



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA  
1-(3,4-DIKLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Nurhidayati Fadhillah**

**NIM 112210101016**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA  
1-(3,4-DIKLOROBENZOILOKSIMETIL)-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

**Nurhidayati Fadhillah**

**NIM 112210101016**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Keluargaku khususnya kedua orang tuaku, Ayahanda Sunarto dan Ibunda Nurul Fadhillah, dengan cinta, kasih sayang, dukungan, bimbingan dan doa mereka, skripsi ini dapat diselesaikan;
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi, yang telah memberikan ilmunya dan membimbingku dengan penuh rasa sabar dan ikhlas;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap (Q.S. Al-Insyirah (94): 6-8)\*

Hanya dengan mengingat Allah hati menjadi tenang (Q.S. Ar-Ra'd (13): 28)\*

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. Al-Qur'an dan Terjemahannya. Penerbit Diponegoro. Bandung

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nurhidayati Fadhilah

NIM : 112210101016

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juni 2015

Yang menyatakan,

Nurhidayati Fadhilah

NIM 112210101016

**SKRIPSI**

**UJI SITOTOKSISITAS DAN PROLIFERASI SENYAWA  
1-(3,4-DIKLOROBENZOILOKSIMETIL)-5-FLUOROURASIL  
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA (MCF-7)**

Oleh

Nurhidayati Fadhilah

NIM 112210101016

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7)”

telah diuji dan disahkan pada:

hari : Rabu

tanggal: 10 Juni 2015

tempat : Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

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

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.  
NIP. 198204062006042001

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

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7);** Nurhidayati Fadhilah, 112210101016; 2015: 65 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker adalah suatu penyakit yang kompleks meliputi terjadinya sinyal proliferasi dalam waktu lama, terjadinya penurunan penekan pertumbuhan, penurunan kematian sel, replikasi yang berlangsung terus-menerus, perangsangan angiogenesis, dan terjadi invasi serta metastasis. Kejadian tersebut diakibatkan oleh ketidakstabilan genetik. Kanker menjadi penyebab kematian nomor dua di dunia sebesar 13% setelah penyakit kardiovaskular. Oleh karena itu diperlukan pengembangan obat untuk menangani penyakit kanker, dengan tujuan memperoleh obat dengan aktivitas yang lebih tinggi dan toksisitas lebih rendah. Pada saat ini, sudah disintesis senyawa DC yang merupakan hasil analisis HKSA turunan 5-FU. 5-FU merupakan antimetabolit yang biasa digunakan untuk pengobatan kanker seperti kanker kolorektal, payudara, ovarium, pankreas, dan lambung. Aktivitas dari senyawa DC ini belum dibuktikan, maka pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas sitotoksik dan pengaruhnya terhadap proliferasi sel kanker payudara (MCF-7).

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sintesis senyawa DC kemudian dilakukan pemurnian senyawa dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak heksana:aseton (6:4). Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT dan penentuan titik leleh. Vial yang memiliki noda tunggal (vial 11-22) digabung menjadi satu dan dieluasi lagi dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana:aseton (6:4), heksana:etil asetat:aseton (5:3:2), dan heksana:etil asetat (6:4). Hasil uji KLT menunjukkan bahwa hanya terdapat satu noda, selanjutnya dilakukan uji KLT dua dimensi dengan menggunakan eluen heksana:aseton (6:4) dilanjutkan heksana:etil asetat (6:4) hasilnya menunjukkan



hanya terdapat satu noda yang berarti bahwa senyawa murni secara KLT. Titik leleh senyawa hasil sintesis (184-185°C) mirip dengan titik leleh senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013) 184-186°C. Senyawa dikatakan murni apabila memiliki rentang titik leleh 0,5-1,5 °C, jadi senyawa hasil sintesis merupakan senyawa murni.

Uji identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan perbandingan spektra hasil densitometri dan spektrofotometer infra merah. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa spektra senyawa hasil sintesis mirip dengan spektra senyawa DC sintesis Palupi (2013) dengan panjang gelombang maksimal berturut-turut adalah 259 dan 258 nm. Senyawa hasil sintesis juga memiliki gugus-gugus senyawa yang sama seperti senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013) walaupun mengalami sedikit pergeseran frekuensi tapi spektranya mirip seperti spektra senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013). Tahap selanjutnya yaitu uji sitotoksisitas dan uji *doubling time* terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan metode MTT. Uji sitotoksisitas dilakukan untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 akibat perlakuan senyawa 5-FU dan senyawa DC. Perlakuan dengan senyawa 5-FU maupun DC memberikan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut 4201,86  $\mu$ M dan 889,744  $\mu$ M. Hasil statistik antara senyawa 5-FU dan DC menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna yang signifikan ( $\alpha < 0,05$ ). Dengan demikian dapat dilihat bahwa senyawa 5-FU memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan DC dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7 tapi kedua senyawa tersebut tidak dapat dikatakan sebagai senyawa sitotoksik karena memiliki  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu$ M.

Aktivitas proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 5-FU dan DC dapat dilihat dengan uji *doubling time*. Hasil *doubling time* untuk senyawa 5-FU konsentrasi 0,5  $IC_{50}$ ;  $IC_{50}$  dan 1,5  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 186,265 jam; 213,673 jam; dan 222,252 jam. Hasil *doubling time* untuk senyawa DC konsentrasi 0,5  $IC_{50}$ ;  $IC_{50}$  dan 1,5  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 200,425 jam; 259,699 jam; dan 412,202 jam. Dengan demikian kemampuan senyawa 5-FU dalam menghambat proliferasi sel MCF-7 lebih kecil dibandingkan dengan senyawa DC.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul Uji Sitotoksitas dan Proliferasi Senyawa 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil terhadap Sel Kanker Payudara (MCF-7). Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk dapat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini bukan semata-mata disusun berdasarkan kemampuan penulis sendiri, melainkan karena mendapat bantuan dari berbagai pihak sehingga penyusunan ini bisa terselesaikan dengan baik, untuk itu pada kesempatan kali ini dengan segala ketulusan hati dan kerendahan hati penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas semua karunia yang telah diberikan;
2. Ibu Lestyo Wulandari S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Ayik Rosita., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota; yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu penulisan skripsi ini;
4. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt. M.Farm dan Bapak Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji; yang telah banyak memberikan bantuan, saran, waktu, dan perhatiannya dalam penulisan skripsi ini;
5. Bapak Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt. dan Bapak Drs. Wiratmo selaku Dosen Pembimbing Akademik;
6. Kedua orang tuaku, Ayahanda Sunarto dan Ibunda Nurul Fadhillah tercinta yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi, serta doanya selama ini. Walau terpisah jarak, aku bangga memiliki orang tua seperti kalian yang selalu sabar menghadapi segala cobaan, terima kasih atas semua

pengorbanan yang engkau berikan untukku. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kebahagiaan dan lindunganNya atas segala kebaikan dan kemuliaan hati kedua orang tuaku,amin;

7. Ketiga saudaraku Kiftiyah Sa'adatul Fadhilah, Mariatul Huda Fadhilah, dan Badhiaturrohmah yang telah memberikan dukungan dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini;
8. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi di Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Jember;
9. Partner skripsiku Meyladia Sukma Ayu, Puspita Arum Wijayanti, Awalia Annisafira, dan Eka Mustika Wati yang selalu memberi semangat dan motivasi serta waktu untuk bertukar pikiran;
10. Teman – teman seperjuangan Tintia Lintang P, Imro'atul Mufidah, Nurul Imamah, dan Ichlasul Amalia yang telah memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini;
11. Teman – teman angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember serta teman-teman kosan Kalimantan VIII/15 tempatku bertukar pikiran, berbagi cerita, semangat, dan kerja samanya hingga skripsi ini selesai;
12. Semua Dosen serta semua pihak yang tidak mungkin penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi para pengkaji/pembaca dan bagi penulis sendiri. Amin Ya Rabbal Alamin.

Jember, 10 Juni 2015

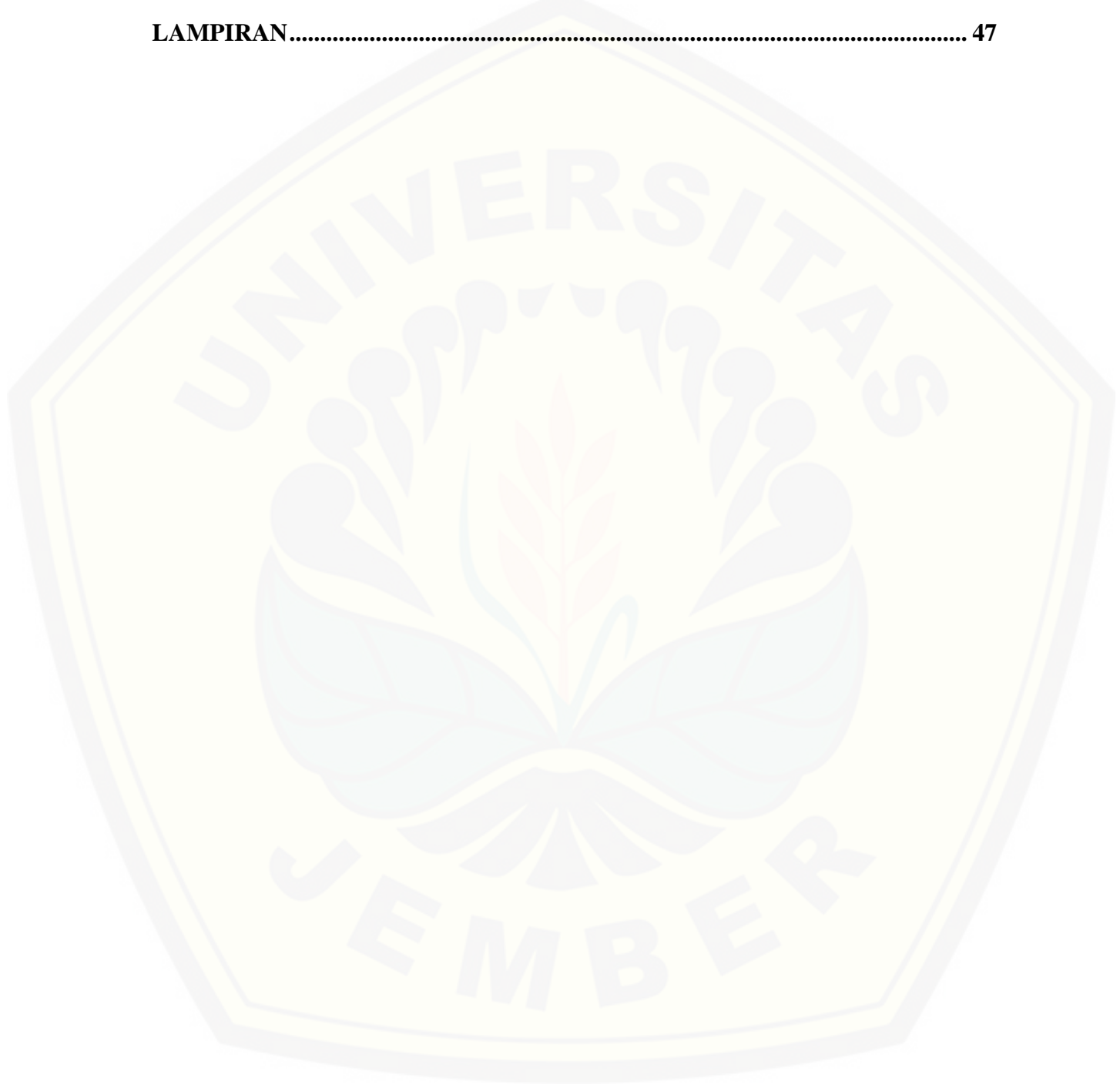
Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat .....	4
1.5 Batasan Masalah .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Kanker Payudara.....	5
2.2 Faktor Risiko Kanker Payudara.....	5
2.2 Tinjauan tentang Obat Antikanker .....	7
2.3 Tinjauan tentang Sel Kanker Payudara MCF-7.....	9
2.4 Tinjauan tentang Senyawa 5-FU .....	9

2.5 Tinjauan tentang Senyawa DC .....	12
2.6 Tinjauan tentang MTT <i>assay</i> .....	14
2.7 Tinjauan tentang Uji <i>Doubling Time</i> .....	14
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>15</b>
3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian .....	<b>15</b>
3.2 Rancangan Penelitian .....	15
3.3 Variabel Penelitian .....	17
3.3.1 Variabel Bebas .....	17
3.3.2 Variabel Terikat .....	17
3.4 Definisi Operasional Variabel .....	17
3.5 Bahan dan Alat yang Digunakan .....	17
3.6 Prosedur Penelitian .....	19
3.6.1 Sintesis Senyawa DC .....	19
3.6.2 Pemurnian Menggunakan Kromatografi Kolom .....	19
3.6.3 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis .....	20
3.6.4 Identifikasi Struktur Senyawa DC .....	20
3.6.5 Preparasi Larutan Sampel dan Pembanding .....	21
3.6.6 Kultur Sel Kanker Payudara .....	21
3.6.7 Uji Sitotoksisitas .....	22
3.6.8 Uji <i>Doubling Time</i> .....	22
3.7 Analisis Data .....	23
3.8 Skema Penelitian .....	25
3.8.1 Alur Penelitian Aktivitas Senyawa DC atau 5-FU terhadap Sel MCF-7 .....	25
3.8.2 Sintesis Senyawa DC (Palupi, 2013) .....	26
3.8.4 Preparasi Larutan Sampel .....	28
3.8.5 Uji Sitotoksisitas .....	29
3.8.6 Uji <i>Doubling Time</i> .....	30
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>30</b>

**BAB 5. PENUTUP..... 42**  
**DAFTAR PUSTAKA ..... 43**  
**LAMPIRAN..... 47**



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1	Karakteristik spektra FTIR.....13
2.2	Karakteristik spektra senyawa DC dengan H-NMR 500 MHz .....13
4.1	Data KLT dari senyawa hasil sintesis .....34
4.2	Hasil penentuan titik leleh.....34
4.3	Perbandingan spektra FTIR KBr hasil sintesis dan literatur .....37
4.4	Hasil uji sitotoksisitas senyawa DC dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 .....38
4.5	Hasil uji <i>doubling time</i> senyawa DC dan 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7 .....40

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1	Struktur 5-FU .....10
2.2	Mekanisme kerja 5-FU dalam membunuh sel kanker.....11
2.3	Struktur metabolit 5-FU .....11
2.4	Mekanisme kerja 5-FU melalui penghambatan TS.....11
2.5	Struktur 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil .....12
2.6	Spektra FTIR senyawa 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)- 5-fluorourasil .....12
2.7	Spektra H-NMR senyawa DC dengan H-NMR 500 MHz.....13
4.1	Hasil KLT fraksi hasil kromatografi kolom.....31
4.2	Hasil KLT vial nomor 10-23 .....32
4.3	Hasil KLT produk hasil sintesis .....33
4.4	Hasil KLT produk hasil sintesis .....33
4.5	Hasil KLT dua dimensi senyawa hasil sintesis .....34
4.6	Spektra senyawa hasil sintesis.....35
4.7	Spektra senyawa hasil sintesis dan bahan awal.....36
4.8	Spektra FTIR KBr senyawa DC.....36
4.9	Kurva konsentrasi vs sel hidup (%) sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa DC dan senyawa 5-FU .....38
4.10	Kurva kinetika proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 5-FU dan senyawa DC .....40



**DAFTAR SINGKATAN**

DC	= 1-(3,4-diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil
5-FU	= 5-fluorourasil
KLT	= kromatografi lapis tipis
MCF-7	= <i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
HKSA	= hubungan kuantitatif struktur-aktivitas
DNA	= <i>deoxyribonucleic acid</i>
CCS	= <i>cell-cycle specific</i>
CCNS	= <i>cell-cycle non specific</i>
TS	= timidilat sintase
FUTP	= fluorouridin trifosfat
FdUMP	= fluorodeoksiuridin monofosfat
FdUTP	= fluorodeoksiuridin trifosfat
DPD	= dihidropirimidin dehidrogenase
DHFU	= dihidrofluorourasil
dUMP	= deoksiuridin monofosfat
dTMP	= deoksitimidin monofosfat
RNA	= <i>ribonucleic acid</i>
dTTP	= deoksitimidin trifosfat
UDG	= urasil-DNA-glikosilase
MK	= medium kultur

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Perhitungan Untuk Preparasi Senyawa untuk Uji Sitotoksik dan Uji <i>Doubling time</i> .....	47
A1. Preparasi Larutan Uji untuk Uji Sitotoksik.....	47
A2. Preparasi Larutan Uji untuk Uji <i>Doubling Time</i> .....	48
B. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksisitas .....	49
B.1 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa 5-FU.....	49
B.1.1 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa 5-FU Replikasi 1 .....	49
B.1.2 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa 5-FU Replikasi 2.....	50
B.1.3 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa 5-FU Replikasi 3.....	51
B.2 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC.....	52
B.2.1 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC Replikasi 1.....	52
B.2.2 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC Replikasi 2.....	53
B.2.3 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC Replikasi 3.....	54
C. Hasil Analisis Uji Sitotoksisitas .....	55
C.1 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (1).....	55
C.2 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (2).....	56
C.3 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (3).....	57
C.4 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (1).....	58
C.5 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (2).....	59
C.6 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (3).....	60
C.7 Hasil Uji t.....	61
C.8 Foto Sel MCF-7 Sebelum Diberi Perlakuan .....	61
C.9 Foto Sel MCF-7 Setelah Diberi Larutan MTT .....	62
C.10 Foto Sel MCF-7 Setelah Diberi Larutan SDS.....	62
D. Perhitungan Hasil Uji <i>Doubling Time</i> .....	63
D.1. Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU .....	63

D.1.1	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU (24 jam) .....	65
D.1.2	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU (48 jam) .....	65
D.1.3	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa 5-FU (72 Jam) .....	65
D.2	Hasil Uji <i>Doubling time</i> Senyawa DC .....	66
D.2.1	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa DC (24 Jam) .....	66
D.2.2	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa DC (48 Jam) .....	66
D.2.3	Hasil Uji <i>Doubling Time</i> Senyawa DC (72 Jam) .....	67
E.	Grafik <i>Doubling Time</i> .....	67
E.1	Grafik <i>Doubling Time</i> Konsentrasi 0,5 IC <sub>50</sub> .....	67
E.2	Grafik <i>Doubling Time</i> Konsentrasi IC <sub>50</sub> .....	67
E.3	Grafik <i>Doubling Time</i> Konsentrasi 1,5 IC <sub>50</sub> .....	68
F.	Skema Operasional Substitusi Aromatik Model Pendekatan Topliss .....	68

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Kanker adalah suatu penyakit yang kompleks meliputi terjadinya sinyal proliferasi dalam waktu lama, terjadinya penurunan penekan pertumbuhan, penurunan kematian sel, replikasi yang berlangsung terus-menerus, perangsangan angiogenesis, dan terjadi invasi serta metastasis. Kejadian tersebut diakibatkan oleh ketidakstabilan genetik (Hanahan dan Weinberg, 2011). Penyakit kanker menjadi masalah kesehatan utama baik di dunia maupun di Indonesia. Menurut data WHO tahun 2013, insidensi kanker meningkat dari 1,4 juta kasus pada tahun 2008 menjadi 12,7 juta kasus pada tahun 2012. Sedangkan kematian meningkat dari 7,6 juta orang tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012. Kanker menjadi penyebab kematian nomor dua di dunia sebesar 13% setelah penyakit kardiovaskular. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, penyakit kanker tertinggi di Indonesia pada perempuan adalah kanker payudara dan kanker leher rahim (Depkes RI, 2014). WHO menyebutkan kanker payudara sebagai jenis kanker pembunuh wanita tertinggi di dunia juga Indonesia (Jambiekspres, 2014).

Penanganan yang tepat dibutuhkan untuk mengurangi risiko kematian akibat kanker payudara. Salah satunya adalah menggunakan kemoterapi. Penggunaan kemoterapi pada pasien kanker payudara stadium awal diketahui dapat mengurangi 15 tahun waktu kematian (EBCTCG, 2005). Pada kanker payudara stadium II kombinasi kemoterapi juga sangat bermanfaat. Pemilihan penanganan kanker yang kurang cermat hanya akan menambah penderitaan, bisa memperparah, dan pemborosan biaya. Seorang penderita kanker bahkan bisa menghabiskan puluhan juta biaya sebelum meninggal dan perpanjangan penderitaan tanpa mengalami hidup yang berarti. Menurut data statistik di negara

maju, 17% pasien kanker sembuh dengan kemoterapi. Bila ditambah dengan pembedahan dini, 50% pasien kanker dapat disembuhkan (Syarif *et al.*, 2007).

Ketepatan pemilihan agen kemoterapi sangat diperlukan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan. Saat ini terdapat berbagai macam agen kemoterapi, namun efektivitasnya masih belum maksimal dalam mengobati kanker khususnya kanker payudara (Anonim, 2015). Oleh karena itu diperlukan pengembangan obat untuk menangani penyakit kanker, dengan tujuan memperoleh obat dengan aktivitas yang lebih tinggi dan toksisitas lebih rendah. Salah satu metode pendekatan pengembangan obat baru adalah menggunakan HKSA. Pengembangan obat antikanker baru dengan pendekatan HKSA sudah banyak dilakukan. Metode tersebut memiliki beberapa keuntungan salah satunya adalah lebih banyak menghemat biaya penelitian atau ekonomis karena untuk mendapatkan obat baru dengan aktivitas yang dikehendaki, faktor coba-coba (*trial and error*) ditekan sekecil mungkin sehingga jalur sintesis menjadi lebih pendek (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Pada saat ini, sudah disintesis senyawa 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (DC) yang merupakan hasil analisis HKSA turunan 5-fluorourasil (5-FU). 5-FU merupakan antimetabolit yang biasa digunakan untuk pengobatan kanker seperti kanker kolorektal, payudara, ovarium, pankreas, dan lambung (Akbari dan Javar, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya, telah dilakukan sintesis turunan 5-FU melalui substitusi dengan derivat asam amino dan ester, dimana setelah diuji aktivitasnya menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan 5-FU (Xiong *et al.*, 2009). Zhou *et al* (2010) juga melakukan sintesis turunan 5-FU melalui substitusi turunan ampelopsin dan setelah diuji aktivitas biologisnya ternyata memberikan aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan 5-FU.

Senyawa DC disintesis dengan melakukan substitusi alkil, benzena, ester, dan atom kloro (Cl) pada posisi 3 dan 4. Berdasarkan pendekatan HKSA, gugus alkil dan benzen merupakan parameter lipofilik yang memudahkan penembusan membran sehingga meningkatkan aktivitas antikanker senyawa tersebut. Atom Cl

dan ester merupakan parameter elektronik yang berpengaruh dalam keserasian interaksi dengan reseptor sehingga juga akan meningkatkan aktivitas antikankernya. Substitusi pada posisi 3 dan 4 akan meningkatkan halangan sterik. Halangan sterik merupakan perisai untuk menstabilkan ikatan antara obat dan reseptor serta akan meningkatkan aktivitas antikankernya. Atom Cl memiliki nilai tetapan substituen Hansch-Fujita ( $\pi$ ) dan nilai tetapan elektronik Hammet ( $\sigma$ ) yang positif. Nilai positif ini menyebabkan apabila suatu senyawa disubstitusi oleh atom Cl maka akan meningkatkan sifat lipofilik dan elektronik. Dimana peningkatan sifat lipofilik dan elektronik akan meningkatkan aktivitas antikankernya (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Oleh karena itu, pengembangan obat ini bersifat rasional sehingga akan mengurangi biaya.

Berdasarkan analisis HKSA terhadap turunan 5-FU tersebut, senyawa DC diperkirakan memiliki aktivitas antikanker yang lebih besar dibandingkan 5-FU. Senyawa ini nantinya dapat digunakan sebagai obat antikanker yang dapat mengobati penyakit kanker payudara baik dengan pemakaian tunggal atau dengan kombinasi. Aktivitas dari senyawa ini belum dibuktikan atau diuji, maka pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas sitotoksik dan pengaruhnya terhadap proliferasi sel kanker payudara (MCF-7). Uji sitotoksitas merupakan salah satu pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan senyawa yang bersifat toksik pada sel yang merupakan syarat mutlak untuk obat-obat antikanker (Kurnijasanti *et al.*, 2008). Uji tersebut termasuk evaluasi preklinik yang merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas antikankernya. Uji tersebut diperlukan dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker (Dewi, 2012). Sedangkan uji proliferasi dilakukan untuk mengetahui profil pertumbuhan sel MCF-7 akibat perlakuan dengan DC dan 5-FU. Digunakan sel MCF-7 karena sel ini mengekspresikan p53 *wild type* sehingga sensitif terhadap agen antineoplastik (Crawford dan Bowen, 2002).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana aktivitas sitotoksik senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara (MCF-7)?
- b. Bagaimana aktivitas antiproliferasi senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU terhadap kanker payudara (MCF-7) ?

## 1.3 Tujuan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

- a. Menentukan aktivitas sitotoksik senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara (MCF-7).
- b. Menentukan aktivitas antiproliferasi senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara (MCF-7).

## 1.4 Manfaat

Dapat digunakan sebagai penelitian awal untuk mendapatkan obat untuk penyakit kanker payudara yang efektif.

## 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini antara lain:

- a. Menentukan jumlah sel yang hidup dengan dilakukan uji sitotoksisitas menggunakan metode MTT *assay*.
- b. Menentukan adanya hambatan yang terjadi pada proliferasi sel dengan uji *doubling time* menggunakan metode MTT *assay*.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Kanker Payudara**

Kanker payudara terjadi karena hilangnya kontrol atas proliferasi sel dan apoptosis sehingga sel berproliferasi terus menerus tanpa ada batas kematian. Hilangnya fungsi apoptosis menyebabkan ketidakmampuan mendeteksi kerusakan sel akibat kerusakan DNA. Selanjutnya apabila terjadi mutasi p53 maka fungsi sebagai pendeteksi kerusakan DNA menjadi hilang, sehingga sel-sel abnormal berproliferasi terus menerus (Nugrahaningsih,2004). Kanker payudara mungkin ditemukan pada saat masih lokal (*in situ*) atau ditemukan sebagai neoplasma maligna (telah menyebar). Kanker payudara hampir selalu merupakan adenokarsinoma dan biasanya timbul di duktus (Corwin, 2007).

### **2.2 Faktor Risiko Kanker Payudara**

Faktor risiko sebagai pemicu timbulnya kanker payudara antara lain sebagai berikut.

a. Usia

Wanita usia 80-85 tahun memiliki risiko lebih besar terhadap kanker payudara dibandingkan dengan wanita usia 30-35 tahun.

b. Ras

Wanita Afrikan-Amerikan yang berusia kurang dari 50 tahun memiliki risiko lebih besar terhadap kanker payudara daripada wanita Amerikan putih, tapi pada usia lebih dari 50 tahun wanita Afrikan-Amerika yang memiliki risiko lebih kecil dibandingkan dengan wanita Amerikan putih. Wanita Hispanic yang tinggal di Amerika utara memiliki risiko 40-50% lebih besar terhadap kanker payudara dibandingkan dengan wanita non Hispanic putih. Wanita Asian yang tinggal di Asia memiliki risiko yang kecil terhadap kanker payudara, tapi anak perempuannya yang



lahir di Amerika utara memiliki risiko kanker payudara yang sama dengan wanita Amerikan putih.

c. Kelahiran hidup pertama

Wanita dengan kehamilan pertama sebelum usia 20 tahun mempunyai risiko yang besarnya separuh dari besar risiko yang dihadapi oleh wanita dengan kelahiran pertama setelah usia 35 tahun (Mitchell, *et al.*, 2006).

d. Ginekologi

a) Usia pada saat haid pertama (*menarche*)

Wanita yang mengalami *menarche* pada usia 11-14 tahun memiliki risiko kanker payudara 10-30 % lebih besar daripada yang mengalami *menarche* usia 16 tahun

b) Usia pada saat menopause

Wanita yang mengalami menopause usia lebih dari 54 tahun atau lebih tua memiliki risiko kanker payudara 50% lebih besar daripada yang mengalami menopause usia 45-55 tahun

e. Kehamilan

Kehamilan pada usia muda (< 20 tahun) mengurangi kemungkinan terjadinya kanker payudara.

f. Alkohol

Terlalu banyak konsumsi alkohol meningkatkan risiko kanker payudara. Hal ini dikarenakan alkohol dapat memfasilitasi transpor karsinogen ke dalam jaringan payudara.

g. Riwayat keluarga

Seseorang yang ibunya menderita kanker payudara memiliki risiko lebih besar terkena kanker payudara. Faktor risiko ini berkaitan dengan genetika. Gen-gen untuk kanker payudara dapat dibawa atau diwariskan oleh kedua orang tua. Wanita yang mewarisi gen untuk kanker payudara biasanya mendapat penyakit tersebut pada usia yang lebih dini daripada wanita yang keluarganya tidak memiliki riwayat penyakit tersebut .

#### h. Berat Badan

Berat badan berhubungan dengan risiko kanker payudara pada wanita postmenopause dan tidak ada hubungan antara berat badan dan risiko kanker payudara pada wanita premenopause (Corwin, 2007).

## 2.2 Tinjauan tentang Obat Antikanker

Tugas utama obat-obatan yang digunakan sebagai sitostatika adalah menghambat pertumbuhan sel neoplastik secara efektif. Terdapat beberapa tempat kerja dari obat-obat antikanker yang berbeda-beda antara lain :

- a. Menghambat mitosis
- b. Bekerja pada metabolisme sel sesungguhnya
- c. Bekerja pada sistem fermentasi
- d. Bekerja pada nukleotida
- e. Bekerja dan masuk pada jalur biosintesis DNA

Dari gambaran di atas terlihat bahwa hampir semua sitostatika bekerja dengan merusak sel yang sedang dalam pembelahan atau juga pada sel-sel yang sedang tumbuh. Sebagian besar senyawa yang digunakan sebagai sitostatika ditinjau secara kimia merupakan zat pengalkilasi yang baik (alkilansia).

Ditinjau dari siklus sel, obat antikanker dapat digolongkan ke dalam 2 golongan yaitu CCS dan CCNS.

#### a. CCS

Zat CCS merupakan zat yang bersifat toksisitas selektif terhadap fase-fase tertentu dari siklus sel, misalnya vinkristin, vinblastin, merkaptopurin, hidroksiurea, metotreksat dan asparaginase. Zat CSS terbukti efektif terhadap kanker yang berproliferasi cepat misalnya kanker sel darah.

#### b. CCNS

Zat CCNS merupakan zat yang tidak bersifat toksisitas selektif terhadap fase-fase dari siklus sel, misalnya zat alkilator, antibiotik antikanker, sisplatin, prokarbazin, dan nitrosourea. Banyak zat yang tergolong CCNS tapi lebih efektif

terhadap sel yang berproliferasi dan terhadap sel-sel yang sedang dalam fase siklus tertentu.

Kerja antikanker pada umumnya berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial. Tidak adanya perbedaan kualitatif antara sel kanker dan sel normal maka semua antikanker bersifat mengganggu sel normal, sitotoksik dan bukan kankerosid atau kankerotoksik yang selektif. Berikut adalah klasifikasi antikanker berdasarkan kerjanya pada proses dalam sel.

a. Alkilator

Cara kerjanya yaitu melalui pembentukan ion karbonium (alkil) atau kompleks lain yang sangat reaktif. Gugus alkil ini kemudian berikatan kovalen dengan berbagai nukleofilik penting dalam tubuh misalnya fosfat, amino, sulfhidril, hidroksil, karboksil atau gugus imidazol. Alkilator yang bifungsional dapat berikatan kovalen dengan 2 gugus asam nukleat pada rantai yang berbeda membentuk cross-linking sehingga terjadi kerusakan pada fungsi DNA. Hal inilah yang menjelaskan sifat sitotoksik dan mutagenik dari alkilator.

b. Antimetabolit

Antipurin dan antipirimidin mengambil tempat purin dan pirimidin dalam pembentukan nukleosida, sehingga mengganggu berbagai reaksi penting dalam tubuh. Penggunaannya sebagai obat antikanker didasarkan atas kenyataan bahwa metabolisme purin dan pirimidin lebih tinggi pada sel kanker dari sel normal. Dengan demikian, penghambatan sintesis DNA sel kanker lebih dari sel normal. Antimetabolit terdiri dari antagonis purin, antagonis pirimidin, dan antagonis folat.

c. Produk alamiah

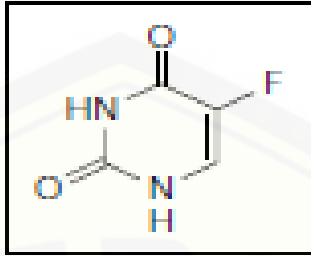
Produk alamiah merupakan obat kanker yang berasal dari alam. Produk alamiah terdiri dari alkaloid vinka, takson, epipodofilotoksin, kamptotesin, antibiotik (antrasiklin, aktinomisin, dan bleomisin), dan enzim (asparaginase) (Syarif *et al.*, 2007).

### 2.3 Tinjauan tentang Sel Kanker Payudara MCF-7

Sel MCF-7 merupakan sel yang menyerupai sel epitel yang tumbuh secara *monolayer* dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Sel MCF-7 adalah sel yang umum digunakan untuk menguji efek kanker payudara *in vitro* karena bentuknya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia (Widowati dan Mudahar, 2009). Sel MCF-7 merupakan sel kanker payudara yang mengekspresikan gen *p53 wild type* sehingga sensitif terhadap agen kemoterapi (Crawford dan Bowen, 2002).

### 2.4 Tinjauan tentang Senyawa 5-FU

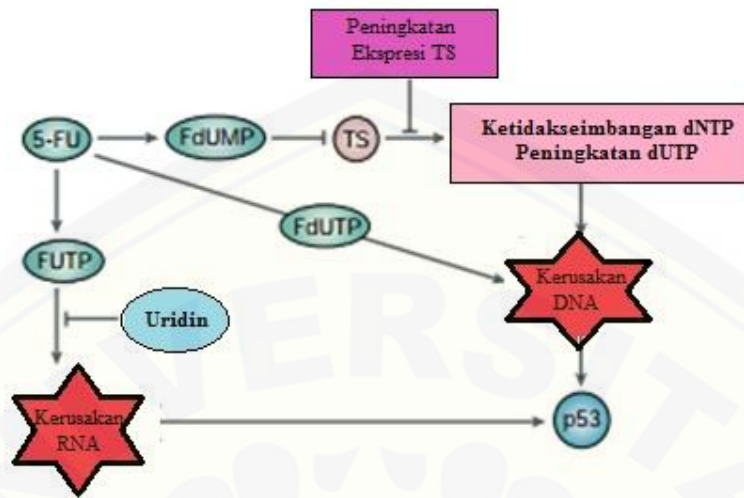
5-FU merupakan analog dari urasil dengan atom fluoro pada posisi C-5 (Gambar 2.1). 5-FU secara cepat masuk ke dalam sel menggunakan mekanisme transpor yang difasilitasi yang sama sebagai urasil. Mekanisme kerja 5-FU (Gambar 2.2) yaitu sebagai antimetabolit yang bekerja secara antagonis dengan timin terhadap aktivitas enzim TS. 5-FU merupakan prodrug, 5-FU di dalam tubuh dimetabolisme menjadi 3 metabolit aktif utama yaitu FUTP, FdUMP, dan FdUTP (Gambar 2.3). Metabolit aktif tersebut akan mengganggu sintesis RNA dan kerja dari TS. Enzim yang membatasi kerja 5-FU adalah DPD yang akan mengubah 5-FU menjadi DHFU (Longley *et al.*, 2003). Aktivitas antikankernya terutama melalui penghambatan TS. TS merupakan enzim yang mengkatalisis biosintesis timidilat yang terlibat dalam pengaturan sintesis protein dan proses apoptosis. TS mengkatilisis metilasi dUMP menjadi dTMP dimana 5,10-metilentetrahidrofolat ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) sebagai donor metil dan selanjutnya berperan dalam reaksi timidilat untuk menjaga replikasi dan perbaikan DNA (Zhang *et al.*, 2008).



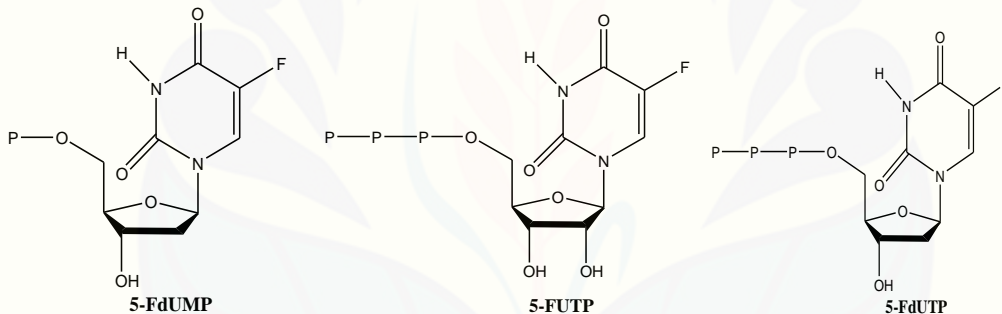
Gambar 2.1 Struktur 5-FU (Sumber: Longley *et al.*, 2003)

Protein TS berfungsi sebagai dimer yaitu subunit yang mengandung daerah pengikatan nukleotida dan daerah pengikatan  $\text{CH}_2\text{THF}$ . Metabolit 5-FU yaitu FdUMP akan berikatan pada daerah pengikatan nukleotida pada TS membentuk kompleks yang stabil dengan enzim dan  $\text{CH}_2\text{THF}$  sehingga akan menghalangi pengikatan substrat normal (dUMP) dan menghambat sintesis dTMP (Gambar 2.4). Penurunan dTMP menyebabkan penurunan dTTP, sehingga akan mengganggu kadar deoksinukleotid yang lain (dATP, dGTP, dan dCTP). Ketidakseimbangan nukleotid (rasio dATP/dTTP) akan mengganggu sintesis dan perbaikan DNA. Disamping itu, penghambatan TS akan menyebabkan akumulasi dUMP yang akan memicu peningkatan kadar dUTP. dUTP dan FdUTP dapat bergabung dengan DNA yang menyebabkan pemutusan rantai dan kematian sel. Perbaikan kerusakan DNA oleh enzim UDG tidak akan berguna ketika tingginya rasio (F)dUTP/dTTP (Longley *et al.*, 2003). Penggabungan pada RNA dan DNA merupakan mekanisme lain dari 5-FU sebagai antikanker. 5-FU sebagai analog pirimidin dapat bergabung pada RNA dan DNA pada tempat urasil atau timin. Sehingga akan mengganggu biosintesis dan fungsi normal asam nukleat (Zhang *et al.*, 2008).

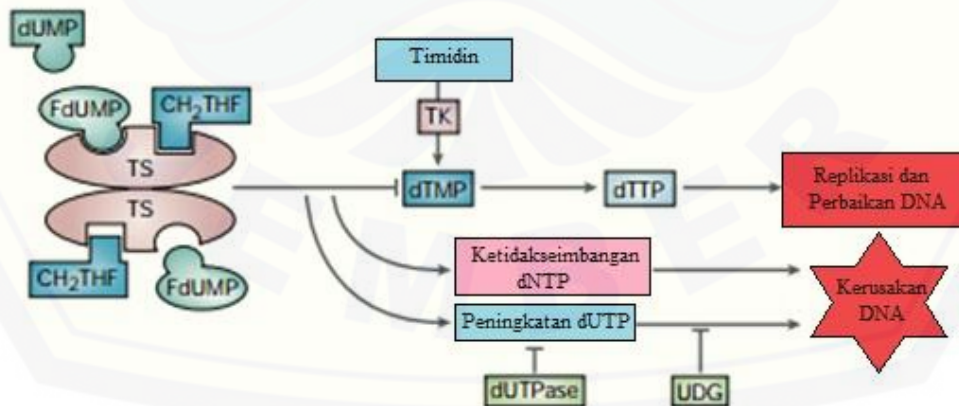
Kerusakan DNA akan memicu ekspresi gen *p53 wild type* dan kemudian *p21*. *p53* merupakan gen penekan tumor untuk menjaga integritas DNA melalui aktivasi gen *CDKN1A* dan *GADD45 $\alpha$*  (gen respon kerusakan). Hal tersebut menyebabkan terjadinya *cycle arrest*. *p53* dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi gen proapoptosis seperti *FAS* dan *BAX* dan akan menurunkan gen anti apoptosis seperti *BCL2* (Longley *et al.*, 2003).



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



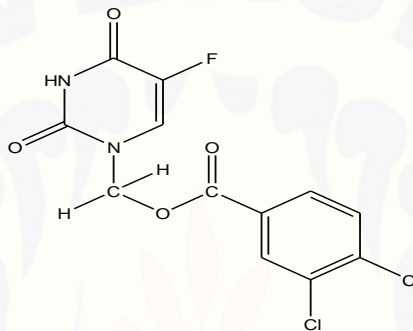
Gambar 2.3 Struktur Metabolit 5-FU (Sumber: Avendaño dan Mene'ndez, 2008)



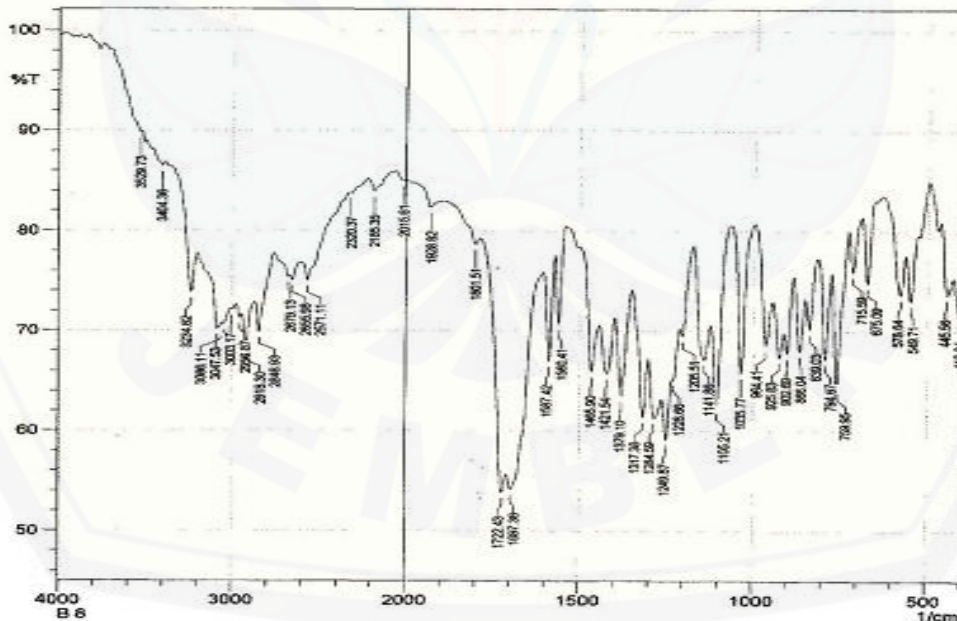
Gambar 2.4 Mekanisme Kerja 5-FU Melalui Penghambatan TS (Sumber: Longley *et al.*, 2003)

## 2.5 Tinjauan tentang Senyawa DC

Senyawa ini berbentuk serbuk putih memiliki titik leleh 184-186°C. Senyawa DC merupakan turunan dari 5-FU (Palupi, 2013). Struktur senyawa ini dapat dilihat pada Gambar 2.5. Hasil spektra inframerah senyawa DC dapat dilihat pada Gambar 2.6 dan perbandingan spektra hasil percobaan dengan literatur dapat dilihat pada Tabel 2.1. Hasil spektra H-NMR senyawa DC dapat dilihat pada Gambar 2.7 dan karakteristik spektra senyawa dengan H-NMR 500 MHz dapat dilihat pada Tabel 2.2.



Gambar 2.5 Struktur 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (Sumber: Palupi, 2013)

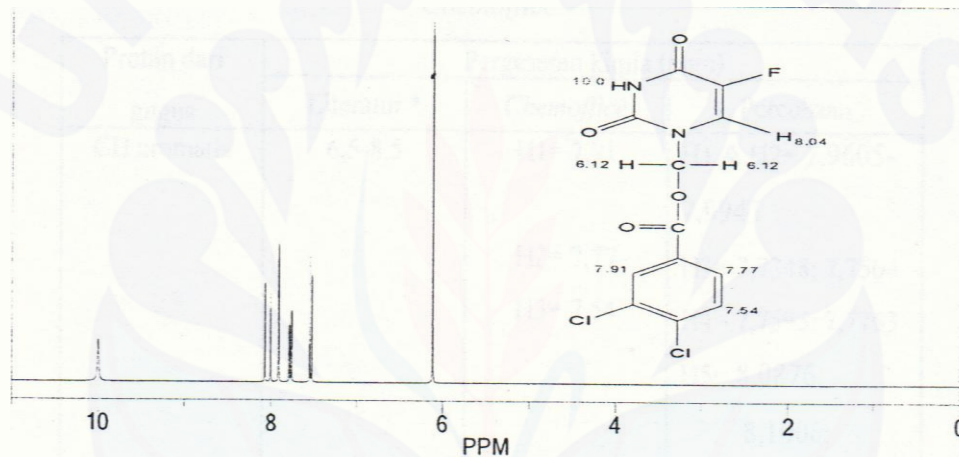


Gambar 2.6 Spektra FTIR senyawa 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil (Sumber: Palupi, 2013)

Tabel 2.1 Karakteristik spektra FTIR

Type Ikatan	Frekuensi ( $\text{cm}^{-1}$ )
C=O (ester konjugasi)	1722,43
N-H (amida)	3404,36
C=O (amida)	1697,38
O-H (karboksilat)	2571,11-3234,82
C-O (ester)	1284,59
C=O (karboksilat)	1697,38

Sumber: Palupi (2013).



Gambar 2.7 Spektra H-NMR senyawa DC dengan H-NMR 500 MHz (Sumber: Palupi, 2013)

Tabel 2.2 Karakteristik spektra senyawa DC dengan H-NMR 500 MHz

Pergeseran kimia (ppm)	Multiplisitas	Integrasi	Proton dari gugus
7,7348; 7,7504	Doublet	1,233	CH aromatis
7,7595; 7,7763	Doublet	0,997	CH aromatis
7,9605-7,9943	Multiplet	2,156	CH aromatis
8,0876; 8,1006	Doublet	1	CH aromatis
8,1253-8,1292	Doublet	1,189	CH aromatis
8,1538-8,1577	Doublet	0,865	H alkena
5,9812	Singlet	2,092	CH <sub>2</sub> ester
10,7	Singlet	-	NH

Sumber: Palupi (2013).



## 2.6 Tinjauan tentang MTT assay

Garam tetrazolium 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay merupakan metode yang digunakan untuk mengevaluasi sitotoksitas secara *in vitro*. MTT assay merupakan metode kolorimetri yang didasarkan pada perubahan warna kuning garam tetrazolium 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide yang larut air menjadi warna biru kristal formazan yang tidak larut air akibat enzim succinat-dehidrogenase mitokondria. Penurunan reduksi MTT dapat digunakan sebagai indeks kerusakan sel (Abe dan Matsuki, 2000; Hansen, 2010). Jumlah produk formazan diukur menggunakan spektrofotometer untuk menghitung viabilitas relatif sel. Absorbansi secara langsung proporsional dengan konsentrasi larutan biru formazan. Diasumsikan bahwa reaksi tersebut hanya terjadi pada sel yang hidup dengan mitokondria yang fungsional. Diasumsikan juga bahwa jumlah formazan yang terbentuk selama periode tertentu secara langsung proporsional dengan jumlah sel yang hidup tiap sumuran. MTT assay merupakan metode yang tepat, reliable, dan kuantitatif untuk mengukur proliferasi dan viabilitas sel. (Sylvester, 2011).

## 2.7 Tinjauan tentang Uji Doubling Time

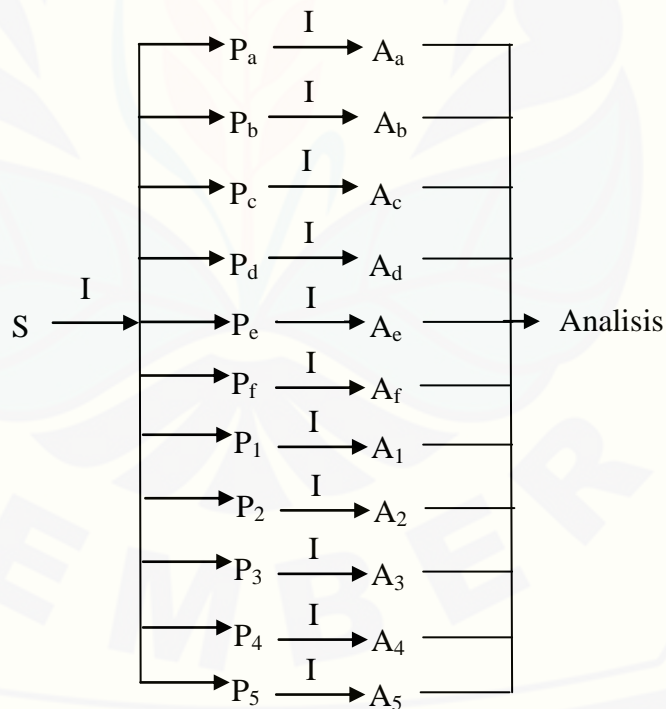
*Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kalinya. Waktu *doubling time* ditentukan dengan ekstrapolasi dari waktu *vs* log jumlah sel hidup. Uji *doubling time* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa uji untuk menghambat proliferasi sel. Senyawa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

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

Uji sitotoksisitas dan proliferasi senyawa DC terhadap sel kanker payudara (MCF-7) merupakan penelitian *Experimental Laboratories*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada bulan Agustus 2014 sampai April 2015.

#### 3.2 Rancangan Penelitian



## Keterangan:

- S : Kultur sel MCF-7
- P<sub>a</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 0,5  $\mu$ M
- P<sub>b</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 5  $\mu$ M
- P<sub>c</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 50  $\mu$ M
- P<sub>d</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 250  $\mu$ M
- P<sub>e</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 500  $\mu$ M
- P<sub>f</sub> : Kontrol positif (5-FU) konsentrasi 5000  $\mu$ M
- P<sub>1</sub> : Perlakuan senyawa DC konsentrasi 50  $\mu$ M
- P<sub>2</sub> : Perlakuan senyawa 1-(3,4 diklorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil konsentrasi 250  $\mu$ M
- P<sub>3</sub> : Perlakuan senyawa DC konsentrasi 500  $\mu$ M
- P<sub>4</sub> : Perlakuan senyawa DC konsentrasi 750  $\mu$ M
- P<sub>5</sub> : Perlakuan senyawa DC konsentrasi 1000  $\mu$ M
- A<sub>a</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi a
- A<sub>b</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi b
- A<sub>c</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi c
- A<sub>d</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi d
- A<sub>e</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi e
- A<sub>f</sub> : Pengukuran absorbansi dari kontrol positif konsentrasi f
- A<sub>1</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 1
- A<sub>2</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 2
- A<sub>3</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 3
- A<sub>4</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 4
- A<sub>5</sub> : Pengukuran absorbansi dari perlakuan 5
- I : Inkubasi

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi senyawa 5-FU yaitu 0,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ ; 250  $\mu\text{M}$ ; 500  $\mu\text{M}$ ; dan 5000  $\mu\text{M}$  serta konsentrasi senyawa DC yaitu 50  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$ , dan 1000  $\mu\text{M}$ .

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai  $\text{IC}_{50}$  dan nilai *doubling time* senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU terhadap sel kanker payudara MCF-7.

#### 3.3.3 Variabel Terkendali

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

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dari penelitian ini yaitu parameter yang digunakan dalam uji sitotoksitas adalah  $\text{IC}_{50}$ .  $\text{IC}_{50}$  adalah konsentrasi senyawa uji yang menyebabkan kematian 50% populasi sel (Meiyanto *et al.*, 2008b).  $\text{IC}_{50}$  dihitung dengan menggunakan penghambatan senyawa uji pada berbagai konsentrasi terhadap sel MCF-7. *Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan jumlahnya menjadi dua kalinya. *Doubling time* dilakukan pada waktu inkubasi 24, 48, dan 72 jam. *Doubling time* dihitung pada sel yang diberi perlakuan senyawa uji pada konsentrasi 0,5  $\text{IC}_{50}$ ;  $\text{IC}_{50}$ ; dan 1,5  $\text{IC}_{50}$ .

### 3.5 Bahan dan Alat yang Digunakan

#### a. Bahan

Subjek dalam penelitian ini adalah sel kanker payudara MCF-7 yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

Bahan-bahan kimia yang digunakan, antara lain Senyawa DC hasil sintesis berdasarkan prosedur Palupi (2013), 5-fluorourasil (prosintesis/Merck), 3,4-diklorobenzoil-klorida (sigma), formaldehid (Merck), aseton (Merck), akuades, trietilamin (Merck), Silika gel 60 F 254, heksan (Merck) metanol p.a (Sigma), DMSO (DMSO 99,5% pro GC, Sigma), *bovine serum albumin* (BSA), *phosphate buffer saline* (PBS) (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM), *foetal bovine serum* (FBS qualified, Gibco, Invitrogen™ USA), antibiotika penisilin-streptomisin 1% (v/v) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, 14072, USA), tripsin-EDTA 0,25% (Gibco, Invitrogen, Canada), MTT (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), dan natrium dodesil sulfat (SDS, Merck-Schuchardt, Dr.Th.Schuchardt & Co, D-85662 Hobenbrunn, Germany), *tissue culture disc* diameter 10 cm (Iwaki), *conical tube* 15 ml (BD Falcon), *yellow tip* dan *blue tip* (Brand), *96-well plate* (Nunc), *microtube* dan aluminium foil.

b. Alat

Alat yang digunakan untuk uji sitotoksisitas dan uji proliferasi antara lain, seperangkat alat gelas, bola pipet, seperangkat alat refluks, vial, stirer, lampu UV 254 nm, lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, oven, autoklaf (Hirayama HV-25 020585175, Hirayama Manufacturing Co., Jepang), Inkubator CO<sub>2</sub> 5 % (Heracus, Kendro Laboratories, Germany), *Labconco purifier class II biosafety cabinet* (Delta Series, Labconco Corporation, Missouri, USA), *inverted microscope* (Carl Zeiss Axiovert 25, Germany), *hemocytometer* (Nebauer improved 0,100 mm Tiefe Depth Profondeur 0,0025 mm<sup>2</sup>, Germany), *cell counter*, mikropipet (VWR Brand), *ELISA reader* (Bio-Rad *microplate reader Benchmark*, Jepang), timbangan analitik (Sartorius), kamera digital (Canon IXY Digital 25 IS 10,0 mega pixels, Japan), sentrifus (Universal 320 R Hettich) dan vortex (Thermolyne, Sybron).

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Sintesis Senyawa DC

Tahap pertama dilakukan dengan mereaksikan 5-FU ( 1,5 g; 11,532 mmol) dengan formaldehid (1,455 g; 48,44 mmol) dan 11,546 ml akuades dalam labu alas bulat. Kemudian direndam dalam *waterbath* (refluks) pada suhu 60 °C dan diaduk dengan magnetik stirer selama 6 jam untuk mendapatkan senyawa 1-hidroksimetil-5-fluorourasil. Hasil refluks kemudian diuapkan pada suhu kamar hingga kering. Setelah kering, hasil refluks dilarutkan dalam aseton 230,911 ml dan ditambahkan trietilamin (1,282 gram, 12,693 mmol) pada labu alas bulat. Hasil pencampuran ini untuk selanjutnya disebut pencampuran 1.

Pada tahap kedua 3,4-diklorobenzoilklorida (2,660 gram; 12,700 mmol) dilarutkan dalam aseton 92,365 ml pada corong pisah yang selanjutnya disebut larutan 2. Pencampuran 1 diletakkan didalam air es kemudian ditambahkan larutan 2 setetes demi setetes hingga habis. Hasil campuran tetap diletakkan dalam *icebath* dan diaduk dengan magnetik stirer selama 17 jam. Hasil reaksi diuapkan sampai pelarut habis kemudian endapan ditambah dengan akuades 46,182 ml dan etil asetat 138,547 ml, sehingga terjadi dua fase yaitu fase minyak dan fase air. Kemudian kedua fase tersebut dicuci dengan 184,729 ml HCl encer pH 3-4 dan dipisahkan dengan corong pisah dimana yang dikumpulkan adalah fase etil asetat. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya fase etil asetat dicuci dengan NaHCO<sub>3</sub> pH 7-8 184,729 ml dan dipisahkan dengan corong pisah dimana yang dikumpulkan adalah fase etil asetat. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Kemudian ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengikat air yang tersisa. Fase etil asetat diuapkan sampai habis (Palupi, 2013).

#### 3.6.2 Pemurnian Menggunakan Kromatografi Kolom

Prosedur menggunakan kromatografi kolom yaitu pertama pembuatan eluen heksana : aseton (6:4) sebanyak 300 ml kemudian pembuatan bubuk silika gel. Kolom yang akan dibuat berdiameter 1 cm dengan panjang 40 cm dan ukuran mes silika

sebesar 0,063 mm–0,200 mm. Bubur silika dibuat dengan mencampurkan 15 gram silika gel dengan eluen secukupnya dan dimasukkan dalam kolom. Setelah kolom telah jadi, dilakukan pemurnian senyawa hasil sintesis yaitu dengan melarutkan senyawa dengan eluen kemudian dimasukkan kedalam kolom dan dikumpulkan setiap 2 ml yang selanjutnya dianalisis dengan KLT (Palupi, 2013).

### 3.6.3 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis

Uji kemurnian senyawa menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan dengan penentuan titik leleh. Senyawa dilarutkan dalam aseton, kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel, dan dielusi dengan 3 macam fase gerak yang berbeda kepolarannya yaitu campuran heksana : aseton (6 : 4); heksana : etil asetat : aseton (5:3:2); dan heksana : etil asetat (6:4). Noda diamati pada lampu UV 254 nm. Noda tunggal menunjukkan senyawa telah murni.

Uji kemurnian juga dilakukan dengan uji KLT dua dimensi untuk memastikan bahwa noda yang dihasilkan berupa noda tunggal. Cara kerjanya sama dengan uji KLT biasanya akan tetapi eluasi dilakukan dengan dua macam fase gerak yang berbeda kepolarannya secara berkelanjutan tapi pada arah yang berbeda. Fase gerak yang digunakan adalah heksana : aseton (6 : 4) dan heksana : etil asetat (6:4).

Cara penentuan titik leleh yaitu sedikit sampel dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya telah ditutup kemudian dimasukkan ke dalam alat penentu titik leleh dan dipanaskan. Diamati dari kaca pembesar saat sampel mulai melebur dan diamati suhu pada saat zat meleleh sempurna (Palupi, 2013). Menurut Mohrig *et al.* (2010) senyawa murni memiliki rentang titik leleh sebesar 0,5-1,5° C.

### 3.6.4 Identifikasi Struktur Senyawa DC

Identifikasi struktur menggunakan FTIR-KBr. Sejumlah sampel dicampur dengan KBr hingga homogen dan dibuat bentuk pellet. Kemudian spektrum diamati pada bilangan gelombang 4000-450 cm<sup>-1</sup>.

### 3.6.5 Preparasi Larutan Sampel dan Pembeding

Ditimbang senyawa DC 0,67 mg dan dilarutkan dalam 40  $\mu$ l DMSO kemudian ditambahkan PBS sampai 400  $\mu$ l (5000  $\mu$ M). Selanjutnya diencerkan menggunakan MK. Konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan yaitu 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M dan 1000  $\mu$ M.

Ditimbang 2,602 mg senyawa 5-FU kemudian dilarutkan dalam 40  $\mu$ l DMSO kemudian ditambahkan dengan PBS sampai 400  $\mu$ l (50.000  $\mu$ l). Selanjutnya diencerkan dengan MK. Konsentrasi larutan uji akhir yang digunakan yaitu 0,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 50  $\mu$ M; 250  $\mu$ M; 500  $\mu$ M; dan 5000  $\mu$ M.

### 3.6.6 Kultur Sel Kanker Payudara

Sel kanker MCF-7 yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37 °C. Suspensi sel diambil dengan mikropipet 1000  $\mu$ l, dimasukkan tetes demi tetes ke dalam MK yang telah disiapkan. *Conical tube* ditutup dengan rapat, disentrifus 600 rpm selama 5 menit. Kembali ke dalam LAF, semprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70%. Dibuka *conical tube*, supernatan MK dituang ke dalam pembuangan dan ditambahkan 4 ml MK baru kemudian diresuspensi kembali sel hingga homogen. Ditransfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 dish. Ditambahkan masing-masing 5 ml MK ke dalam dish lalu dihomogenkan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop dan disimpan sel ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> (Hermawan, 2010).

Sel dari inkubator CO<sub>2</sub> diambil dan diamati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Media dibuang dengan menggunakan mikropipet atau pipet Pasteur steril. Sel dicuci dengan PBS dan diulang 2 kali (volume PBS  $\pm$ 1/2 volume media awal). Ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) 1 ml secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Kemudian resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu. Keadaan sel diamati dengan mikroskop. Resuspensi dilakukan kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Sel ditransfer ke dalam *conical* steril baru. Kemudian ditambah dengan 2 ml MK. Sel dihitung dengan



*hemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan (Junedi, 2009).

### 3.6.7 Uji Sitotoksisitas

Sel ditanam pada *microplate* 96-well sehingga diperoleh kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan pertumbuhan yang baik. Setelah itu medium diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan 5-FU dan senyawa DC pada berbagai konsentrasi menggunakan kosolven DMSO dengan konsentrasi yang tidak lebih dari 1% dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media dan senyawa dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS. Pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 µl media kultur dan 10 µl MTT 5 mg/ml. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C. Reaksi MTT dihentikan dengan SDS 10% setelah 4 jam. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (Meiyanto *et al.*, 2008b).

### 3.6.8 Uji Doubling Time

Sel diambil dari inkubator CO<sub>2</sub>, kemudian diamati kondisi sel. Kultur sel yang digunakan adalah dalam kondisi 70-80% konfluen untuk dipanen. Sel dipanen sesuai dengan protokol panen. Setelah itu, jumlah sel dihitung dan dibuat pengenceran sel dengan MK sehingga jumlah sel untuk uji proliferasi sel sebesar  $5 \times 10^3$  sel/sumuran ( $5 \times 10^3$  sel/100 µl MK). Kemudian sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl, dan disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media (tidak diisi sel). Setiap kali mengisi 12 sumuran, resuspensi kembali sel agar tetap homogen. Keadaan sel diamati di bawah mikroskop untuk melihat distribusi sel.

Sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Inkubasi ini dilakukan agar sel pulih dan kembali ke keadaan normal setelah panen sel. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi sampel 0,5 IC<sub>50</sub>; IC<sub>50</sub>; dan 1,5 IC<sub>50</sub> untuk perlakuan (termasuk kontrol sel dan kontrol DMSO) sesuai dengan protokol preparasi sampel.

*Plate* yang telah berisi sel diambil dari inkubator, media sel dibuang dengan cara *plate* dibalik 180° di atas tempat buangan, kemudian *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan dan tisu tidak perlu disemprot dengan alkohol 70%.

Sel dalam sumuran dicuci, masing-masing dengan 100 µl PBS, kemudian PBS dibuang, dan ditiriskan sisa cairan dengan tisu. Seratus mikroliter seri konsentrasi sampel dimasukkan ke dalam sumuran dengan replikasi sebanyak 3 kali (triplo) dengan cara dari atas ke bawah mulai dari konsentrasi paling rendah ke konsentrasi paling tinggi, kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Lama inkubasi berbeda-beda, mulai dari 24, 48, dan 72 jam. Setelah itu, media sel dibuang, dicuci dengan PBS sebanyak 1x, lalu ditambahkan reagen 100 µl MTT 0,5 mg/ml ke dalam setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel).

Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 2-4 jam, kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*, jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1N HCl. *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap (suhu ruangan) semalam dan keesokan harinya, *plate* di-*shaker* selama 10 menit untuk melarutkan formazan. Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan *microplate reader* dengan λ=595 nm. Kemudian dihitung viabilitas sel untuk masing-masing seri konsentrasi sampel dan kontrol pada tiap-tiap waktu inkubasi dan dibuat grafik waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. *Doubling time* dihitung dengan substitusi pada persamaan grafik yang diperoleh (Fitriasari, 2010).

### 3.7 Analisis Data

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

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

a. Uji Sitotoksitas

Aktivitas sitotoksik senyawa dinyatakan dalam  $IC_{50}$  (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel) yang diperoleh melalui analisis probit (Meiyanto *et al.*, 2008b).

b. Uji *Doubling Time*

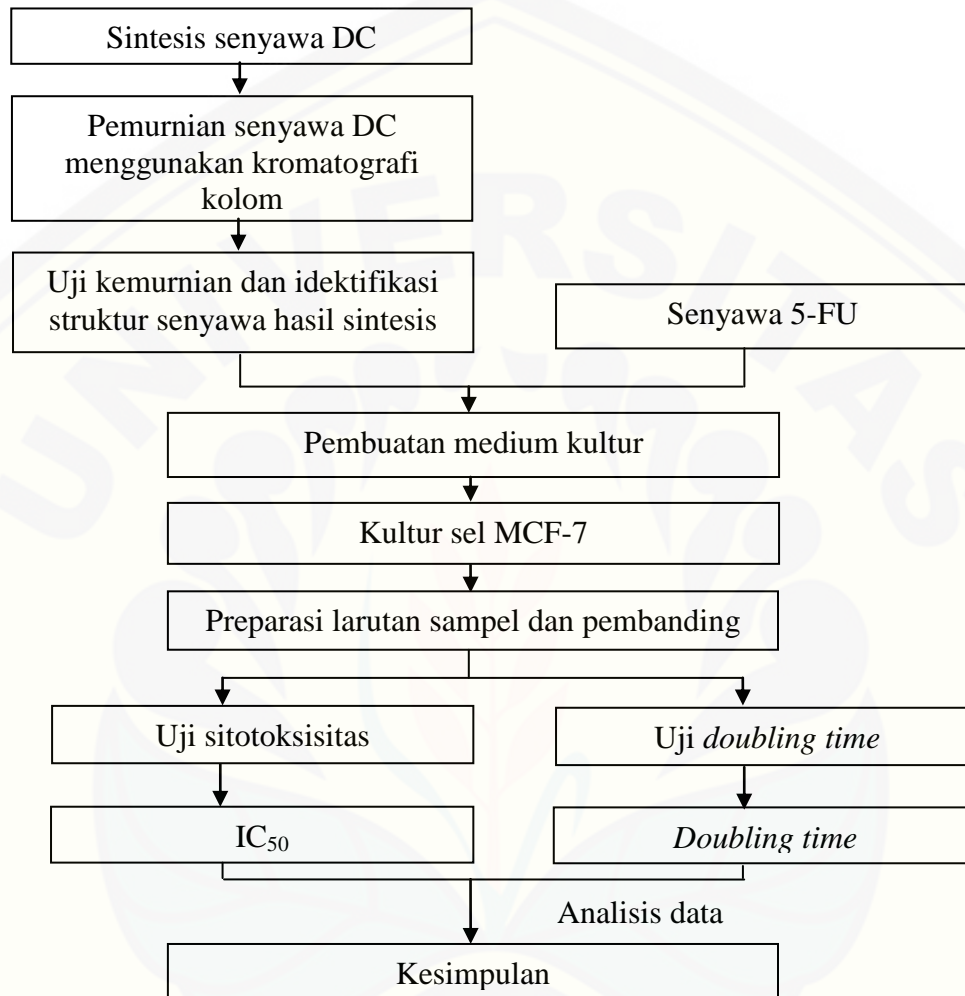
Aktivitas antiproliferasi ditunjukkan melalui *doubling time* yang dinyatakan sebagai waktu yang menghambat penggandaan sel kanker. Waktu tersebut diperoleh dari ekstrapolasi kurva antara log jumlah sel yang hidup *vs* waktu (Meiyanto *et al.*, 2008a).

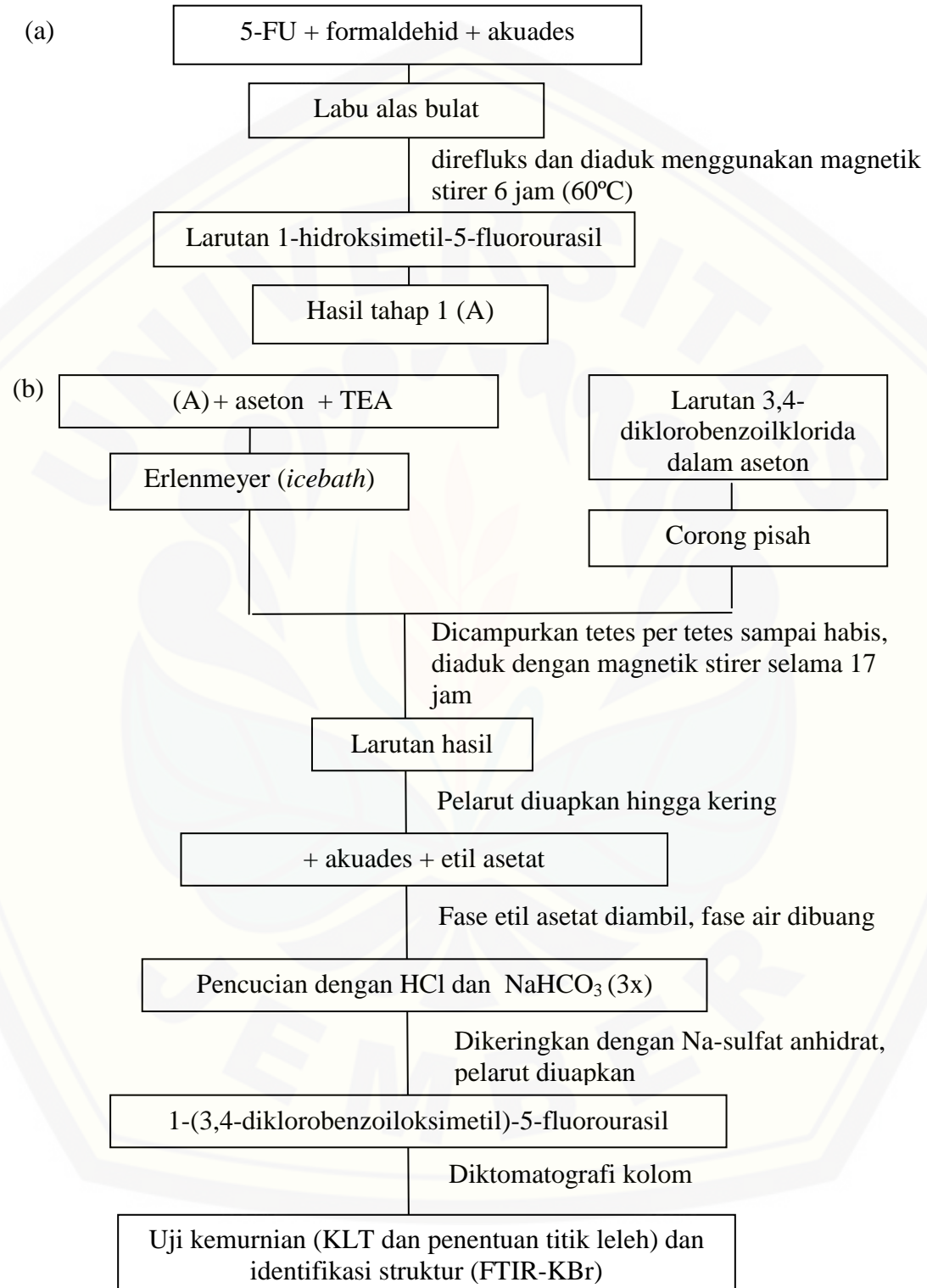
c. Analisis Statistik

Hasil uji sitotoksik dengan uji t dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok pembanding dengan kelompok perlakuan. Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $<0,05$ .

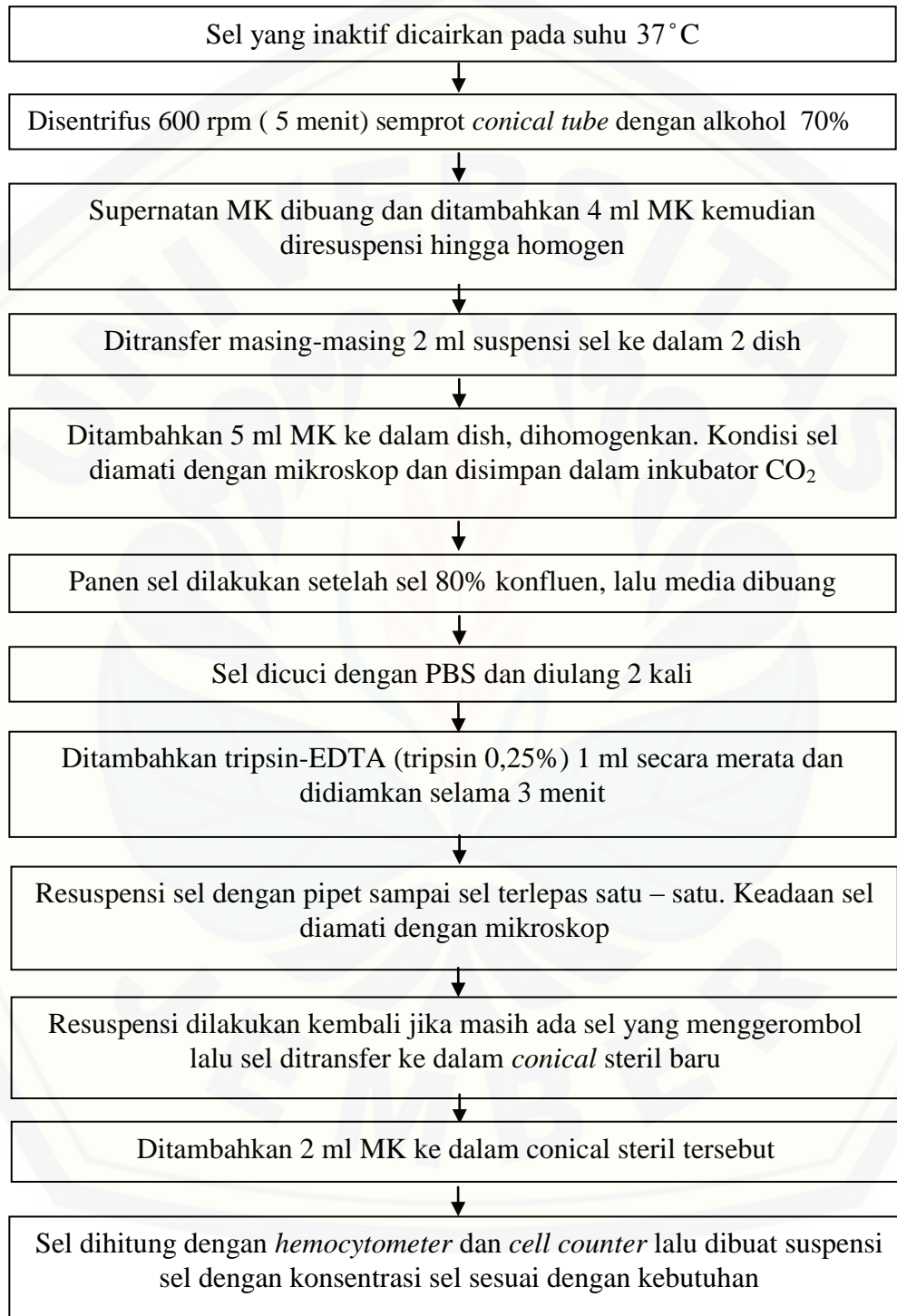
### 3.8 Skema Penelitian

#### 3.8.1 Alur Penelitian Aktivitas Senyawa DC atau 5-FU terhadap Sel MCF-7



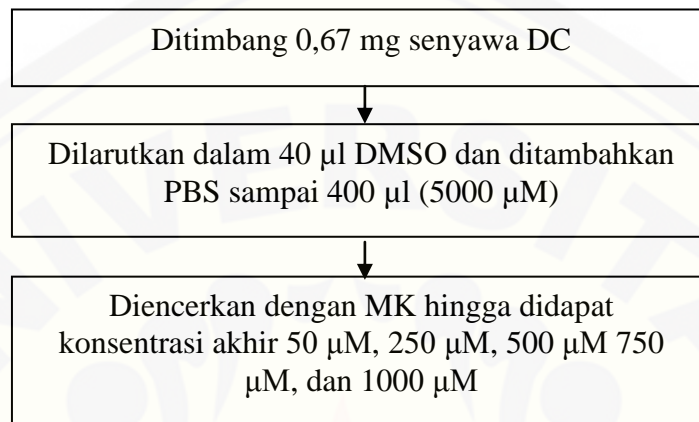
**3.8.2 Sintesis Senyawa DC (Palupi, 2013)**

### 3.8.3 Alur Kultur Sel MCF-7

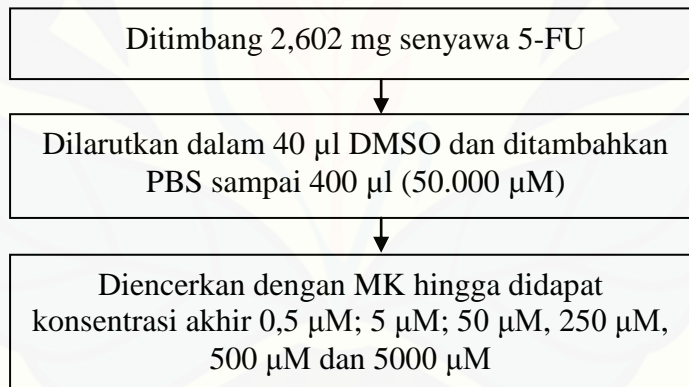


### 3.8.4 Preparasi Larutan Sampel

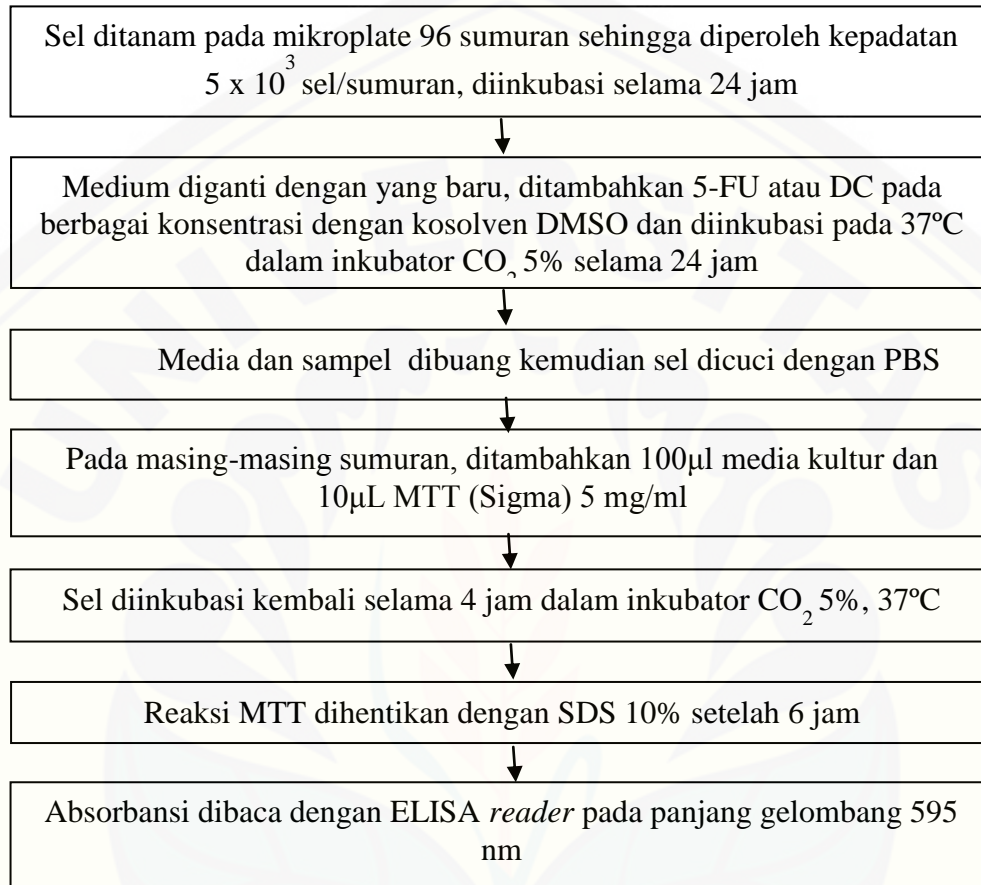
#### a. Senyawa DC



#### b. Senyawa 5-FU

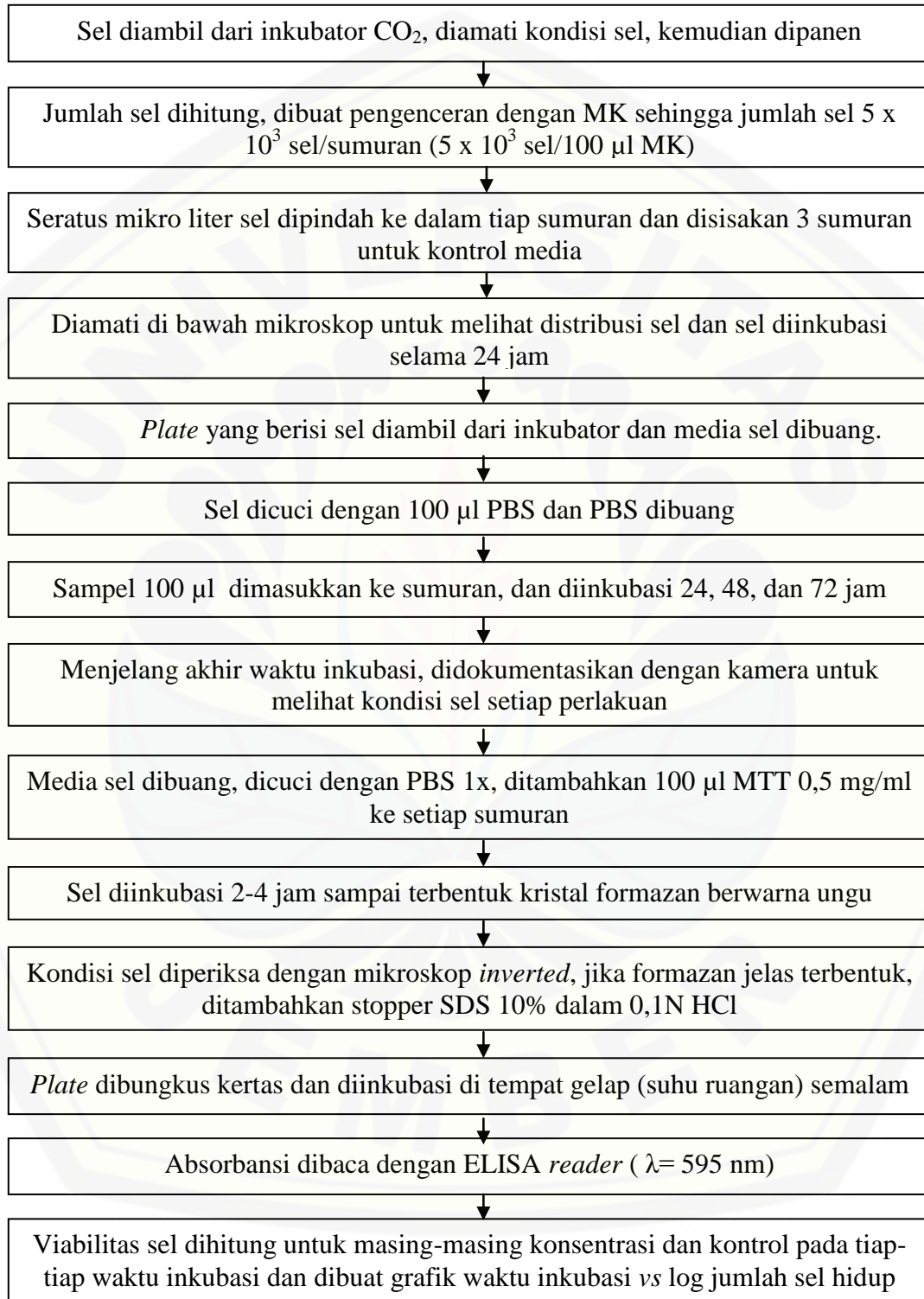


### 3.8.5 Uji Sitotoksitas



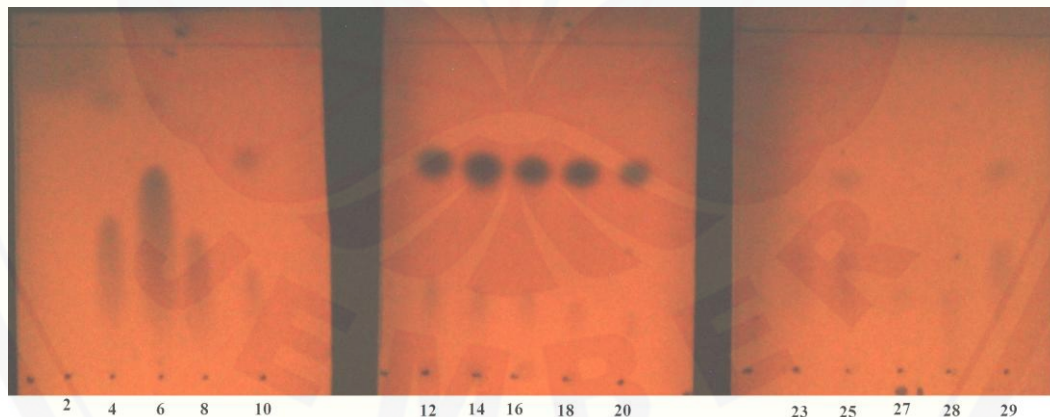


### 3.8.6 Uji *Doubling Time*



#### BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

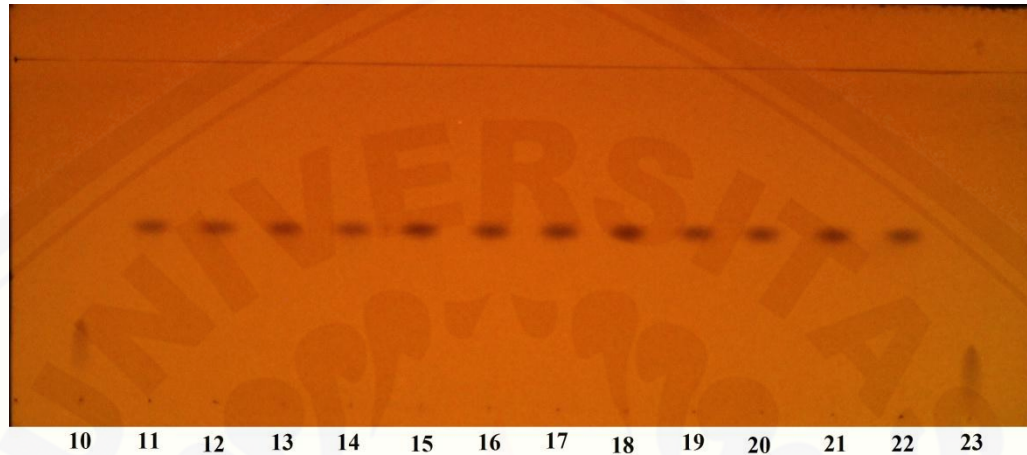
Sintesis obat baru dari modifikasi senyawa yang sudah terbukti memiliki aktivitas merupakan salah satu upaya pengembangan obat. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan sintesis senyawa turunan 5-FU yaitu DC yang merupakan salah satu hasil modifikasi 5-FU tetapi belum dibuktikan aktivitasnya. Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sintesis senyawa DC kemudian dilakukan pemurnian senyawa dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase gerak heksana:aseton (6:4) (Palupi, 2013). Didapatkan 29 vial hasil dari kromatografi kolom tersebut. Pemurnian senyawa dilakukan untuk mendapatkan senyawa produk yang bebas dari pengotornya seperti bahan awal dan substituen yang tersisa. Hasil dari kromatografi kolom (29 vial) kemudian diuji kemurniannya dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji titik leleh. Dua puluh sembilan vial hasil pemurnian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi dengan heksana : aseton (6:4). Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil KLT fraksi hasil kromatografi kolom. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak heksana:aseton (6:4). Detektor sinar UV 254 nm

Berdasarkan hasil eluasi, vial yang memiliki noda tunggal (vial 12-21) diuji KLT lagi untuk memastikan bahwa noda yang dihasilkan berupa noda tunggal. Vial

yang diuji ulang adalah vial nomor 10-23. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa vial yang memiliki noda tunggal adalah vial nomor 11-22 (Gambar 4.2), kemudian vial 11-22 digabung menjadi satu dan dilakukan uji kemurnian.

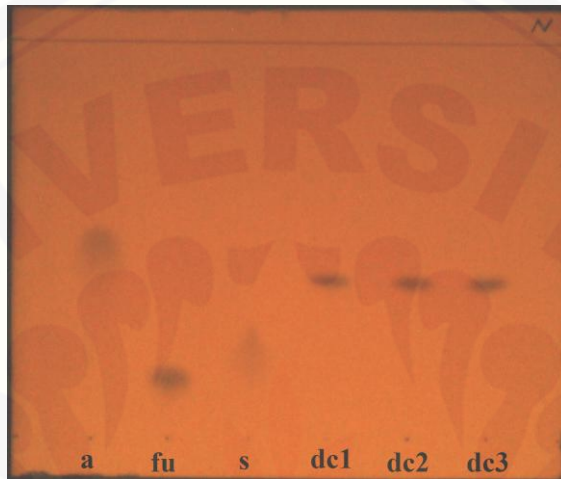


Gambar 4.2 Hasil KLT vial nomor 10-23. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak heksana:aseton (6:4). Detektor sinar UV 254 nm

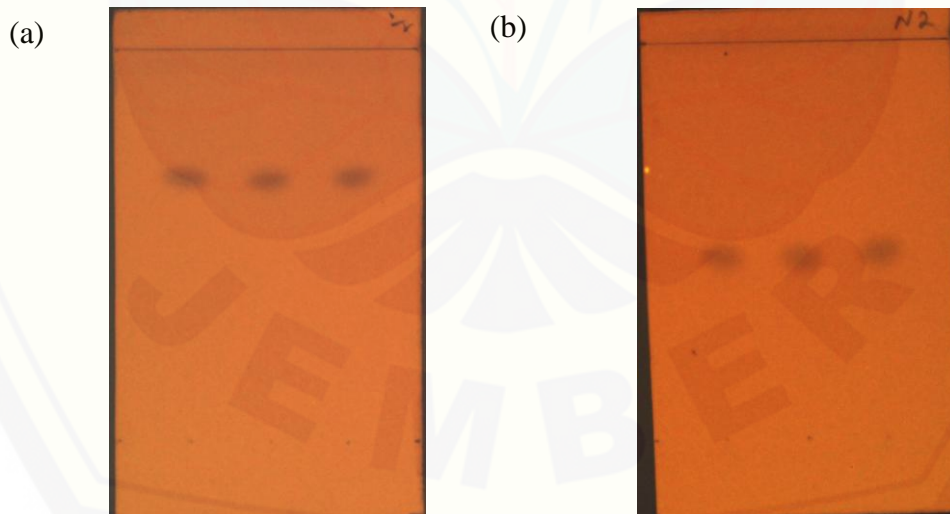
Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan metode KLT dan dengan penentuan titik leleh. Pada metode KLT, senyawa (gabungan vial 11-22) dieluasi dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana : aseton (6:4), heksana : etil asetat : aseton (5:3:2), dan heksana : etil asetat (6:4) (Puspaningtyas, 2011). Noda hasil KLT dari senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4 dan data hasil KLT nya dapat dilihat pada Tabel 4.1. Dari data uji KLT tersebut dapat diamati bahwa hanya terdapat satu noda. Selanjutnya dilakukan KLT dua dimensi dengan menggunakan eluen heksana : aseton (6:4) dan dilanjutkan heksana:etil asetat (6:4) untuk memastikan bahwa noda yang dihasilkan berupa noda tunggal. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat satu noda yang berarti bahwa senyawanya murni secara KLT (Gambar 4.5).

Uji kemurnian juga dilakukan dengan penentuan titik leleh yang dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dan didapatkan hasil pada Tabel 4.2. Hasil penentuan titik leleh menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan merupakan senyawa murni karena memiliki rentang titik leleh 1°C. Mohrig *et al.* (2010) menyatakan bahwa

senyawa murni memiliki rentang titik leleh sebesar 0,5-1,5 °C. Titik leleh senyawa hasil sintesis sama dengan titik leleh senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013) yaitu 184-186°C.



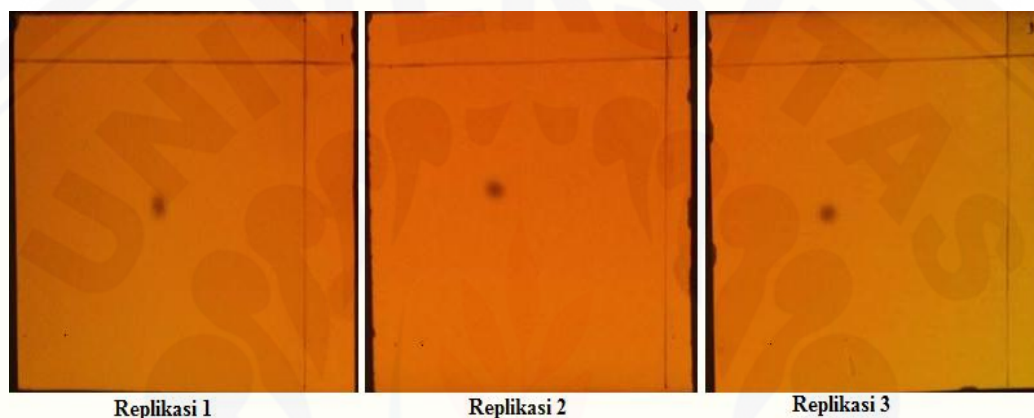
Gambar 4.3 Hasil KLT produk hasil sintesis. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak heksana : aseton (6:4). Detektor sinar UV 254 nm  
**a**: asam benzoat (R<sub>f</sub>=0,49); **f**: 5-FU (R<sub>f</sub>=0,15); **s**: 3,4-diklorobenzoilklorida (R<sub>f</sub>=0,22); **dc1**: replikasi 1 (R<sub>f</sub>=0,40); **dc2**: replikasi 2 (R<sub>f</sub>=0,39); dan **dc3**: replikasi 3 (R<sub>f</sub>=0,39)



Gambar 4.4 Hasil KLT produk hasil sintesis. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak heksana : etil asetat : aseton (5:3:2) (a) dan heksana : etil asetat (6:4) (b). Detektor sinar UV 254 nm. Didapatkan noda tunggal

Tabel 4.1 Data KLT dari senyawa hasil sintesis

Replikasi	Rf		
	heksana : aseton (6:4)	heksana : etil asetat : aseton (5:3:2)	heksana : etil asetat (6:4)
1	0,40	0,68	0,47
2	0,39	0,67	0,46
3	0,39	0,67	0,46
<b>Rata-rata</b>	<b>0,39</b>	<b>0,67</b>	<b>0,46</b>



Gambar 4.5 Hasil KLT dua dimensi senyawa hasil sintesis. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>. Fase gerak heksana : aseton (6:4) dilanjutkan heksana : etil asetat (6:4). Detektor sinar UV 254 nm. Didapatkan noda tunggal

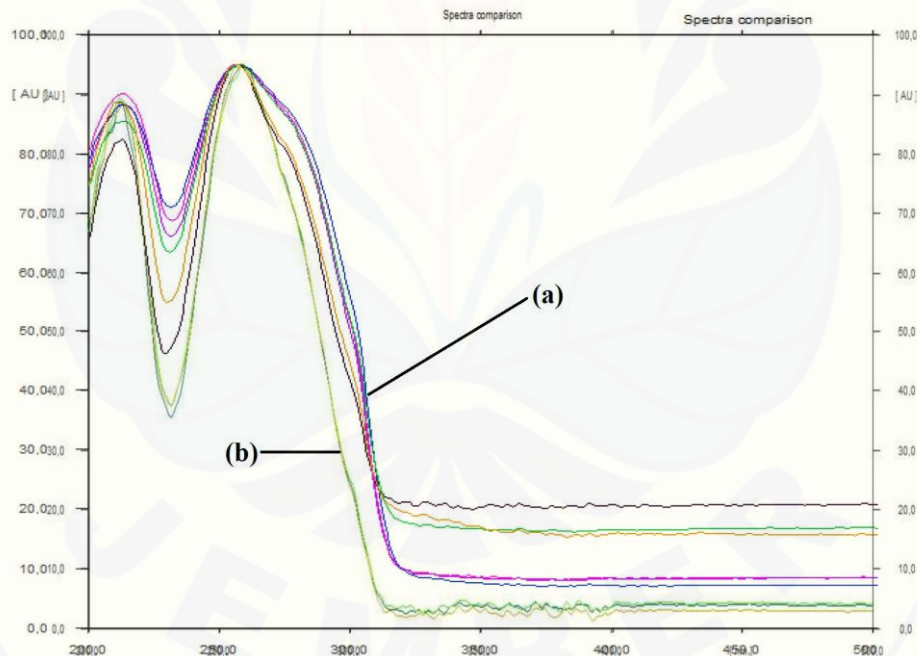
Tabel 4.2 Hasil penentuan titik leleh

No	Jarak Lebur (°C)
1	184-185
2	184-185
3	184-185
Rata-rata	184-185

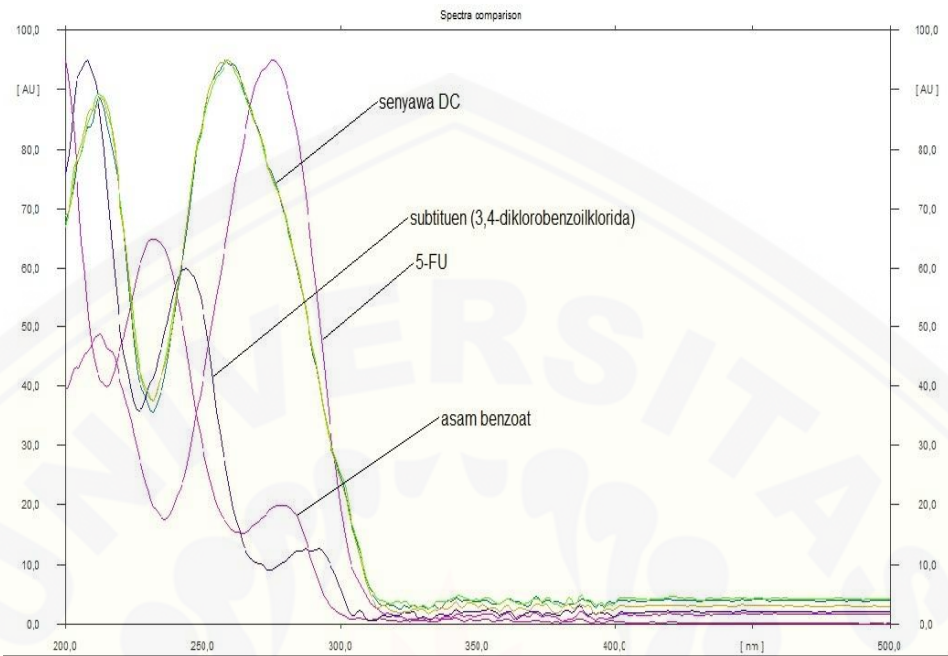
Selanjutnya dilakukan uji identifikasi senyawa dengan menggunakan perbandingan spektra hasil densitometri. Spektra senyawa hasil sintesis yang dihasilkan mirip dengan spektra senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013) dengan panjang gelombang maksimal berturut-turut adalah 259 nm dan 258 nm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam senyawa hasil sintesis mengandung senyawa DC (Gambar 4.6). Apabila dibandingkan dengan spektra bahan awal (5-FU, 3,4-

diklorobenzoilklorida, dan asam benzoat), senyawa hasil sintesis menunjukkan pola spektra yang berbeda (Gambar 4.7). Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan bahan awal.

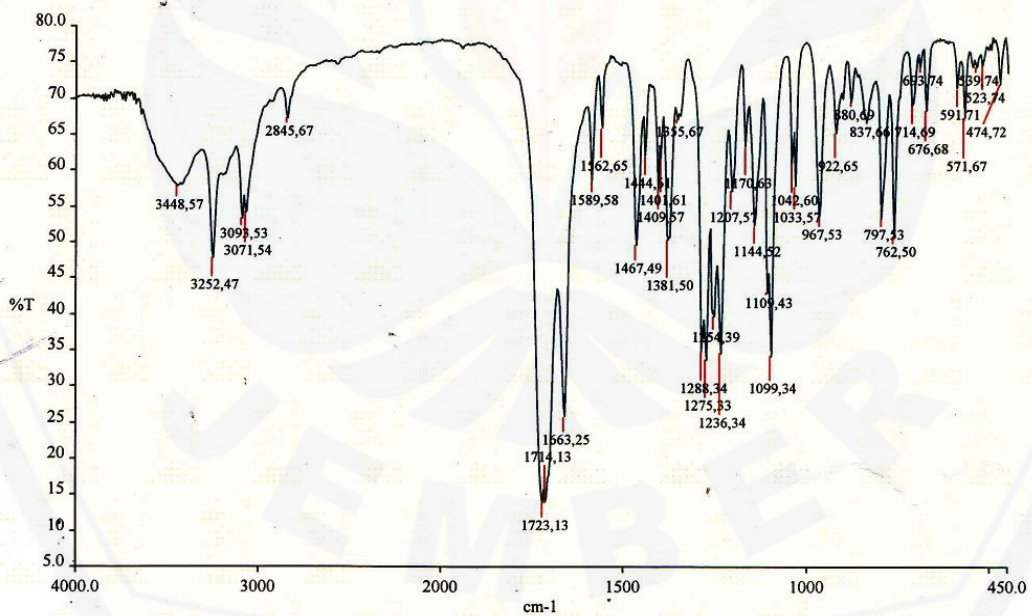
Uji identifikasi senyawa juga dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer infra merah untuk memastikan bahwa senyawa tersebut benar merupakan senyawa DC. Hasil FTIR ditunjukkan pada Gambar 4.8 dan perbandingan spektra FTIR KBr antara hasil sintesis, spektra senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013), dan literatur dapat dilihat pada Tabel 4.3. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa yang dihasilkan memiliki gugus yang sama dengan gugus senyawa DC. Spektra FTIR KBr senyawa hasil sintesis memiliki kemiripan dengan spektra FTIR KBr senyawa DC hasil sintesis Palupi (2013) yang berarti bahwa senyawa yang dihasilkan merupakan senyawa yang mirip walaupun terjadi pergeseran frekuensi.



Gambar 4.6 Spektra senyawa hasil sintesis Senyawa hasil sintesis Palupi (2013) (a) dan senyawa hasil sintesis (b)



Gambar 4.7 Spektra senyawa hasil sintesis dan bahan awal



Gambar 4.8 Spektra FTIR KBr senyawa DC

Tabel 4.3. Perbandingan spektra FTIR KBr hasil sintesis dan literatur

Tipe Ikatan	Literatur*	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> )**	Frekuensi (cm <sup>-1</sup> ***)
C=O (ester)	1730 - 1705	1714 & 1723	1722
N-H (amida sekunder)	3500 - 3150	3252 & 3448	3404
C=O (amida)	1700 - 1630	1663	1697
C-O (ester)	1310 - 1250	1254 & 1288	1284
N-C	1350-1000	1288-1033	1317-1035
C-Cl	800-400	797-474	794-410
C=C aromatis	1650-1430	1589-1444	1587-1465
C-H aromatis	3100-3000	3093&3071	3066-3003
C-F	1300-1000	1288-1033	1284-1035

1. \*Sumber : Mohrig, *et al.* (2010) dan Stuart (2004)
2. \*\* Senyawa hasil sintesis
3. \*\*\* Senyawa hasil sintesis Palupi (2013)

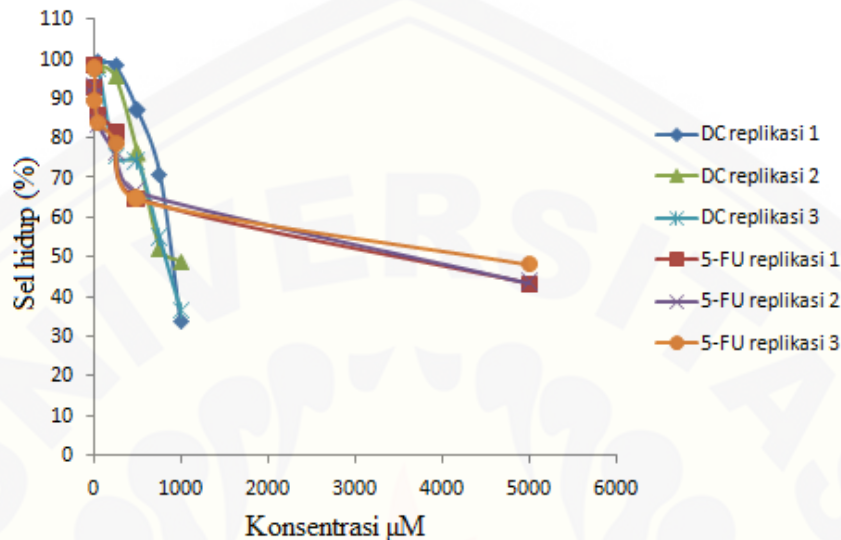
Tahap selanjutnya yaitu uji aktivitas antikanker senyawa DC terhadap sel kanker payudara MCF-7. Uji aktivitas antikanker yang dilakukan yaitu uji sitotoksisitas dan uji *doubling time* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

#### 4.1 Hasil Uji Sitotoksisitas 5-FU dan DC terhadap Sel MCF-7

Uji sitotoksisitas dilakukan untuk mengetahui potensi penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 akibat perlakuan senyawa 5-FU dan senyawa DC. Uji sitotoksisitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kenaikan kadar senyawa uji (5-FU atau DC) menyebabkan penurunan jumlah sel hidup MCF-7 (Gambar 4.9). Nilai R kurva dosis-respon senyawa 5-FU ketiganya memenuhi persyaratan yaitu lebih dari 0,811 untuk n= 6 dan nilai R kurva dosis-respon senyawa DC ketiganya juga memenuhi persyaratan yaitu lebih dari 0,878 untuk n=5 (Suliyanto, 2012). Nilai RSD untuk perlakuan senyawa 5-FU dan senyawa DC berturut-turut adalah 19,627% dan 7,204%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan RSD yaitu kurang dari 30% (Comission directive dalam Vanderperren *et al.*, 2004). Dengan demikian data tersebut bisa digunakan. Data hasil uji sitotoksisitas senyawa DC dan 5-FU terhadap sel MCF-7 dengan metode MTT



ditampilkan pada Tabel 4.4. Dalam penelitian ini didapatkan nilai rata-rata  $IC_{50}$  senyawa 5-FU dan senyawa DC berturut-turut yaitu 4201,86  $\mu\text{M}$  dan 889,744  $\mu\text{M}$ .



Gambar 4.9 Kurva konsentrasi vs sel hidup (%) dengan perlakuan senyawa 5-FU dan DC

Tabel 4.4 Hasil uji sitotoksitas senyawa 5-FU dan DC terhadap sel kanker payudara MCF-7

Senyawa	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	RSD (%)
5-FU	4201,86 $\pm$ 824,715 <sup>a</sup>	19,627
DC	889,744 $\pm$ 64,0929 <sup>b</sup>	7,204

Data disajikan dalam rata-rata  $IC_{50} \pm SD$  (n=3)

Notasi huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan uji t pada taraf  $\alpha=5\%$

Terdapat perbedaan bermakna yang signifikan dimana  $\alpha = 0,002$  ( $\alpha < 0,05$ ) menunjukkan bahwa senyawa DC memiliki aktivitas lebih tinggi lima kali dibandingkan 5-FU dalam menghambat pertumbuhan sel MCF-7. Hal ini dikarenakan senyawa DC memiliki lipofilitas (log P) yang lebih tinggi dibandingkan senyawa 5-FU. Nilai log P senyawa DC dan 5-FU yang diperoleh dari ChemDraw Ultra berturut-turut adalah 2,545 dan -0,577. Lebih tingginya nilai log P senyawa DC dikarenakan senyawa DC memiliki gugus alkil dan benzen yang merupakan parameter lipofilik sehingga memudahkan penembusan membran sehingga meningkatkan aktivitas

antikanker senyawa tersebut. Adanya atom Cl dan ester merupakan parameter elektronik yang berpengaruh dalam keserasian interaksi dengan reseptor sehingga meningkatkan aktivitas antikankernya. Substitusi pada posisi 3 dan 4 meningkatkan halangan sterik. Halangan sterik merupakan perisai untuk menstabilkan ikatan antara obat dan reseptor sehingga meningkatkan aktivitas antikankernya (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Akan tetapi senyawa 5-FU dan senyawa DC tidak dapat dikatakan sebagai senyawa sitotoksik karena memiliki  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu M$  (Boik dan Newman, 2008)

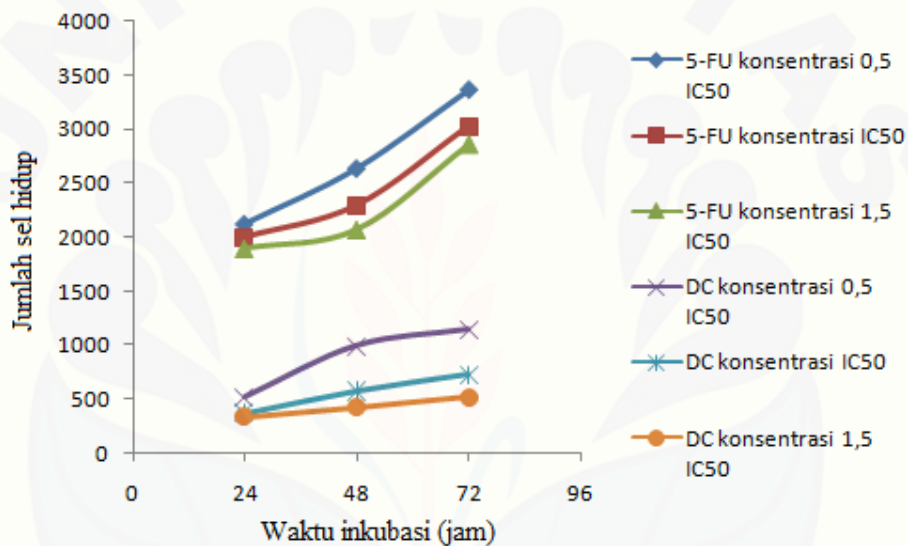
#### 4.2 Pengaruh 5-FU dan DC terhadap Proliferasi Sel MCF-7

Aktivitas proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 5-FU dan DC dapat dilihat dengan uji *doubling time*. Uji *doubling time* dilakukan dengan menggunakan metode MTT sama seperti uji sitotoksitas. Konsentrasi yang digunakan untuk uji *doubling time* adalah 0,5  $IC_{50}$ ;  $IC_{50}$ ; dan 1,5  $IC_{50}$ . Setelah diperoleh data absorbansi dan dihitung jumlah sel hidup, kemudian dibuat kurva antara waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup. Hasil akhir yang diperoleh adalah berupa nilai *doubling time*.

Berdasarkan pengamatan kinetika proliferasi sel MCF-7 menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel seiring bertambahnya waktu inkubasi, tapi jumlah sel hidup dengan perlakuan senyawa DC lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan senyawa 5-FU (Gambar 4.10). Nilai *doubling time* sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 5-FU maupun senyawa DC lebih besar dibandingkan dengan nilai *doubling time* sel MCF-7 normal yaitu 24 jam (Sutherland *et al.*, 2006). Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa 5-FU dan senyawa DC mampu mengurangi kecepatan proliferasi sel MCF-7 tetapi senyawa DC mampu mengurangi kecepatan proliferasi sel MCF-7 yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa 5-FU.

Apabila nilai *doubling time* senyawa DC dibandingkan dengan senyawa 5-FU, senyawa DC memiliki nilai *doubling time* yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa 5-FU (Tabel 4.5). Hal tersebut juga membuktikan bahwa senyawa DC

mampu menghambat pertumbuhan sel MCF-7 yang lebih besar dibandingkan dengan 5-FU, tetapi baik senyawa 5-FU maupun DC memiliki nilai *doubling time* yang semakin tinggi dengan bertambahnya konsentrasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, semakin tinggi aktivitas penghambatan terhadap proliferasi sel MCF-7. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker dapat melalui *cell cycle arrest* atau apoptosis. Untuk mengetahui mekanisme pasti penghambatan pertumbuhan sel kanker perlu dilakukan uji lebih lanjut.



Gambar 4.10 Kurva kinetika proliferasi sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa 5-FU dan senyawa DC

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

Senyawa	Konsentrasi	<i>Doubling time</i> (jam)	R
5-FU	0,5 IC <sub>50</sub>	2100 $\mu$ M	186,265
	IC <sub>50</sub>	4200 $\mu$ M	213,673
	1,5 IC <sub>50</sub>	6300 $\mu$ M	222,252
DC	0,5 IC <sub>50</sub>	450 $\mu$ M	200,425
	IC <sub>50</sub>	900 $\mu$ M	259,699
	1,5 IC <sub>50</sub>	1350 $\mu$ M	412,202

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa DC memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil yang juga merupakan turunan 5-FU yang disintesis oleh Puspaningtyas (2011) dengan  $IC_{50}$  215,978  $\mu$ M. Berdasarkan pendekatan topliss untuk senyawa aromatis, apabila senyawa DC memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan senyawa 1-(*p*-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil maka untuk sintesis selanjutnya dengan tujuan untuk mendapatkan aktivitas sitotoksik yang lebih besar perlu dilakukan substitusi 4-CF<sub>3</sub> (Lampiran F).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa DC memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa 5-FU karena nilai  $IC_{50}$  senyawa 5-FU dan DC berturut-turut adalah 4201,86  $\mu$ M dan 889,744  $\mu$ M.
2. Senyawa DC memiliki aktivitas antiproliferasi terhadap sel MCF-7 yang lebih besar dari senyawa 5-FU karena nilai *doubling time* senyawa DC lebih besar dari senyawa 5-FU.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap mekanisme molekuler penghambatan proliferasi dan juga perlu dilakukan uji selektivitas terhadap sel kanker dan sel normal serta perlu dilakukan juga uji *in vivo*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abe, K. dan Matsuki, N. 2000. Measurement Of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction Activity And Lactate Dehydrogenase Release Using MTT. *Neuroscience Research*, 38: 325–329.
- Akbari, R. dan Javar, H. A. 2013. Efficacy of Capecitabine and 5- Fluorouracil (5-FU) on The Human Breast Cancer Cell Line (MCF7)– Effect of Concentration. *American Journal of Research Communication* 1 (16): 75-91.
- Anonim. 2015. Chemotherapy Treatment Options [on line]. [http://www.breastcancer.org/symptoms/types/recur\\_metast/treat\\_metast/chemo](http://www.breastcancer.org/symptoms/types/recur_metast/treat_metast/chemo) [22 Juni 2015]
- Avendan˜o, C. dan Mene´ndez, J. C. 2008. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Ed 1<sup>st</sup>. UK: Elsevier.
- Boik, J. C. dan Newman, R. A. 2008. Structure-Activity Models of Oral Clearance, Cytotoxicity, and LD<sub>50</sub>: A Screen for Promising Anticancer Compounds [on line]. <http://www.biomedcentral.com/1472-221-/8/12>. [22 Mei 2015]
- Corwin, E. J. 2007. Patofisiologi. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Crawford, K.W. dan Bowen, W. D. 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. Hilangkan Mitos tentang Kanker [on line]. <http://www.depkes.go.id/article/print/201407070001/hilangkan-mitos-tentang-kanker.html>. [24 Desember 2014]
- EBCTCG (Early Breast Cancer Trialist, Collaborative Group). 2005. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Breast Cancer Research*, 365: 1687-1717.
- Fitriasari, A. 2010. Prosedur Tetap Uji Pengamatan Proliferasi Sel (*Doubling time*). Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R.A. 2011. Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell* 100: 57-70.

- Hansen, J. dan Bross, P. 2010. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. *Meth. Mol. Biol.* 648 : 303–311.
- Hermawan, A. 2010. Prosedur Tetap Menumbuhkan Sel dari Tangki Nitrogen Cair (*Cell Thawing*). Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM.
- Jambiekspres News. 2014. Kanker Payudara Jadi Pembunuh Wanita [on line]. <http://www.jambiekspres.co.id/berita-18408-kanker-payudara-jadi-pembunuh-wanita.html> [24 Desember 2014].
- Junedi, S. 2009. Protokol Tetap *Cell Thawing*. Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., dan Johnston, P. G. 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Cancer Res.* 3 (5): 330-338.
- Meiyanto, E., Rahmi, F., dan Riyanto, S. 2008a. Efek Sitotoksik Fraksi Semipolar Ekstrak Metanolik Kulit Batang Cangkring (*Erythrina Fusca* Lour) Terhadap Sel Hela [on line]. [http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page\\_id=10](http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=10). [24 Desember 2014].
- Meiyanto, Susidarti, Handayani, dan Rahmi. 2008b. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) Mampu Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19 (1): 12 – 19.
- Mitchell, Kumar, Abbas, dan Fusto. 2006. Dasar Patologi Penyakit. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Mohrig, J. R., Christina, N. H., dan Paul, F. S. 2010. *Techniques in Organic Chemistry*. USA : W. H. Freeman and Company.
- Nugrahaningsih, W H. 2004. Ekspresi Protein Bcl-2 pada kanker Mamma. *M. Med Indonesia*. 39 (1) [on line]. <http://www.mediamedika.net/archives/271>. [24 Desember 2014].
- Palupi, D. R. 2013. Sintesis 1-(3,4-Diklorobenzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Sebagai Pengembangan Obat Kanker. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

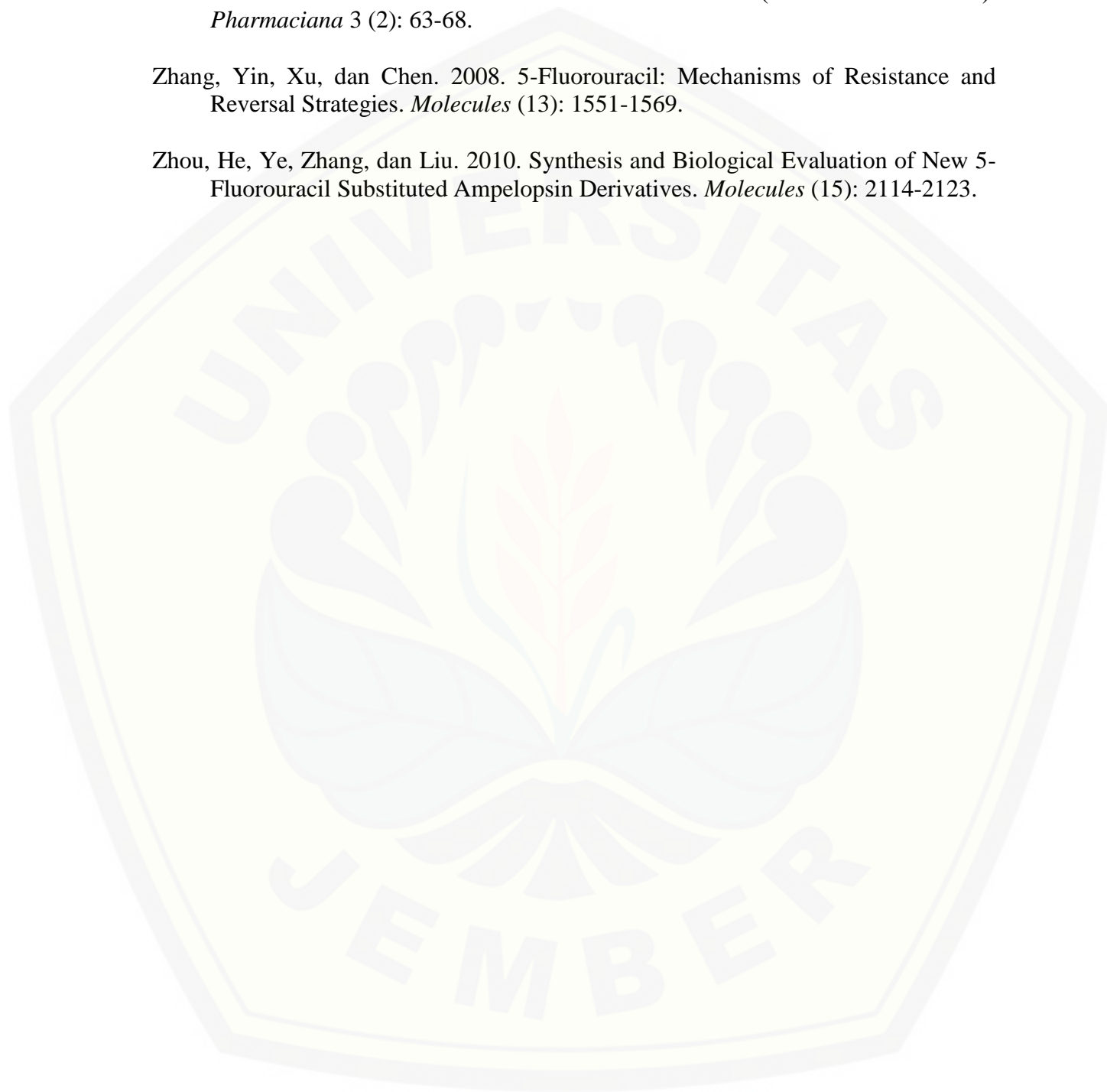
- Puspaningtyas, A.R. 2011. "Modifikasi Struktur 5-Fluorourasil dan Uji Sitotoksik Turunan 1-(Benzoiloksimetil)-5-Fluorourasil Hasil Modifikasi terhadap Sel Kanker MCF-7". Tidak Diterbitkan. Tesis. Surabaya: Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Siswandono dan Soekardjo. 1995. Kimia Medisinal edisi 1. Surabaya: Airlangga University Press.
- Siswandono dan Soekardjo. 2000. Kimia Medisinal edisi 2. Surabaya: Airlangga University Press.
- Stuart, B. 2004. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Sydney: John Wiley & Sons, Ltd.
- Suliyanto. 2012. Analisis Statistik-Pendekatan Praktis dengan Microsoft Excel. Yogyakarta: Andi Offset.
- Sutherland, R.L., Hall, R. E., dan Taylor I. W. 1983. Cell Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Mammary Carcinoma Cells in Culture and Effects of Tamoxifen on Exponentially Growing and Plateau-Phase Cells. *Cancer Research* 43: 3998-4006.
- Syarif, Estuningtyas, Setiawati, Azalia, dan Bahry. 2007. Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Badan Penerbit FKUI.
- Sylvester, P.W. 2011. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Methods in Molecular Biology*, 716: 157-168
- Vanderperren, Wouwe, Behets, Windal, Overmeire, dan Fontaine. 2004. TEQ-value determinations of animal feed; emphasis on the CALUX bioassay validation. *Talanta* 63: 1277-1280.
- Widowati, L. dan Mudahar, H. 2009. Uji aktivitas Ekstrak Etanol 50% Umbi Keladi Tikus (*Typhonium flagelliforme* (Lood) Bi) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 *In Vitro*. *Media Litbang Kesehatan*, 19 (1): 9-14
- Xiong, Zhu, Zhao, Lan, Jiang, Yang, dan Zhang. 2009. Synthesis and Antitumor Activity of Amino Acid Ester Derivatives Containing 5-Fluorouracil. *Molecules* (14): 3142-3152.



Zainab. 2013. Pengaruh Konsentrasi Etanol sebagai Pelarut Pengekstraksi terhadap Kadar Naftokinon dalam Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.). *Pharmaciana* 3 (2): 63-68.

Zhang, Yin, Xu, dan Chen. 2008. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* (13): 1551-1569.

Zhou, He, Ye, Zhang, dan Liu. 2010. Synthesis and Biological Evaluation of New 5-Fluorouracil Substituted Ampelopsin Derivatives. *Molecules* (15): 2114-2123.



## LAMPIRAN

## A. Perhitungan untuk Preparasi Senyawa untuk Uji Sitotoksisitas dan Uji

*Doubling Time*

## A.1 Preparasi Larutan Uji untuk Uji Sitotoksisitas

- Pembuatan larutan 5-FU

- a. Penimbangan senyawa 5-FU

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{10^6}{V (\mu l)}$$

$$50.000 \mu M = \frac{g}{130,08} \times \frac{10^6}{400}$$

$$g = 2601,6 \mu g = 2,602 \text{ mg}$$

- b. Pengenceran

$$5000 \mu M = \frac{x}{400} \times 50.000 \mu M$$

$$x = 40 \mu l$$

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

$$x = 40 \mu l$$

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

$$x = 20 \mu l$$

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

$$x = 40 \mu l$$

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

$$x = 40 \mu l$$

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

$$x = 40 \mu l$$

- Pembuatan Larutan DC

- a. Penimbangan Senyawa DC

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{10^6}{V (\mu l)}$$

$$5000 \mu M = \frac{g}{332} \times \frac{10^6}{400}$$

$$g = 664 \mu g = 0,664 \text{ mg}$$

b. Pengenceran

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

$$x = 80 \mu\text{l}$$

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

$$x = 60 \mu\text{l}$$

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

$$x = 40 \mu\text{l}$$

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

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

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

$$x = 40 \mu\text{l}$$

## A.2 Preparasi Larutan Uji untuk Uji *Doubling Time*

### Pembuatan Larutan 5-FU

$$M = \frac{g}{M_r} \times \frac{10^6}{V (\mu\text{l})}$$

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

$$g = 2601,6 \mu\text{g} = 2,602 \text{ mg}$$

a. Pengenceran

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

$$x = 105 \mu\text{l}$$

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

$$x = 210 \mu\text{l}$$

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

$$x = 315 \mu\text{l}$$

### Pembuatan Larutan DC

$$M = \frac{g}{M_r} \times \frac{10^6}{V (\mu\text{l})}$$

$$4500 \mu\text{M} = \frac{g}{332} \times \frac{10^6}{1000}$$

$$g = 1494 \mu\text{g} = 1,494 \text{ mg}$$

a. Pengenceran

$$4500 \mu\text{M} = \frac{x}{1000} \times 4500 \mu\text{M}$$

$$x = 100 \mu\text{l}$$

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

$$x = 200 \mu\text{l}$$

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

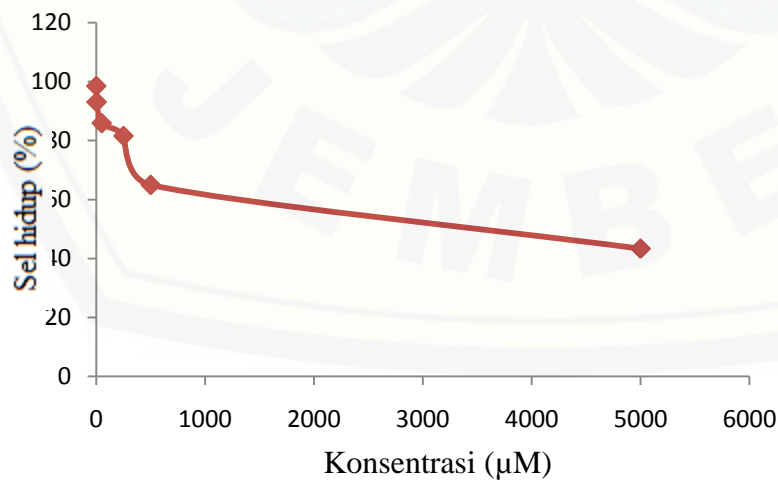
$$x = 300 \mu\text{l}$$

## B. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksitas

### B.1 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU

#### B.1.1 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU Replikasi 1

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	R
0,5	0,404	0,412	0,422	0,413	98,478	3291,156	0,875
5	0,4	0,353	0,433	0,395	93,018		
50	0,388	0,363	0,367	0,373	85,879		
250	0,3	0,417	0,36	0,359	81,575		
500	0,24	0,372	-	0,306	64,882		
5000	0,283	0,192	-	0,2375	43,307		
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,4175			
Kontrol media	0,09	0,102	0,108	0,1			



Contoh perhitungan

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

a. Konsentrasi 0,5  $\mu\text{M}$

$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,413-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 98,478 \%$$

b. Konsentrasi 5  $\mu\text{M}$

$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,395-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 93,018 \%$$

c. Konsentrasi 50  $\mu\text{M}$

$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,373-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 85,879 \%$$

d. Konsentrasi 250  $\mu\text{M}$

$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,359-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 81,575 \%$$

e. Konsentrasi 500  $\mu\text{M}$

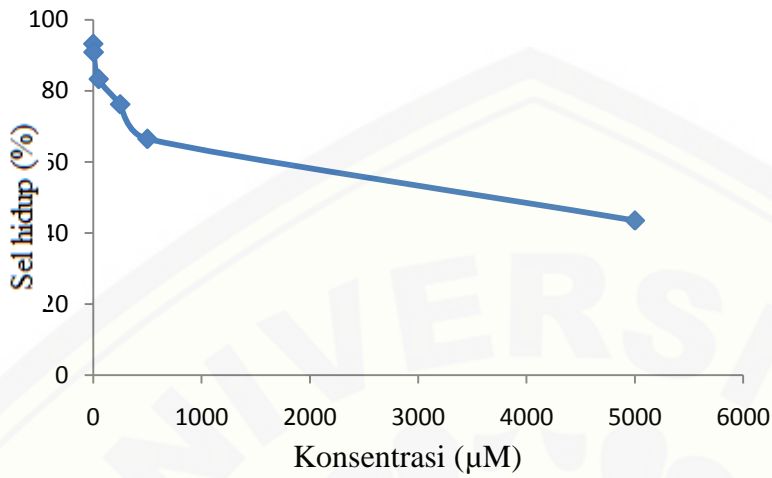
$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,306-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 64,882 \%$$

f. Konsentrasi 5000  $\mu\text{M}$

$$\text{Sel hidup} = \frac{(0,2375-0,1)}{(0,4175-0,1)} \times 100 \% = 43,307 \%$$

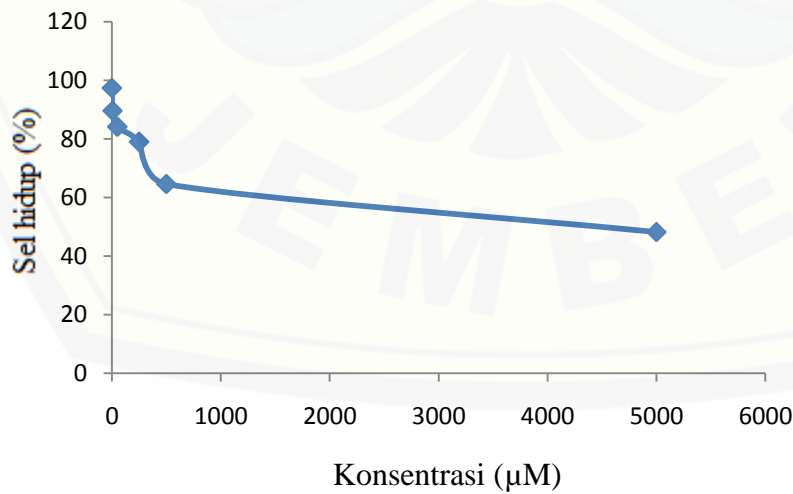
### B.1.2 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU Replikasi 2

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	R
0,5	0,781	0,766	-	0,7735	93,2143	4416,124	0,894
5	0,757	0,757	-	0,757	90,857		
50	0,726	0,669	0,717	0,704	83,286		
250	0,641	0,644	0,679	0,655	76,238		
500	0,549	0,53	0,679	0,586	66,429		
5000	0,434	0,415	0,427	0,425	43,476		
Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,821			
Kontrol media	0,119	0,116	0,127	0,121			



**B.1.3 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU Replikasi 3**

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)	IC <sub>50</sub> (µM)	R
0,5	0,8	0,895	-	0,848	97,340	4898,302	0,842
5	0,79	0,791	-	0,791	89,563		
50	0,78	0,743	0,728	0,750	84,084		
250	0,719	0,702	0,718	0,713	78,990		
500	0,673	0,603	0,546	0,607	64,575		
5000	0,506	0,518	0,438	0,487	48,204		
Kontrol sel	0,864	0,87		0,867			
Kontrol media	0,129	0,132	0,142	0,134			



IC <sub>50</sub> (μM)	Rata-rata (μM)	SD	RSD
3291,16	4201,86	824,715	19,627
4416,12			
4898,3			

$$SD = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(3291,16 - 4201,86)^2 + (4416,12 - 4201,86)^2 + (4898,3 - 4201,86)^2}{2}}$$

$$= 824,715$$

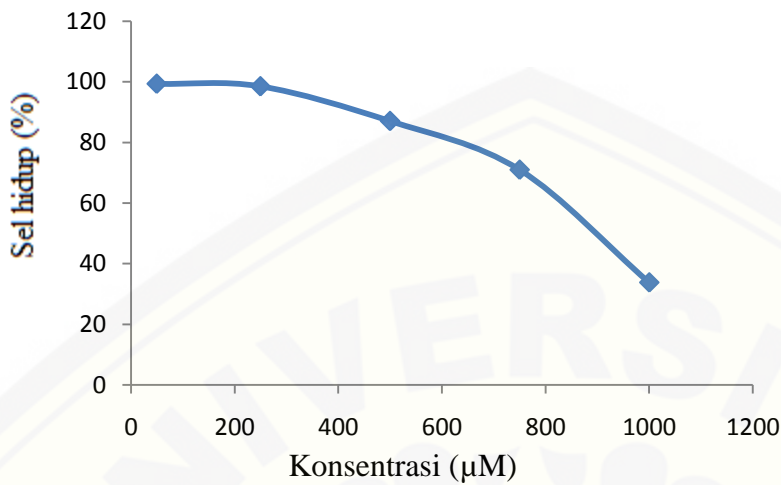
$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$= \frac{824,7153}{4201,86} \times 100\% = 19,627\%$$

## B.2 Perhitungan Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC

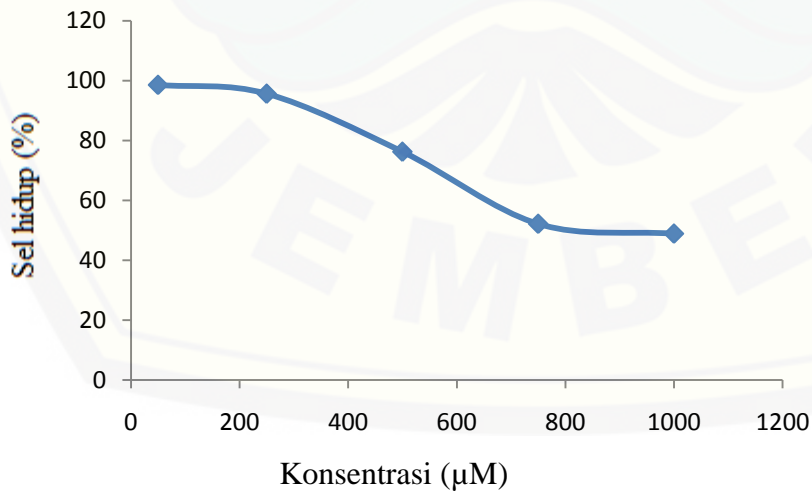
### B.2.1 Hasil Uji Sitotoksisitas Senyawa DC Replikasi 1

Konsentrasi (μM)	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Sel Hidup	IC <sub>50</sub> (μM)	R
50	0,426	0,415	0,405	0,415	99,318		
250	0,404	0,412	0,422	0,413	98,478		
500	0,377	0,385	0,367	0,376	87,034	921,178	0,933
750	0,331	0,309	0,336	0,325	70,971		
1000	0,278	0,179	0,165	0,207	33,806		
Kontrol sel	0,394	0,441	-	0,418			
Kontrol media	0,09	0,102	0,108	0,100			



**B.2.2 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa DC Replikasi 2**

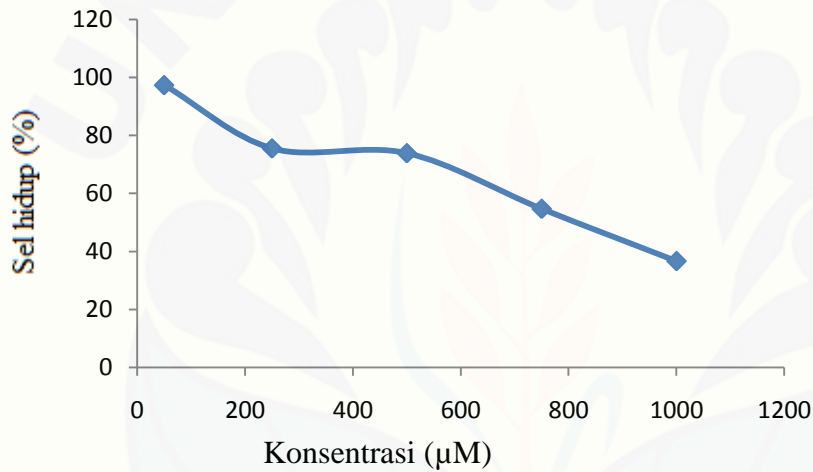
Konsentras i (µM)	Absorbansi			Rata-rata absorbansi	Sel Hidup (%)	IC <sub>50</sub> (µM)	R
50	0,818	0,853	0,762	0,811	98,571	932,052	0,944
250	0,762	0,856	0,753	0,790	95,619		
500	0,679	0,644	0,641	0,655	76,238		
750	0,489	0,526	0,443	0,486	52,143		
1000	0,496	0,466	0,427	0,463	48,857		
Kontrol sel	0,834	0,808	-	0,821			
Kontrol media	0,119	0,116	0,127	0,121			





**B.2.3 Hasil Uji Sitotoksitas Senyawa DC Replikasi 3**

Konsentrasi (µM)	Absorbansi			Rata-rata absorbansi	Sel hidup (%)	IC <sub>50</sub> (µM)	R
50	0,559	0,525	0,513	0,532	97,366		
250	0,379	0,439	0,514	0,444	75,556		
500	0,454	0,366	0,492	0,437	73,909	816,003	0,975
750	0,397	0,361	0,321	0,360	54,733		
1000	0,333	0,201	0,326	0,287	36,708		
Kontrol sel	0,696	0,603	0,329	0,543			
Kontrol media	0,14	0,133	0,142	0,138			



IC <sub>50</sub> (µM)	Rata-rata (µM)	SD	RSD
921,178	889,744	64,0929	7,20352
932,052			
816,003			

$$SD = \frac{\sqrt{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2}}{n-1}$$

$$SD = \frac{\sqrt{(921,178 - 889,744)^2 + (932,052 - 889,744)^2 + (816,003 - 889,744)^2}}{2}$$

$$= 64,0929$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{64,0929}{889,744} \times 100\% = 7,20352 \%$$

**C. Hasil Analisis Uji Sitotoksitas**

**C.1 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (1)**

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	3.529E7	4439273.974	8.054E8	7.548	6.647	8.906
0.02	1.189E7	1794006.048	2.055E8	7.075	6.254	8.313
0.03	5.967E6	1009107.456	8.643E7	6.776	6.004	7.937
0.04	3.551E6	654353.371	4.506E7	6.550	5.816	7.654
0.05	2.328E6	459917.167	2.654E7	6.367	5.663	7.424
0.06	1.625E6	340606.593	1.691E7	6.211	5.532	7.228
0.07	1.186E6	261710.415	1.140E7	6.074	5.418	7.057
0.08	8.945E5	206678.914	8005034.696	5.952	5.315	6.903
0.09	6.920E5	166723.053	5805827.009	5.840	5.222	6.764
0.1	5.465E5	136791.380	4320246.802	5.738	5.136	6.636
0.15	2.055E5	60200.608	1272736.181	5.313	4.780	6.105
0.2	94495.757	31283.906	482922.664	4.975	4.495	5.684
0.25	48513.871	17802.016	210756.720	4.686	4.250	5.324
0.3	26659.029	10704.071	100332.051	4.426	4.030	5.001
0.35	15307.193	6662.723	50573.588	4.185	3.824	4.704
0.4	9041.880	4235.041	26486.713	3.956	3.627	4.423
0.45	5433.129	2720.680	14224.526	3.735	3.435	4.153
0.5	3291.156	1750.708	7756.370	3.517	3.243	3.890
0.55	1993.640	1118.340	4260.452	3.300	3.049	3.629
0.6	1197.948	701.960	2341.784	3.078	2.846	3.370
0.65	707.622	427.336	1280.559	2.850	2.631	3.107
0.7	406.305	247.874	692.667	2.609	2.394	2.841
0.75	223.270	133.640	367.753	2.349	2.126	2.566
0.8	114.626	64.669	188.734	2.059	1.811	2.276
0.85	52.697	26.596	90.487	1.722	1.425	1.957
0.9	19.821	8.327	37.472	1.297	.920	1.574
0.91	15.652	6.260	30.430	1.195	.797	1.483
0.92	12.110	4.585	24.308	1.083	.661	1.386
0.93	9.133	3.251	19.017	.961	.512	1.279
0.94	6.665	2.210	14.481	.824	.344	1.161
0.95	4.653	1.421	10.631	.668	.153	1.027
0.96	3.051	.844	7.408	.484	-.074	.870
0.97	1.815	.444	4.763	.259	-.353	.678
0.98	.911	.188	2.655	-.041	-.725	.424
0.99	.307	.049	1.062	-.513	-1.314	.026

a. Logarithm base = 10.

**C.2 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (2)**

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT						
0.01	8.080E8	4.448E7	7.835E10	8.907	7.648	10.894
0.02	1.953E8	1.391E7	1.254E10	8.291	7.143	10.098
0.03	7.934E7	6651648.914	3.924E9	7.900	6.823	9.594
0.04	4.029E7	3816664.945	1.638E9	7.605	6.582	9.214
0.05	2.322E7	2428464.665	8.048E8	7.366	6.385	8.906
0.06	1.452E7	1652380.449	4.397E8	7.162	6.218	8.643
0.07	9.624E6	1178713.798	2.589E8	6.983	6.071	8.413
0.08	6.659E6	870929.863	1.611E8	6.823	5.940	8.207
0.09	4.763E6	661291.164	1.047E8	6.678	5.820	8.020
0.1	3.499E6	513156.682	7.041E7	6.544	5.710	7.848
0.15	9.762E5	179265.979	1.365E7	5.990	5.253	7.135
0.2	3.539E5	77514.801	3713201.605	5.549	4.889	6.570
0.25	1.482E5	37662.372	1218731.994	5.171	4.576	6.086
0.3	67806.831	19642.507	449369.323	4.831	4.293	5.653
0.35	32859.868	10711.026	178843.901	4.517	4.030	5.252
0.4	16524.714	6000.896	74902.638	4.218	3.778	4.874
0.45	8497.690	3408.600	32433.931	3.929	3.533	4.511
0.5	4416.184	1940.225	14329.915	3.645	3.288	4.156
0.55	2295.057	1093.686	6393.275	3.361	3.039	3.806
0.6	1180.213	602.023	2856.704	3.072	2.780	3.456
0.65	593.511	317.614	1270.535	2.773	2.502	3.104
0.7	287.621	156.384	560.013	2.459	2.194	2.748
0.75	131.616	69.224	243.288	2.119	1.840	2.386
0.8	55.112	26.217	102.441	1.741	1.419	2.010
0.85	19.979	7.913	39.937	1.301	.898	1.601
0.9	5.573	1.649	12.972	.746	.217	1.113
0.91	4.094	1.123	9.947	.612	.050	.998
0.92	2.929	.738	7.469	.467	-.132	.873
0.93	2.026	.464	5.461	.307	-.334	.737
0.94	1.343	.276	3.856	.128	-.559	.586
0.95	.840	.152	2.598	-.076	-.818	.415
0.96	.484	.076	1.638	-.315	-1.122	.214
0.97	.246	.032	.931	-.609	-1.497	-.031
0.98	.100	.010	.441	-1.001	-1.998	-.356
0.99	.024	.002	.136	-1.617	-2.789	-.865

a. Logarithm base = 10.

**C.3 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa 5-FU (3)**

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	4.109E8	2.673E7	3.028E10	8.614	7.427	10.481
0.02	1.088E8	9001554.817	5.467E9	8.037	6.954	9.738
0.03	4.685E7	4509759.344	1.846E9	7.671	6.654	9.266
0.04	2.485E7	2680412.908	8.163E8	7.395	6.428	8.912
0.05	1.484E7	1755078.049	4.204E8	7.171	6.244	8.624
0.06	9.565E6	1223699.258	2.390E8	6.981	6.088	8.378
0.07	6.509E6	891809.511	1.457E8	6.814	5.950	8.163
0.08	4.612E6	671703.503	9.354E7	6.664	5.827	7.971
0.09	3.371E6	519000.449	6.253E7	6.528	5.715	7.796
0.1	2.526E6	409267.116	4.317E7	6.402	5.612	7.635
0.15	7.650E5	152831.138	9319847.183	5.884	5.184	6.969
0.2	2.960E5	69693.778	2762661.835	5.471	4.843	6.441
0.25	1.311E5	35450.253	975647.465	5.118	4.550	5.989
0.3	63085.554	19270.197	384101.281	4.800	4.285	5.584
0.35	32030.925	10922.224	162388.339	4.506	4.038	5.211
0.4	16836.438	6350.446	71994.640	4.226	3.803	4.857
0.45	9036.611	3741.056	32921.269	3.956	3.573	4.517
→ 0.5	4898.302	2209.071	15334.117	3.690	3.344	4.186
0.55	2655.129	1293.433	7203.144	3.424	3.112	3.858
0.6	1425.086	741.497	3384.724	3.154	2.870	3.530
0.65	749.069	409.313	1580.578	2.875	2.612	3.199
0.7	380.331	212.432	729.770	2.580	2.327	2.863
0.75	183.021	100.149	331.267	2.263	2.001	2.520
0.8	81.053	40.894	145.731	1.909	1.612	2.164
0.85	31.366	13.498	59.684	1.496	1.130	1.776
0.9	9.499	3.146	20.648	.978	.498	1.315
0.91	7.118	2.199	16.081	.852	.342	1.206
0.92	5.203	1.487	12.280	.716	.172	1.089
0.93	3.686	.966	9.147	.567	-.015	.961
0.94	2.508	.595	6.596	.399	-.226	.819
0.95	1.617	.342	4.552	.209	-.466	.658
0.96	.965	.178	2.951	-.015	-.750	.470
0.97	.512	.079	1.737	-.291	-1.101	.240
0.98	.220	.027	.861	-.657	-1.568	-.065
0.99	.058	.005	.287	-1.234	-2.306	-.542

a. Logarithm base = 10.

**C.4 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (1)**

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT*						
0.01	3996.304	.	.	3.602	.	.
0.02	3364.951	.	.	3.527	.	.
0.03	3017.149	.	.	3.480	.	.
0.04	2779.413	.	.	3.444	.	.
0.05	2599.919	.	.	3.415	.	.
0.06	2456.303	.	.	3.390	.	.
0.07	2336.922	.	.	3.369	.	.
0.08	2234.963	.	.	3.349	.	.
0.09	2146.102	.	.	3.332	.	.
0.1	2067.432	.	.	3.315	.	.
0.15	1771.250	.	.	3.248	.	.
0.2	1566.427	.	.	3.195	.	.
0.25	1409.690	.	.	3.149	.	.
0.3	1282.348	.	.	3.108	.	.
0.35	1174.639	.	.	3.070	.	.
0.4	1080.810	.	.	3.034	.	.
0.45	997.170	.	.	2.999	.	.
0.5	921.178	.	.	2.964	.	.
0.55	850.978	.	.	2.930	.	.
0.6	785.124	.	.	2.895	.	.
0.65	722.409	.	.	2.859	.	.
0.7	661.731	.	.	2.821	.	.
0.75	601.955	.	.	2.780	.	.
0.8	541.723	.	.	2.734	.	.
0.85	479.080	.	.	2.680	.	.
0.9	410.446	.	.	2.613	.	.
0.91	395.400	.	.	2.597	.	.
0.92	379.680	.	.	2.579	.	.
0.93	363.114	.	.	2.560	.	.
0.94	345.466	.	.	2.538	.	.
0.95	326.383	.	.	2.514	.	.
0.96	305.305	.	.	2.485	.	.
0.97	281.249	.	.	2.449	.	.
0.98	252.179	.	.	2.402	.	.
0.99	212.339	.	.	2.327	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

## C.5 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (2)

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
0.01	9494.895	2535.559	4.049E11	3.977	3.404	11.607
0.02	7233.824	2180.421	5.476E10	3.859	3.339	10.738
0.03	6087.278	1980.149	1.540E10	3.784	3.297	10.187
0.04	5346.199	1840.988	5.930E9	3.728	3.265	9.773
0.05	4810.453	1734.523	2.730E9	3.682	3.239	9.436
0.06	4396.961	1648.368	1.411E9	3.643	3.217	9.149
0.07	4063.759	1576.024	7.911E8	3.609	3.198	8.898
0.08	3786.900	1513.663	4.713E8	3.578	3.180	8.673
0.09	3551.521	1458.841	2.944E8	3.550	3.164	8.469
0.1	3347.807	1409.907	1.909E8	3.525	3.149	8.281
0.15	2621.477	1221.667	3.182E7	3.419	3.087	7.503
0.2	2158.392	1086.627	7687340.643	3.334	3.036	6.886
0.25	1826.876	979.314	2280400.198	3.262	2.991	6.358
0.3	1572.797	888.332	768872.524	3.197	2.949	5.886
0.35	1369.010	807.314	282243.153	3.136	2.907	5.451
0.4	1200.107	731.939	109847.215	3.079	2.864	5.041
0.45	1056.553	658.547	44562.769	3.024	2.819	4.649
0.5	932.052	583.139	18664.748	2.969	2.766	4.271
0.55	822.221	500.225	8069.833	2.915	2.699	3.907
0.6	723.869	401.767	3667.341	2.860	2.604	3.564
0.65	634.561	281.192	1848.928	2.802	2.449	3.267
0.7	552.341	155.418	1115.986	2.742	2.192	3.048
0.75	475.522	65.836	805.741	2.677	1.818	2.906
0.8	402.485	22.016	644.172	2.605	1.343	2.809
0.85	331.386	5.689	535.635	2.520	.755	2.729
0.9	259.489	.989	445.088	2.414	-.005	2.648
0.91	244.605	.646	427.342	2.388	-.190	2.631
0.92	229.401	.406	409.340	2.361	-.392	2.612
0.93	213.773	.243	390.873	2.330	-.614	2.592
0.94	197.573	.137	371.670	2.296	-.863	2.570
0.95	180.590	.071	351.352	2.257	-1.147	2.546
0.96	162.493	.033	329.338	2.211	-1.482	2.518
0.97	142.711	.013	304.633	2.154	-1.894	2.484
0.98	120.091	.004	275.194	2.080	-2.443	2.440
0.99	91.493	.000	235.235	1.961	-3.309	2.372

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

**C.6 Hasil Analisis Probit Uji Sitotoksitas Senyawa DC (3)**

**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	21564.394	4771.381	1.683E7	4.334	3.679	7.226
0.02	14692.743	3755.289	5864433.587	4.167	3.575	6.768
0.03	11518.044	3223.861	3005685.991	4.061	3.508	6.478
0.04	9590.617	2873.052	1818687.567	3.982	3.458	6.260
0.05	8263.295	2615.212	1208981.486	3.917	3.418	6.082
0.06	7279.291	2413.429	854261.678	3.862	3.383	5.932
0.07	6513.413	2248.845	630147.901	3.814	3.352	5.799
0.08	5896.295	2110.595	479963.221	3.771	3.324	5.681
0.09	5385.968	1991.882	374765.718	3.731	3.299	5.574
0.1	4955.345	1888.186	298490.189	3.695	3.276	5.475
0.15	3509.441	1509.869	116606.079	3.545	3.179	5.067
0.2	2667.799	1259.549	55441.865	3.426	3.100	4.744
0.25	2108.574	1074.001	29410.647	3.324	3.031	4.469
0.3	1707.035	926.559	16719.573	3.232	2.967	4.223
0.35	1403.542	803.400	9964.407	3.147	2.905	3.998
0.4	1165.609	696.226	6145.651	3.067	2.843	3.789
0.45	973.870	599.371	3894.007	2.989	2.778	3.590
0.5	815.993	508.452	2528.074	2.912	2.706	3.403
0.55	683.711	419.891	1685.977	2.835	2.623	3.227
0.6	571.243	331.539	1164.735	2.757	2.521	3.066
0.65	474.403	244.887	842.812	2.676	2.389	2.926
0.7	390.060	166.381	641.029	2.591	2.221	2.807
0.75	315.780	103.218	506.775	2.499	2.014	2.705
0.8	249.586	57.951	408.291	2.397	1.763	2.611
0.85	189.730	28.610	328.018	2.278	1.457	2.516
0.9	134.369	11.474	255.501	2.128	1.060	2.407
0.91	123.626	9.178	241.149	2.092	.963	2.382
0.92	112.926	7.196	226.647	2.053	.857	2.355
0.93	102.227	5.503	211.876	2.010	.741	2.326
0.94	91.471	4.075	196.679	1.961	.610	2.294
0.95	80.579	2.890	180.836	1.906	.461	2.257
0.96	69.427	1.928	164.009	1.842	.285	2.215
0.97	57.809	1.171	145.628	1.762	.069	2.163
0.98	45.318	.602	124.540	1.656	-.220	2.095
0.99	30.877	.211	97.587	1.490	-.676	1.989

a. A heterogeneity factor is used.

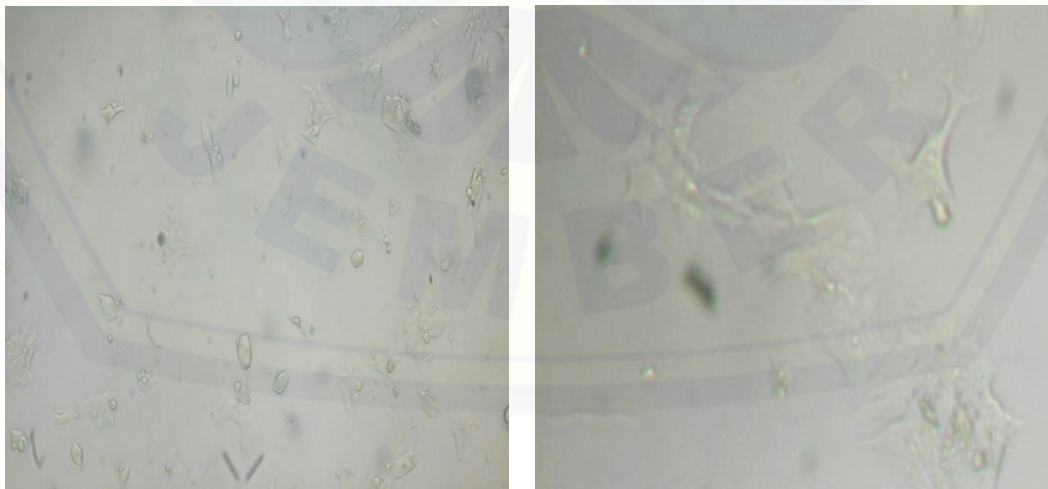
b. Logarithm base = 10.

**C.7 Hasil Uji t**

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
IC <sub>50</sub>	Equal variances assumed	7.313	.054	6.935	4	.002	3312.116333	477.587356	1986.121257	4638.111410
	Equal variances not assumed			6.935	2.024	.020	3312.116333	477.587356	1280.547244	5343.685422

**C.8 Foto Sel MCF-7 Sebelum Diberi Perlakuan**

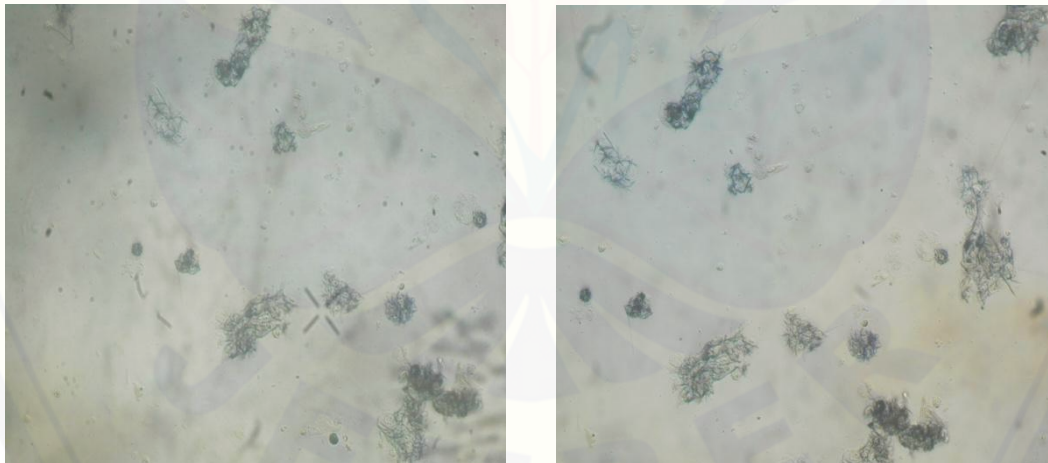




**C.9 Foto Sel MCF-7 Setelah diberi Larutan MTT**



**C.10 Foto Sel MCF-7 Setelah diberi Larutan SDS**



**D. Perhitungan Hasil Uji *Doubling Time*****D.1 Perhitungan Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU**

Konsentrasi (µM)	Waktu inkubasi (jam)	Sel hidup (%)	Jumlah sel hidup	Log jml sel hidup	Persamaan log jumlah sel hidup (y) vs waktu inkubasi (x)	R	<i>Doubling time</i> (jam)
0,5 IC <sub>50</sub>	24	42,527	2126,35	3,328	y=0,00415x + 3,227	0,999	186,265
	48	52,789	2639,45	3,422			
	72	67,328	3366,4	3,527			
IC <sub>50</sub>	24	40,127	2006,35	3,302	y=0,00373x + 3,203	0,982	213,673
	48	45,994	2299,7	3,362			
	72	60,524	3026,2	3,481			
1,5 IC <sub>50</sub>	24	37,875	1893,75	3,277	y=0,00373x + 3,171	0,951	222,252
	48	41,367	2068,35	3,316			
	72	57,175	2858,75	3,456			

**Contoh perhitungan (konsentrasi 0,5 IC<sub>50</sub>)**

## a. Jumlah sel hidup

Jumlah sel hidup = % hidup x jumlah sel awal

Jumlah sel awal = 5000 sel

Waktu inkubasi 24 jam

42,527 % x 5000 sel = 2126,35 sel

Waktu inkubasi 48 jam

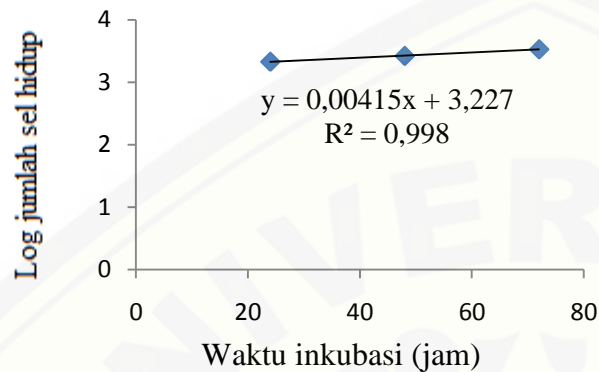
52,789 % x 5000 sel = 2639,45 sel

Waktu inkubasi 72 jam

67,328 % x 5000 sel = 3366,4 sel

b. *Doubling time*

Dibuat kurva waktu inkubasi vs log jumlah sel hidup



Dari kurva tersebut akan diperoleh persamaan :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

$y$  = log jumlah sel hidup

$x$  = *doubling time*

$a$  = intersep

$b$  = *slope*

Jadi untuk menghitung *doubling time* :

$$x = \frac{y-a}{b}$$

$$\text{Doubling time} = \frac{\log(2x \text{ jumlah sel awal}) - \text{intersep}}{\text{slope}}$$

*Doubling time* adalah waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan jumlah sel menjadi dua kalinya, jadi jumlah sel yang digunakan dalam rumus adalah dua kali jumlah sel awal. Jumlah sel awal adalah 5000 sel, maka *doubling time* adalah waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan jumlah sel menjadi 10000 sel.

$$\text{Doubling time} = \frac{\log 10000 - 3,227}{0,00415} = 186,265 \text{ jam}$$

**D.1.1 Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU (24 jam)**

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata ( $\mu\text{M}$ )	Sel hidup (%)
2100	0,790	0,925	0,953	0,889	42,527
4200	0,893	0,869	0,777	0,846	40,127
6300	0,798	0,817	0,803	0,806	37,875
Kontrol sel	2,073	2,241	1,442	1,919	
Kontrol media	0,123	0,128	0,132	0,128	

**D.1.2 Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU (48 jam)**

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata ( $\mu\text{M}$ )	Sel hidup (%)
2100	1,116	1,108	1,165	1,130	52,789
4200	1,033	1,017	0,954	1,001	45,994
6300	0,974	0,862	0,907	0,914	41,387
Kontrol sel	2,276	1,884	1,904	2,021	
Kontrol media	0,135	0,127	0,136	0,133	

**D.1.3 Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa 5-FU (72 jam)**

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata ( $\mu\text{M}$ )	Sel hidup (%)
2100	1,696	1,837	1,570	1,701	67,328
4200	1,511	1,564	1,579	1,551	60,524
6300	1,589	1,421	1,423	1,478	57,175
Kontrol sel	2,552	2,458	2,249	2,420	
Kontrol media	0,232	0,218	0,21	0,22	

## D.2 Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa DC

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Waktu inkubasi (jam)	Sel hidup (%)	Jumlah Sel Hidup	Log Jumlah Sel Hidup	Persamaan log jumlah sel hidup (y) vs waktu inkubasi (x)	R	<i>Doubling time</i> (jam)
0,5 IC <sub>50</sub>	24	10,46	523	2,719	$y=0,00706x + 2,585$	0,938	200,425
	48	19,884	994,2	2,997			
	72	22,867	1143,35	3,058			
IC <sub>50</sub>	24	7,538	376,9	2,576	$y=0,00598x + 2,447$	0,986	259,699
	48	11,574	578,7	2,762			
	72	14,593	729,65	2,863			
1,5 IC <sub>50</sub>	24	6,849	342,45	2,535	$y=0,00377x + 2,017$	0,999	412,202
	48	8,539	426,95	2,630			
	72	10,396	519,8	2,716			

### D.2.1 Hasil Uji *Doubling Time* Senyawa DC (24 jam)

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)
450	0,309	0,302	0,335	0,315	10,460
900	0,281	0,25	0,258	0,263	7,538
1350	0,216	0,3	0,236	0,251	6,849
Kontrol sel	2,073	2,241	1,442	1,919	
Kontrol media	0,123	0,128	0,132	0,128	

### D.2.2 Hasil Uji *Doubling time* Senyawa DC (48 jam)

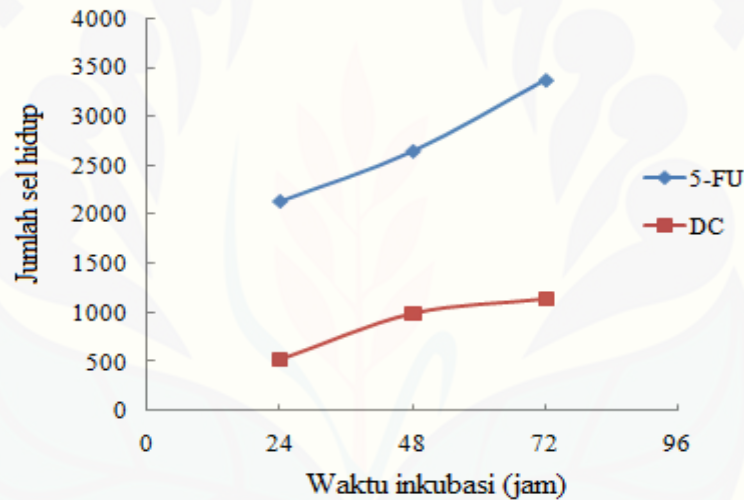
Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)
450	0,51	0,485	0,528	0,508	19,884
900	0,318	0,341	0,393	0,351	11,574
1350	0,258	0,32	0,302	0,293	8,539
Kontrol sel	2,276	1,884	1,904	2,021	
Kontrol media	0,133	0,127	0,136	0,132	

### D.2.3 Hasil Uji *Doubling time* Senyawa DC (72 jam)

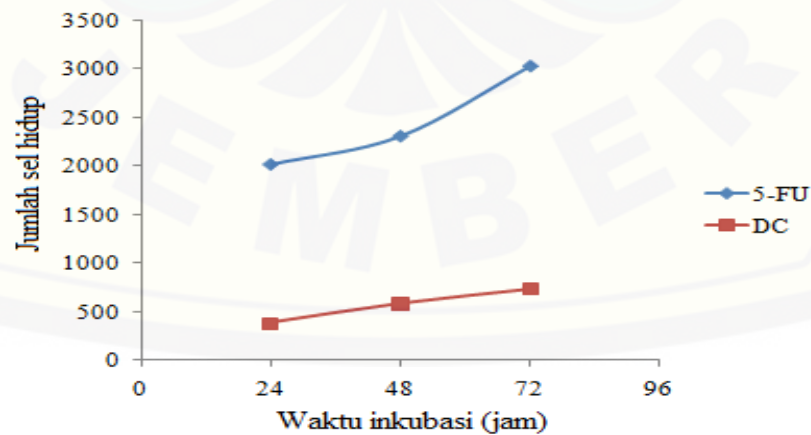
Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbansi			Rata-rata	Sel hidup (%)
450	0,733	0,751	0,685	0,723	22,867
900	0,556	0,546	0,521	0,541	14,593
1350	0,412	0,448	0,486	0,449	10,396
Kontrol sel	2,552	2,458	2,249	2,420	
Kontrol media	0,232	0,218	0,21	0,22	

### E. Grafik *Doubling Time*

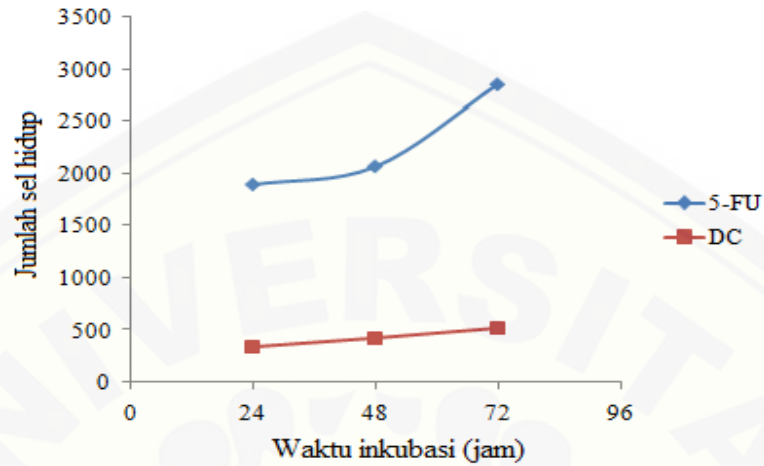
#### E.1 Grafik *Doubling Time* Konsentrasi 0,5 IC<sub>50</sub>



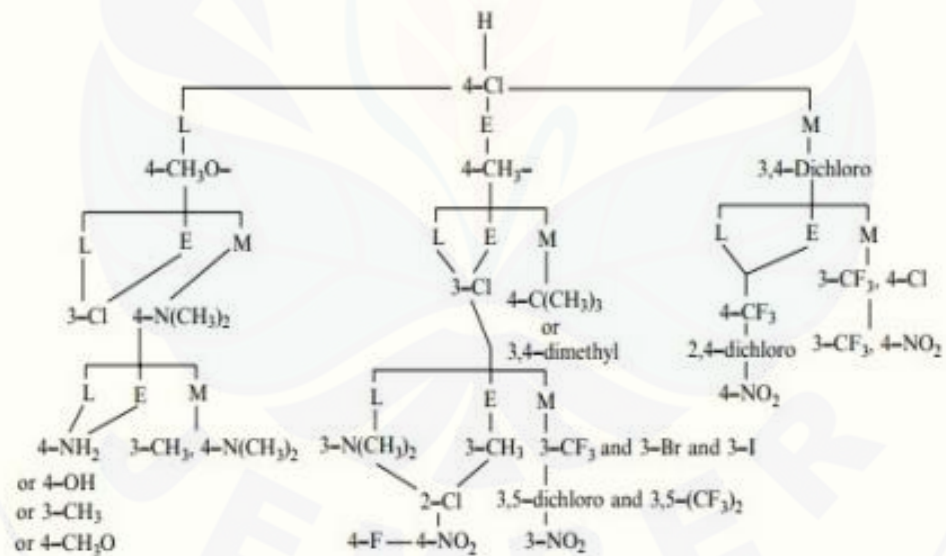
#### E.2 Grafik *Doubling Time* Konsentrasi IC<sub>50</sub>



**E.3 Grafik Doubling Time Konsentrasi 1,5 IC<sub>50</sub>**



**F. Skema Operasional Substitusi Aromatik Model Pendekatan Topliss (Thomas, 2003)**



Keterangan :

- L : aktivitas lebih kecil
- E : aktivitas sama besar
- M : aktivitas lebih besar