B = *slope* (Nurani, 2011).

3.8.3 Analisis Statistik

Hasil uji sitotoksik dianalisis menggunakan uji t untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Perbedaan signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansi <0,05 (Puspaningtyas, 2011). Hasil uji *doubling time* senyawa 3-CIFU dibandingkan dengan senyawa 5-FU menggunakan grafik antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup.

3.9 Skema Penelitian

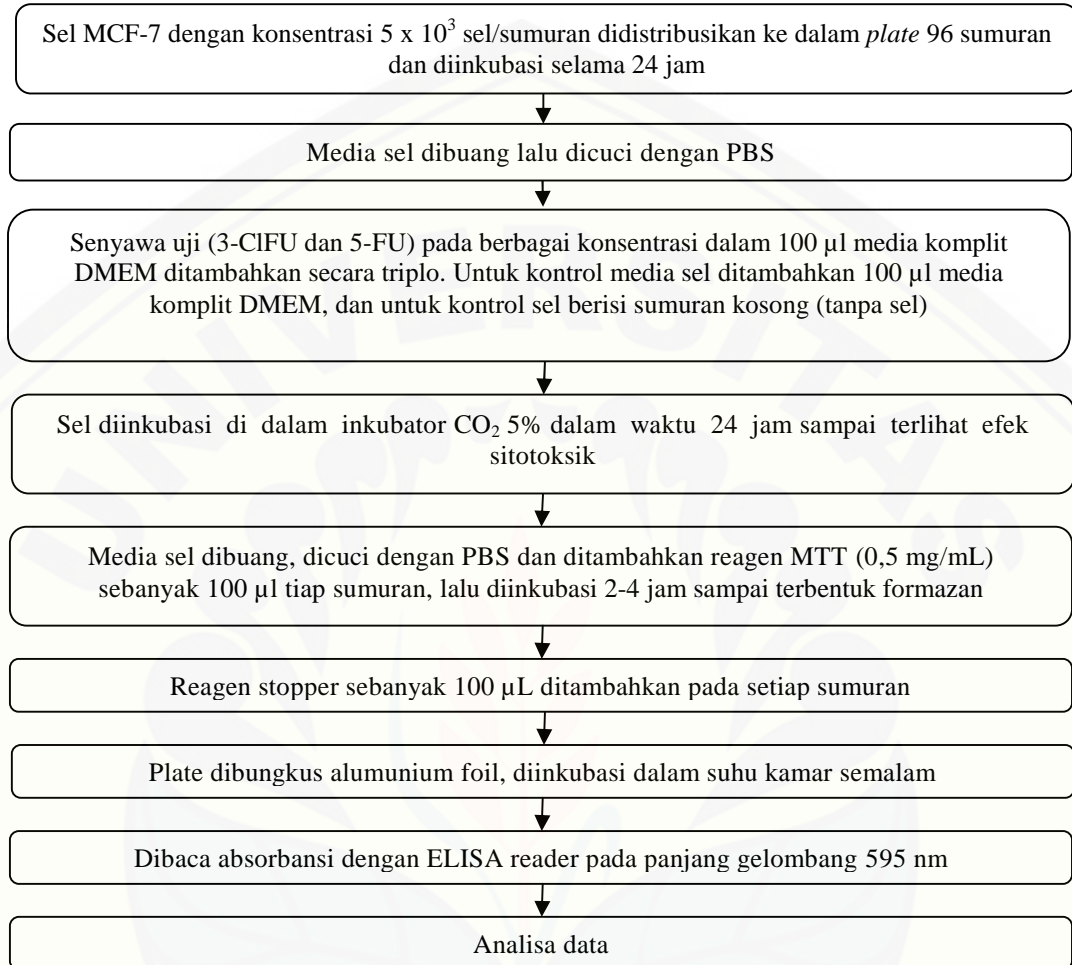
3.9.1 Pembuatan Larutan Uji Sampel dan Pembandingan

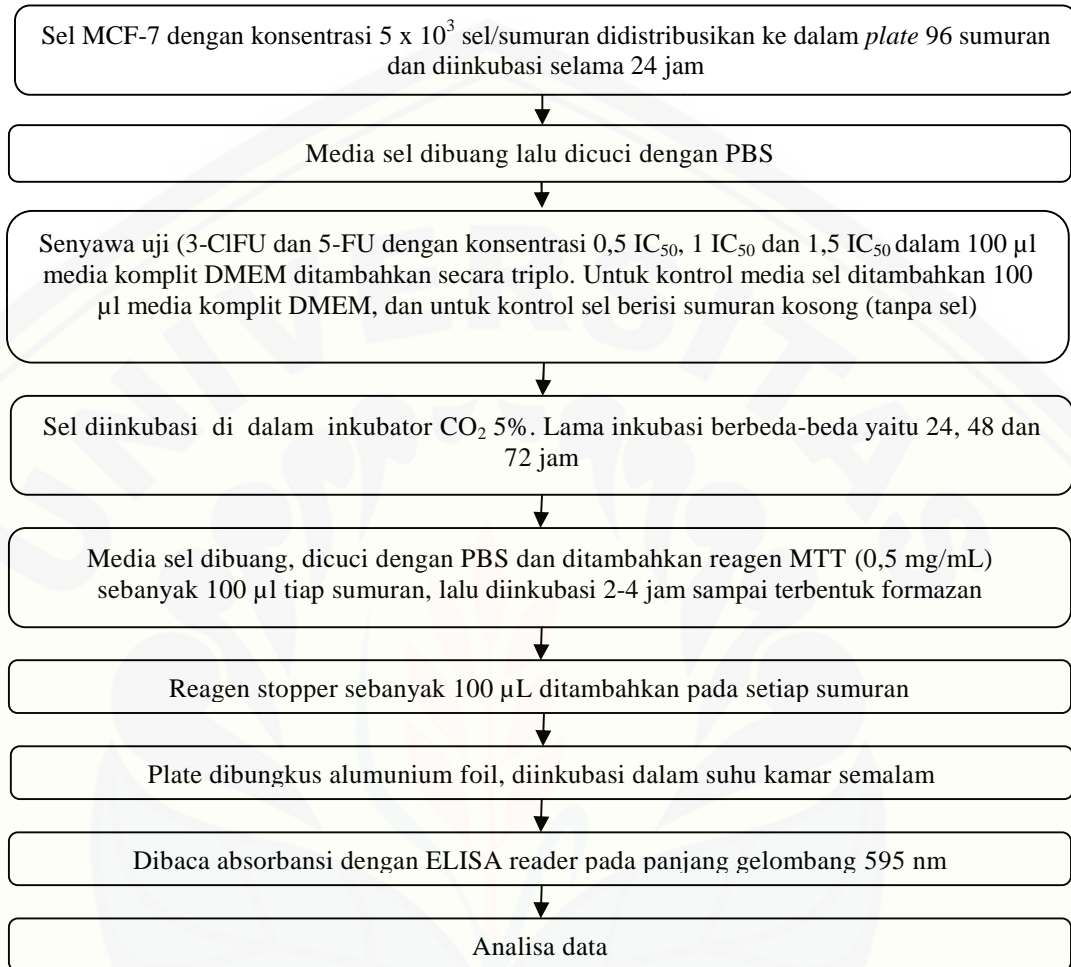
Senyawa 3-CIFU ditimbang sebanyak 0,6 mg dan senyawa 5-FU sebanyak 2,602 mg

Masing-masing senyawa dilarutkan dalam 40 µl DMSO dan 360 µl PBS sampai larut

Diencerkan dengan media DMEM sampai diperoleh konsentrasi senyawa 3-CIFU sebesar 1000, 750, 500, 250 dan 50 µM dan konsentrasi senyawa 5-FU sebesar 5000, 500, 250, 50, 5 dan 0.5 µM

3.9.2 Uji Sitotoksitas



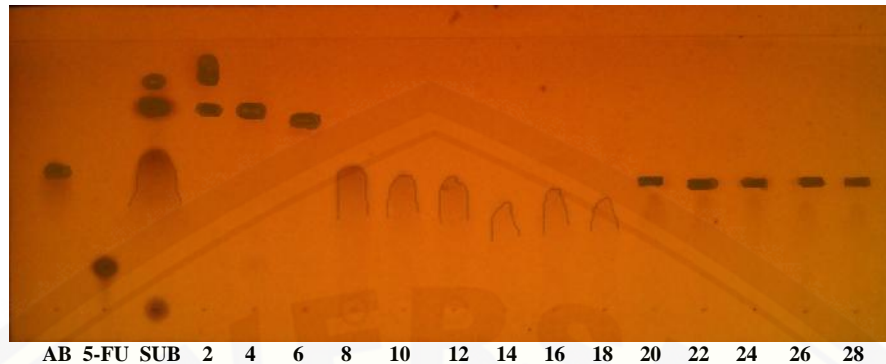
3.9.3 Uji Proliferasi (*Doubling Time*)

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

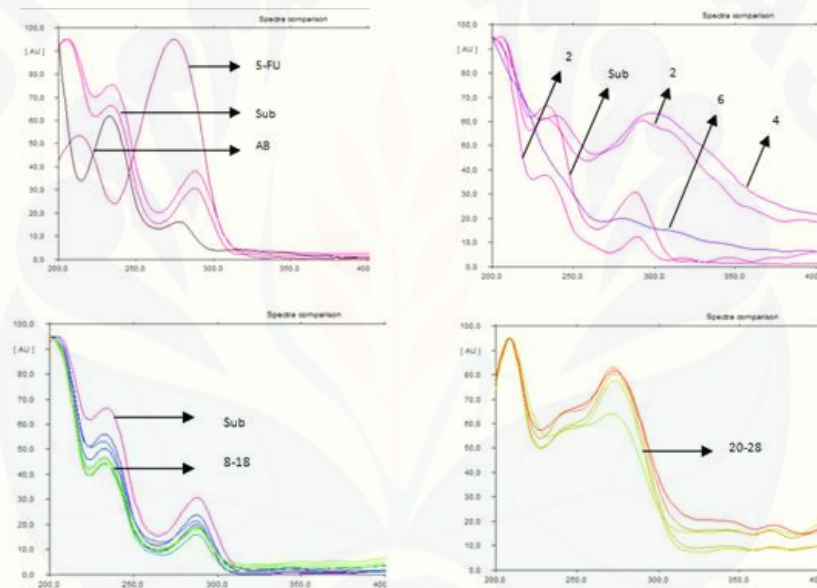
Pada penelitian ini telah dilakukan uji sitotoksitas dan *doubling time* senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (3-CIFU) dibandingkan senyawa 5-fluorourasil (5-FU) terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTT. Sebelum dilakukan uji sitotoksitas dan *doubling time*, senyawa 3-CIFU disintesis dan dimurnikan dengan kromatografi kolom, KLT-Densitometri, uji jarak lebur serta identifikasi struktur menggunakan FTIR-KBr sesuai prosedur yang dilakukan oleh Aswika (2012). Uji sitotoksitas menghasilkan absorbansi sel hidup dan dianalisis dengan probit untuk mendapatkan nilai IC_{50} yang kemudian dianalisis dengan menggunakan uji t untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok sampel dan pembanding. Nilai IC_{50} yang dihasilkan dari uji sitotoksitas digunakan sebagai pedoman dalam menentukan konsentrasi uji untuk pengujian *doubling time*.

4.1 Uji Kemurnian Senyawa dengan KLT-Densitometri

Senyawa 3-CIFU diperoleh dari hasil sintesis kemudian dilakukan pemurnian menggunakan kromatografi kolom. Pemurnian menggunakan kromatografi kolom ini diperoleh 28 fraksi. Selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dianalisis menggunakan KLT dengan menggunakan eluen heksan:aseton (6:4), fase diam silica gel 60 F 254 dan detektor lampu UV 254 nm untuk mengetahui noda tunggal yang diduga senyawa murni (Aswika, 2012). Hasil eluasi kromatografi kolom fraksi senyawa produk sintesis dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan spektra hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.1 Hasil eluasi kromatografi kolom fraksi 2-28. Fase diam silika gel 60 F254. Fase gerak heksan:aseton (6:4). Detektor sinar UV 254 nm. AB=Asam Benzoat; 5-FU=5-fluorourasil; Sub=Subtituen (3-klorobenzoilklorida); 2-28=fraksi ke-n.



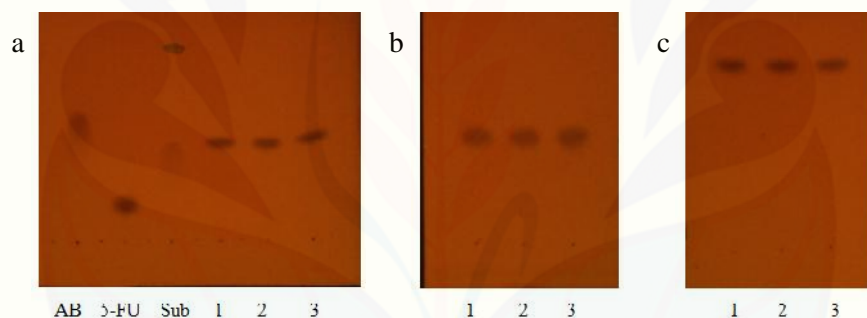
Gambar 4.2 Spektra hasil kromatografi kolom. AB=Asam Benzoat; 5-FU=5-fluorourasil; Sub=Subtituen (3-klorobenzoilklorida); 2-28=fraksi ke-n.

Berdasarkan Gambar 4.1 terlihat bahwa noda pada fraksi 2 memiliki 2 noda, fraksi 4 memiliki 1 noda tetapi memiliki Rf yang sama dengan pembanding (3-klorobenzoilklorida), fraksi 6 memiliki spektra yang tidak sama dengan 3-CIFU yang disintesis Aswika (2012), fraksi 8-18 mengandung noda yang terbentuk *tailing* serta spektra yang dihasilkan sama dengan substituen, fraksi 20-28 memiliki 1 noda dan memiliki spektra yang sama dengan 3-CIFU yang disintesis Aswika (2012). Senyawa

murni harus menunjukkan noda tunggal pada tiga macam sistem eluen (Rahman *et al*, 2013), sehingga fraksi 20-28 tersebut digabung menjadi 1 fraksi lalu dieluasi kembali menggunakan 3 macam sistem eluen yang berbeda kepolarannya. Komposisi pelarut untuk eluen-1 heksan:aseton (6:4); eluen-2 heksan:etil asetat (6:4); dan eluen-3 heksan:etil asetat:aseton (5:3:2) (Puspaningtyas, 2011).

Tabel 4.1 Data Kromatografi Lapis Tipis (KLT) senyawa hasil sintesis

Replikasi	Rf		
	Heksan:Aseton (6:4)	Heksan:Etil asetat (6:4)	Heksan:Etil asetat:Aseton (5:3:2)
1.	0,42	0,43	0,75
2.	0,42	0,42	0,74
3.	0,44	0,42	0,74
Rata-rata	0,43	0,42	0,74

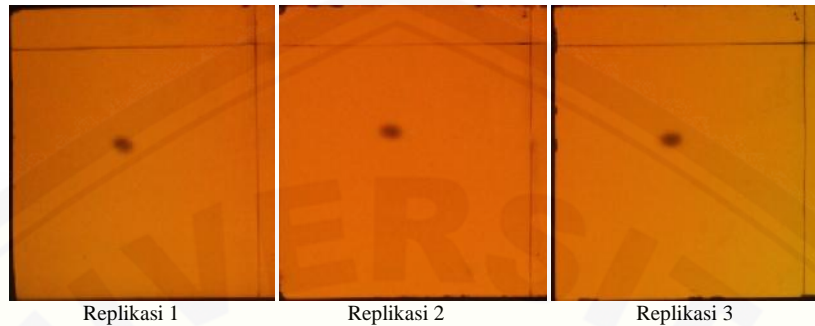


Gambar 4.3 Hasil KLT produk hasil sintesis. Fase diam silika gel 60 F₂₅₄.

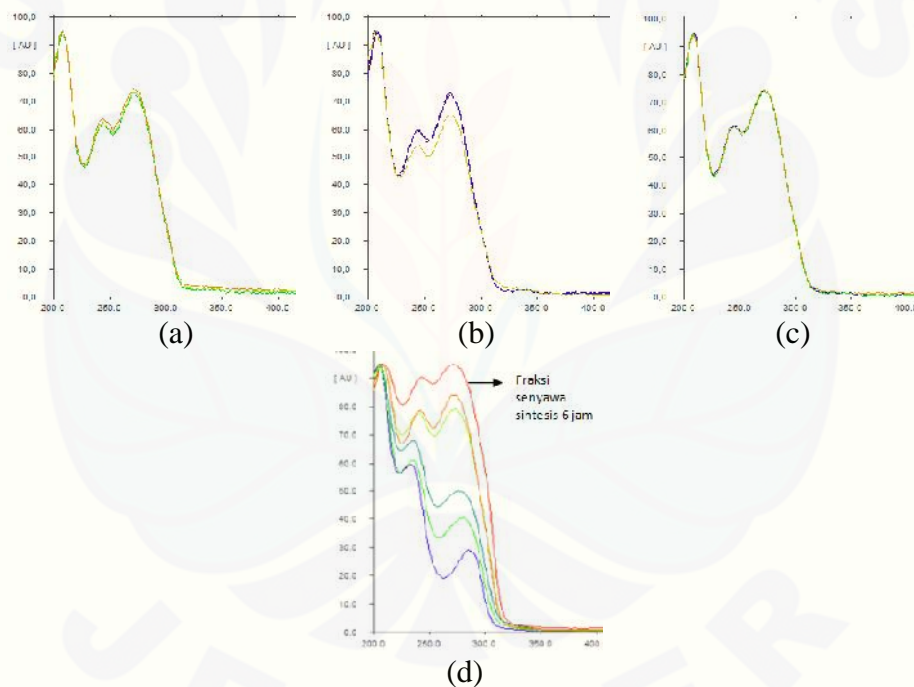
Fase gerak heksan:aseton (6:4) (a) heksan:etil asetat (6:4) (b) dan heksan:etil asetat:aseton (c). Detektor sinar UV 254 nm. AB=Asam Benzoat; 5-FU=5-fluorourasil; Sub=Subtituen (3-klorobenzoilklorida); 1-3=replikasi ke-n.

Hasil eluasi menunjukkan bahwa fraksi 20-28 memiliki noda tunggal setelah dieluasi menggunakan 3 eluen dengan kepolaran yang berbeda. Selanjutnya dilakukan KLT dua dimensi dengan menggunakan eluen heksan:aseton (6:4) dan dilanjutkan heksan:etil asetat (6:4) untuk memastikan bahwa noda yang dihasilkan berupa noda tunggal. Hasil menunjukkan bahwa terdapat noda tunggal dalam senyawa (Gambar 4.4), sehingga fraksi 20-28 dapat dikatakan senyawa murni secara

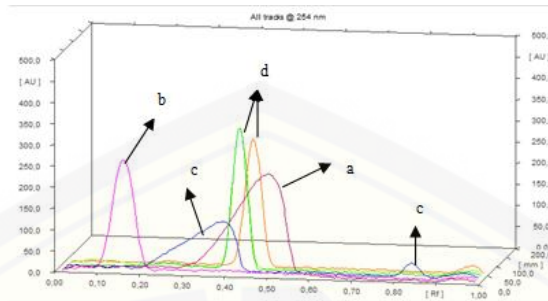
KLT. Sedangkan untuk melihat spektra (Gambar 4.5) dan kromatogram (Gambar 4.6) senyawa produk dapat dilihat menggunakan densitometer.



Gambar 4.4 Hasil KLT dua dimensi senyawa hasil sintesis. Fase diam silika gel 60 F254. Fase gerak heksan:aseton (6:4) dilanjutkan heksana : etil asetat (6:4). Detektor sinar UV 254 nm



Gambar 4.5 Spektra senyawa fraksi 20-28 menggunakan fase gerak heksan:aseton (6:4) (a), heksan:etil asetat (6:4) (b) heksan:etil asetat:aseton (5:3:2) (c) dan spektra senyawa CIFU Aswika (2012) (d)



Gambar 4.6 Perbandingan kromatogram noda asam benzoat (a), 5-FU (b), 3-klorobenzoilklorida (c) dan fraksi 20-28 (d)

Spektra senyawa fraksi 20-28 pada 3 macam fase gerak memiliki puncak pada panjang gelombang maksimum yang sama dengan senyawa 3-CIFU yang disintesis oleh Aswika (2012) yaitu antara 208-209 nm. Pada Gambar 4.6, terlihat pula bahwa senyawa memiliki puncak berbeda dengan senyawa pembanding (asam benzoat, 5-FU dan 3-klorobenzoilklorida) serta memiliki nilai $r(s,m)$ dan $r(m,e)$ 0,99 (Lampiran A) sehingga dapat dikatakan bahwa secara KLT-Densitometri senyawa pada fraksi 20-28 adalah murni senyawa target. Gabungan fraksi tersebut kemudian dilakukan uji jarak lebur dan diidentifikasi strukturnya menggunakan FTIR-KBr.

4.2 Uji Jarak Lebur

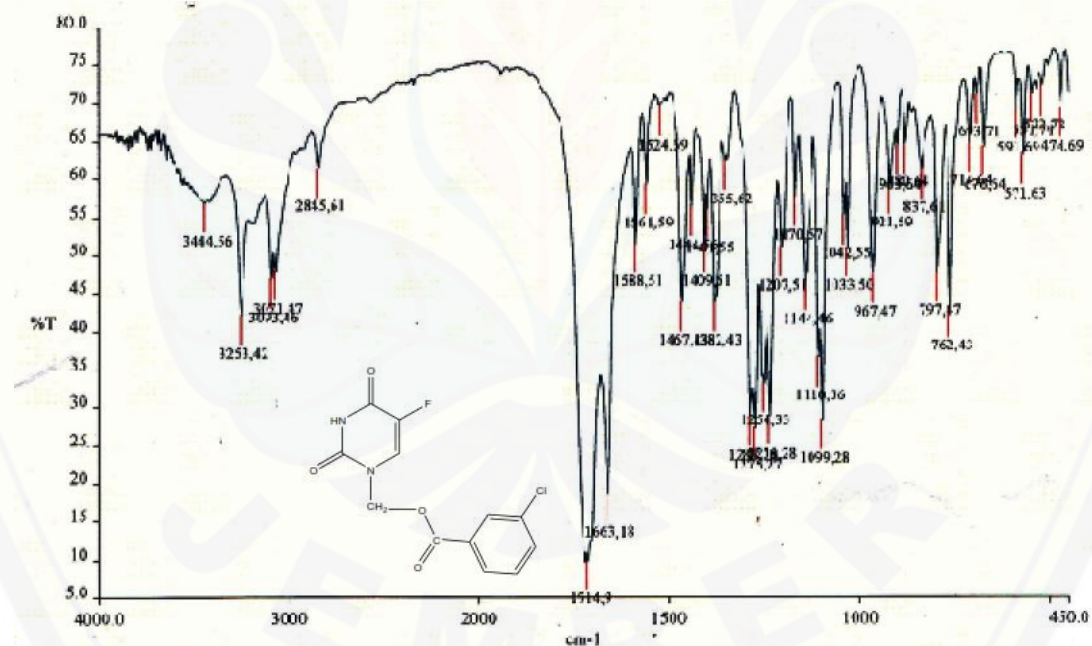
Uji jarak lebur dilakukan menggunakan alat *melting point tester*. Jarak lebur merupakan jarak ketika senyawa mulai melebur sampai melebur sempurna. Senyawa dikatakan murni jika memiliki jarak lebur 2°C (Ritmelani dan Nurcahyani, 2006). Berdasarkan pengujian jarak lebur sebanyak tiga kali replikasi, senyawa produk memiliki jarak lebur antara 166-167 $^{\circ}\text{C}$ sehingga senyawa produk dapat dikatakan murni. Jarak lebur yang dihasilkan memiliki nilai yang sama dengan jarak lebur senyawa 2-CIFU hasil sintesis sebelumnya oleh Aswika (2012). Hasil pengukuran jarak lebur ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pengukuran jarak lebur

No	Jarak lebur (°C)
1.	166-167
2.	166-167
3.	166-167
Rata-rata	166-167

4.3 Identifikasi Struktur dengan FTIR-KBr

Identifikasi senyawa 3-CIFU dilakukan dengan menggunakan FTIR-KBr *Shimadzu IR Prestige-21* untuk menentukan adanya gugus fungsi senyawa dan posisi gugus fungsi pada cincin benzoil aromatis. Jika dilihat dari struktur senyawa, gugus yang membedakan antara senyawa 3-CIFU dengan senyawa 5-FU adalah gugus C=O ester, C-Cl dan substitusi Cl pada posisi *-meta*. Spektra hasil analisis FTIR-KBr senyawa target dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Spektrum inframerah identifikasi gugus fungsi senyawa 3-CIFU menggunakan FTIR-KBr.

Tabel 4.3 Perbandingan karakteristik spektrum inframerah antara senyawa 3-CIFU dengan literatur

Gugus fungsi	Frekuensi gelombang senyawa (cm^{-1})	Frekuensi gelombang senyawa (cm^{-1})*	Frekuensi gelombang teoritis (cm^{-1})**
C=O amida	1663	1661	1680-1630
N-H	3252, 3444	3424	3500-3100
C-F	1033-1382	1072	1400-1000
N-C	1033-1288	1260	1350-1000
C=O ester	1714	1707	1730-1705
C-Cl	551-762	791	785-540
Substitusi <i>-meta</i>	m = 880	m = 850	m = 900-860
	s = 762, 797	s = 670, 653	s = 810-750
	str = 676, 714	str = 791	str = 720-670
C=C aromatis	1524, 1561, 1588	1468	1600 & 1475
C-H aromatis	3071, 3093	3073	3150-3050
C=C alkena sp^2	3254	3254	>3000

Ket: m = medium, s = small, str = strong

* (Aswika, 2012)

** (Pavia *et al.*, 2001 ; Stuart, 2004)

Senyawa 3-CIFU merupakan senyawa ester aromatis sehingga penentu utama terbentuknya senyawa hasil sintesis adalah adanya spektra yang menunjukkan ester. Menurut stuart (2004), gugus C=O ester berada pada rentang frekuensi 1730-1705 cm^{-1} . Pada spektra hasil percobaan menunjukkan adanya spektra pada frekuensi 1714 cm^{-1} yang menunjukkan adanya C=O ester. Sehingga dapat diketahui bahwa senyawa merupakan ester. Selain ester, gugus penentu terbentuknya senyawa target adalah adanya gugus C-Cl pada frekuensi 551-765 cm^{-1} dan substitusi Cl pada posisi **m** = 880 cm^{-1} , **s** = 762, 797 cm^{-1} dan **str** = 676, 714 cm^{-1} (Pavia *et al.*, 2001).

Gugus-gugus lain seperti C=O amida, N-H, C-F, N-C, C=C aromatis, C-H aromatis dan C=C alkena sp^2 juga terdapat pada spektra senyawa. Seluruh gugus yang diharapkan ada pada senyawa target juga ada pada spektra dan seluruhnya memenuhi kriteria dari frekuensi secara teoritis. Frekuensi yang dihasilkan pada uji FTIR ini memiliki frekuensi yang mirip dengan senyawa 3-CIFU hasil sintesis sebelumnya oleh Aswika (2012) walaupun sedikit mengalami pergeseran. Hasil

FTIR-KBr menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis memiliki gugus yang sama dengan senyawa 3-CIFU.

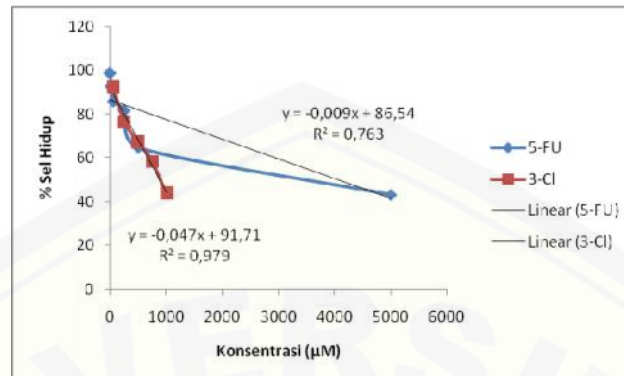
Dengan demikian, berdasarkan hasil uji kemurnian secara KLT-Densitometri, uji jarak lebur dan identifikasi struktur menggunakan FTIR-KBr menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis dapat dikatakan murni dan merupakan senyawa 3-CIFU.

4.4 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas diujikan terhadap sel kanker payudara MCF-7 untuk mengetahui efek sitotoksitas sel terhadap senyawa uji menggunakan metode MTT. Efek sitotoksitas didasarkan atas kemampuan sel untuk hidup oleh adanya senyawa toksik. Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan p53 *wild type*, dimana p53 belum bermutasi. Penggunaan sel MCF-7 berhubungan dengan mekanisme 5-FU yang umumnya melalui jalur transduksi p53 (Crawford, 2002).

Uji sitotoksitas menghasilkan data absorbansi yang kemudian dihitung rata-rata setiap konsentrasi uji termasuk kontrol media dan kontrol sel untuk kemudian dikonversikan kedalam % sel hidup. Uji sitotoksik dilakukan 3 kali replikasi untuk mengetahui apakah aktivitas sitotoksik senyawa adalah benar dan bukan merupakan suatu kesalahan. Persen standar deviasi pada uji biologis menurut Vanderperren (2004) adalah <30%, sedangkan pada hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua persen standar deviasi setiap IC_{50} senyawa memenuhi syarat (Tabel 4.4).

Berdasarkan Gambar 4.8 hasil uji sitotoksitas senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU terhadap sel MCF-7 memperlihatkan penurunan persentase sel hidup dengan adanya kenaikan konsentrasi perlakuan sampel. Hal ini memperlihatkan bahwa potensi ketoksikan senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU adalah tergantung pada konsentrasi uji. Berdasarkan kedua grafik konsentrasi vs % sel hidup pada senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi senyawa yang diberikan pada sel MCF-7, maka semakin kecil jumlah sel MCF-7 yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kadar (μM) dan % sel hidup adalah berbanding terbalik pada kedua senyawa uji.



Gambar 4.8 Profil viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan dengan senyawa 5-FU dan 3-CIFU

Pada Gambar 4.8, hubungan antara konsentrasi dengan % sel hidup dapat dilihat dari linearitasnya. Suatu grafik dikatakan linier jika nilai R hitung $\geq R$ tabel. Nilai R tabel untuk $n=6$ adalah 0,811, sedangkan nilai R tabel untuk $n=5$ adalah 0,878. Nilai R hitung diperoleh dari akar R^2 (Suliyanto, 2012). Berdasarkan grafik pada Gambar 4.6 dapat dikatakan linier karena nilai R hitung $\geq R$ tabel.

Tabel 4.4 Hasil uji sitotoksitas senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT

Senyawa	IC ₅₀ (µM) (Rata-rata ± SD)	RSD (%)
5-FU	4213,709 ± 831,954	19,744
3-CIFU	894,320 ± 120,232	13,444

Perbandingan efektivitas senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU dapat ditunjukkan dari nilai IC₅₀ yang diperoleh dari kurva konsentrasi vs % sel hidup dan dihitung menggunakan perhitungan probit. IC₅₀ merupakan konsentrasi minimum yang dapat menghambat 50% dari jumlah sel. Semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% jumlah sel menunjukkan bahwa senyawa tersebut semakin toksik.

Senyawa dikatakan memiliki efek sitotoksik jika nilai IC₅₀ ≤ 50 µM (Boik, 2008). Berdasarkan hasil analisis probit pada SPSS, diperoleh nilai IC₅₀ rata-rata

senyawa 5-FU sebesar 4213,709 μM , sedangkan nilai IC_{50} senyawa 3-CIFU adalah sebesar 894,320 μM . Senyawa 3-CIFU dapat dikatakan memiliki efek sitotoksik lebih besar daripada senyawa 5-FU karena nilai IC_{50} -nya lebih kecil tetapi belum dapat dikatakan sebagai senyawa sitotoksik karena $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$. Tetapi, hal ini masih dapat digunakan karena pada penelitian uji sitotoksisitas senyawa turunan 5-FU lain oleh Sun (2013), terdapat turunan 5-FU yang juga memiliki nilai $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$, namun nilai IC_{50} tersebut masih lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} senyawa 5-FU.

Peningkatan aktivitas senyawa 3-CIFU sesuai dengan teori HKSA dan pendekatan Topliss bahwa penambahan alkil benzena, ester, dan Cl pada posisi *-meta* melalui sintesis ester dengan 3-klorobenzoilklorida dapat meningkatkan aktivitas senyawa turunan 5-FU berdasarkan peningkatan sifat lipofilik, sterik dan elektronik (Aswika, 2012). Nilai IC_{50} kedua senyawa dianalisis menggunakan uji t untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna pada nilai IC_{50} antara senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU. Berdasarkan hasil statistik, terdapat perbedaan bermakna antara senyawa 5-FU dan senyawa 3-CIFU dimana harga $t = 0,002$ ($p < 0,05$). Hasil statistik dapat dilihat pada Lampiran G.

4.5 Uji Proliferasi (*Doubling Time*)

Berdasarkan hasil uji sitotoksisitas yang telah dilakukan, senyawa 3-CIFU memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut karena aktivitas sitotoksiknya lebih besar daripada senyawa 5-FU. Aktivitas sitotoksik digunakan sebagai acuan dalam pengembangan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kinetika proliferasi sel (*doubling time*) oleh adanya perlakuan senyawa 3-CIFU dibandingkan senyawa 5-FU.

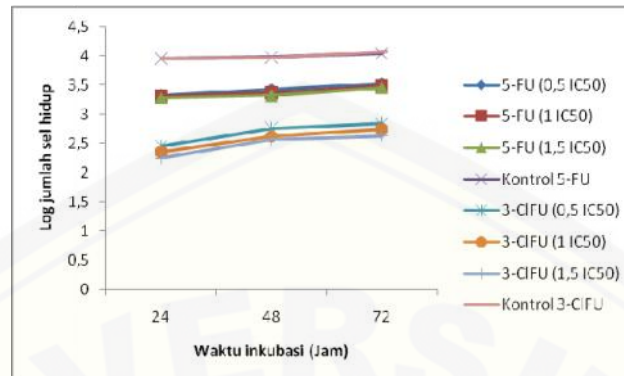
Hasil uji sitotoksisitas digunakan untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan untuk uji *doubling time* yaitu menggunakan $0,5\text{IC}_{50}$, 1IC_{50} , $1,5\text{IC}_{50}$ (Puspaningtyas, 2011). Pada senyawa 5-FU menggunakan konsentrasi 2100 μM , 4200 μM dan 6300 μM , sedangkan senyawa 3-CIFU menggunakan konsentrasi 450

μM , 900 μM dan 1350 μM yang dilarutkan dalam media komplet DMEM. Metode dan prosedur yang digunakan dalam uji *doubling time* sama dengan pada uji sitotoksitas yaitu menggunakan metode MTT namun terdapat penambahan waktu inkubasi 48 dan 72 jam. Data yang diperoleh adalah berupa absorbansi sel hidup, kemudian dikonversikan menjadi jumlah sel hidup. Waktu inkubasi kemudian dibuat kurva dengan log jumlah sel hidup sehingga mendapatkan nilai *slope* dan *intercept* yang dapat digunakan untuk menentukan nilai *doubling time* dari senyawa.

Nilai *doubling time* diperoleh dari nilai log dua kali jumlah sel awal (Y) dikurangi harga intersep (A) dari persamaan regresi linear waktu inkubasi versus log jumlah sel hidup, kemudian dibagi dengan *slope*. Hasil regresi linear dan harga *doubling time* sel MCF-7 pada berbagai perlakuan dan kontrol sel ditampilkan pada Tabel 4.5. Berdasarkan harga *doubling time* tersebut dapat diketahui penghambatan senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap kecepatan sel MCF-7 untuk berproliferasi.

Tabel 4.5 Hasil uji *doubling time* senyawa 5-FU dan 3-CIFU terhadap sel MCF-7

Senyawa	Konsentrasi (μM)	<i>Doubling Time</i> (Jam)	R
5-FU	0,5 IC ₅₀	185,985	0,999
	1 IC ₅₀	213,730	0,982
	1,5 IC ₅₀	220,631	0,953
Kontrol		53,937	0,963
3CIFU	0,5 IC ₅₀	209,845	0,956
	1 IC ₅₀	224,457	0,977
	1,5 IC ₅₀	239,005	0,928
Kontrol		50,695	0,934



Gambar 4.9 Kurva persamaan kinetika proliferasi senyawa 5-FU dan 3-CIFU

Berdasarkan pengamatan kinetika proliferasi sel (Gambar 4.9), baik kontrol sel maupun perlakuan senyawa menunjukkan peningkatan jumlah sel seiring bertambahnya waktu inkubasi. Akan tetapi seiring bertambahnya waktu inkubasi jumlah sel hidup pada perlakuan senyawa lebih sedikit dibandingkan kontrol sel, dan jumlah sel hidup pada perlakuan senyawa 3-CIFU lebih sedikit dibandingkan senyawa 5-FU. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 3-CIFU mampu mengurangi kecepatan proliferasi sel lebih cepat dibandingkan senyawa 5-FU.

Terlihat juga bahwa semakin besar konsentrasi, harga *doubling time* perlakuan senyawa 5-FU dan 3-CIFU semakin besar pula. Hal ini memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa maka penghambatan proliferasinya pada sel MCF-7 semakin besar pula. Selain itu, pada konsentrasi yang sama, senyawa 3-CIFU memiliki nilai *doubling time* lebih besar dengan senyawa 5-FU terhadap sel MCF-7. Nilai *doubling time* yang lebih besar pada senyawa 3-CIFU menunjukkan bahwa senyawa 3-CIFU mampu memacu *cell cycle arrest* lebih besar daripada senyawa 5-FU. Adanya kemampuan sel untuk melakukan *cell cycle arrest* berkaitan dengan adanya apoptosis. Sehingga untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukan uji apoptosis. Selain itu, uji selektivitas juga diperlukan untuk mengetahui apakah senyawa 3-CIFU selektif terhadap sel kanker.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Senyawa 3-CIFU memiliki IC_{50} rata-rata sebesar 894,320 μ M sedangkan senyawa 5-FU memiliki IC_{50} rata-rata sebesar 4213,709 μ M.
2. Senyawa 3-CIFU memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar daripada senyawa 5-FU berdasarkan nilai IC_{50} ($< 0,05$).
3. Senyawa 3-CIFU memiliki efek antiproliferatif terhadap sel MCF-7 yang lebih besar daripada senyawa 5-FU berdasarkan nilai *doubling time*.

5.2 Saran

Untuk penelitian lebih lanjut, penulis menyarankan:

1. Perlunya dilakukan uji apoptosis untuk mengetahui mekanisme dan jalur apoptosis.
2. Perlunya dilakukan uji selektivitas untuk mengetahui selektivitas senyawa 3-CIFU terhadap sel kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah S. 2008. "Analisa Konsentrasi Total Sapogenin Steroid dan Uji Sitotoksitas dari Fraksi Etil Asetat Biji Kelabet (*Trigonella Foenum-Graecum.L*) terhadap Cell Line *MCF-7* secara *in Vitro*". Skripsi. Tidak Diterbitkan. Jakarta: Program Sarjana Fakultas Farmasi UIN Syarif Hidayatullah.
- Aswika, C. I. 2012. "Sintesis Senyawa 1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Program Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Boik, J. C & Newman, R. A. 2008. Structure-Activity Models of Oral Clearance, Cytotoxicity, and LD₅₀: a Screen for Promising Anticancer Compounds. *Journal BMC Pharmacology*, 8 (12): 1-13.
- ChemOffice. 2008. *1-(3-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil*. ChemOffice 11.0 versi trial.
- Crawford KW & WD Bowen. 2002. Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 6 : 313- 322.
- Depkes RI. 2014. Seminar Sehari dalam Rangka Memperingati Hari Kanker Sedunia 2013. <http://www.depkes.go.id/article/view/2233/seminar-sehari-dalam-rangka-memperingati-hari-kanker-sedunia-2013.html> [8 Januari 2015].
- Dwitarhayani, M. 2012. "Nanopropolis sebagai Penghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara *MCF-7*". Tesis. Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A., 2011. The Hallmarks of Cancer: the Next Generation. *Journal Cell*, 144 : 646-674.
- Hondermarck, H. 2003. Breast Cancer: when Proteomics Challenges Biological Complexity. *Review Journal Proteomics of Breast Cancer*, 2 (5) : 281-291.
- Husniati. 2008. "Sintesis Senyawa Analog UK-3A : 3-hidroksi-n-oktilpikolinamida, 2-hidroksi-n-fenil-benzamida, 3-hidroksi-n-fenilpikolinamida, dan 2-hidroksi-n-oktilbenzamida dan Uji Bioaktivitas secara *in Vitro* terhadap Sel Kanker Murine Leukimia P-338". Tesis. Tidak Diterbitkan. Jakarta: Program Magister Sains Ilmu Kimia FMIPA UI.

- Fajarningsih, N. D., Nursid, M., Wikanta, T., & Marraskuranto, E. 2008. Bioaktivitas Ekstrak *Turbinaria Decurrens* sebagai Antitumor (Hela dan T47d) serta Efeknya terhadap Proliferasi Limfosit. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3 (1) : 21-28.
- Katzung B.G., *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Alih bahasa oleh Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran UNSRI. 1997. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Khoiriyah, A. 2011. “Uji Sitotoksitas Ekstrak Spons Laut *Aaptos suberitoides* terhadap Sel Kanker Kolon Widr secara in Vitro”. Tidak diterbitkan. Tesis. Surabaya: Program Pasca Sarjana Fakultas MIPA ITS Surabaya.
- Kumala, S., Septisetyani, E. P., & Meiyanto, E. 2009. Fraksi N-Butanolik Kapang Endofit Buah Makasar Meningkatkan Efek Apoptosis Doxorubusin pada Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 20 (1) : 42-47.
- Levrero, M., Laurenzi, V. De., Constanzo, A., Sabatini, S., Gong, J., Wang, J.Y.J. & Melino, G. 2000. The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Function. *Journal of Cell Science*, 113 : 1661-1670.
- Lipton, A., 2007. *The Diagnosis and Treatment of Bone Metatheses in Breast Cancer*. Nedherlands : Springer Science and Bussiness Media.
- Liu, H. C., Chen, G. G., Vlantis, A. C., Leung, B. C., Tong, M. C., & Van Hasselt, C. A. 2006. 5-Fluorouracil Mediates Apoptosis and G1/S Arrest in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Via a p53-Independent Pathway. *Cancer Journal*, 12 (6) : 482-93.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Cancer Res*, 3 (5): 330-338.
- Macdonald, F., Ford, C. H. J., & Casson, A.G. 2005. *Molecular Biology of Cancer*. Second Edition. London: Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Malet & Martino. 2002. Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-fluorouracil. *Journal the Oncologist*, 7: 288-323.

- Matsubara, J., Nishina, T., Yamada, Moriwaki, T., Shimoda, T., Kajiwara, T., Nakajima, T.E., Kato, K., Hamaguchi, T., Shimada, Y., Okayama, T., Oka, T. & Shirao, K. 2008. Impacts of Excision Repair Cross Complementing Gene 1 (ERCC1), Dihydropyrimidine Dehydrogenase, and Epidermal Growth Factor Receptor on the Outcomes of Patients with Advanced Gastric Cancer. *British Journal of Cancer*, 98 : 832–839.
- Melnikova, V. O., Annanthaswamy H.N. 2006. *Molecular Mechanisms of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas*. New York: Springer.
- Mycek, M. J., Harvey, R. A., & Champe, P. C. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Edisi kedua. Jakarta: Widya Medika.
- Nafrialdi dan Gan. 2012. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Nurani, H. L. 2011. Uji Sitotoksisitas dan Antiproliferatif Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella Sativa*, Lour) terhadap Sel Mieloma. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 1 (2): 11-21.
- Onuki, R., Kawasaki, H., Baba, T., & Taira, K. 2003. Analysis of a Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence of a Caspase-3-Dependent Pathway. *Journal Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. Vol 13 (2): 75-82.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., dan Kriz, G. S. 2001. *Introduction of Spectroscopy*. Fourth Edition. USA: Cengage Learning Inc.
- Puspaningtyas, A. R. 2011. “Modifikasi Struktur 5-FU dan Uji Sitotoksisitas turunan 1-(benzoiloksimetil)-5-fluorourasil Hasil Modifikasi terhadap Sel Kanker MCF-7 (sebagai Upaya Pengembangan Obat Antikanker)”. Tesis. Tidak Diterbitkan. Surabaya: Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Pusztai, L., & Lewis E. 1996. *Cell Proliferation in Cancer ; Regulatory Mechanisms of Neoplastic Cell growth*. New York: Oxford University Press.
- Rahman, A., Aminah, I.,& Muhakim, A. 2013. *Karakterisasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Kimia Anti Tuberculosis (TBC) pada Spons Petrosia Alfiani dari Perairan Selat Makassar*. Makassar: Universitas Hasanudin.

- Ritmelani & Nurcahyani, W. 2006. Sintesis 4-fenil-3,4-tetrahidro-indeno.[2,1]-pirimidin-2-on (LR-1). *Majalah Farmasi Indonesia*, 17 (1): 49-55.
- Siswandono & Soekardjo, B. 2000. *Kimia Medisinal*. Jilid 2. Surabaya : Airlangga University Press.
- Sjamsuhidayat, R., Wim, D, J., 1997. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Jakarta: EGC.
- Stuart, H. Barbara. B. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Sydney: JohnWiley & Sons.
- Suliyanto. 2012. *Analisis Statistik-Pendekatan Praktis dengan Microsoft Excel*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- Sun, J., Zhang, S., Li, H., Zhou, W., Hu, W., & Shan, S. 2013. Novel 5-fluorouracil Derivates: Synthesis and Cytotoxic Activity of 2-butoxy-4-subtituted 5-fluoropyrimidines. *Bull Korean Chem*, 34 (5): 1349-1354.
- Tannock, I.E. Hil, R.P. 1998. *The Basic Science of Oncology*, 3rd Edition. Singapore: Mc Graw Hill.
- Tarman, K., Mustopa, A. Z., Safithri, M. 2012. Pengembangan Protein Antikanker dari Kapang Endofit Indigenous Laut Indonesia *Xylaria psidii* Kt30. *Prosiding Insinas*, 7 (18) : 228-231.
- Tian, Z. Y., Du, G. J., Xie, S. Q., Zhao, J., Gao, W. Y., & Wang, C. J. 2007. Synthesis and Bioevaluation of 5-fluorouracil Derivatives. *Molecules Journal*, 12: 2450-2457
- Tubiana-Hulin, M., & Gardner, M. 2009. *Adjuvant Chemotherapy*. USA : Springer Science and Bussiness media.
- Vanderperren, H., Wouwe, N. V., Behets, S., Windal, I., Overmeire, I. V. & Fontaine, A. 2004. TEQ-Value Determinations of Animal Feed; Emphasis on the CALUX Bioassay Validation. *Talanta*, 63: 1277–1280.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Nilai korelasi hasil uji *purity* dengan KLT-Densitometri

A.1 Eluen = Heksan:Aseton (6:4)

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,50	Substance 4	796 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999114	0,999712	ok
2	0,15	Substance 1	478 AU @ 275 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999929	0,999794	ok
3	0,38	Substance 2	720 AU @ 203 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999122	0,998961	ok
3	0,83	AutoGenerated7	407 AU @ 203 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999819	0,999406	ok
4	0,42	Substance 3	582 AU @ 208 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999949	0,999795	ok
5	0,42	Substance 3	573 AU @ 208 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999963	0,999847	ok
6	0,44	Substance 3	537 AU @ 209 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999869	0,999844	ok

Keterangan :

Track 1 : Asam benzoat

Track 2 : 5-Fluorourasil

Track 3 : 3-Klorobenzoilklorida

Track 4-6 : Fraksi 20-28

A.2 Eluen = Heksan:etil asetat (6:4)

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,43	Substance 1	410 AU @ 209 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999910	0,999794	ok
2	0,42	Substance 1	432 AU @ 206 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999875	0,999861	ok
3	0,42	Substance 1	490 AU @ 208 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999620	0,999809	ok

Keterangan :

Track 1-3 : Fraksi 20-28

A.3 Eluen = Heksan:etil asetat:aseton (5:3:2)

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0,05	Substance 1	52 AU @ 218 nm	<input type="checkbox"/>	0,990570	0,988152	failed
1	0,75	Substance 2	553 AU @ 210 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999945	0,999866	ok
2	0,74	Substance 2	559 AU @ 208 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999924	0,999931	ok
3	0,74	Substance 2	554 AU @ 209 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0,999918	0,999900	ok

Keterangan :

Track 1-3 : Fraksi 20-2

LAMPIRAN B. Pembuatan larutan uji sitotoksitas senyawa (5-FU dan 3-CIFU)

B.1 Senyawa 5-FU

Larutan induk

$$M = \frac{\text{massa}}{MR} \times \frac{1}{\text{vol}}$$

$$50000 \mu M = \frac{\text{massa}}{130,08} \times \frac{10^6}{400 \mu L}$$

Massa = 0,260 mg dilarutkan dalam 40 μL DMSO dan 360 μL PBS 1x

Pengenceran

$$5000 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 50000 \mu M$$

$x = 40 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

$$500 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 5000 \mu M$$

$x = 40 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

$$250 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 5000 \mu M$$

$x = 20 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 380 μL MK

$$50 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 500 \mu M$$

$x = 40 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

$$5 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 50 \mu M$$

$x = 40 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

$$0,5 \mu M = \frac{x}{400 \mu L} 5 \mu M$$

$x = 40 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

B.2 Senyawa 3-CIFU**Larutan induk**

$$M = \frac{\text{massa}}{MR} \times \frac{1}{\text{vol}}$$

$$5000 \mu\text{M} = \frac{\text{massa}}{298,65} \times \frac{10^6}{400 \mu\text{L}}$$

Massa = 0,600 mg dilarutkan dalam 40 μL DMSO dan 360 μL PBS 1x

Pengenceran

$$1000 \mu\text{M} = \frac{x}{400 \mu\text{L}} 5000 \mu\text{M}$$

$x = 80 \mu\text{L} \rightarrow$ dilarutkan dalam 320 μL MK

$$750 \mu\text{M} = \frac{x}{400 \mu\text{L}} 5000 \mu\text{M}$$

$x = 60 \mu\text{L} \rightarrow$ dilarutkan dalam 340 μL MK

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

$x = 40 \mu\text{L} \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

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

$x = 20 \mu\text{L} \rightarrow$ dilarutkan dalam 380 μL MK

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

$x = 40 \mu\text{L} \rightarrow$ dilarutkan dalam 360 μL MK

LAMPIRAN C. Pembuatan larutan uji *doubling time* senyawa (5-FU dan 3-CIFU)

C.1 Senyawa 5-FU

Larutan induk

$$M = \frac{\text{massa}}{MR} \times \frac{1}{\text{vol}}$$

$$20000 \mu M = \frac{\text{massa}}{130,08} \times \frac{10^6}{1000 \mu L}$$

Massa = 2,601 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO dan 900 μL PBS 1x

Pengenceran

$$2100 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 20000 \mu M$$

$x = 105 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 895 μL MK

$$4200 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 20000 \mu M$$

$x = 210 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 790 μL MK

$$6300 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 20000 \mu M$$

$x = 315 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 685 μL MK

C.2 Senyawa 3-CIFU**Larutan induk**

$$M = \frac{\text{massa}}{MR} \times \frac{1}{\text{vol}}$$

$$4500 \mu M = \frac{\text{massa}}{298,65} \times \frac{10^6}{1000 \mu L}$$

Massa = 1,344 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO dan 900 μL PBS 1x

Pengenceran

$$450 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 4500 \mu M$$

$x = 100 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 900 μL MK

$$900 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 4500 \mu M$$

$x = 200 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 800 μL MK

$$1350 \mu M = \frac{x}{1000 \mu L} 4500 \mu M$$

$x = 300 \mu L \rightarrow$ dilarutkan dalam 700 μL MK

LAMPIRAN D. Perhitungan hasil uji sitotoksitas**D.1 Senyawa 5-FU**

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

$$\% \text{ sel hidup replikasi 1 } 0,5 \mu\text{M} = \frac{(0,413 - 0,100)}{(0,417 - 0,100)} \times 100\% = 98,427 \%$$

Senyawa	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% RSD	% Sel Hidup
		1	2	3	Rerata		
Kontrol media		0,090	0,102	0,108	0,100	9,165	
Kontrol sel		0,394	0,441		0,417	7,969	
Replikasi 1	0,5	0,404	0,412	0,422	0,413	2,183	98,427 %
	5	0,400	0,353	0,433	0,395	10,178	92,767 %
	50	0,388	0,363	0,367	0,373	3,600	85,849 %
	250	0,300	0,417	0,360	0,359	16,297	81,446 %
	500	0,240	0,372		0,306	29,809	64,779 %
	5000	0,283	0,192		0,237	27,150	43,238 %
Kontrol media		0,129	0,132	0,142	0,134	5,079	
Kontrol sel		0,864	0,870		0,867	0,489	
Replikasi 2	0,5	0,800	0,895		0,847	7,931	97,339 %
	5	0,790	0,791		0,790	0,089	89,563 %
	50	0,780	0,743	0,728	0,750	3,569	84,083 %
	250	0,719	0,702	0,718	0,713	1,338	79,990 %
	500	0,673	0,603	0,546	0,607	10,479	64,575 %
	5000	0,506	0,518	0,438	0,487	8,859	48,204 %
Kontrol media		0,119	0,116	0,127	0,120	4,739	
Kontrol sel		0,834	0,808		0,821	2,239	
Replikasi 3	0,5	0,781	0,766		0,773	1,372	93,224 %
	5	0,757	0,757		0,757	0	90,870 %
	50	0,717	0,669	0,726	0,704	4,353	83,309 %
	250	0,679	0,644	0,641	0,655	3,225	76,272 %
	500	0,549	0,530	0,679	0,586	13,839	66,476 %
	5000	0,427	0,415	0,434	0,425	2,261	43,557 %

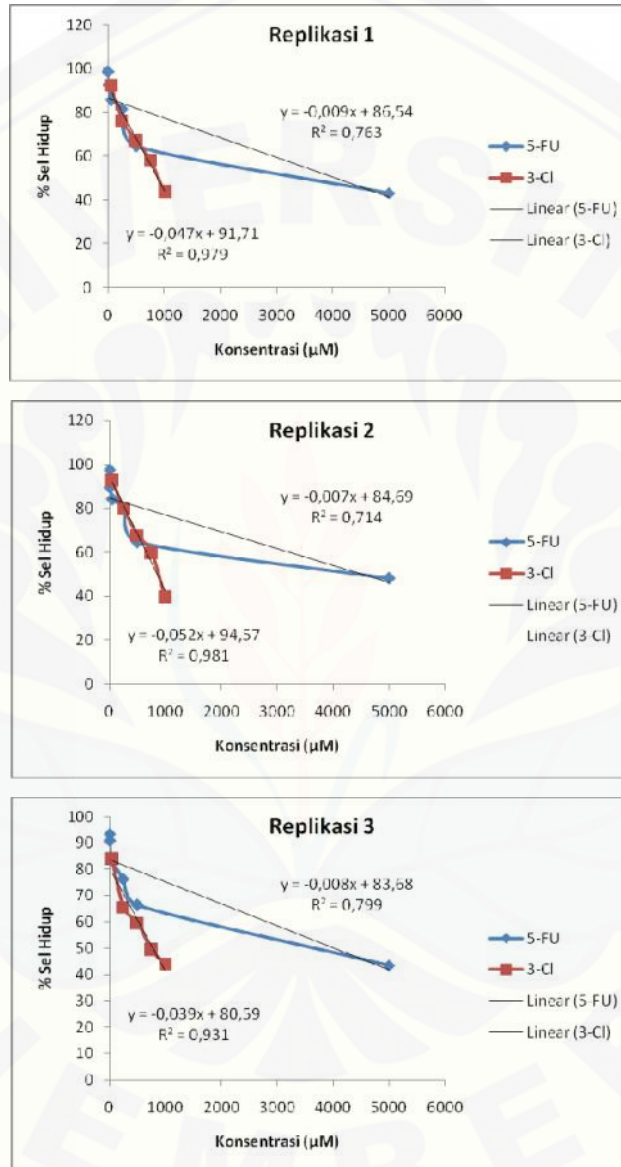
D.2 Senyawa 3-CIFU

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

$$\% \text{ sel hidup replikasi 1 } 50 \mu\text{M} = \frac{(0,809 - 0,134)}{(0,867 - 0,134)} \times 100\% = 92,087 \%$$

Senyawa	Konsentrasi (μM)	Absorbansi				% RSD	% Sel Hidup
		1	2	3	Rerata		
Kontrol media		0,129	0,132	0,142	0,134	5,079	
Kontrol sel		0,864	0,870		0,867	0,489	
Replikasi 1	50	0,829	0,842	0,757	0,809	5,659	92,087 %
	250	0,688	0,713	0,699	0,693	1,808	76,262 %
	500	0,603	0,635	0,637	0,625	3,053	66,985 %
	750	0,541	0,569	0,577	0,562	3,364	58,390 %
	1000	0,472	0,466	0,427	0,455	5,370	43,792 %
Kontrol media		0,119	0,116	0,127	0,120	4,739	
Kontrol sel		0,834	0,808		0,821	2,239	
Replikasi 2	50	0,788	0,764	0,754	0,768	2,275	92,439 %
	250	0,612	0,725	0,702	0,679	8,795	79,743 %
	500	0,594	0,589	0,600	0,594	0,927	67,617 %
	750	0,572	0,551	0,491	0,538	7,813	59,629 %
	1000	0,393	0,396	0,399	0,396	0,758	39,342 %
Kontrol media		0,140	0,133	0,142	0,138	3,425	
Kontrol sel		0,696	0,603	0,329	0,543	24,96	
Replikasi 3	50	0,502	0,382	0,548	0,477	17,97	83,786 %
	250	0,460	0,400	0,351	0,404	13,51	65,597 %
	500	0,341	0,379	0,419	0,380	10,26	59,670 %
	750	0,294	0,404	0,315	0,338	17,28	49,300 %
	1000	0,309	0,329	0,312	0,317	3,402	44,115 %

D.3 Profil viabilitas sel MCF-7 setelah perlakuan dengan senyawa 5-FU dan 3-CIFU



LAMPIRAN E. Perhitungan hasil uji *doubling time*

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

$$\% \text{ sel hidup 5 - FU (24 jam) } 0,5 \text{ IC}_{50} = \frac{(0,889 - 0,128)}{(1,919 - 0,128)} \times 100\% = 42,508 \%$$

Senyawa	Konsentrasi (μM)	Absorbansi rata-rata				% RSD	% Sel Hidup
		1	2	3	Rerata		
Kontrol media		0,123	0,128	0,132	0,128	3,523	-
Kontrol sel		2,073	2,241	1,442	1,919	21,951	179,100
5-FU (24 jam)	0,5 IC ₅₀	0,790	0,925	0,953	0,889	9,804	42,508
	1 IC ₅₀	0,893	0,869	0,777	0,846	7,238	40,108
	1,5 IC ₅₀	0,789	0,817	0,803	0,803	1,743	37,688
Kontrol media		0,135	0,127	0,136	0,133	3,709	-
Kontrol sel		2,276	1,884	1,904	2,012	10,971	188,800
5-FU (48 jam)	0,5 IC ₅₀	1,116	1,108	1,165	1,129	2,733	52,789
	1 IC ₅₀	1,033	1,017	0,954	1,001	4,172	45,992
	1,5 IC ₅₀	0,974	0,862	0,907	0,914	6,166	41,384
Kontrol media		0,232	0,218	0,210	0,220	5,062	-
Kontrol sel		2,552	2,458	2,249	2,419	6,412	219,900
5-FU (72 jam)	0,5 IC ₅₀	1,696	1,837	1,570	1,701	7,852	67,349
	1 IC ₅₀	1,511	1,564	1,579	1,551	2,303	60,543
	1,5 IC ₅₀	1,589	1,421	1,423	1,478	6,524	57,192
Kontrol media		0,123	0,128	0,132	0,128	3,523	-
Kontrol sel		2,073	2,241	1,442	1,919	21,952	179,100
3-CIFU (24 jam)	0,5 IC ₅₀	0,219	0,233	0,231	0,228	3,321	5,565
	1 IC ₅₀	0,214	0,200	0,211	0,208	3,544	4,485
	1,5 IC ₅₀	0,174	0,188	0,211	0,191	9,781	3,517
Kontrol media		0,135	0,126	0,135	0,132	3,936	-
Kontrol sel		2,243	1,845	1,915	2,001	10,619	186,900
3-CIFU (48 jam)	0,5 IC ₅₀	0,300	0,337	0,383	0,340	12,232	11,128
	1 IC ₅₀	0,280	0,291	0,291	0,287	2,213	8,311
	1,5 IC ₅₀	0,288	0,246	0,278	0,271	8,096	7,419
Kontrol media		0,233	0,211	0,215	0,223	5,255	-

Kontrol sel		2,586	2,651	2,318	2,518	7,009	229,500
3-CIFU (72 jam)	0,5 IC ₅₀	0,528	0,547	0,540	0,538	1,786	13,740
	1 IC ₅₀	0,479	0,477	0,471	0,476	0,875	11,009
	1,5 IC ₅₀	0,428	0,397	0,427	0,471	3,739	8,468

$$\text{Doubling time} = \frac{\log(2 \times \text{jumlah sel hidup awal}) - \text{Intercept}}{\text{slope}}$$

$$\text{Doubling time} = \frac{Y - \text{Intercept}}{\text{slope}}$$

$$\text{Doubling time 5 - FU 0,5 IC}_{50} = \frac{4,000 - 3,225}{4,167 \cdot 10^{-3}} = 185,985 \text{ jam}$$

Senyawa	Konsentrasi (μM)	Log Jumlah Sel Hidup			Persamaan	Y	R	Doubling Time (Jam)
		24	48	72				
5-FU	0,5 IC ₅₀	3,327	3,421	3,527	$y = 4,167 \cdot 10^{-3}x + 3,225$	4,000	0,999	185,985
	1 IC ₅₀	3,302	3,362	3,481	$y = 3,729 \cdot 10^{-3}x + 3,203$	4,000	0,982	213,730
	1,5 IC ₅₀	3,275	3,316	3,456	$y = 3,771 \cdot 10^{-3}x + 3,168$	4,000	0,953	220,631
Kontrol		3,952	3,975	4,041	$y = 1,854 \cdot 10^{-3}x + 3,900$	4,000	0,963	53,937
3CIFU	0,5 IC ₅₀	2,444	2,745	2,837	$y = 8,187 \cdot 10^{-3}x + 2,282$	4,000	0,956	209,845
	1 IC ₅₀	2,351	2,619	2,740	$y = 8,104 \cdot 10^{-3}x + 2,181$	4,000	0,977	224,457
	1,5 IC ₅₀	2,246	2,569	2,627	$y = 7,958 \cdot 10^{-3}x + 2,098$	4,000	0,928	239,005
Kontrol		3,952	3,970	4,059	$y = 2,229 \cdot 10^{-3}x + 3,887$	4,000	0,934	50,695

Lampiran F. Hasil perhitungan IC_{50} menggunakan probit

F.1 Senyawa 5-FU

Replikasi 1

Confidence Limits						
Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log(kons) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	3.766E7	4666050.065	8.810E8	7.576	6.669	8.945
.020	1.260E7	1873809.256	2.225E8	7.100	6.273	8.347
.030	6288172.401	1049789.473	9.299E7	6.799	6.021	7.968
.040	3728304.272	678688.027	4.826E7	6.572	5.832	7.684
.050	2436989.797	475854.258	2.831E7	6.387	5.677	7.452
.060	1696996.938	351675.288	1.798E7	6.230	5.546	7.255
.070	1235581.479	269721.485	1.208E7	6.092	5.431	7.082
.080	929992.118	212656.802	8462874.854	5.968	5.328	6.928
.090	718222.605	171289.802	6123291.777	5.856	5.234	6.787
.100	566187.392	140345.524	4546508.364	5.753	5.147	6.658
.150	211482.895	61414.395	1327307.430	5.325	4.788	6.123
.200	96686.271	31770.365	500019.377	4.985	4.502	5.699
.250	49402.841	18008.481	216878.040	4.694	4.255	5.336
.300	27031.773	10790.224	102677.972	4.432	4.033	5.011
.350	15459.880	6694.398	51492.953	4.189	3.826	4.712
.400	9097.823	4241.885	26838.679	3.959	3.628	4.429
.450	5446.907	2716.759	14346.996	3.736	3.434	4.157
.500	3287.719	1742.858	7787.943	3.517	3.241	3.891
.550	1984.446	1109.857	4258.827	3.298	3.045	3.629
.600	1188.097	694.358	2330.589	3.075	2.842	3.367
.650	699.171	421.210	1268.853	2.845	2.624	3.103
.700	399.866	243.345	683.342	2.602	2.386	2.835



.750	218.795	130.587	361.225	2.340	2.116	2.558
.800	111.796	62.838	184.562	2.048	1.798	2.266
.850	51.111	25.665	88.061	1.709	1.409	1.945
.900	19.091	7.964	36.256	1.281	.901	1.559
.910	15.050	5.974	29.401	1.178	.776	1.468
.920	11.623	4.365	23.451	1.065	.640	1.370
.930	8.748	3.087	18.317	.942	.490	1.263
.940	6.370	2.093	13.922	.804	.321	1.144
.950	4.435	1.341	10.199	.647	.127	1.009
.960	2.899	.793	7.090	.462	-.100	.851
.970	1.719	.415	4.544	.235	-.382	.657
.980	.858	.175	2.523	-.067	-.757	.402
.990	.287	.045	1.003	-.542	-1.350	.001

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log(kons) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	4.109E8	2.673E7	3.028E10	8.614	7.427	10.481
.020	1.088E8	9001908.959	5.468E9	8.037	6.954	9.738
.030	4.685E7	4509917.082	1.847E9	7.671	6.654	9.266
.040	2.485E7	2680497.855	8.164E8	7.395	6.428	8.912
.050	1.484E7	1755128.979	4.204E8	7.171	6.244	8.624
.060	9565635.720	1223731.982	2.390E8	6.981	6.088	8.378
.070	6509498.190	891831.579	1.457E8	6.814	5.950	8.163
.080	4611795.089	671718.923	9.355E7	6.664	5.827	7.971
.090	3370887.800	519011.518	6.253E7	6.528	5.715	7.796

.100	2526040.810	409275.231	4.317E7	6.402	5.612	7.635
.150	764977.382	152833.219	9320237.218	5.884	5.184	6.969
.200	296025.650	69694.381	2762752.263	5.471	4.843	6.441
.250	131098.022	35450.408	975671.787	5.118	4.550	5.989
.300	63085.971	19270.207	384108.174	4.800	4.285	5.584
.350	32030.989	10922.191	162390.207	4.506	4.038	5.211
.400	16836.398	6350.404	71995.031	4.226	3.803	4.857
.450	9036.552	3741.019	32921.256	3.956	3.573	4.517
→ .500	4898.250	2209.042	15334.025	3.690	3.344	4.186
.550	2655.089	1293.412	7203.061	3.424	3.112	3.858
.600	1425.058	741.481	3384.667	3.154	2.870	3.530
.650	749.051	409.302	1580.543	2.875	2.612	3.199
.700	380.320	212.425	729.751	2.580	2.327	2.863
.750	183.015	100.145	331.257	2.262	2.001	2.520
.800	81.050	40.892	145.726	1.909	1.612	2.164
.850	31.364	13.497	59.681	1.496	1.130	1.776
.900	9.498	3.145	20.648	.978	.498	1.315
.910	7.118	2.199	16.080	.852	.342	1.206
.920	5.202	1.487	12.280	.716	.172	1.089
.930	3.686	.965	9.147	.567	-.015	.961
.940	2.508	.595	6.596	.399	-.226	.819
.950	1.617	.342	4.552	.209	-.466	.658
.960	.965	.178	2.951	-.015	-.750	.470
.970	.512	.079	1.737	-.291	-1.101	.240
.980	.220	.027	.861	-.657	-1.568	-.065
.990	.058	.005	.287	-1.234	-2.306	-.543

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log(kons) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	8.220E8	4.502E7	8.054E10	8.915	7.653	10.906
.020	1.985E8	1.407E7	1.287E10	8.298	7.148	10.109
.030	8.060E7	6725688.938	4.021E9	7.906	6.828	9.604
.040	4.091E7	3858031.742	1.677E9	7.612	6.586	9.225
.050	2.356E7	2454208.311	8.236E8	7.372	6.390	8.916
.060	1.473E7	1669563.174	4.497E8	7.168	6.223	8.653
.070	9761775.667	1190762.469	2.646E8	6.990	6.076	8.423
.080	6752197.231	879694.650	1.646E8	6.829	5.944	8.216
.090	4828979.881	667851.214	1.069E8	6.684	5.825	8.029
.100	3546825.457	518179.471	7.188E7	6.550	5.714	7.857
.150	988506.463	180923.065	1.391E7	5.995	5.257	7.143
.200	358091.600	78198.091	3779771.690	5.554	4.893	6.577
.250	149853.863	37980.668	1239205.811	5.176	4.580	6.093
.300	68536.091	19802.191	456461.261	4.836	4.297	5.659
.350	33196.448	10794.973	181496.911	4.521	4.033	5.259
.400	16685.948	6046.311	75945.874	4.222	3.781	4.881
.450	8576.612	3433.545	32856.908	3.933	3.536	4.517
→ .500	4455.159	1953.976	14504.088	3.649	3.291	4.161
.550	2314.252	1101.206	6465.186	3.364	3.042	3.811
.600	1189.530	606.051	2886.127	3.075	2.783	3.460
.650	597.909	319.688	1282.337	2.777	2.505	3.108
.700	289.606	157.381	564.612	2.462	2.197	2.752
.750	132.452	69.649	245.018	2.122	1.843	2.389
.800	55.428	26.366	103.065	1.744	1.421	2.013

.850	20.079	7.951	40.144	1.303	.900	1.604
.900	5.596	1.655	13.028	.748	.219	1.115
.910	4.110	1.126	9.989	.614	.052	1.000
.920	2.940	.740	7.499	.468	-.131	.875
.930	2.033	.465	5.481	.308	-.333	.739
.940	1.347	.276	3.870	.129	-.558	.588
.950	.842	.152	2.607	-.074	-.817	.416
.960	.485	.076	1.643	-.314	-1.122	.216
.970	.246	.032	.934	-.609	-1.497	-.030
.980	.100	.010	.442	-1.000	-1.998	-.355
.990	.024	.002	.137	-1.617	-2.790	-.865

a. Logarithm base = 10.

F.2 Senyawa 3-CIFU

Replikasi 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log(kons) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	101986.249	31553.280	772523.715	5.009	4.499	5.888
.020	59226.167	20521.712	367870.970	4.773	4.312	5.566
.030	41952.847	15615.795	229811.024	4.623	4.194	5.361
.040	32367.466	12712.679	161338.130	4.510	4.104	5.208
.050	26210.445	10752.819	121010.161	4.418	4.032	5.083
.060	21901.769	9323.658	94742.259	4.340	3.970	4.977
.070	18710.813	8227.016	76453.411	4.272	3.915	4.883
.080	16250.274	7354.440	63099.962	4.211	3.867	4.800
.090	14294.621	6641.012	52995.710	4.155	3.822	4.724
.100	12703.159	6045.229	45134.286	4.104	3.781	4.655

.150	7792.518	4092.907	23235.788	3.892	3.612	4.366
.200	5284.465	2998.020	13726.680	3.723	3.477	4.138
.250	3786.965	2292.102	8751.193	3.578	3.360	3.942
.300	2807.615	1798.094	5850.789	3.448	3.255	3.767
.350	2127.728	1432.983	4037.102	3.328	3.156	3.606
.400	1635.490	1152.238	2846.580	3.214	3.062	3.454
.450	1267.920	929.595	2037.667	3.103	2.968	3.309
.500	986.936	748.391	1474.485	2.994	2.874	3.169
.550	768.220	597.421	1076.045	2.885	2.776	3.032
.600	595.566	468.942	791.686	2.775	2.671	2.899
.650	457.785	358.047	587.878	2.661	2.554	2.769
.700	346.929	262.804	440.432	2.540	2.420	2.644
.750	257.209	183.505	330.819	2.410	2.264	2.520
.800	184.322	120.431	245.697	2.266	2.081	2.390
.850	124.997	72.537	176.518	2.097	1.861	2.247
.900	76.677	37.850	117.912	1.885	1.578	2.072
.910	68.140	32.307	107.096	1.833	1.509	2.030
.920	59.940	27.191	96.503	1.778	1.434	1.985
.930	52.058	22.487	86.094	1.716	1.352	1.935
.940	44.473	18.181	75.821	1.648	1.260	1.880
.950	37.162	14.261	65.621	1.570	1.154	1.817
.960	30.093	10.716	55.402	1.478	1.030	1.744
.970	23.218	7.537	45.019	1.366	.877	1.653
.980	16.446	4.718	34.190	1.216	.674	1.534
.990	9.551	2.252	22.187	.980	.352	1.346

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for kons			95% Confidence Limits for log(kons) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a .010	64813.827	9429.686	1.718E8	4.812	3.974	8.235
.020	39459.305	6897.240	4.795E7	4.596	3.839	7.681
.030	28801.162	5652.416	2.135E7	4.459	3.752	7.329
.040	22727.218	4864.472	1.162E7	4.357	3.687	7.065
.050	18744.531	4303.995	7085726.156	4.273	3.634	6.850
.060	15909.510	3877.162	4652506.352	4.202	3.589	6.668
.070	13778.843	3537.136	3218024.923	4.139	3.549	6.508
.080	12114.390	3257.447	2313788.564	4.083	3.513	6.364
.090	10775.875	3021.804	1714371.492	4.032	3.480	6.234
.100	9674.888	2819.531	1301095.540	3.986	3.450	6.114
.150	6192.331	2112.034	416122.048	3.792	3.325	5.619
.200	4343.448	1673.238	168717.052	3.638	3.224	5.227
.250	3204.052	1365.422	78041.155	3.506	3.135	4.892
.300	2438.025	1132.913	39211.540	3.387	3.054	4.593
.350	1892.695	948.032	20829.527	3.277	2.977	4.319
.400	1488.476	795.004	11508.443	3.173	2.900	4.061
.450	1179.758	663.799	6547.692	3.072	2.822	3.816
→ .500	938.522	547.330	3817.150	2.972	2.738	3.582
.550	746.613	440.121	2281.813	2.873	2.644	3.358
.600	591.761	338.185	1410.705	2.772	2.529	3.149
.650	465.380	240.998	917.192	2.668	2.382	2.962
.700	361.285	154.557	635.736	2.558	2.189	2.803
.750	274.909	87.872	466.158	2.439	1.944	2.669
.800	202.793	43.910	352.129	2.307	1.643	2.547

.850	142.244	18.701	265.579	2.153	1.272	2.424
.900	91.042	6.182	192.456	1.959	.791	2.284
.910	81.740	4.717	178.608	1.912	.674	2.252
.920	72.709	3.513	164.845	1.862	.546	2.217
.930	63.926	2.538	151.078	1.806	.405	2.179
.940	55.365	1.764	137.191	1.743	.246	2.137
.950	46.991	1.163	123.033	1.672	.066	2.090
.960	38.756	.713	108.380	1.588	-.147	2.035
.970	30.583	.390	92.862	1.485	-.409	1.968
.980	22.322	.174	75.753	1.349	-.759	1.879
.990	13.590	.049	55.118	1.133	-1.311	1.741

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for k			95% Confidence Limits for log(kons) ^a		
		ons			Estimate	Lower Bound	Upper Bound
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound			
PROBIT	.010	404345.864	75322.188	9900942.361	5.607	4.877	6.996
	.020	193714.791	42911.309	3396203.941	5.287	4.633	6.531
	.030	121448.746	30018.844	1723107.075	5.084	4.477	6.236
	.040	85478.570	22938.490	1034498.265	4.932	4.361	6.015
	.050	64236.394	18427.254	683222.586	4.808	4.265	5.835
	.060	50370.112	15291.554	480033.695	4.702	4.184	5.681
	.070	40698.195	12982.844	352304.894	4.610	4.113	5.547
	.080	33625.201	11211.842	267097.106	4.527	4.050	5.427
	.090	28265.803	9810.851	207659.214	4.451	3.992	5.317

.100	24090.855	8675.676	164727.265	4.382	3.938	5.217
.150	12430.254	5207.857	63219.887	4.094	3.717	4.801
.200	7346.587	3464.334	29592.646	3.866	3.540	4.471
.250	4678.899	2436.362	15465.008	3.670	3.387	4.189
.300	3120.194	1771.013	8659.365	3.494	3.248	3.937
.350	2143.516	1312.837	5078.642	3.331	3.118	3.706
.400	1501.079	982.787	3077.757	3.176	2.992	3.488
.450	1063.425	736.375	1911.975	3.027	2.867	3.281
.500	757.502	546.565	1213.647	2.879	2.738	3.084
.550	539.586	396.234	788.743	2.732	2.598	2.897
.600	382.265	275.501	528.022	2.582	2.440	2.723
.650	267.695	180.910	364.794	2.428	2.257	2.562
.700	183.902	111.567	257.174	2.265	2.048	2.410
.750	122.638	64.386	181.378	2.089	1.809	2.259
.800	78.106	34.281	125.200	1.893	1.535	2.098
.850	46.162	16.243	82.280	1.664	1.211	1.915
.900	23.819	6.287	48.977	1.377	.798	1.690
.910	20.300	4.994	43.249	1.308	.698	1.636
.920	17.065	3.888	37.795	1.232	.590	1.577
.930	14.099	2.951	32.598	1.149	.470	1.513
.940	11.392	2.169	27.642	1.057	.336	1.442
.950	8.933	1.525	22.911	.951	.183	1.360
.960	6.713	1.009	18.384	.827	.004	1.264
.970	4.725	.606	14.031	.674	-.217	1.147
.980	2.962	.308	9.803	.472	-.511	.991
.990	1.419	.106	5.577	.152	-.976	.746

a. Logarithm base = 10.

Lampiran G. Hasil analisis uji t

Group Statistics

identitas	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ic50 fu	3	4213.7093	831.97114	480.33876
cl	3	893.6533	120.57480	69.61389

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
ic50 Equal variances assumed	6.778	.060	6.840	4	.002	3320.05600	485.35700	1972.48892	4667.62308
Equal variances not assumed			6.840	2.084	.019	3320.05600	485.35700	1310.33930	5329.77270

Lampiran H. Certificate of Analysis (COA) 5-FU

Specification



8.18505.0005 5-Fluorouracil for synthesis

Specification

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

Dr. Oliver Schramel
Responsible laboratory manager quality control

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