



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ANALISIS O<sup>6</sup>-METILGUANIN  
DALAM DARAH PASIEN YANG MENDAPATKAN  
SIKLOFOSFAMID DALAM REGIMEN KEMOTERAPI  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**SKRIPSI**

**SERUNI PUSPA RAHADIANI  
0806328096**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ANALISIS O<sup>6</sup>-METILGUANIN  
DALAM DARAH PASIEN YANG MENDAPATKAN  
SIKLOFOSFAMID DALAM REGIMEN KEMOTERAPI  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi**

**SERUNI PUSPA RAHADIANI  
0806328096**

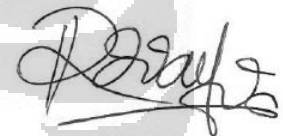
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## **SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012



Seruni Puspa Rahadianati

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Seruni Puspa Rahadiani

NPM : 0806328096

Tanda Tangan : 

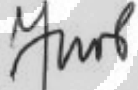
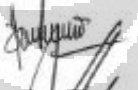
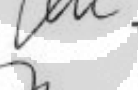

Tanggal : 9 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

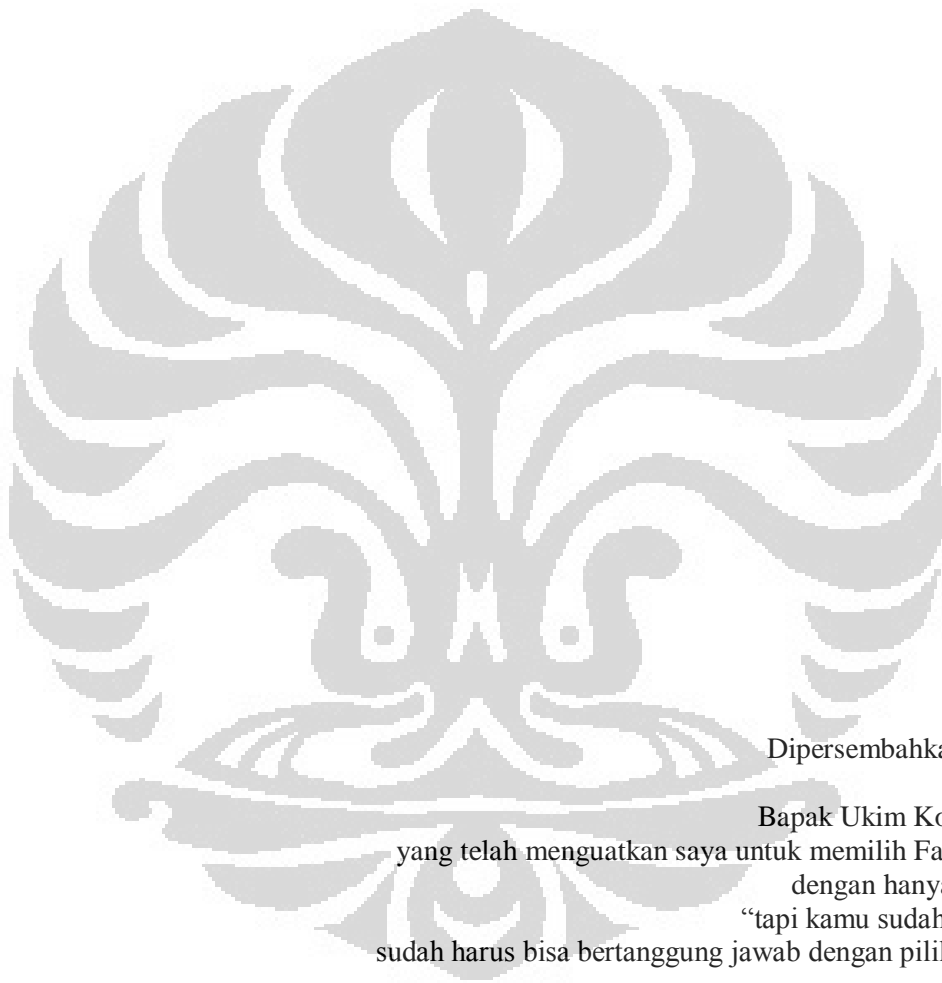
Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Seruni Puspa Rahadiani  
NPM : 0806315622  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Analisis O<sup>6</sup>-Metilguanin dalam Darah Pasien yang Mendapatkan Siklofosfamid dalam Regimen Kemoterapi Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, Apt. (  )  
Pembimbing II : Dra. Rizka Andalusia, MARS. M.Pharm, Apt. (  )  
Penguji I : Dr. Harmita, Apt. (  )  
Penguji II : Drs. Herman Suryadi, M.S., Apt (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 9..... .. Juli 2012



Dipersembahkan untuk,  
Bapak Ukim Komarudin  
yang telah menguatkan saya untuk memilih Farmasi UI  
dengan hanya berkata  
“tapi kamu sudah dewasa,  
sudah harus bisa bertanggung jawab dengan pilihanmu..”

Nisa, Neti, Dian, Tris,  
yang telah menguatkan saya untuk lulus semester ini  
dengan terus berkata,  
“Kita pasti bisa wisuda bareng Run..!”

dan yang pasti,  
Mama dan Ayah,  
yang telah – ah, saya hanya bisa berkata,  
“Betapa bersyukur Runi bisa menjadi anak kalian berdua..”

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang, karena atas segala kuasa, kehendak serta curahan cintaNya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwascripsi ini dapat terselesaikan berkat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang dengan tulus memberikan dukungan dan bimbingan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
- (2) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Pembimbing I dan Dra. Rizka Andalusia, MARS. M.Pharm, Apt., selaku Pembimbing II yang dengan tulus dan sabar telah membimbing, memberikan dukungan, arahan, bantuan serta saran selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
- (3) Dra. Maryati K., Apt., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (4) Seluruh jajaran dosen Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan dukungan dan arahan selama penelitian berlangsung.
- (5) Seluruh karyawan Departemen Farmasi, terutama Ibu Rina Rahmawati, Ibu Krisnasari Dianpratami dan Ibu Siti F. dari Laboratorium Bioavailabilitas / Bioekivalensi; Mbak Lia, dan Mas Ardi dari Laboratorium Kimia Kuantitatif; Mbak Ulfa dari Laboratorium Fitokimia; serta jajaran Petugas Keamanan atas segala bantuannya selama penelitian berlangsung.
- (6) Ibu Dewi Kristanti, selaku Pembimbing Teknis Isolasi DNA, Mas Hari, dan Mbak Cathy, serta seluruh karyawan Instalasi Farmasi, Instalasi Patologi Klinis, dan Instalasi Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker “Dharmas” yang senantiasa membantu selama penelitian berlangsung.
- (7) Ikatan Alumni (ILUNI) FE UI atas bantuan finansial berupa beasiswa skripsi.

- (8) Mama Titin Sumarni serta Ayah Didi Audi, sang perpanjangan tanganNya yang paling dekat dan nyata. Terima kasih atas ruahan kasih sayang, doa yang tak pernah putus, seluruh motivasi dan dukungan, serta dekapan dan pelukan, yang telah dan akan selalu menemani Runi dari kecil hingga kini dan nanti.
- (9) Bundo Juniarti dan Om “Oyon” Syafril, serta seluruh keluarga besar Pontianak dan Surabaya.
- (10) Nisa Yulianti, Dian Rahma Bakti, Neti Triwinanti, Tris Febriana Chantika, M. Irfan Hasan, Yoga Octa Perdana, Ryan Adi Candra, Feby Hendola, Inka Saraswati, Dani Purbonegoro, Aditya Aufferino, Mas Yustian Yusa, Mas Leonardo Feneri, dan Wahyudin Bempah; teman-teman tersayang, mereka yang selalu menyempatkan hadir untuk meyakinkan bahwa saya mampu menamatkan semuanya, dan saya tidak pernah sendiri dalam perjuangan ini.
- (11) Kawan-kawan KBI Kimia Analisis; Epin, Adon, Santi, Citra, Cynthia, Nurul; dan teman-teman Farmasi UI 2008.
- (12) Pihak lain yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Saya juga meminta maaf atas segala kekhilafan yang pernah saya lakukan selama proses pendidikan serta penyusunan skripsi ini. Besar harapan saya agar skripsi ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu kesehatan, khususnya dalam bidang penanda biologis kanker dan analisis.

Penulis  
2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:


Nama : Seruni Puspa Rahadiani  
NPM : 0806328096  
Program Studi : Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :  
“Analisis O<sup>6</sup>-Metilguanin dalam Darah Pasien yang Mendapatkan Siklofosfamid dalam Regimen Kemoterapi Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 2 Juli 2012  
Yang menyatakan

  
(Seruni Puspa Rahadiani)

## ABSTRAK

Nama : Seruni Puspa Rahadiani  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Analisis O<sup>6</sup>-Metilguanin dalam Darah Pasien yang Mendapatkan Siklofosfamid dalam Regimen Kemoterapi Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Siklofosfamid merupakan senyawa antineoplastik golongan pengalkilasi yang banyak digunakan untuk mengobati penyakit keganasan. Alkilasi yang terjadi pada posisi N<sup>7</sup> basa guanin di kedua untai rantai DNA mengakibatkan kegagalan replikasi sel yang berguna untuk terapi kanker. Kesalahan posisi alkilasi, salah satunya pada posisi O<sup>6</sup> basa guanin, ternyata dapat memberikan efek mutagenik dan bahkan karsinogenik, yang dapat memicu kanker sekunder. Oleh karena itu, *addition product (adduct)* yang terbentuk akibat alkilasi tersebut, yaitu O<sup>6</sup>-metilguanin, dapat menjadi penanda biologis terhadap risiko terbentuknya kanker sekunder. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi senyawa O<sup>6</sup>-metilguanin dalam darah pasien kanker yang mendapatkan siklofosfamid dalam regimen kemoterapi selama minimal 4 siklus. Sampel yang digunakan adalah DNA yang diisolasi dari darah pasien kanker. Isolat DNA kemudian dihidrolisis dan dianalisis menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi penukar kation kuat dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6), suhu kolom 30°C, laju alir 1,2 ml/menit, dengan sistem deteksi fluoresensi menggunakan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm. Penentuan O<sup>6</sup>-metilguanin dalam sampel dilakukan dengan membandingkan data waktu retensi sampel dengan standar, yaitu menit ke 7,600 dengan batas deteksi sebesar 20,74 ng/ml (setara dengan 128813,52  $\mu$ V/s). Sampling dilakukan terhadap 27 pasien, tetapi hanya 17 sampel DNA pasien yang dapat teranalisis dan O<sup>6</sup>-metilguanin terdeteksi dalam 1 sampel DNA pasien.

Kata Kunci : O<sup>6</sup>-metilguanin, siklofosfamid, DNA adduct, kanker sekunder, biomarker, HPLC  
xiv + 94 halaman; 15 gambar, 35 lampiran.  
Daftar Pustaka : 61(1979-2011)

## ABSTRACT

Name : Seruni Puspa Rahadiani  
Program Study : Pharmacy  
Title : Analysis of O<sup>6</sup>-Methylguanine in Patient's Blood who Administered Cyclophosphamid in Chemotherapy Regiment Using High Performance Liquid Chromatography

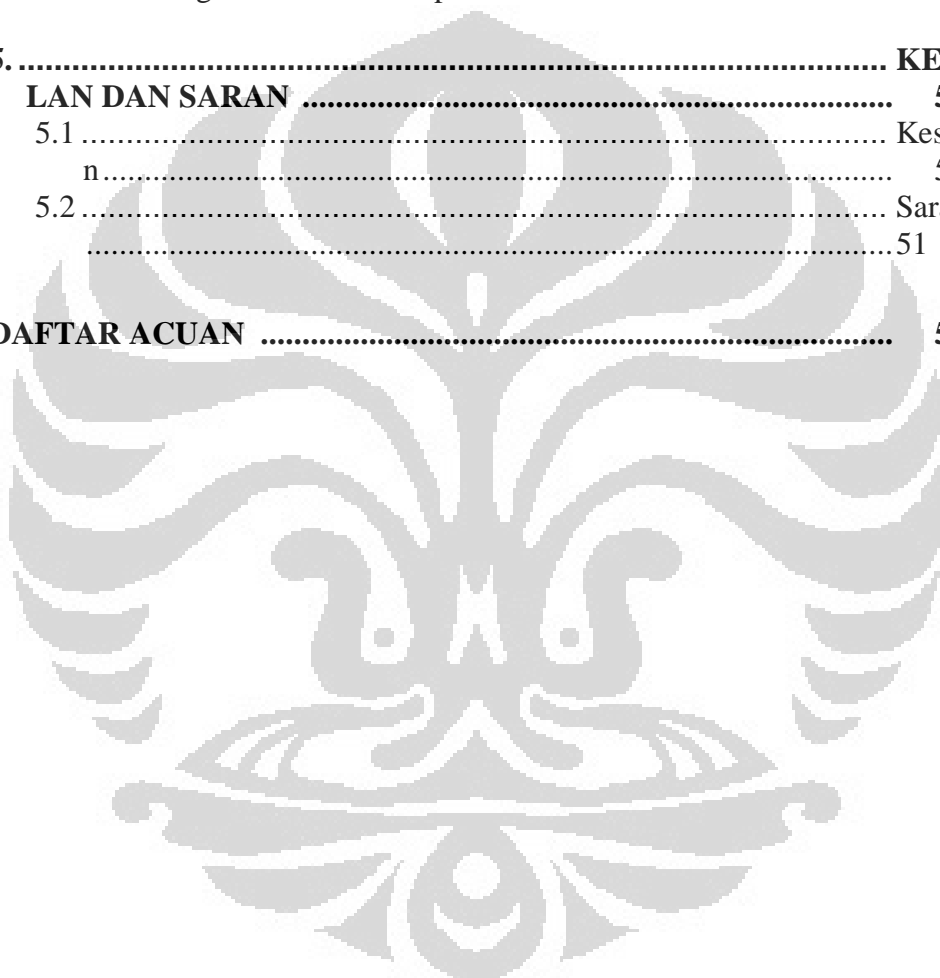
Cyclophosphamide is one of alkylating agent which widely use in chemotherapy. Alkylation occurred in N<sup>7</sup>-guanine position in both DNA strand causes the cancer cell failed to replicate, hence gives the cytotoxic effects which is beneficial for the cancer therapy. Contrary, if the alkylation occurs in O<sup>6</sup>-guanine position, the drug gives mutagenic and carcinogenic properties which vulnerably leads to secondary cancer. Therefore, detection of the adduct formed, O<sup>6</sup>-methylguanine, is able to become a biomarker for the risk of secondary cancer's development. In this research, O<sup>6</sup>-methylguanine was identified from patient which had been receiving cyclophosphamid in their chemotherapy for minimum 4 cycles. Patient's DNA which isolated from their blood, were being hydrolyzed and identified. Analytical method which use in this research was High Performance Liquid Chromatography with strong cation exchange column, mobile phase consisted of 30 mM ammonium formate pH 3,95-methanol (94:6), flow rate 1,2 ml/min, column temperature 30°C and detected at excitation wavelength 300 nm and emission wavelength 370 nm. Standart of O<sup>6</sup>-methylguanine in samples was conducted with comparing retention time data from sample and standar, which was eluted in 7.600 minute and with limit of detection as 20,74 ng/ml (equals to 128813,52  $\mu$ V/s). Sampling was conducted in 27 patients but only 17 patient's DNA samples were able to be analyzed and O<sup>6</sup>-methylguanine was detected in 1 sample.

Key Words : O<sup>6</sup>-methylguanine, cyclophosphamide, DNA adduct, secondary cancer, biomarker, HPLC  
xiv + 94 pages ; 15 pictures, 35 appendixes.  
Bibliography : 61 (1979-2011)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
LEMBAR PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR.....	vii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	ix
ABSTRAK .....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 .....	DNA
.....	4
2.2 .....	Kanker
.....	7
2.3 .....	Agen
Pengalkilasi .....	10
2.4 .....	Siklofosfa
mid .....	13
2.5 .....	DNA
Adduct.....	16
2.6 .....	Kromatogr
afi Cair Kinerja Tinggi.....	20
2.7 .....	Teori
Fluoresensi .....	26
2.8 .....	Validasi
Metode Analisis.....	27
<b>3. ....</b>	<b>METODE</b>
<b>PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
3.1 .....	Waktu dan
Tempat Penelitian .....	32
3.2 .....	Alat
.....	32
3.3 .....	Bahan
.....	32

3.4 .....	Cara Kerja	
.....		35
<b>4. ....</b>	<b>HASIL</b>	
<b>DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>39</b>
4.1 .....	Validasi	
Metode Analisis.....		39
4.2 .....	Preparasi	
Sampel .....		42
4.3 .....	Analisis	
O <sup>6</sup> -Metilguanin dalam Sampel.....		46
<b>5. ....</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
<b>LAN DAN SARAN .....</b>		<b>51</b>
5.1 .....	Kesimpulan.....	51
5.2 .....	Saran .....	51
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>		<b>52</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur pirimidin dan purin.....	4
Gambar 2.2. Struktur adenin .....	5
Gambar 2.3. Struktur guanin. ....	5
Gambar 2.4. Struktur rantai polinukleotida.....	6
Gambar 2.5. Ikatan hidrogen antara basa nitrogen pada DNA.....	7
Gambar 2.6. Posisi penyerangan basa DNA oleh agen pengalkilasi .....	11
Gambar 2.7. Fragmentasi DNA yang disebabkan oleh alkilasi pada guanin.....	11
Gambar 2.8. Tautan silang pada agen pengalkilasi bifungsional .....	12
Gambar 2.9. Reaksi alkilasi nitrogen mustar dengan nukleofil.....	13
Gambar 2.10. Struktur siklofosfamid.....	13
Gambar 2.11. Metabolisme siklofosfamid .....	15
Gambar 2.12. Pembentukan adduct DNA antara siklofosfamid dengan guanin.....	18
Gambar 2.13. Struktur N <sup>7</sup> -metilguanin.....	18
Gambar 2.14. Struktur O <sup>6</sup> -metilguanin.....	19
Gambar 2.15. Struktur N <sup>3</sup> -metiladenin .....	19

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara perhitungan jumlah plat teoritis (N) dan HETP .....	58
Lampiran 2. Cara perhitungan persentase uji perolehan kembali (% UPK) dan persentase diferensiasi (% diff) .....	59
Lampiran 3. Cara perhitungan persentase koefisien variasi (KV) .....	60
Lampiran 4. Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas).....	61
Lampiran 5. Cara perhitungan persentase koefisien fungsi regresi ( $V_{x_0}$ ) .....	62
Lampiran 6. Cara perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) .....	63
Lampiran 7. Cara perhitungan resolusi (R) .....	64
Lampiran 8. Intensitas fluoresensi basa DNA teralkilasi.....	65
Lampiran 9. Data protonasi basa DNA dan basa DNA teralkilasi .....	66
Lampiran 10. Gambar peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	67
Lampiran 11. Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem O <sup>6</sup> -metilguanin .....	68
Lampiran 12. Gambar kromatogram campuran larutan standar.....	69
Lampiran 13. Hasil perhitungan resolusi komponen lain terhadap O <sup>6</sup> -metilguanin untuk uji kesesuaian sistem .....	70
Lampiran 14. Gambar kromatogram standar O <sup>6</sup> -metilguanin 101,0 ng/ml .....	71
Lampiran 15. Gambar kromatogram standar N <sup>7</sup> -metilguanin 1,01 µg/ml.....	72
Lampiran 16. Gambar kromatogram standar N <sup>3</sup> -metiladenin 1,01 µg/ml .....	73
Lampiran 17. Gambar kromatogram standar guanin 1,01 µg/ml .....	74
Lampiran 18. Gambar kromatogram standar adenin 1,01 µg/ml .....	75
Lampiran 19. Hasil pengukuran kurva kalibrasi O <sup>6</sup> -metilguanin .....	76
Lampiran 20. Gambar kurva kalibrasi O <sup>6</sup> -metilguanin .....	77
Lampiran 21. Hasil pengukuran linearitas O <sup>6</sup> -metilguanin .....	78
Lampiran 22. Hasil pengukuran batas deteksi ( <i>limit of detection</i> / LOD) O <sup>6</sup> -metilguanin secara statistika.....	79
Lampiran 23. Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) O <sup>6</sup> -metilguanin .....	80
Lampiran 24. Gambar instrumen yang digunakan dalam isolasi DNA .....	81
Lampiran 25. Bagan isolasi DNA menggunakan <i>QIAamp DNA Mini Kits</i> ....	83
Lampiran 26. Data pasien serta kadar DNA terisolasi.....	84
Lampiran 27. Kromatogram DNA <i>calf thymus</i> tanpa reaksi alkilasi .....	86
Lampiran 28. Kromatogram DNA <i>calf thymus</i> dengan reaksi alkilasi .....	87
Lampiran 29. Hasil analisis sampel DNA pasien .....	88
Lampiran 30. Kromatogram pasien 18 .....	89
Lampiran 31. Kromatogram pasien 19. ....	90
Lampiran 32. Sertifikat analisis O <sup>6</sup> -metilguanin .....	91
Lampiran 33. Sertifikat analisis Guanin .....	92
Lampiran 34. Sertifikat analisis N <sup>7</sup> -metilguanin .....	93
Lampiran 35. Surat keterangan lolos kaji etik.....	94

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Siklofosfamid merupakan anti neoplastik golongan agen pengalkilasi yang banyak digunakan dalam mengobati berbagai kasus keganasan. Senyawa ini bekerja dengan cara mengalkilasi basa nitrogen pada DNA sel tumor sehingga replikasi DNA dan proliferasi sel terhenti (Brundage, 2008). Siklofosfamid digunakan dalam regimen yang disesuaikan dengan jenis kanker yang diderita. Umumnya, siklofosfamid diberikan secara oral atau IV kepada pasien kanker payudara, limfoma, leukemia, dan ovarium (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005).

Seperti agen sitostatika pada umumnya, siklofosfamid memberikan efek samping pada sel – sel yang cepat membelah sehingga pasien dapat mengalami mual dan muntah, alopesia, serta penurunan jumlah sel darah. Namun, efek samping khas yang diakibatkan oleh penggunaan siklofosfamid jangka panjang adalah timbulnya kanker sekunder (*secondary cancer*) seperti leukemia myeloma akut dan limfoma (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005). Akibatnya, pasien kanker yang mendapatkan siklofosfamid dalam regimen kemoterapinya akan rentan mengidap kanker lainnya dalam waktu beberapa tahun pasca kesembuhan dari kanker pertama (Hemminki & Kallama, 1986). Keganasan sekunder ini muncul sebagai akibat sifat mutagenisitas dan karsinogenisitas dari siklofosfamid. International Agency of Research on Cancer juga telah mengkatagorikan siklofosfamid ke dalam senyawa karsinogen golongan 1 (karsinogen pada manusia) karena telah memiliki cukup bukti karsinogenisitas pada manusia serta pada hewan coba (International Agency of Research on Cancer, 2010).

Sifat mutagenisitas dan karsinogenisitas siklofosfamid tersebut muncul sebagai akibat dari alkilasi posisi tertentu pada basa nitrogen, khususnya posisi yang terlibat dalam ikatan hidrogen pada waktu penyusunan kelengkapan basa Watson-Crick sehingga terjadi kesalahan pemasangan pasangan basa nitrogen yang berakibat kepada mutasi DNA (mutagenesis) (Lyngdoh, 1994). Mutasi DNA yang permanen dan kerusakan DNA yang terakumulasi akan menyebabkan



berubahnya pola perkembangan sel sehingga sel akan berproliferasi secara berlebih dan terbentuklah sel kanker (karsinogenesis).

Atom oksigen pada posisi C nomor 6 dari guanin merupakan salah satu atom yang terlibat dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan basa komplementernya yaitu sitosin. Atom tersebut juga merupakan salah satu atom yang dapat dialkylasi oleh siklofosfamid serta agen pengalkilasi lainnya dan menyebabkan terbentuknya produk tambahan / *addition product (adduct)* DNA yaitu O<sup>6</sup>-alkilguanin (Smith dan Clark, 2011). Jika terjadi alkilasi pada posisi tersebut, maka hanya terbentuk dua ikatan hidrogen sehingga basa yang dipasangkan adalah timin dan terjadilah mutasi titik.

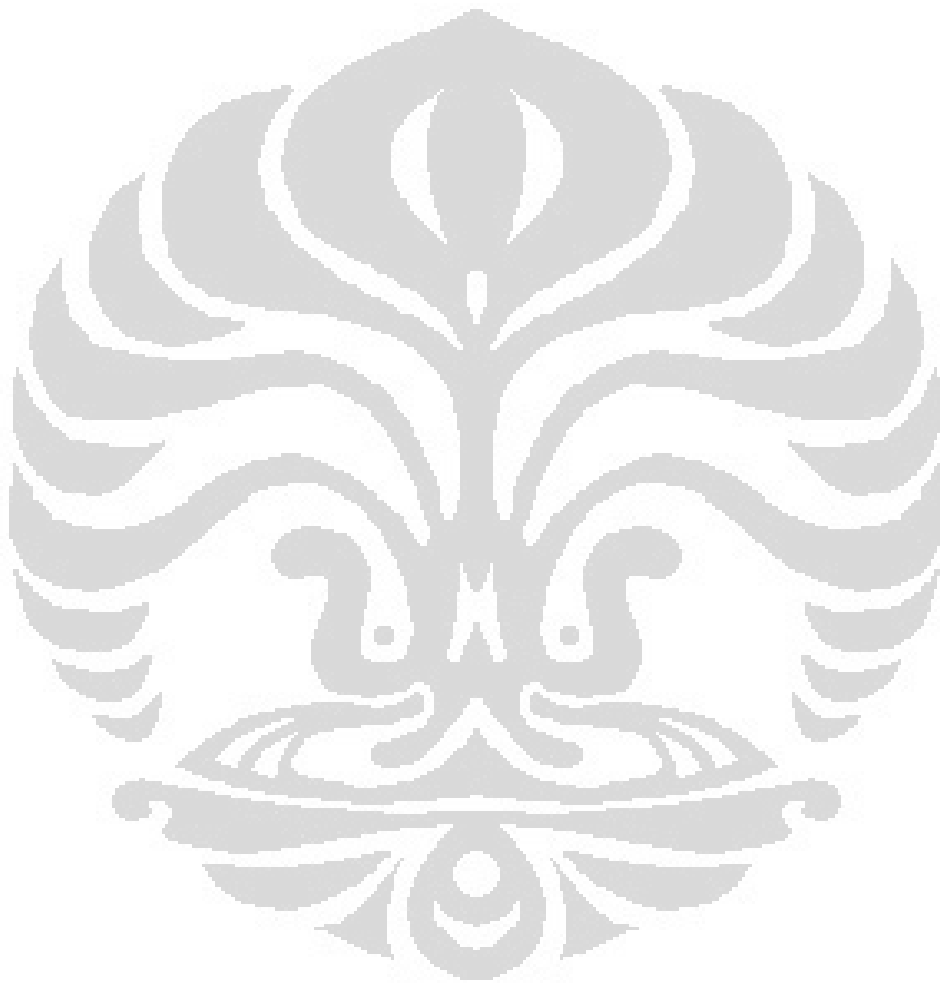
O<sup>6</sup>-alkilguanin seperti O<sup>6</sup>-metilguanin telah dapat dideteksi secara kualitatif dan kuantitatif melalui beberapa metode seperti <sup>32</sup>P-Post labelling (Stiborova, 1998), *Immunoassay, Repair assay / ada protein* (Otteneder dan Lutz, 1999), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) – Spektroskopi massa (MS) (Chadt, Sykora, Nilsson, & Vodicka, 2008), dan KCKT kolom penukar ion kuat - detektor fluoresensi (Harahap, Sari, Sari, & Herawati, 2008). Deteksi dini *adduct* ini sangat berguna untuk mengetahui resiko terbentuknya keganasan sekunder pada seorang pasien yang telah mendapatkan obat golongan agen pengalkilasi.

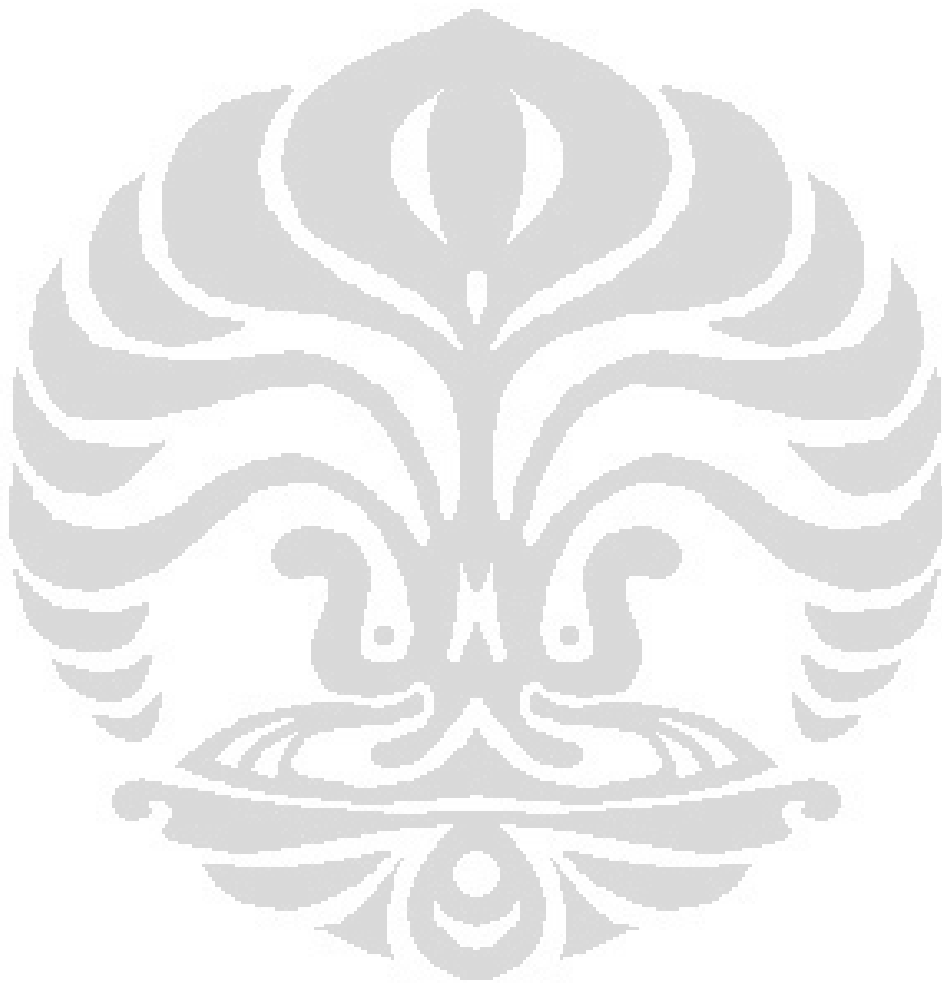
Analisis O<sup>6</sup>-alkilguanin dalam darah pasien akibat pemakaian obat golongan agen pengalkilasi telah dilakukan dalam sejumlah penelitian (Vassilis L. Souliotis, 1990), khususnya oleh Yahdiana Harahap pada tahun 2009 yang menganalisis O<sup>6</sup>-alkilguanin dalam darah pasien kanker payudara Rumah Sakit Kanker “Dharmas” yang mendapatkan regimen siklofosfamid.

Pada penelitian ini dilakukan analisis secara kualitatif O<sup>6</sup>-metilguanin pada pasien kanker yang mendapatkan regimen siklofosfamid dalam kemoterapinya. Salah satu kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah pasien telah mendapatkan kemoterapi sebanyak minimal 4 siklus karena diharapkan telah terjadi akumulasi O<sup>6</sup>-metilguanin dalam kadar yang dapat terdeteksi. Untuk mengetahui riwayat pengobatan pasien, maka terlebih dahulu dilakukan penelusuran data pemakaian obat sitotoksik pasien. Penelitian ini juga telah mendapat keterangan lolos kaji etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Analisis secara kualitatif O<sup>6</sup>-metilguanin yang terbentuk secara *in vivo* pada pasien kanker yang mendapatkan siklofosfamid dalam regimen kemoterapinya.
2. Mengetahui jumlah pasien yang O<sup>6</sup>-metilguanin terdeteksi di dalam darahnya serta mengetahui diagnosis dan regimen kemoterapi yang diterima oleh pasien tersebut.



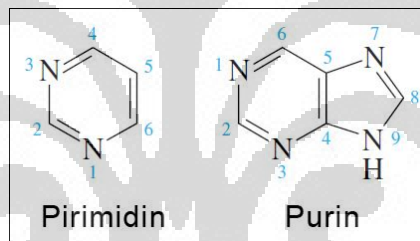


## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.9 DNA

Asam deoksiribonukleat atau *deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan suatu polimer nukleotida yang membawa informasi genetik yang dikemas dalam kromosom. Nukleotida pada DNA terdiri atas 3 komponen utama yaitu basa nitrogen, gula pentosa, dan gugus fosfat. Basa nitrogen yang menyusun DNA merupakan suatu cincin aromatik yaitu pirimidin (monosiklik) dan purin (bisiklik). Terdapat dua jenis pirimidin dalam DNA yaitu sitosin (*cytosine* atau Cyt) dan timin (*thymine* atau Thy) dan dua jenis purin yaitu guanin (*guanine* atau Gua) dan adenin (*adenine* atau Ade).



[Sumber: Carey, 2000, telah diolah kembali]

**Gambar 2.1.** Struktur pirimidin dan purin.

Monografi dari adenin dan guanin adalah sebagai berikut:

(1) Adenin (Merck, 2001)

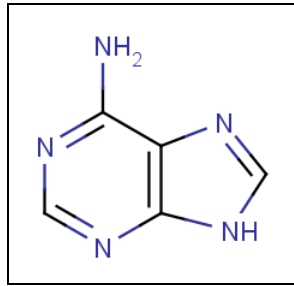
Sinonim : 6-aminopurin; 6-amino-1*H*-purin; 6-amino-3*H*-purin; 6-amino-9*H*-purin; 1,6-dihydro-6-iminopurin; 3,6-dihydro-6-iminopurin.

Rumus Molekul : C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>

Berat Molekul : 135.13

Pemerian : Jarum ortorombik, terdekomposisi pada suhu 360-365°

Kelarutan : Hampir tidak larut dalam air, eter, dan kloroform, sedikit larut dalam alkohol.



[Sumber: Rodwell, 2003, telah diolah kembali]

**Gambar 2.2.** Struktur adenin.

(2) Guanin (Merck, 2001)

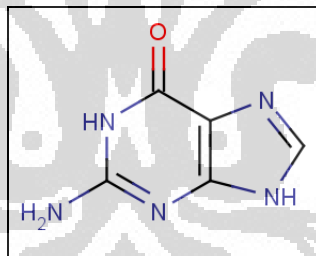
Sinonim : 2-Amino-1,7-dihidro-6*H*-purin-6-on, 2-aminohipoxantin.

Rumus Molekul :  $C_5H_5N_5O$

Berat Molekul : 151.13.

Pemerian : Amorf, terdekomposisi pada suhu diatas 360 °C.

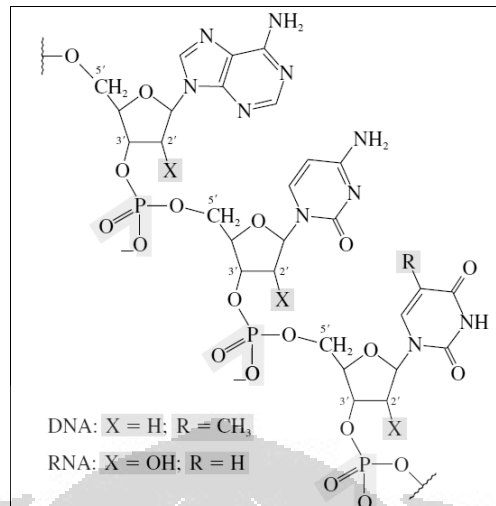
Kelarutan : Larut dalam amonia encer, kalium hidroksida, dan asam encer; hampir tidak larut dalam air, larut sebagian dalam alkohol dan eter.



[Sumber: Rodwell, 2003, telah diolah kembali]

**Gambar 2.3.** Struktur guanin.

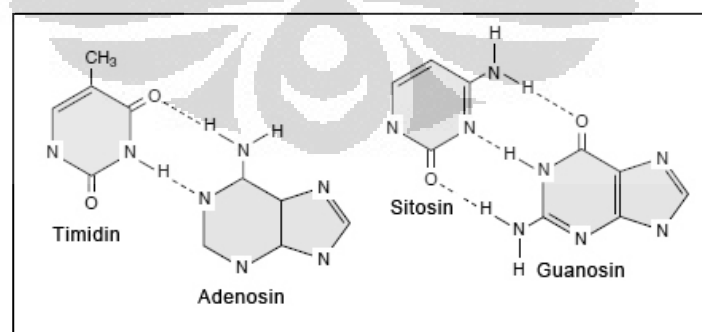
Atom karbon 1 pada gula pentosa berikatan dengan gugus nitrogen pada purin (posisi  $N^9$ ) atau pirimidin (posisi  $N^1$ ) melalui suatu ikatan N-glikosida dan atom karbon 5 pada gula pentosa berikatan dengan gugus fosfat. Satu nukleotida berikatan dengan nukleotida lainnya melalui ikatan fosfodiester antara gugus fosfat suatu nukleotida dengan atom karbon 3 pada gula pentosa nukleotida sebelumnya. Gula pentosa pada DNA adalah gula deoksiribosa (Koolman & Roehm, 2005).



[Sumber: Carey, 2000, telah diolah kembali]

**Gambar 2.4.** Struktur rantai polinukleotida.

Sesuai dengan model molekul DNA yang diajukan oleh Watson, Crick, dan Wilkins, DNA terdiri dari dua untai polinukleotida yang disatukan oleh ikatan hidrogen yang memasangkan antara basa nitrogen pada untai satu dengan untai lainnya. Pembentukan pasangan basa antara adenin dengan timin memerlukan dua ikatan hidrogen, yaitu antara N<sup>1</sup>-adenin dengan N<sup>3</sup>-timin dan N<sup>6</sup>-Adenin dengan O<sup>4</sup>-Timin. Sementara itu, pasangan basa antara guanin dan sitosin memerlukan tiga ikatan hidrogen, yaitu antara N<sup>1</sup>-guanin dengan N<sup>3</sup>-sitosin, N<sup>2</sup>-guanin dengan O<sup>2</sup>-sitosin, dan O<sup>6</sup>-guanin dengan N<sup>4</sup>-sitosin. Kedua untai tersebut kemudian berputar mengelilingi suatu sumbu sehingga menghasilkan bentuk heliks ganda (Weil & Granner, 2006).



[Sumber: Granner, 2003, telah diolah kembali]

**Gambar 2.5.** Ikatan hidrogen antara basa nitrogen pada DNA.

### 2.9.1 Isolasi DNA

DNA dapat diisolasi dari semua sel yang memiliki inti (nukleus). Tahap utama yang harus dilakukan dalam mengisolasi DNA dari berbagai sumber biologis adalah melisiskan sel untuk membebaskan molekul DNA dan memisahkan molekul DNA tersebut dari material selular lainnya. Beberapa teknik isolasi DNA yang sering digunakan adalah ekstraksi organik (*organic extraction*), ekstraksi *Chelex* (*Chelex extraction*), dan FTA atau ekstraksi fase-solid (*solid-phase extraction*) (Butler, 2012). Ekstraksi organik merupakan metode yang paling sering dilakukan karena reagensinya yang mudah didapat. Secara garis besar, mekanisme isolasi DNA adalah dengan cara melisiskan sel dengan bantuan enzim Proteinase K atau senyawa guanidin isotiosianat dan DNA yang telah lepas dari inti sel akan diekstraksi dalam alkohol.

DNA yang telah diisolasi idealnya disimpan pada suhu  $-20$  sampai  $-80^{\circ}\text{C}$ . Hal tersebut bertujuan untuk menghindari aktifitas enzim nuklease yang dapat mendegradasi DNA menjadi komponen nukleotida. Enzim nuklease juga membutuhkan magnesium sebagai katalis reaksi sehingga baik isolat DNA maupun sampel sumber isolat DNA (seperti darah) disimpan dalam tabung berisi pengawet EDTA sehingga enzim nuklease tidak dapat bekerja untuk memecah DNA dalam sampel karena ion magnesium yang ada telah dikhelat oleh EDTA (Butler, 2012).

### 2.10 Kanker

Tumor merupakan suatu keadaan dimana pertumbuhan baru jaringan di mana multiplikasi sel tidak terkontrol dan progresif (Kumala & Komala, 1996). Sel tumor tidak merespons terhadap sinyal kontrol pertumbuhan normal dan terhadap sinyal kepadatan sehingga tumbuh secara agresif di atas satu sama lain dan membentuk lapisan sel yang tidak teratur (Corwin, 2008). Tumor dapat bersifat jinak ataupun ganas. Tumor ganas atau kanker memiliki sifat invasif, dapat bermetastasis walaupun tumor primer sudah diangkat, tidak dikelilingi oleh kapsul fibrosa dan telah kehilangan fungsi dan struktur normalnya (anaplasia) (Brundage, 2008).

Kanker dikelompokkan berdasarkan asal dari sel tersebut. Sel kanker yang berasal dari jaringan epitel, seperti pada kulit, saluran gastrointestinal, saluran pernafasan, dan organ reproduksi, disebut sebagai karsinoma. Adenokarsinoma merupakan sebutan pada kanker jaringan penghasil kelenjar seperti payudara. Sementara kanker yang berasal dari jaringan ikat seperti otot, tulang, dan lemak, disebut sebagai sarkoma. Keganasan yang terjadi pada sistem sirkulasi terdiri atas leukemia (keganasan pada komponen darah pada sumsum tulang), limfoma (keganasan pada jaringan limfe), dan myeloma (keganasan pada sel plasma) (Balmer, Valley, dan Iannucini, 2005).

### 2.10.1 Etiologi Kanker

Kanker terjadi akibat suatu sel kehilangan kontrol terhadap perkembangan dan proliferasi sel normalnya. Pembentukan kanker (karsinogenesis) berlangsung dalam 4 tahap; inisiasi, promosi, transformasi, dan progresi. Tahap inisiasi merupakan tahap dimana terjadi paparan sel normal terhadap substansi karsinogenik yang menyebabkan suatu kerusakan genetik. Jika kerusakan tersebut gagal diperbaiki, maka akan terjadi mutasi seluler yang irreversibel sehingga sel mutan berkembang menjadi suatu populasi sel neoplastik (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005)

Dalam tahap promosi, terjadi pertumbuhan sel neoplastik membentuk jaringan karena terdapat senyawa karsinogen atau kondisi yang membantu perkembangan sel tersebut. Tahap transformasi terjadi ketika sel tumor berubah menjadi ganas dan tahap progresi terjadi perubahan genetik permanen yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel dan terjadi metastasis.

Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya, pada tahap inisiasi terjadi kerusakan genetik terutama pada gen yang mengontrol atas reproduksi sel. Secara garis besar, terdapat dua macam gen yang terlibat dalam regulasi perkembangan sel; proto-onkogen dan gen supresor tumor. Jika terjadi mutasi pada gen tersebut, maka perkembangan sel berlangsung secara abnormal dan tidak terkontrol.

Proto-onkogen merupakan gen yang terlibat dalam perkembangan sel secara normal seperti gen yang mentranskripsikan faktor pertumbuhan. Perubahan secara genetik pada proto-onkogen melalui mutasi titik, perubahan kromosom,



ataupun amplifikasi gen, menyebabkan proto-onkogen teraktifasi menjadi onkogen. Setelah teraktifasi, onkogen menghasilkan produk proto-onkogen normal secara berlebihan. Hal tersebut menyebabkan pertumbuhan sel terjadi secara berlebih (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005)

Gen supressor tumor merupakan gen yang mengatur dan menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel yang tidak normal. Ketiadaan gen ataupun mutasi yang terjadi pada gen tersebut menyebabkan hilangnya kontrol terhadap pertumbuhan abnormal sel. Gen supressor tumor yang sering mengalami mutasi adalah gen p53, suatu gen yang mengkode protein p53 yang dapat menghentikan pembelahan sel secara abnormal dan menginduksi apoptosis. Mutasi pada gen tersebut telah dikaitkan pada banyak kasus keganasan seperti kanker otak, payudara, kolon, paru-paru, dan serviks (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005)

#### 2.10.2 Kemoterapi

Kemoterapi atau pengobatan menggunakan agen kimia merupakan salah satu dari empat metode penatalaksanaan kanker selain pembedahan, terapi radiasi, dan terapi biologi (imunoterapi) (Corwin, 2008). Berdasarkan tujuan penggunaannya, kemoterapi dibedakan menjadi *neoadjuvant chemotherapy* dan *adjuvant chemotherapy*. *Neoadjuvant chemotherapy* merupakan kemoterapi yang diberikan sebelum pembedahan yang bertujuan untuk memperkecil ukuran tumor sementara *adjuvant chemotherapy* merupakan kemoterapi yang diberikan setelah pembedahan yang bertujuan untuk menghilangkan sisa sel kanker serta mencegah metastasis (Brundage, 2008).

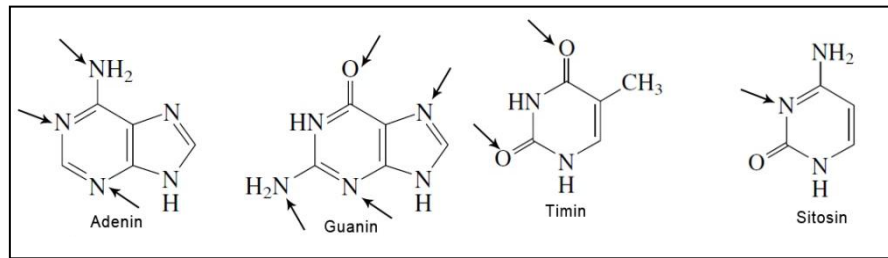
Pada umumnya, agen antikanker bekerja dengan cara mengganggu salah satu dari rangkaian proses selular yaitu proses replikasi DNA, sintesis protein, dan pembelahan sel. Namun beberapa agen antikanker juga dapat bekerja sebagai hormon atau antagonis hormon, antibodi monoklonal, dan interferon. Agen antikanker dapat diberikan secara tunggal, namun akan lebih baik jika diberikan secara kombinasi antara agen antikanker yang memiliki mekanisme dan tempat kerja yang berbeda sehingga akan timbul efek sinergis / potensiasi. Selain itu, pemberian secara kombinasi dapat membantu menghindari atau memperlambat resistensi sel terhadap agen antikanker (Finkel, Clark, & Cubeddu, 2009)

Pemberian agen antikanker secara kombinasi selalu dirumuskan dalam suatu protokol yang di dalamnya mengatur mengenai jenis agen antikanker dan dosis yang digunakan, cara, serta waktu pemberian. Pemberian kemoterapi sebagian besar dilakukan dengan memberikan jarak waktu antara satu pemberian dengan pemberian berikutnya. Hal tersebut dilakukan agar pasien dapat pulih dari efek toksisitas kemoterapi. Tiap periode kemoterapi disebut sebagai siklus yang terdiri dari 21-28 hari (Brundage, 2008) dan dalam satu set kemoterapi sebagian besar terdiri dari 6 siklus. Penerapan pengobatan dalam siklus ini juga berkaitan dengan kemampuan agen dalam mengurangi angka sel kanker.

### 2.11 Agen Pengalkilasi

Agen pengalkilasi merupakan salah satu agen antikanker yang digunakan untuk mengobati berbagai kasus kanker. Senyawa yang tergolong ke dalam agen pengalkilasi memiliki kemampuan untuk mengikat gugus alkil secara kovalen dengan gugus lain pada suatu molekul biologi di bawah kondisi fisiologis (larutan akueous, suhu 37 °C dan pH 7,4). Agen ini berinteraksi dengan sel yang sedang berada dalam berbagai fase siklus sel, baik dalam fase istirahat maupun fase proliferasi (fase G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, dan M) sehingga golongan ini dikenal sebagai *nonspecific-phase alkylating agent* (Avendanõ & Menéndez, 2008)

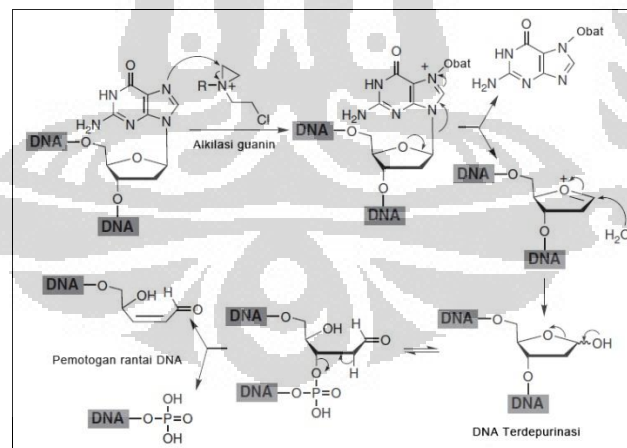
Pengikatan gugus alkil secara kovalen dengan molekul biologi terjadi karena adanya penyerangan gugus elektrofil agen pengalkilasi kepada gugus nukleofil pada suatu molekul biologi seperti gugus –SH pada protein, atom –N- pada protein atau basa DNA, dan atom =O pada basa DNA atau fosfat (Brunton dan Parker, 2008). Pusat nukleofil basa DNA adalah pada posisi N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup>, dan O<sup>6</sup> pada guanin; N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>, dan N<sup>4</sup> pada adenin; N<sup>3</sup>, O<sup>2</sup> dan O<sup>4</sup> pada timin; dan N<sup>3</sup> pada sitosin (Smith & Clark, 2011). Urutan nukleofilisitas atom pada basa nitrogen adalah N<sup>7</sup>-guanin > N<sup>1</sup>-adenin > N<sup>3</sup>-sitosin > N<sup>3</sup>-timin > O<sup>6</sup>-guanin (Avendanõ dan Menéndez, 2008). Karena memiliki nukleofilisitas yang paling tinggi, posisi N<sup>7</sup> menjadi posisi yang paling rentan mengalami alkilasi (Smith & Clark, 2011).



[Sumber: Carey, 2000, telah diolah kembali]

**Gambar 2.6.** Posisi penyerangan basa DNA oleh agen pengalkilasi.

Alkilasi dapat bersifat monofungsional dan bifungsional. Alkilasi monofungsional terjadi ketika agen pengalkilasi mengalkilasi satu posisi pada DNA saja sehingga struktur dan dinamika DNA terganggu. Basa dari DNA yang teralkilasi akan cenderung memiliki ikatan N-glikosida yang tidak stabil sehingga basa teralkilasi akan cenderung mudah lepas dari kerangka DNA. Akibatnya, timbul keadaan depurinasi (gula apurinik) dan hilangnya informasi genetik yang tidak dapat diperbaiki oleh sel (Bont & Larebeke, 2004). Selanjutnya, DNA dapat mengalami pemotongan dan fragmentasi sebagai akibat dari beberapa reaksi hidrolisis pada tulang punggung DNA (Avendanõ dan Menéndez, 2008) sehingga menyebabkan kematian sel (Maccubbin, Caballes, Riordan, *et al.*, 1991).



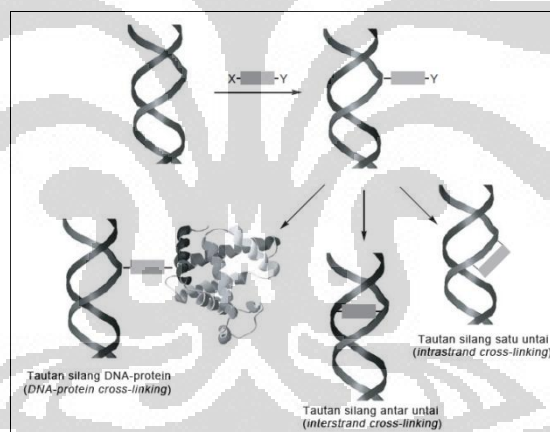
[Sumber: Avendanõ dan Menéndez, 2008, telah diolah kembali]

**Gambar 2.7.** Fragmentasi DNA yang disebabkan oleh alkilasi pada guanin.

Alkilasi monofungsional juga dapat menyebabkan kesalahan pemasangan basa. Hal tersebut terjadi jika alkilasi berlangsung pada atom yang terlibat dalam ikatan hidrogen pada penyusunan kelengkapan pasangan basa Watson-Crick. Jika

terjadi kesalahan pemasangan basa (mutasi), maka resiko mutagenisitas dan karsinogenisitas meningkat. Sifat promutagenik basa DNA teralkilasi dimiliki oleh O<sup>6</sup>-alkilguanin dan O<sup>4</sup>-alkiltimin. O<sup>6</sup>-alkilguanin mampu menginduksi mutasi transisional GC → AT. Sementara itu, O<sup>4</sup>-alkiltimin mampu menginduksi mutasi transisional TA → CG (Lyngdoh, 1994).

Agen pengalkilasi yang bersifat bifungsional (memiliki dua gugus elektrofil yang fungsional) dapat mengalkilasi dua basa DNA (*cross-linking* atau tautan silang). Berdasarkan letak kedua basa DNA, tautan silang dibedakan menjadi tautan silang dalam satu untai DNA (*intrastrand cross-linking*) dan antar untai DNA (*interstrand cross-linking*). Tautan silang juga dapat terjadi antara basa DNA dengan protein (*DNA-protein cross-linking*). Tautan silang antar untai DNA menyebabkan kegagalan pemisahan dua untai DNA proses replikasi DNA sehingga DNA gagal direplikasi (Avendanõ & Menéndez, 2008).



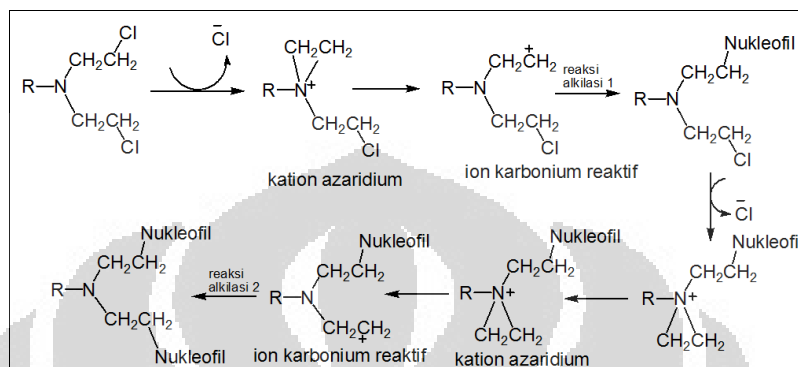
[Sumber: Avendanõ dan Menéndez, 2008, telah diolah kembali]

**Gambar 2.8.** Tautan silang pada agen pengalkilasi bifungsional.

Terdapat beberapa golongan agen pengalkilasi yang biasa digunakan dalam kemoterapi yaitu nitrogen mustar, etilenimin, alkil sulfonat, nitrosurea, triazen, metilhidrazin, dan kompleks platina.

Nitrogen mustar bekerja dengan membentuk senyawa perantara berupa senyawa aziridium, suatu derivat etilenimonium siklik yang berbentuk cincin antara etil dengan amin yang bermuatan positif akibat lepasnya atom Cl sebagai gugus yang mudah lepas (*easy leaving group*) (Hemminki & Kallama, 1986,

Smith & Clark, 2011). Kation aziridium merupakan senyawa antara dimana cincin tersebut akan terbuka dan membentuk ion karbonium reaktif yang menyerang gugus nukleofil seperti atom N, O, dan/atau S yang terdapat pada struktur asam amino, asam nukleat, dan protein.

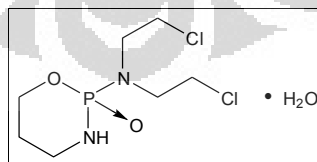


[Sumber: Avendanõ & Menéndez, 2008 dan Smith & Clark, 2011, telah diolah kembali]

**Gambar 2.9.** Reaksi alkilasi nitrogen mustard dengan nukleofil.

## 2.12 Siklofosfamid

Siklofosfamid merupakan senyawa antikanker golongan agen pengalkilasi dari golongan nitrogen mustard. Sama seperti agen pengalkilasi lainnya, siklofosfamid memberikan aksi sitostatika dengan cara mengalkilasi basa nitrogen dalam DNA manusia. Siklofosfamid digunakan secara luas untuk mengobati berbagai macam jenis keganasan seperti kanker payudara, leukemia limfositik akut dan kronis, limfoma non-Hodgkin's, kanker ovarium, sarkoma tulang dan jaringan lunak, rhabdomiosarkoma, dan tumor Wilms (Smith & Clark, 2011).



[Sumber: Merck, 2001c]

**Gambar 2.10.** Struktur siklofosfamid.

Siklofosfamid biasanya diberikan dalam bentuk oral maupun injeksi intravena. Selain itu, siklofosfamid juga dapat diberikan secara intramuscular, intraperitoneal, intrapleural dan intra-arterial. Siklofosfamid secara tunggal

diberikan secara oral dengan dosis 60-120 mg/m<sup>2</sup> selama 14 hari. Regimen tersebut diberikan untuk pasien limfoma dan leukemia limfositik kronik serta kemoterapi adjuvant pada kanker payudara. Siklofosfamid dalam kombinasi dengan agen antikanker lainnya diberikan pada dosis yang lebih tinggi, yaitu 500-1500 mg/m<sup>2</sup> secara intravena tiap 2-4 minggu pada pasien tanpa kelainan hematologis. (Brunton & Parker, 2008; Nafriadi & Gan, 2007).

Protokol kemoterapi yang menyertakan siklofosfamid dalam regimennya antara lain adalah sebagai berikut. Pada pengobatan kanker payudara, siklofosfamid digunakan dalam protokol AC (*Doxorubicin* + 600mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide*), FAC (*5-Fluorouracil* + *Doxorubicin* + 500mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide*), CMF (600mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide* + *Methotrexate* + 5-Fluorourasil), dan TC (*Paclitaxel* + 800mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide*). Pada pengobatan Limfoma Non Hodgkin's, siklofosfamid digunakan dalam protokol CVP (800mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide* + *Vincristine* + *Prednisolone*) dan CHOP (800mg/m<sup>2</sup> *Cyclophosphamide* + *Doxorubicin* + *Vincristine* + *Prednisolone*). Pada pengobatan kanker ovarium, 750 mg/m<sup>2</sup> siklofosfamid diberikan bersama paklitaxel atau doksorubisin (Balmer, Valley, & Iannucini, 2005).

Efek samping yang ditimbulkan oleh penggunaan siklofosfamid adalah sistitis hemoragik dan leukopenia berat. Selain itu, obat ini juga menyebabkan anoreksia, mual, muntah, dan alopesia. Efek samping khas yang terjadi pada penggunaan siklofosfamid ataupun agen pengalkilasi lainnya serta radiasi adalah timbulnya kanker sekunder. Tipe kanker yang paling sering timbul adalah leukemia myeloid akut atau sindrom mielodisplastik yang muncul beberapa bulan hingga tahun pasca penghentian pengobatan (Penn, 1985; Balmer, Valley, & Iannucini, 2005).

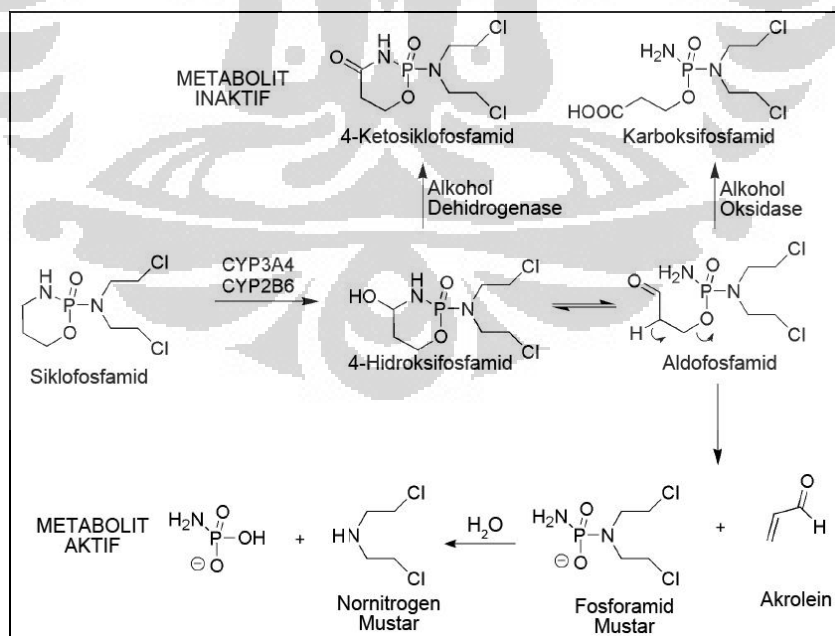
### 2.12.1 Farmakokinetika Siklofosfamid

Jika diberikan secara oral, siklofosfamid akan diabsorpsi dengan baik dan bioavailabilitasnya mencapai  $\geq 75\%$ . Siklofosfamid didistribusi secara luas di dalam jaringan dan dapat melewati sawar darah otak (Sweetman, 2007). Untuk memberikan efek farmakologis, siklofosfamid harus dimetabolisme di hati oleh enzim sitokrom P450 isoenzim CYP2B6 dan 3A4/5 menjadi bentuk metabolit

aktifnya. Senyawa utama dan metabolit siklofosfamid kemudian akan dieliminasi di urin dengan waktu paruh berkisar antara 4 – 6 jam (Smith dan Clark, 2011).

Langkah pertama dari metabolisme siklofosfamid adalah hidroksilasi siklofosfamid oleh enzim CYP2B6 dan CYP3A4 menjadi 4-hidroksi siklofosfamid. Senyawa tersebut berada dalam keadaan kesetimbangan dengan bentuk asikliknya yaitu aldofosfamid. Alkohol dehidrogenase hati kemudian mengoksidasi menjadi 4-ketosiklofosfamid dan aldehyd oksidase mengoksidasi aldofosfamid menjadi karboksifosfamid. Kedua metabolit tersebut merupakan metabolit inaktif dari siklofosfamid. Hal tersebutlah yang menjelaskan alasan mengapa siklofosfamid memiliki efek hepatotoksik yang rendah.

Metabolit aktif dari siklofosfamid akan dibawa melalui sirkulasi ke seluruh tubuh. Aldofosfamid kemudian akan teraktivasi melalui reaksi eliminasi spontan yang menghasilkan akrolein dan fosforamid mustar, suatu metabolit aktif yang memiliki aktifitas sitotoksik. Fosforamid mustar juga dapat dihidrolisis menjadi nornitrogen mustar yang juga masih aktif (Avendanõ & Menéndez, 2008). Fosforamid mustar dan fosforamid mustar bertanggungjawab terhadap efek antitumor, sementara akrolein merupakan suatu senyawa yang elektrofil sehingga memiliki sifat toksisitas terhadap ginjal dan kandung kemih. (Schmall, 1985).



[Sumber: Smith dan Clark, 2011, telah diolah kembali]

**Gambar 2.11.** Metabolisme siklofosfamid.

### 2.13 DNA Adduct

*Adduct* atau *addition product* merupakan senyawa yang dibentuk akibat pengikatan secara kovalen senyawa karsinogen yang elektrofil pada komponen biologis yang nukleofil (Brunton & Parker, 2008). Oleh karena itu, adduct dapat terbentuk dari basa DNA atau asam amino pada protein seperti albumin dan hemoglobin (Farmer, 1995).

Karsinogen dapat membentuk ikatan kovalen karena sifat elektrofil alami (bekerja langsung) atau karena metabolisme selular yang terjadi dalam tubuh host sehingga terbentuk metabolitnya yang elektrofil (bekerja secara tidak langsung). Modifikasi struktur tersebut mengakibatkan DNA atau protein yang terikat menjadi malfungsi. Kerusakan pada DNA tersebut diyakini sebagai penyebab dari terbentuknya tumor akibat terjadinya mutasi genetik.

Terdapat dua macam mekanisme karsinogen dalam mengganggu fungsi normal DNA melalui pembentukan DNA *adduct* yaitu menginterkalasi dan mengalkilasi. Agen penginterkalasi biasanya berupa senyawa dengan ukuran yang besar serta planar. Senyawa tersebut berikatan dengan DNA pada posisi tertentu dan menyebabkan DNA *adduct* tersebut menyisip di antara basa DNA yang berdekatan dan menyebabkan tergesernya rangka basa nitrogen sehingga terjadi kesalahan pada pemasangan basa nitrogen yang komplemen dengan template pada saat replikasi DNA. Contoh dari karsinogen yang dapat menginterkalasi DNA adalah polisiklik aromatik hidrokarbon (benz(a)piren, 7,12-dimetilbenz[a]antrasen, dll), aflatoksin (AFB1, AFB2), hormon (tamoksifen), dan amin aromatis heterosiklik (Otteneder dan Lutz, 1999).

DNA *adduct* teralkilasi memberikan efek biologis yang berbeda bergantung pada posisi alkilasinya yaitu efek sitostatik dan mutagenik. Alkilasi pada posisi N<sup>7</sup> pada basa guanin menimbulkan efek sitostatik karena dapat menyebabkan depurinasi DNA yang kemudian dilanjutkan dengan reaksi hidrolisis sehingga terjadi fragmentasi DNA. Pada agen pengalkilasi bifungsional, alkilasi N<sup>7</sup>-guanin pada kedua rantai DNA (*inter-strand cross linking*) menyebabkan puntiran DNA tidak dapat terbuka sehingga proses replikasi DNA terhenti (Avendanõ dan Menéndez, 2008).



Sementara itu, alkilasi pada atom yang terlibat dalam ikatan hidrogen pada penyusunan kelengkapan pasangan basa Watson-Crick seperti posisi O<sup>6</sup>-guanin, dan O<sup>4</sup>-timin, menyebabkan kesalahan pemasangan basa komplemen pada proses replikasi DNA. Akibatnya terjadi mutasi titik (mutagenesis) yang jika terakumulasi akan menyebabkan kanker (karsinogenesis) (Lyngdoh, 1994).

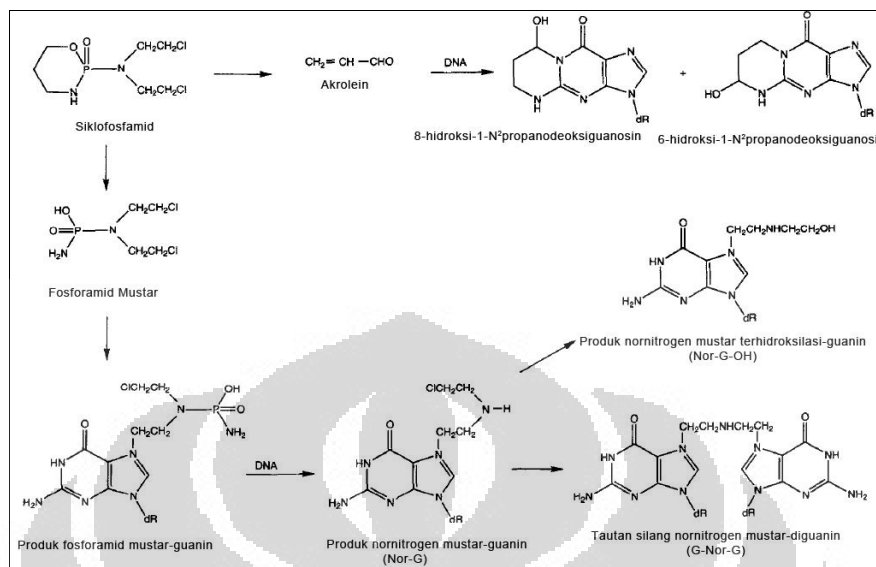
DNA *adduct* teralkilasi dalam tubuh manusia dapat dideteksi dan dikuantitasi menggunakan beberapa metode. seperti pelabelan radioaktif (<sup>32</sup>P-*Postlabelling*), spektrofotometri massa, teknik imunokimia seperti radioimmunoassay dan ELISA, spektrometri serapan atom, elektroforesis gel, HPLC dengan detektor elektrokimia ataupun HPLC dengan detektor fluoresensi (Sharma dan Farmer, 2004). Pemilihan metode disesuaikan dengan jenis *adduct* yang akan dideteksi. DNA *adduct* dapat menjadi penanda terhadap resiko kanker sehingga dapat digunakan untuk baik untuk kemoprevensi kanker ataupun untuk studi epidemiologi pajanan karsinogen pada suatu komunitas.

Untuk dapat dideteksi, DNA *adduct* harus dibebaskan terlebih dahulu dari untai DNA dengan metode hidrolisis untuk memutus ikatan fosfodiester. Hidrolisis dapat dilakukan dalam 3 cara yaitu dengan hidrolisis dalam lingkungan netral, lingkungan asam, serta hidrolisis enzimatik. Hidrolisis dalam lingkungan netral menggunakan dapar natrium kakodilat 0,01M pH 7,0 pada suhu 100 °C selama 30 menit. Hidrolisis dalam kondisi asam menggunakan asam klorida 0,1 N pada suhu 70 °C selama 30 menit. Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim DNase I, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit kemudian ditambahkan diesterase bisa ular dan fosfatase alkali E.coli, kemudian diinkubasi lagi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Warren, 1984).

#### 2.13.1 DNA *Adduct* Akibat Alkilasi Siklofosfamid

Sebagai agen pengalkilasi, siklofosfamid membentuk 3 jenis *adduct* utama yaitu substitusi nornitrogen mustar pada posisi N<sup>7</sup> pada guanin. Ketiga jenis *adduct* utama tersebut adalah N-(2-kloroetil)-N-[2-(7-guaninil)etil]amin (Nor-G); N-(2-hidroksietil)-N-[2-(7-guaninil)etil]amin (Nor-G-OH); dan N,N-bis[2-(7-guaninil)etil]amin (G-Nor-G). Selain itu, akrolein juga dapat membentuk *adduct* dengan berikatan pada posisi N<sup>2</sup> pada guanin sehingga terbentuk 8-hidroksi-1-

$N^2$ propanodeoksiguanosin dan 6-hidroksi-1- $N^2$ propanodeoksiguanosin. Keduanya terbentuk dalam jumlah yang kecil (Hemminki dan Kallama, 1986).



[Sumber: Lawley & Phillips, 1996, telah diolah kembali]

**Gambar 2.12.** Pembentukan adduct DNA antara siklofosfamid dengan guanin.

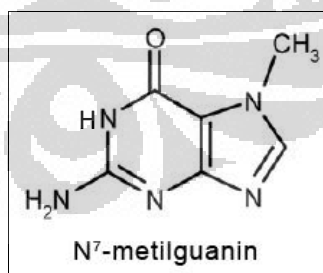
Basa DNA teralkilasi yang dapat terbentuk oleh agen pengalkilasi seperti siklofosfamid di antaranya adalah (Guliaev & Singer, 2004):

(1)  $N^7$ -metilguanin

Sinonim : 7-Metilguanin, Amino-6H-7-metilpurin

Rumus Molekul :  $C_6H_7N_5O$

Berat Molekul : 165,2



[Sumber: Chadt, Sykora, Nilsson, & Vodicka, 2008, telah diolah kembali]

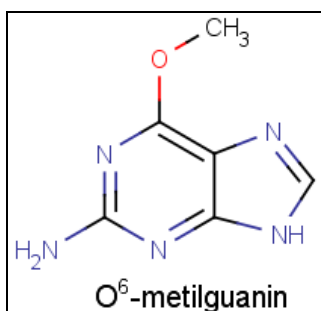
**Gambar 2.13.** Struktur  $N^7$ -metilguanin.

(2)  $O^6$ -metilguanin

Sinonim : 6-Metoksiguanin, 2-Amino-6-metokspurin

Rumus Molekul :  $C_6H_7N_5O$

Berat Molekul : 165,2



[Sumber: Chadt, Sykora, Nilsson, & Vodicka, 2008, telah diolah kembali]

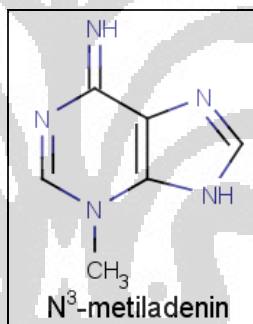
**Gambar 2.14.** Struktur O<sup>6</sup>-metilguanin.

(3) N<sup>3</sup>-metiladenin

Sinonim : 3-Metiladenin, 6-Amino-3-metilpurin

Rumus Molekul : C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>

Berat Molekul : 149,2



[Sumber: Chadt, Sykora, Nilsson, & Vodicka, 2008, telah diolah kembali]

**Gambar 2.15.** Struktur N<sup>3</sup>-metiladenin.

Sebagai senyawa turunan guanin dan adenin, DNA *adduct* siklofosfamid memiliki kemiripan sifat fisikokimia dengan guanin dan adenin termasuk profil kelarutannya. Metode yang pernah digunakan untuk analisis basa DNA teralkilasi akibat alkilasi siklofosfamid antara lain adalah sebagai berikut:

- (1) Penentuan rasio O<sup>6</sup>-alkilguanin dan tautan-silang terhadap N<sup>7</sup>-alkilguanin yang terbentuk pada reaksi zat pengalkil dengan DNA *in vitro*. menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan fase geras metanol – kalium dihidrogenfosfat 0,01 M pH 4 dengan komposisi 50:50, kecepatan alir 1,0 ml/menit, dan menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm (Harahap, 2003).

- (2) Analisis *adduct* hasil reaksi siklofosfamid dengan guanin dan DNA *calf thymus in vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom penukar kation kuat, fase gerak amonium format-metanol (94:6) dengan konsentrasi akhir amonium format adalah 30 mM pH 3,95, kecepatan alir 1,2 ml/menit, suhu kolom 30°C dan respon analit diukur menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 274 nm. (Harahap, Sari, Sari, & Herawati, 2008)
- (3) Analisis *adduct* DNA setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin secara berulang pada tikus menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom penukar kation kuat, fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM, kecepatan alir 1,5 ml/menit, suhu kolom 30°C dan respon analit diukur menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. (Harahap, Andalusia, Radji, & Natalia, 2009).

## 2.14 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### 2.14.1 Teori Dasar KCKT

Kromatografi merupakan teknik pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sendiri merupakan suatu teknik pemisahan sampel dalam fase diam dan fase gerak dimana sistem pemisahan dilengkapi dengan pompa yang dapat memberikan tekanan hingga 5000 psi sehingga dapat pemisahan dapat berlangsung lebih cepat namun tetap efisien (Harmita, 2006).

Keuntungan yang didapat ketika menggunakan KCKT diantaranya adalah kolom yang dapat dipakai kembali, pemasukkan sampel dapat berlangsung secara otomatis, deteksi dan kuantitasi dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa detektor sehingga dapat meningkatkan akurasi dan presisi analisis (Braithwaite & Smith, 1996). Selain itu, waktu analisisnya yang cepat, daya pisahnya yang baik, peka, pemilihan kolom dan eluen yang bervariasi, dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, cuplikan dapat diperoleh kembali, dan dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat kecil.

Berdasarkan mekanisme pemisahan analit dan jenis fase yang berperan, KCKT dibagi 4 macam yaitu kromatografi adsorpsi, partisi, eksklusi dan penukar ion (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Kromatografi adsorpsi atau kromatografi cair – padat merupakan kromatografi yang pemisahannya didasarkan pada kompetisi analit pada permukaan aktif fase diam yaitu silika gel ataupun alumina. Kromatografi adsorpsi digunakan untuk pemisahan isomer struktur dan untuk pemisahan solute dengan gugus fungsional yang berbeda.

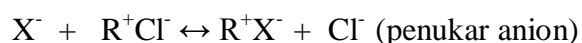
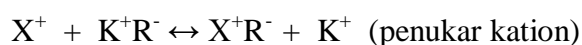
Kromatografi partisi merupakan kromatografi yang pemisahannya didasarkan pada partisi zat terlarut antara dua pelarut yang tidak bercampur, yaitu fase diam dan fase gerak yang didasarkan pada perbedaan polaritasnya. Kromatografi partisi fase normal merupakan suatu sistem kromatografi dimana fase diam bersifat lebih polar dibandingkan dengan fase gerak sementara kromatografi partisi fase terbalik merupakan suatu sistem kromatografi dimana fase gerak bersifat lebih polar dibandingkan dengan fase diamnya.

Kromatografi eksklusi atau kromatografi permeasi merupakan suatu sistem kromatografi yang pemisahannya didasarkan pada perbedaan ukuran molekul zat terlarut. Fase diam dari kromatografi ini adalah silika atau polimer yang porus. Molekul solut yang memiliki BM yang besar akan terelusi terlebih dahulu sementara molekul solut dengan BM yang kecil akan tertahan di dalam porus fase diam sehingga akan terelusi lebih lama .

#### 2.14.2 Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion merupakan suatu sistem kromatografi yang pemisahannya didasarkan pada persaingan ion pada sampel dengan ion lawan yang terdapat dalam fase gerak untuk berikatan dengan resin penukar ion tetap yang terdapat dalam fase diam.

Hubungan interaksi antara ion pada sampel, ion lawan pada fase gerak, serta ion penukar pada fase stasioner dapat dijelaskan menggunakan ilustrasi di bawah ini:



Dimana R adalah fase diam ( $R^-$  adalah fase diam penukar kation dan  $R^+$  adalah fase diam penukar anion); X adalah sampel ( $X^-$  untuk sampel anionik dan  $X^+$  untuk sampel kationik); serta  $K^+$  dan  $Cl^-$  adalah ion lawan pada fase gerak. (Harland, 1994)

Kolom yang digunakan dalam kromatografi jenis ini memiliki ciri-ciri yaitu terdapat gugus yang bermuatan yang terikat secara kovalen pada fase diamnya. Fase penyangga pada fase diam yang paling sering digunakan adalah polistirena divinilbenzen (PS-DVB) atau polistiren resin (Vogel, 1989). Sementara itu, kolom penukar ion dibedakan berdasarkan muatannya. Fase diam pada kolom penukar anion membawa muatan positif. Berdasarkan kebasaaan gugusnya, terdapat dua macam penukar anion; penukar anion kuat (*strong anion exchange* / SAX) yang menggunakan gugus trialkilamonium, dan penukar kation lemah (*weak anion exchange* / WAX) yang menggunakan gugus amin primer. Kromatografi jenis ini digunakan untuk memisahkan sampel campuran asam atau senyawa yang bersifat anionik lainnya.

Sementara pada kolom penukar kation, fase diamnya membawa muatan negatif. Berdasarkan keasaman gugusnya, terdapat dua macam penukar kation; penukar kation kuat (*strong cation exchange* / SCX) yang menggunakan gugus sulfonat ( $-SO_3^-$ ), dan penukar kation lemah (*weak cation exchange* / WCX) yang menggunakan gugus karboksilat. Kromatografi jenis ini digunakan untuk memisahkan kation seperti basa-basa yang terprotonasi. (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997).

SCX dan SAX memiliki rentang pH yang lebih besar dibandingkan dengan WCX dan WAX, sehingga pada rentang pH tersebut, resin penukar ion yang terdapat dalam kolom penukar ion kuat tetap dapat terionisasi. Oleh karena itu, sampel yang terionisasi pada pH sangat rendah atau sangat tinggi akan lebih efektif jika dipisahkan dengan menggunakan kolom penukar kation kuat atau penukar anion kuat.

Fase gerak merupakan komponen yang sangat penting dalam KCKT penukar ion. Fase gerak yang digunakan biasanya merupakan larutan terdapat, dan mengandung sejumlah kecil pelarut organik yang bercampur dengan air (seperti metanol dan asetonitril) (Snyder & Kirkland, 1979).

Pada kromatografi penukar ion, sampel harus berada dalam keadaan terion sehingga bisa ditahan oleh gugus fungsi yang berada di fase diam. Oleh karena itu, fase gerak harus berada pada pH yang sesuai agar ionisasi sampel dapat terjadi dengan maksimal (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997). Peningkatan pH akan meningkatkan ionisasi sampel dan retensi pada pemisahan asam dengan penukar anion, sementara penurunan pH akan membantu retensi basa pada penukar kation. Variasi pH seringkali dilakukan untuk mengubah selektivitas pada pemisahan menggunakan penukar ion.

Pemakaian dapar pada fase gerak KCKT penukar ion digunakan untuk menjaga agar pH fase gerak tetap stabil sehingga ionisasi analit dalam detektor selalu konstan. Pemilihan dapar dapat biasanya didasarkan pada kisaran aktifitas pH dapar tersebut yang disesuaikan dengan pKa analit. pH optimum dapar untuk analisis basa menggunakan pertukaran kation adalah 1 sampai 2 dibawah nilai pKa analit (Haky, 2002). Pemilihan dapar juga dapat didasarkan pada gugus fungsionalnya yang mirip dengan gugus fungsional analit. Misalnya, dapar asetat dipakai untuk mengelusi asam organik atau dapar fosfat dipakai untuk mengelusi nukleotida (Harmita, 2006). Kekuatan dapar harus diperhatikan agar pH fase gerak tetap dapat dikendalikan. Namun harus dihindari konsentrasi dapar yang hampir jenuh karena dapat terjadi rekristalisasi pada penurunan suhu sehingga dapat menyumbat kolom (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997).

Garam pada dapar fase gerak juga menyediakan ion lawan yang berperan pada proses retensi ion sampel pada penukar ion fase stasioner. Semakin besar muatan ion lawan, maka semakin kuat kemampuan ion untuk menukar (*displace*) ion sampel pada fase stasioner sehingga waktu retensi zat menurun (Gooding, 2002). Kekuatan ion lawan pada penukaran kation adalah  $H^+$  (lemah)  $< Na^+$   $< NH_4^+$   $< K^+$   $< Ca^{2+}$  (kuat). Sementara pada penukar anion adalah  $F^-$  (lemah)  $< OH^-$   $< asetat^-$   $< Cl^-$   $< NO_3^-$   $< sitrat^-$  (kuat) (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997).

Penambahan pelarut organik yang bercampur dengan air seperti metanol atau asetonitril berfungsi untuk meningkatkan selektivitas zat serta memperbaiki kelarutan analit. Metanol biasanya lebih banyak dipakai untuk memisahkan sampel ionik dibandingkan dengan asetonitril karena kelarutan dapar yang lebih

tinggi jika dalam campuran air-metanol. Peningkatan jumlah pelarut organik dalam fase gerak dapat menurunkan waktu retensi (Snyder & Kirkland, 1979).

### 2.14.3 Instrumentasi KCKT

Instrumentasi KCKT pada terdiri atas enam komponen utama yaitu: (1) wadah fase gerak (reservoir eluen), (2) sistem penghantaran fase gerak (pompa), (3) alat untuk memasukkan sampel (injektor) , (4) kolom, (5) detektor, (6) integrator.

#### 2.14.3.1 Reservoir Eluen

Wadah fase gerak harus bersih dan inert dan dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Gas dalam fase gerak harus dihilangkan terlebih dahulu (*degassing*) agar tidak menyumbat kolom dan merusak detektor. Selain itu, eluen juga harus bebas dari partikel sehingga harus disaring dengan membran 0,45 µm sebelum digunakan, terutama eluen yang mengandung dapar, garam, atau senyawa kimia lain yang sukar larut. Ada baiknya jika eluen yang digunakan memiliki derajat KCKT (*HPLC grade*) (Gandjar & Rohman, 2007).

#### 2.14.3.2 Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Seluruh komponen pompa harus terbuat dari bahan yang inert terhadap eluen. Pompa sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 ml/menit (Gandjar & Rohman, 2007).

#### 2.14.3.3 Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom.

#### 2.14.3.4 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing – masing komponen. Perhubungan antara kolom dengan detektor dan dengan injektor haruslah tanpa ruang kosong. Kolom standar memiliki diameter dalam antara 2-6 mm dan panjang yang berkisar antara 5-100 cm. Bahan yang digunakan untuk mengisi



kolom sebaiknya berupa partikel yang berbentuk bulat dan berukuran kecil sehingga tidak menyebabkan hambatan terhadap aliran pelarut serta menghasilkan pemisahan yang baik. Pada KCKT penukar ion untuk pemisahan nukleotida, digunakan kolom penukar kation dengan penyangga polistiren divinil benzen dan fase terikat berupa asam sulfonat.

Suatu kolom harus dinilai efisiensinya untuk mengetahui kemampuan kolom dalam menghasilkan puncak yang sempit sehingga pemisahan akan lebih baik. Efisiensi tersebut diketahui dengan cara menghitung jumlah plat teoritis (*theoretical plate* atau  $N$ ) serta HETP (*Height Equivalent to a Theoretical Plate* atau HETP) yaitu panjang kolom yang diperlukan untuk mencapai keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Suatu keadaan kromatografi yang ideal memiliki nilai  $N$  yang lebih besar dari 2500 dan nilai HETP yang sekecil mungkin (Satiadarma & Mulja, 2004). Rumus untuk menghitung jumlah plat teoritis ( $N$ ) dan HETP dapat dilihat di Lampiran 1.

#### 2.14.3.5 Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat serta mengukur jumlahnya. Pemilihan detektor disesuaikan dengan sifat analit yang akan dideteksi. Detektor yang baik idealnya memiliki sensitivitas yang tinggi, responnya tidak dipengaruhi variasi parameter, tidak merusak analit, serta mampu memberikan informasi yang kualitatif. Beberapa jenis detektor yang digunakan dalam KCKT adalah detektor serapan optik (UV/VIS), detektor indeks bias, detektor elektrokimia, detektor ionisasi nyala, detektor evaporation light scattering, detektor radioaktif, detektor spektroskopi massa, dan detektor fluoresensi.

Detektor fluoresensi merupakan detektor yang mampu memancarkan cahaya monokromatik pada panjang gelombang tertentu untuk mengeksitasi senyawa yang berada di dalam sel. Senyawa yang dapat berfluoresensi kemudian akan mengemisikan energi cahaya pada panjang gelombang tertentu dan ditangkap dan direkam oleh detektor.

#### 2.14.3.6 Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak kromatogram. Saat ini, integrator bekerja secara digital menggunakan software komputer yang terintegrasi dengan sistem KCKT yang digunakan.

#### 2.14.4 KCKT sebagai Metode Analisis Kualitatif

Kromatografi cair kinerja tinggi dapat menjadi suatu metode untuk menentukan jenis senyawa yang terkandung di dalam suatu sampel (analisis kualitatif). Cara termudah untuk menentukan pita dari suatu sampel yang tidak diketahui adalah dengan membandingkan nilai waktu retensi sampel dengan senyawa lain yang diperkirakan terdapat di dalam sampel (senyawa standar), pada kondisi kromatografi yang distandarkan (Satiadarma & Mulja, 2004). Jika terdapat kesamaan antara waktu retensi dari sampel dengan waktu retensi senyawa standar, hal tersebut dapat menandakan bahwa kedua senyawa tersebut adalah sama (Snyder & Kirkland, 1979).

Waktu retensi merupakan ciri khas dari suatu senyawa yang dianalisis dalam suatu sistem kromatografi (kolom, pelarut, dan kondisi lainnya). Oleh karena itu, kondisi analitik yang dipakai untuk memperoleh informasi waktu retensi dari zat standar dan sampel haruslah sama, yaitu suhu, laju aliran, tekanan, fase gerak, dan instrumen KCKT yang digunakan. Suatu kondisi analisis dikatakan dapat memberikan informasi yang akurat adalah jika persentase koefisien variasi waktu retensi berbagai replika standar bernilai kurang dari 2% (Johnson & Stevenson, 1991).

### 2.15 Teori Fluoresensi

Fluoresensi (*photoluminescence*) merupakan suatu fenomena perpendaran yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap suatu energi cahaya dan memancarkan (mengemisikan) kembali sebagian dari energi tersebut dalam bentuk cahaya dan pendaran terjadi segera setelah absorpsi energi ( $10^{-12}$  s/d  $10^{-9}$  detik). Cahaya yang diemisikan selalu memiliki panjang gelombang yang lebih besar dibandingkan dengan yang diserapnya karena energi emisi selalu lebih rendah daripada energi eksitasinya (Vogel, 1989).

Senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi memiliki struktur yang planar dan kaku sehingga mampu menyerap sinar secara kuat di daerah 200 – 800 nm. Modifikasi struktur terhadap senyawa ini dapat menurunkan atau meningkatkan intensitas fluoresensi, tergantung pada sifat dan letak gugus substituen. Gugus yang memberikan elektron (*electron donating groups*) seperti gugus hidroksil, amino, atau metoksi yang terikat secara langsung pada sistem ikatan  $\pi$  dapat memfasilitasi terjadinya proses fluoresensi. Sementara itu, gugus yang menarik elektron (*electron withdrawing groups*) seperti nitro, bromo, iodo, siano, atau karboksil, cenderung mengurangi intensitas fluoresensi. Pengukuran fluoresensi senyawa yang secara alami tidak berfluoresensi dilakukan dengan cara mereasikannya dengan reagen yang fluorogenik seperti O-phtaldehid atau ninhidrin untuk pengukuran asam amino atau dansil klorida untuk menderivatisasi gugus amin, asam amino dan fenol.

Pelarut mempengaruhi fluoresensi suatu senyawa. Jika pelarut makin polar, maka intensitas fluoresensi akan makin besar. Sementara itu, jika pelarut mengandung atom yang berat (halogen), maka kemungkinan terjadinya fluoresensi akan mengecil. pH juga berpengaruh pada fluoresensi karena akan mempengaruhi letak keseimbangan antara bentuk terionisasi dan bentuk tak terionisasi. Fluoresensi terjadi pada bentuk tak terionisasi. Anilin yang bersifat basa lemah akan terprotonasi dalam larutan asam sehingga tidak memiliki auksokrom dan fluoresensinya melemah (Gandjar & Rohman, 2007).

## 2.16 Validasi Metode Analisis

Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2006). Parameter dasar yang harus dipenuhi dalam validasi metode meliputi (1) akurasi, (2) presisi, (3) selektivitas, (4) sensitivitas, (5) keterulangan, dan (6) stabilitas (Center for Drug Evaluation and Research, 2001). Hal lain yang harus diketahui melalui validasi metode adalah kurva kalibrasi, batas deteksi dan batas kuantitasi.

Metode analisa yang telah dipublikasikan seringkali dimodifikasi agar dapat sesuai dengan keadaan dari laboratorium yang digunakan. Modifikasi

tersebut harus divalidasi untuk menjamin bahwa metode analisis tersebut memberikan hasil yang baik. Berbagai tipe dan tingkatan validasi meliputi validasi penuh (*full validation*), validasi parsial (*partial validation*), dan validasi silang (*cross validation*).

Validasi penuh harus dilaksanakan ketika dilakukan pengembangan dan penerapan suatu metode analisis untuk pertama kalinya dan/atau untuk suatu obat baru. Validasi penuh juga harus dilaksanakan terhadap pengujian yang sudah termodifikasi jika ada metabolit lain yang akan dikuantitasi.

Validasi parsial adalah suatu validasi yang tidak harus memenuhi keenam parameter dasar validasi metode karena hanya ada modifikasi minor dalam metode analisis yang sudah ada. Pada bioanalisis, modifikasi yang membutuhkan validasi parsial adalah perubahan anti koagulan, perubahan prosedur proses pengambilan sampel, perubahan spesies dengan matriks yang sama, perubahan range konsentrasi, dan perubahan instrumen dan/atau platform software. Validasi parsial juga dilakukan ketika terjadi transfer metode bioanalisis antar lab atau antar analis, volume sampel terbatas, dan/atau matriks yang jarang. Dalam validasi parsial, parameter minimum yang harus memenuhi syarat adalah linearitas serta akurasi dan presisi yang dilakukan secara intra day.

Validasi silang merupakan suatu perbandingan dari parameter validasi ketika dua atau lebih metode bioanalisis digunakan untuk menghasilkan data pada studi yang sama atau studi yang berbeda.

#### 2.16.1 Kecermatan (Akurasi)

Akurasi didefinisikan sebagai kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai yang sebenarnya. (Satiadarma & Mulja, 2004). Terdapat 3 cara yang dapat digunakan untuk menentukan akurasi; (1) membandingkan dengan standar, (2) perolehan kembali analit yang ditambahkan ke dalam matriks plasebo, (3) penambahan standar ke dalam matriks yang telah mengandung analit.

Akurasi yang ditetapkan dengan cara membandingkan langsung dengan standar merupakan metode yang biasa digunakan jika analit tidak berada di dalam matriks yang kompleks. Melalui metode ini, akurasi ditentukan minimal pada 3 konsentrasi (low, medium, high) dengan minimal 3 replika pada tiap konsentrasi.

Untuk menghitung akurasi terhadap analit yang berada di dalam matriks yang kompleks, dilakukan metode uji perolehan kembali analit yang ditambahkan ke dalam matriks plasebo dimana konsentrasi penambahan standar analit yang digunakan adalah 50, 75, 100, 125 dan 150% dari konsentrasi analit yang diperkirakan. Sementara itu, metode ketiga dilakukan pada perhitungan akurasi pada matriks sampel yang telah mengandung analit namun belum diketahui konsentrasinya dan konsentrasi standar analit yang digunakan adalah 25, 50 dan 100% dari konsentrasi analit yang diperkirakan (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997).

Suatu metode dinyatakan akurat jika nilai persen uji perolehan kembali (% UPK atau % *recovery*) berada di rentang 98-102 % dan untuk sampel hayati (biologis/nabati) memiliki nilai % diferensiasi (% diff) antara konsentrasi terukur dengan konsentrasi sebenarnya sebesar  $\pm 10\%$  (Harmita, 2006). Rumus perhitungan % UPK dan % diferensiasi dapat dilihat di Lampiran 2.

#### 2.16.2 Keseksamaan (Presisi)

Presisi didefinisikan sebagai kedekatan antar hasil pengujian individual analit ketika suatu prosedur digunakan secara berulang pada sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi dapat diartikan pula sebagai derajat reproduksibilitas / ketertiruan (*reproducibility*) dan keterulangan (*repeatability*). Ketertiruan merupakan keseksamaan hasil yang diperoleh jika dilakukan dengan kondisi yang berbeda (dilakukan dalam laboratorium, peralatan, pereaksi, pelarut, atau analisis yang berbeda).

Keterulangan adalah keseksamaan hasil yang diperoleh jika prosedur analisis dilakukan berulang kali di laboratorium yang sama pada waktu yang berlainan, dalam kurun waktu yang singkat oleh analisis yang sama dengan menggunakan instrumen yang sama. (Satiadarma & Mulja, 2004).

Presisi ditentukan dengan mengukur sejumlah alikot dari satu sampel dengan minimal 5 replika dan dihitung secara statistik persentase koefisien variasi (%KV) dari luas puncak dimana nilai %KV tidak boleh lebih dari  $\pm 2\%$  (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997). Rumus untuk menghitung % koefisien variasi dapat dilihat di Lampiran 3.

### 2.16.3 Kurva kalibrasi dan Linearitas

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respons instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus dibuat dalam matriks biologis yang sama dengan sampel dengan cara menambahkan analit dengan konsentrasi yang diketahui ke dalam matriks (*spiking*). Kurva kalibrasi harus terdiri atas 6 sampai 8 sampel dengan konsentrasi yang mencakup range pengukuran, termasuk LLOQ.

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respons yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, baik secara langsung maupun dengan bantuan transformasi matematik yang baik. Linearitas dapat dinilai dari pembuatan kurva kalibrasi dimana data diolah menggunakan persamaan regresi linier sehingga didapatkan *intercept* (a), *slope* (b), dan koefisien korelasi (r). Rumus untuk menghitung persamaan garis regresi linear dan koefisien korelasi dapat dilihat di Lampiran 4.

Suatu persamaan garis dikatakan linear jika nilai koefisien korelasi di atas 0,999; dan koefisien fungsi regresi ( $V_{x_0}$ ) bernilai  $\leq 5,0\%$  untuk sediaan biologi dan  $\leq 2,0\%$  untuk sediaan farmasi.  $V_{x_0}$  didapatkan dari nilai simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ) dan kemudian standar deviasi fungsi regresi ( $S_{x_0}$ ). Rumus untuk menghitung simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ), deviasi fungsi regresi ( $S_{x_0}$ ), dan koefisien fungsi regresi ( $V_{x_0}$ ) dapat dilihat di lampiran 5.

### 2.16.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

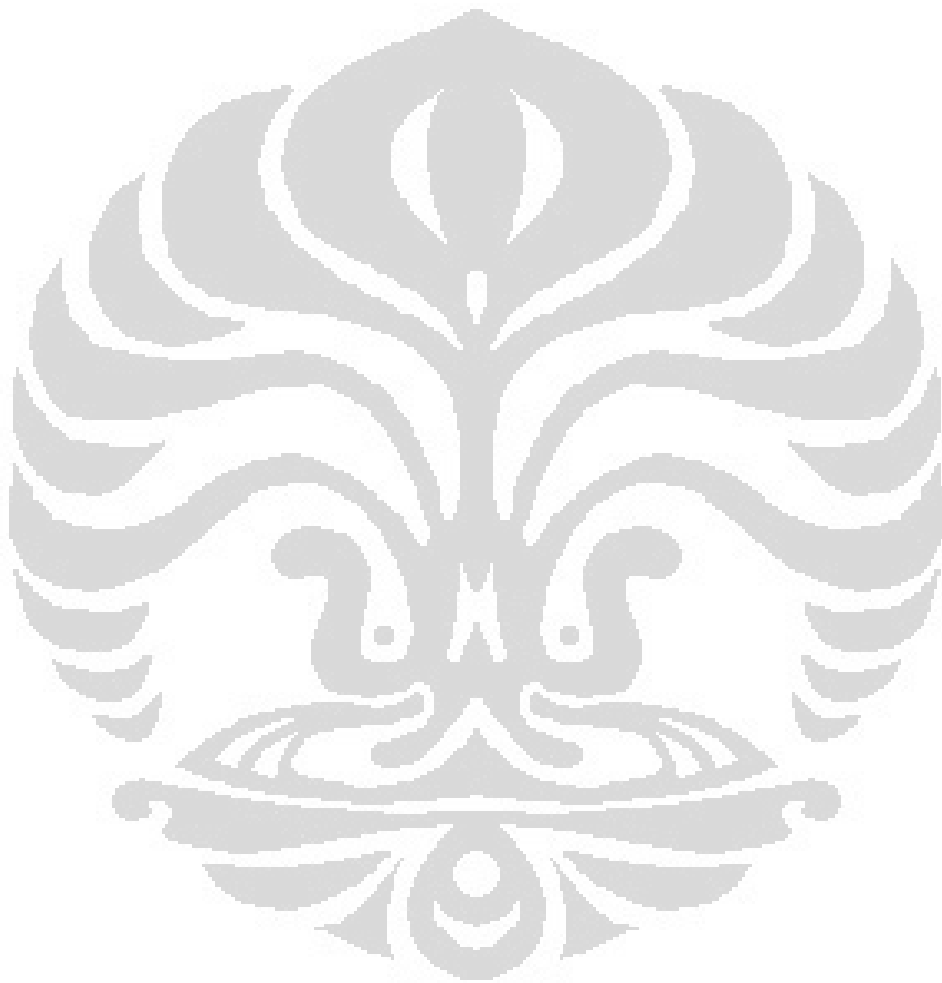
Batas deteksi (*limit of detection/LOD*) didefinisikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi (*limit of quantification/LOQ*) didefinisikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat diketahui secara statistik melalui persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi (Harmita, 2006). Rumus untuk menghitung batas deteksi dan kuantitasi dapat dilihat di lampiran 6.

### 2.16.5 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan dari metode analisis untuk mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2006). Syarat suatu metode dinyatakan selektif adalah waktu retensi analit pada sampel sama dengan waktu retensi analit pada standar dan tidak terdapat serapan pada daerah sekitar waktu retensi analit oleh blanko.

Selektivitas dibagi ke dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi (kualitatif) dan uji kemurnian (kuantitatif). Pada uji identifikasi, selektivitas ditujukan untuk membedakan antar senyawa yang memiliki struktur yang mirip pada sampel.

Selain itu, selektivitas juga dinilai dari resolusinya (Lloyd, Kirkland, & Glajh, 1997). Resolusi merupakan suatu ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lainnya. Resolusi didefinisikan sebagai jarak ( $t_R$ ) antara dua puncak dibagi rata-rata lebar ( $W$ ) dua puncak yang diukur pada alas puncak. Pemisahan dapat dikatakan baik apabila nilai resolusi antar analit lebih besar dari 1,5 (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Rumus untuk menghitung resolusi dapat dilihat di lampiran 7.





## BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Februari hingga Mei 2012 di Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan Laboratorium Bioavailabilitas / Bioekuivalensi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok, serta Laboratorium Biologi Molekuler Instalasi Penelitian dan Pengembangan Rumah Sakit Kanker “Dharmais”.

### 3.2 Alat

Seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang terdiri dari kolom (Supelcosil LC-CSX 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm), pompa (Shimadzu Prominence LC-20AD VP), oven kolom (Shimadzu CTO-10AS VP), detektor fluoresensi (Shimadzu RF-10A XL), *auto sampler* (Shimadzu SIL-20A), degasser (Shimadzu Prominence DGU-20A5) dan rekorder (LC Solution); timbangan analitik; pengaduk ultrasonik (Elmasonic); penyaring eluen 0,45  $\mu\text{m}$  (Whatman); pH meter (Eutech Intrumets pH 510); lemari pendingin; alat sentrifugasi (ThermoScientific Micro CL 17R); Microcentrifuge (LX-100); Vortex (Thermolyne type 37600 Mixer); Thermal Blok (MajorScience Elite); DNA/RNA Calculator (GeneQuant PharmaciaBiotech); Thermomixer (Eppendorf); pipet Eppendorf 0,5-10  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 20-200  $\mu\text{l}$ , dan 100-1000  $\mu\text{l}$ ; tabung K<sub>3</sub>EDTA; QIAgen *Column* dan *Collection tube*; *sampel cup* 1,5 ml; *blue tip*; *yellow tip*; *white tip*; dan alat-alat gelas.

### 3.3 Bahan

#### 3.3.1 Bahan Uji

Bahan uji merupakan DNA *adduct* yang diambil dari hasil hidrolisis isolat DNA dari darah pasien kanker Rumah Sakit Kanker Dharmais. Sampel dari penelitian ini adalah pasien kanker yang berobat di Rumah Sakit Kanker

Dharmais, dalam periode bulan tanggal 1 – 12 Mei 2012 serta memenuhi kriteria inklusi serta eksklusi yaitu:

A. Kriteria inklusi:

- Pasien kanker Rumah Sakit Kanker Dharmais.
- Pasien berusia 18 – 55 tahun pada saat pengambilan sampel darah.
- Pasien menerima siklofosfamid dalam regimen kemoterapinya.
- Jenis agen pengalkilasi yang diberikan dalam regimen kemoterapi pasien hanyalah siklofosfamid.
- Pada masa pengambilan sampel, pasien telah menjalani minimal 4 siklus kemoterapi atau setara dengan 3 (tiga) bulan pengobatan.
- Pasien menyatakan bersedia ikut serta dalam penelitian dengan menandatangani lembar *informed consent*.

B. Kriteria eksklusi:

- Pasien non kanker Rumah Sakit Kanker Dharmais.
- Pasien berusia dibawah 18 atau di atas 55 tahun pada saat pengambilan sampel darah.
- Pasien tidak menerima siklofosfamid dalam regimen kemoterapinya.
- Ada agen pengalkilasi selain siklofosfamid yang digunakan dalam regimen kemoterapi.
- Pada masa pengambilan sampel, pasien belum menjalani 4 siklus kemoterapi atau setara dengan 3 (tiga) bulan pengobatan.
- Pasien menyatakan tidak bersedia ikut serta dalam penelitian dengan tidak menandatangani lembar *informed consent*.

3.3.2 Bahan Kimia

- 1) Standar: O<sup>6</sup>-metilguanin, N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, adenin (Sigma Aldrich)
- 2) Eluen pada sistem KCKT: amonia 25% p.a., asam format p.a. metanol (Merck)
- 3) Reagen untuk isolasi DNA: Proteinase K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, dan Buffer AE (QIAamp DNA Mini Kits); etanol absolut (Merck)
- 4) Aquabidestilata (Widatra Bhakti; PT Otsuka Indah)

### 3.3.3 Pembuatan Fase Gerak dan Larutan Standar untuk Analisis

#### 3.3.3.1 Pembuatan Fase Gerak Larutan Amonium Format 2M

140 ml larutan amonium hidroksida P 25% ke ditambahkan dalam 700 ml aquabidest. Kemudian asam format ditambahkan sebanyak 120 ml secara perlahan-lahan dan campuran dibiarkan hingga mencapai suhu kamar. pH larutan diatur hingga mencapai pH 3,95 dengan penambahan asam format. Kemudian aquabidest ditambahkan kembali sampai volume mencapai 1 l.

#### 3.3.3.2 Pembuatan Larutan Standar dan Campuran Standar

1) Pembuatan larutan induk standar O<sup>6</sup>-metilguanin 1.000,0 µg/ml

Timbang secara seksama standar O<sup>6</sup>-metilguanin sebanyak 25,0 mg, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan larutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Lakukan pengenceran secara kuantitatif.

2) Pembuatan larutan induk N<sup>7</sup>-metilguanin 1.000,0 µg/ml

Timbang secara seksama standar N<sup>7</sup>-metilguanin sebanyak 25,0 mg, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan larutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Lakukan pengenceran secara kuantitatif.

3) Pembuatan larutan induk N<sup>3</sup>-metiladenin 1.000,0 µg/ml

Timbang secara seksama standar N<sup>3</sup>-metiladenin sebanyak 25,0 mg, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan larutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Lakukan pengenceran secara kuantitatif.

4) Pembuatan larutan induk standar guanin 1.000,0 µg/ml

Timbang secara seksama standar guanin sebanyak 25,0 mg, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan larutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Lakukan pengenceran secara kuantitatif.

5) Pembuatan larutan induk standar adenin 1.000,0 µg/ml

Timbang secara seksama standar N<sup>3</sup>-metiladenin sebanyak 25,0 mg, kemudian masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan larutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Lakukan pengenceran secara kuantitatif.

6) Pembuatan campuran larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin, N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, dan adenin 1,0 µg/ml

Larutan induk N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, dan adenin dengan konsentrasi 10,0 µg/ml serta larutan induk O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 100 ng/ml masing-masing dipipet sebanyak 1,0 ml dan seluruhnya dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Campuran kemudian ditambahkan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas.

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Validasi Metode Analisis

Metode analisis yang digunakan adalah metode kromatografi cair kinerja tinggi – penukar ion dengan detektor fluoresensi. Kondisi analisis terpilih adalah dengan menggunakan fase gerak amonium format 30mM, pH 3,95, yang mengandung pelarut organik berupa metanol dengan konsentrasi 6% kecepatan alir 1,2 ml/menit, suhu kolom 30°C, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm (Harahap, Andalusia, Radji, & Natalia, 2009).

##### 3.4.1.1 Uji Kesesuaian Sistem

Sebanyak 20,0 µl larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 100,0 ng/ml disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak 5 kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan efisiensi kolom (jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP), faktor ikutan (T<sub>f</sub>), dan koefisien variasi dari jumlah lempeng teoritis serta waktu retensi sebagai syarat kesesuaian sistem metode KCKT untuk analisis secara kualitatif.

Sebanyak 20,0 µl larutan campuran standar O<sup>6</sup>-metilguanin 25 ng/ml, N<sup>7</sup>-metilguanin 1,0 µg/ml, N<sup>3</sup>-metiladenin 1,0 µg/ml, guanin 1,0 µg/ml, dan adenin

1,0 µg/ml disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis yang sama. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan resolusinya.

#### 3.4.1.2 Uji Selektivitas

Sebanyak 20,0 µl larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin 100 ng/ml, N<sup>7</sup>-metilguanin 10,0 µg/ml, N<sup>3</sup>-metiladenin 10,0 µg/ml, guanin 10,0 µg/ml, dan adenin 10,0 µg/ml dengan disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, kemudian dicatat waktu retensi dari masing-masing standar.

#### 3.4.1.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Penentuan Batas Deteksi (LOD) dari O<sup>6</sup>-Metilguanin

Sebanyak 20,0 µl larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 25; 50; 70; 100; 300; 500; dan 700 ng/ml disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Luas puncak yang diperoleh kemudian dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya, lalu dihitung koefisien relasinya (r) serta harga LOD.

#### 3.4.1.4 Uji ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) terhadap O<sup>6</sup>-Metilguanin

Sebanyak 20,0 µl larutan O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 50; 100; 300 ng/ml µl disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak enam kali untuk masing-masing konsentrasi. Untuk menguji ketepatan metode, dihitung % recovery antara konsentrasi terukur terhadap konsentrasi yang sebenarnya. Konsentrasi terukur larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar yang dibuat pada hari pengujian akurasi dan presisi dilakukan. Untuk menguji keseksamaan metode, dari luas puncak yang diperoleh, dihitung koefisien variasi dari nilai variabel sumbu y (nilai luas puncak).

#### 3.4.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel terdiri dari 3 tahap yaitu pengambilan sampel berupa darah dari pasien kanker Rumah Sakit Kanker Dharmais, isolasi DNA dari darah, dan hidrolisis DNA untuk mendapatkan basa DNA.

### 3.4.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel darah diambil pada saat pemeriksaan hematologi rutin. Darah diambil menggunakan teknik *venipuncture* sebanyak kurang lebih 1ml dan dimasukkan ke dalam tabung K<sub>3</sub>EDTA.

### 3.4.2.2 Isolasi DNA (QIAGEN, 2007)

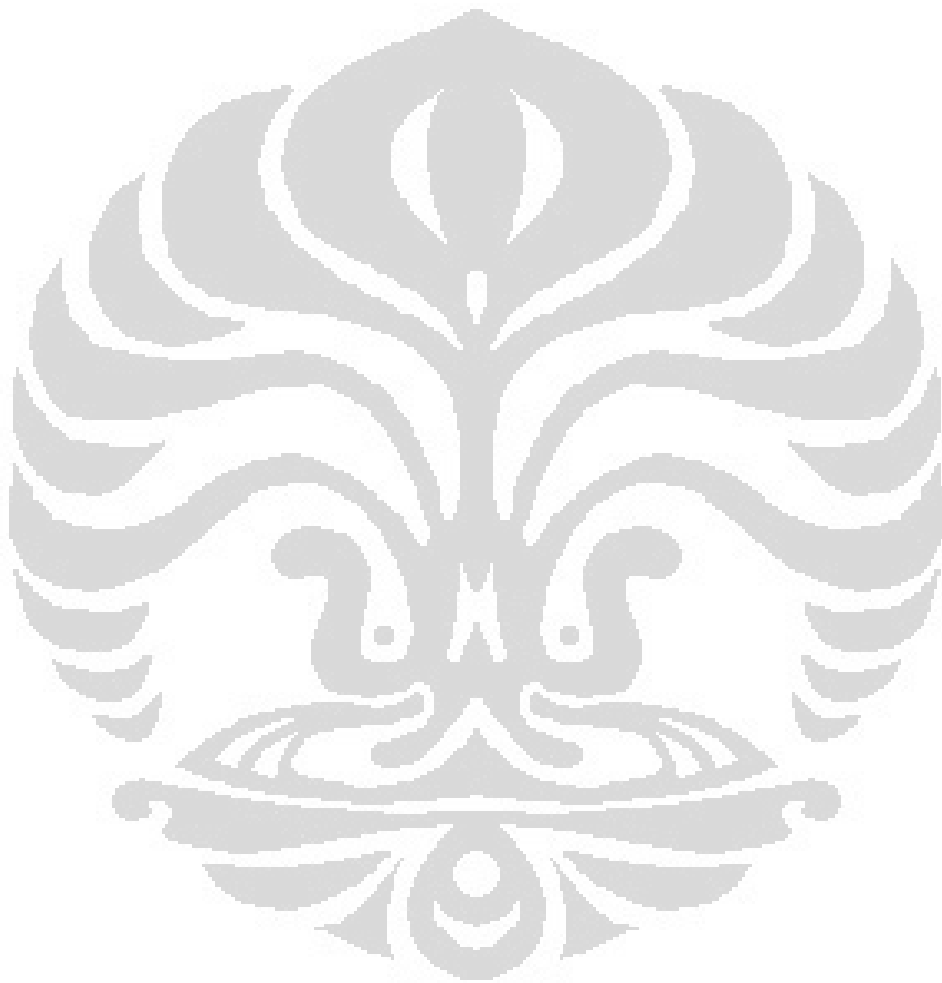
Sebanyak 20 µl proteinase K, 200 µl darah, dan 200 µl Buffer AL ditambahkan ke dalam *sample cup*, lakukan *pulse vortex* 15 detik dan mikrosentrifugasi *sample cup*. Selanjutnya, *sample cup* diinkubasi pada suhu 56 °C selama 30 menit dan lakukan mikrosentrifugasi. Ke dalam *sample cup*, ditambahkan 400 µl etanol absolut dingin dan lakukan *pulse vortex* 15 detik dan mikrosentrifugasi *sample cup*. Cairan di dalam *sample cup* kemudian dipindahkan ke dalam QIAgen *column* yang telah dipasang dengan QIAgen *collection tube*. Kolom dan *collection tube* tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar, ganti *collection tube* yang berisi filtrat dengan *collection tube* yang baru. Ke dalam *column* ditambahkan buffer AW1 sebanyak 500 µl. Kolom dan *collection tube* tersebut disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. Filtrat pada *collection tube* kemudian dibuang dan *collection tube* dipasang kembali. Ke dalam kolom ditambahkan buffer AW2 sebanyak 500 µl dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu kamar. Filtrat pada *collection tube* kemudian dibuang, *collection tube* dipasang kembali dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. *Collection tube* yang berisi filtrat kemudian dibuang dan kolom dipasang pada *sample cup* baru. Ke dalam kolom ditambahkan buffer AE sebanyak 50 µl. Kolom dan *sample cup* tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit pada suhu kamar. DNA yang terisolasi di dalam *sample cup* dihitung konsentrasinya menggunakan DNA/RNA Calculator.

### 3.4.2.3 Hidrolisis DNA

Isolat DNA diencerkan terlebih dahulu dengan aquabidest dengan volume yang sebanding. Ke dalamnya, ditambahkan larutan asam klorida 0,1 N dengan volume yang sebanding dengan volume isolat DNA yang telah diencerkan dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 30 menit (Warren, 1984).

### 3.4.3 Analisis O<sup>6</sup>-Metilguanin dalam Sampel

Hasil hidrolisis DNA dari sampel darah pasien kanker Rumah Sakit Kanker Dharmais disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Dari kromatogram hasil elusi, ditentukan ada atau tidaknya senyawa O<sup>6</sup>-metilguanin dengan membandingkannya dengan kromatogram standar dan dilakukan pengukuran luas puncak. Jika puncak tersebut memiliki luas yang lebih kecil dari luas nilai batas deteksi (limit of detection / LOD) maka puncak tersebut dinyatakan tidak terdeteksi.





## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.5 Validasi Metode Analisis

##### 3.5.1 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah metode yang akan digunakan dapat dipakai untuk menganalisis komponen yang akan dipisahkan (Badan Pengawasan Obat dan Makanan, 1995). Kesesuaian sistem dapat dinilai dari beberapa parameter, yaitu efisiensi kolom (pelat teoritis (N) dan HETP), faktor ikutan, koefisien variasi dari jumlah pelat teoritis dan waktu retensi dari lima replika analisis standar, serta resolusi standar campuran.

Pada analisis 5 replika standar O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 101,0 ng/ml, standar disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak 5 kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan efisiensi kolom (jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP), faktor ikutan (T<sub>f</sub>), dan koefisien variasinya. Dari hasil analisis lima replika standar, diketahui bahwa kolom tidak efisien karena memiliki nilai N yang lebih kecil dari 2500, serta nilai faktor ikutan lebih besar dari 1,5. Namun nilai %KV dari luas area serta %KV dari waktu retensi yang diberikan masih di bawah 2%. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode analisis dapat memberikan hasil yang presisi dalam memberikan informasi waktu retensi zat (Johnson & Stevenson, 1991), sehingga dapat digunakan untuk menganalisis zat secara kualitatif dimana parameter identitas zat didasarkan pada waktu retensinya. Data mengenai hasil uji efisiensi kolom dapat dilihat pada Lampiran 8.

Pada kromatogram larutan campuran standar O<sup>6</sup>-metilguanin 25,25 ng/ml, N<sup>7</sup>-metilguanin 1,01 µg/ml, N<sup>3</sup>-metiladenin 1,01 µg/ml, guanin 1,01 µg/ml, dan adenin 1,01 µg/ml, terdapat puncak pada menit ke 5,317. Puncak tersebut diyakini sebagai puncak dari campuran adenin dan N<sup>7</sup>-metilguanin karena kedua senyawa tersebut teretensi pada waktu retensi yang hampir bersamaan. Selain itu, juga tampak puncak kecil pada menit ke 5,930. Puncak tersebut diyakini sebagai puncak dari adenin karena terdapat dua puncak pada kromatogram hasil analisis

standar adenin. N<sup>3</sup>-metiladenin tidak terdeteksi sehingga tidak memberikan puncak. Kromatogram campuran larutan standar dapat dilihat pada Lampiran 9.

Nilai resolusi dari larutan campuran standar adalah sebagai berikut: antara puncak 1 dan 2 (guanin dan campuran adenin dan N<sup>7</sup>-metilguanin), nilai resolusinya adalah 1,99; antara puncak 2 dan 3 (campuran adenin dan N<sup>7</sup>-metilguanin dan adenin), nilai resolusinya adalah 1,21; dan antara puncak 3 dan 4 (adenin dan O<sup>6</sup>-metilguanin), nilai resolusinya adalah 1,71. Walaupun antara adenin dan N<sup>7</sup>-metilguanin tidak dapat terpisah dengan sempurna, namun karena tujuan penelitian ini adalah menganalisis O<sup>6</sup>-metilguanin, maka hal tersebut tidak menjadi masalah. Kromatogram larutan campuran menunjukkan bahwa antara O<sup>6</sup>-metilguanin dengan komponen lain dapat terpisah dengan sempurna. Data mengenai perhitungan resolusi standar dapat dilihat pada Lampiran 10.

### 3.5.2 Uji Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk mengetahui adanya gangguan dari komponen lain. Standar O<sup>6</sup>-metilguanin 101,0 ng/ml, dan N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, dan adenin dengan konsentrasi masing – masing 10,1 µg/ml disuntikkan sebanyak 20 µl ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, kemudian dicatat waktu retensi dari masing-masing standar. Waktu retensi dari standar O<sup>6</sup>-metilguanin adalah pada menit ke 7,600 dengan bentuk kromatogram yang khas yaitu terdapat “bahu” pada sisi puncak sebelah kanan dan nilai tailing factor yaitu sekitar 3,1. Hasil analisis dari standar N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, dan adenin memberikan informasi waktu retensi zat berturut – turut yaitu 5,210; 9,801; 3,884; serta 5,112 dan 5,850 (terdapat dua puncak pada kromatogram adenin). Kromatogram standar O<sup>6</sup>-metilguanin, N<sup>7</sup>-metilguanin, N<sup>3</sup>-metiladenin, guanin, dan adenin semua standar dapat dilihat berturut – turut pada Lampiran 11 hingga Lampiran 15.

### 3.5.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Penentuan Batas Deteksi (LOD) dari O<sup>6</sup>-Metilguanin

Pembuatan kurva kalibrasi bertujuan untuk mengetahui suatu korelasi antara konsentrasi analit dengan respon detektor yang diberikan, dalam hal ini

adalah area puncak zat. Korelasi tersebut dinyatakan dengan sebuah persamaan garis regresi linear.

Pada penelitian ini, larutan O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 25,25; 50,50; 70,70; 101,0; 303,0; 505,0; dan 707,0 ng/ml masing-masing sebanyak 20 µl disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Luas puncak yang diperoleh kemudian dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya. Berdasarkan perhitungan menggunakan regresi linear, diketahui bahwa nilai a (intersep) adalah sebesar 18786,302 dan nilai b (slope) adalah sebesar 5305.26 sehingga diketahui persamaan regresi linear kurva kalibrasi adalah  $y = 18786,302 + 5305.26x$ , dimana x adalah konsentrasi serta y adalah luas puncak. Data kurva kalibrasi O<sup>6</sup>-metilguanin beserta gambar dapat dilihat di Lampiran 16 dan Lampiran 17.

Sebagai parameter linearitas kurva kalibrasi, diketahui bahwa nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9997 dan nilai koefisien fungsi regresi ( $V_{x_0}$ ) bernilai 2,746%. Kedua data tersebut menunjukkan bahwa kurva kalibrasi yang telah dibuat memiliki linearitas yang kurang baik. Walaupun nilai koefisien korelasi yang bernilai lebih dari 0,999, namun nilai koefisien fungsi regresi bernilai lebih dari 2,0%. Ketidaklinearan tersebut diperkirakan terjadi karena terdapat variasi lebar puncak akibat terjadinya *tailing* pada kurva. Data linearitas selengkapnya dapat dilihat di Lampiran 18.

Berdasarkan data regresi linear kurva kalibrasi pula, dapat diketahui nilai batas deteksi (limit of detection / LOD) adalah sebesar 20,74 ng/ml (setara dengan luas puncak sebesar 128813,45 µV/s). Data perhitungan batas minimum deteksi selengkapnya dapat dilihat di Lampiran 19.

#### 3.5.4 Uji ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) terhadap O<sup>6</sup>-Metilguanin

Uji ketepatan dilakukan untuk mengetahui apakah metode analisis dapat memberikan hasil analisis yang mendekati hasil sebenarnya. Suatu metode dikatakan akurat jika persentasi perolehan kembali antara konsentrasi terukur dengan konsentrasi sebenarnya (% recovery) berada di rentang  $\pm 2\%$  untuk sampel farmasi dan  $\pm 10\%$  untuk sampel hayati (Harmita, 2006). Sementara itu, uji keseksamaan dilakukan untuk mengetahui derajat kesesuaian antar hasil uji

tiap replika (individu). Sebuah metode dinyatakan seksama jika persentase koefisien variasi dari luas puncaknya kurang dari 2%.

Pada penelitian ini, larutan O<sup>6</sup>-metilguanin dengan konsentrasi 50,5; 101,0; 505,0 ng/ml masing-masing sebanyak 20 µl disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak enam kali untuk masing-masing konsentrasi. Berdasarkan Lampiran 20, dapat diketahui bahwa persentase perolehan kembali pada konsentrasi 50,5 ng/ml berkisar antara 92,09 – 94,61%; 107,33 – 109,79% pada konsentrasi 101,0 ng/ml; serta 98,12-98,59% pada konsentrasi 505,0%. Seluruh persentase perolehan kembali ketiga konsentrasi tersebut berada di luar rentang % recovery, yaitu 98 - 102%. Berdasarkan data tersebut, metode analisis dinyatakan tidak akurat. Namun karena analisis ini bertujuan untuk menganalisis zat secara kualitatif (identifikasi), maka parameter akurasi dapat diabaikan. Parameter akurasi harus diperhatikan jika analisis dilangsungkan secara kuantitatif untuk sehingga dapat menjamin bahwa nilai yang dihasilkan dari analisis tersebut mendekati nilai yang sesungguhnya pada sampel.

Pada pengujian keeksamaan (presisi), diperoleh nilai % koefisien variasi (%KV) larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin 50,50 ng/ml adalah sebesar 0,8368%; % KV larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin 101,0 ng/ml adalah sebesar 0,8467%; serta % KV larutan standar O<sup>6</sup>-metilguanin 505,0 ng/ml adalah sebesar 0,1853%. Nilai persentase koefisien variasi ketiga konsentrasi berada dibawah angka 2% sehingga metode dapat dinyatakan seksama. Data uji keeksamaan juga dapat dilihat pada Lampiran 20.

### **3.6 Preparasi Sampel**

#### **3.6.1 Pengambilan Sampel**

Pada penelitian ini, terdapat 27 sampel yang berasal dari 27 pasien kanker Rumah Sakit Kanker Dharmas yang mendapatkan siklofosamid dalam regimen kemoterapi. Sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi, 27 pasien tersebut telah menjalani minimal 4 siklus kemoterapi. Batasan 4 siklus kemoterapi didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Kyrtopoulos, dkk (1991). Berdasarkan penelitian tersebut, diketahui bahwa O<sup>6</sup>-metilguanin yang terbentuk akibat alkilasi

prokarbazin dalam kemoterapi mengalami akumulasi dan jumlahnya meningkat secara linear seiring dengan jumlah akumulasi prokarbazin di dalam tubuh dan stabil (membentuk plateau) pada dosis akumulasi prokarbazin  $600\text{mg}/\text{m}^2$  (pada siklus ke empat). Oleh karena itu, diasumsikan juga dapat terjadi akumulasi O<sup>6</sup>-metilguanin yang terbentuk secara *in vivo* akibat alkilasi oleh siklofosfamid setelah pemberian minimal 4 siklus kemoterapi.

Dari 27 pasien yang diteliti, 18 orang pasien terdiagnosa kanker payudara, 3 orang pasien terdiagnosa leukemia non Hodgkin's, 3 orang pasien terdiagnosa kanker ovarium, 2 orang pasien terdiagnosa leukemia myeloid dan 1 orang pasien terdiagnosa neuroblastoma. Dosis siklofosfamid yang diberikan kepada pasien pada siklus kemoterapi terakhir berjumlah antara  $700 - 1700 \text{ mg}/\text{mm}^2$ . Sebanyak 11 orang pasien telah mendapatkan 4 siklus kemoterapi; 3 orang pasien telah mendapatkan 5 siklus; 7 orang pasien telah mendapatkan 6 siklus; 3 orang pasien telah mendapatkan 7 siklus; 2 orang pasien telah mendapatkan 9 siklus; dan 1 orang pasien telah mendapatkan 12 siklus.

Keseluruhan sampel darah pasien diambil bersamaan dengan pemeriksaan hematologi rutin pasien di Instalasi Patologi Klinis Rumah Sakit Kanker Dharmas. Sampel darah yang diambil adalah sebanyak kurang lebih 1ml dan disimpan dalam tabung K<sub>3</sub>EDTA pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dengan akan dianalisis. Penelitian ini juga telah dinyatakan lolos kaji etik oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

### 3.6.2 Isolasi DNA

DNA yang terdapat di dalam sel darah putih pasien diisolasi dengan menggunakan perangkat isolasi DNA (*DNA isolation kit*) yaitu QIAamp DNA Mini Kits. Perangkat isolasi DNA ini memungkinkan kita untuk mengisolasi DNA dari sample dengan jumlah yang terbatas namun dengan tingkat *recovery* yang tinggi, dalam hal ini, hanya diperlukan sebanyak 200  $\mu\text{l}$  darah untuk mengisolasi 4 – 12  $\mu\text{g}$  DNA (rata-rata 6  $\mu\text{g}$ ). Darah yang digunakan juga dapat berupa darah segar ataupun darah beku yang dicairkan kembali.

Perangkat isolasi DNA ini terdiri dari 2 alat serta 5 reagen. Alat yang tersedia dalam kit adalah kolom isolasi (QIAamp Mini spin column) dan tabung

penampung (*collection tube*). Kolom isolasi merupakan sebuah tabung bertutup dimana ujung bagian bawahnya terdapat membran silika sehingga alat ini berfungsi sebagai filter dan dapat dipasang ke tabung penampung (*collection tube*) maupun *sample cup* sebagai penampung filtratnya. Sementara itu, reagen yang tersedia dalam perangkat ini adalah Proteinase K, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, dan Buffer AE. Gambar perangkat *DNA isolation kit* serta instrumen lain yang digunakan dalam tahap isolasi DNA dapat dilihat di Lampiran 21.

Proses isolasi DNA menggunakan DNA kit terbagi dalam 4 tahap utama yaitu tahap pemecahan sel (*lyse*), tahap pengikatan DNA pada membran (*bind*), tahap pencucian membran (*wash*), dan tahap pelarutan DNA (*elute*). Bagan proses isolasi DNA menggunakan DNA kit tersebut dapat dilihat pada Lampiran 22 (QIAGEN, 2007).

Pada tahap *lyse*, di dalam *sample cup*, 200µl darah dicampur dengan 20µl proteinase K dan 200µl buffer AL yang kemudian diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Proteinase K yang ditambahkan berfungsi untuk melisiskan sel darah putih. Inkubasi dilakukan untuk memaksimalkan kerja enzim dalam melisiskan sel. Lisisnya sel ditandai dengan warna larutan yang berubah menjadi hijau gelap dan terdapat serpihan halus di bagian dinding tabung. Kemudian ke dalam *sample cup* ditambahkan 400 µl etanol absolut yang berfungsi untuk menarik DNA dari sel yang telah lisis. Setelah *sample cup* diputar dengan *vortex*, larutan dalam *sample cup* tersebut dipindahkan ke dalam kolom isolasi yang telah dipasang pada tabung penampung.

Tahap *bind* terjadi ketika kolom isolasi dan tabung penampung tersebut disentrifugasi. Kandungan garam dan pH pada buffer AL yang ditambahkan pada tahap sebelumnya membuat DNA akan terjerap pada membran silika yang terdapat pada dasar kolom isolasi sehingga ketika kolom isolasi tersebut disentrifugasi, DNA akan tertahan pada membran sementara protein akan lolos dari membran dan tertampung pada tabung penampung.

DNA yang telah terikat pada membran dalam kolom isolasi akan dimurnikan dengan cara mencuci membran dengan sentrifugasi sebanyak dua kali menggunakan buffer AW1 dan AW2. Sama seperti tahap sebelumnya, DNA akan tetap tertahan pada membran sementara kontaminan lain akan lolos dari membran

sehingga penggunaan kedua dapar pencuci tersebut secara signifikan akan meningkatkan kemurnian DNA.

Tahap terakhir dalam isolasi menggunakan *DNA isolation kit* adalah tahap pelarutan DNA (*elute*). DNA yang terjerap dalam membran akan larut dengan cara menambahkan 50  $\mu\text{l}$  Buffer AE ke dalam kolom isolasi. Pada tahap ini, kolom isolasi dipasang pada *sample cup*, bukan pada tabung penampung seperti yang dilakukan di tahap-tahap sebelumnya. Inkubasi pada suhu kamar selama 5 menit akan meningkatkan jumlah DNA yang terlarut. Setelah diinkubasi, maka kolom isolasi disentrifugasi kembali sehingga DNA yang terlarut dapat terlepas dari membran dan tertampung dalam *sample cup*. Semakin sedikit volume buffer AE yang ditambahkan maka akan semakin besar konsentrasi DNA yang terisolasi.

Pada penelitian ini, 17 dari 27 sampel mengandung DNA sebanyak 0,6 – 79,4  $\mu\text{g/mL}$  sementara 10 sampel mengandung DNA sebanyak lebih dari 130–252,7  $\mu\text{g/mL}$ . Diperkirakan terdapat kesalahan pada proses isolasi DNA kesepuluh sampel tersebut sehingga menunjukkan nilai konsentrasi DNA yang menyimpang dari kisaran konsentrasi DNA sampel lainnya. Data pasien serta isolat DNANYA dapat dilihat pada Lampiran 23.

### 3.6.3 Hidrolisis DNA

Basa nitrogen DNA, terutama O<sup>6</sup>-metilguanin, harus dibebaskan terlebih dahulu dari untai DNA sebelum dianalisis. Pembebasan basa nitrogen dilakukan dengan cara menghidrolisis DNA dalam suasana asam. Lingkungan asam akan menghidrolisis ikatan fosfodiester sehingga basa nitrogen dapat terlepas dari rangkanya. Jumlah larutan asam klorida yang ditambahkan sebanding dengan volume akhir larutan DNA yang telah diencerkan (Harahap, Sari, Sari, & Herawati, 2008). Pada penelitian ini, 12,5  $\mu\text{l}$  isolat DNA diencerkan dengan 12,5  $\mu\text{l}$  aquabidest. Selanjutnya isolat DNA yang telah diencerkan tersebut dihidrolisis dengan 25,0  $\mu\text{l}$  HCl 0,1N pada suhu 70 °C selama 30 menit.

Tahap hidrolisis dalam suasana asam tersebut telah terbukti dapat membebaskan adenin dan guanin dari DNA *calf thymus* yang tidak mengalami alkilasi, serta O<sup>6</sup>-metilguanin dari DNA *calf thymus* yang mengalami alkilasi oleh siklofosamid secara in vitro. Kromatogram hasil hidrolisis DNA *calf thymus*

yang tidak mengalami alkilasi oleh siklofosfamid dapat dilihat pada Lampiran 24 dan kromatogram hasil hidrolisis DNA *calf thymus* yang mengalami alkilasi oleh siklofosfamid secara in vitro dapat dilihat pada Lampiran 25 (Harahap, Andalusia, Radji, & Natalia, 2009).

### 3.7 Analisis O<sup>6</sup>-Metilguanin dalam Sampel

O<sup>6</sup>-metilguanin murni memiliki pemerian berupa serbuk yang agak menggumpal dengan warna putih kekuningan. Senyawa ini hampir tidak larut dalam air namun larut dalam asam encer dan amonia encer. Senyawa ini merupakan basa lemah dengan nilai pKa sebesar 5,31. Data pKa senyawa diketahui melalui kalkulasi menggunakan perangkat lunak “*Marvin Sketch* (ver 5.8.2, 2011)”. Pada lingkungan dengan pH 3,95, atom N pada posisi 7 mengalami protonasi sebanyak hampir 91,23% dan membentuk kation  $-NH^+$ .

Berdasarkan sifat fisikokimianya tersebut, O<sup>6</sup>-metilguanin dapat dianalisis menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan kolom penukar kation (*cation exchange*) karena senyawa O<sup>6</sup>-metilguanin dapat terionisasi menjadi bermuatan positif (kation) pada pH yang sesuai. Pemisahan senyawa menggunakan metode KCKT *ion exchange* ini didasarkan pada terbentuknya ikatan ionik antara resin penukar ion tetap pada fase diam dengan ion sampel dan ion lawan pada fase gerak.

Jenis kolom penukar kation yang dipilih adalah penukar kation kuat (*strong cation exchange / SCX*) karena kestabilan ionisasi gugus penukar ion terjadi pada rentang pH yang lebih luas (pH 2 – 12) dibandingkan dengan penukar kation lemah (pH < 5). Pada KCKT dengan kolom penukar kation kuat, terdapat gugus sulfonat ( $-SO_3H$ ) yang terikat pada resin (penyangga). Jika gugus tersebut terionisasi menjadi anionnya ( $-SO_3^-$ ), maka gugus tersebut dapat mengikat ion dengan muatan positif pada fase gerak maupun sampel. Kolom fase balik tidak digunakan dalam penelitian ini karena pemisahan pada kromatografi partisi fase terbalik didasarkan pada perbedaan polaritas antar analit. Basa DNA dan basa teralkilasinya memiliki struktur kimia yang mirip satu sama lain sehingga memiliki polaritas yang juga hampir sama.



Fase gerak yang digunakan dalam analisis ini adalah campuran dapar dalam air dengan pelarut organik yaitu metanol. Pelarut organik ditambahkan untuk meningkatkan selektivitas serta menurunkan waktu retensi. Dapar yang dipilih adalah dapar amonium format karena asam format memiliki pKa sebesar 3,8 sehingga dapat menjaga pH fase gerak dalam rentang 2,8 - 4,8 (Snyder & Kirkland, 1979). Dapar amonium format dipilih juga karena kelarutannya yang rendah sehingga memiliki kecenderungan yang lebih kecil untuk mengendap sehingga tidak merusak kolom. Dalam kondisi asam, ion amonium ( $-\text{NH}_4^+$ ) pada dapar akan bertindak sebagai ion lawan dalam mekanisme pertukaran ion. Konsentrasi dapar yang dipilih dalam percobaan ini adalah sebanyak 30mM (Harahap, Sari, Sari, & Herawati, 2008).

Dapar amonium fosfat sebenarnya dapat digunakan untuk analisis DNA *adduct* namun dapar ini tidak spesifik meretensi  $\text{O}^6$ -metilguanin karena memiliki pKa sebesar 2,1 untuk menjaga pH pada fase gerak sebesar  $< 3,1$  (Snyder & Kirkland, 1979). Penggunaan dapar amonium fosfat dilakukan jika diinginkan adanya pemisahan yang baik antara  $\text{N}^7$ -metilguanin dengan adenin karena pada dapar amonium format,  $\text{N}^7$ -metilguanin dan adenin teretensi pada waktu yang hampir bersamaan sehingga tidak terpisah dengan baik (Herron & Shank, 1979).

Atas strukturnya yang rigid, planar serta memiliki banyak ikatan rangkap terkonjugasi,  $\text{O}^6$ -metilguanin memiliki sifat fluoresensi alami tanpa harus diderivatisasi. Sifat fluoresensi  $\text{O}^6$ -metilguanin diperkuat dengan adanya gugus metoksi yang terikat secara langsung pada sistem ikatan  $\pi$ . Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Harahap (2003), diketahui bahwa  $\text{O}^6$ -metilguanin memberikan intensitas fluoresensi tertinggi dibandingkan dengan  $\text{N}^7$ -metiladenin serta  $\text{N}^3$ -metiladenin. Oleh karena itu, detektor fluoresensi digunakan dalam penelitian ini karena selektif untuk mendeteksi  $\text{O}^6$ -metilguanin. Detektor UV tidak digunakan dalam penelitian ini karena  $\text{O}^6$ -metilguanin berada dalam konsentrasi yang rendah sehingga diperlukan detektor yang lebih sensitif, dimana detektor fluoresensi memiliki sensitifitas 100 kali lebih tinggi daripada detektor UV (Harmita, 2006). Selain itu, detektor UV lebih cocok digunakan jika yang dianalisis adalah campuran basa DNA dan *DNA adduct* (Rakhman, 2005).

Larutan dapar amonium format diatur agar memiliki pH sebesar 3,95. Nilai pH tersebut dipilih karena merupakan pH optimum yang digunakan pada penelitian sebelumnya (Harahap, Andalusia, Radji, & Natalia, 2009) serta berdasarkan data dari penelusuran literatur (Warren, 1984). Nilai pH tersebut juga dipilih karena pada rentang pH 4 – 11, O<sup>6</sup>-metilguanin memberikan intensitas fluoresensi tertinggi pada pH 4 (Harahap Y. , 2003). Data intensitas fluoresensi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 26.

Selain itu, sebanyak 96,21% senyawa O<sup>6</sup>-metilguanin mengalami protonasi. Pada pH tersebut, hanya 1,53% senyawa N<sup>7</sup>-metilguanin, 1,62% senyawa guanin, dan 0,8% senyawa adenin yang terprotonasi. Perbedaan persentase ionisasi antar senyawa tersebut memungkinkan terpisahnya O<sup>6</sup>-metilguanin dari adduct serta basa DNA lainnya. Senyawa N<sup>3</sup>-metiladenin sendiri pada pH tersebut mengalami protonasi sebanyak 96,31%, namun senyawa ini tidak memiliki sifat fluoresensi alami sehingga sulit terdeteksi oleh detektor. Data persentase spesi ion senyawa diperoleh dengan menggunakan perangkat lunak “*Marvin Sketch* (ver 5.8.2, 2011)” dan dapat dilihat pada Lampiran 27.

Berdasarkan data – data diatas, maka dalam penelitian ini, digunakan kondisi analisis yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) penukar kation kuat dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 yang dicampur dengan pelarut organik berupa metanol dengan perbandingan 94:6, suhu kolom 30°C, laju alir 1,2 ml/menit, dengan sistem deteksi fluoresensi menggunakan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm. Kondisi analisis tersebut juga merupakan kondisi analisis optimal yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Harahap, Andalusia, Radji, & Natalia, 2009). Metode inilah yang dipakai untuk mengidentifikasi O<sup>6</sup>-metilguanin di dalam sampel. Gambar instrumen analisis yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat di Lampiran 28.

Isolat sampel DNA yang telah dihidrolisis kemudian dianalisis secara kualitatif menggunakan metode di atas. Dari kromatogram hasil analisis sampel, ditentukan ada atau tidaknya O<sup>6</sup>-metilguanin dalam sampel DNA pasien dengan cara diamati apakah terdapat puncak pada waktu retensi sekitar menit ke 7,600 dan dilakukan pengukuran luas puncak. Jika puncak tersebut memiliki luas yang

lebih kecil dari luas nilai kadar minimum deteksi (limit of detection / LOD), yaitu 128.813,45  $\mu\text{V/s}$ , maka puncak tersebut dinyatakan tidak terdeteksi.

Hasilnya, dari 17 sampel yang dapat dianalisis, terdapat 2 orang pasien yang pada kromatogramnya terdapat puncak pada sekitar menit ke 7,600, yaitu pada pasien 18 dan pasien 19. Namun dari kedua pasien tersebut, hanya 1 pasien yang luas puncaknya melebihi nilai luas puncak kadar minimum deteksi, yaitu pada pasien 19. Oleh karena itu, puncak O<sup>6</sup>-metilguanin pada pasien 18 dinyatakan tidak terdeteksi oleh metode analisis yang diterapkan karena hanya memiliki luas puncak sebesar 36.890  $\mu\text{V/s}$ .

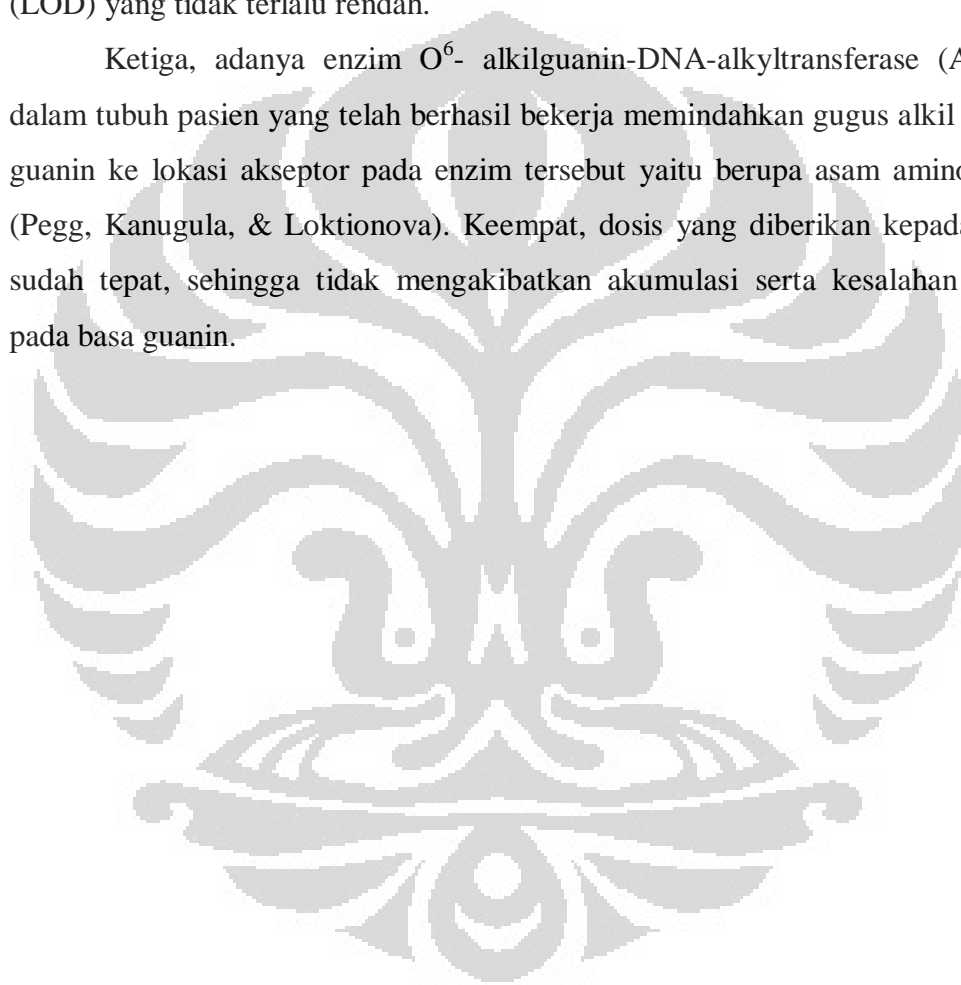
Pada kromatogram hidrolisat DNA pasien 19, terdapat puncak pada sekitar menit ke 7,600 dengan luas puncak sebesar 2.967.253  $\mu\text{V/s}$ . Berdasarkan luas puncaknya, diperkirakan kadar O<sup>6</sup>-metilguanin yang terdapat pada pasien adalah sebesar 546,69 ng/ml. Data analisis kualitatif 27 sampel tersebut dapat dilihat pada Lampiran 29 sedangkan kromatogram sampel 18 dan 19 dapat dilihat pada Lampiran 30 dan Lampiran 31.

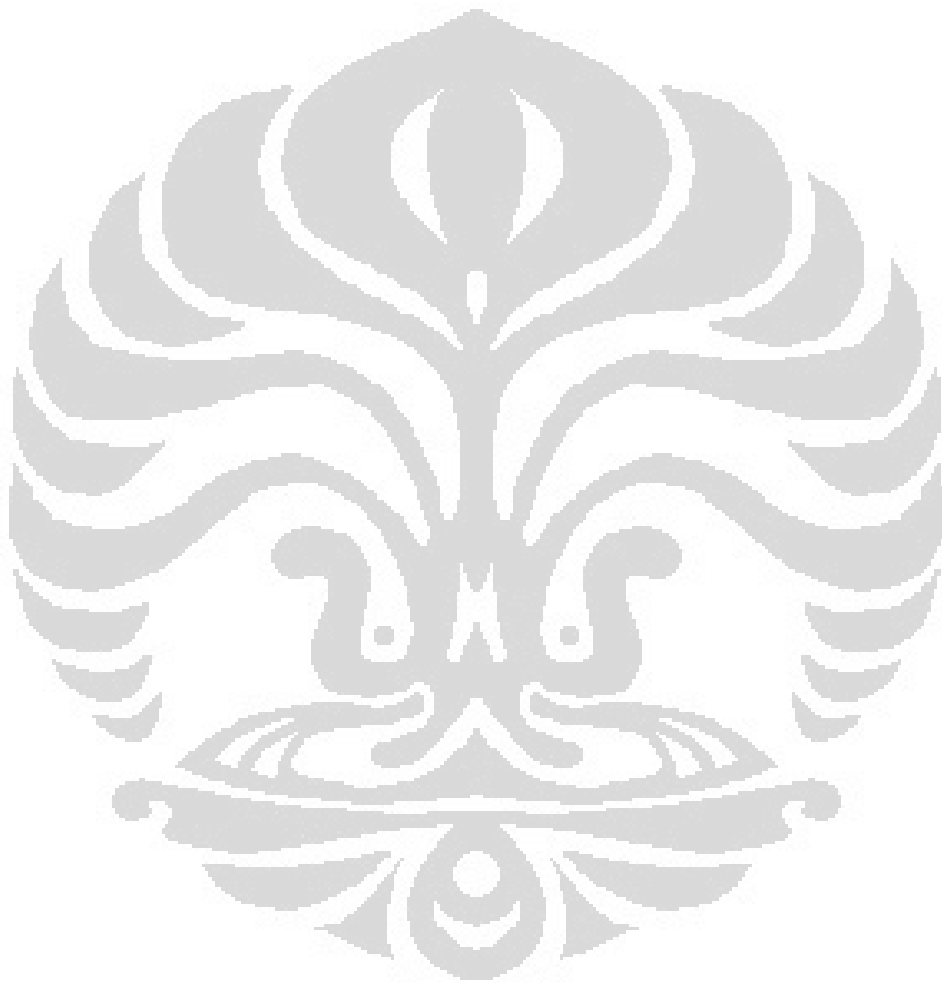
Pasien 19 merupakan pasien kanker ovarium yang berjenis kelamin wanita. Pasien tersebut telah mendapatkan 6 siklus kemoterapi dengan regimen kombinasi Siklofosfamid dan Doksorubisin. Tingginya perkiraan konsentrasi O<sup>6</sup>-metilguanin yang terbentuk diperkirakan terjadi akibat tingginya dosis siklofosfamid yang diberikan dibandingkan dengan dosis siklofosfamid yang normal diberikan pada pasien kanker ovarium yaitu 600-750  $\text{mg/m}^2$  (Langerak & Dreisbach, 2001). Pada siklus pertama kemoterapi, pasien mendapatkan siklofosfamid sebesar 1200  $\text{mg/m}^2$ , 1500  $\text{mg/m}^2$  pada siklus kedua, dan meningkat menjadi 1700  $\text{mg/m}^2$  pada siklus ketiga hingga siklus keenam.

Selain itu, tingginya jumlah siklus kemoterapi yang telah diterima pasien (6 siklus) diperkirakan mengakibatkan terjadinya akumulasi O<sup>6</sup>-metilguanin di dalam tubuh pasien. Hasil analisis pasien 19 ini memperkuat hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Vassilis L. Souliotis pada tahun 1990 yang berjudul "Accumulation of O<sup>6</sup>-Methylguanine in Human Blood Leukocyte DNA during Exposure to Procarbazine and Its Relationship with Dose and Repair" dimana O<sup>6</sup>-metilguanin yang terbentuk secara in vivo jumlahnya meningkat seiring dengan jumlah akumulasi dosis yang diterima.

Terdapat empat kemungkinan yang menyebabkan O<sup>6</sup>-metilguanin tidak terdeteksi pada 16 pasien lainnya. Pertama, alkilasi pada posisi O<sup>6</sup>-metilguanin memang tidak terjadi secara *in vivo* karena posisi tersebut memiliki nukleofilisitas yang paling kecil sehingga sulit teralkilasi. Kedua, O<sup>6</sup>-metilguanin mungkin saja telah terbentuk secara *in vivo* namun berada pada konsentrasi yang sangat kecil sehingga tidak dapat terdeteksi oleh metode analisis yang digunakan, terlebih kolom berada dalam kondisi yang tidak efisien dan memiliki nilai batas deteksi (LOD) yang tidak terlalu rendah.

Ketiga, adanya enzim O<sup>6</sup>-alkilguanin-DNA-alkyltransferase (AGT) di dalam tubuh pasien yang telah berhasil bekerja memindahkan gugus alkil dari O<sup>6</sup>-guanin ke lokasi akseptor pada enzim tersebut yaitu berupa asam amino sistein (Pegg, Kanugula, & Loktionova). Keempat, dosis yang diberikan kepada pasien sudah tepat, sehingga tidak mengakibatkan akumulasi serta kesalahan alkilasi pada basa guanin.





## BAB 5

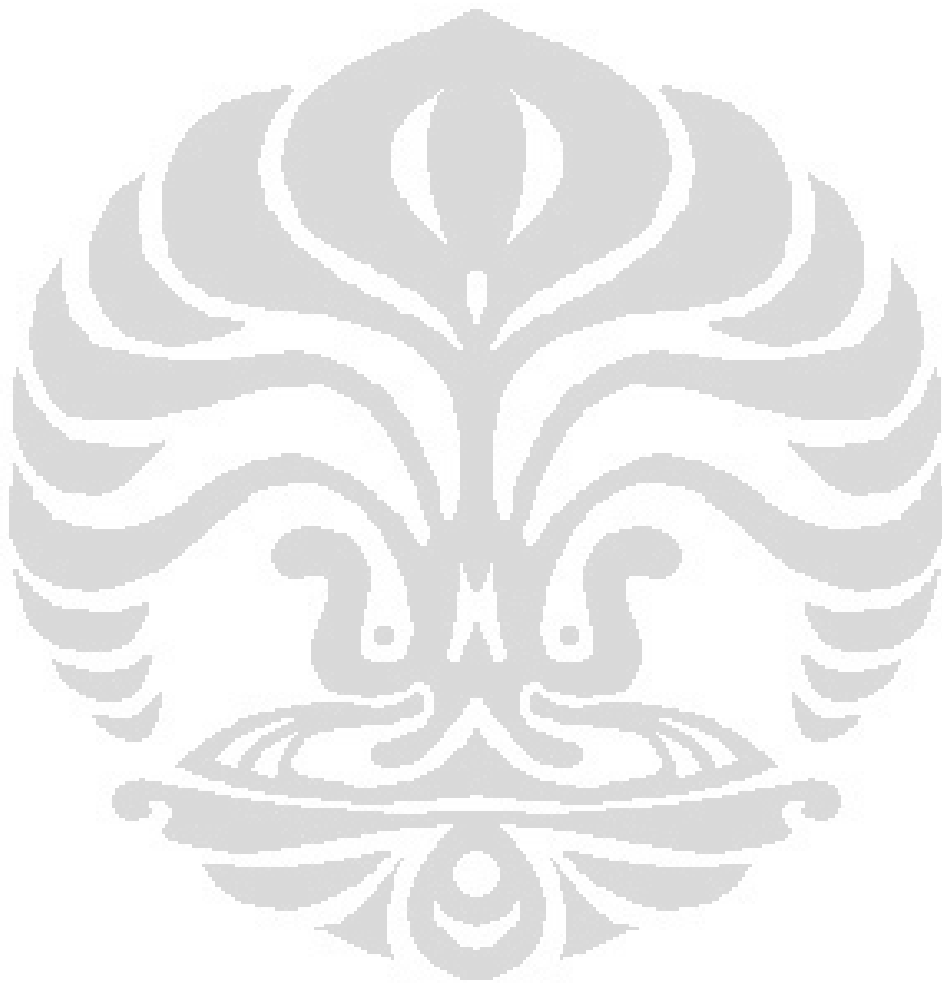
### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. O<sup>6</sup>-metilguanin dapat dianalisis secara kualitatif menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) penukar kation kuat dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol dengan perbandingan 94:6, suhu kolom 30°C, laju alir 1,2 ml/menit, yang dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm, dimana waktu retensi standar O<sup>6</sup>-metilguanin adalah 7,600 menit dengan batas deteksi sebesar 20,74 ng/ml (setara dengan luas puncak sebesar 128813,52  $\mu$ V/s)
2. O<sup>6</sup>-metilguanin terdeteksi pada 1 DNA pasien dari total 27 DNA pasien Rumah Sakit Kanker Dharmais yang telah menerima minimal 4 siklus kemoterapi yang mengandung siklofosfamid dalam regimennya. Pasien tersebut merupakan pasien kanker ovarium yang telah menerima kemoterapi sebanyak 6 siklus dengan dosis siklofosfamid yang diterima adalah 1.200 – 1.700 mg/m<sup>2</sup>.

#### 5.2 Saran

1. Jumlah pasien yang digunakan sebagai subjek hendaknya diperbanyak sehingga data yang didapatkan lebih valid untuk mewakili keseluruhan populasi.
2. Penelitian lebih difokuskan pada pasien kanker yang mendapatkan regimen kemoterapi dengan dosis tinggi (di atas 1000 mg/m<sup>2</sup>) serta telah menjalani kemoterapi lebih dari 4 siklus.



## DAFTAR ACUAN

- Avendanõ, C., & Menéndez, J. C. (2008). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Oxford: Elsevier.
- Balmer, C. M., Valley, A. W., & Iannucini, A. (2005). Cancer Treatment and Chemotherapy. Dalam J. T. DiPiro, R. L. Talbert, & G. C. Yee (Penyunt.), *Pharmacotherapy: A Patophysiologic Approach* (6th ed., hal. 2282). New York: McGraw-Hill.
- Bont, R. D., & Larebeke, N. v. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19 (3), 169-185.
- Braithwaite, A., & Smith, F. (1996). *Chromatographic Methods*. Dordrecht: Kluwe Academic Publisher.
- Brundage, D. (2008). Cancer Chemotherapy and Treatment. Dalam M. A. Chisholm-Burns (Penyunt.), *Pharmacotherapy Principles & Practice*. New York: McGraw-Hills.
- Brunton, L. L., & Parker, K. L. (Penyunt.). (2008). *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. New York: McGraw-Hill.
- Butler, J. M. (2012). *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. London: Elsevier.
- Carey, F. A. (2000). *Organic Chemistry* (4th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Center for Drug Evaluation and Research. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services.
- Chadt, J., Sykora, D., Nilsson, R., & Vodicka, P. (2008). Monitoring of dimethyl sulphate-induced N3-methyladenine, N7-methylguanine and O6-methylguanine DNA adducts using reversed-phase high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* (867), 43-48.
- Corwin, E. J. (2008). *Handbook of Pathophysiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.



- Farmer, P. B. (1995). Monitoring of Human Exposure to Carcinogens Through DNA and Protein Adduct Determination. *Toxicology Letters* (82), 757-762.
- Finkel, R., Clark, M. A., & Cubeddu, L. X. (Penyunt.). (2009). *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology* (4th ed.). Lipincott Williams & Wilkins.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gooding, K. M. (2002). Ion Exchange: Mechanism and Factors Affecting Separations. Dalam J. Cazes (Penyunt.), *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- Granner, D. K. (2003). Nucleic Acid Structure & Function. Dalam R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, & V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th ed.). New York: McGraw-Hill Companies.
- Guliaev, A. B., & Singer, B. (2004). DNA Damage: Alkylation. Dalam W. J. Lennarz, & M. D. Lane (Penyunt.), *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Vol. 1, hal. 607-611). London: Academic Press.
- Haky, J. (2002). Ion-Exchange Buffers. Dalam J. Cazes (Penyunt.), *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- Harahap, Y. (2003). *Rasio O6-Alkilguanin dan Tautan-Silang Terhadap N7-Alkilguanin yang Terbentuk Pada Reaksi Zat Pengalkil dengan DNA In Vitro*. Bandung: Disertasi Program S3 Farmasi ITB.
- Harahap, Y., Andalusia, R., Radji, M., & Natalia, L. (2009). Analysis of O6-alkylguanine in Breast Cancer Patients' Blood During Recurrent Oral Administration of Cyclophosphamide. *World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2009*. Istanbul.
- Harahap, Y., Hayun, & Irawati. (2008). Analysis of adduct which is formed from reaction between cyclophosphamide with guanine and *calf thymus* DNA in vitro by high performance liquid chromatography-strong cation exchange. *International Symposium on Molecular Targeted Drug Therapy*.
- Harahap, Y., Sari, S. P., Sari, N., & Herawati, H. (2008). Analysis of O6-Alkylguanine in Rat Blood During Recurrent Oral Administration of Cyclophosphamide. *The 8th Asian Conference on Clinical Pharmacy*. Surabaya.
- Harland, C. (1994). *Ion Exchange: Theory and Practice* (2th ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Herron, D. C., & Shank, R. (1979). Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of methylated purines in DNA of rats treated with chemical carcinogens. *Anal. Biochem.* (100), 58-63.
- Hemminki, K., & Kallama, S. (1986). Reactions of Nitrogen Mustards with DNA. Dalam D. Schmahl, & J. Kaldor (Penyunt.), *Carcinogenicity of Alkylating Cytostatic Drugs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- International Agency of Research on Cancer. (2010). *IARC Monographs - 100A: Cyclophosphamide*. Paris: International Agency of Research on Cancer.
- Johnson, E. L., & Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. (S. Niksolihin, Penyunt., & K. Padmawinata, Penerj.) Bandung: Penerbit ITB.
- Koolman, J., & Roehm, K.-H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry* (2 ed.). New York: Thieme.
- Kamus Saku Kedokteran Dorland* (25 ed.). (1996). (P. Kumala, & S. Komala, Penerj.) Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Langerak, A. D., & Dreisbach, L. P. (2001). *VANDEMECUM: Chemotherapy Regimens and Cancer Care*. Texas: Landes Bioscience.
- Lawley, P., & Phillips, D. (1996). DNA adducts from chemotherapeutic agents. *Mut. Res.* (355), 13-40.
- Lloyd, R. S., Kirkland, J. J., & Glajh, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development* (2nd ed.). New York: John Willey & Sons.
- Lyngdoh, D. (1994). Mutagenic Role of Watson-Crick Protons in Alkylated DNA Bases: A Theoretical Study. *J. Biosci*, 19 (2), 131-143.
- Maccubbin, A. E., Caballes, L., Riordan, J. M., Huang, D. H., & Gurtoo, H. L. (1991). A cyclophosphamid/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. *Cancer Res* (51), 886-892.
- Merck. (2001). *The Merck Index Thirteenth Edition* (CD-ROM Version). New Jersey: Merck and Company. Cambridge Soft.
- Nafriadi, & Gan, S. (2007). Antikanker. Dalam S. G. Gunawan (Penyunt.), *Farmakologi dan Terapi* (5th ed.). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.

- Otteneder, M., & Lutz, W. K. (1999). Correlation of DNA Adduct Levels with Tumor Incidence: Carcinogenic Potency of DNA Adducts. *Mut. Res.* , 424, 237-247.
- Pegg, A. E., Kanugula, S., & Loktionova, N. A. O6-alkylguanine-DNA-Alkyltransferase. Dalam T. M. Penning (Penyunt.), *Chemical Carcinogenesis*. New York: Springerlink.
- Penn, I. (1985). Malignancies Induced by Drug Therapy: A Review. Dalam D. Schmahl, & J. Kaldor (Penyunt.), *Carcinogenicity of Alkylating Cytostatic Drugs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- QIAGEN. (2007). *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Mainz: QIAGEN.
- Rakhman, A. M. (2005). *Optimasi Analisis Campuran Guanin, N7-Metilguanin, O6-Metilguanin, Adenin, N1-Metidl adenin, N3-Metiladenin dengan KCKT Penukar Kation Kuat*. Depok: Farmasi UI.
- Rodwell, V. W. (2003). Nucleotides. In R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, & V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells Using Proteinase K and Phenol. Dalam J. Sambrook, & D. W. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3th ed., Vol. 1, hal. 6.8). New York: Cold Spring Harbor Laboratori Press.
- Satiadarma, K., & Mulja, M. (2004). *Asas Pengembangan Prosedur Analisis*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Schmall, D. (1985). Carcinogenicity of Anticancer Drugs and Especially Alkylating Agents. Dalam D. Schmall, & J. Kaldor (Penyunt.), *Carcinogenicity of Alkylating Cytostatic Drugs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Sharma, R. A., & Farmer, P. B. (2004). Biological Relevance of Adduct Detection to The Chemoprevention of Cancer. *Clin. Cancer Res.* , 10, 4901-4912.
- Skoog, D. A., Holler, E. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instruments Analysis* (7th ed.). Belmont: Thomson Higher Education.
- Smith, F. T., & Clark, C. R. (2011). Antineoplastic Agents. Dalam J. M. Beale, & J. H. Block (Penyunt.), *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (12th Edition ed., hal. 358-369). Philadelphia: Lippincott Wiliams & Wilkins.

- Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: John Wiley & Sons.
- Stiborova, M. e. (1998). 32P-Post Labelling: A Sensitive Thechnique for Detection of DNA Adduct. *Chem. Listy*. (92), 661-668.
- Sugiyono. (2009). *Metodologi Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Sweetman, S. (Penyunt.). (2007). *Martindale: The Complete Drug Reference* (35th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Vassilis L. Souliotis, S. K. (1990). Accumulation of O6-Methylguanine in Human Blood Leukocyte DNA during Exposure to Procarbazine and Its Relationship with Dose and Repair. *Cancer Res* (50), 2759-2764.
- Vogel, A. I. (1989). *Vogel's Textbook of Quantitative Analysis* (5th Edition ed.). (G. Jeffery, J. Basset, J. Mendham, & R. Denney, Penyunt.) Essex: Longman Scientific & Technical.
- Warren, W. (1984). The Analysis of Alkylated DNA by High Pressure Liquid Chromatography. Dalam S. Venitt, & J. M. Parry (Penyunt.), *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press.
- Weil, P. A., & Granner, D. K. (2006). Struktur & Fungsi Asam Nukleat. Dalam R. K. Murray, D. K. Granner, & V. W. Rodwell, *Biokimia Harper* (27th ed.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.



# LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Cara perhitungan jumlah plat teoritis (N) dan HETP

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Dimana:

N = Jumlah Plat Teoritis

HETP = Panjang kolom yang sesuai dengan theoretical plate (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*)

$t_R$  = Waktu retensi

W = Lebar puncak yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

L = Panjang kolom

**Lampiran 2.** Cara perhitungan persentase uji perolehan kembali (% UPK) dan persentase diferensiasi (% diff)

$$\% \text{ UPK} = \frac{\text{Konsentrasi terukur}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Diff} = \frac{(\text{Konsentrasi terukur} - \text{Konsentrasi sebenarnya})}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

Dimana:

% UPK = Persentase uji perolehan kembali (% *recovery*)

% Diff = Persentase diferensiasi

**Lampiran 3.** Cara perhitungan persentase koefisien variasi (KV)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

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

Dimana:

SD = Standar Deviasi

$x_i$  = Luas puncak tiap konsentrasi

$\bar{x}$  = Luas puncak rata-rata

n = Jumlah replika penyuntikan

% KV = Persentase koefisien variasi



**Lampiran 4.** Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas)

$$a = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

sehingga persamaan garis :  $y = a + bx$

dengan nilai r :

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Dimana:

a = intercept

b = slope

r = koefisien korelasi

**Lampiran 5.** Cara perhitungan persentase koefisien fungsi regresi ( $V_{x_0}$ )

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}} \times 100\%$$

Dimana :

$S_{y/x}$  = Simpangan baku residual

$y$  = Luas puncak

$y_i$  = Luas puncak terukur

$n$  = Jumlah data

$S_{x_0}$  = Deviasi fungsi regresi

$b$  = Slope

$V_{x_0}$  = Koefisien fungsi regresi

$\bar{x}$  = Rata-rata konsentrasi

**Lampiran 6.** Cara perhitungan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ)

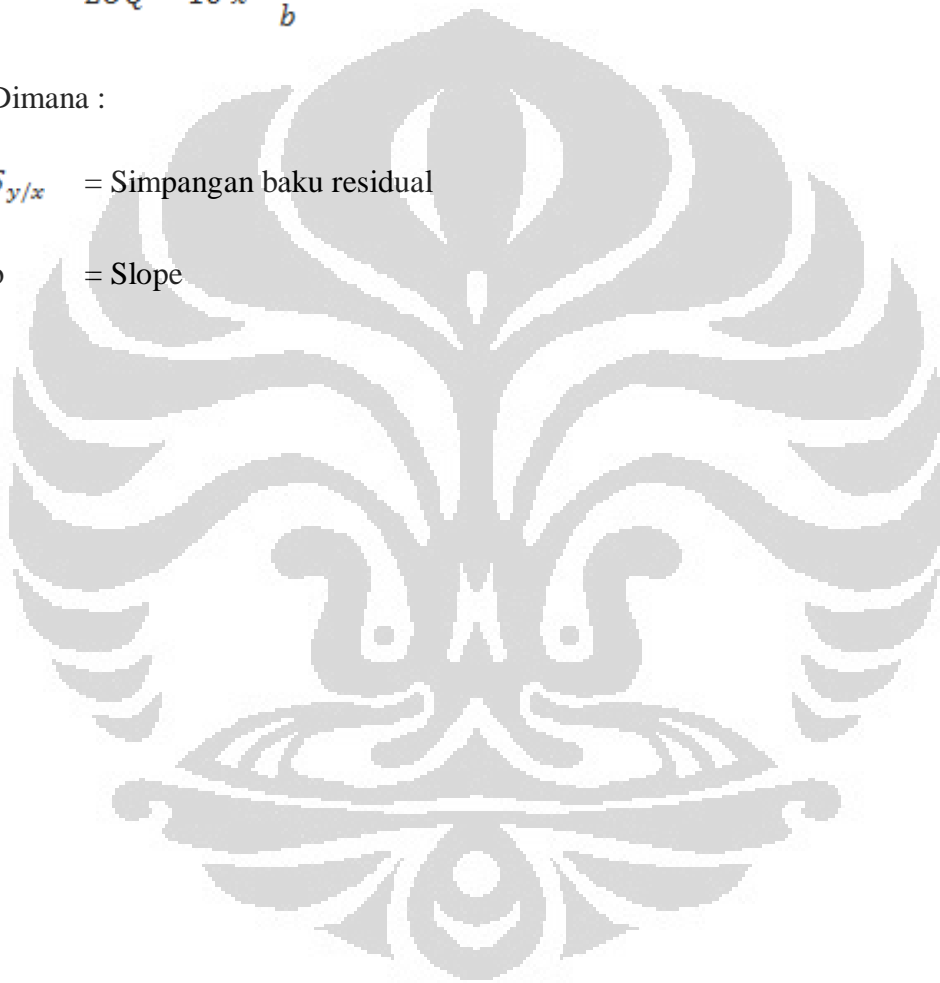
$$LOD = 3 \times \frac{S_{y/x}}{b}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{S_{y/x}}{b}$$

Dimana :

$S_{y/x}$  = Simpangan baku residual

b = Slope



**Lampiran 7.** Cara perhitungan resolusi (R)

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 - W_2}$$

Dimana:

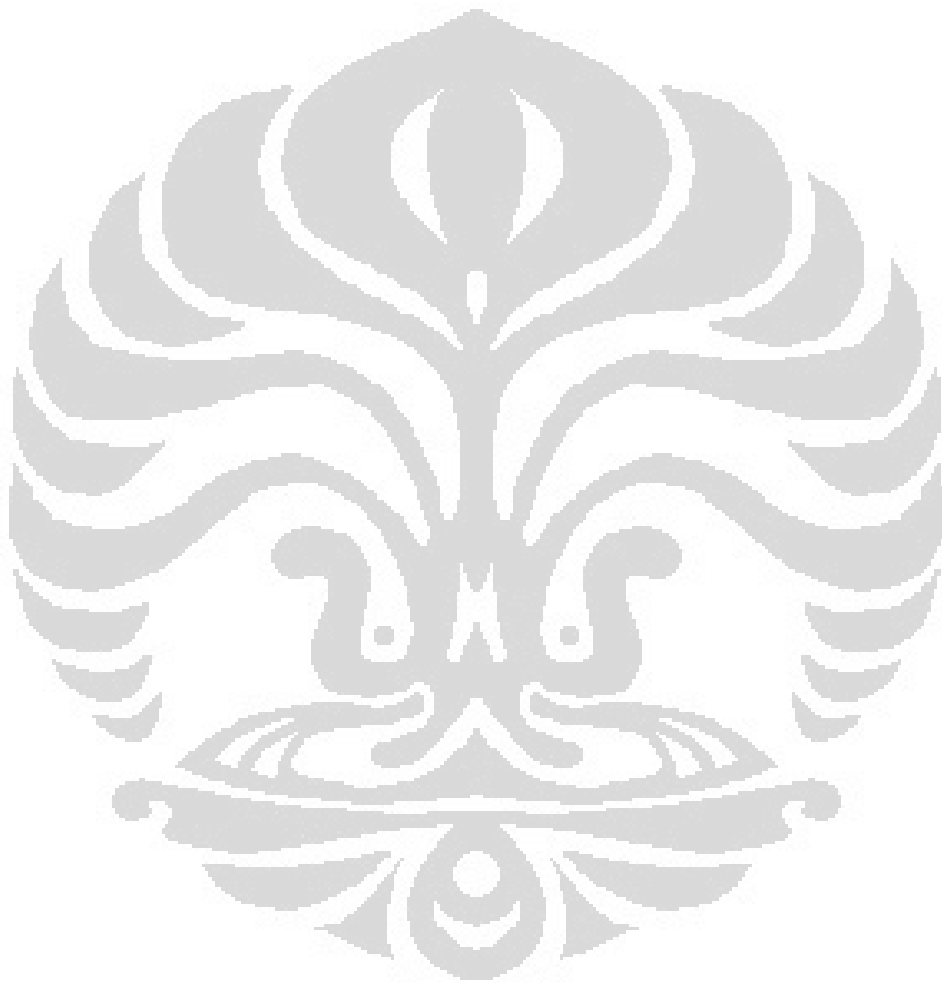
R = Resolusi

$t_{R1}$  = Waktu retensi analit 1

$t_{R2}$  = Waktu retensi analit 2

$W_1$  = Lebar puncak yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak 1 yang relatif lurus sampai garis dasar

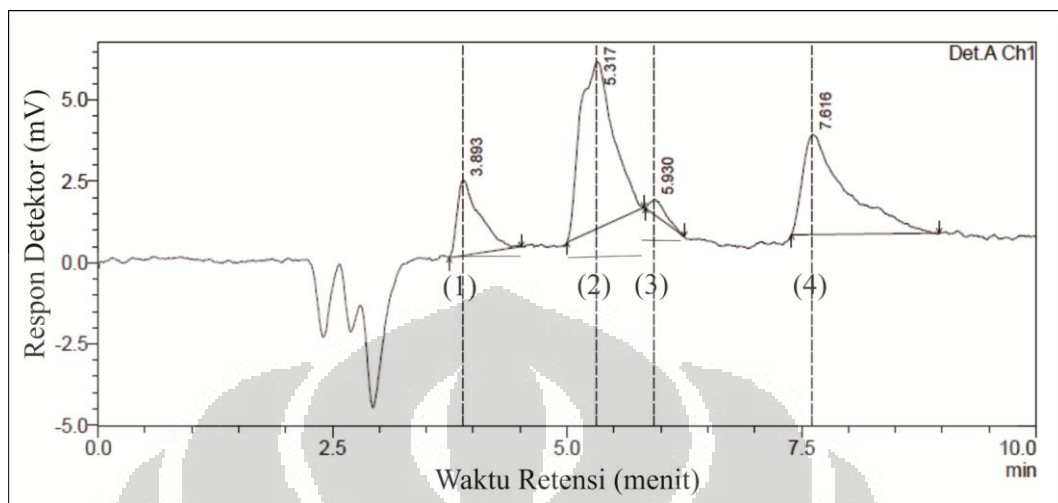
$W_2$  = Lebar puncak yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak 2 yang relatif lurus sampai garis dasar



**Lampiran 8.** Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem O<sup>6</sup>-metilguanin

No	Konsentrasi (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)	Waktu Retensi (menit)	N (Pelat Teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)	Tf (Faktor ikutan)	Waktu Retensi			Pelat Teoritis		
							$\bar{x}$	SD	%KV	$\bar{x}$	SD	%KV
1	101,0	601296	7,625	1856,674	0,013464938	3,216	7,612	0,0151	0,1978	1883,136	25,1235	1,3341
2		593868	7,597	1868,859	0,013377146	3,143						
3		607086	7,609	1870,064	0,013368526	3,101						
4		598931	7,631	1909,07	0,013095382	3,040						
5		595570	7,600	1911,015	0,013082053	2,965						

Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0  $\mu$ m, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ l

**Lampiran 9.** Gambar kromatogram campuran larutan standar

Keterangan : (1) Guanin 1  $\mu\text{g/ml}$ ; (2) Campuran  $\text{N}^7$ -metilguanin 1  $\mu\text{g/ml}$  dan adenin 1  $\mu\text{g/ml}$ ; (3) Adenin 1  $\mu\text{g/ml}$ ; (4)  $\text{O}^6$ -metilguanin 25  $\text{ng/ml}$ . Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0  $\mu\text{m}$ , dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{l}$

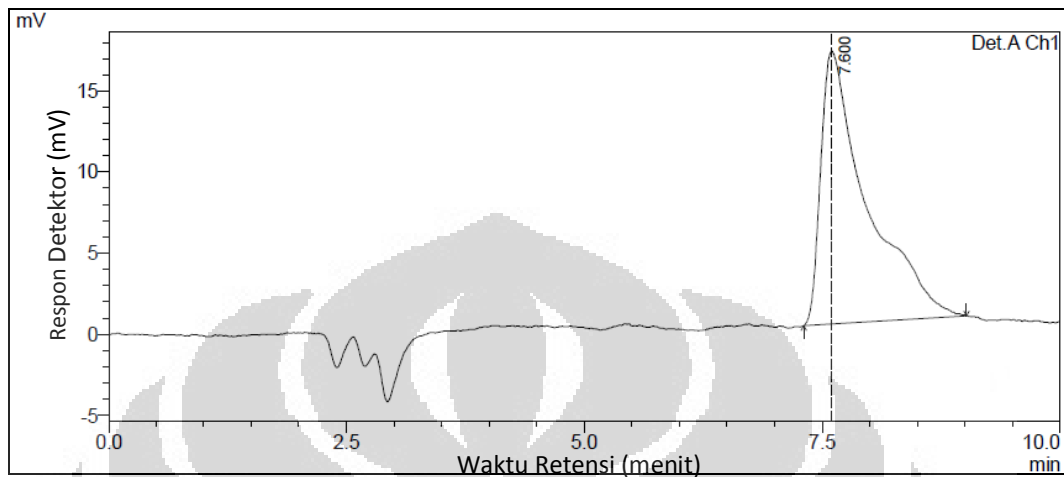
**Lampiran 10.** Hasil perhitungan resolusi komponen lain terhadap O<sup>6</sup>-metilguanin untuk uji kesesuaian sistem

R-1-2	R-2-3	R-3-4
1,98	1,21	1,71
1,99	1,21	1,72
1,89	1,19	1,72
1,86	1,20	1,70
1,88	1,19	1,71

Keterangan: (1) Guanin; (2) Campuran N<sup>7</sup>-metilguanin; (3) Adenin 1 µg/ml; (4) O<sup>6</sup>-metilguanin 25 ng/ml. Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

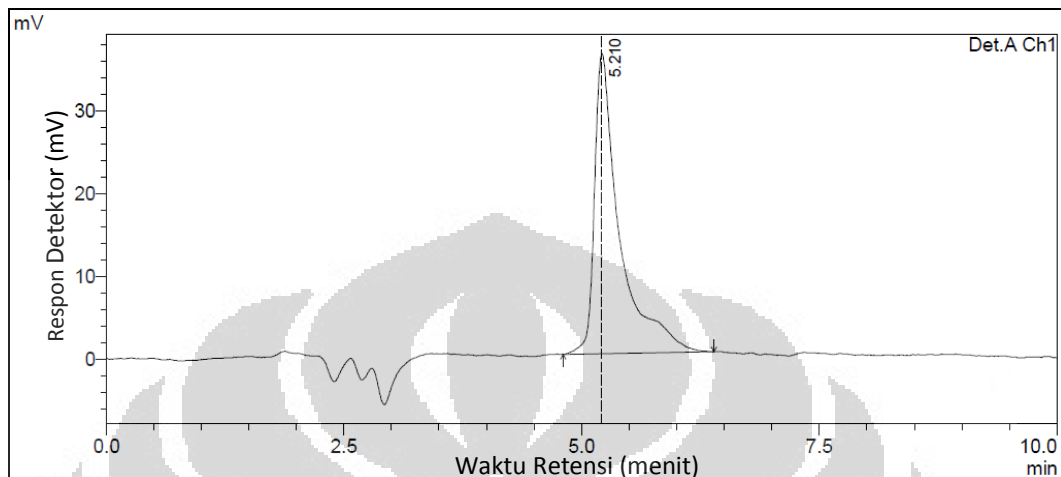


**Lampiran 11.** Gambar kromatogram standar O<sup>6</sup>-metilguanin 101,0 ng/ml



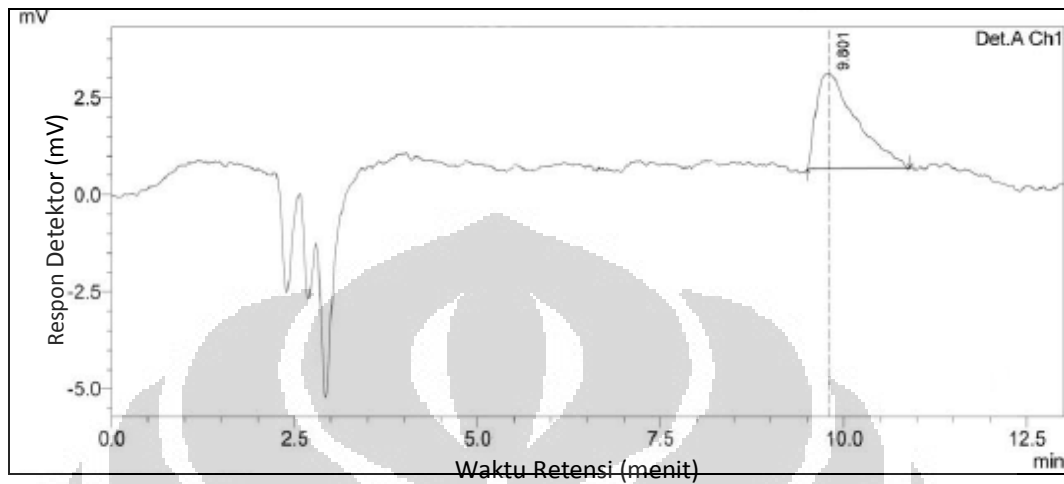
Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 12.** Gambar kromatogram standar N<sup>7</sup>-metilguanin 10,1 µg/ml



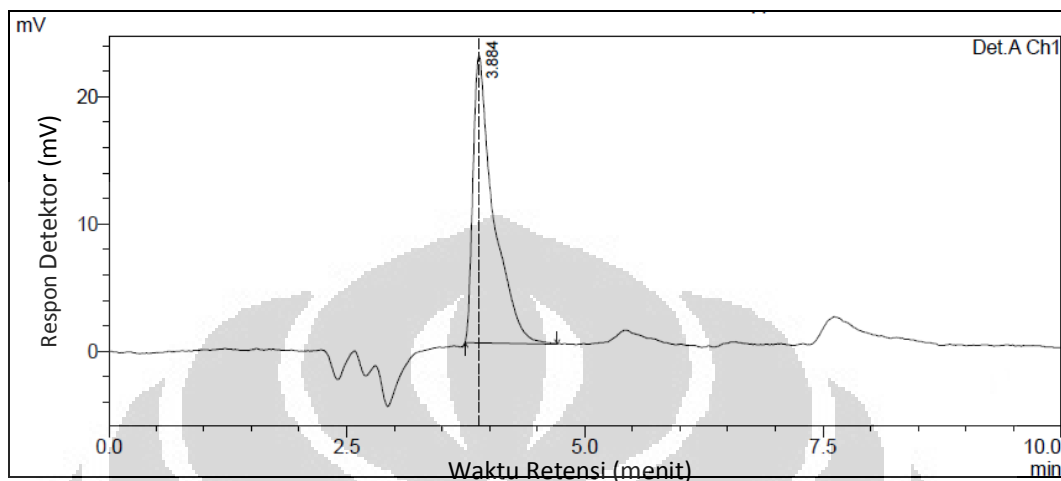
Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 13.** Gambar kromatogram standar N<sup>3</sup>-metiladenin 10,1 µg/ml



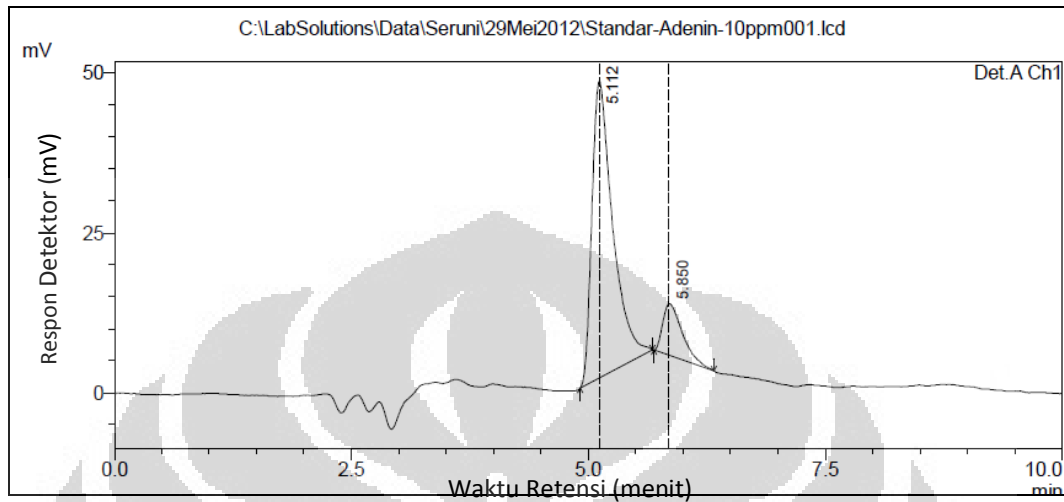
Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 14.** Gambar kromatogram standar guanin 10,1 µg/ml



Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 15.** Gambar kromatogram standar adenin 10,1 µg/ml



Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 16.** Hasil pengukuran kurva kalibrasi O<sup>6</sup>-metilguanin

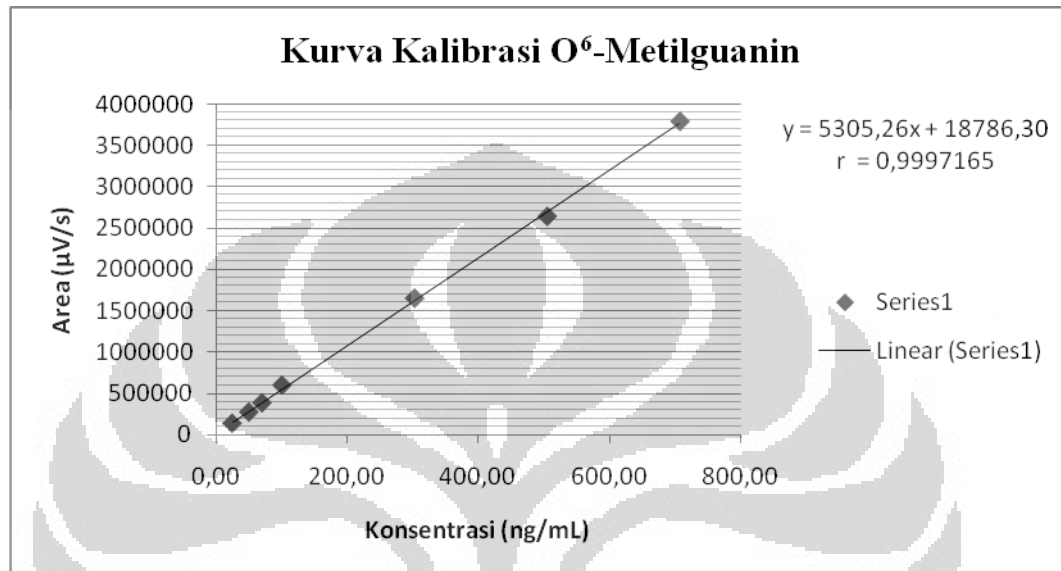
No	Konsentrasi (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)
1	25,25	136253
2	50,50	272262
3	70,70	385634
4	101,00	598931
5	303,00	1651403
6	505,00	2643284
7	707,00	3793995

$$y = 18786,302 + 5305,26x$$

$$r = 0,9997165$$

Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0  $\mu$ m, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ l

Lampiran 17. Gambar kurva kalibrasi O<sup>6</sup>-metilguanin



Keterangan : Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 18.** Hasil pengukuran linearitas O<sup>6</sup>-metilguanin

No	Konsentrasi (x) (ng/ml)	Area (y) ( $\mu$ V/s)	Area Terukur (y <sub>i</sub> ) ( $\mu$ V/s)	Selisih (y-y <sub>i</sub> ) <sup>2</sup> ( $\mu$ V/s)	$\Delta$ x	$\Delta$ y	$\Delta$ y/ $\Delta$ x
1	25,25	136253	152744,12	272040226,4	25,25	136009	5386,5
2	50,50	272262	286701,93	208657505	20,20	113372	5612,48
3	70,70	385634	393868,18	67918267,49	30,30	213297	7039,5
4	101,00	598931	554617,56	1962785758	202,00	1052472	5210,26
5	303,00	1651403	1626280,08	629639478,1	202,00	991881	4910,3
6	505,00	2643284	2697942,60	2993085842	202,00	1150711	5696,59
7	707,00	3793995	3769605,12	591422418,6			

$\Sigma (y-y_i)^2$	6725541080
$\bar{x}$	251,78
$S_{y/x}$	36675,71698
$S_{x_0}$	6,913
$V_{x_0}$	2,746%

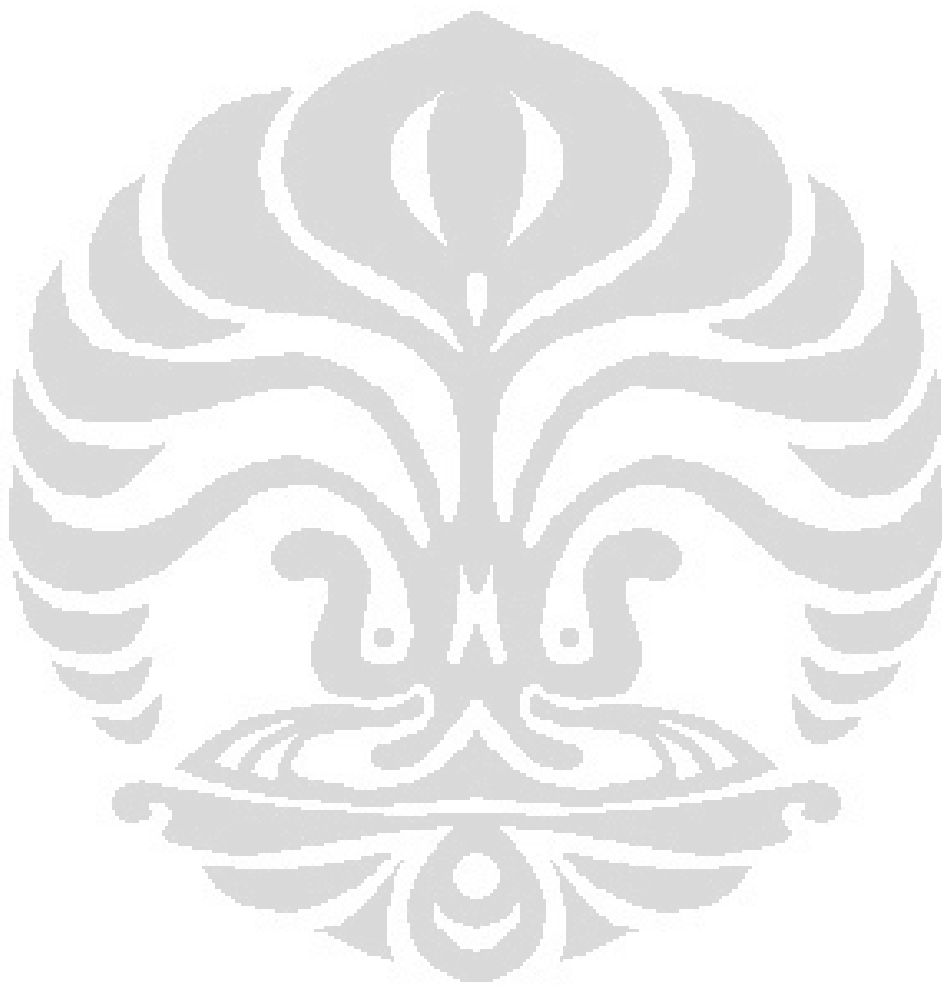
Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0  $\mu$ m, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ l



**Lampiran 19.** Hasil pengukuran batas deteksi (*limit of detection* / LOD)  
O<sup>6</sup>-metilguanin secara statistika

No	Konsentrasi (x) (ng/ml)	Area (y) ( $\mu$ V/s)	Area Terukur (y <sub>i</sub> ) ( $\mu$ V/s)	Selisih (y-y <sub>i</sub> ) <sup>2</sup> ( $\mu$ V/s)
1	25,25	136253	152746,642	272040226,4
2	50,50	272262	286706,982	208657505
3	70,70	385634	393875,254	67918267,49
4	101,00	598931	554627,662	1962785758
5	303,00	1651403	1626310,382	629639478,1
6	505,00	2643284	2697993,102	2993085842
7	707,00	3793995	3769675,822	591422418,6
		$\Sigma (y-y_i)^2$	6725541080	
		$\bar{x}$	251,78	
		$S_{y/x}$	36675,71698	
		$S_{x_0}$	6,913	
		$V_{x_0}$	2,746%	
		LOD	20,74 ng/ml	
		LOQ	69,13 ng/ml	
		Area LOD	128813,45 $\mu$ V/s	
		Area LOQ	385543,47 $\mu$ V/s	

Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0  $\mu$ m, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ l

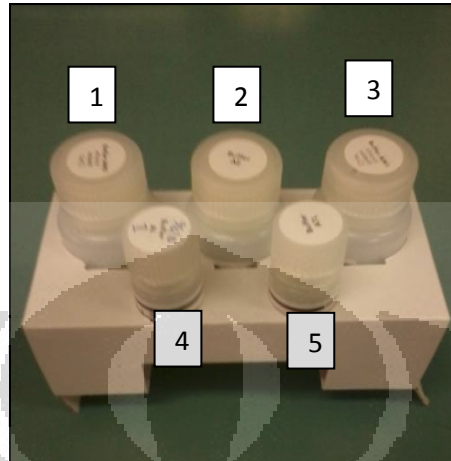


**Lampiran 20.** Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) O<sup>6</sup>-metilguanin

Konsentrasi Sebenarnya (ng/ml)	Area (y) (μV/s)	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Konsentrasi Rata-Rata	Area Rata-Rata (ȳ) (μV/s)	(y-ȳ) <sup>2</sup>	Σ (y-ȳ) <sup>2</sup>	SD Area	KV Area (%)	Recovery (%)	% diff (%)
50,5	272263	47,78	47,02	268262	16008001	25195930,39	2244,81	0,8368	94,61	-5,39
	265519	46,51			7524049				92,09	-7,91
	268590	47,09			107584				93,24	-6,76
	267318	46,85			891136				92,76	-7,24
	268423	47,05			25760,25				93,18	-6,82
	267462	46,87			639400				92,82	-7,18
101,0	602374	110,00	109,53	599854	16024009	128967069	5078,72	0,8467	108,91	8,91
	601296	109,80			8555625				108,71	8,71
	593868	108,40			20277009				107,33	7,33
	607086	110,89			75951225				109,79	9,79
	598931	109,35			313600				108,27	8,27
	595570	108,72			7845601				107,64	7,64
505,0	2650960	496,14	496,49	2652810	8259876	120858443	4916,47	0,1853	98,25	-1,75
	2660127	497,87			39601849				98,59	-1,41
	2654688	496,85			729316				98,39	-1,61
	2648135	495,61			32478601				98,14	-1,86
	2655258	496,95			2027776				98,41	-1,59
	2647689	495,53			37761025				98,12	-1,88

Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 μm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 μl.

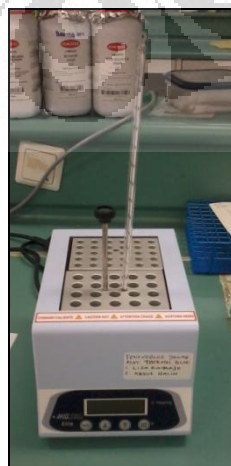
**Lampiran 21.** Gambar instrumen yang digunakan dalam isolasi DNA



Keterangan : Reagen yang digunakan dalam isolasi DNA (*QIAamp DNA Mini Kits*): (1) Buffer AW; (2) Buffer AW2; (3) Buffer AE; (4) Buffer AL (5) Proteinase K



Keterangan: QIAgen *column* dan *collection tube* (*QIAamp DNA Mini Kits*): (1) QIAgen *column*; (2) QIAgen *collection tube*



Keterangan: Thermal Blok (MajorScience Elite)

(lanjutan)



Keterangan: Alat Sentrifugasi (ThermoScientific Micro CL 17R)

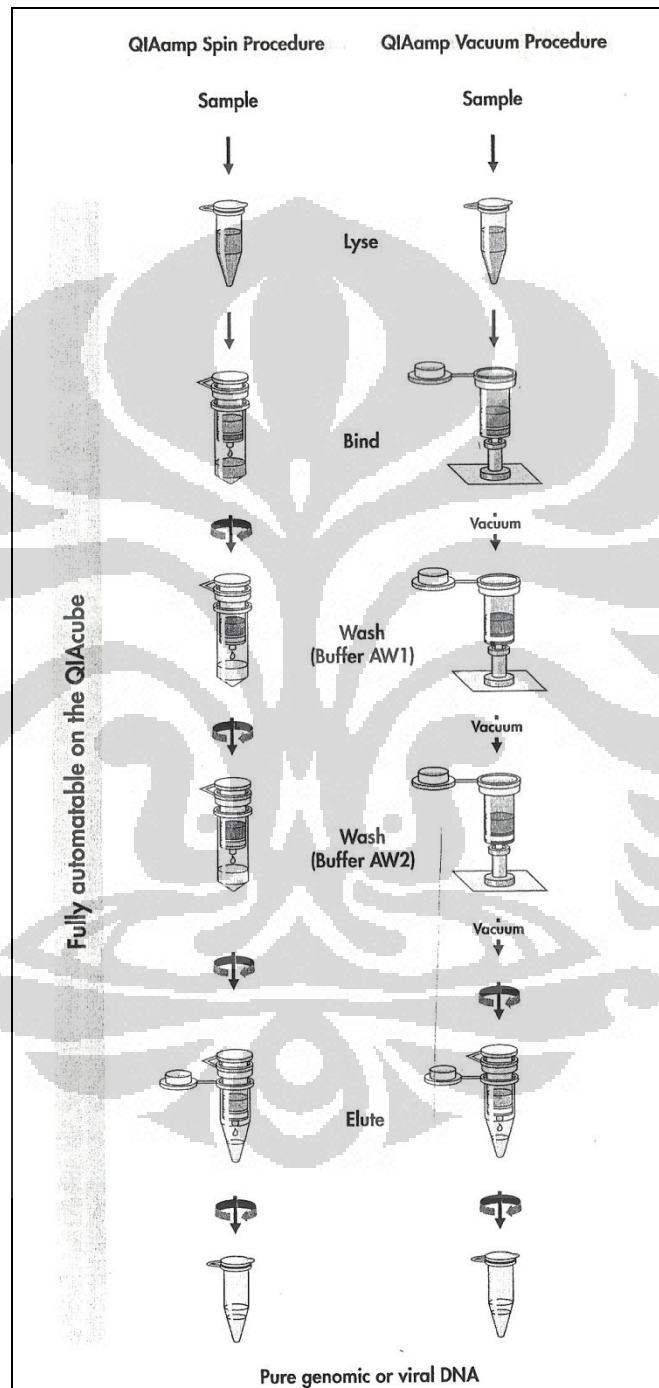


Keterangan: Vortex (Thermolyne type 37600 Mixer)

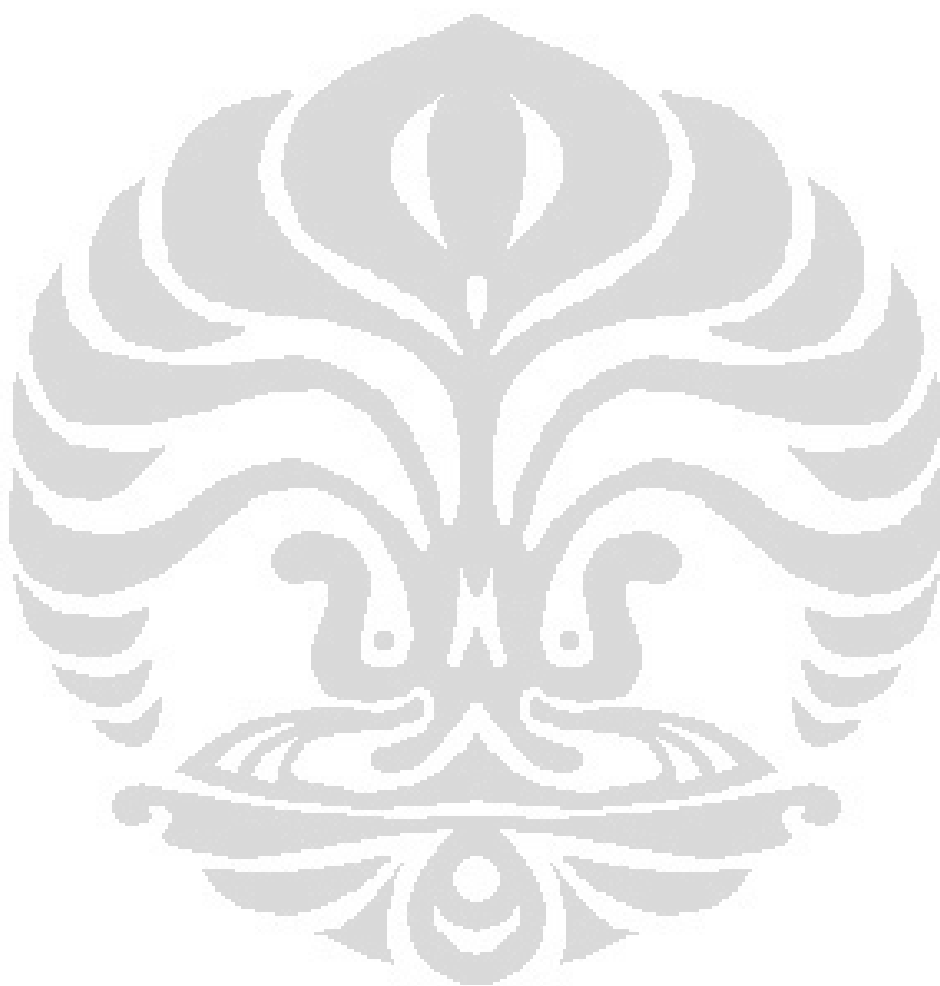


Keterangan: Microcentrifuge (LX-100)

**Lampiran 22.** Skema isolasi DNA menggunakan *QIAamp DNA Mini Kits*



Keterangan: Sumber: QIAGEN. 2007. *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Mainz: QIAGEN.



**Lampiran 23.** Data pasien serta kadar DNA terisolasi

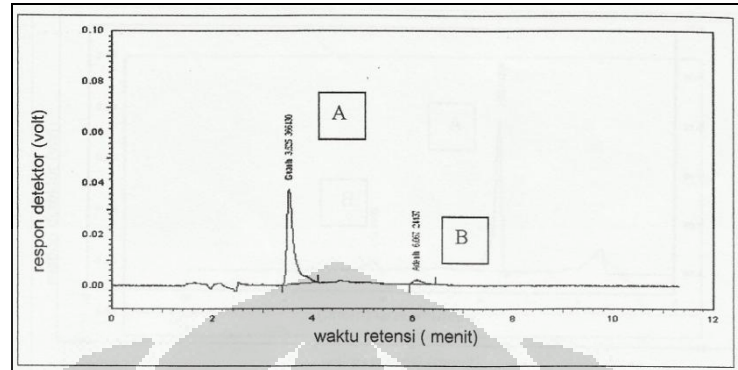
No Pasien	Diagnosa	Obat Lain yang Diterima Selain Siklofosamid	Dosis Siklofosamid pada Siklus Terakhir (mg/m <sup>2</sup> )	Durasi Kemoterapi (hari)	Jumlah Kemoterapi yang Telah Dijalani	Kadar DNA Terisolasi (µg/mL)
1	Ovarium	Dokсорubisin	1200	21	4	252,7
2	Mammae	Dokсорubisin, 5-Fluorourasil	700	21	6	193,2
3	LNH	Dokсорubisin, Vinkristin	1000	27	4	130,6
4	Mammae	Dokсорubisin, 5-Fluorourasil	885	21	5	231,3
5	Mammae	Metotreksat, 5-Fluorourasil	1024	21	4	216,6
6	LM	Dokсорubisin, Vinkristin	1200	21	5	239,5
7	LM	Dokсорubisin, Vinkristin	1200	27	4	191
8	Mammae	Dosetaksel	985	21	7	202,9
9	Mammae	Dokсорubisin	750	21	4	209
10	LNH	Dokсорubisin, Vinkristin	1200	21	7	226
11	LNH	Epirubicin, Vinkristin	1000	21	9	40,5
12	Mammae	Dokсорubisin, 5-Fluorourasil	1000	21	6	26
13	Mammae	Dosetaksel	960	21	6	27,6
14	Mammae	Dokсорubisin, 5-Fluorourasil	750	21	6	9,3
15	Mammae	Metotreksat, 5-Fluorourasil	900	21	6	45



(lanjutan)

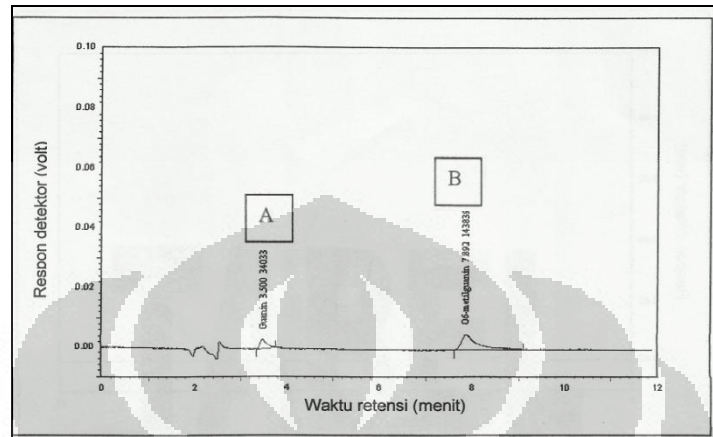
16	Mammae	Dosetaksel	700	21	5	22,4
17	Mammae	Doksorubisin, 5-Fluorourasil	820	21	4	44,3
18	Mammae	Doksorubisin, 5-Fluorourasil	780	21	6	41,2
19	Ovarium	Doksorubisin	1700	21	6	4,5
20	Neuroblastoma	Vinkristin	900	21	9	33,6
21	Mammae	Doksorubisin	905	21	4	79,4
22	Mammae	Doksorubisin, 5-Fluorourasil	760	21	7	57,3
23	Mammae	Metotreksat, 5-Fluorourasil	800	21	4	0,6
24	Mammae	Dosetaksel	1000	21	12	10,1
25	Mammae	Metotreksat, 5-Fluorourasil	900	27	4	25,4
26	Mammae	Doksorubisin, 5-Fluorourasil	900	21	4	2,9
27	Ovarium	Doksorubisin	1000	21	4	12,6

**Lampiran 24.** Kromatogram DNA *calf thymus* tanpa reaksi alkilasi



Keterangan : Kromatogram DNA *calf thymus* dalam aquadest tanpa reaksi dengan siklofosamid *in vitro*, disertai hidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70 °C selama 30 menit dimana (A) Guanin dan (B) Adenin. Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

### Lampiran 25. Kromatogram DNA *calf thymus* dengan reaksi alkilasi



Keterangan : Kromatogram endapan hasil reaksi 0,5 ml DNA *calf thymus* (50 mg/12,5 ml) dengan 4,0 mg siklofosamid dalam 1,0 ml campuran dimetilsulfoksida dan dapar Tris-HCl 0,01 M pH 8,0 *in vitro*, setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70 °C selama 30 menit dimana (A) Guanin dan (B) Adenin. Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

**Lampiran 26.** Intensitas fluoresensi basa DNA teralkilasi

pH	Intensitas Fluoresensi			
	N <sup>7</sup> -Metilguanin	O <sup>6</sup> -Metilguanin	N <sup>3</sup> -Metiladenin	N <sup>1</sup> -Metiladenin
4	0.0130	10.600	0.0010	0.0010
5	-	2.050	-	-
6	-	1.950	-	-
7	-	2.050	-	-
8	-	1.950	-	-
9	-	1.800	-	-
10	-	1.750	-	-
11	-	0.550	-	-

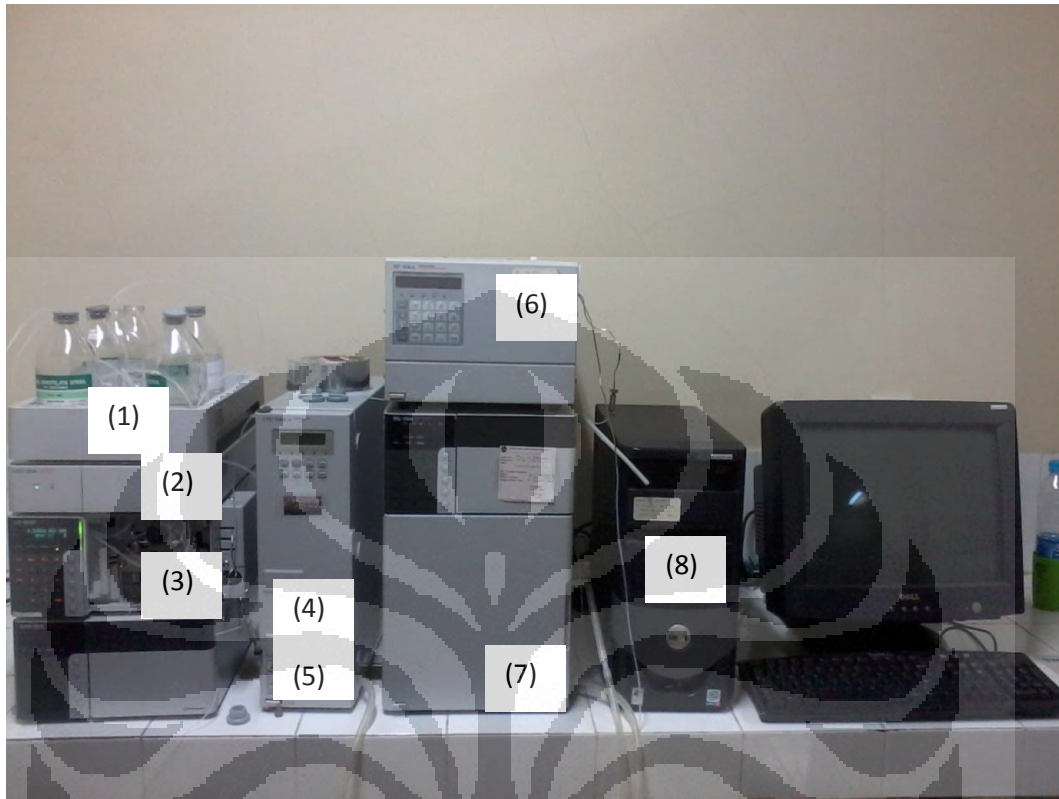
Keterangan : Diukur pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan panjang gelombang emisi 370 nm. Sumber: Harahap, Y. (2003). *Rasio O6-Alkilguanin dan Tautan-Silang Terhadap N7-Alkilguanin yang Terbentuk Pada Reaksi Zat Pengalkil dengan DNA In Vitro*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

**Lampiran 27.** Data protonasi basa DNA dan basa DNA teralkilasi

Nama Zat	pKa	% Protonasi pada pH 3,95
Guanin	2,19	1,62 %
O <sup>6</sup> -Metilguanin	5,31	96,21 %
N <sup>7</sup> -Metilguanin	2,14	1,53%
Adenin	1,37	0,80%
N <sup>3</sup> -Metiladenin	5,36	96,31

Keterangan : Data diperoleh menggunakan perangkat lunak (*software*) Marvin Sketch 5.8.2 2011



**Lampiran 28.** Gambar peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

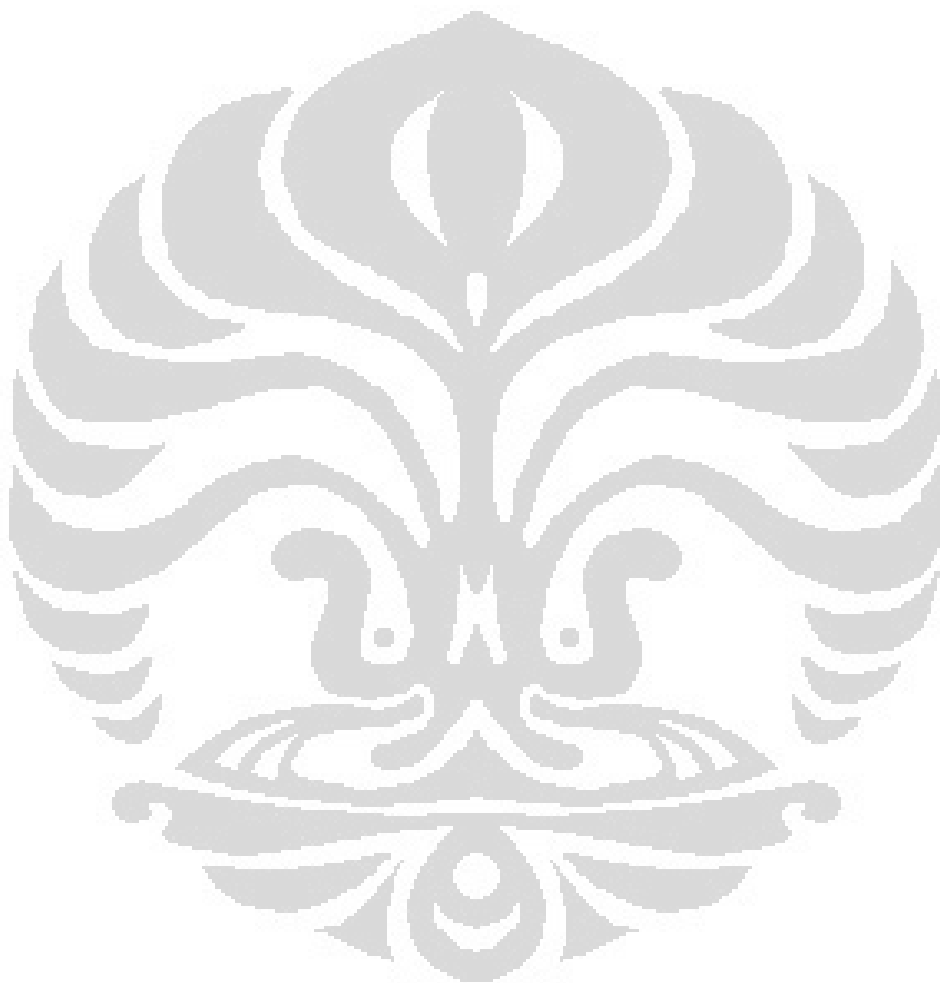
Keterangan : 1. Wadah penampung fase gerak; 2. Penghilang gas (DGU-12A VP, Shimadzu); 3. Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-20AD VP, Shimadzu); 4. Oven kolom (Shimadzu CTO-10AS VP); 5. Kolom (Supelcosil LC-CSX 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm, terdapat di dalam oven); 6. Detektor Fluoresensi (Shimadzu RF-10A XL); 7. *Autosampler* (Shimadzu SIL-20A); 8. Komputer dengan perangkat lunak *LC Solution*.

**Lampiran 29.** Hasil analisis sampel DNA pasien

No Pasien	Guanin (menit)	Adenin (menit)	N <sup>7</sup> - metilguanin (menit)	Campuran Adenin & N <sup>7</sup> - metilguanin (menit)	O <sup>6</sup> - metilguanin (menit)	N <sup>3</sup> - metiladenin (menit)
Standar	3,884	5,112	5,21	5,317	7,6	9,001
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	3,885	-	-	5,425	-	-
12	3,885	-	-	5,44	-	-
13	3,538	-	-	5,414	-	-
14	3,887	-	-	5,629	-	-
15	3,994	-	-	5,43	-	-
16	4,007	-	-	5,422	-	-
17	3,887	-	-	5,43	-	-
18	3,858	-	-	5,495	-	-
19	3,886	-	-	5,374	7,569	-
20	3,886	-	-	5,396	-	-
21	3,885	-	-	5,375	-	-
22	3,884	-	-	5,389	-	-
23	4,005	-	-	5,393	-	-
24	3,999	-	-	5,38	-	-
25	3,885	-	-	5,584	-	-
26	3,962	-	5,169	-	-	-
27	3,897	-	5,27	-	-	-

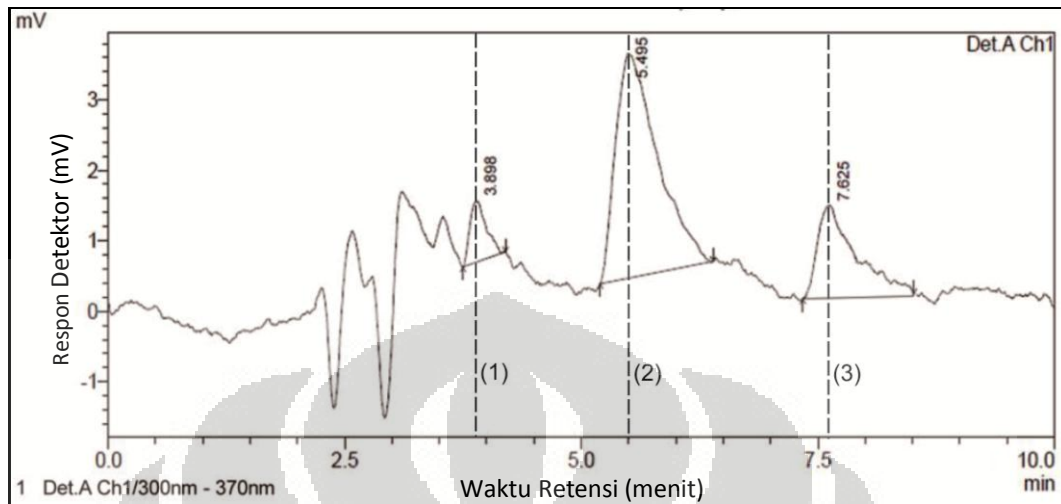
Keterangan: Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom

30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl



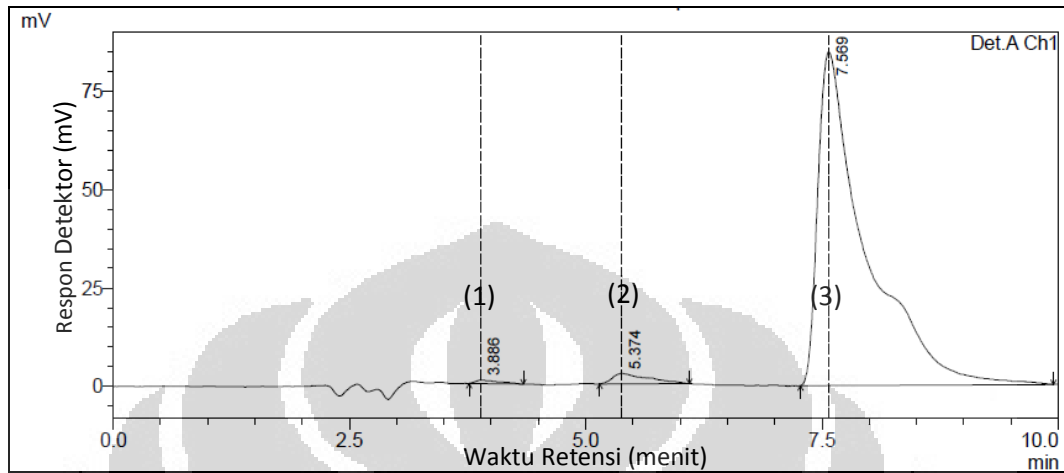


**Lampiran 30.** Kromatogram pasien 18.



Keterangan : (1) Guanin; (2) Campuran Adenin – N<sup>7</sup>-metilguanin; (3) O<sup>6</sup>-metilguanin. Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

### Lampiran 31. Kromatogram pasien 19.




Keterangan : (1) Guanin; (2) Campuran Adenin – N<sup>7</sup>-metilguanin; (3) O<sup>6</sup>-metilguanin. Kondisi: kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom penukar kation kuat Supelcosil® LC-SCX dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5,0 µm, dengan fase gerak amonium format 30 mM pH 3,95 - metanol (94:6); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,2 ml/menit; detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikkan 20,0 µl

Lampiran 32. Sertifikat analisis O<sup>6</sup>-metilguanin

Certificate of Analysis		
SIGMA-ALDRICH		
Product Name	6-O-Methylguanine, 97%	
Product Number	363057	
Product Brand	ALDRICH	
CAS Number	20535-83-5	
Molecular Formula	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O	
Molecular Weight	165.15	
<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT 05417jhv RESULTS</b>
<b>APPEARANCE</b>	WHITE TO LIGHT YELLOW POWDER OR CRYSTALLINE	LIGHT YELLOW POWDER
<b>INFRARED SPECTRUM</b>		CONFORMS TO STRUCTURE.
<b>ELEMENTAL ANALYSIS</b>	CARBON 42.1% - 45.2%	CARBON 43.60%
	NITROGEN 40.9% - 43.9%	NITROGEN 42.34%
<b>HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY</b>	96.5% (MINIMUM)	98.1%
<b>PRODUCT CROSS</b>		REPLACES PRODUCT NUMBER M9286
<b>REFERENCE INFORMATION</b>		
<b>QUALITY CONTROL</b>		
		
Barbara Rajzer, Supervisor Quality Control Milwaukee, Wisconsin USA		

## Lampiran 33. Sertifikat analisis Guanin



**SIGMA-ALDRICH**

**Certificate of Analysis**

Product Name	Guanine
Product Number	G6779
Product Brand	SIGMA
CAS Number	73-40-5
Molecular Formula	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O
Molecular Weight	151.13

TEST	SPECIFICATION	LOT 033K5008 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO OFF-WHITE POWDER	OFF-WHITE POWDER
SOLUBILITY	COMPLETE COLORLESS (0.1 M IN 1 N SODIUM HYDROXIDE AT 20 DEG CENTIGRADE)	CONFORMS
PURITY BY HPLC	MINIMUM 99%	100.0%
RESIDUE ON IGNITION	<0.1%	PASS
INSOLUBLE MATTER	<0.1%	PASS
ALUMINUM (AL)	<0.002%	PASS
CALCIUM (CA)	<0.005%	PASS
COPPER (CU)	<0.0005%	PASS
IRON (FE)	<0.002%	PASS
LEAD (PB)	<0.001%	PASS
MAGNESIUM (MG)	<0.0005%	PASS
PHOSPHORUS (P)	<0.005%	PASS
POTASSIUM (K)	<0.005%	PASS
SODIUM (NA)	<0.05%	PASS
ZINC (ZN)	<0.002%	PASS
SHELF LIFE	3 YEARS	APRIL 2006
QC ACCEPTANCE DATE		APRIL 2003

*Len Schulz*

Len Schulz, Manager  
Analytical Services

Lampiran 34. Sertifikat analisis N<sup>7</sup>-metilguanin



**SIGMA-ALDRICH**

**Certificate of Analysis**

<b>Product Name</b>	7-Methylguanine, purum, ≥98.0% (HPLC)
<b>Product Number</b>	67073
<b>Product Brand</b>	Fluka
<b>CAS Number</b>	578-76-7
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O
<b>Molecular Weight</b>	165.15


<b>TEST</b>	<b>LOT 1316539 RESULTS</b>
<b>APPEARANCE (COLOR)</b>	FAINTLY YELLOW
<b>APPEARANCE (FORM)</b>	FIBRES
<b>PURITY (HPLC AREA %)</b>	100.0 % rel
<b>CARBON CONTENT</b>	43.38 %
<b>HYDROGEN CONTENT</b>	4.14 %
<b>NITROGEN CONTENT</b>	42.29 %
<b>DATE OF QC-RELEASE</b>	01/DEC/06

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, non-specified tests may be included as additional information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.



Dr. Gert van Look, Manager  
Quality Control  
Buchs Switzerland

### Lampiran 35. Surat keterangan lolos kaji etik



## UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat  
Pos Box 1358 Jakarta 10430  
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

---

Nomor : 83/PT02.FK/ETIK/2012

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**

---

**ETHICAL APPROVAL**

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:


*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**“Analisis O6 Metilguanin Dalam Darah Pasien Kanker yang Mendapatkan Regimen Siklofosamid Dalam Kemoterapi di Rumah Sakit Kanker “Dharmais””.**

**Peneliti Utama** : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt  
*Principal Investigator*

**Nama Institusi** : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UI  
*Name of the Institution*

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.  
*And approved the above-mentioned protocol.*



**Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK**

\*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan  
\*\*Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
  - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
  - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*