

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADASENYAWA 2-METOKSI-4-((4-METOKSIFENILIMINO)METIL)FENOL TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

**OLEH:
LAILA SUKRIA
NIM. 15630101**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADASENYAWA 2-METOKSI-4-((4-METOKSIFENILIMINO)METIL)FENOL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

Oleh:
LAILA SUKRIA
NIM. 15630101

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019

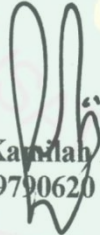
UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADA SENYAWA 2-METOKSI-4-((4-METOKSIFENILIMINO)METIL)FENOL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D

SKRIPSI

Oleh:
LAILA SUKRIA
NIM. 15630101

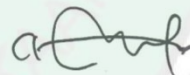
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 29 Mei 2019

Pembimbing I



Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIDT. 19890113 20180201 1 244

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADA SENYAWA 2-METOKSI-4-((4-METOKSIFENILIMINO)METIL)FENOL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D


SKRIPSI

Oleh:
LAILA SUKRIA
NIM. 15630101

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 29 Mei 2019

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Anggota Penguji	: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I NIDT. 19890113 20180201 1 244	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan


Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Laila Sukria

NIM : 15630101

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antikanker Pada Senyawa 2-Metoksi-4-((4-Metoksifenilimino)Metil)Fenol Terhadap Sel Kanker Payudara T47D.

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 18 Juni 2019

Yang membuat pernyataan,



Laila Sukria
NIM. 15630101

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

Kedua orangtua, Bapak Zaenal Muttaqien dan Ibu Siti Safinatuzzahro' yang senantiasa memberikan motivasi, dukungan secara materi maupun do'a yang tiada hentinya.

Kakak satu-satunya Mas Musthofa Fahmi beserta istri mbk Aulia Rahma Annisa yang senantiasa memberikan do'a dan motivasi.

Seluruh bapak ibu dosen jurusan kimia UIN Malang yang telah memberikan do'a dan ilmunya kepada penulis.

Bapak ibu pembimbing, staf, teknisi Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada yang telah memberikan banyak ilmu serta mendampingi penulis dalam penelitian

Seluruh teman-teman satu angkatan maupun beda angkatan jurusan kimia yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini dengan lancar.

Teman-teman dari Universitas Gadjah Mada yang juga telah membantu proses penelitian yang telah dilaksanakan.

Seluruh pihak di belakang penulis yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang dengan ikhlas memberikan do'a dan motivasi pada penulis.

KATA PENGANTAR



Puji syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT atas segenap limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIKANKER PADA SENYAWA 2-METOKSI-4-((4-METOKSI-FENILIMINO)-METIL)FENOL TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D”**. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya. Karena beliau adalah yang menuntun umat manusia dari jaman jahiliyah menuju jaman yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Skripsi ini merupakan salah satu studi yang harus ditempuh untuk syarat menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dengan ketulusan hati, seta iringan doapenulis ingin mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang serta dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Oky Bagus Prasetyo, M.Pd.I selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Hanapi, M.Sc. selaku konsultan yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

6. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penulis.

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu dalam proses penyelesaian proposal ini diridhoi oleh Allah SWT dan dicatat sebagai amal sholeh Bapak/Ibu/Saudara sekalian. Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam proposal ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak demi penyempurnaan penelitian ini. Akhir kata, penulis berharap proposal penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua, yaitu bagi penulis pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya. Amin.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
مستخلص البحث.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol Sebagai Antikanker	7
2.2 Sel kanker T47D sebagai sel uji antikanker	9
2.3 Uji Aktivitas Antikanker secara <i>In Vitro</i> dengan metode MTT..	9
2.4 Karakterisasi Senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol	11
2.4.1 Uji Kimia dengan Larutan NaOH	11
2.4.2 Karakterisasi Senyawa Basa Schiff Menggunakan FTIR ..	12
2.4.3 Karakterisasi Senyawa Basa Schiff Menggunakan KG-SM	14
BAB III METODOLOGI	
3.1 Pelaksanaan Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.3 Tahapan Penelitian	17
3.4 Cara Kerja	17
3.4.1 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan Uji Kimia	17
3.4.2 Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol Menggunakan Spektrofotometer FTIR	18

	ix
3.4.3 Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol Menggunakan KG-SM.....	18
3.4.4 Uji Antikanker dengan metode MTT	19
3.4.4.1 Penyiapan Sel	19
3.4.4.2 Perhitungan Sel Kanker.....	20
3.4.4.3 Peletakan Sel Pada Plate	20
3.4.4.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada Plate	20
3.4.4.5 Pemberian Larutan MTT	21
3.4.5 Analisis Data	21
BAB IV PEMBAHASAN	
4.1 Karakterisasi senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol	24
4.1.1 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)-metil)fenol dengan Uji Kimia.....	24
4.1.2 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)-metil)fenol dengan Menggunakan FTIR	25
4.1.3 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)-metil)fenol dengan KG-SM	27
4.2 Uji Aktivitas Antikanker Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)-metil)fenol	35
4.3 Aktivitas Antikanker Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)-metil)fenol dalam Perspektif Islam	41
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Gugus Fungsi dari Spektra FTIR produk sintesis	13
Tabel 4.1 Hasil Identifikasi FTIR senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol	26
Tabel 4.2 Data Nilai IC ₅₀ Uji Aktivitas Antikanker	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Reaksi Pembentukan Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol	8
Gambar 2.2	Reaksi reduksi MTT menjadi formazan	10
Gambar 2.3	Reaksi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol dengan penambahan NaOH	11
Gambar 2.4	Hasil Spektra FTIR dari produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol dan Reaktan.....	12
Gambar 2.5	Kromatogram Produk Sintesis	14
Gambar 2.6	Spektra Massa (A) Puncak 1 (B) Puncak 2	15
Gambar 4.1	Reaksi Asam Basa Bronsted Lowry	25
Gambar 4.2	Hasil Spektra FTIR Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol	26
Gambar 4.3	Spektra Hasil Kromatogram	28
Gambar 4.4	Spektra Massa Puncak 1	30
Gambar 4.5	Pola Fragmentasi Puncak 1.....	30
Gambar 4.6	Struktur senyawa <i>p</i> -Anisidin	31
Gambar 4.7	Spektra Massa Puncak 2	31
Gambar 4.8	Pola Fragmentasi Puncak 2.....	32
Gambar 4.9	Struktur Senyawa Vanillin	32
Gambar 4.10	Spektra Massa Puncak 3	33
Gambar 4.11	Pola Fragmentasi Puncak 3.....	35
Gambar 4.12	Morfologi Sel Kanker.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian	50
Lampiran 2 Diagram Alir	51
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Reagen	57
Lampiran 4 Data dan Perhitungan Hasil Penelitian	60
Lampiran 5 Dokumentasi	67



ABSTRAK

Sukria, Laila. 2019. Uji Aktivitas Antikanker Pada Senyawa 2-Metoksi-4-((4-Metoksifenilimino)Metil)Fenol Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si. ; Pembimbing II: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I ; Konsultan : Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: Senyawa basa Schiff, Sel Kanker Payudara T47D, FTIR, KG-SM, MTT

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol serta untuk menguji aktivitas antikanker senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dalam menghambat sel kanker payudara T47D. Kestabilan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dilakukan dengan karakterisasi menggunakan uji kimia, identifikasi menggunakan FTIR dan KG-SM. Sedangkan uji aktivitas antikanker senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan metode MTT. Hasil karakterisasi dengan menggunakan uji kimia, identifikasi FTIR dan KG-SM menunjukkan senyawa masih stabil. Nilai IC_{50} senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol sebesar 353,038 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan keaktifan yang lemah dalam menghambat sel kanker payudara T47D.

ABSTRACT

Sukria, Laila. 2019. Test Of Anticancer Activity in 2-Methoxy-4-((4-Methoxyphenilimino)methyl)phenol Compoundon T47D Breast Cancer Cells. Thesis.Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University Malang. Advisor I: Elok kamilah Hayati, M.Si.; Advisor II: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I ; Consultant:Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: Schiff-Base Compound,Breast Cancer Cell T47D, FTIR, GC-MS, MTT

The purpose of this research is to determine the stability of the 2-methoxy-4-((4-methoxyphenilimino) methyl) phenol compound and to test the anticancer activity of 2-methoxy-4-((4-methoxyphenilimino) methyl) phenol in inhibiting T47D breast cancer cells.The stability of the 2-methoxy-4-((4-methoxyphenilimino)methyl)phenol compound was carried out by characterization using chemical tests, identification using FTIR and GC-MS. While the anticancer activity test of compound 2-methoxy-4-((4-methoxyphenilimino) methyl) phenol using the MTT method. The results of re-characterization using chemical tests, identification of FTIR and KG-SM showed the compound was still stable. The IC_{50} value of compound 2-methoxy-4-((4-methoxyphenilimino) methyl) phenol was 353,038 $\mu\text{g} / \text{mL}$ which showed weak activity in inhibiting T47D breast cancer cells.

مستخلص البحث

شكرية، ليلي. 2019. تجربة أنشطة ضد السرطان في المستحضر 4-((4-2-metoksi-fenilimino)metil)metoksifenilimino)metil)fenol لخلية سرطان النهد T47D. تقرير البحث. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: إيلوك كاملة حياتي الماجستير. المشرف الثاني: أوكي باجاس فراستيو الماجستير. المستشار: أحمد حنفي الماجستير.

الكلمات المفتاحية: المستحضر Basa Schiff، خلية سرطان النهد T47D، FTIR، KG-SM، MTT.

يهدف هذا البحث إلى معرفة استقرار المستحضر 4-((4-2-metoksi-fenilimino)metil)metoksifenilimino)metil)fenol في أنشطة ضد السرطان في تحريج خلية سرطان النهد T47D. واستقرار المستحضر 4-((4-2-metoksi-fenilimino)metil)metoksifenilimino)metil)fenol قد يقام بالوصف باستخدام التجربة الكيميائية والتعرف باستخدام FTIR و KG-SM. وأما تجربة أنشطة ضد السرطان للمستحضر 4-((4-2-metoksi-fenilimino)metil)metoksifenilimino)metil)fenol تستخدم المنهج MTT. ونتيجة الوصف باستخدام التجربة الكيميائية والتعرف باستخدام FTIR و KG-SM يدلان على المستحضر المستقر. و قيمة IC_{50} المستحضر قدر 353,038 يدل على الدؤوب الضعيف في تحريج خلية سرطان النهد T47D.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit kedua yang menyebabkan kematian di seluruh dunia setelah penyakit kardiovaskular dan lebih dari 70% penyakit kanker terjadi di negara berkembang. Kematian karena penyakit kanker mengalami peningkatan terus menerus dan diperkirakan kematian dapat mencapai 12 juta pada tahun 2030 (Patel, dkk., 2011). Menurut WHO, penderita kanker setiap tahun bertambah sekitar 6,25 juta jiwa (Triningsih, 2002).

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita oleh wanita di seluruh dunia dengan insidensi yang meningkat 1-2% tiap tahun (Basu, dkk., 2004). Di Indonesia sendiri kanker ini menduduki peringkat kedua setelah kanker serviks dengan kasus kejadian 17,77% (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Sehingga, untuk mengurangi persentase penderita kanker payudara tersebut, diperlukan adanya pengembangan suatu agen kemopreventif atau suatu senyawa yang dapat mencegah dan menghambat perkembangan kanker.

Senyawa basa schiff merupakan produk kondensasi amina primer dengan senyawa karbonil. Ciri utama dari struktur senyawa ini adalah memiliki rumus umum $RHC=N-R_1$, dimana R dan R₁ adalah alkil, aril, siklo alkil atau heterosiklik (Ashraf, dkk., 2011). Imina atau basa schiff juga merupakan kelompok senyawa yang berperan penting secara biologis sebagai antioksidan (Saranya dan Lakshmi, 2015), anti inflamasi dan agen analgesik (Ali, dkk., 2012), antijamur (Ashraf dkk., 2011), antimalaria (Brodowska, dkk., 2014), antibakteri

(Chaluvaraju dan Zaranappa, 2011). Selain itu, senyawa basa schiff juga dapat berfungsi sebagai senyawa antikanker seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Mokhles dkk., (2016) dan Gupta dkk., (2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Mokhles dkk., (2016) menyatakan bahwa senyawa basa schiff hasil reaksi antara salisilaldehida dengan 2-amino-4-fenil-5-metiltiazol mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel HepG2, MCF-7, dan HCT116 dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah $9,22 \mu\text{gmL}^{-1}$, $10,00 \mu\text{gmL}^{-1}$ dan $9,50 \mu\text{gmL}^{-1}$. Penelitian lain juga dilakukan oleh Gupta dkk., (2015) yang menyatakan bahwa produk basa schiff dari 2,4-dihidroksibenzaldehida dengan berbagai amina primerbutilamin, anilin, dan 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)anilin memiliki aktivitas antikanker terhadap sel PC3. Pengujian dilakukandengan metode MTT yang menghasilkan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $7,43 \mu\text{M}$, $7,15 \mu\text{M}$, dan $4,83 \mu\text{M}$. Sedangkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Zhao dkk., (2018), bahwa senyawa basa Schiff turunan dari dehidroabietilamin memiliki aktivitas antikanker terhadap sel Hela, HepG2, MCF-7, A549, HUVEC. Seperti pada senyawa imidazol-2-formaldehida-dehidroabietilamin menghasilkan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $3,22 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $0,24 \pm 0,01 \mu\text{M}$, $4,28 \pm 0,70 \mu\text{M}$, $3,17 \pm 0,05 \mu\text{M}$ dan $7,67 \pm 0,43 \mu\text{M}$.

Kemampuan senyawa sebagai antioksidan dan antikanker dapat diketahui melalui adanya gugus fenolat pada senyawa tersebut. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Mohamed dkk., (2013) bahwa beberapa senyawa basa Schiff turunan dari sulfonamide-imina yang memiliki gugus fenolat seperti 4-[(2-hidroksi-benzilidena)-amino]-benzensulfonamidamemiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara dengan nilai IC_{50} sebesar $90 \mu\text{M}$, sedangkan jika

dibandingkan dengan senyawa 4-(benzilidena-amino)-benzensulfonamida yang tidak memiliki gugus fenolat tidak memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara dengan tidak dihasilkannya nilai IC_{50} . Menurut Silalahi (2002), senyawa bioaktif dari buah yang mengandung gugus fenolat seperti flavonoid, asam folat, β -karoten, limonoid dan beberapa jenis serat ternyata memiliki potensi sebagai antikanker. Senyawa bahan alam lain yang juga memiliki gugus fenolat adalah vanilin (Handayani, 2011). Vanilin banyak digunakan sebagai material start untuk sintesis senyawa fenolat yang terkonjugasi panjang seperti pada penelitian Purwono dkk., (2013), Hasanah dkk., (2017), dan Adawiyah (2017).

Adawiyah (2017) telah melakukan sintesis senyawa basa schiff dari vanilin dan *p*-anisidin. Penggunaan vanilin sebagai material start tersebut dapat menghasilkan produk senyawa basa schiff yang memiliki gugus fenolat. Mengacu pada penelitian yang telah disebutkan, diharapkan senyawa basa schiff ini dapat bertindak sebagai antikanker.

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, maka dilakukan penelitian uji antikanker pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol hasil sintesis yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017) terhadap sel kanker payudara T47D. Sebelum dilakukan uji antikanker, terlebih dahulu dilakukan karakterisasi menggunakan FTIR dan KG-MS serta uji kimia dengan larutan NaOH untuk memastikan senyawa tersebut tidak rusak karena penyimpanan.

Melalui penelitian ini, diharapkan dapat mengetahui manfaat senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol sebagai antikanker. Senyawa tersebut merupakan salah satu ciptaan Allah yang dapat kita renungkan manfaatnya berdasarkan penelitian yang dilakukan. Hal ini dikarenakan menurut

Imam Ghazali, jalan untuk mengenal Allah dan mendekatkan diri kepada-Nya adalah dengan memikirkan dan merenungkan hikmah atau manfaat yang terkandung dalam ciptaan-Nya. Allah SWT memberikan gelar Ulul Albab pada orang yang berfikir melalui aspek mata akal (fikir dan nadzar), observasi (pengamatan), mata hati (dzikir), instropeksi (muhasabah, perenungan, dan penghayatan) (Syafuruddin, 2003). Sebagaimana firman Allah SWT dalam Surat Ali Imran ayat 190.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal,”

Menurut tafsir jalalain, (sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi) dan keajaiban-keajaiban yang terdapat pada keduanya (serta pergantian malam dan siang) dengan datang dan pergi serta bertambah dan berkurang (menjadi tanda-tanda) atau bukti-bukti atas kekuasaan Allah SWT (bagi orang-orang yang berakal) artinya yang mempergunakan pikiran mereka.

Adanya aktivitas antikanker pada senyawa basa Schiff menunjukkan bahwa senyawa tersebut nantinya dapat diaplikasikan sebagai obat. Allah telah menciptakan seluruh makhluk yang ada di bumi memiliki manfaat yang tiada terhitung dan tidak ada yang sia-sia, sebagaimana firman Allah dalam surat Al-Anbiya' ayat 16:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَعِبِينَ ﴿١٦﴾

“Dan tidaklah Kami ciptakan Iangit dan bumi dan segala yang ada di antara keduanya dengan bermain-main”.

Menurut tafsir Jalalain, (Dan tidaklah Kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada diantara keduanya dengan bermain-main) tiada gunanya, tetapi justru hal ini menjadi bukti yang menunjukkan kekuasaan Kami dan sekaligus sebagai manfaat untuk hamba-hamba Kami. Berdasarkan hal tersebut, aktivitas antikanker yang didapatkan pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol dapat bermanfaat bagi penderita penyakit kanker sebagai obat pencegahan pertumbuhan kanker yang semakin besar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kestabilan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)-fenol dari hasil uji kimia dengan larutan NaOH dan identifikasi menggunakan FTIR dan KG-SM?
2. Bagaimana aktivitas antikanker dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, dapat didapatkan tujuan sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui kestabilan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dari hasil uji kimia dengan larutan NaOH dan identifikasi menggunakan FTIR dan KG-SM.
2. Untuk mengetahui aktivitas antikanker dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol.

1.4 Batasan Masalah

Agar pembahasan tidak menyimpang dari tujuan, maka penyusun menentukan batasan masalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan adalah sampel hasil sintesis dari Adawiyah (2017) berupa senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol pada bulan April 2017.
2. Karakterisasi yang digunakan adalah dengan uji kimia dengan larutan NaOH dan identifikasi menggunakan FTIR dan KG-SM.
3. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara T47D.
4. Metode *in-vitro* yang digunakan adalah metode MTT.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kestabilan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol serta aktivitas antikanker dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol Sebagai Antikanker

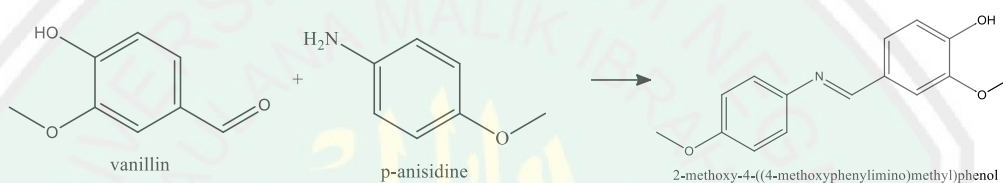
Kanker merupakan tumor yang membahayakan (*malignant tumor*). Kanker terbentuk oleh adanya pembelahan sel secara terus-menerus yang disebabkan oleh kegagalan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel. Pembelahan sel ini juga diakibatkan oleh perubahan DNA sel yang juga memiliki kemampuan untuk menginvasi jaringan lain yang sehat dan melakukan pertumbuhan (Katzung, 2004).

Melalui beberapa penelitian yang telah dilakukan, senyawa basa schiff memiliki potensi sebagai senyawa antimitosis atau senyawa yang dapat menghambat pembelahan sel secara terus-menerus. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Mohamed dkk., (2013) menunjukkan bahwa senyawa basa Schiff turunan dari sulfanilamida-imina berpotensi sebagai senyawa antimitosis yang terikat pada *colchicine binding site*. Salah satu turunan dari sulfanilamide-imina adalah 4-[(2-hidroksi-benzilidena)-amino]-benzensulfonamida yang memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara dengan nilai IC_{50} sebesar 90 μ M.

Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol merupakan senyawa hasil sintesis dari vanilin dan *p*-anisidin yang memiliki wujud padatan berwarna coklat muda, serta memiliki titik lebur 128-131°C (Adawiyah, 2017). Senyawa basa schiff tersebut merupakan modifikasi dari struktur vanillin yang dapat meningkatkan nilai toksisitas yang dimiliki, sehingga dapat meningkatkan

potensi senyawa sebagai antikanker (Adawiyah, 2017). Penelitian yang telah dilakukan oleh Handayani dkk., (2013) menunjukkan bahwa senyawa divanililaseton yang merupakan modifikasi struktur vanilin memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 10,26 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan vanilin hasil isolasi memiliki aktivitas antikanker yang rendah dengan nilai IC_{50} sebesar 1.360,17 $\mu\text{g/mL}$.

Reaksi yang terjadi antara vanillin dan *p*-anisidin adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Reaksi pembentukan senyawa senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol

Gugus fenolat pada posisi para seperti pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada Gambar 2.1 dapat memberikan aktivitas antikanker yang besar. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Mohamed dkk., (2013) menunjukkan bahwa senyawa 4-[(3-etoksi-4-hidroksi-benzilidena)-amino]-benzensulfonamida dengan nilai IC_{50} kanker payudara dan kanker paru-paru sebesar 96 μM dan 130 μM yang memiliki gugus fenolat pada posisi para. Sedangkan senyawa 4-[(2-hidroksifenil)metilidena]amino}benzensulfonamida yang memiliki gugus fenolat pada posisi orto memiliki nilai IC_{50} sebesar 101 pada sel kanker payudara dan tidak memiliki nilai IC_{50} pada sel kanker paru-paru. Hal ini menunjukkan bahwa gugus fenolat pada posisi para dapat meningkatkan aktivitas antikanker.

2.2 Sel Kanker T47D Sebagai Sel Uji Antikanker

Sel kanker payudara yang digunakan dalam penelitian ini adalah T47D. T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor *duktal* payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena penanganannya yang mudah, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi, serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. *Cell line* adalah sel yang disubkultur dari *primary cultures*, yaitu sel dari organ atau jaringan yang dikultur dalam kondisi hormonal yang sesuai (Abcam, 2007).

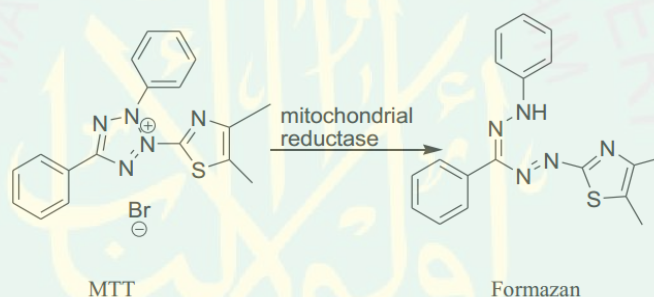
Sel kanker payudara T47D merupakan protein p53 yang termutasi (Schafer dkk., 2000). Media yang digunakan pada sel T47D adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum. Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum mengandung hormon pertumbuhan sel, albumin merupakan protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral merupakan kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media RPMI tersebut berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Amalina, 2008).

2.3 Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro* dengan Metode MTT

Metode uji sitotoksik yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT (*Methylthiazol Tetrazolium*). Prinsip dari MTT adalah mengukur aktivitas berdasarkan kemampuan enzim mitokondria reduktase dalam mereduksi garam MTT yang berwarna kuning membentuk kristal formazan berwarna biru.

Konsentrasi formazan yang berwarna biru dapat ditentukan secara spektrofotometri visible dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosman, 1983).

Metode uji MTT memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif, akurat, digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah besar dan hasilnya bisa untuk memprediksi sifat sitotoksik suatu bahan. Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel (Basmal, 2009). Reaksi MTT dapat ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Meiyanto, 1999)

Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna biru semakin besar, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Mosman, 1983). Absorbansi larutan berwarna ini kemudian diukur dengan menggunakan Elisa *reader* pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm, yang mana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup (Meiyanto, dkk., 1999).

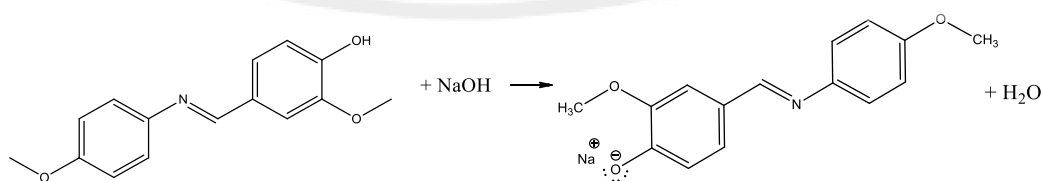
Uji MTT digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang menghasilkan penghambatan poliferasi sel sebesar

50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut tidak toksik. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi % sel yang mampu bertahan hidup (Abcam, 2007). Menurut US National Cancer Institut saat nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil yang sangat toksik, nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan cukup toksik atau cukup aktif. Saat nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan ketoksikan yang lemah, dan saat $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil yang tidak toksik.

2.4 Karakterisasi Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol

2.4.1 Uji Kimia dengan Larutan NaOH

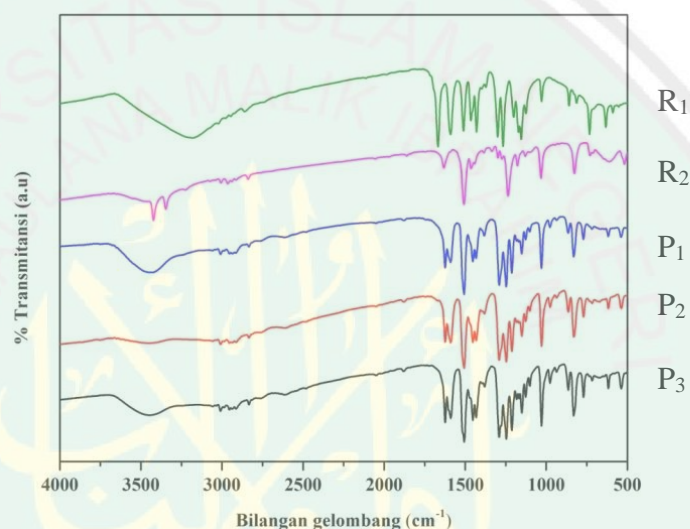
Uji kimia senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dilakukan berdasarkan prinsip reaksi asam basa Bronsted-Lowry yaitu reaksi yang melibatkan transfer proton. Pada uji kimia yang telah dilakukan oleh Robi'atul (2017), menunjukkan ketika produk sintesis dilarutkan dalam air, warna larutan berubah menjadi kekuningan dan terdapat endapan yang menunjukkan bahwa sedikit larut dalam air. Namun, saat ditambahkan dengan NaOH 2M menyebabkan endapan larut sempurna dan warna larutan menjadi kuning.



Gambar 2.3 Reaksi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan penambahan NaOH

2.4.2 Karakterisasi Produk Sintesis Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Karakterisasi FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat di dalam senyawa hasil sintesis. Menurut Ummathur (2009), serapan khas dari senyawa basa Schiff adalah adanya gugus C=N pada daerah $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ dengan karakteristik serapan yang kuat. Pada karakterisasi awal yang dilakukan oleh Adawiyah (2017) didapatkan spectra FTIR pada Gambar 2.1 dan gugus fungsi dari produk sintesis sesuai tabel 2.1.



Gambar 2.4 Hasil spektra FTIR dari produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dan reaktan (Adawiyah, 2017)

Berdasarkan spektra FTIR pada Gambar 2.4, menunjukkan bahwa produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol memiliki serapan yang tajam dan kuat dari gugus fungsi imina (C=N) pada panjang gelombang 1590 cm^{-1} .

Tabel 2.1 Gugus fungsi dari spektra FTIR ketiga produk sintesis

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		
	P1	P2	P3
-OH <i>stretch</i>	3441	3447	3451
C _{sp2} -H <i>stretch</i> aromatic	3009	3009	3009
C _{sp3} -H <i>stretch</i> alifatik	2950	2950	2950
Overtone aromatic	2051-1878	2050-1878	2050-1880
C=C aromatic	1623 dan 1507	1623 dan 1507	1623 dan 1506
-C=N- <i>stretch</i>	1590	1590	1590
Ph-O-C asimetrik	1247	1247	1246
C-O <i>stretch</i> fenol	1212	1212	1212
Ph-O-C simetrik	1029	1029	1029
-CH ₂ <i>bend</i> aromatic	831	830	831

Keterangan:

P1 :produk variasi waktu penggerusan 10 menit

P2 :produk variasi waktu penggerusan 15 menit

P3 :produk variasi waktu penggerusan 20 menit

Serapan gugus -OH *stretch* berada pada daerah 3441-3451 cm⁻¹ dengan serapan yang melebar, dan didukung dengan adanya serapan kuat dan tajam dari gugus C-O *stretch* fenol pada daerah 1212-1213 cm⁻¹. Gugus C_{sp2}-H *stretch* aromatik dengan serapan yang lemah berada pada bilangan gelombang 3009 cm⁻¹ yang didukung dengan adanya serapan lemah *overtone* aromatic pada daerah 2051-1878 cm⁻¹ dan serapan kuat gugus fungsi C=C aromatik pada 1623 dan 1507 cm⁻¹. Adanya serapan kuat dan tajam dari gugus fungsi asimetris Ph-O-C *stretch* pada 1246-1247 cm⁻¹, serapan kuat dan tajam simetris Ph-O-C *stretch* pada daerah 1029 cm⁻¹, dan serapan lemah C_{sp3}-H *stretch* pada 2950 cm⁻¹ menunjukkan adanya substituen metoksi pada produk sintesis. Berdasarkan hasil analisis spektra FTIR yang diperoleh, diduga bahwa senyawa target telah terbentuk dalam ketiga produk sintesis.

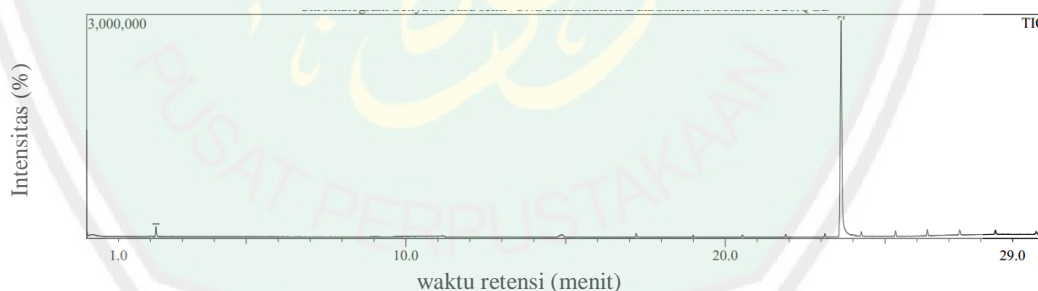
2.4.3 Karakterisasi Produk Sintesis Menggunakan KG-SM

Karakterisasi dengan menggunakan KG-SM sebenarnya merupakan kombinasi dari dua teknik analisis yang berbeda, yaitu kromatografi gas dan spektrometri massa. Kromatografi gas digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan volatilitas yang berbeda dengan fase gerak berupa gas dan fase diam di dalam kolom. Spektra senyawa dikumpulkan oleh spektrometer massa saat keluar dari kolom dan kemudian diidentifikasi berdasarkan massa fragmen (m/z).

Kadar dari suatu senyawa pada sampel dapat diketahui dengan membandingkan luas senyawa dengan luas sampel, kadar senyawa dalam bentuk presentase dengan persamaan 2.1 (Gandjar dan Rohman, 2012).

$$\text{Persen (\%)} \text{ Komponen} = \frac{\text{luas komponen}}{\text{jumlah luas semua sampel}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.1)$$

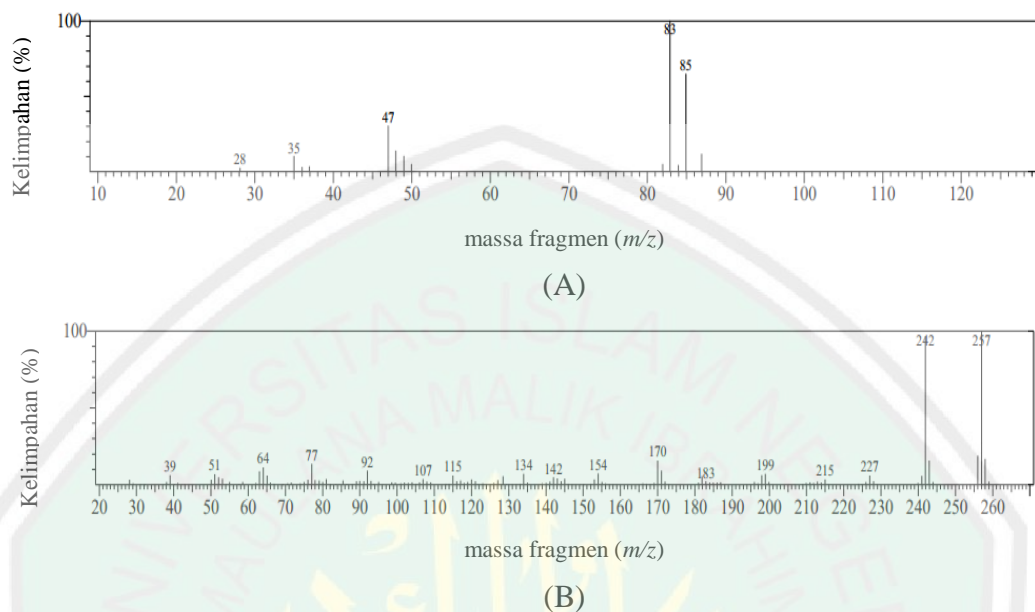
Karakterisasi awal yang dilakukan oleh Adawiyah (2017) didapatkan hasil kromatogram pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Kromatogram produk sintesis

Gambar 2.5 menunjukkan bahwa produk yang dihasilkan muncul puncak pada waktu retensi 2,174 menit dengan % luas area sebesar 2,34, dilanjutkan dengan puncak ke 2 dengan waktu retensi 23,624 menit dengan % luas area

sebesar 97,66. Gambar 2.6 menunjukkan hasil dari spektrometer massa yang dilakukan oleh Adawiyah (2017).



Gambar 2.6 Spektra Massa (A) puncak 1 (B) puncak 2

Hasil spektrometer massa yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017) pada puncak 1 pada Gambar 2.6 (A) menunjukkan ion molekular dengan m/z 118 yang merupakan pelarut kloroform. Sedangkan pada puncak 2 pada Gambar 2.6 (B) menunjukkan bahwa nilai m/z 257 dengan kelimpahan 100% yang merupakan berat molekul dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – April 2019 di Laboratorium Kimia Analitik Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Uji aktivitas antikanker dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, bola hisap, neraca analitik, spektrofotometer FTIR VARIAN tipe FT 1000, spektrometer KG-SM. Uji aktivitas antikanker payudara T47D menggunakan vortex merek Barnsted Thermolyne, pipet ukur 5 mL, mikropipet 200 μ L, 1000 μ L, *Conical Tube* Lokal, *Blue tip* Lokal, cawan petri lokal, inkubator, mikroskop *inverted*, *Hemocytometer*, dan *ELISA reader*.

3.2.2 Bahan

Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol yang telah disimpan \pm 1 tahun (Sampel A), vanilin, *p*-anisidin, NaOH 2M, akuades, kloroform. Serta untuk uji antikanker adalah PBS (*Phosphate Buffered Saline*), tripsin-EDTA, media kultur RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), DMSO

(Dimethyl Sulfoxide), MTT (*Methylthiazol Tetrazolium*) 5 mg/mL (50 mg MTT dan 10 mL PBS), SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 10%, HCl 0,1 M.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut.

1. Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan uji kimia.
2. Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan menggunakan FTIR.
3. Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan menggunakan KG-SM.
4. Uji antikanker dengan metode MTT.
5. Analisis data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan Uji Kimia

Uji kimia produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol diujikan dalam pelarut air. Sebanyak 0,01 gram produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL akuades. Campuran dikocok dengan jarak pengocokan sepanjang 10 cm. jika produk sintesis tersebut tidak larut sempurna, ditambahkan NaOH 2M tetes per tetes ($\pm 20 \mu\text{L}$) dan diamati perubahan yang terjadi.

3.4.2 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Identifikasi gugus fungsi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR VARIAN tipe FT 1000. Produk sintesis senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dicampur dengan KBr lalu digerus dalam mortar agate. Selanjutnya campuran ditekan dan dibentuk pelet, lalu pelet diletakkan pada *cell holder* dalam instrumen FTIR dan dibuat spektrum FTIR pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

3.4.3 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan KG-SM

Sebanyak 1 μL senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol yang telah dilarutkan dalam kloroform dengan konsentrasi 70.000 ppm diinjeksikan dengan menggunakan *syringe* ke dalam injector KG-SM VARIAN CP-3800 SATURN 2200 dengan kondisi operasional sebagai berikut:

Jenis kolom	: AGILENT J&W VF-5MS
Panjang kolom	: 30 meter
Detektor	: CP 3800 (GC) Saturn 2200 (MS)
Oven	: Terprogram 100°C (10 menit) → 330°C (20 menit)
Temperatur injector	: 350°C
Tekanan gas	: 16,5 kPa
Kecepatan aliran gas	: 1 mL/menit
Gas pembawa	: Helium

3.4.4 Uji Antikanker dengan Metode MTT

3.4.4.1 Penyiapan Sel

Sel kanker payudara T47D diambil dari koleksi Universitas Gajah Mada (UGM) di inkubator CO₂. Sel kanker diambil dari *frozen stock* pada suhu -80°C, kemudian dihangatkan pada suhu 37°C selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media RPMI. Setelah itu disentrifugasi dengan 2000 rpm untuk memisahkan sel kanker (pelet) dengan media RPMI. Kemudian pelet dipindahkan ke *culture dish* dan ditambahkan 4 mL medium komplet, diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 3-4 jam pada suhu 37°C/5% CO₂. Sel diamati kondisinya untuk melihat sel yang melekat di dasar *culture dish*, pelet yang terbentuk diamati di bawah mikroskop dan jika jumlah sel di dalam *culture dish* mencapai 70-80% (konfluen) dilakukan panen sel.

Tahap-tahap yang dilakukan ketika panen sel yaitu pembuangan media kultur, kemudian dicuci sel dengan PBS untuk mencuci sel-sel yang mati, kemudian ditambahkan tripsin-EDTA secara merata sebanyak $\pm 300-500 \mu\text{L}$ untuk melepaskan sel dari *culture dish* dan melepaskan ikatan antar sel, kemudian diaduk perlahan, diinkubasi selama 3 menit pada suhu 37°C/5% CO₂. Apabila sel masih menempel pada *culture dish*, waktu inkubasi ditambahkan sampai total waktunya maksimal 10 menit. Kemudian sel ditambahkan media RPMI 5 mL untuk mengaktifkan sel kemudian dilakukan resuspensi. Sel kemudian diamati di bawah mikroskop *inverted*, kemudian sebanyak 10 μL sel dimasukkan ke dalam *hemocytometer* yang digunakan untuk perhitungan sel dan sisanya diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

3.4.4.2 Perhitungan Sel Kanker

Panen sel diambil 10 μL dan dipindahkan ke *hemacytometer*. Diamati sel tersebut dan dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel kanker dapat diketahui dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\Sigma \text{ sel} = \frac{\Sigma \text{sel kamar A} + \Sigma \text{sel kamar B} + \Sigma \text{sel kamar C} + \Sigma \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4 \quad (3.1)$$

3.4.4.3 Peletakan Sel Pada *Plate 96-well*

Peletakan sel pada *plate 96-well* harus diketahui berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran (persamaan 3.1). Selanjutnya sel diletakkan dan ditambahkan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam sumuran dengan total volume 10 mL dan diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO_2 . Cara menghitung sel yang diletakkan di dalam sumuran menggunakan rumus (3.2).

$$\Sigma \text{mL panen sel yang ditransfer} = \frac{\Sigma \text{well} \times \Sigma \text{sel yang digunakan}}{\Sigma \text{sel terhitung/mL}} \quad (3.2)$$

3.4.4.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plate 96-well*

Sel dari inkubator diambil dan dibuang media sel. Kemudian dicuci dengan 100 μL *buffer* PBS. Selanjutnya dibuat larutan sampel. Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol, vanillin, dan *p*-anisidin masing-masing sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 μL DMSO dan divortex. Selanjutnya larutan sampel sebanyak 10 μL dimasukkan dalam sumuran dan

dibuat variasi konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm dan diulang 3 kali (triplo). Selanjutnya *plate 96-well* diinkubasi kembali selama 24 jam.

3.4.4.5 Pemberian Larutan MTT

Media sel dalam cawan petri dibuang dan dicuci dengan *buffer* PBS. Sebanyak 500 μL MTT ditambahkan media komplit sampai volume mencapai 5 mL. Selanjutnya 100 μL larutan MTT ditambahkan ke setiap sumuran kecuali kontrol sel dan diinkubasi selama 3-4 jam (sampai terbentuk formazan). Kemudian kondisi sel diamati dengan mikroskop *inverted*. Selanjutnya ditambahkan SDS 10% dalam HCl 0,1 N sebanyak 100 μL untuk melarutkan kristal formazan. Selanjutnya *plate 96-well* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu 37°C / 5% CO_2 selama 24 jam.

Selanjutnya dibaca absorbansi sel menggunakan ELISA *reader* untuk mengetahui IC_{50} setiap sampel. Sampel dimasukkan ke ELISA *reader*, dan dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 595 nm. Kemudian dihitung prosentase sel hidup dengan persamaan sebagai berikut.

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\% \quad (3.3)$$

3.4.5 Analisis Data

Analisis hasil uji kimia, hasil FTIR, dan hasil KG-SM dibandingkan dengan hasil yang didapatkan saat sintesis awal senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol oleh Adawiyah (2017). Apabila hasil yang

didapatkan sama atau sesuai dengan saat karakterisasi awal, maka dilanjutkan dengan uji aktivitas antikanker, dan apabila hasil karakterisasi menunjukkan kerusakan yang signifikan pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol, maka dilakukan sintesis ulang senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol. Hasil yang didapatkan pada karakterisasi awal oleh Adawiyah (2017) adalah sebagai berikut.

1. Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol larut sempurna pada saat ditambahkan NaOH. Apabila senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol tidak larut sempurna saat ditambahkan NaOH, maka menunjukkan bahwa gugus OH pada senyawa tersebut telah hilang, dan untuk memperkuat hipotesis awal mengenai kestabilan gugus fungsi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol, dilakukan identifikasi dengan menggunakan FTIR.
2. Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada karakterisasi FTIR menunjukkan serapan yang khas pada bilangan gelombang 1500-1650 cm^{-1} yaitu gugus C=N. Sedangkan karakterisasi dengan menggunakan KG-SM menunjukkan bahwa senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol memiliki ion molekular pada m/z 257.

Data yang dianalisis pada uji antikanker metode MTT adalah data absorbansi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol terhadap sel T47D. Kemudian, dibuat kurva regresi dengan sumbu x adalah konsentrasi dan sumbu y adalah % sel hidup. Sehingga didapatkan rumus $y=ax+b$, dan untuk mendapatkan nilai IC_{50} (x) adalah dengan mengubah nilai y dari rumus tersebut menjadi 50.

$$y = ax + b$$

$$\frac{50 - b}{a} = x \text{ (IC}_{50}\text{)}$$

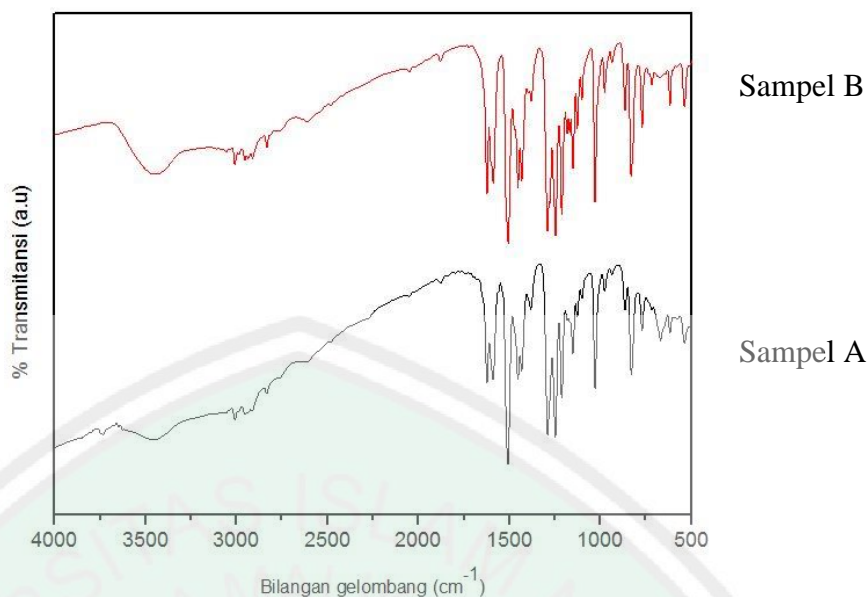
(3.4)



Senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol merupakan senyawa fenolat yang memiliki sifat asam dan dapat melepaskan ion H^+ dari gugus hidroksil yang dimiliki. Ion OH^- pada NaOH menyerang ion H^+ pada gugus fenolat senyawa basa Schiff dan membentuk H_2O . Sedangkan ion Na^+ akan menggantikan ion H^+ yang lepas pada senyawa basa Schiff membentuk garam natrium yang dapat larut dalam air.

4.1.2 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Karakterisasi sampel A (senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol yang telah disimpan ± 1 tahun) dengan menggunakan spektrofotometer FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa tersebut. Analisis spektra yang telah didapatkan dibandingkan dengan analisis sebelumnya yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017). Hal ini bertujuan untuk mengetahui bahwa sampel A masih stabil dan tidak rusak karena penyimpanan. Beberapa gugus fungsi yang terdapat pada sampel A adalah $-OH$ (hidroksil), $C_{sp^2}-H$, $C_{sp^3}-H$, $C=C$ aromatik, $-C=N-$ stretch, $Ph-O-C$, $C-O$ stretch fenol, dan $-CH_2$ bend aromatic. Perbandingan hasil spektra FTIR yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017) dan hasil dari karakterisasi ulang ditunjukkan oleh Gambar 4.2. Sedangkan analisis gugus fungsi beserta bilangan gelombang pada sampel A ditunjukkan oleh Tabel 4.1.



Gambar 4.2. Hasil Spektra FTIR senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol setelah disimpan selama ± 1 tahun (A) dan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol hasil sintesis awal (2017) (B)

Tabel 4.1 Hasil Identifikasi FTIR senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	
	Sampel A	Sampel B
-OH <i>stretch</i>	3449	3451
$\text{C}_{\text{sp}2}\text{-H}$ <i>stretch</i> aromatic	3009	3009
$\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H}$ <i>stretch</i> alifatik	2954	2950
Overtone aromatic	2050-1879	2050-1880
$\text{C}=\text{C}$ aromatic	1623 dan 1508	1623 dan 1506
-C=N- <i>stretch</i>	1590	1590
Ph-O-C asimetrik	1247	1246
C-O <i>stretch</i> fenol	1212	1212
Ph-O-C simetrik	1028	1029
-CH ₂ <i>bend</i> aromatic	829	831

Keterangan:

Sampel A = Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol setelah disimpan ± 1 tahun

Sampel B = Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol hasil sintesis awal (2017)

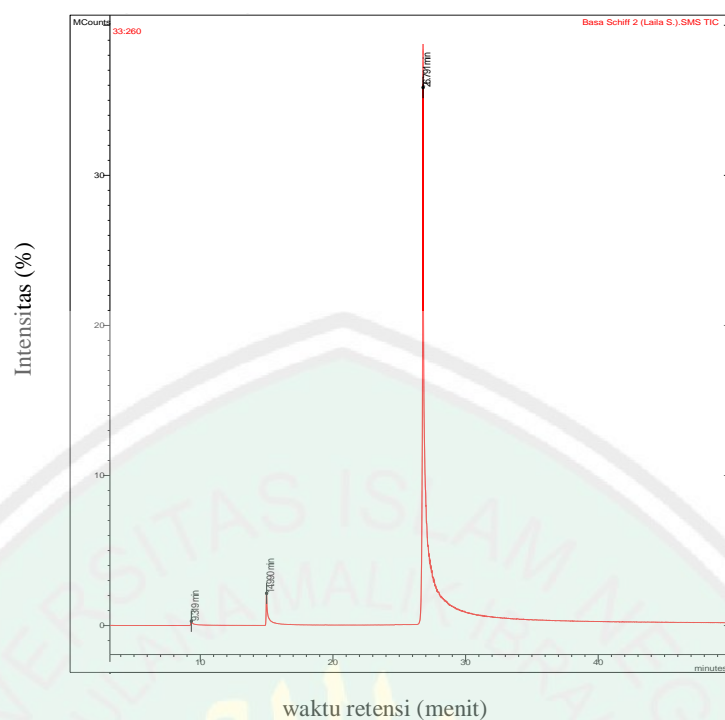
Hasil karakterisasi sampel A pada spektrofotometer FTIR menunjukkan bahwa nilai bilangan gelombang yang didapatkan terdapat sedikit perbedaan dengan sampel B. Perbedaan spektra sampel B dengan sampel A terlihat pada

intensitas melebar yang khas pada gugus $-OH$ pada daerah $3400-3450\text{ cm}^{-1}$. Namun, perbedaan yang diperoleh dari masing-masing gugus fungsi tidak terlalu signifikan dan hanya terdapat sedikit selisih bilangan gelombang dengan sampel B. Hal ini menunjukkan bahwa sampel A secara struktur senyawa tidak berubah dan senyawa tidak mengalami kerusakan saat penyimpanan.

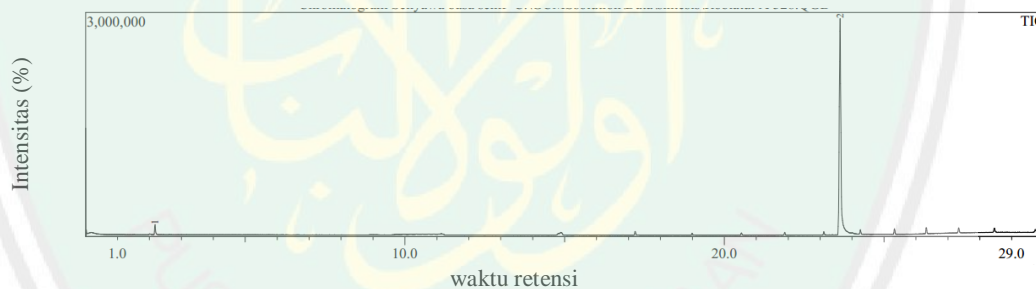
4.1.3 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan KG-SM

Karakterisasi dengan menggunakan KG-SM digunakan untuk mengetahui adanya senyawa yang terdapat dalam sampel A dan untuk mengetahui berat molekul senyawa berdasarkan dari nilai m/z dari ion molekular senyawa tersebut. Hasil analisis dari KG-SM dibandingkan dengan hasil analisis sebelumnya yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017). Hal ini bertujuan untuk mengetahui bahwa sampel A masih stabil dan tidak rusak karena penyimpanan.

Hasil karakterisasi menggunakan KG-SM menghasilkan 3 puncak pada hasil kromatogram seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 pada sampel A. Puncak pertama muncul pada waktu retensi 9,319 menit dengan kadar 0,86%. Sedangkan puncak kedua muncul pada waktu retensi 14,990 menit dengan kadar 4,87%. Puncak ketiga muncul pada waktu retensi 26,791 menit dengan kadar 94,267%. Hal ini menunjukkan bahwa puncak ketiga memiliki kadar yang paling dominan dibandingkan tiga puncak yang didapatkan.



Sampel A



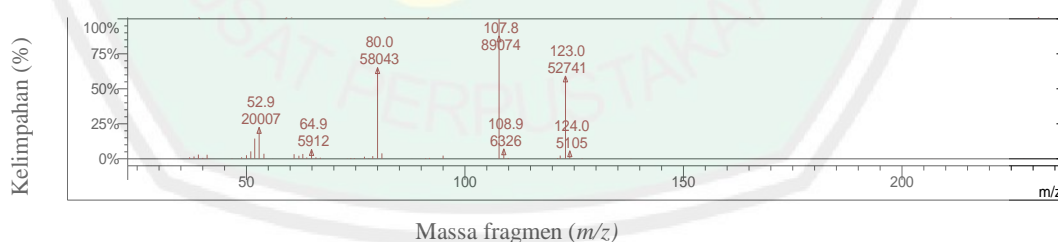
Sampel B

Gambar 4.3 Spektra Hasil Kromatogram sampel A: Senyawa basa Schiff setelah disimpan ± 1 tahun. Sampel B: Karakterisasi Awal yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017)

Berdasarkan hasil kromatogram karakterisasi ulang yang telah didapatkan pada Gambar 4.3 pada sampel A, hasil tersebut memiliki perbedaan dengan hasil kromatogram sampel B. Perbedaan kromatogram terletak pada jumlah kromatogram yang didapatkan yaitu 3 puncak pada sampel A, dan 2 puncak pada sampel B dengan waktu retensi yang berbeda pula. Hal tersebut dapat disebabkan

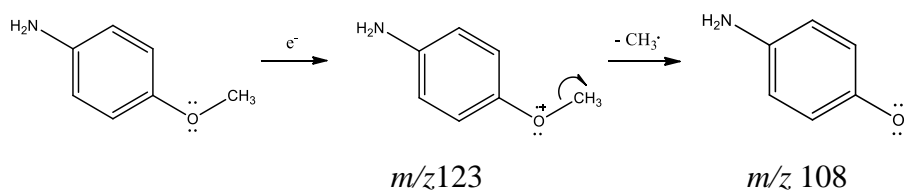
oleh perbedaan alat yang digunakan, pada sampel A menggunakan KG-SM VARIAN CP-3800 SATURN 2200. Sedangkan sampel B menggunakan KG-SM QP-2010S/Shimadzu. Selain itu, pada sampel A, puncak dari pelarut kloroform tidak diikuti sertakan, atau dihilangkan sehingga puncak-puncak kecil yang muncul dapat terbaca. Sedangkan pada sampel B pelarut kloroform diikuti sertakan dalam hasil akhir, sehingga puncak-puncak kecil yang dihasilkan tidak terbaca waktu retensi serta luas areanya.

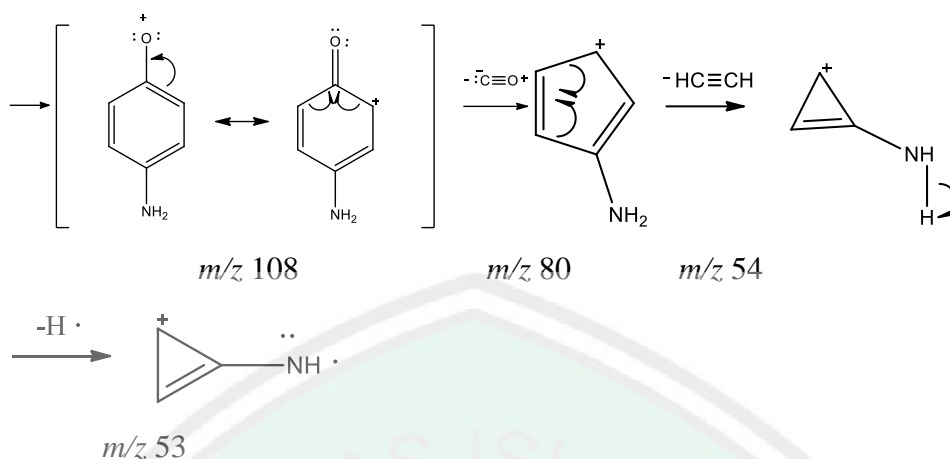
Kadar sampel B adalah mencapai 97,66%, sedangkan hasil karakterisasi sampel A mengalami penurunan menjadi 94,267%. Penurunan hasil produk dengan disertai munculnya puncak lain yang merupakan reaktan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3 pada sampel A dapat disebabkan karena adanya peristiwa reaksi balik pada hasil produk sintesis. Reaksi balik dapat terjadi karena adanya hidrolisis pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol yang dapat disebabkan karena penyimpanan dengan kurun waktu yang lama disertai dengan kelembaban udara yang cukup tinggi.



Gambar 4.4 Spektra Massa Puncak 1 Sampel A

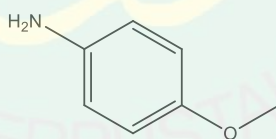
Berikut ini pola fragmentasi dari puncak 1 dari sampel A:





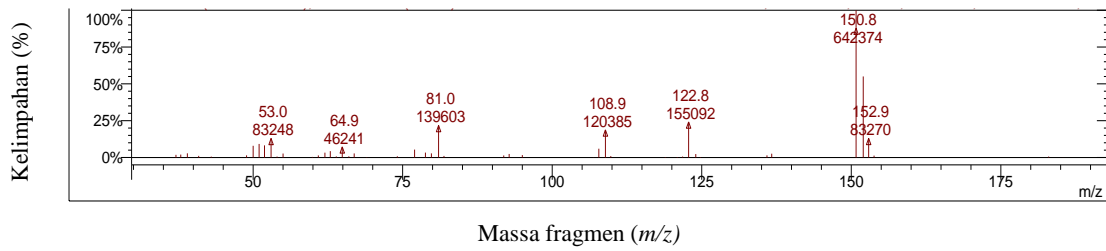
Gambar 4.5 Pola fragmentasi puncak 1 Sampel A

Hasil analisis spektra massa puncak 1 sampel A terlihat pada Gambar 4.4. Spektra massa puncak 1 mempunyai ion molekuler dengan m/z 123 yang nilainya sama dengan berat molekul *p*-anisidin, sehingga puncak 1 diduga merupakan senyawa *p*-anisidin. *p*-anisidin (C_7H_9NO) merupakan reaktan dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol. Struktur dari senyawa *p*-anisidin ditunjukkan pada Gambar 4.6. Sedangkan pola fragmentasi puncak 1 ditunjukkan pada Gambar 4.5.



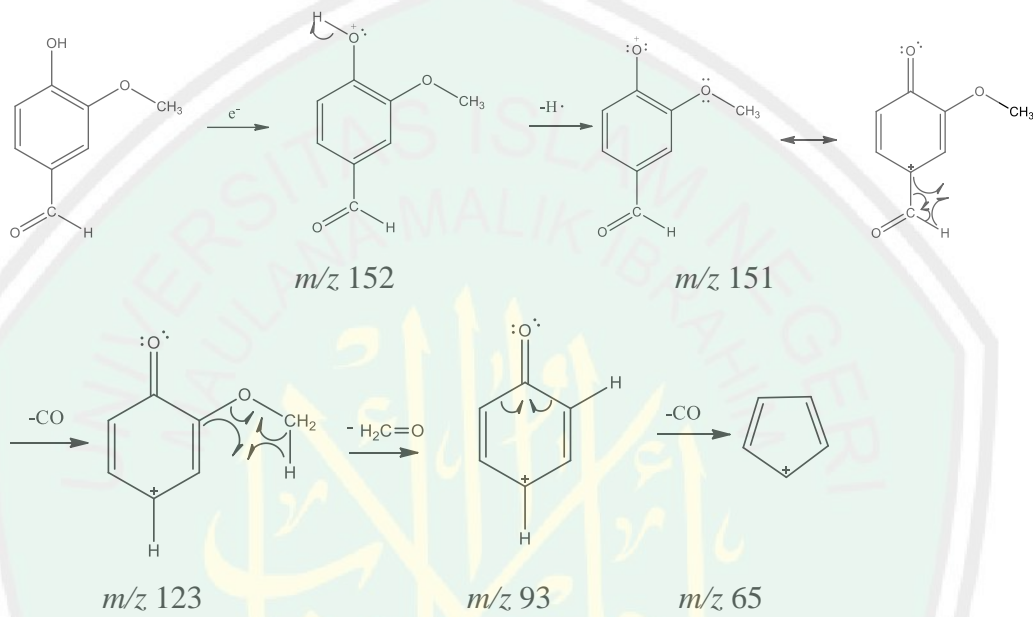
Gambar 4.6 Struktur senyawa *p*-anisidin

Hasil analisis puncak 2 dengan spektrometer massa ditunjukkan pada Gambar 4.7.

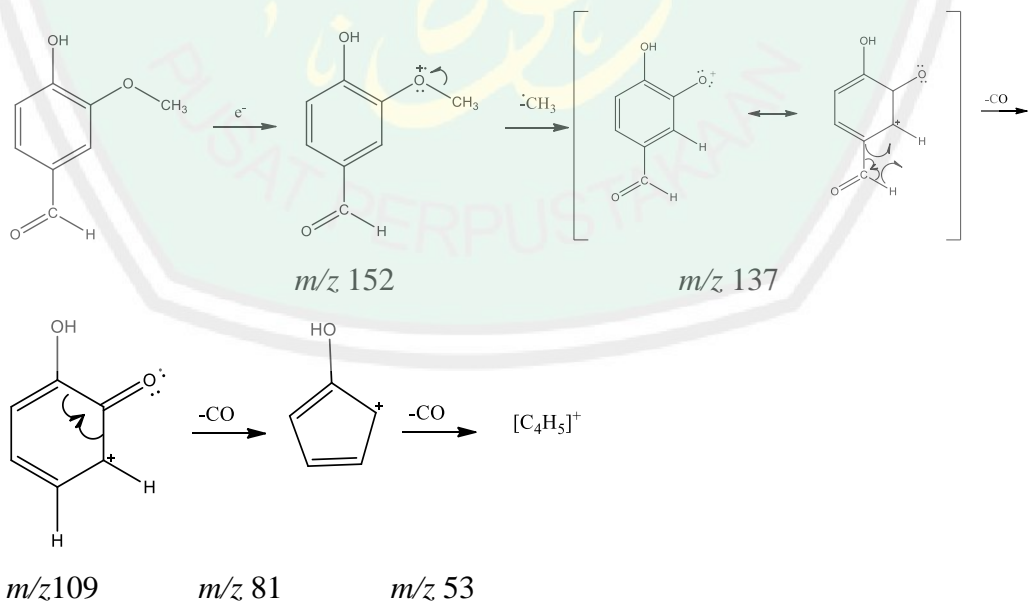


Gambar 4.7 Spektra Massa puncak 2 Sampel A

Berikut ini adalah pola fragmentasi dari puncak 2 dari sampel A:

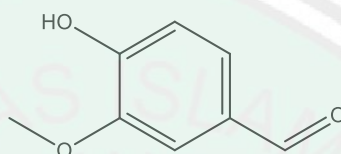


Pola fragmentasi lain:



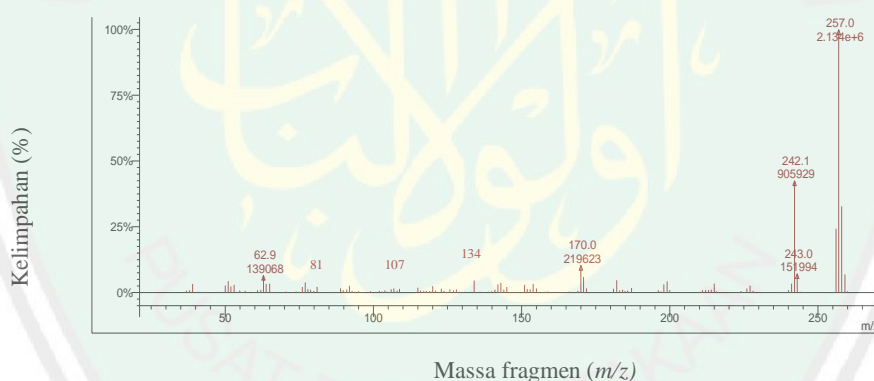
Gambar 4.8 Pola fragmentasi puncak 2 Sampel A

Spektra massa puncak 2 mempunyai ion molekuler m/z 152 yang nilainya sama dengan berat molekul vanillin, sehingga puncak 2 diduga merupakan senyawa vanillin yang merupakan reaktan dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol. Pola fragmentasi ditunjukkan pada Gambar 4.8. Struktur dari senyawa vanillin ($C_8H_8O_3$) ditunjukkan oleh Gambar 4.9.



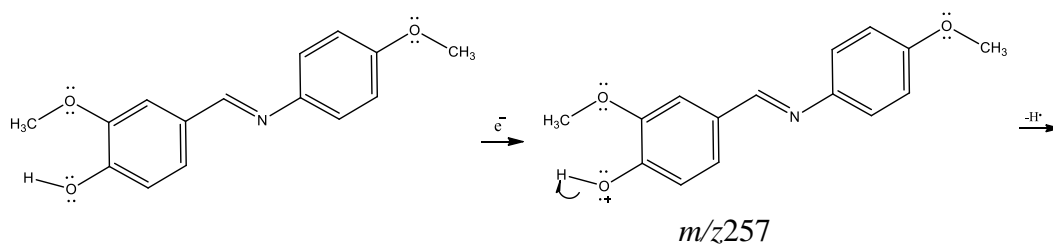
Gambar 4.9 Struktur senyawa vanillin

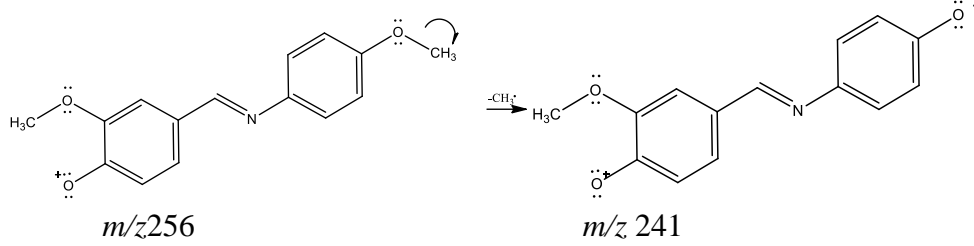
Hasil spektra kromatogram pada puncak 3 ditunjukkan oleh Gambar 4.10. dan pola fragmentasinya ditunjukkan pada Gambar 4.11.



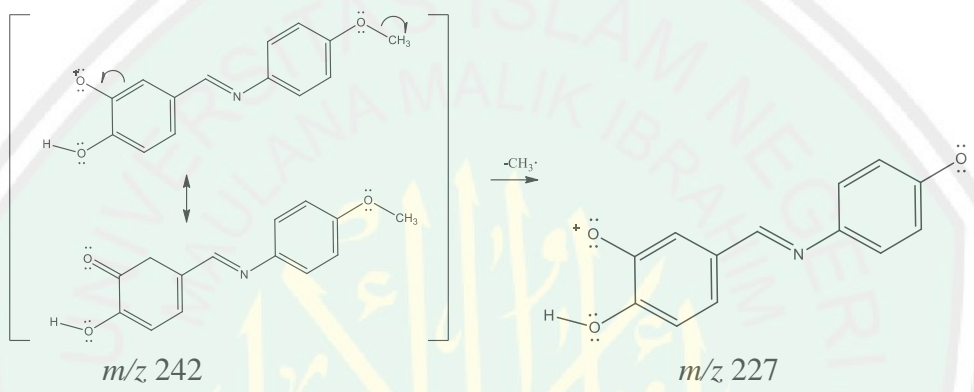
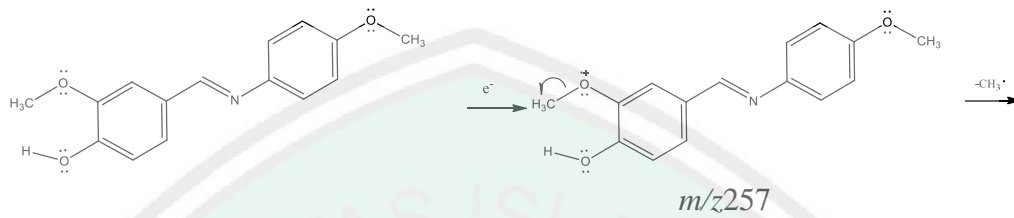
Gambar 4.10 Spektra Massa Puncak 3 Sampel A

Berikut pola fragmentasi pada hasil spektra massa puncak 3 sampel A:

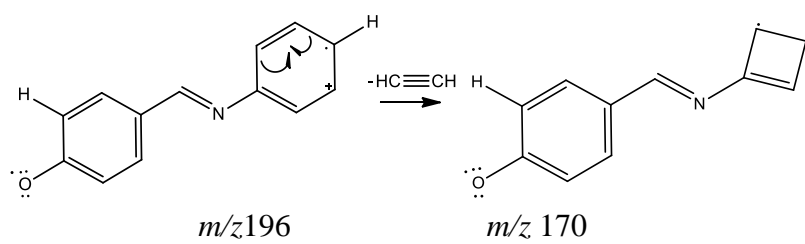
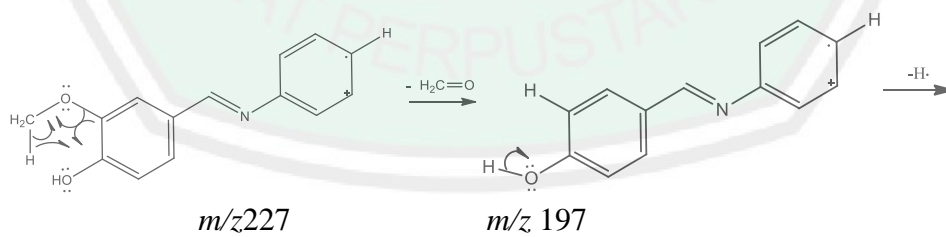
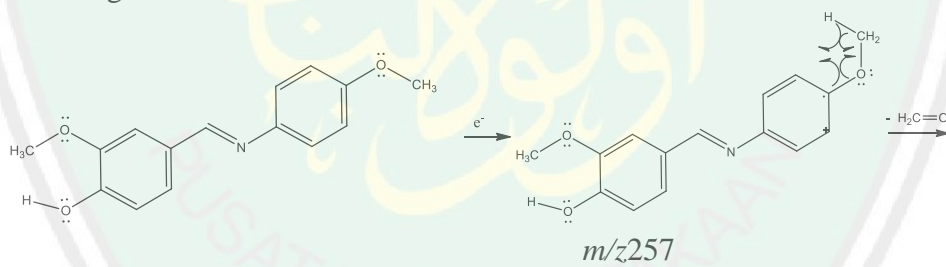




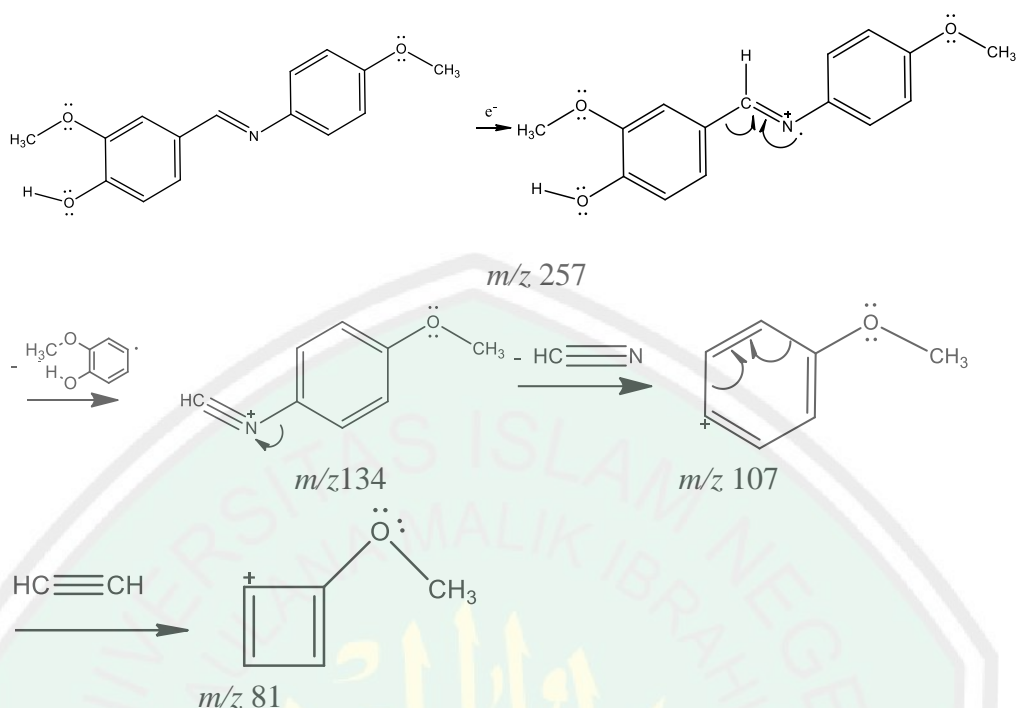
Pola fragmentasi lain



Pola fragmentasi lain:



Pola fragmentasi lain:



Gambar 4.11 Pola fragmentasi puncak 3 Sampel A

Spektra massa puncak 3 pada Gambar 4.10 menunjukkan bahwa nilai m/z 257 dengan kelimpahan 100% merupakan ion molekuler serta *base peak*. Nilai ion molekuler m/z 257 sesuai dengan berat molekul dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol. Sedangkan puncak dengan kelimpahan kedua terbesar adalah ion molekuler m/z 242 dengan kelimpahan $\pm 40\%$. Berdasarkan hasil dari spektra massa karakterisasi ulang yang telah diperoleh, menunjukkan bahwa senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol tidak memiliki perbedaan dengan hasil spektra massa yang telah dilakukan oleh Adawiyah (2017). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa basa Schiff stabil berdasarkan strukturnya atau secara kualitatif.

4.2 Uji Aktivitas Antikanker Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol

Pengujian aktivitas antikanker dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada sampel A dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara. Pengujian dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT. Konsentrasi sampel yang digunakan adalah 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63 ppm.

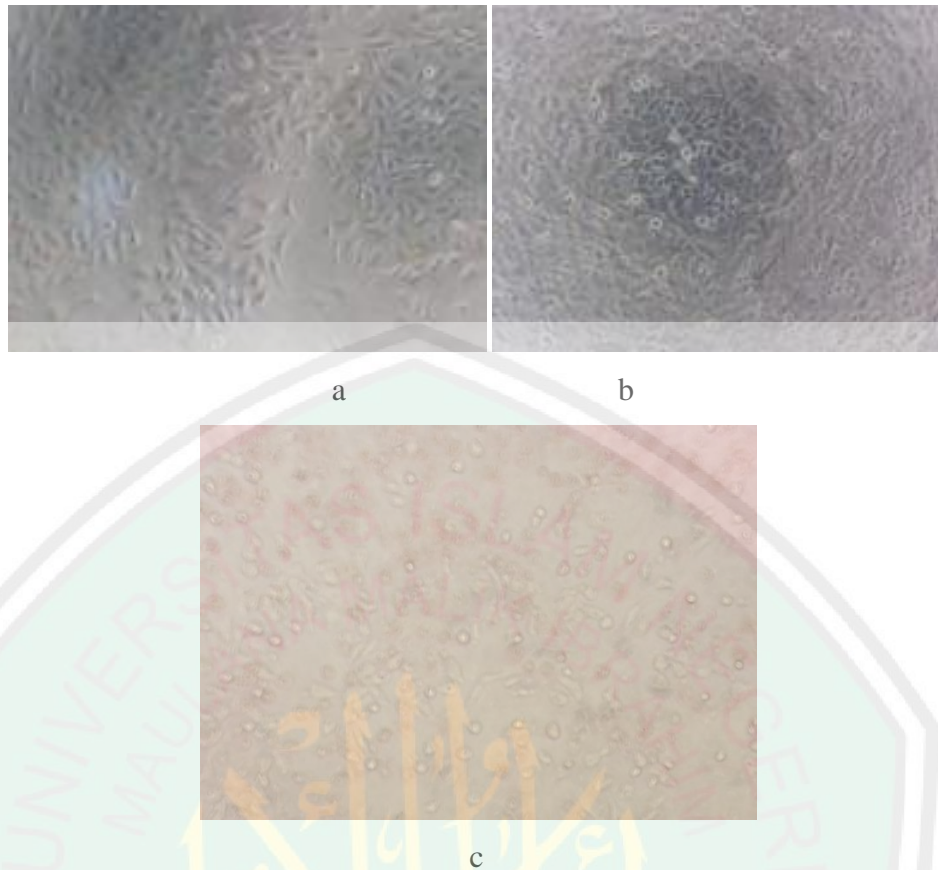
Tahapan uji aktivitas antikanker dengan metode MTT adalah 1) penyiapan sel kanker T47D, 2) perhitungan sel kanker T47D, 3) peletakan sel pada *plate 96-well*, 4) pembuatan larutan sampel dan pemberian larutan sampel pada *plate 96-well*, 5) pemberian larutan MTT. Penyiapan sel dilakukan untuk menghidupkan kembali sel yang ditidurkan (inaktif sel) hingga mencapai konfluen. Konfluensi sel adalah tumbuh meratanya sel didalam *culture dish* mencapai 70-80%. Proses pengambilan sel yang telah konfluen disebut panen sel. Panen sel dilakukan dengan menambahkan tripsin-EDTA yang berfungsi untuk melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel itu sendiri (CCRC, 2009). Tripsin merupakan enzim protease yang dapat melepaskan interaksi antara glikoprotein dan proteoglikan dengan dasar wadah kultur, akibatnya sel akan kehilangan kemampuannya untuk melekat pada dasar wadah dan mengapung di permukaan (Doyle dan Griffith, 2000). Pelepasan ikatan antar sel dilakukan karena sel yang telah ditumbuhkan memiliki sifat adesif yaitu mampu melekat pada substrat (A'illah,2015).

Perhitungan sel kanker T47D dengan menggunakan *hemocytometer* dan pengamatan dibawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui jumlah sel yang didapatkan saat panen sel. Syarat penghitungan sel dengan metode hemositometri

adalah sel harus berdiri sendiri-sendiri tidak menggerombol (CCRC, 2009). Jumlah sel yang didapatkan adalah 50×10^4 /mL. Tahap peletakan sel pada *plate* 96-*well* dilakukan sebagai sub-kultur sel pada masing-masing sumuran pada *plate* 96-*well*. Media komplet yang digunakan mengandung FBS 10%, penstrep 1-2%, Amphotericin B 0,5%, dan RPMI 100%, untuk menjaga pertumbuhan sel pada masing-masing sumuran yang selanjutnya digunakan untuk pengujian.

Tahap selanjutnya adalah preparasi sampel. Persyaratan sampel yang digunakan adalah dapat larut dalam media kultur dan kelarutannya tersebut dibantu dengan *cosolvent* seperti DMSO (CCRC, 2009). Dimetilsulfoksida (DMSO) adalah cairan tak berwarna yang memiliki rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar (Morshed, dkk., 2012). Sampel yang digunakan adalah senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol, serta reaktan vanillin dan p-anisidin, dimana semua sampel yang digunakan dapat larut dalam DMSO. Masing-masing sampel menggunakan seri konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 ppm. Kontrol positif yang digunakan adalah Doxorubicin dengan seri konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 ppm.

Pengamatan morfologi sel setelah ditambahkan sampel, menunjukkan bahwa terjadi perubahan pada saat telah ditambahkan sampel seperti yang ditunjukkan Gambar 4.12.



Gambar 4.12 (a) Morfologi sel sebelum penambahan sampel (b) Morfologi sel setelah penambahan sampel senyawa basa Schiff 1000 ppm (c) Morfologi sel setelah penambahan Doxorubicin 100 ppm

Berdasarkan Gambar 4.12 menunjukkan bahwa morfologi sel hidup sebelum penambahan sampel (a) berbentuk lonjong seperti jarum yang saling berimpit dengan sel lainnya dan terlihat menempel pada dasar wadah kultur. Sedangkan morfologi sel setelah penambahan sampel (b), terdapat sel mati yang berbentuk bulat, berwarna gelap, tersebar, dan mengapung. Hal yang sama juga pada morfologi sel saat ditambahkan doxorubicin 100 ppm (c).

Kemampuan sampel dalam menghambat pertumbuhan sel kanker T47D dapat ditentukan dengan penambahan reagen MTT (*Methylthiazol Tetrazolium*). Indikasi sel yang hidup akan mengabsorpsi reagen MTT dan akan terbentuk kristal formazan berwarna ungu. Pada sampel senyawa basa Schiff, vanillin, dan

p-anisidin menunjukkan warna ungu yang didapatkan dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah semakin besar intensitas warnanya. Sedangkan pada kontrol doxorubicin menghasilkan warna kuning sedikit keunguan. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel A, vanillin, dan p-anisidin masih terdapat banyak sel yang hidup. Hal ini dikarenakan reagen MTT hanya dapat bereaksi dengan sel hidup. Sedangkan pada kontrol doxorubicin menunjukkan lebih banyak sel yang mati ditandai dengan perubahan intensitas warna yang kecil.

Intensitas warna ungu yang didapatkan dihitung absorbansinya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} pada masing-masing sampel. Hasil nilai IC_{50} ditunjukkan oleh Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data nilai IC_{50} Uji Aktivitas Antikanker

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada Sampel A	353,038
Vanillin	845,134
p-Anisidin	176,642
Doxorubicin	0,627

Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada sampel A memiliki aktivitas yang lemah dalam menghambat sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} sebesar 353,038 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan vanillin memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan sampel A dengan IC_{50} sebesar 845,134 $\mu\text{g/mL}$, dan p-anisidin cukup aktif dalam menghambat sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 176,642 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan hasil dari kontrol positif Doxorubicin menunjukkan bahwa senyawa tersebut sangat aktif dalam menghambat sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 0,627

$\mu\text{g/mL}$. Hal ini berdasarkan US National Cancer Institut saat nilai $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil yang sangat toksik, nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan cukup toksik atau cukup aktif. Saat nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan ketoksikan yang lemah, dan saat $\text{IC}_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan hasil yang tidak toksik.

Senyawa basa Schiff secara umum merupakan biosintesis senyawa alkaloid (Plemenkov, 2001), dimana alkaloid dapat menghambat aktivitas sel kanker payudara T47D pada fase G_1 dengan meningkatkan p53 yang merupakan protein penghambat sel kanker (Asmuddin, 2004). Jika p53 sebagai supresor kanker meningkat maka inhibitor p21 juga meningkat. Peningkatan inhibitor tersebut akan menghambat sel kanker untuk masuk ke fase S. adanya peningkatan p53 dan p21 menyebabkan Cyclin D-CDK4 dan Cyclin D-CDK6 tidak terbentuk, sehingga kompleks Rb-E2F tidak terfosforilasi. Tidak adanya fosforilasi terhadap kompleks tersebut maka E2F non aktif sehingga gen tidak mampu mentranskripsikan DNA dan akan tetap berada pada fase G_1 . E2F merupakan faktor transkrip yang akan memicu terjadinya transkrip gen yang akan digunakan pada fase S. Sel yang berhenti akan masuk ke G_0 dan diperbaiki. Jika sel tidak dapat diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis (Murti dkk., 2007).

Pengaruh aktivitas antikanker dari senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol dapat dipengaruhi oleh gugus fenolat yang berada pada posisi para yang dapat memberikan aktivitas yang lebih besar. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Mohamed dkk., (2013) menunjukkan bahwa senyawa 4-[(3-etoksi-4-hidroksi-benzilidena)-amino]-bensensulfonamida yang juga merupakan senyawa basa schiff yang memiliki gugus fenolat pada posisi para

aktif dalam menghambat sel kanker payudara dengan nilai IC_{50} sebesar $96 \mu M$. Sedangkan senyawa 4-[(2-hidroksifenil)metilidena]amino}bensulfonamida yang memiliki gugus fenolat pada posisi orto memiliki nilai IC_{50} sebesar 101 pada sel kanker payudara.

Senyawa *p*-anisidin memiliki aktivitas yang cukup aktif dalam menghambat sel kanker payudara T47D dan lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol pada sampel A. Hal ini kemungkinan dapat dipengaruhi oleh adanya pesangan elektron bebas gugus amina primer (NH_2) yang dapat mudah membentuk ikatan hidrogen dengan sel kanker payudara T47D yang didukung oleh penelitian yang telah dilakukan Zhao dkk., (2018) bahwa senyawa 4-amino-2-hidroksi-dietilbenzenformaldehid-dehidroabietilamin yang mempunyai gugus dietil amino memiliki aktivitas yang lebih tinggi dengan $IC_{50} 11,23 \pm 0,35 \mu M$ dibandingkan dengan senyawa 3-tert-butil-2-hidroksi-benzenformaldehid-dehidroabietilamin yang tidak memiliki amina dengan $IC_{50} 20 \pm 2 \mu M$ terhadap sel Hela.

Aktivitas senyawa *p*-Anisidin dalam menghambat sel kanker payudara T47D tidak dapat digunakan dalam pengembangan agen kemopreventif lebih lanjut. Hal ini dikarenakan senyawa *p*-Anisidin justru dapat menyebabkan kanker bila masuk dalam tubuh (Merck Chemicals). Selain itu berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Yoshida dkk., (1989) bahwa senyawa *p*-anisidin merupakan senyawa yang nefrotoksik terhadap tikus fischer 344 jantan, artinya senyawa *p*-anisidin dapat menjadi penyebab kerusakan ginjal jika masuk ke dalam tubuh.

4.3 Aktivitas Antikanker Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksi-fenilimino)metil)fenol dalam Perspektif Islam

Pengujian aktivitas antikanker pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 353,038 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol mampu menghambat proliferasi sel sebanyak 50% pada konsentrasi 353,038 µg/mL. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang didapatkan, maka aktivitas antikanker semakin besar. Sebagaimana yang telah disebutkan dalam Al-Qur'an surat Al-Qomar ayat 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

“ Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.”

Menurut tafsir Ibnu Katsir, Dia (Allah) telah menentukan ukuran masing-masing makhluk-Nya dan memberi petunjuk kepada semua makhluk-Nya. Oleh karena itu, pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol juga memiliki kadar tertentu dalam menghambat aktivitas sel kanker payudara T47D.

Aktivitas antikanker pada senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menunjukkan bahwa senyawa tersebut nantinya dapat diaplikasikan sebagai obat. Allah telah menciptakan seluruh makhluk yang ada di bumi memiliki manfaat yang tiada terhitung dan tidak ada yang sia-sia, sebagaimana firman Allah dalam surat Al-Anbiya' ayat 16:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لِعِبَادٍ ﴿١٦﴾

“Dan tidaklah Kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada di antara keduanya dengan bermain-main”.

Menurut tafsir Jalalain, (Dan tidaklah Kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada diantara keduanya dengan bermain-main) tiada gunanya, tetapi justru hal ini menjadi bukti yang menunjukkan kekuasaan Kami dan sekaligus sebagai manfaat untuk hamba-hamba Kami. Berdasarkan hal tersebut, aktivitas antikanker yang didapatkan pada senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol dapat bermanfaat bagi penderita penyakit kanker sebagai obat pencegahan pertumbuhan kanker yang semakin besar.

Uji aktivitas antikanker senyawa basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol merupakan salah satu upaya pengembangan penelitian dalam mengobati penyakit kanker yang semakin meningkat. Pada dasarnya semua penyakit berasal dari Allah, maka yang dapat menyembuhkan juga Allah semata. Akan tetapi untuk mencapai kesembuhan tersebut tentunya dengan usaha maksimal. Sesungguhnya Allah mendatangkan penyakit, maka bersamaan dengan itu Allah juga mendatangkan obat seperti firman Allah dalam QS. Asyu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَّضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku,”

Sakit pada ayat ini dinisbatkan (disandarkan) kepada diri Ibrahim, menurut tafsir Ibnu Katsir bahwa saat Nabi Ibrahim sakit, beliau berkata “Bila aku sakit, sesungguhnya tiada seorangpun selain-Nya yang dapat menyembuhkanku dengan berbagai macam sarana pengobatan apapun yang menjadi penyebab kesembuhan”. Berdasarkan ayat tersebut, dapat diketahui bahwa Allah SWT tidak akan menurunkan penyakit kecuali Allah menurunkan obatnya, baik itu penyakit

yang muncul pada zaman nabi maupun sesudah nabi (Hawari, 2008). Oleh karena itu, tugas manusia hanya berusaha untuk memanfaatkan apa yang telah Allah berikan untuk dijadikan sebagai usaha mendapatkan kesembuhan, salah satunya dengan melalui pengembangan ilmu pengetahuan (penelitian).

Pada pengembangan penelitian, kita telah diperintahkan oleh Allah untuk dapat membaca, menelaah, serta memikirkan segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah seperti yang telah disebutkan dalam QS. Al-Alaq ayat 1-5 sebagai berikut:

أَقْرَأْ بِأَسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ۝ خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ۝ أَلَمْ نَكُنْ مِنْ عِلْمِ رَبِّكَ الْأَكْرَمُ ۝ الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ۝ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ۝

“Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang Menciptakan,. Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah.. Bacalah, dan Tuhanmulah yang Maha pemurah,.yang mengajar (manusia) dengan perantaran kalam, Dia mengajar kepada manusia apa yang tidak diketahuinya.”

Menurut tafsir Mishbah, iqra’ terambil dari kata menghimpun. Dari menghimpun terlahir makna seperti menyampaikan, menelaah, mendalami, meneliti, mengetahui ciri sesuatu, dan membaca baik teks tertulis maupun tidak. Manusia adalah makhluk yang disebut pertama kali melalui wahyu pertama, bukan saja karena ia diciptakan dalam bentuk yang sebaik-baiknya, tetapi agar dapat mengantarkan manusia menghayati petunjuk-petunjuk Allah dengan memperkenalkan jati dirinya serta menguraikan kejadiannya. Hal ini menunjukkan bahwa melalui petunjuk-petunjuk yang telah diberikan oleh Allah dalam Al-Qur’an, manusia diperintahkan untuk dapat mengembangkan, mengkaji, dan memperinci dengan melakukan penelitian. Melalui hasil penelitian yang telah

diperoleh, dapat menunjukkan tanda-tanda keesaan, kebesaran dan kekuasaan Allah SWT.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Karakterisasi ulang senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan uji kimia, identifikasi dengan FTIR dan KG-SM menunjukkan bahwa senyawa basa Schiff tersebut stabil, dan tidak rusak karena penyimpanan.
2. Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol memiliki aktivitas yang lemah dalam menghambat sel kanker payudara T47D dengan nilai IC₅₀ 353,038 µg/mL.

5.2 Saran

1. Hasil uji aktivitas antikanker senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)-metil)fenol dalam menghambat sel kanker payudara T47D menunjukkan aktivitas yang lemah. Pengujian lebih lanjut disarankan untuk menggunakan jenis sel kanker yang berbeda, serta diujikan pada sel sehat (sel verro).
2. Diperlukan uji lanjutan berupa uji apoptosis sel kanker untuk mengetahui kematian sel secara terprogram.
3. Hasil sintesis senyawa basa Schiff dapat dilakukan pemurnian terlebih dahulu untuk meningkatkan kestabilan senyawa basa Schiff sebelum uji aktivitas antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. 2007. *T47D (Human Ductal Breast Epithelial Tumor Cell Line) Whole Cell Lysate*.
- Adawiyah, Robi'atul. 2017. *Sintesis Senyawa Basa Schiff dari Vanilin dan p-Anisidin Menggunakan Metode Penggerusan*. Skripsi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- A'illah, Anis Farhatul. 2015. Uji Aktivitas Antikanker Terhadap Sel Kanker Payudara T47D dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Dari Ekstrak dan Fraksi Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn). Skripsi. Jurusan Kimia FSAINTEK UIN Malang.
- Ali, S. M. M., Jesmin, M., Azad, M. A. K., Islam, M. K., and Zahan, R. 2012. Antiinflammatory and analgesic activities of acetophenone semicarbazone and benzophenone semicarbazone. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (radikal bebas) 2) 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (bukan radikal) 57 April 2015 (Vol. 2 No. 1) ELSEVIER, S1036
- Ashraf, M. A., Mahmoud K., and Wajid A. 2011. *Synthesis, Characterization and Biological Activity of Schiff Bases*. IPCBEE, 10: 1-7
- Asmuddin. 2004. Peran Gen p16 Pada Siklus Sel Terhadap Pembentukan Kanker. *JKM*. 4 (1): 63-73.
- Basmal, J., Amini, S., Sugiyono ., dan Murniyati. 2009. *Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta.
- Basu, G.D., Pathangey, L.B., Tindler, T.L., Gendler, S.J., and Mukherjee, P. 2004. Mechanisms Underlying the Growth Inhibitory Effects of the Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitor Celecoxib in Human Breast Cancer Cell, *Journal from Breast Cancer Research*, 11: 632-642.
- Brodwaska, K., and Lodgaya, E. 2014. Schiff bases-Interesting Range of Application in Various Fields of Science. *CHEMIK*, 68(2): 129-134.
- Chaluvaraju dan Zaranappa. 2011. Synthesis and Biological Evaluation of some Isatin derivatives for Antimicrobial Properties. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(1): 541-546.
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 2*. Diterjemahkan oleh Pudjaatmaka, A.H. Jakarta: Erlangga.

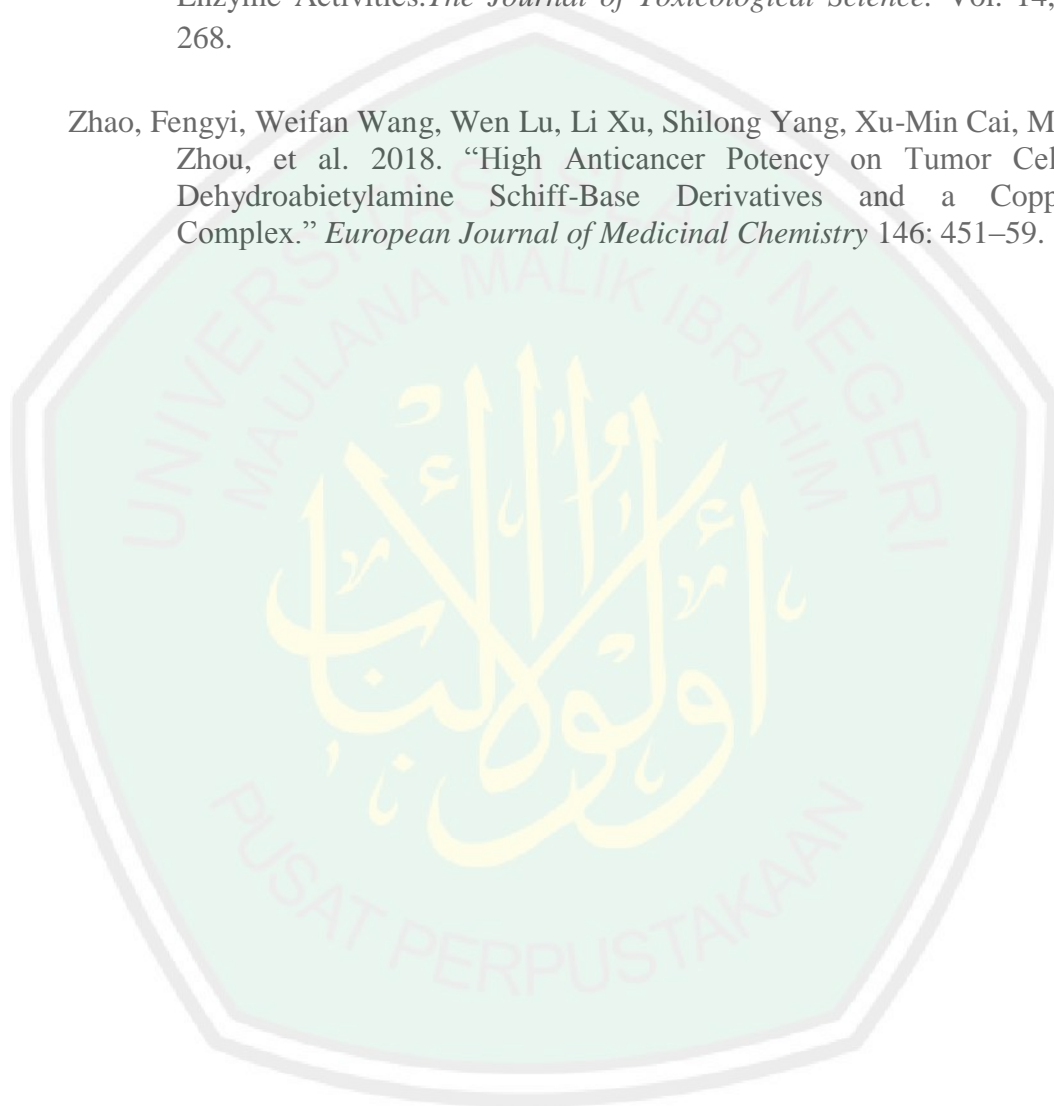
- Gupta Dutta, Sayan, B. Revathi, Gisela I. Mazaira, Mario D. Galigniana, C.V.S. Subrahmanyam, N.L. Gowrishankar, and N.M. Raghavendra. 2015. "2,4-Dihydroxy Benzaldehyde Derived Schiff Bases as Small Molecule Hsp90 Inhibitors: Rational Identification of a New Anticancer Lead." *Bioorganic Chemistry* 59 : 97–105.
- Handayani, S., Arianingrum, R., and Haryadi, W. 2011. Vanilin Structure Modification of Isolated Vanila Fruit (*Vanila Planifolia* Andrews) to form Vanilinacetone. *Proceedings at 14th Asian Chemical Congress 2011*, 252-257.
- Hasanah, Ulfatul, Ahmad Hanapi, and Rachmawati Ningsih. 2017. "Synthesis of Schiff Base Compound from Vanillin and P-Toluidine by Solvent Free-Mechanochemical Method," 4.
- Hawari, D. 2008. *Integrasi Agama dalam Pelayanan Medik*. Jakarta: FKUI
- Katzung, 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik, Buku 3*. Jakarta: Salemba Medika.
- Meiyanto, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., Dan Gonzalez, F.J. 1999. Targeted Disruption of Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274.23963-23968.
- Mohamed, Sofian S., Abdalkarem R. Tamer, Salah M. Bensaber, Mousa I. Jaeda, Nouri B. Ermeli, Aemen Ali Allafi, Ibrahim A. Mrema, Mabrouk Erhuma, Anton Hermann, and Abdul M. Gbaj. 2013. "Design, Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Sulfanilamide-Imines Derivatives as Potential Anticancer Agents." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386, no. 9 813–22.
- Mokhles Abd-Elzaher, M., Ammar A. Labib, Hanan A. Mousa, Samia A. Moustafa, Mamdouh M. Ali, and Ahmed A. El-Rashedy. 2016. "Synthesis, Anticancer Activity and Molecular Docking Study of Schiff Base Complexes Containing Thiazole Moiety." *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 5, no. 1 85–96.
- Morshed, H., Islam, Md.s, Parvin, S., Uddin, M.A., Mostofa, A.G.M., dan Sayyed, S.B. 2012. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of the Methanol Extract of (*Peaderia foetida* Linn). *Journal of Applied pharmaceutical Science*, 2 (1); 2012 : 77-80
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application t oProliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1 -2): 55-63.

- Murti, H., Boediono, A., Setiawan, B., dan Sandra F. 2007. Regulasi Siklus Sel: Kunci Sukses *Somatic Cell Nuclear Transfer*. *Jurnal Cdk*. 34 (6): 312-316.
- Patel, K., Karthikeyan C., Solomon V.R., Moorthy N.S.H.N., Lee H., Sahu K., Deora G.S., and Trivedi, P., 2011, Synthesis of Some Coumarinyl Chalcones and Their Antiproliferative Activity Against Breast Cancer Cell Lines., *Letters in Drug Design & Discovery*, 8.
- Plemenkov, VV. (2001). *Introduction of The Chemistry of Natural Compound*. Kazan.
- Purwono, Bambang, Chairil Anwar, and Ahmad Hanapi. 2013. "Syntheses of Azo-Imine Derivatives from Vanillin as an Acid Base Indicator." *Indonesian Journal of Chemistry* 13, no. 1 : 1.
- Putri Pratiwi, Herry Cahyana, 2015. and Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia MIPA, Universitas Indonesia. "Sintesis Ramah Lingkungan Senyawa Imina Turunan Vanilin dan 2-Hidroksi Asetofenon Serta Uji Aktivitas Biologi dan Antioksidan." *Pharmaceutical Sciences and Research* 2, no. 1
- Salahuddin, Mohammad Shaharyar, Avijit Mazumder, and Mohamed Jawed Ahsan. 2014. "Synthesis, Characterization and Anticancer Evaluation of 2-(Naphthalen-1-Ylmethyl/Naphthalen-2-Yloxymethyl)-1-[5-(Substituted Phenyl)-[1,3,4]Oxadiazol-2-Ylmethyl]-1H-Benzimidazole." *Arabian Journal of Chemistry* 7, no. 4: 418–24.
- Silalahi, Jansen. 2002 "Anticancer and Health Protective Properties of Citrus Fruit Components." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11, no. 1: 79–84.
- Saranya, J., and Lakshmi, S. S. 2015. *Invitro* antioxidant, antimicrobial and larvicidal studies of schiff base transition metal complexes. *Journal Chemical and Pharmaceutical Research (JCPR)*, 7 (4), 180-181.
- Sumardi dan Marianti, M., 2007. *Biologi Sel*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Tjindrabumi, D. and R. Mangunkusumo. 2000. Cancer in Indonesia, Present and Future. *Jpn J ClinOncol*; 32(supplement 1), p. 17-22.
- Triningsih, E. 2002. Kanker dan Permasalahannya dalam Seminar Pengobatan Komplementer pada Penderita Kanker, Yayasan Kucala Yogyakarta.

Ummathur, M.B, Sayudevi, P., and Krishnankutty, K. 2009. Schiff Bases Of 3-[2-(1,3-Benzothiazol-2-Y1)Hydrazinylidene] Pentane-2,4-Dione With Aliphatic Diamines And Their Metal Complexes. *J. Argent. Chem. Soc.*, 2009, 97(2), 31-39.

Yoshida, M., Hideo Yoshikawa, Hirofuni Goto, Ichiro Hara. 1989. Evaluation of the Nephrotoxicity of Aromatic Nitro-Amino Compounds By Urinary Enzyme Activities. *The Journal of Toxicological Science*. Vol. 14, 257-268.

Zhao, Fengyi, Weifan Wang, Wen Lu, Li Xu, Shilong Yang, Xu-Min Cai, Mengyi Zhou, et al. 2018. "High Anticancer Potency on Tumor Cells of Dehydroabietylamine Schiff-Base Derivatives and a Copper(II) Complex." *European Journal of Medicinal Chemistry* 146: 451–59.



LAMPIRAN

L.1 Rancangan Penelitian

Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol

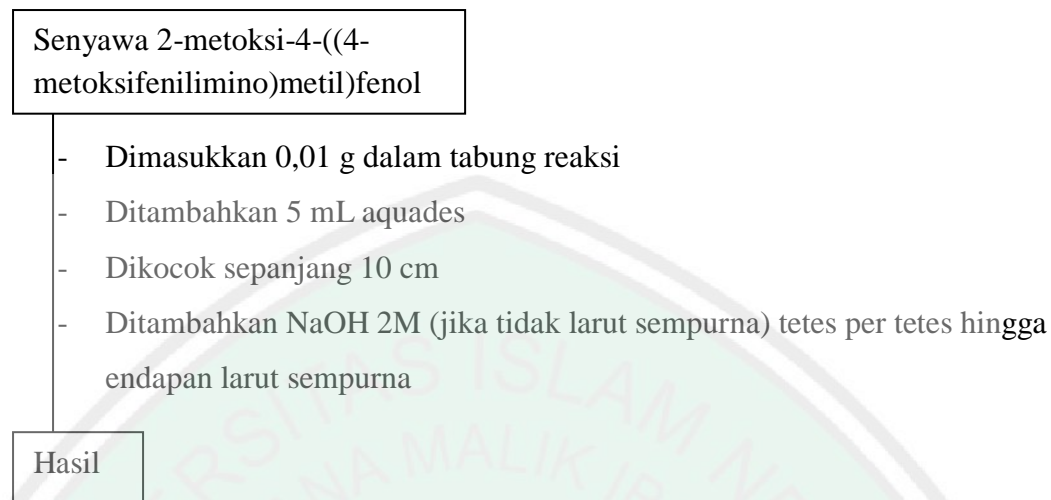
- Dikarakterisasi dengan uji kimia
- Diidentifikasi menggunakan FTIR dan KG-SM

Diuji antikanker dengan metode MTT

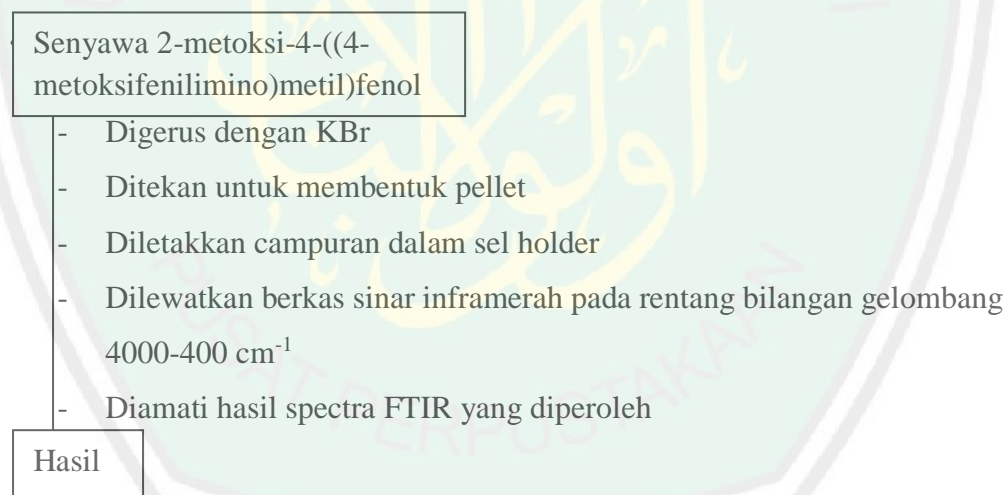


L. 2 Diagram Alir

L.2.1 Karakterisasi Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol dengan uji kimia.



L.2.2 Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan FTIR



L.2.3 Karakterisasi senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol menggunakan KG-SM

Senyawa 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol

- Dilarutkan dengan kloroform dengan konsentrasi 70.000 ppm
- Diinjeksikan ke dalam instrumen KG-SM dengan kondisi operasional sebagai berikut:

Jenis kolom	: AGILENT J&W VF-SMS
Panjang kolom	: 30 meter
Detektor	: CP 3800 (GC) Saturn 2200 (MS)
Oven	: Terprogram 100°C (10 menit) → 330°C (20 menit)
Temperatur injektor	: 350°C
Tekanan gas	: 16,5 kPa
Kecepatan aliran gas	: 1 mL/menit
Gas pembawa	: Helium

- Diamati pola kromatogram yang dihasilkan

Hasil

L.2.4 Uji Antikanker dengan Metode MTT

L.2.4.1 Penyiapan Sel

Sel kanker payudara

- Dikeluarkan dari *freezer* (-80°C)
- Dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2-3 menit
- Dipindahkan ke dalam *conical tube* yang telah berisi 10 mL media RPMI
- Disentrifugasi

Pelet

- Dipindahkan ke dalam *culture dish* yang telah berisi 10 mL RPMI
- Diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C pada incubator CO₂ 5%
- Diamati dibawah mikroskop *inverted*
- Dicuci 2x dengan PBS
- Ditambahkan tripsin-EDTA dan diinkubasi selama 3 menit
- Ditambahkan media RPMI 5 mL
- Diamati dibawah mikroskop *inverted*
- Diinkubasi dalam incubator CO₂

Supernatan

Hasil

L.2.4.2 Perhitungan Sel Kanker

Sel Kanker Payudara T47D

- Diambil 10 µL
- Dipipetkan ke *hemacytometer*
- Diamati dan dihitung dengan counter dibawah mikroskop *interved*

Hasil

L.2.4.3 Peletakan Sel pada *Plate 96-well*

Sel Kanker Payudara T47D

- Diletakkan sel dan media RPMI sesuai perhitungan ke dalam *plate 96-well*
- Ditambahkan media RPMI sampai volumenya menjadi 10 mL
- Diletakkan 100 μ L sel pada masing-masing sumuran, kecuali pada control media
- Diinkubasi selama 24 jam dalam incubator CO₂

Hasil

L.2.4.4 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Larutan Sampel pada *Plat*

Senyawa 2-metoksi-4-((4-etoksifenilimino)metil)fenol

- Ditimbang 10 mg dan dimasukkan ke dalam tempat yang berbeda
- Dilarutkan masing-masing dengan 100 μ L DMSO
- Diaduk dengan vortex

Hasil

L. 2.4.5 Pengenceran Larutan Sampel

Larutan Sampel

- Dimasukkan media RPMI 500 μ L pada tabung konsentrasi 1000;500;250;125;62,5;31,25 dan 15,625 μ g/mL
- Dihitung larutan sampel yang akan dimasukkan pada konsentrasi 1000 μ g/mL
- Diambil 10 μ L larutan sampel
- Dimasukkan pada konsentrasi 1000 μ g/mL
- Ditambahkan 490 μ L pada konsentrasi 1000 μ g/mL
- Diresuspensi dari konsentrasi tinggi sampai konsentrasi rendah

Hasil

L.2.4.6 Penambahan Larutan sampel pada sel

Sel Kanker Payudara T47D

- Diambil sel dari inkubator
- Dibuang media RPMI dengan cara dibalikkan *plate* 180 °C
- Dimasukkan larutan sampel sebanyak 10 µL pada konsentrasi 1000;500;250;125;62,5;31,25 dan 15,625 µg/mL
- Dilakukan pengulangan penambahan larutan sampel pada masing-masing sebanyak 3 kali
- Diinkubasi selama 24 jam

Hasil

L.2.4.7 Pembuatan Larutan Stok MTT

MTT 5 mg/ml

- Dipipet 500 µL
- Dimasukkan kedalam conical tube
- Ditambahkan media komplit sampai 5 mL
- Dikocok hingga homogen

Hasil

L.2.4.8 Pemberian Larutan MTT

Larutan MTT

- Ditambahkan 100 mikrolit ke semua sumuran
- Diinkubasi selama 3 jam
- Ditambahkan 100 mikrolit SDS 10% dalam 0,1 M HCl
- Dibungkus plate dengan alumunium foil
- Diinkubasi di tempat gelap

Hasil

L.2.3.9 Pembacaan Absorbansi dengan ELISA *reader*

Plate

- Dimasukkan pada *Elisa reader*
- Dibaca pada panjang gelombang 595 nm

Hasil



L.3 Perhitungan dan Pembuatan Reagen

L.3.1 Pembuatan Larutan NaOH 2M

$$M = \frac{n}{v}$$

$$2 = \frac{n}{5 \text{ mL}}$$

$$10 \text{ mmol} = n$$

$$\text{Mol} = \frac{\text{massa}}{Mr}$$

$$10 \text{ mmol} = \frac{\text{massa}}{40 \text{ gr/mol}}$$

$$\text{Massa} = 400 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan NaOH 2M dengan cara menimbang 400 mg padatan NaOH dan dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 5 mL.

L.3.2 Perhitungan Jumlah Larutan NaOH 2M yang ditambahkan Pada Uji Kimia

$$\text{Mol Senyawa basa Schiff} = \frac{0,01 \text{ gr}}{257}$$

$$= 3,89 \times 10^{-5}$$

$$\text{NaOH 2M} = \text{Konsentrasi Senyawa Basa Schiff}$$

$$\frac{2 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} = \frac{3,89 \times 10^{-5} \text{ mol}}{v}$$

$$V = \frac{3,89 \times 10^{-2}}{2}$$

$$= 0,01945 \text{ mL} = 19,45 \mu\text{L} = 20 \mu\text{L}$$

Pada penambahan NaOH tetes per tetes pada uji kimia, jumlah NaOH 2M yang ditambahkan adalah $\pm 20 \mu\text{L}$.

L.3.3 Pembuatan Larutan Stok Sampel Konsentrasi 120.000 ppm untuk uji KG-SM

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel yang ditimbang} &= \frac{\text{ppm} \times \text{mL}}{1000} \\ &= \frac{120.000 \text{ ppm} \times 1 \text{ mL}}{1000} \\ &= 120 \text{ mg} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok sampel dalam preparasi identifikasi menggunakan KG-SM adalah dengan menimbang 120 mg sampel senyawa basa Schiff dan dilarutkan dengan kloroform sebanyak 1 mL.

L.3.4 Pembuatan Larutan MTT (5 mg/mL)

Pembuatan larutan MTT 5 mg/mL adalah dengan cara ditimbang 50 mg serbuk MTT. Kemudian dilarutkan ke dalam 10 µL PBS. Selanjutnya divortex.

L.3.5 Pembuatan Larutan Stok 1000 ppm

$$\begin{aligned} \text{Berat sampel} &= 10 \text{ mg} \\ \text{Volume pelarut} &= 100 \text{ } \mu\text{L DMSO} \\ \text{Molaritas} &= \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ } \mu\text{L}} = \frac{10.000 \text{ } \mu\text{g}}{0,1 \text{ mL}} = 100.000 \text{ } \mu\text{g/mL} \\ M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 1 \text{ mL} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/mL} &= 100.000 \text{ } \mu\text{g/mL} \times V_2 \\ V_2 &= 0,01 \text{ mL} \\ V_2 &= 10 \text{ } \mu\text{L} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan stok 1000 ppm yaitu diambil 10 µL sampel yang telah dilarutkan dengan 100 µL DMSO. Ditambahkan 990 µL media kultur RPMI. Diresuspensi hingga homogen.

L.3.6 Pembuatan Larutan SDS 10%

$$\text{SDS 10\%} = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

Cara pembuatannya yaitu 10 g SDS (*Sodium Deodecyl Sulphate*) dilarutkan dalam 80 mL aquades pada beaker glass 100 mL. Diaduk hingga larut. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan.



L.4 Data dan Perhitungan Hasil Penelitian

L.4.1 Perhitungan %Hasil Kromatogram pada KG-SM

$$\% \text{ Hasil} = \frac{\text{Luas Area masing-masing puncak}}{\text{Jumlah keseluruhan luas area}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Puncak 1} = \frac{0,536138 \times 10^6}{62,206138 \times 10^6} \times 100\% = 0,86\%$$

$$\% \text{ Puncak 2} = \frac{3,030 \times 10^6}{62,206138 \times 10^6} \times 100\% = 4,87\%$$

$$\% \text{ Puncak 3} = \frac{58,64 \times 10^6}{62,206138 \times 10^6} \times 100\% = 94,267\%$$

L.4.2 Perhitungan Jumlah mL panen sel yang ditransfer pada plate 96-well

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel yang ditransfer} &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel yang terhitung}} \\ &= \frac{100 \times 10^4}{50 \times 10^4 / \text{mL}} \\ &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 2 mL, ditambahkan medium komplet sampai 10 mL. Total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100 μL x 100 sumuran = 10000 μL atau 10 mL.

L.4.3 Perhitungan Persentasi Sel Hidup

- Data Uji Aktivitas Antikanker Plate 1 (Senyawa basa Schiff dan vanilin)

Kontrol Sel				
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Jumlah	Rata2
0.406	0.436	0.427	1.269	0.423

Kontrol Media				
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Jumlah	Rata2
0.093	0.097	0.096	0.286	0.09533

➤ Data Uji Aktivitas Antikanker Plate 2 (*p*-anisidin dan Doxorubicin)

Kontrol Sel				
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Jumlah	Rata2
0.392	0.39	0.382	1.164	0.388

Kontrol Media				
Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Jumlah	Rata2
0.091	0.092	0.093	0.276	0.092

1. Senyawa Basa Schiff 2-metoksi-4-((4-metoksifenilimino)metil)fenol

Konsentrasi	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata- rata	% Sel Hidup
		1	2	3		
1000	3	0,152	0,185	0,185	0,174	24,008
500	2,69897	0,256	0,267	0,256	0,25967	50,152
250	2,39794	0,274	0,272	0,292	0,27933	56,154
125	2,09691	0,3	0,327	0,349	0,32533	70,193
62,5	1,79588	0,357	0,388	0,376	0,37367	84,944
31,25	1,49485	0,398	0,393	0,441	0,41067	96,236
15,63	1,193959	0,449	0,462	0,439	0,45	108,24

2. Vanillin

Konsentrasi	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Sel Hidup
		1	2	3		
1000	3	0,227	0,217	0,237	0,227	40,183
500	2,69897	0,325	0,326	0,328	0,3263	70,498
250	2,39794	0,4	0,413	0,404	0,405667	94,710
125	2,09691	0,426	0,437	0,426	0,429667	102,035
62,5	1,79588	0,441	0,437	0,436	0,438	104,5778
31,25	1,49485	0,45	0,468	0,485	0,467667	113,6317
15,63	1,193959	0,451	0,438	0,41	0,433	103,0519

3. *p*-Anisidin

Konsentrasi	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata- rata	% Sel Hidup
		1	2	3		
1000	3	0,116	0,117	0,117	0,116	8,33
500	2,69897	0,178	0,184	0,188	0,183	30,85
250	2,39794	0,221	0,238	0,21	0,223	44,25
125	2,09691	0,273	0,278	0,298	0,283	63,53
62,5	1,79588	0,317	0,318	0,31	0,315	75,34
31,25	1,49485	0,357	0,344	0,349	0,35	87,16
15,63	1,193959	0,351	0,345	0,351	0,349	86,82

4. Doxorubicin

Konsentrasi	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata- rata	% Sel Hidup
		1	2	3		
100	2	0,126	0,139	0,141	0,135	14,639
50	1,69897	0,151	0,167	0,168	0,162	23,648
25	1,39794	0,184	0,191	0,184	0,186	31,869
12,5	1,09691	0,197	0,197	0,196	0,196	35,360
6,25	0,79588	0,208	0,218	0,2	0,209	39,414
3,125	0,49485	0,231	0,215	0,211	0,219	42,905
1,5625	0,19382	0,201	0,202	0,208	0,204	37,725

➤ Perhitungan persentasi sel hidup

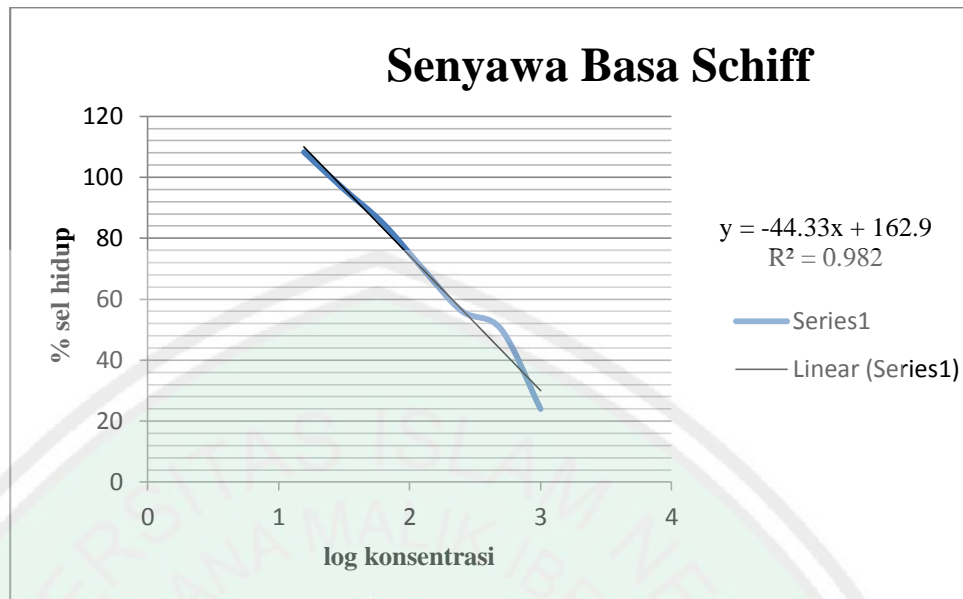
$$\% \text{Sel Hidup} = \frac{C-B}{A-B} \times 100\%$$

Keterangan :
 A = absorbansi kontrol sel (sel+media)
 B = absorbansi kontrol media (media kompleks)
 C = absorbansi sampel (sel+media+sampel)

L.4.4 Perhitungan Nilai IC₅₀

Setelah mendapatkan % sel hidup, kemudian membuat plot regresi linear dengan garis x = log konsentrasi dan y = %sel hidup.

1. Senyawa Basa Schiff



$$Y = -44,33x + 162,9$$

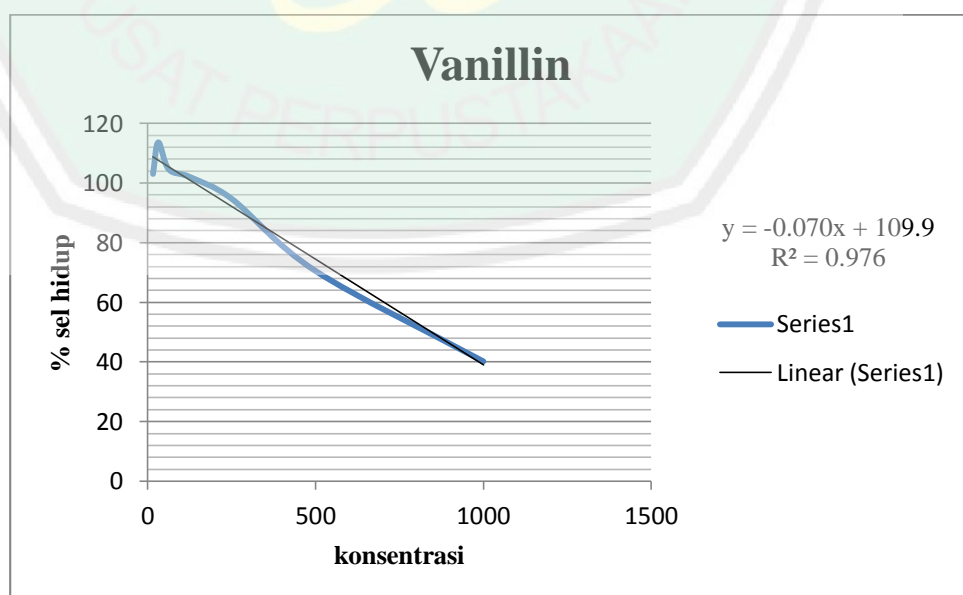
$$50 = -44,33x + 162,9$$

$$X = \frac{50 - 162,9}{-44,33}$$

$$X = 2,547821$$

$$\text{Antilog } 2,547821 = 353,0376 \mu\text{g/mL}$$

2. Vanillin



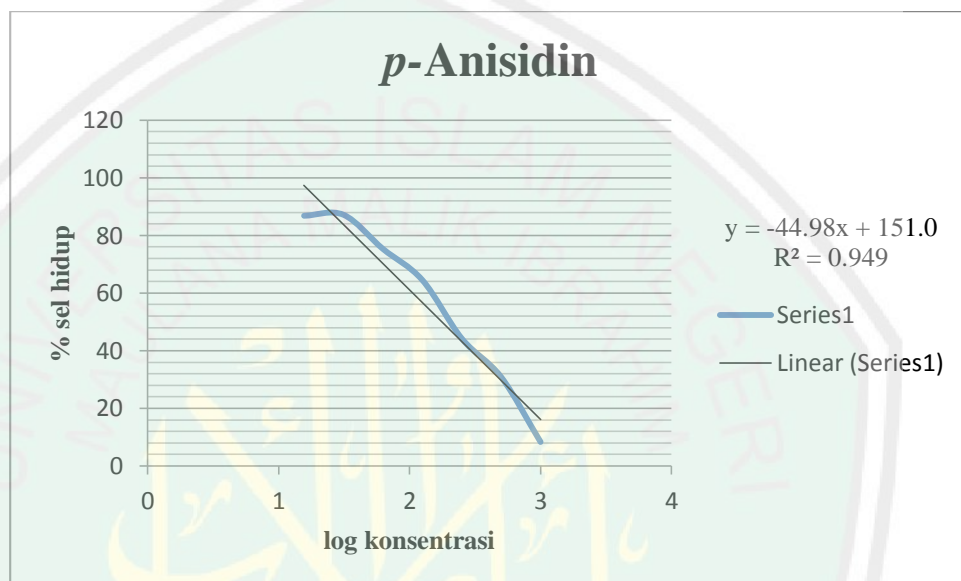
$$Y = -0,070x + 109,9$$

$$50 = -0,070x + 109,9$$

$$X = \frac{50 - 109,9}{-0,070}$$

$$X = 845,134 \mu\text{g/mL}$$

3. *p*-Anisidin



$$Y = -44,98 x + 151$$

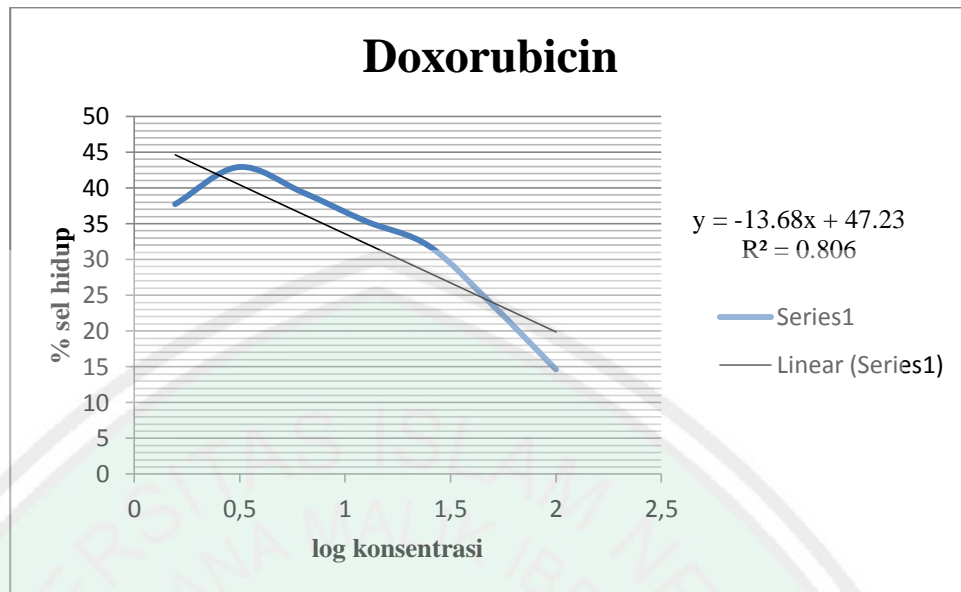
$$50 = -44,98 x + 151$$

$$X = \frac{50 - 151}{-44,98}$$

$$X = 2,247094$$

$$\text{Antilog } 2,247094 = 176,6419 \mu\text{g/mL}$$

4. Doxorubicin



$$Y = -13,68x + 47,23$$

$$50 = -13,68x + 47,23$$

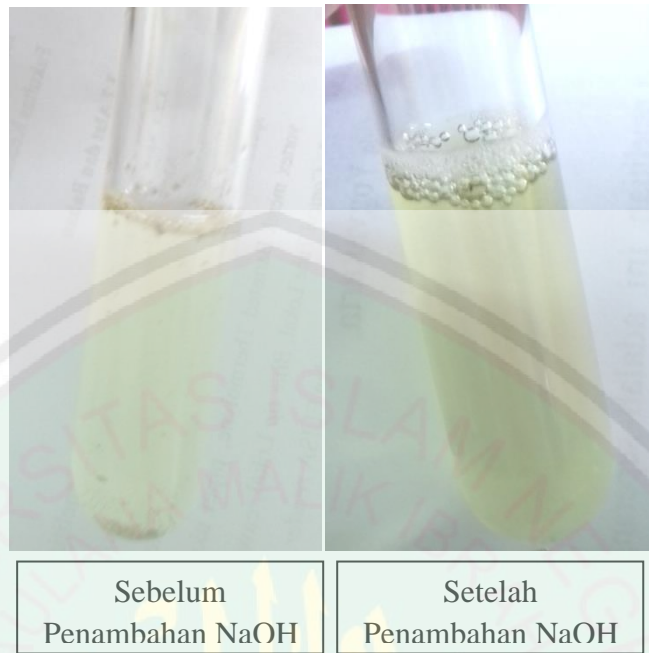
$$X = \frac{50 - 47,23}{-13,68}$$

$$X = -0,20247$$

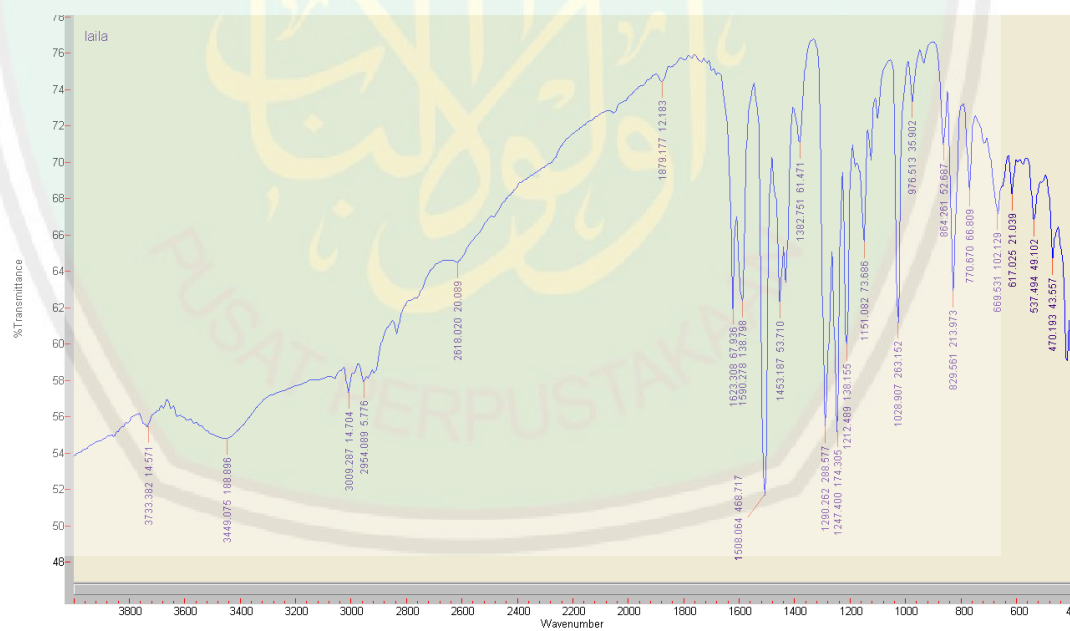
$$\text{Antilog } -0,20247 = 0,627378 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

L. 5 Dokumentasi

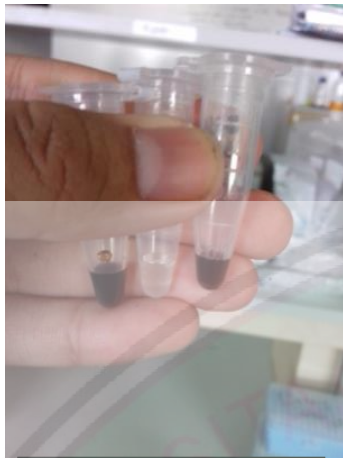
L.5.1 Uji Kimia Senyawa Basa Schiff



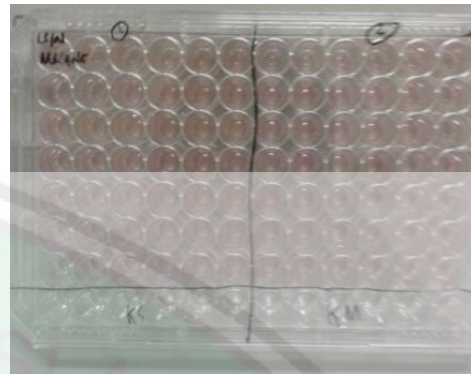
L.5.2 Hasil Karakterisasi FTIR



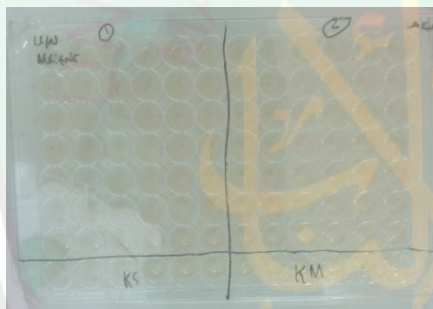
L.5.3 Uji Aktivitas Antikanker



Larutan stok sampel
100.000 ppm



Sel + media +
sampel



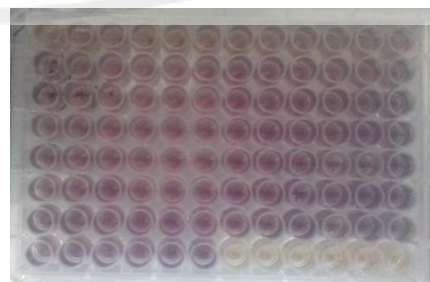
Sel + media + sampel +
MTT (sebelum inkubasi)



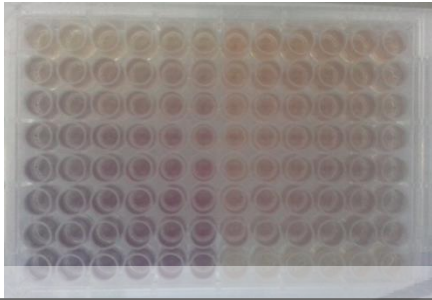
Sel + media + sampel +
MTT (setelah inkubasi)



Sel + media + sampel + MTT +
SDS (sebelum inkubasi)



Sel + media + sampel + MTT + SDS
(setelah inkubasi)



Sel+media+sampel+MTT+SDS
(setelah inkubasi)



Analisis menggunakan ELISA
reader

