



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN DAN UJI SITOTOKSISITAS
NANOPARTIKEL EMAS – DENDRIMER POLIAMIDOAMIN
(PAMAM) GENERASI 4 TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

FATIMAH

0806453573

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**PEMBUATAN DAN UJI SITOTOKSISITAS
NANOPARTIKEL EMAS – DENDRIMER POLIAMIDOAMIN
(PAMAM) GENERASI 4 TERHADAP SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

FATIMAH

0806453573

**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, 6 Juli 2012



Fatimah

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Fatimah
NPM : 0806453573
Tanda Tangan : 
Tanggal : 6 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Fatimah
NPM : 0806453573
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pembuatan dan Uji Sitotoksitas Nanopartikel Emas -
Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4 terhadap
Sel Kanker Payudara MCF-7

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 : Sutriyo, S.Si., M.Si., Apt (.....)

Pembimbing II : Dr. Anton Bahtiar, M. Biomed., Apt (.....)

Penguji I : Dr. Joshita Djajadisastra, MS (.....)

Penguji II : Dr. Katrin, MS (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, sujud syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam tak lupa penulis sanjungkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW. Penulis menyadari, skripsi ini dapat terselesaikan atas bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Sutriyo S.Si., M.Si., Apt selaku Pembimbing I, Bapak Dr. Anton Bahtiar S.Si., M.Si., selaku Pembimbing II dan Ibu Dra. Arleni M.S selaku Pembimbing Lapangan di Laboratorium MAKMAL Terpadu FKUI yang selalu menyediakan waktu, arahan, sumbangan pemikiran dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi UI;
3. Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt., selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan arahan selama menempuh perkuliahan;
4. Para dosen yang telah memberikan bekal kefarmasian dan pengetahuan selama masa perkuliahan;
5. dr. R. Muharam, Sp.OG(K) selaku Kepala MAKMAL Terpadu FKUI yang telah memberikan izin dan banyak masukan selama penelitian, serta karyawan/karyawati Lab MAKMAL Terpadu FKUI terutama Bu Yuyun dan Bu Sri yang telah memberikan banyak bantuan dan masukan kepada penulis;
6. Sahabat-sahabat yang selalu saling memberikan semangat agar dapat mengenakan toga bersama di September 2012 : Irie, Yusdam, Septy, Mamik, Dewi dan kak Ika. Our dream comes true ☺ Terima kasih kepada adik-adikku Oci dan Yoan serta my twins Maya yang selalu memberikan dukungan kepada penulis;
7. Bapak/Ibu karyawan dan laboran Fakultas Farmasi UI yang telah banyak membantu penulis;

8. Teman-teman Farmasi angkatan 2008. Terima kasih atas kebersamaan dan kenangan manis selama 4 tahun perkuliahan, terutama kepada Yurika, Fathia, Yoga Zhuisa dan teman-teman seperjuangan di Lab Faset dan Fortab;
9. Yuk Umi, Jade, Ela, dan seluruh mahasiswa Farmasi yang tidak bisa disebutkan satu persatu. Terima kasih atas persahabatan dan bantuannya kepada penulis;
10. Partner terbaik, Maya, Nita dan Resti. Terima kasih atas semua semangat dan dukungan yang selalu diberikan.
11. Keluarga tercinta, Papa, Mama, Kak Mi, Ayuk Dila dan Dek Mida atas do'a, kasih sayang, semangat, pengertian dan bantuan yang tidak akan pernah mampu tertandingi walau dengan beribu terima kasih. Semoga penulis dapat terus membahagiakan kalian.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dengan sebaik-baik balasan. Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya dan untuk perkembangan dunia kefarmasian.

Penulis

2012

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

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

Nama : Fatimah
NPM : 0806453573
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 Royalti Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pembuatan dan Uji Sitotoksitas Nanopartikel Emas – Dendrimer
Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4 terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

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 6 Juli 2012
Yang menyatakan


(Fatimah)

ABSTRAK

Nama : Fatimah
Program Studi : Farmasi
Judul : Pembuatan dan Uji Sitotoksitas Nanopartikel Emas–
Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4 terhadap Sel
Kanker Payudara MCF-7

Emas (Au) merupakan logam transisi yang telah banyak dikembangkan sebagai agen terapi dan diagnosis kanker. Au valensi +3 memiliki aktivitas toksik terhadap sel kanker dan valensi 0 dapat digunakan untuk deteksi kanker. Au valensi +3 dan 0 diformulasikan menjadi bentuk nanopartikel dengan pembawa dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) generasi 4. Nanopartikel Au⁰ dan Au³⁺ dalam dendrimer PAMAM G4 dikarakterisasi meliputi spektrum serapan, ukuran partikel, pH serta sitotoksitasnya secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara MCF-7 menggunakan metode MTS. Spektrum nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4 sebelum dan setelah penyimpanan selama 6 minggu memberikan serapan yang sama. Nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4 yang dihasilkan berukuran 2-30 nm. Nilai IC₅₀ nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4 valensi +3 dan 0 serta dendrimer PAMAM G4 berturut-turut adalah 73,79, 131,86 dan 114,82 µM menunjukkan bahwa nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM bersifat sitotoksik sedangkan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 dan dendrimer PAMAM G4 tidak bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7. Dendrimer PAMAM G4 merupakan sistem pembawa nanopartikel dengan toksisitas yang sangat rendah, nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 berpotensi sebagai agen antikanker dan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 bersifat nonsitotoksik sehingga dapat dikembangkan untuk diagnosis kanker.

Kata Kunci : Emas, Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4,
nanopartikel, sitotoksitas, sel kanker MCF-7.
xvii + 96 halaman : 14 gambar; 1 tabel; 45 lampiran
Daftar Pustaka : 56 (1985-2012)

ABSTRACT

Name : Fatimah
Program Study : Pharmacy
Title : Preparation and Cytotoxicity of Gold–Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer Generation 4 Nanoparticle in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines

Gold (Au) is a metal transition element which has been widely used as therapeutic and cancer diagnostic agent. Au^{3+} cation is known having toxic activity against cancer cells, while Au^0 element can be used as cancer diagnostic agent. Au^{3+} and Au^0 nanoparticles were prepared using Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer generation 4. Au^{3+} and Au^0 were characterized by UV-Vis spectra, particle size, pH and its cytotoxicity were analyzed against MCF-7 breast cancer cells by MTS assay. The UV-Vis spectra of Au–PAMAM dendrimer G4 before and after 6 months storage had similarity absorbances. The sizes for Au-PAMAM dendrimer G4 nanoparticles measured by TEM and DLS methods were 2-30 nm. For its cytotoxicity assay, the IC_{50} value of Au^{3+} -PAMAM dendrimer G4, Au^0 -PAMAM dendrimer G4, and PAMAM dendrimer G4 were 73.79; 131.86 and 114.82 μM , which showed that Au^{3+} -PAMAM dendrimer G4 was toxic while Au^0 -PAMAM dendrimer G4 and PAMAM dendrimer G4 were nontoxic in MCF-7 cells. PAMAM dendrimer G4 is a low toxicity nanoparticles template, Au^{3+} -PAMAM dendrimer G4 can be potential anticancer agent and Au^0 -PAMAM dendrimer G4 is nontoxic that can be used for cancer detection.

Keywords : Gold, Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimer Generation 4, Nanoparticle, Cytotoxicity, MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines
xvii + 96 pages : 14 figures; 1 table; 45 appendixes
References : 56 (1985-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Emas (Au)	4
2.2 Nanopartikel Emas	7
2.3 Dendrimer	10
2.4 Dendrimer Poliamidoamin (PAMAM)	12
2.5 Sel Kanker	16
2.6 Sel Kanker MCF-7	18
2.7 Uji Sitotoksitas	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	22
3.1 Lokasi	22
3.2 Alat	22
3.3 Bahan	22
3.4 Metode Pelaksanaan	23
3.5 Analisa Data Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Spektrum Serapan Nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4	33
4.2 Pengukuran pH.....	36
4.3 Penentuan Ukuran Nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4.....	36
4.4 Kultivasi Sel	39
4.5 Jumlah Kepadatan Sel	39
4.6 Penyiapan Suspensi Sel Uji.....	40
4.7 Pengujian Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7	40

4.8 Hasil IC ₅₀	41
4.9 Analisis Persentase Kematian Sel MCF-7	43
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR ACUAN	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Perkiraan mekanisme kematian sel yang diinduksi oleh kompleks emas	6
Gambar 2.2. Struktur dendrimer	10
Gambar 2.3. Struktur percabangan dendrimer generasi 0-4	11
Gambar 2.4. Struktur dendrimer PAMAM generasi 4	14
Gambar 2.5. Mekanisme dendrimer menembus membran sel	16
Gambar 2.6. Siklus sel	17
Gambar 3.1. Hemositometer	28
Gambar 4.1. Foto nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 (a) dan nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4	32
Gambar 4.2. Kurva spektrum serapan UV-Vis berbagai larutan saat pembuatan nanopartikel	34
Gambar 4.3. Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) H ₂ AuCl ₄ , (b) dendrimer PAMAM G4, (c) Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 dan (d) Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu	35
Gambar 4.4. Mikrograf (a) dan histogram (b) TEM nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 sebelum penyimpanan	37
Gambar 4.5. Kurva distribusi ukuran nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 (a) dan nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 sebelum (b) dan setelah (c) penyimpanan	38
Gambar 4.6. Mikroskopis sel MCF-7 pada pemberian 50 μM (a) nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4, (b) nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4, (c) kontrol positif cisplatin dan 35,5 μM (d) dendrimer PAMAM G4	41
Gambar 4.7. Kurva hubungan persentase kematian sel MCF-7 dengan konsentrasi berbagai larutan uji	42

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Karakteristik Fisika Dendrimer PAMAM	13
---	----

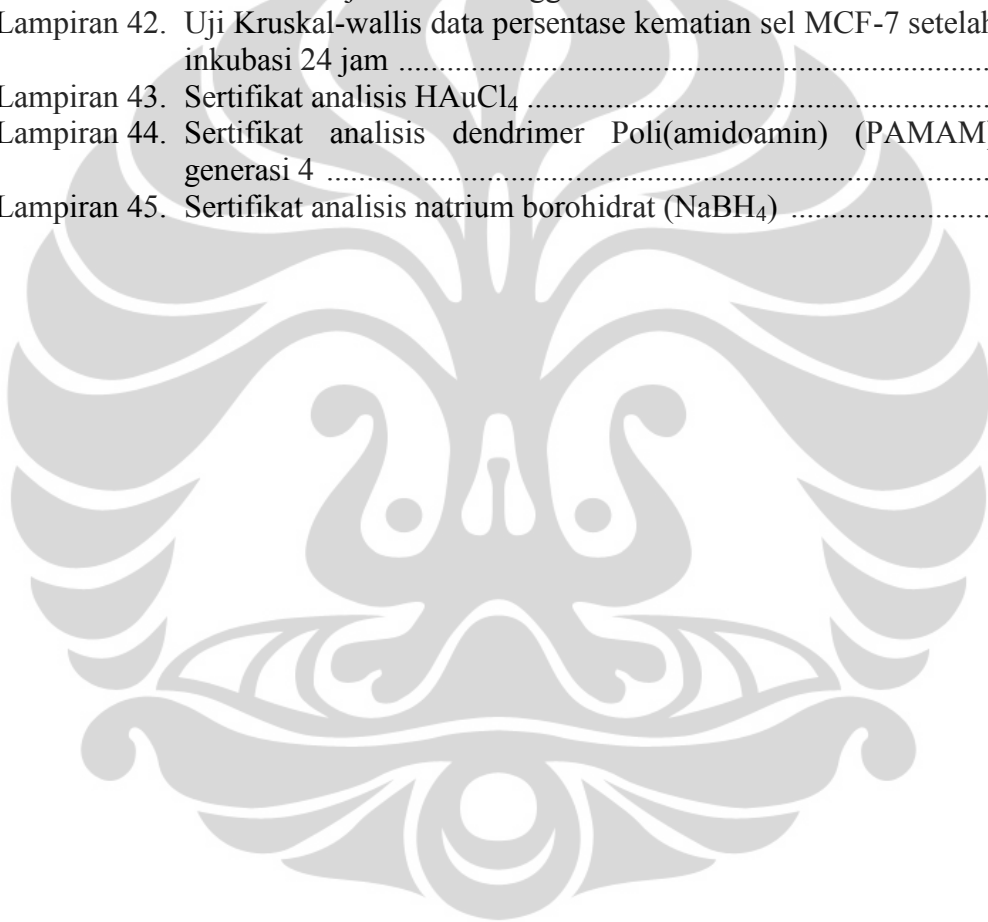


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Bagan kerja penelitian	52
Lampiran 2.	Penyiapan dan uji sitotoksitas terhadap sel kanker MCF-7	53
Lampiran 3.	Foto larutan (a) nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4, (b) nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 (c) dendrimer PAMAM G4 dan (d) kontrol positif sisplatin	55
Lampiran 4.	Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) HAuCl ₄ (b) dendrimer PAMAM G4 (c) Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 dan (d) Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4	56
Lampiran 5.	Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 (b) Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu	57
Lampiran 6.	Hasil analisa nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 menggunakan <i>Transmission Electron Microscope</i> (TEM)	58
Lampiran 7.	Mikroskopis sel MCF-7 sesaat setelah proses pencairan sel beku dan belum melekat pada dasar labu kultur (a) serta setelah inkubasi 4 hari dan mencapai kerapatan 80-90%	59
Lampiran 8.	Mikroskopis sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam sebagai kontrol negatif	59
Lampiran 9.	Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 µM dan (b) 3,125 µM	60
Lampiran 10.	Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 µM dan (b) 3,125 µM	60
Lampiran 11.	Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 µM dan (b) 3,125 µM	61
Lampiran 12.	Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan kontrol positif sisplatin selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 µM dan (b) 3,125 µM	61
Lampiran 13.	Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO ₂ 95%	62
Lampiran 14.	Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO ₂ 95%	62
Lampiran 15.	Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO ₂ 95%	63
Lampiran 16.	Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari kontrol positif sisplatin setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO ₂ 95%	63

Lampiran 17. Penentuan ukuran partikel nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 dari <i>Transmission Electron Microscope</i> (TEM) sebelum masa penyimpanan menggunakan program <i>Image J Analysis</i>	64
Lampiran 18. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam	65
Lampiran 19. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam	65
Lampiran 20. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam	66
Lampiran 21. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan kontrol positif sisplatin setelah inkubasi 24 jam	66
Lampiran 22. Nilai IC ₅₀ (μM) larutan uji yang diperoleh melalui persamaan dari grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam	67
Lampiran 23. Perhitungan pengenceran bahan untuk pembuatan nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4	68
Lampiran 24. Analisis deskriptif nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 sebelum masa penyimpanan menggunakan SPSS 20	70
Lampiran 25. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu menggunakan metode <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	72
Lampiran 26. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 sebelum penyimpanan selama 6 minggu menggunakan metode <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	73
Lampiran 27. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu menggunakan metode <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	74
Lampiran 28. Spesifikasi sel MCF-7	75
Lampiran 29. Perhitungan jumlah kepadatan sel MCF-7	78
Lampiran 30. Perhitungan penyediaan suspensi sel MCF-7 untuk pengujian sitotoksitas	79
Lampiran 31. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4 untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7	80
Lampiran 32. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan dendrimer PAMAM G4 untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7	81
Lampiran 33. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan blanko positif sisplatin untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7	82
Lampiran 34. Pemetaan pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7 pada mikroplat 96 sumuran	83
Lampiran 35. Perhitungan nilai IC ₅₀ nanopartikel Au ⁰ -dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7	85
Lampiran 36. Perhitungan nilai IC ₅₀ nanopartikel Au ³⁺ -dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7	86

Lampiran 37. Perhitungan nilai IC_{50} dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7	87
Lampiran 38. Perhitungan nilai IC_{50} kontrol positif cisplatin terhadap sel MCF-7	88
Lampiran 39. Uji distribusi normal Shapiro-Wilk terhadap data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam menggunakan SPSS 20	89
Lampiran 40. Uji homogenitas Levene data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam menggunakan SPSS 20	90
Lampiran 41. Uji homogenitas transformasi data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam berdasarkan nilai <i>Power Estimation</i> uji Levene menggunakan SPSS 20.....	91
Lampiran 42. Uji Kruskal-wallis data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam	92
Lampiran 43. Sertifikat analisis $H AuCl_4$	94
Lampiran 44. Sertifikat analisis dendrimer Poli(amidoamin) (PAMAM) generasi 4	95
Lampiran 45. Sertifikat analisis natrium borohidrat ($NaBH_4$)	96



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 2008, kanker payudara (*breast cancer*) menempati urutan pertama kejadian kanker di dunia dengan jumlah 1.384.155 kasus (10,9 % dari total) dengan perbandingan yang setara pada kawasan negara maju dan berkembang. Di Indonesia, penyakit kanker payudara juga menempati urutan pertama dengan jumlah 39.831 kasus (IARC, 2008). Untuk mengatasi masalah penyakit kanker, telah banyak dikembangkan berbagai terapi dan deteksi dini kanker. Pengembangan kemoterapi termasuk obat-obat berbasis logam transisi telah dilakukan sejak penemuan sisplatin sebagai agen antikanker pada tahun 1968. Efek terapi yang dihasilkan sisplatin berdasarkan mekanisme kerjanya terkait pembentukan kompleks metal transisi dengan DNA sel yang memicu apoptosis sel kanker (Alderden, Hall dan Hambley, 2006). Sejak penemuan sisplatin, telah banyak dilakukan usaha penemuan obat antikanker berbasis logam transisi lain yang mampu membentuk kompleks kovalen koordinat berdasarkan adanya kemiripan hubungan struktur dan aktivitas.

Diantara agen-agen metal antitumor lain, kompleks emas telah menarik perhatian karena potensinya menghambat pertumbuhan sel kanker melalui mekanisme yang berbeda dengan obat-obat berbasis platinum. Emas dalam bilangan oksidasi +3 telah diketahui memiliki aktivitas antikanker melalui reaksi oksidasi-reduksi dengan sel kanker. Namun, pengembangan aplikasi kompleks Au sebagai agen antikanker memiliki keterbatasan karena kemudahannya tereduksi terutama oleh senyawa –tiol yang banyak ditemukan dalam sistem biologis tubuh. Potensial reduksi yang tinggi dan stabilitasnya yang relatif rendah menyebabkan emas sulit diaplikasikan dibawah kondisi fisiologis (Fregona, et al., 2010). Di sisi lain, penelitian tentang emas sebagai agen deteksi kanker juga telah dilakukan berdasarkan karakteristik logam yang dimilikinya, misalnya sifat konduktivitas dan memberikan serapan kuat dapat diaplikasikan untuk pendeteksian kanker dan biomarker penyakit (Alanazi, Radwan dan Alsarra, 2010).

Dendrimer sebagai *template* pembentukan nanopartikel telah banyak digunakan untuk enkapsulasi berbagai senyawa, termasuk logam. Dendrimer merupakan pembawa dalam sistem nanopartikel yang memiliki banyak keuntungan, diantaranya (i) struktur dendrimer yang mampu melipat dapat membentuk nanopartikel dengan bentuk yang unik, (ii) nanopartikel emas terjerat dalam rongga dendrimer sehingga melindungi dari kemungkinan reduksi yang terjadi dalam penghantarannya ke sel target, dan (iii) mampu membentuk sistem yang biokompatibel sehingga dendrimer menjadi sistem pembawa terpilih untuk penghantaran emas ke target. Diantara dendrimer yang telah tersedia secara komersial, dendrimer PAMAM merupakan kandidat terpilih sebagai sistem pembawa karena toksisitas dan polidispersitasnya yang relatif rendah, kelarutannya yang baik dalam air, kemampuannya berpenetrasi ke dalam sel yang lebih baik, dan imunogenisitasnya yang rendah dibandingkan dendrimer lain (Menjoge, Kannan dan Tomalia. 2010; Jain, Kesharwani, Gupta dan Jain, 2010).

Toksisitas merupakan kejadian kompleks secara *in vivo*. Toksisitas yang dihasilkan dapat disebabkan karena perusakan sel secara langsung oleh senyawa antikanker ataupun karena adanya efek fisiologis, misalnya transport membran di ginjal, efek inflamasi dan efek sistemik lainnya. Hal ini menyebabkan sulitnya mengamati efek langsung senyawa antikanker tersebut terhadap sel target sehingga uji toksisitas awal dilakukan pada tingkat selular secara *in vitro* (Freshney, 2007). Oleh karena itu dilakukan pembuatan nanopartikel emas dalam sistem pembawa dendrimer PAMAM dan pengujian sitotoksitasnya secara *in vitro* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pembuatan dan pengujian sitotoksitas nanopartikel emas dalam pembawa dendrimer Poli(amidoamin) (PAMAM) generasi 4 pada sel kanker payudara MCF-7.

1.3 Manfaat Penelitian

Dengan adanya penelitian ini diharapkan aktivitas antikanker nanopartikel emas dalam sistem pembawa dendrimer PAMAM generasi 4 dapat diketahui lebih

mendalam. Selain itu, diharapkan fungsi nanopartikel emas dalam sistem pembawa Dendrimer PAMAM generasi 4 dalam bidang farmasi dapat diperluas sehingga dapat berguna untuk penelitian selanjutnya dalam rangka penemuan agen terapi dan diagnosis kanker baru yang lebih efektif.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Emas (Au)

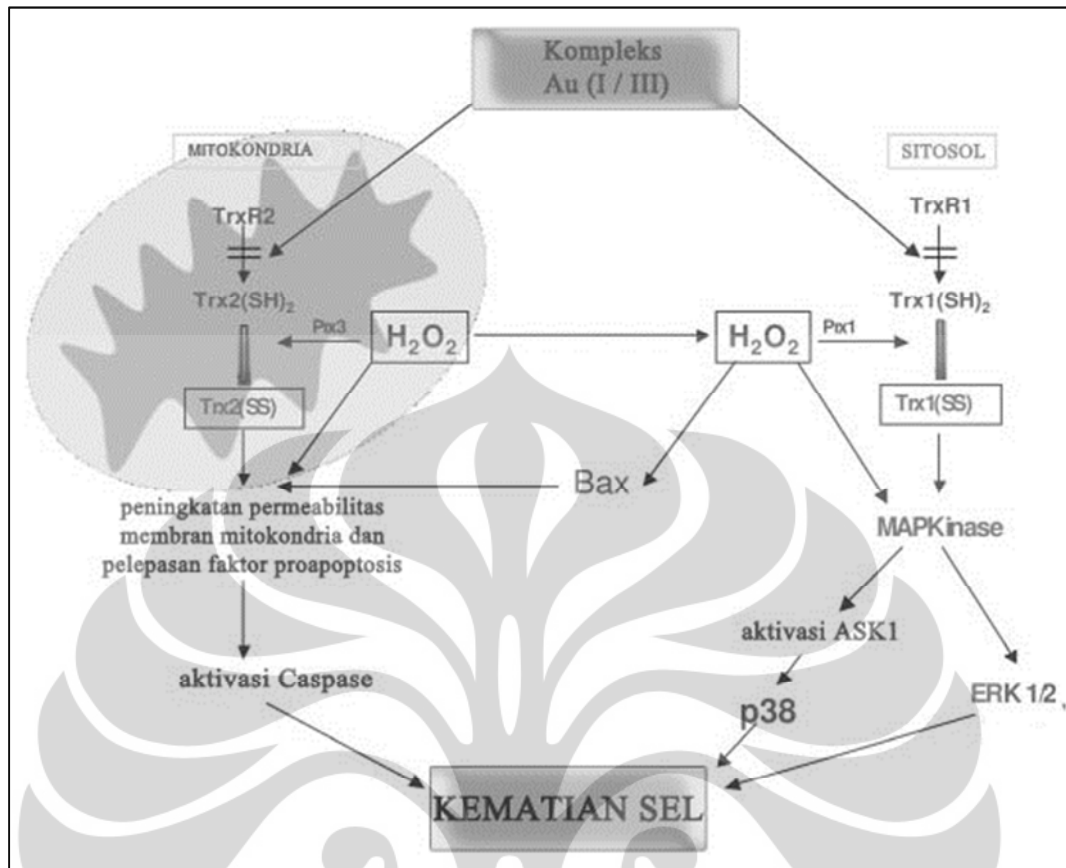
Emas termasuk dalam golongan logam transisi IB dan periode 6 pada tabel periodik. Emas memiliki nomor atom 79, nomor massa 196,966 dan konfigurasi elektron $[1s^2 2s^2p^6 3s^2p^6d^{10} 4s^2p^6d^{10}f^{14} 5s^2p^6d^{10} 6s^1]$ (Barbalace, 1995-2012). Emas dapat berada pada berbagai bilangan oksidasi, yaitu -1, 0, +1, +2, +3, +4 dan +5. Emas dengan bilangan oksidasi 0 berbentuk solid dan telah banyak digunakan, misalnya sebagai perhiasan dan kosmetik. Diantara keenam bilangan oksidasi emas, hanya emas dalam bilangan oksidasi +1 dan +3 yang stabil dalam media aqueous dan sistem biologis (Farrel, 1999).

Penggunaan emas di bidang kesehatan modern dimulai sejak penemuan emas sianida yang memiliki aktivitas bakteriostatik terhadap bakteri basilus tuberkulosis oleh Robert Koch pada tahun 1890. Meskipun terapi emas selanjutnya terbukti tidak efektif terhadap pasien tuberkulosis, pada tahun 1927 Lande menemukan bahwa terapi emas dapat mengobati penyakit sendi pada pasien non-tuberkulosis sehingga pengembangan terapi emas terus dilanjutkan untuk mengobati reumatoid arthritis. Pada pertengahan era 1980, Sutton et al. menemukan Au(I) Fosfin (Auranofin) sebagai kompleks emas pertama yang disetujui secara klinis terhadap pasien reumatoid arthritis. Pada masa yang bersamaan auranofin diuji secara *in vitro* dan diketahui bersifat sitotoksik terhadap sel kanker sehingga dilakukan pengembangan-pengembangan kompleks Au(I) Fosfin lainnya sebagai agen antikanker baru. Namun, kompleks Au(I) menunjukkan aktivitas kardiotoxicitas pada hewan sehingga pengembangan terakhir ditujukan pada kompleks Au(III) sebagai agen antikanker, berdasarkan kesamaan struktur *square-planar* dan sifat isoelektrik dengan Pt(II) yang telah digunakan secara klinis dalam mengobati penyakit kanker (Alessio, 2011).

Penelitian emas sebagai antikanker telah banyak dikembangkan karena (i) auranofin, senyawa berbasis emas yang telah digunakan secara klinis untuk terapi rheumatoid arthritis telah terbukti memiliki aktivitas antikanker, (ii) kemiripan struktur *square-planar* dan sifat elektronik Au(III) dengan Pt(II), (iii) analogi

terhadap aktivitas imunomodulator Au(I), dan (iv) kompleks Au(I) dan Au(III) telah diketahui memiliki aktivitas antitumor. Stabilitas Au(III) yang rendah dan mudah tereduksi dapat ditingkatkan antara lain melalui pemasangan ligan melalui pembentukan berbagai variasi kompleks, misalnya pada penelitian yang dilakukan Parish et al. (1996) dengan membentuk kompleks Au(III) dan diuji secara *in vitro* pada kultur sel ZR-75. Penelitian tersebut membuktikan bahwa kompleks stabil Au(III) memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara ZR-75. Berbagai kompleks *Au(III)dithiocarbamate* disintesis oleh Ronconi et al. dan diketahui memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker HeLa (2005) dan sel kanker resisten sisplatin (2006). Isab et al. (2011) juga telah membuktikan aktivitas antiproliferatif kompleks Au(III) terhadap kultur sel kanker lambung SGC-7901 dan sel kanker prostat PC-3.

Mekanisme kematian sel akibat kompleks emas belum diketahui dengan pasti. Mitokondria, organel sel yang berperan dalam pengaturan reaksi oksidasi-reduksi intrasel dan apoptosis sel diperkirakan merupakan target kompleks emas dalam menghambat pertumbuhan sel-sel kanker. Mitokondria mengandung enzim spesifik *thioredoxin reductase* (TrxR2) yang berperan dalam pengaturan sistem reduksi-oksidasi di dalam sel. Penghambatan enzim TrxR2 mempengaruhi permeabilitas mitokondria yang pada akhirnya menginisiasi apoptosis sel. Apoptosis sel terjadi karena adanya interaksi Au(I) dan Au(III) pada residu selenosistein pada enzim TrxR yang menyebabkan oksidasi residu (gambar 2.1). Di mitokondria, hidrogen peroksida diproduksi dari hasil rantai pernapasan intraseluler mitokondria yang mengoksidasi thioreduksin (Trx2), pada reaksi yang diperantai peroksidoksin (Prx3). Inhibisi thioreduksin reduktase oleh kompleks emas mencegah reduksi Trx2 sehingga terjadi akumulasi hidrogen peroksida. Proses ini meningkatkan permeabilitas mitokondria sehingga hidrogen peroksida dilepaskan ke sitosol, menyebabkan oksidasi irreversibel Trx1 yang berujung pada kematian sel (Alessio, 2011).



[sumber : Alessio, 2011]

Gambar 2.1. Perkiraan mekanisme kematian sel yang diinduksi oleh kompleks emas, telah diolah kembali

Emas valensi 0 telah terbukti bersifat nonsitotoksik dan digunakan dalam deteksi biomarker penyakit dan diagnosis penyakit kanker, misalnya pada deteksi marker tumor. Selain itu Au⁰ juga telah digunakan untuk deteksi karbohidrat antigen 19-9 yang merupakan marker tumor yang diekspresikan oleh kanker pankreas, kolorektal, lambung dan hati (Alanazi, Radwan dan Alsarra, 2010)

Emas terutama diekskresi melalui urin dan feses. Pada injeksi intramuskular emas, jalur ekskresi utama emas pada awal pemberian terutama melalui urin sedangkan pada pertengahan masa terapi ekskresi emas terutama melalui feses. Ikatan albumin-emas cukup tinggi sehingga klirens emas pada pertengahan masa terapi menurun dan tidak proporsional dengan jumlah emas yang diinjeksikan (Thakor, Jokerst, Zavaleta, Massoud dan Gambhir, 2011).

2.2 Nanopartikel Emas

Nanopartikel adalah partikel koloid berukuran 1-100 nm. Partikel berukuran nano dapat meningkatkan penghantaran obat ke sel target sehingga dapat meningkatkan efek dan meminimalisasi efek samping. Keuntungan dalam penggunaan nanopartikel, antara lain (Mohanraj dan Y. Chen, 2006) :

- a. Memungkinkan pelepasan obat terkontrol dan obat tertarget (*drug targeting*).
- b. Mengontrol dan memperpanjang pelepasan obat selama perjalanan obat dan pada loka aksi obat.
- c. Sistem nanopartikel dapat digunakan dalam berbagai rute pemberian, seperti oral, nasal, parenteral maupun intraokular
- d. Meningkatkan stabilitas obat
- e. Memungkinkan menggabungkan obat lipofil dan hidrofil
- f. Pembawa yang digunakan tidak memiliki biotoksisitas

Penggunaan nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat difokuskan pada peningkatan penghantaran obat ke sel target, pengaturan pelepasan obat, serta perancangan sistem pembawa yang biodegradabel dan mampu menghindari degradasi dalam sistem tubuh. Beberapa jenis sistem pembawa nanopartikel antara lain (Bharali, Khalil, Gurbuz, Simone dan Mousa, 2009; Pal dan Nayak, 2010) :

a. Liposom

Liposom merupakan vesikel lipid berukuran 50-1000 nm. Berdasarkan ukuran dan jumlah lapisannya, liposom dapat dikategorikan menjadi *multi-lamellar vesicles* (MLV), *large uni-lamellar vesicles* (LUV) dan *small uni-lamellar vesicle* (SUV). Liposom berukuran lebih kecil dari 400 nm mampu berpenetrasi ke sel tumor dari darah namun tetap berada dalam aliran darah pada jaringan normal. Namun, masalah utama yang membatasi penggunaan liposom adalah stabilitasnya rendah, tidak dapat diproduksi dalam skala besar pada tiap *batch*, sterilisasi sulit dilakukan dan kapasitas penyerapan obat yang rendah.

b. *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN)

SLN berukuran submikron dengan rentang 50-1000 nm yang disintesis dari lipid membentuk fase solid pada suhu ruang.

c. Dendrimer

Dendrimer merupakan polimer makromolekul unik dengan rantai cabang berulang dari gugus inti, membentuk struktur geometris tiga dimensi yang sferis. Dendrimer dapat membentuk nanopartikel dengan berbagai ukuran berdasarkan pengaturan rasio dendrimer dan obat serta generasi dendrimer yang digunakan. Generasi dendrimer mempresentasikan keterulangan cabang simetris pada strukturnya. Semakin tinggi generasi maka semakin besar bobot molekul dan semakin banyak gugus fungsi pada terminal dendrimer. Dendrimer merupakan sistem penghantar obat yang ideal terkait topologi, dimensi dan fungsionalitasnya yang mudah diatur serta kemiripan ukuran dan bentuknya dengan berbagai polimer biologis tubuh, misalnya DNA dan protein sehingga bersifat biokompatibel.

Emas yang telah terbukti memiliki aktivitas sebagai agen antikanker diformulasi menjadi sediaan nanopartikel. Pembuatan nanopartikel emas dilakukan berdasarkan pertimbangan (i) bahwa kompleks emas telah lama digunakan dalam bidang kesehatan berdasarkan histori peradaban, (ii) nanopartikel emas cenderung mudah disintesis, relatif murah, dan metode pembuatan yang aman dan dapat dipercaya baik secara kimia, fisika maupun biologi telah dilakukan, (iii) nanopartikel emas dapat disintesis dengan ukuran yang bervariasi dari 2-500 nm berdasarkan variasi parameter sintesis, (iv) nanopartikel emas dapat disintesis menjadi berbagai bentuk (sferis, kubik, heksagonal, triangular, tube dan rod) menggunakan *template* dan variasi kondisi reaksi, (v) muatan negatif pada permukaan nanopartikel emas memudahkannya berinteraksi dengan biomolekul dan polimer mengandung tiol dan amin, (vi) nanopartikel emas mudah dikarakterisasi karena adanya karakteristik pita *surface plasmon resonance* (SPR) dan (vii) nanopartikel emas telah terbukti bersifat biokompatibel dan non-toksik (Ronconi, Aldinucci, Ping Dou dan Fregone, 2010).

Patra, et al. (2010) telah melakukan penelitian mengenai sitotoksitas dan imunogenisitas nanopartikel emas pada sel makrofag RAW264.7, salah satu sel efektor imun yang berperan penting sebagai agen sekretorik, fagosit dan antigenik dalam sistem imun. Penelitian ini telah membuktikan bahwa nanopartikel Au(0) bersifat nonsitotoksik dan tidak memicu sekresi proinflamatori *cytokine* TNF- α

dan IL1- β . Pembuatan nanopartikel emas dapat dilakukan melalui metode (Alanazi, 2010) :

a. Metode Fisika

Metode ablasi laser telah digunakan untuk menghasilkan nanopartikel emas dengan menggunakan irradiasi laser terhadap emas dalam air tanpa adanya bahan tambahan lainnya pada panjang gelombang 532 atau 266 nm, 10 Hz. Kondensasi gas inert juga dapat digunakan untuk preparasi nanopartikel emas. Pada metode ini, nanopartikel emas akan seketika terbentuk dan bertabrakan dengan gas inert pada tekanan rendah sehingga terbentuk partikel dengan ukuran kecil dan terkontrol. Keuntungan dari metode ini adalah distribusi ukuran partikel yang sempit, namun membutuhkan peralatan yang relatif mahal. Metode fisika lainnya adalah melalui termolisis kompleks Au(I) pada suhu 180°C selama 5 jam dalam atmosfer nitrogen, radiolisis garam emas dalam larutan aqueous menggunakan reduksi radiasi γ , fotokimia misalnya dengan irradiasi UV larutan H₂AuCl₄ yang mengandung agen protektif dan aseton pada panjang gelombang 300 nm membentuk nanopartikel dengan diameter rata-rata 5 nm, serta melalui sonokimia menggunakan reduksi terinduksi ultrasound pada garam emas dalam larutan aqueous.

b. Metode Kimia

Melalui proses emulsifikasi dapat diproduksi nanopartikel emas namun dengan distribusi diameter partikel yang luas. Nanopartikel emas juga dapat dibuat melalui reduksi ion Au dengan adanya *dispersant* untuk menghindari aglomerasi emas melalui reaksi dengan sodium sitrat. Reduktor lain yang dapat digunakan untuk membentuk nanopartikel emas adalah sodium borohidrat dan asam askorbat. Dari semua metode pembuatan nanopartikel yang ada, metode kimia merupakan metode yang paling baik dalam preparasi nanopartikel emas.

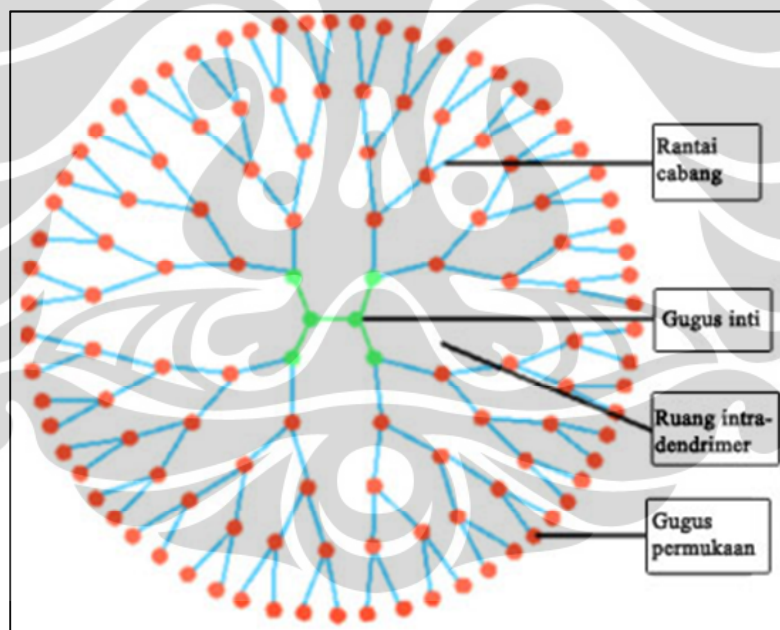
c. Metode Biosintesis

Penggunaan fungi *Fusarium oxysporum* dan *Actinomyces thermomonospora* sp. telah dilakukan untuk sintesis ekstraseluler nanopartikel emas. Selain itu, fungi *Verticillium* sp. juga telah digunakan

untuk sintesis intraseluler nanopartikel emas. Pada penggunaan *Colletotrichum* sp., reaksi pembentukan nanopartikel emas terjadi dari reaksi antara ion AuCl_4^- dengan ekstrak daun geranium. Ekstrak jamur *Volvariella volvacea* reduktan dalam sintesis nanopartikel emas.

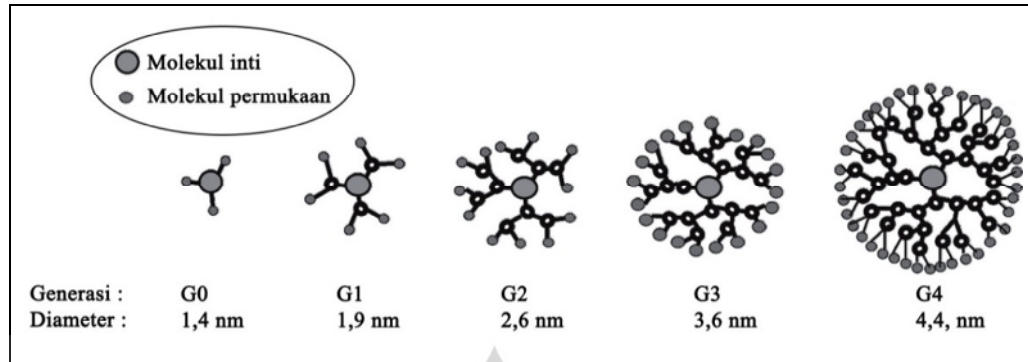
2.3 Dendrimer

Dendrimer merupakan polimer dengan rantai bercabang berulang berbentuk sferis dengan diameter berkisar antara 1 hingga 100 nm. Dendrimer terdiri dari tiga komponen, yaitu gugus inti, rantai cabang dan gugus fungsi terminal (gambar 2.2). Gugus inti terletak di pusat dendrimer dan cabang dendrimer yang menyusun struktur intradendrimer terikat pada gugus inti. Monomer yang terikat pada gugus inti (G0) disebut Generasi I (G1), cabang yang terikat pada G1 dendrimer disebut Generasi II (G2), dan seterusnya (gambar 2.3).



[sumber : Nanjwade, Bechra, Derkar, Manvi dan Nanjwade, 2009]

Gambar 2.2. Struktur dendrimer telah diolah kembali



[sumber : Bharali, Khalil, Gurbuz, Simone, dan Mousa, 2009]

Gambar 2.3. Struktur percabangan dendrimer generasi 0-4, telah diolah kembali

Dendrimer merupakan polimer pembawa obat dengan berbagai kelebihan karakteristik. Ketersediaan dendrimer dalam berbagai polivalensi memberikan berbagai interaksi dengan obat dan target. Polivalensi dendrimer ditunjukkan dengan jumlah gugus fungsional pada terminal dendrimer. Berbeda dengan polimer linear, dendrimer cenderung bersifat monodispers sehingga memungkinkan sintesis partikel yang seragam (Nanjwade, Bechra, Derkar, Manvi, dan Nanjwade, 2009). Dendrimer generasi ≥ 4 memiliki struktur sferis yang mampu mengenkapsulasi kompleks logam dan molekul lainnya (Torigoe, Suzuki, dan Esumi, 2001). Penggunaan dendrimer sebagai pembawa memberikan keuntungan antara lain (Caminade, Turrin, Lauren, Ouali, dan Delavaux-nicot, 2011):

- Karakteristik lipat dendrimer mampu menjadi sistem pembawa nanopartikel yang unik,
- Nanopartikel terperangkap sempurna dalam dendrimer sehingga dapat mencegah aglomerasi logam dan menurunkan toksisitas obat.
- Nanopartikel terperangkap dalam struktur intradendrimer sehingga gugus perifer dendrimer dapat berinteraksi dengan lingkungan luar secara aktif,
- Gugus perifer dendrimer dapat dimodifikasi untuk optimasi aktivitas.
- Pembentukan nanopartikel dapat dilakukan dengan penjerapan dalam dendrimer yang kemudian diekstraksi.

Dendrimer telah menarik perhatian banyak peneliti karena keunikan struktur dan karakteristiknya. Struktur dan karakteristik kimia dendrimer dapat diatur dengan modifikasi gugus inti, jenis dan jumlah keterulangan rantai cabang

intenal dan gugus terminal. Beberapa jenis dendrimer yang telah disintesis antara lain (Nanjwade, Bechra, Derkar, Manvi, dan Nanjwade, 2009; Aillon, Yumei Xie, El-Gendy, Berkland, dan Forrest, 2009) :

a. *Tecto Dendrimer*

Tecto Dendrimer tersusun dari dendrimer yang dikelilingi oleh dendrimer-dendrimer lain pada bagian tepi.

b. Dendrimer Kiral

Dendrimer kiral memiliki struktur berupa cabang kiral yang menempel pada gugus inti.

c. Dendrimer Peptida

Bagian perifer dendrimer peptida terdiri dari peptida dengan rantai cabang yang tersusun atas asam amino.

d. Glycodendrimer

Glycodendrimer merupakan dendrimer yang tersusun atas karbohidrat pada strukturnya. Karbohidrat pada dendrimer ini dapat terletak pada gugus perifer, pada gugus inti dan menjadi penyusun dendrimer sepenuhnya.

e. Dendrimer POPAM

Dendrimer POPAM, yang dikenal sebagai dendrimer PPI (polypropyleneimine) merupakan polimer bercabang dengan gugus perifer amin, gugus interior propilen dan gugus inti diamin. Hingga saat ini dendrimer PPI yang tersedia di pasaran hingga generasi 5,

f. Dendrimer PAMAM

Dendrimer PAMAM (poliamidoamin) merupakan polier bercabang dengan gugus inti, rantai cabang dan gugus perifer yang tersusun atas senyawa amin. Dendrimer PAMAM yang tersedia dipasaran saat ini hingga generasi 10.

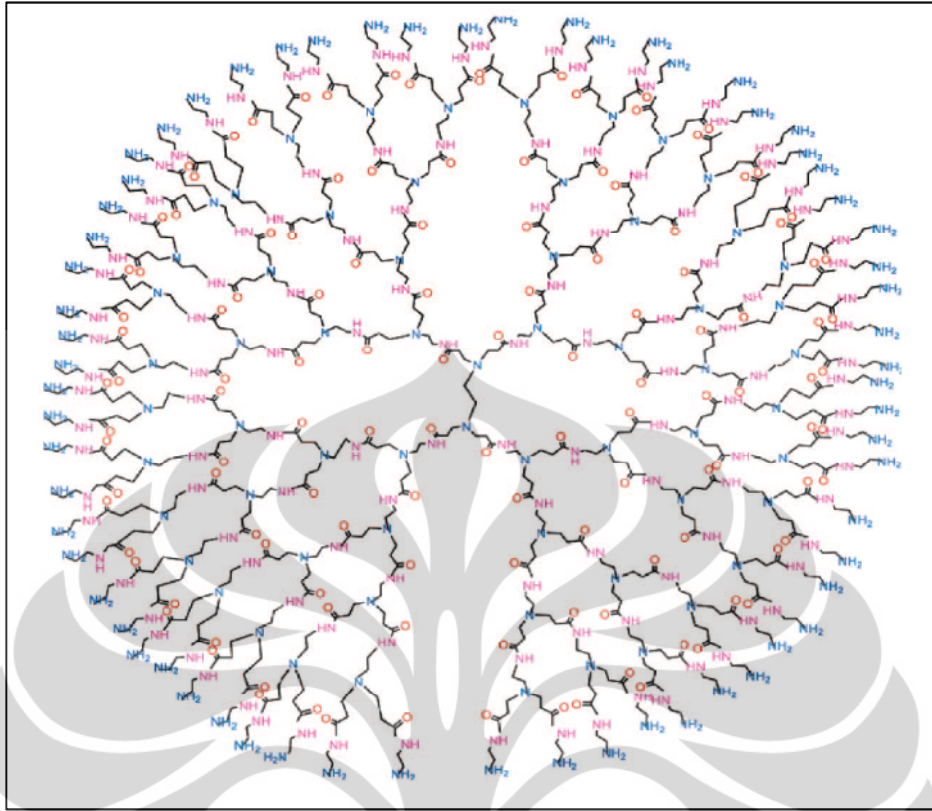
2.4 Dendrimer PAMAM

Dendrimer PAMAM merupakan dendrimer yang pertama kali berhasil disintesis, dikarakterisasi dan tersedia secara komersial. Kemiripan ukuran, kemiripan sifat elektrik dan karakteristik biomimetik lain dendrimer PAMAM dengan berbagai protein tubuh menyebabkan jenis dendrimer ini disebut sebagai *artificial protein* (Svenson, dan Tomalia, 2005). Dendrimer PAMAM merupakan

kandidat terpilih sebagai sistem pembawa obat karena toksisitas dan polidispersitasnya yang relatif rendah, kelarutannya yang baik dalam air, kemampuannya berpenetrasi ke dalam sel yang lebih baik, dan imunogenisitasnya yang rendah dibandingkan dendrimer lain (Menjoge, Kannan, dan Tomalia, 2010; Jain, Kesharwani, Gupta, dan Jain, 2010).

Tabel 2.1. Karakteristik Fisika Dendrimer PAMAM (Nanjwade, Bechra, Derkar, Manvi, dan Nanjwade, 2009), telah diolah kembali

Generasi	Jumlah Gugus Terminal	Bobot Molekul (g/mol)	Diameter (nm)
0	4	517	1,5
1	8	1430	2,2
2	16	3256	2,9
3	32	6909	3,6
4	64	14215	4,6
5	128	28826	5,4
6	256	58048	6,7
7	512	116493	8,1
8	1024	233383	9,7
9	2048	467162	11,4
10	4096	934720	13,5



[sumber : Diallo, Arasho, Johnson, dan Goddard, 2008]

Gambar 2.4. Struktur dendrimer PAMAM generasi 4

Dendrimer PAMAM merupakan salah satu dendrimer yang telah diproduksi secara komersial. Jumlah gugus fungsional pada permukaan dendrimer meningkat secara eksponensial sebanding fungsi generasi, yang berimplikasi pada struktur geometris bergantung pada jumlah struktur perifer dendrimer. Dendrimer generasi relatif atas mampu membentuk struktur tiga dimensi yang memiliki rongga pada bagian interior sehingga mampu menjerap material nanopartikel didalamnya (Crooks, Mingqi Zhao, Li Sun, Victor Chechik dan Lee K. Yeung, 2001). Ketidakstabilan dendrimer PAMAM pada suhu diatas 100°C dan harga yang relatif mahal menyebabkan keterbatasan penggunaannya.

2.4.1 Biokompatibilitas, Biopermeabilitas dan Toksisitas Dendrimer PAMAM

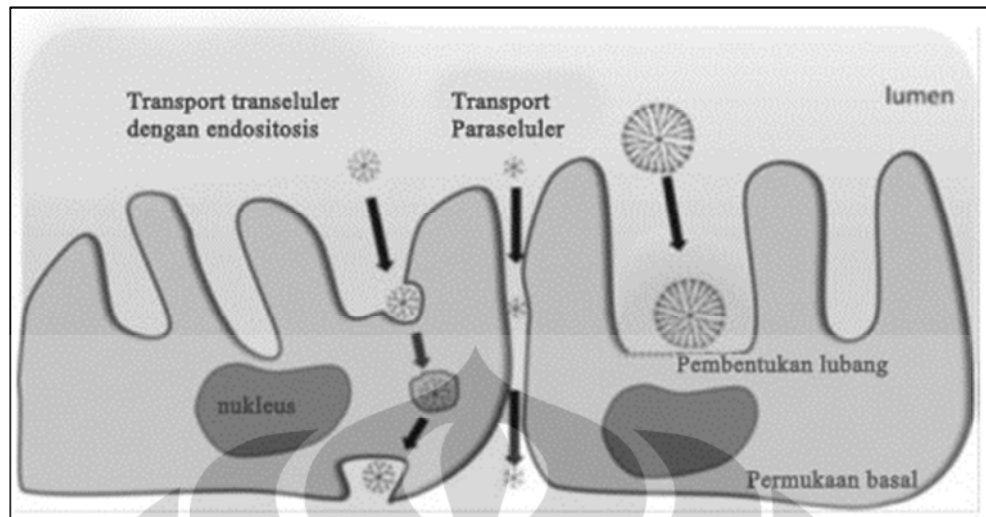
Dendrimer harus bersifat nontoksik, non-imunogenik (jika digunakan untuk vaksinasi), biopermeabel dan mampu menembus barrier dan membran sel, mampu berada di sirkulasi sistem biologis selama waktu dan yang diinginkan dan mampu menuju sel target spesifik agar dapat digunakan dalam sistem

penghantaran obat. Dendimer PAMAM secara garis besar bersifat relatif nontoksik dan non-imunogenik. Muatan permukaan, generasi dendrimer dan rute administrasi menentukan efek dan biokompatibilitas dendrimer terhadap sistem biologis tubuh. Sistem fagosit inti tunggal (MPS, *mononuclear phagocyte system*) di limpa, hati, paru-paru dan sumsum tulang menangkap partikel hidrofobik dengan diameter lebih besar dari 100 nm sedangkan dendrimer PAMAM bersifat hidrofilik (< 10 nm) sehingga tidak terdeteksi sistem fagositosis tubuh.

Struktur dan fleksibilitas rangka polimer menentukan toksisitas dendrimer. Dendrimer PAMAM memiliki struktur globular dan fleksibilitas yang rendah sehingga toksisitasnya relatif lebih rendah daripada polimer dengan struktur amin linear. Struktur globular dan fleksibilitas yang rendah ini pula yang menyebabkan dendrimer mampu membentuk gaya adhesi dengan permukaan sel. Dendrimer yang memiliki gugus permukaan kationik, misalnya PAMAM pada umumnya menunjukkan aktivitas sitotoksik terkait muatan permukaannya. Toksisitas molekul dengan gugus permukaan kationik pada dendrimer PAMAM menyebabkan gangguan membran sel melalui gaya elektrostatik dengan gugus negatif permukaan sel yang kemudian diikuti proses pembentukan lubang atau endositosis. Sitotoksitas dendrimer PAMAM meningkat seiring dengan peningkatan generasi yang terkait dengan jumlah gugus amin primer pada permukaan dendrimer.

2.4.2 Interaksi Dendrimer – Membran Sel

Polimer kationik termasuk dendrimer menginduksi pembentukan lubang pada membran sel yang menyebabkan nanopartikel dapat masuk ke dalam sel (Tekade, Kumar, dan Jain, 2009). Ukuran dendrimer menentukan mekanismenya melewati membran sel (gambar 2.5). Dendrimer generasi 1 dan generasi 2 melewati sel melalui mekanisme transport paraselular, sedangkan dendrimer generasi 3-5 menembus membran sel melalui mekanisme transport transelular (endositosis) (Caminade, Turrin, Laurent, Ouali, dan Delavaux-nicot, 2011).



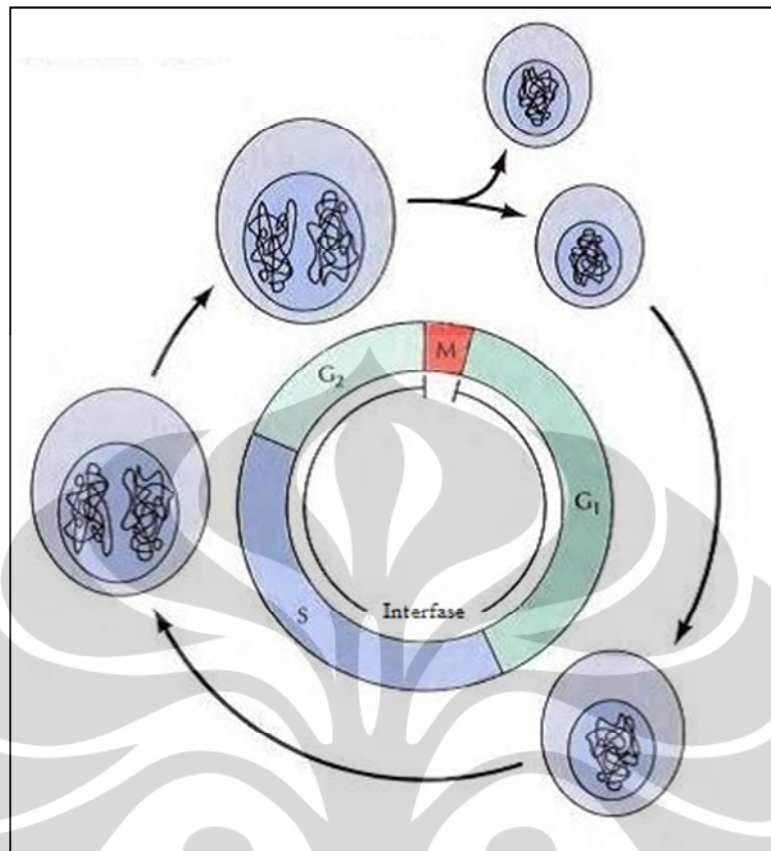
[sumber : Caminade, Turrin, Laurent, Ouali, dan Delavaux-nicot, 2011]

Gambar 2.5. Mekanisme dendrimer menembus membran sel, telah diolah kembali

2.5 Sel Kanker

Kanker merupakan penyakit dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler (Dept. Farmakologi dan Terapeutik FKUI, 2007). Perkembangan sel normal diatur oleh sinyal fisiologis yang menentukan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis sel sedangkan sel kanker memiliki kemampuan mengatur sinyal perkembangan sendiri sehingga terjadi pertumbuhan dan proliferasi sel yang tidak terkendali (Hejmadi, 2009).

Sel baru terbentuk dari pembelahan sel yang telah ada. Proses kehidupan sel diatur oleh siklus sel. Siklus sel dapat diartikan sebagai keseluruhan proses yang terjadi dimulai dari akhir pembelahan sel hingga dimulainya pembelahan sel baru (Verdina dan Agarwal, 2004). Siklus sel dapat dibedakan menjadi 4 fase, yaitu fase G₁, S, G₂ dan M.



[sumber : Cooper dan Hausman, 2007]

Gambar 2.6. Siklus Sel, telah diolah kembali

2.5.1 Fase G₁

Pada fase G₁ sintesis DNA tidak terjadi. Selama fase ini terjadi sintesis RNA, protein dan membran diikuti dengan pertumbuhan nukleus dan sitoplasma dari masing-masing sel anakan hingga tercapai ukuran sel dewasa. Sel yang berada pada fase G₁ terlalu lama dikatakan berada pada fase G₀, yaitu fase dimana sel tetap menjalankan fungsi metabolismenya dengan aktif tetapi tidak melakukan proliferasi secara aktif, misalnya pada sel yang tidak lagi berproliferasi dan berdiferensiasi, yaitu pada sel saraf dan sel otot lurik. Sel yang berada pada fase G₀ dapat memasuki siklus sel tahap berikutnya atau tetap pada fase tersebut hingga terjadi apoptosis. Dalam siklus sel, 30-50% waktu total merupakan fase G₁.

2.5.2 Fase S (Sintesis)

Selama fase S terjadi proses sintesis DNA dan protein histon. Protein histon dibutuhkan pada awal sintesis DNA untuk membentuk DNA baru dengan nukleosom. Oleh karena itu, pada akhir fase S, masing-masing kromosom memiliki 2 molekul DNA dan 1 set duplikasi gen. Dalam siklus sel, 35-45% waktu total merupakan fase S.

2.5.3 Fase G₂

Pada fase G₂, terjadi proses sintesis RNA dan protein yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. 10-20% waktu total 1 siklus sel merupakan fase G₂.

2.5.4 Fase M (Mitosis)

Fase M merupakan tahap terjadinya pembelahan sel. Pada fase ini terjadi penurunan jumlah RNA dan protein secara tiba-tiba diikuti kondensasi kromosom dan pembelahan sitoplasma. Dalam fase M terjadi beberapa jenjang fase, yaitu :

1. Profase, fase terjadinya kondensasi kromosom dan pertumbuhan pemintalnya. Pada saat ini kromosom terlihat di dalam sitoplasma.
2. Metafase, kondensasi kromosom pada bidang ekuatorial mencapai titik puncak
3. Anafase, tiap sentromer mulai terpisah dan tiap kromatid dari masing-masing kromosom tertarik menuju pemintal kutub.
4. Telofase, kromosom pada tiap kutub mulai mengalami dekondensasi, diikuti dengan terbentuknya kembali membran inti sel dan sitoplasma perlahan mulai membelah. Dalam telofase terjadi sitokinesis. Pembelahan sitoplasma selesai setelah terjadi oleh interaksi antara pemintal mitotik, sitoskeleton aktomiosin dan fusi sel, dan menghasilkan dua sel anak yang identik.
5. Interfase, merupakan sebuah jeda panjang antara satu mitosis dengan yang lain. Jeda tersebut termasuk fase G₁, S, G₂.

2.6 Sel Kanker MCF-7

Sel MCF-7 merupakan *cell line* yang diambil dari jaringan pleural kanker payudara seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O dan Rh positif. Sel MCF-7 pertama kali dikembangkan di *Michigan*

Cancer Foundation pada tahun 1970 dan telah menjadi model standar untuk berbagai pengujian di seluruh dunia (Levenson, Anait S, 1997). Sel MCF-7 mengekspresikan reseptor ER α yang diekspresikan oleh 80% kanker payudara (Zampieri, Bianchi, Ruff, dan Arbuthnot, 2002; Jagannathan dan Robinson-Rechavi, 2011), bersifat adhesif dan memiliki *doubling time* selama 29 jam (ATCC, 2009).

2.7 Uji Sitoksisitas (Freshney, 2007; Minor, 2006)

Sitotoksisitas adalah kemampuan suatu senyawa menghasilkan aktivitas toksik terhadap jenis sel tertentu. Uji sitotoksisitas ditentukan untuk mengetahui potensi suatu senyawa dalam memberikan efek toksik terhadap sel. Metode uji toksisitas menggunakan kultur sel merupakan metode penapisan awal senyawa antikanker yang potensial yang dapat memberikan hasil yang lebih menggambarkan refleksi biologis pada level seluler dalam kondisi fisiologis. Metode ini dapat memberikan informasi mengenai parameter seperti permeabilitas sel yang tidak dapat diperoleh pada metode biokimia dan *in vivo*. Jika senyawa terbukti memberikan efek toksik pada level *in vitro*, pengujian aktivitas dapat dilanjutkan ke tahap *in vivo*. Toksisitas merupakan peristiwa kompleks secara *in vivo* dikarenakan mekanisme sistem biologis tubuh yang dapat mempengaruhi senyawa aktif sebelum sampai ke target. Selain itu, pengujian secara *in vitro* memberikan banyak keuntungan, misalnya waktu pengerjaan lebih cepat, biaya pelaksanaan yang relatif lebih murah dan zat uji yang dibutuhkan lebih sedikit dibandingkan uji *in vivo*.

Penentuan metode uji dipilih berdasarkan sistem model *in vitro* yang digunakan. Pemilihan metode uji ditentukan berdasarkan pertimbangan :

- a. Tujuan analisa dan parameter yang ingin diketahui, misalnya menentukan jumlah sel yang hidup (*viable cell number*), menentukan jumlah sel yang mati (*cytotoxicity*) dan menentukan mekanisme kematian sel (*apoptosis*),
- b. Kemudahan penggunaan,
- c. Biaya,
- d. Ketersediaan alat,
- e. Kemungkinan kesalahan oleh manusia.

Beberapa macam uji sitotoksitas yang digunakan antara lain :

a. Uji sitotoksitas dengan MTT

Uji sitotoksik MTT merupakan salah satu pengujian sitotoksitas menggunakan metode sederhana dalam perhitungan jumlah sel baik untuk keperluan perhitungan sitotoksik maupun proliferasi sel, dengan standar pembacaan serapan pada mikroplat tanpa perlu adanya pemindahan sel. Prinsip uji MTT adalah penetapan kadar secara kolorimetri dengan menggunakan kemampuan sel hidup mereduksi 3-{4,5-dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) menjadi kristal formazan ungu yang tidak larut. Jumlah sel hidup ditentukan dengan serapan yang diukur menggunakan ELISA *Plate Reader*, pada panjang gelombang 545 nm dan panjang gelombang referensi 620 nm, dimana konsentrasi warna yang dihasilkan sebanding dengan jumlah sel yang mampu bertahan pada pemaparan senyawa uji.

b. Uji ambilan Merah Netral

Merah netral (*2-methyl-3-amino-7-dimethylamino-phenazine*) merupakan senyawa kationik lemah yang berwarna dan dapat terakumulasi dalam lisosom sel hidup. Prinsip uji ini adalah absorpsi pewarna merah netral dalam lisosom sel hidup yang mampu bertahan setelah pemaparan senyawa uji selama waktu tertentu. Merah netral yang terakumulasi di lisosom sel hidup kemudian diekstraksi dan diukur serapannya secara spektrofotometri. Absorbansi yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang mampu bertahan setelah pemaparan senyawa uji.

c. Pewarnaan Diferensial

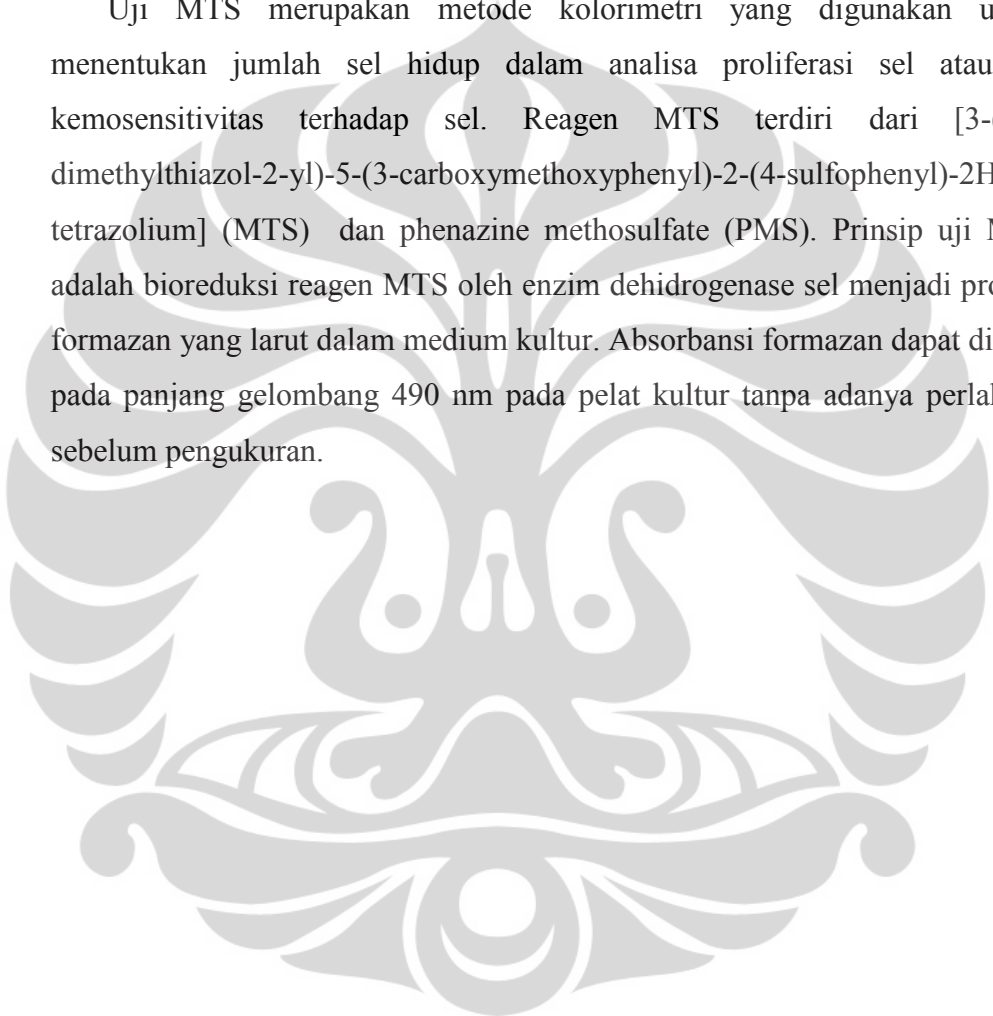
Prinsip metode pewarnaan diferensial adalah perbedaan warna yang dihasilkan oleh diasetil fluoresin dan propium iodida. Sel hidup mampu menghidrolisis diasetil fluoresin menjadi fluoresin. Namun membran sel hidup bersifat impermeabel terhadap fluoresin sehingga sel hidup akan berfluorosensi hijau, sedangkan sel mati akan terwarnai oleh propium iodida sehingga berfluorosensi merah.

d. Eksklusi Zat Warna (*Dye Exclusion*)

Prinsip uji eksklusi zat warna berdasarkan integritas membran sel dimana membran sel hidup akan bersifat impermeabel terhadap pewarna biru tripan, sehingga hanya sel mati yang akan terwarnai. Penentuan jumlah sel mati biasanya dilakukan dengan metode hemositometer.

e. Uji MTS

Uji MTS merupakan metode kolorimetri yang digunakan untuk menentukan jumlah sel hidup dalam analisa proliferasi sel atau uji kemosensitivitas terhadap sel. Reagen MTS terdiri dari [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) dan phenazine methosulfate (PMS). Prinsip uji MTS adalah bioreduksi reagen MTS oleh enzim dehidrogenase sel menjadi produk formazan yang larut dalam medium kultur. Absorbansi formazan dapat diukur pada panjang gelombang 490 nm pada pelat kultur tanpa adanya perlakuan sebelum pengukuran.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Farmasetika dan Laboratorium Formulasi Tablet Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia Depok dan Laboratorium Sitogenetik dan Kultur Sel MAKMAL Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.2 Alat

Spektrofotometer UV 1800 (Shimadzu), *Transmission Electron Microscope* (TEM), Malvern Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcesterhire, UK), mikropipet (Gilson, Eppendorf), *freezer* -80°C (Sanyo), kabinet laminar (Esco Class II Type A/B3), inkubator sel dengan aliran oksigen 95% dan karbondioksida 5% (Forma Scientific), mikroskop *inverted* (Nikon), *centrifuge* (Kokusan H-103N Series), pengaduk magnetik, hemositometer (Assistant, Superior Marienfeld), pHmeter (Mettler Toledo), 96 *wellplate* (Thermo Scientific), ELISA *plate reader* (Vmax), filter bakteri 0,2 µm steril (Sartorius Stedim Biotech), spuit 10 mL steril (Terumo), tabung sentrifugasi (Corning), *TC Flask* (Corning), alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Dendrimer Poli(amidoamin) (PAMAM) Generasi 4 (Sigma), asam tetrakloroaurat (HAuCl₄) (Sigma), natrium borohidrida (NaBH₄) (Sigma), natrium hidroksida (NaOH), akuabides, sisplatin, sel kanker payudara (koleksi Laboratorium MAKMAL Terpadu FKUI), medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) *High Glucose with L-Glutamine* (Biowest), Natrium bikarbonat (NaHCO₃), penisilin-streptomisin (Gibco), Amphotericin B (Gibco), *fetal bovine serum* (Sigma), *phosphate buffered saline*, larutan tripsin 2,5% (Gibco), EDTA, MTS *reagent* (Promega), asam klorida 0,1 N.

3.4 Metode Pelaksanaan

3.4.1 Preparasi Nanopartikel Emas (*nanogold*) PAMAM

Metode pembuatan nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4 diadopsi dari jurnal *Morphological Change of Gold-Dendrimer Nanocomposites by Laser Irradiation* (Esumi et. al., 2003) dengan variasi, yaitu dengan pembentukan koloid Au(0) melalui reduksi H_{AuCl}₄ dan pembentukan nanopartikel Au(III) tanpa adanya reduksi.

3.4.2 Pembuatan Nanopartikel Au-Dendrimer PAMAM G4

3.4.2.1 Pembuatan Larutan Dendrimer PAMAM Generasi 4 $1,4 \times 10^{-3}$ M

Larutan dendrimer PAMAM G4 yang akan digunakan diambil dari larutan induk dendrimer PAMAM/metanol 10% (0,0057 M). Pembuatan larutan dendrimer PAMAM G4 $1,4 \times 10^{-3}$ M dilakukan dengan cara memipet larutan induk 10% sebanyak 288 μ L dan diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 10,0 mL hingga batas.

3.4.2.2 Pembuatan Larutan H_{AuCl}₄ 0,002 M

Larutan H_{AuCl}₄ yang akan digunakan diambil dari larutan induk H_{AuCl}₄/HCl 30% (1,445 M). Pembuatan larutan H_{AuCl}₄ 0,002 M dilakukan dengan memipet 138 μ L larutan induk kemudian diencerkan dalam labu ukur 100,0 mL hingga batas.

3.4.2.3 Pembuatan Larutan NaBH₄ 0,02 M

Larutan NaBH₄ yang akan digunakan diambil dari larutan induk NaBH₄ (4,3616 M). Larutan NaBH₄ 0,02 M dibuat dengan cara memipet 458 μ L dan diencerkan dengan aquabidest hingga batas labu ukur 100,0 mL hingga batas.

3.4.3 Pembuatan Nanopartikel Au-Dendrimer PAMAM G4

Sebanyak 1,0 mL larutan H_{AuCl}₄ 0,002 M ditambahkan kedalam 8,5 mL larutan dendrimer PAMAM G4 $1,4 \times 10^{-3}$ M. Campuran larutan diaduk selama 15 menit untuk menyempurnakan pembentukan kompleks Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 yang berwarna kuning terang. Pembuatan larutan dilakukan duplo. Pada

perlakuan variasi, larutan pertama dicukupkan volumenya hingga mencapai 10,0 mL dengan penambahan akuabides. Sedangkan pada pembuatan koloid nanopartikel Au^0 , larutan kompleks Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 kedua ditambahkan 0,5 mL larutan aqueous NaBH_4 0,02 M dengan segera diikuti pengadukan kuat untuk mereduksi ion Au menjadi valensi 0 dan terbentuk koloid nanopartikel merah coklat. Rasio mol akhir $[\text{Au}^{3+}]/[\text{dendrimer PAMAM}] = 1,43:1$.

3.4.4 Penentuan Spektrum Serapan

Penentuan spektrum serapan nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4 dilakukan menggunakan spektrofotometer UV 1800. Penentuan dilakukan dengan mengukur spektrum serapan larutan dendrimer PAMAM G4, larutan HAuCl_4 , nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 dan nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 pada panjang gelombang 200-800 nm. Pengukuran spektrum serapan nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 dan nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu setelah proses pembuatan dan setelah penyimpanan selama 6 minggu.

3.4.5 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pHmeter. Setelah pHmeter dikalibrasi dengan pH standar 7,0, dilakukan pengukuran pH terhadap nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4, nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 dan larutan dendrimer PAMAM G4.

3.4.6 Penentuan Ukuran Partikel

Ukuran nanopartikel emas ditentukan menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dan Malvern Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcesterhire, UK). Penentuan ukuran nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4 dilakukan dengan menggunakan $\pm 1,0$ mL larutan pada masing-masing pengujian. Pengukuran diameter nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 dan nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu setelah proses pembuatan dan setelah masa penyimpanan selama 4 minggu.

3.4.7 Uji Aktivitas Antikanker Nanopartikel Au–Dendrimer PAMAM G4 (Cell Biolabs, Inc; CCRC Farmasi UGM, 2008; Ronconi, et al., 2005; Sau Har Lee, 2011; Subakir, Sri B., 2006)

3.4.7.1 Pembuatan Medium DMEM Stok

Medium DMEM stok dibuat dengan melarutkan 6,765 g serbuk DMEM dan 1,85 g natrium bikarbonat dalam 250 mL akuades. Setelah DMEM dan natrium bikarbonat larut sempurna, volume dicukupkan dengan penambahan akuades hingga mencapai volume 500 mL. Selanjutnya, medium stok difiltrasi dengan filter bakteri 0,22 μm dan disegel. Medium stok disimpan pada suhu 2-8°C hingga digunakan.

3.4.7.2 Pembuatan Larutan *Phosphate Buffer Saline*

Larutan PBS 1 x dibuat dengan melarutkan 4,0 g NaCl, 0,575 g Na₂HPO₄, 0,1 g KH₂PO₄ dan 0,1 g KCl dalam 300 ml akuabides steril menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya dilakukan pengaturan pH dengan penambahan HCl 1 M atau NaOH 1 M hingga diperoleh pH larutan 7,4. Setelah itu volume larutan dicukupkan hingga 500 mL dan larutan PBS dipindahkan ke dalam botol *schott* dan disimpan pada suhu 2-4°C.

3.4.7.3 Penyiapan Medium DMEM Kultur

Fetal Bovine Serum dan penisillin-streptomisin dicairkan. Sebanyak \pm 60 mL medium DMEM stok dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 10 mL FBS dan 0,5 ml penisilin-streptomisin (100 unit/mL penisilin dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomisin). Volume dicukupkan dengan penambahan larutan medium DMEM stok ke dalam erlenmeyer hingga diperoleh 100 mL medium kultur. Medium komplet kemudian difiltrasi dengan filter 0,2 μm dan disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan.

3.4.7.4 Pembuatan Larutan Tripsin-EDTA 0,025%

Larutan tripsin-EDTA 0,025 % dibuat dengan melarutkan 0,038 g EDTA dalam akuades. Setelah EDTA larut sempurna, 1,0 mL larutan induk tripsin (2,5%) dipipet dan dicampurkan ke dalam larutan EDTA kemudian volume

dicukupkan dengan penambahan akuades hingga mencapai volume 100 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan difiltrasi dengan filter bakteri 0,22 μm dan disegel. Larutan disimpan pada suhu 2-8°C hingga digunakan.

3.4.7.5 Penyiapan Larutan Kontrol Positif Sisplatin

Sediaan sisplatin merupakan larutan dengan konsentrasi 1 mg/mL atau $3,32 \times 10^{-6}$ M. Dari larutan tersebut, dipipet sebanyak 301 μL dan diencerkan dengan penambahan akuabides hingga volume 5,0 mL dan diperoleh larutan induk 200 μM . Dari larutan induk, dilakukan pengenceran bertingkat dengan memipet 500 μL larutan sisplatin dan ditambahkan medium hingga diperoleh volume akhir 1,0 mL (konsentrasi 100 μM) yang dilakukan duplo. Dari salah satu larutan tersebut, dipipet kembali sebanyak 500 μL dan ditambahkan medium hingga volume 1000 μL (konsentrasi 50 μM). Pengenceran bertingkat dilakukan hingga diperoleh seri konsentrasi larutan akhir 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,125 μM .

3.4.6.6 Penyiapan Larutan Uji

Seri konsentrasi larutan uji dibuat dari larutan induk yang memiliki konsentrasi 200 μM . Dari larutan induk, dipipet masing-masing sebanyak 500 μL secara duplo dan masing-masing ditambahkan medium hingga diperoleh volume akhir 1000 μL . Konsentrasi larutan uji yang terbentuk adalah 100 μM . Dari salah satu larutan tersebut, dipipet kembali sebanyak 500 μL dan ditambahkan medium hingga volume 1000 μL (konsentrasi 50 μM). Dari larutan konsentrasi 50 μM , tahap pengenceran bertingkat diulangi kembali hingga diperoleh larutan akhir dengan seri konsentrasi 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,125 μM .

3.4.7.7 Penyiapan Larutan Dendrimer PAMAM

Dari larutan induk dendrimer PAMAM dengan konsentrasi 0,0057 M, dipipet sebanyak 122 μL dan diencerkan dalam labu ukur 5,0 mL hingga diperoleh konsentrasi larutan 140 μM . Selanjutnya pembuatan seri konsentrasi larutan dilakukan dengan pengenceran bertingkat. Sebanyak 500 μL larutan dendrimer PAMAM 140 μM dipipet duplo dan masing-masing diencerkan dengan penambahan medium kultur hingga diperoleh konsentrasi 70 μM . Pada salah satu larutan, sebanyak 500 μL dipipet dan diencerkan dengan penambahan medium

kultur hingga diperoleh volume 1000 μL (konsentrasi 35 μM). Perlakuan yang sama dilakukan bertingkat hingga diperoleh seri konsentrasi larutan 17,5, 8,75, 4,325 dan 2,16 μM .

3.4.7.8 Pencairan dan Kultivasi Sel

Media kultur sebanyak 10 mL disiapkan dalam *centrifuge tube* steril. Ampul (*cryovial*) berisi sel beku dicairkan dalam waterbath pada suhu 37°C. Untuk menghindari terjadinya kontaminasi, usap *cryovial* dengan etanol 70% sebelum dibuka. Tepat sebelum sel beku mencair semua, suspensi sel dipipet dan dimasukkan ke dalam media kultur yang telah disiapkan dalam *centrifuge tube* kemudian sel disentrifugasi pada 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan sel dibuang dan suspensi sel diresuspensi dengan penambahan 5 mL medium kultur. Medium kultur yang telah mengandung sel dipindahkan ke dalam *TC flask*. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan CO₂ atmosfer 5%.

3.4.7.9 Pemeliharaan Kultur Sel

Pemeliharaan kultur sel dilakukan setiap hari di bawah mikroskop untuk memeriksa kemungkinan terjadinya pencemaran oleh jamur atau bakteri. Jika medium kultur telah berubah warna, maka medium diganti dengan medium segar. Penggantian medium dimulai dengan penyiapan PBS dan medium kultur segar. Medium dalam labu kultur dipipet perlahan dengan pipet pastur kemudian dibuang. Sel dalam *flask* dicuci dengan 3 mL PBS sebanyak 3 kali. Pada sel yang telah dicuci ditambahkan 5 mL medium kultur segar dan dihomogenkan. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator dengan kandungan CO₂ atmosfer 5% hingga diperoleh kerapatan 70-80%.

3.4.7.10 Panen Sel

Setelah sel mencapai kerapatan 70-80%, media kultur dalam *flask* dibuang dan sel dicuci 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah ½ kali volume medium awal, yaitu 3-3,5 mL). Tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,025%) ditambahkan sel diinkubasi selama 3 menit. Setelah diinkubasi, \pm 5 mL media ditambahkan untuk menginaktifkan tripsin dan sel diresuspensi agar sel tidak menggerombol

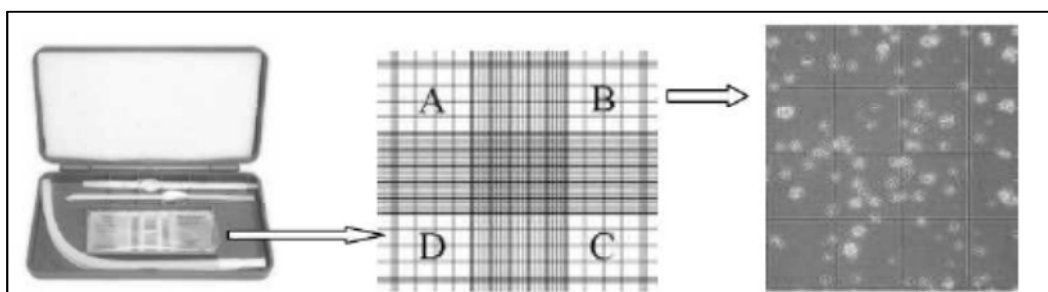
(pengamatan dengan mikroskop). Sel yang telah diresuspensi ditransfer ke dalam *centrifuge tube* steril baru.

3.4.7.11 Subkultur Sel

Sel yang telah dipanen diresuspensi terlebih dahulu untuk menghomogenkan sel dalam media, kemudian 300 μL sel panen ditransfer ke dalam *centrifuge tube* yang lain dan ditambahkan 5 mL medium kultur. Sel dituang ke dalam *flask* dan diamati jumlahnya secara kualitatif. Pemeliharaan sel dilakukan hingga diperoleh kerapatan 70-80% untuk melakukan pemanenan sel uji.

3.4.7.12 Perhitungan Sel

Sel dicuci 2 kali dengan PBS (volume PBS $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal). Setelah dicuci, tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,025%) ditambahkan ke dalam labu kultur dan sel diinkubasi selama 3 menit. Setelah 3 menit, labu kultur dikeluarkan dari inkubator dan dilihat di bawah mikroskop untuk memastikan sel sudah tidak melekat pada dasar labu. Ke dalam labu ditambahkan 2-3 mL medium kultur untuk menginaktifkan tripsin dan sel diresuspensi dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Sel yang telah terlepas satu-satu dipindahkan ke dalam *centrifuge tube* steril baru dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi kembali dengan penambahan medium kemudian sel dalam *centrifuge tube* digunakan untuk pengujian. Sebanyak 10 μL *trypan blue* dipipet dan dihomogenkan dengan 10 μL suspensi sel lalu dimasukkan ke dalam hemositometer.



[sumber : CCRC Farmasi UGM]

Gambar 3.1. Hemositometer

Perhitungan sel dilakukan dengan cara :

1. Sel pada 4 kamar (A, B, C dan D) hemositometer dihitung. Masing-masing kamar terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap dan sel yang berada di batas luar sebelah atas dan kanan pada tiap-tiap kotak tidak dihitung, sel di batas kiri dan batas bawah tiap-tiap kotak ikut dihitung.
2. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{Sel terhitung}}{4} \times 10^4 \times 2 \times \text{vol suspensi sel (mL)} \quad (3.1)$$

3.4.7.13 Penyiapan Sel untuk Uji

Jumlah total sel yang diperlukan dihitung berdasarkan jumlah sel pada setiap sumuran dikalikan jumlah sumuran yang berisi sel. Volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dihitung dengan persamaan :

$$\text{vol sel ditransfer} = \frac{\text{jumlah sel yang diperlukan} \times \text{vol sel terhitung}}{\text{jumlah sel terhitung}} \quad (3.2)$$

Sejumlah volume panen sel yang telah dihitung ditransfer ke dalam *centrifuge tube* baru kemudian ditambahkan media kultur hingga diperoleh volume total yang diinginkan.

Pada uji sitotoksitas yang dilakukan, 3 sampel divariasikan menjadi 6 konsentrasi dan diamati setelah inkubasi 24 jam. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100 μL media kultur berisi sel dengan jumlah sel sebanyak 1×10^4 sel per sumuran, maka total volume yang diperlukan untuk mengkultur sel adalah :

Kontrol positif sisplatin	: 6 konsentrasi, triplo	= 18 sumuran
Kontrol negatif	: 12 sumuran	= 12 sumuran
Sampel 1 (Au-PAMAM)	: 6 konsentrasi, triplo	= 18 sumuran
Sampel 2 (Au-PAMAM- NaBH_4)	: 6 konsentrasi, triplo	= 18 sumuran
Dedriemer PAMAM	: 6 konsentrasi, triplo	= 18 sumuran +
		<hr/> 84 sumuran

Dilakukan pembulatan hingga 100 sumuran.

Total volume sel yang dibutuhkan adalah $100 \mu\text{L} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$.

Jumlah sel yang dibutuhkan untuk pengujian adalah $10^4 \text{ sel/sumuran} \times 100 \text{ sumuran} = 1,0 \times 10^6 \text{ sel}$.

3.4.7.14 Pembuatan Larutan MTS

Pembuatan larutan MTS/PMS untuk MTS *assay* dilakukan sesaat sebelum pengujian. Larutan MTS dan PMS dicairkan pada suhu ruang (± 90 menit) atau dalam waterbath 37°C (± 10 menit). Setelah mencair sempurna, sebanyak 2,0 mL larutan MTS dipindahkan dari botol induk ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 100 μL larutan PMS dan campuran larutan dihomogenkan.

3.4.7.15 Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTS

Sel ditransfer ke dalam 78 sumuran masing-masing 100 μL dengan konsentrasi 10^5 sel/mL dan 6 sumuran diisi masing-masing 100 μL medium. Setelah sel dalam sumuran diinkubasi semalam (sel kembali normal setelah panen), media kultur sel dibuang dan seri konsentrasi larutan uji dalam medium sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam sumuran (triplo), kemudian masing-masing sel dalam mikroplat diinkubasi selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, pada masing-masing sumuran ditambahkan 20 μL larutan MTS/PBS lalu sel diinkubasi kembali selama 1 jam dan serapan diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 490 nm.

3.4.7.16 Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7

Perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh larutan uji dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Persentase keamatan} = \frac{\text{Serapan kontrol negatif} - \text{Serapan larutan uji}}{\text{Serapan kontrol negatif}} \times 100\% \quad (3.4)$$

Perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh sisplatin dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

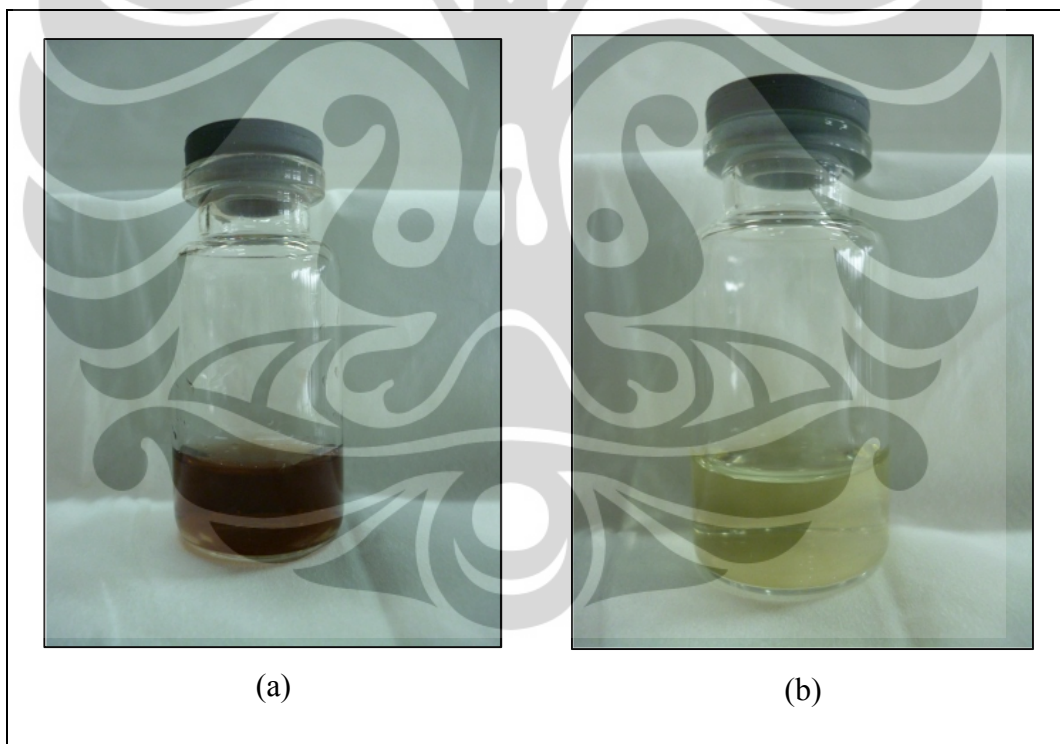
$$\text{Persentase kematian} = \frac{\text{Serapan kontrol negatif} - \text{Serapan sisplatin}}{\text{Serapan kontrol negatif}} \times 100\% \quad (3.5)$$

3.5 Analisa Data Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7

Dari data persentase kematian sel MCF-7, ditentukan nilai IC_{50} berdasarkan persamaan dari kurva hubungan persentase kematian sel MCF-7 dengan konsentrasi larutan uji menggunakan program Graphpad Prims 5. Selanjutnya dilakukan uji hipotesis komparatif terhadap data persentase kematian sel MCF-7. Distribusi probabilitas dan homogenitas data persentase kematian larutan uji dan kontrol positif sisplatin dianalisa untuk menentukan jenis analisa statistik komparatif yang akan digunakan untuk melihat hubungan persentase kematian sel MCF-7 antar larutan uji dan kontrol positif sisplatin.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan dan pengujian sitotoksitas nanopartikel emas dengan dendrimer Poliamidoamin (PAMAM) Generasi 4 sebagai sistem pembawa nanopartikel. Pada pembuatan nanopartikel, emas sebagai zat aktif divariasikan dalam dua bilangan oksidasi, yaitu bilangan oksidasi 0 dan +3. Pembuatan nanopartikel dilakukan dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 30 menit agar emas dapat terjerap secara optimal. Setelah proses pembuatan, diperoleh larutan akhir nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 yang berwarna kuning jernih dan larutan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 berwarna merah coklat (gambar 4.1).



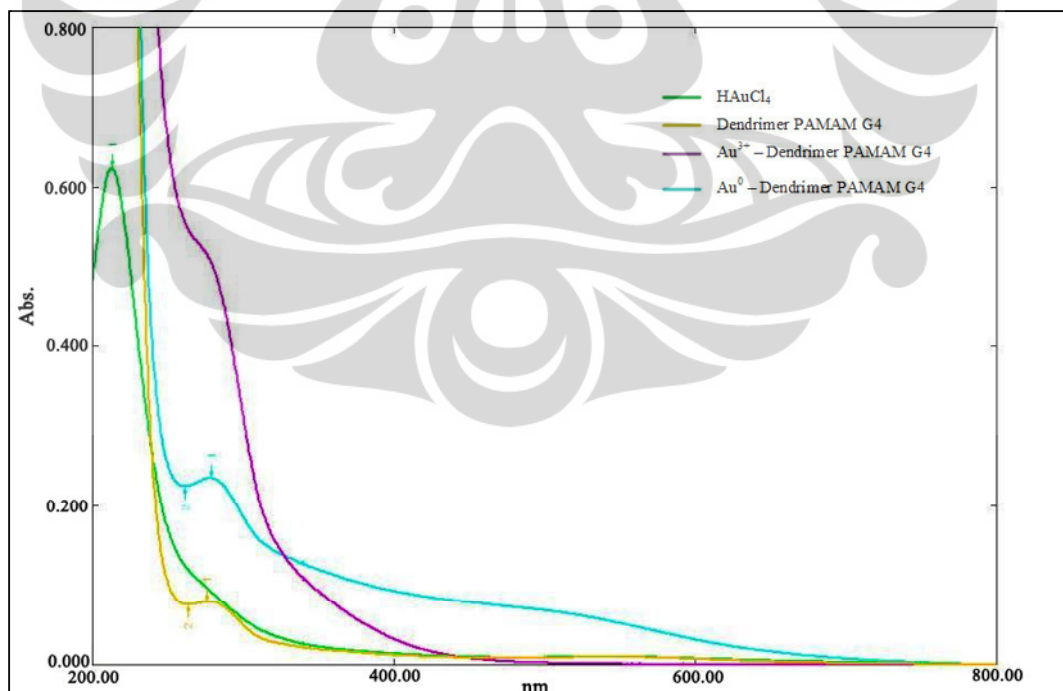
Gambar 4.1. Foto nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 (a) dan nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4

4.1 Spektrum Serapan Nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4

Spektrum serapan nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4 ditentukan menggunakan spektrofotometer UV 1800. HAuCl_4 memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 213 nm dan spektrum lebar pada panjang gelombang sekitar 290 nm (lampiran 4.a) yang terbentuk karena adanya interaksi antara logam dan ligan kloro pada HAuCl_4 (Esumi, Suzuki, Yamahira dan Torigoe, 2000). Larutan dendrimer PAMAM G4 memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 276 nm (lampiran 4.b). Serapan pada panjang gelombang tersebut terbentuk karena adanya interaksi dalam struktur dendrimer PAMAM G4, secara khusus terkait gugus amin tersier yang terletak pada interior dendrimer PAMAM (Pande dan Crooks, 2011). Saat HAuCl_4 direaksikan dengan dendrimer PAMAM G4, terjadi penurunan pH larutan sehingga gugus amin tersier dendrimer PAMAM G4 terprotonasi (Whei Chen, Tomalia dan Thomas, 2000) yang menyebabkan serapan dendrimer PAMAM G4 pada panjang gelombang 276 nm menghilang (Pande dan Crooks, 2011). Sebaliknya, terjadi peningkatan absorbansi pada panjang gelombang sekitar 290 nm (lampiran 4.c), yang disebabkan karena adanya peningkatan interaksi kimia AuCl_4^- berupa interaksi elektrostatik dengan gugus amin tersier dendrimer PAMAM G4 yang terprotonasi menjadi NH_3^+ (Esumi, Suzuki, Yamahira dan Torigoe, 2000).

Pada larutan nanopartikel emas variasi pertama, muatan Au dipertahankan dalam bilangan oksidasi +3 dan hanya dilakukan pencukupan volume dengan penambahan akuabides. Pada variasi larutan kedua, dilakukan penambahan NaBH_4 untuk mereduksi ion Au^{3+} menjadi Au dengan bilangan oksidasi 0. Proses reduksi sempurna ion Au^{3+} menjadi Au^0 ditandai dengan perubahan warna larutan dari kuning jernih menjadi merah coklat. Setelah penambahan NaBH_4 , pengadukan larutan dilakukan selama 30 menit untuk memastikan proses reduksi telah bereaksi sempurna. Pada analisa kualitatif, reaksi reduksi yang telah berjalan sempurna dapat diamati dari serapan yang terbentuk, yaitu hilangnya serapan pada panjang gelombang sekitar 290 nm yang menunjukkan bahwa Au telah tereduksi (Esumi, Suzuki, Yamahira dan Torigoe, 2000). Selain itu, muncul puncak serapan pada panjang gelombang 278 nm (lampiran 4.d) yang dihasilkan oleh gugus amin tersier dendrimer PAMAM G4 yang mengalami deprotonasi saat penambahan

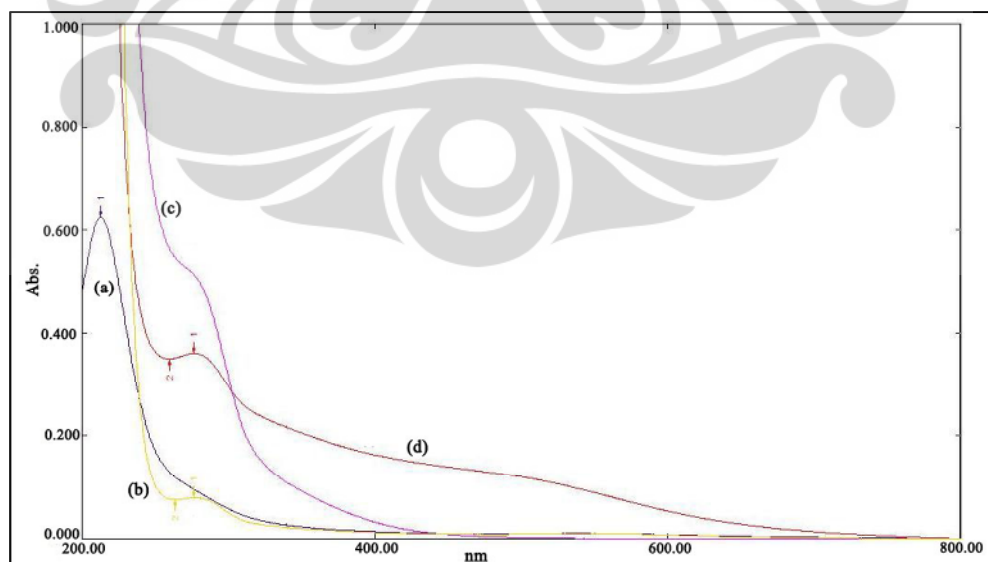
NaBH_4 yang bersifat basa (Pande dan Crooks, 2011). Pengenkapsulasian nanopartikel emas dalam dendrimer PAMAM G4 menyebabkan peningkatan absorbansi dendrimer PAMAM pada panjang gelombang 278 nm. Penelitian yang dilakukan Zhijuan Zhang, et. al., (2010) juga memberikan hasil yang sama, yaitu adanya peningkatan absorbansi dendrimer PAMAM G4 pada panjang gelombang 285 nm setelah proses pengenkapsulasian emas. Hal ini membuktikan bahwa proses pembentukan nanopartikel emas telah berjalan sempurna. Pergeseran panjang gelombang dendrimer PAMAM G4 dari 276 nm menjadi 278 nm dan perbedaan panjang gelombang dendrimer PAMAM G4 antara penelitian dan literatur dapat disebabkan karena efek perubahan suhu dan pH larutan saat dilakukan pengukuran. Nanopartikel emas yang berukuran lebih besar dari 2 nm memberikan serapan pada panjang gelombang 500-550 nm (Yong-Gu Kim, Sang-Keun Oh dan Crooks, 2004). Berdasarkan spektrum serapan nanopartikel emas yang dihasilkan, pita serapan yang landai pada panjang gelombang 500-550 nm menunjukkan bahwa nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 yang terbentuk berukuran ± 2 nm (gambar 4.2).



Gambar 4.2. Kurva spektrum serapan UV-Vis berbagai larutan saat pembuatan nanopartikel

Analisa spektrofotometri UV-Vis juga dilakukan untuk mengamati stabilitas nanopartikel emas selama masa penyimpanan. Setelah penyimpanan selama 6 minggu, spektrum UV-Vis nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 tidak menunjukkan adanya serapan baru pada panjang gelombang 500–550 nm yang merupakan spektrum karakteristik dari emas dengan bilangan oksidasi 0 (gambar 4.3). Hal ini menunjukkan bahwa interaksi elektrostatis antara emas dan dendrimer mampu mempertahankan stabilitas emas dalam bilangan oksidasi +3.

Spektrum serapan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah masa penyimpanan selama 6 minggu juga tidak menunjukkan adanya perubahan (gambar 4.3), yang menunjukkan bahwa stabilitas nanopartikel emas dengan bilangan oksidasi 0 mampu dipertahankan. Nanopartikel emas yang berukuran lebih besar dari 2 nm secara spesifik menunjukkan puncak pada panjang gelombang 500–550 nm. Ketika nanopartikel emas berukuran kurang dari 2 nm, puncak pada panjang gelombang tersebut menunjukkan spektrum serapan yang tidak bermakna, yang meningkat sebanding dengan peningkatan ukuran nanopartikel (Yong-Gu Kim, Sang-Keun Oh dan Crooks, 2004). Spektrum serapan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 tidak menunjukkan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 500–550 nm yang menunjukkan tidak adanya reduksi Au³⁺ menjadi Au⁰ yang berukuran diatas 2 nm.



Gambar 4.3. Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) HAuCl₄, (b) dendrimer PAMAM G4, (c) Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 dan (d) Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu

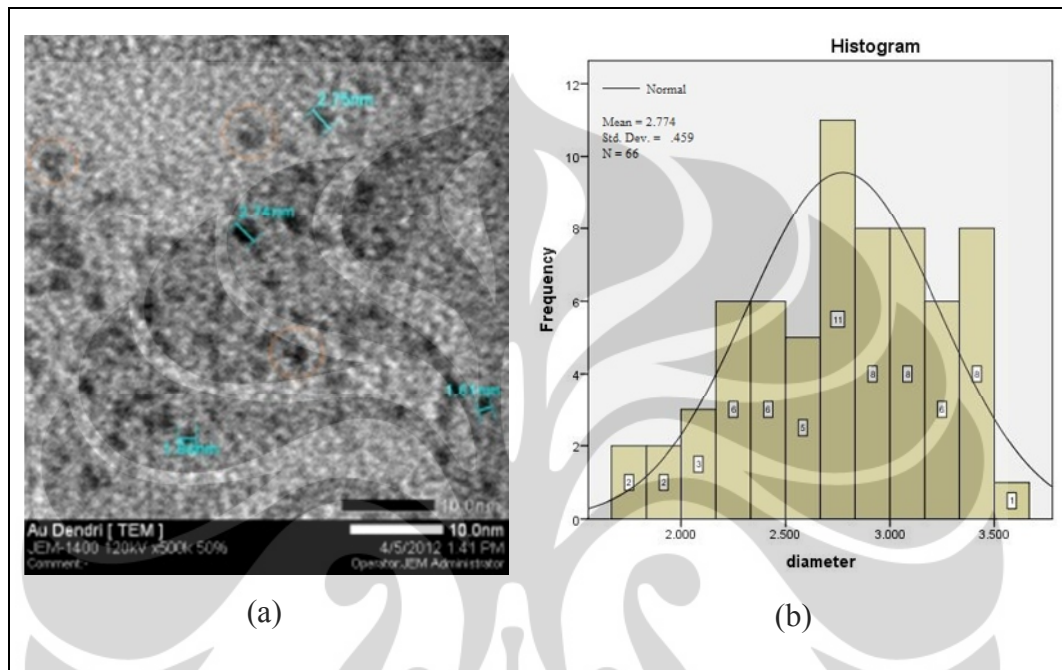
4.2 Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pHmeter. Pada pH \pm 9,5, sebagian besar gugus amin dendrimer PAMAM bermuatan netral. Penurunan pH akan menyebabkan protonasi gugus amin. Pada pH \pm 7 gugus amin tersier dendrimer PAMAM akan terprotonasi (Whei Chen, Tomalia dan Thomas, 2000). Hasil pengukuran pH yang diperoleh telah sesuai dengan spektrum serapan yang terbentuk. Dendrimer PAMAM G4 memiliki pH 9,52. Saat penambahan H_{AuCl}₄ dalam pembentukan nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 mengalami penurunan pH menjadi 7,17 yang menyebabkan penurunan pH sehingga gugus amin tersier dendrimer PAMAM G4 terprotonasi dan serapan dendrimer PAMAM G4 pada panjang gelombang 276 nm menghilang (Pande dan Crooks, 2011). Pada variasi pembentukan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4, penambahan NaBH₄ menyebabkan pH meningkat menjadi 10,31 dan dendrimer PAMAM G4 mengalami deprotonasi sehingga serapan pada panjang gelombang 276 nm muncul kembali.

4.3 Penentuan Ukuran Nanopartikel Au – dendrimer PAMAM G4

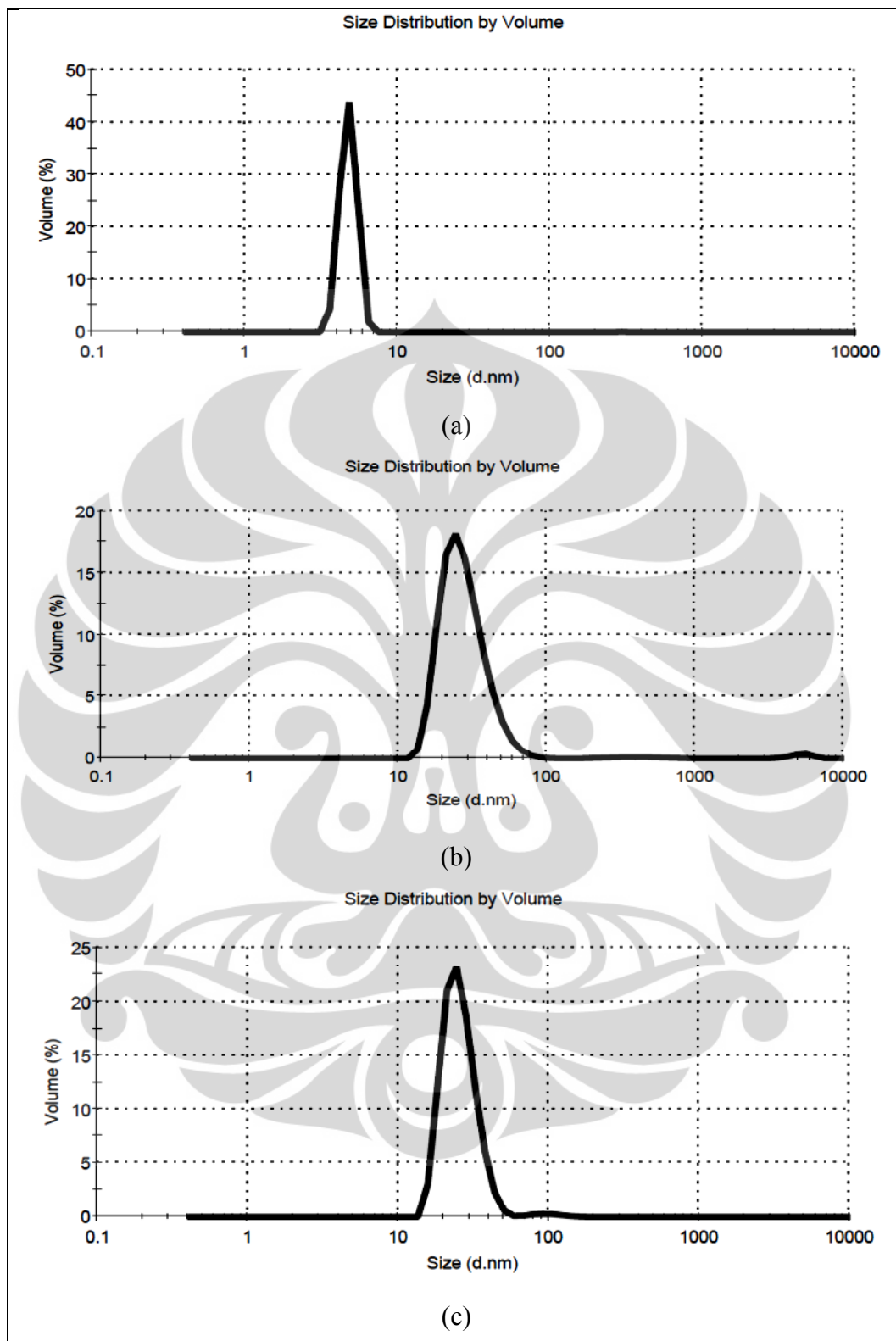
Penentuan ukuran nanopartikel emas dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu setelah proses pembuatan nanopartikel emas dan setelah penyimpanan selama 4 minggu. Pengukuran diameter Nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 sebelum masa penyimpanan dilakukan dengan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dan dianalisa menggunakan program *Image J Analysis* (gambar 4.4). Hasil pengukuran diameter nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 dianalisa secara statistik menggunakan program SPSS 20. Berdasarkan hasil analisa statistik diketahui bahwa nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 telah terdistribusi normal dengan rata-rata ukuran partikel $2,77 \pm 0,46$ nm. Setelah penyimpanan selama 4 minggu, dari pemeriksaan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 menggunakan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS) diketahui nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 sebanyak 99,9% volum berukuran 4,81 nm dengan indeks polidispersitas 0,381 (lampiran 26). Indeks polidispersitas berbanding lurus dengan tingkat polidispersi partikel. Dari hasil pengukuran tersebut, terlihat bahwa ukuran nanopartikel yang terbentuk terdistribusi normal dengan

polidispersitas ukuran yang rendah. Data ukuran nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 memberikan hasil yang sesuai dengan analisa nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 secara kualitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel yang terbentuk adalah ± 2 nm.



Gambar 4.4. Mikrograf (a) dan histogram (b) TEM nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 sebelum penyimpanan

Penentuan ukuran nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 dilakukan dengan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS). Sebelum masa penyimpanan, sebanyak 98,3% volum nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 memiliki ukuran 28,36 nm dengan indeks polidispersitas 0,182 (lampiran 27). Setelah penyimpanan selama 4 minggu, sebanyak 98,8% volum nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 berukuran 25,85 nm dengan indeks polidispersitas 0,239 (lampiran 28). Kedua hasil pengukuran tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 dengan partikel yang relatif monodispers dapat terbentuk.



Gambar 4.5. Kurva distribusi ukuran nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 (a) dan nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 sebelum (b) dan setelah (c) penyimpanan

4.4 Kultivasi Sel

Kultivasi sel MCF-7 dilakukan untuk memperbanyak sel hingga diperoleh jumlah sel yang cukup untuk pelaksanaan uji sitotoksitas. Teknik pengkulturan sel dilakukan dalam kondisi aseptis untuk mencegah terjadinya kontaminasi (Freshney, 2007). Oleh karena itu, pengerjaan dilakukan dalam *laminar air flow*. Sel MCF-7 dikultur dalam medium DMEM *High Glucose* karena medium ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel. Untuk mencegah kontaminasi maka medium kultur diformulasi mengandung penisilin-streptomisin dan amphoterasin B masing-masing dengan kadar 1%. pH medium kultur disesuaikan dengan pH pertumbuhan optimum sebagian besar *cell line*, yaitu pada $\text{pH} \pm 7,4$ (Freshney, 2007) dan ditambahkan natrium bikarbonat sebagai *buffer*.

Berdasarkan perhitungan menggunakan tripan biru, sel beku yang dicairkan dalam *cryovial* berjumlah $\pm 5,8$ juta sel yang dikultur dalam labu kultur 25 cm^2 . Sel diperiksa setiap hari untuk memastikan tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri dan jamur. Dalam waktu 4 hari, sel dalam labu kultur telah mencapai kerapatan $\pm 80\%$ sehingga perlu dilakukan subkultivasi agar fase log sel tetap terjaga dan sel terus berada pada kondisi optimum pertumbuhan. Sel MCF-7 bersifat melekat pada dasar labu kultur sehingga saat subkultivasi perlu ditambahkan tripsin untuk melepaskan sel dari dasar labu kultur. Paparan tripsin yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan sel (Freshney, 2007). Oleh karena itu pengamatan terhadap sel dilakukan per 3 menit sel diinkubasi dalam larutan tripsin. Jika sel telah terlepas dari dasar labu maka harus segera ditambahkan medium ke dalam labu kultur untuk menonaktifkan tripsin. Jika jumlah sel diperkirakan telah cukup untuk pelaksanaan uji sitotoksitas maka dilakukan pemanenan sel.

4.5 Jumlah Kepadatan Sel

Sel yang telah dipanen dihitung kepadatannya dengan metode kamar hitung. Metode ini menggunakan tripan biru yang mewarnai sel mati namun tidak mampu mewarnai sel hidup karena sifat permeabilitas yang dimilikinya sehingga sel mati akan berwarna biru dan sel hidup akan terlihat jernih (Freshney, 2007).

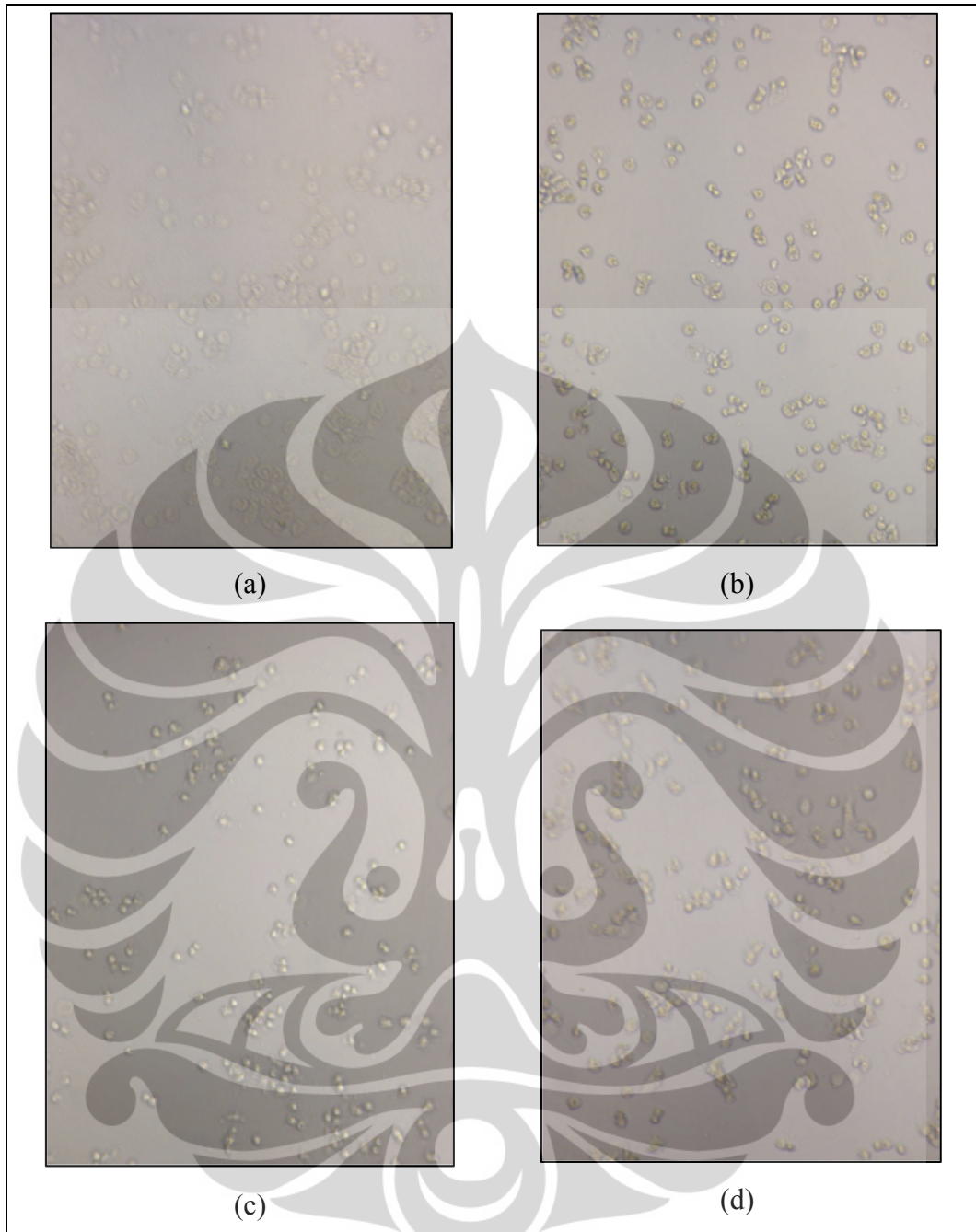
Rata-rata jumlah sel saat perhitungan menggunakan hemositometer sebelum penyiapan sel untuk uji sitotoksitas adalah 68 sel dengan faktor pengenceran 10 kali sehingga jumlah sel yang digunakan untuk penyiapan sel uji adalah 6,8 juta sel dalam 5 mL medium (suspensi sel induk).

4.6 Penyiapan Suspensi Sel Uji

Pelat kultur terdiri dari 96 sumuran (pembulatan dihitung 100 sumuran) dengan masing-masing sumuran diisi 10^4 sel/100 μ l sehingga jumlah sel yang diperlukan adalah 10^6 sel dalam 10 mL medium kultur. Penyiapan suspensi sel dilakukan dengan memipet 735 μ L suspensi sel induk dan ditambahkan medium kultur hingga volume 10 mL untuk masing-masing pelat kultur. Saat pengisian sel ke dalam pelat kultur, suspensi sel yang telah disiapkan diresuspensi dengan pemipetan perlahan secara berkala agar jumlah sel saat pemipetan tetap homogen.

4.7 Pengujian Sitotoksitas terhadap Sel MCF-7

Sebanyak 3 pelat kultur yang telah diisi suspensi sel diinkubasi pada suhu 37°C dan kandungan CO_2 atmosfer 5% selama semalam agar sel menempel pada dasar pelat kultur dan berada pada fase log. Setelah diinkubasi, medium sel pada masing-masing pelat diganti dengan variasi konsentrasi larutan uji dan kontrol positif sisplatin dalam medium kultur dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, pada masing-masing pelat ditambahkan 20 μ L pereaksi MTS dan pelat dilapisi aluminium foil kemudian sel diinkubasi kembali selama 1 jam. Larutan MTS dapat menembus membran sel hidup dan direduksi di mitokondria menjadi senyawa formazan yang larut dalam medium kultur. Serapan formazan dapat diukur pada panjang gelombang 490 nm tanpa praperlakuan sebelum pengukuran (Promega, 2009).

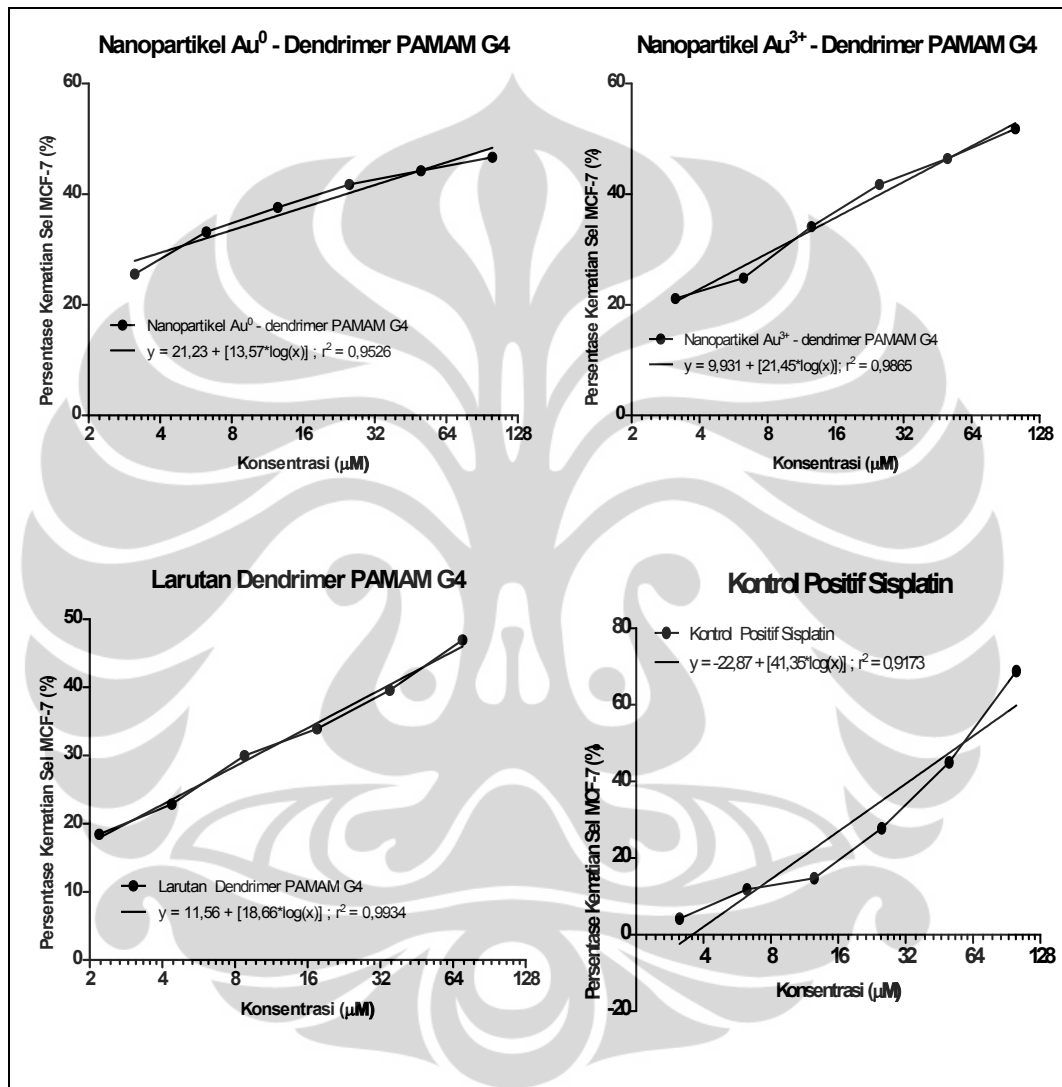


Gambar 4.6. Mikroskopis sel MCF-7 pada pemberian 50 μM (a) nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4, (b) nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4, (c) kontrol positif sisplatin dan 35,5 μM (d) dendrimer PAMAM G4

4.8 Hasil IC_{50}

Nilai IC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan sel hingga 50%. Suatu senyawa dianggap memiliki aktivitas sitotoksik jika memiliki nilai $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{M}$ (Rubbiani, et al., 2010).

Nilai IC_{50} larutan uji ditentukan berdasarkan persamaan dari kurva hubungan konsentrasi larutan uji dengan persentase kematian sel MCF-7. Sel yang tidak diberi perlakuan pemberian larutan uji merupakan kontrol negatif yang menunjukkan tidak adanya kematian akibat perlakuan.



Gambar 4.7. Kurva hubungan persentase kematian sel MCF-7 dengan konsentrasi berbagai larutan uji

Nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4, nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4, larutan dendrimer PAMAM G4 dan sisplatin secara berurut memiliki nilai IC_{50} 131,86 μM , 73,79 μM , 114,82 μM dan 57,84 μM . Data tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 dan larutan dendrimer PAMAM G4 tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel

MCF-7. Pengujian toksisitas dendrimer PAMAM G4 sebelumnya telah dilakukan oleh Bielawski (2011) terhadap sel kanker payudara MDA-MB 231. Hasil penelitian tersebut juga menyatakan bahwa dendrimer PAMAM G4 tidak memberikan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker MDA-MB 231.

Nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 dan kontrol positif sisplatin memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 sehingga dapat disimpulkan bahwa nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 berpotensi menjadi senyawa antikanker. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan kovalen koordinasi yang terbentuk antara ion Au³⁺ dan dendrimer PAMAM G4 mampu mempertahankan bilangan oksidasi ion Au³⁺.

4.9 Analisis Persentase Kematian Sel MCF-7

Data persentase kematian sel MCF-7 dianalisis secara statistik untuk melihat perbedaan bermakna antar perlakuan pemberian larutan uji. Pemilihan uji statistik dilakukan berdasarkan hasil uji homogenitas dan distribusi normal data. Data yang memenuhi syarat homogenitas dan terdistribusi normal dianalisa dengan uji komparatif menggunakan metode analisis varian (ANOVA). Jika kedua syarat tersebut tidak terpenuhi, maka uji komparatif dilakukan menggunakan metode Kruskal-wallis (Dahlan, 2011).

Uji distribusi normal yang digunakan untuk sampel yang berjumlah kecil (kurang dari 50) yaitu uji Shapiro-wilk (Dahlan, 2011). Nilai P yang diperoleh berdasarkan hasil uji Shapiro-wilk terhadap data persentase kematian sel MCF-7 menunjukkan bahwa data telah terdistribusi normal (lampiran 40).

Uji homogenitas dengan metode Levene terhadap data persentase kematian sel MCF-7 menunjukkan bahwa varian data tidak homogen (lampiran 41). Selanjutnya, data persentase kematian sel MCF-7 ditransformasi berdasarkan nilai *power estimation* dari uji Levene dan diuji kembali homogenitasnya. Nilai P berdasarkan hasil uji homogenitas Levene terhadap transformasi data persentase kematian sel MCF-7 $< 0,05$ sehingga data tetap dinyatakan tidak homogen (lampiran 42).

Karena syarat uji ANOVA tidak terpenuhi, maka uji komparatif data persentase kematian sel MCF-7 antar perlakuan dilakukan dengan metode

Kruskal-wallis. Nilai P berdasarkan hasil uji Kruskal-wallis menyatakan bahwa data persentase kematian sel MCF-7 tidak berbeda secara statistik (lampiran 43).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Pembuatan nanopartikel emas dengan dendrimer poliamidoamin (PAMAM) generasi 4 sebagai sistem pembawa menghasilkan nanopartikel yang stabil melalui analisa spektrum serapan dan ukuran partikel. Dendrimer PAMAM generasi 4 dapat membentuk nanopartikel emas dengan ukuran 2-30 nm.
- b. Nilai IC_{50} nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4 valensi +3 dan 0 serta dendrimer PAMAM G4 berturut-turut adalah 73,79; 131,86 dan 114,82 μM menunjukkan bahwa nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM bersifat sitotoksik sedangkan nanopartikel dendrimer PAMAM G4 dan Au⁰-dendrimer PAMAM G4 tidak bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7.
- c. Dendrimer PAMAM G4 merupakan sistem pembawa nanopartikel dengan toksisitas yang sangat rendah, nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 berpotensi sebagai agen antikanker dan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 tidak bersifat sitotoksik sehingga dapat dikembangkan untuk diagnosis kanker.

5.2 Saran

- a. Penentuan spektrum serapan Au⁰ dilakukan secara kuantitatif untuk menentukan stabilitas nanopartikel.
- b. Perlu dilakukan purifikasi larutan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 agar toksisitas yang dihasilkan tidak disebabkan hasil reaksi samping saat pembuatan nanopartikel sehingga nilai IC_{50} yang diperoleh lebih akurat.
- c. Pengujian sitotoksitas dilakukan dengan jumlah replikasi yang lebih banyak, sehingga sampel untuk analisis statistik data persentase kematian sel MCF-7 akibat berbagai perlakuan variasi uji lebih merepresentasikan keadaan sebenarnya.

DAFTAR ACUAN

- Aillon, K.L., Yumei Xie, El-Gendy, N., Berkland, C., dan Forrest, M.L. (2009). Effects of Nanomaterial Physicochemical Properties on *In Vivo* Toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 457-466.
- Alanazi, F.K., Radwan, A.A., dan Alsarra, I.A. (2010). Biopharmaceutical Application of Nanogold. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, 179-193.
- Alderden, R.A., Hall, M.D, dan Hambley, T.W. (2006). The discovery and development of cisplatin. *J Chem Ed*, 83, 728–734.
- Alessio, Enzo. (2011). *Bioinorganic Medicinal Chemistry*. Germany : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- ATCC. (2009). *Product Information Sheet for ATCC[®] HTB-22TM*. 5 Juni, 2012. <http://www.atcc.org/attachments/17392.pdf>
- Barbalace, K. (1995-2012). *Periodic Table of Elements – Gold – Au*. EnviromentalChemistry.com. 15 Juni, 2012. <http://EnviromentalChemistry.com/yogi/periodic/Au.html>
- Bharali, D.J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T.M. dan Mousa, S.A. (2009). Nanoparticles and Cancer Therapy : A Concise Review With Emphasis on Dendrimers. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 1-7.
- Bielawski, K., Bielawska, A., Myszyńska, A., Popławska, B., dan Czarnomysy, R. (2011). Cytotoxic Activity of G3 PAMAM-NH₂ Dendrimer-Chlorambucil Conjugate in Human Breast Cancer Cells. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*, 31, 364-372.
- Caminade, Anne-marie, Turrin, C.O., Laurent, R., Ouali, A., dan Delavaux-nicot, B. (2011). *Dendrimers : Towards Catalytic, Material, adn Biomedical Uses*. United Kingdom : John Wiley & Sons, Ltd.
- CCRC Fakultas Farmasi UGM. *Protokol In Vitro*. 2 Februari, 2012. <http://www.crc.farmasi.ugm.ac.id/>
- Cooper, G.M., dan Hausman, R.E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach*. Fourth Edition. Washington : Sinauer Associates, Inc.
- Crooks, R.M., Mingqi Zhao, Li Sun, Victor Chechik dan Lee K. Yeung. (2001). Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles : Synthesis, Characterization and Application to Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, 34, 181-190.
- Dahlan, M. Sopiudin. (2011). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan* Ed. 5. Jakarta : Salemba Medika.

- Diallo, M.S., Arasho, W., Johnson, J.H., dan Goddard, W.A., III. (2008). Dendritic Chelating Agents. 2. U(VI) Binding to Poly(amidoamine) and Poly(propyleneimine) Dendrimers in Aqueous Solutions. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 1572-1579.
- Esumi, K., Suzuki, A., Yamahira, A. dan Torigoe, K. (2000). Role of Poly(amidoamine) Dendrimers for Preparing Nanoparticles of Gold, Platinum and Silver. *Langmuir*, 16, 2604-2608.
- Esumi, K., Hayakawa, K., dan Yoshimura, T. (2003). Morphological Change of Gold-dendrimer Nanocomposites by Laser Irradiation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 268, 501-506.
- Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. (2007). Jakarta : Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Farrel, Nicholas P. (1999). *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.
- Ronconi, L., Aldinucci, D., Q. Ping Dou dan Fregone, D. (2010). Latest Insight into the Anticancer Activity of Gold(III)-Dithiocarbamate Complexes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 283-292.
- Freshney, R. Ian. (2007). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th Ed. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc.
- Hejmadi, Momna. (2009). *Introduction to Cancer Biology*. Momna Hejmadi & Ventus Publishing.
- Hoffman, Lee W., Andersson, G.G., Sharma, A., Clarke, S.R. dan Voelcker, N.H. (2011). New Insight into the Structure of PAMAM Dendrimer/Gold Nanoparticle Nanocomposites. *Langmuir*, 27, 6759-6767.
- Isab, Anvarhusein A., et al. (2011). Synthesis, Characterization and Anti Proliferative Effect of $[\text{Au}(\text{en})_2]\text{Cl}_3$ and $[\text{Au}(\text{N-propyl-en})_2]\text{Cl}_3$ on Human Cell Cancer Lines. *Spectrochimica Acta Part A*, 79, 1196-1201.
- Jagannathan, Vidhya, dan Marc Robinson-Rechavi. (2011) Meta-analysis of Estrogen Response in MCF-7 Distinguishes Early Target Genes Involved in Signaling and Cell Proliferation from Later Target Genes Involved in Cell Cycle and DNA Repair. *BMC System Biology*, 5, 138.
- Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., dan Jain, N.K. (2010). Dendrimer Toxicity : Let's Meet the Challenge. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 394, 122-142.
- Yong-Gu, Kim Sang-Keun Oh dan Crooks, R.M. (2004). Preparation and Characterization of 1-2 nm Dendrimer-Encapsulated Gold Nanoparticles Having Very Narrow Size Distributions. *Chem. Mater.*, 16, 167-172.
- Levenson, Anait S., dan V. Craig Jordan. (1997). MCF-7: The first Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*, 57, 3071-3078

- Menjoge, A.R., Kannan, R.M. dan Tomalia, D.A. (2010). Dendrimer-based Drug and Imaging Conjugates : Design Considerations for Nanomedical Applications. *Drug Discovery Today*, 15, 171-185.
- Messori, Luigi, et. al. (2000). Gold(III) Complexes as Potential Antitumor Agents : Solution Chemistry and Cytotoxic Properties of Some Selected Gold(III) Compounds. *J. Med. Chem*, 43, 3541-3548.
- Milacic, V., Di Chen, Ronconi, L., Landis-Piwowar, K.R., Fregona, D., dan Q. Ping Dou. (2006). A Novel Anticancer Gold(III) Dithiocarbamate Inhibits the Activity of a Purified 20S Proteasome and 26S Proteasome in Human Breast Cancer Cell Cultures and Xenografts. *Cancer Res*, 66 (21), 10478-10486.
- Minor, Lisa K. (2006). *Handbook of Assay Development in Drug Delivery*. Boca Raton : Taylor & Francis Group, LLC.
- Mirabelli, C.K., Johnson, R.K., Chiu Mei Sung, Faucette, L., Muirhead, K., dan Crooke, Stanley K. (1985). Evaluation of the *in Vivo* Antitumor Activity and *in Vitro* Cytotoxic Properties of Auranofin, a Coordinated Gold Compound, in Murine Tumor Models. *Cancer Research*, 45, 32-39.
- Mohanraj, VJ dan Y. Chen. (2006). Nanoparticles-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573.
- Mukherjee, Priyabrata, et al. (2005). Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles. *Clinical Cancer Research*, 11, 3530-3534.
- Nanjwade, B.K., Bechra, H.M., Derkar, G.K., Manvi, F.V., dan Nanjwade, V.K. (2009). Dendrimers : Emerging polymers for drug-delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, 185-196.
- O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P., Johnson, S.W. (1999). *Clinical status of cisplatin, carboplatin and other platinum-based antitumor drugs*. In: Lippert, B. (Ed.), *Cisplatin. chemistry and biochemistry of leading anticancer drug*. Zürich : Wiley-VCH.
- Pal, D., dan Nayak, A.K. (2010). Nanotechnology for Targeted Delivery in Cancer Therapeutics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1, 1-7.
- Pande, S., dan Crooks, R.M. (2011). Analysis of Poly(amidoamine) Dendrimer Structure by UV-Vis Spectroscopy. *Langmuir*, 27, 9609-9613.
- Parish, R.V., Howe, B.P., Wright, J.P., Marck, J., dan Pritchard, R.G. (1996). Chemical and Biological Studies of Dichloro(2-((dimethylamino)methyl)phenyl)gold(III). *Inorg. Chem*, 35, 1659-1666.
- Patra, C.N., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., dan Mukherjee, P. (2010). Fabrication of Gold Nanoparticles for Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 346-361.

- Promega (2009, Mei). *Cell Titer 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Protocol*. 4 Mei, 2012. <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/CellTiter%2096%20AQueous%20Non-Radioactive%20Cell%20Proliferation%20systems%20protocol.pdf>
- Ronconi, Luca, et. al. (2005). Gold Dithiocarbamate Derivatives as Potential Antineoplastic Agents : Design, Spectroscopic Properties, and in Vitro Antitumor Activity. *Inorg. Chem*, 44, 1867-1881.
- Ronconi, Luca, et. al. (2006). Gold(III) Dithiocarbamate Derivatives for the Treatment of Cancer : Solution Chemistry, DNA Binding and Hemolytic Properties. *J. Med. Chem*, 49, 1648-1657.
- Rosenberg, B. (1985). Fundamental Studies with Cisplatin. *Cancer*, 55, 2303-2316.
- Rubbiani, R., et al. (2010). Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties. *J. Med. Chem*, 53, 8608-8618.
- Sau Har Lee, Jaganath, I.B., Seok, M.W., dan Sekaran, S.D. (2011). Antimetastatic Effects of. Antimetastatic Effects of *Phyllanthus* on Human Lung (A549) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines. *PloS ONE*, 6 (6), e20994
- Shaw III, Frank. (1999). Gold-Based Therapeutic Agents. *Chem. Rev*, 99, 2589-2600.
- Subakir, Sri B. (2006). *Lokakarya Kultur Jaringan. Laboratorium Sitogenetik dan Kultur Jaringan*. Jakarta : Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Svenson, S., dan Tomalia, D.A. (2005). Dendrimers in Biomedical Application- Reflections on the Field. *Adv. Drug Delivery*, 57, 2106-2129.
- Tekade, RK., Kumar, P.V., dan Jain, N.K. (2009). Dendrimers in Oncology : An Expanding Horizon. *Chem. Rev*, 109, 49-87.
- Thakor, A.S, J. Jokerst, C. Zavaleta, T.F. Massoud, dan S.S Gambhir. (2011). Gold Nanoparticles : A Revival in Precious Metal Administration to Patients. *Nano Letters*, 11, 4029-4036.
- Tim Workshop Teknologi Farmasi dan Medika. (2010). *Modul Workshop Teknik-teknik Dasar Kultur Sel & Limfosit Mamalia*. Tangerang : Lab Teknologi Farmasi dan Medika. Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi.
- Torigoe, K., Suzuki, A., dan Esumi, K. (2001). PAMAM Interaction and Formation of Au-PAMAM Nanocomposites in Ethyl Acetate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 241, 346-356.

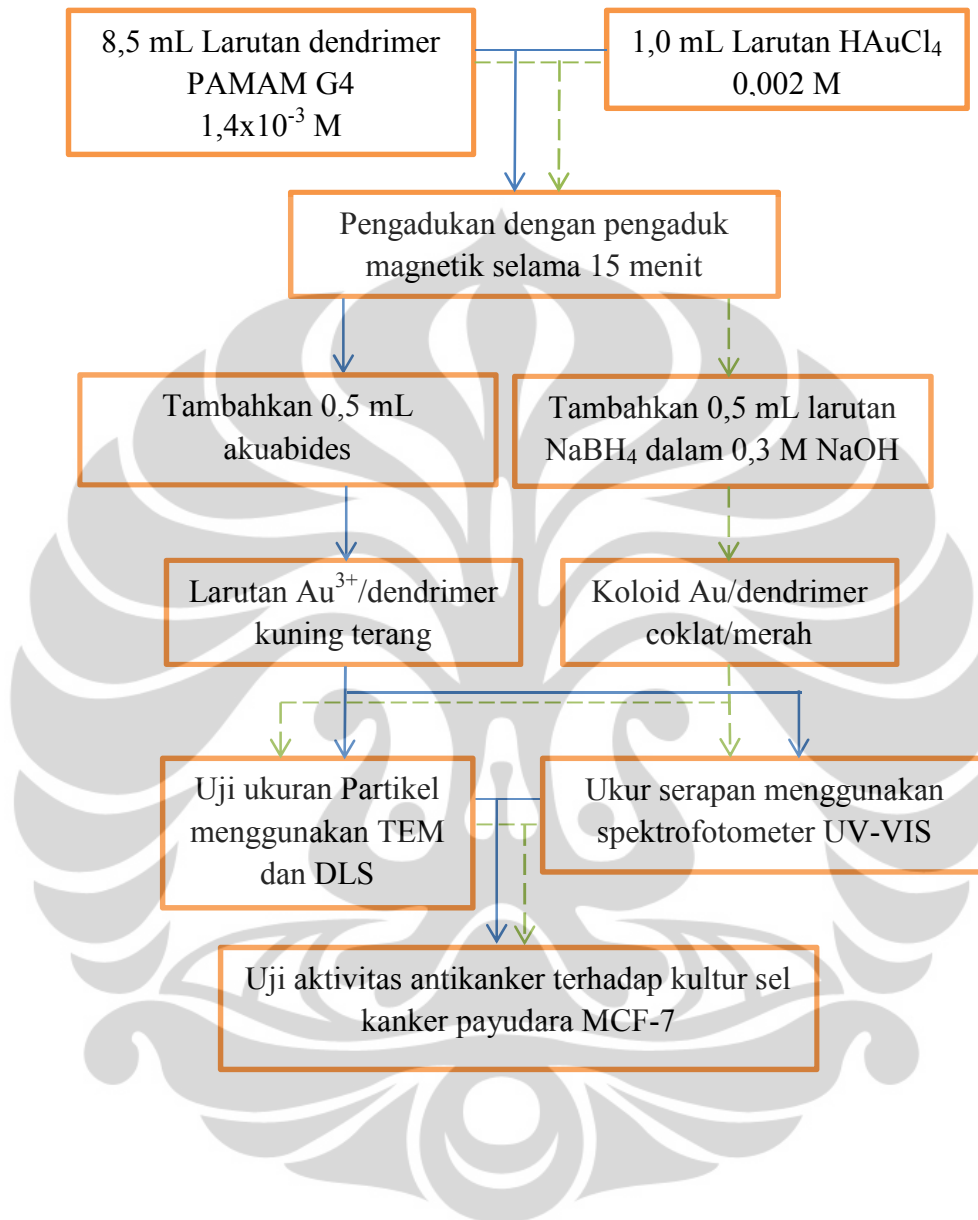
- Wei Chen, Donald, A.T., dan Thomas, J.L. (2000). Unusual pH-Dependent Polarity Changes in PAMAM Dendrimers: Evidence for pH-Responsive Conformational Changes. *Macromolecules*, 33, 9169-9172.
- Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., dan Arbuthnot, P. (2002) Differential Modulation by Estradiol of P-glycoprotein Drug Resistance Protein Expression in Cultured MCF7 and T47D Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.*, 22 (4), 2253-9.
- Zhijuan, Zhang et. al. (2010). Investigation the Effects of Nano Golds on the Fluorescence Properties of the Sectorial Poly(amidoamine) (PAMAM) Dendrimers. *Applied Surface Science*, 256, 7194-7199.





LAMPIRAN

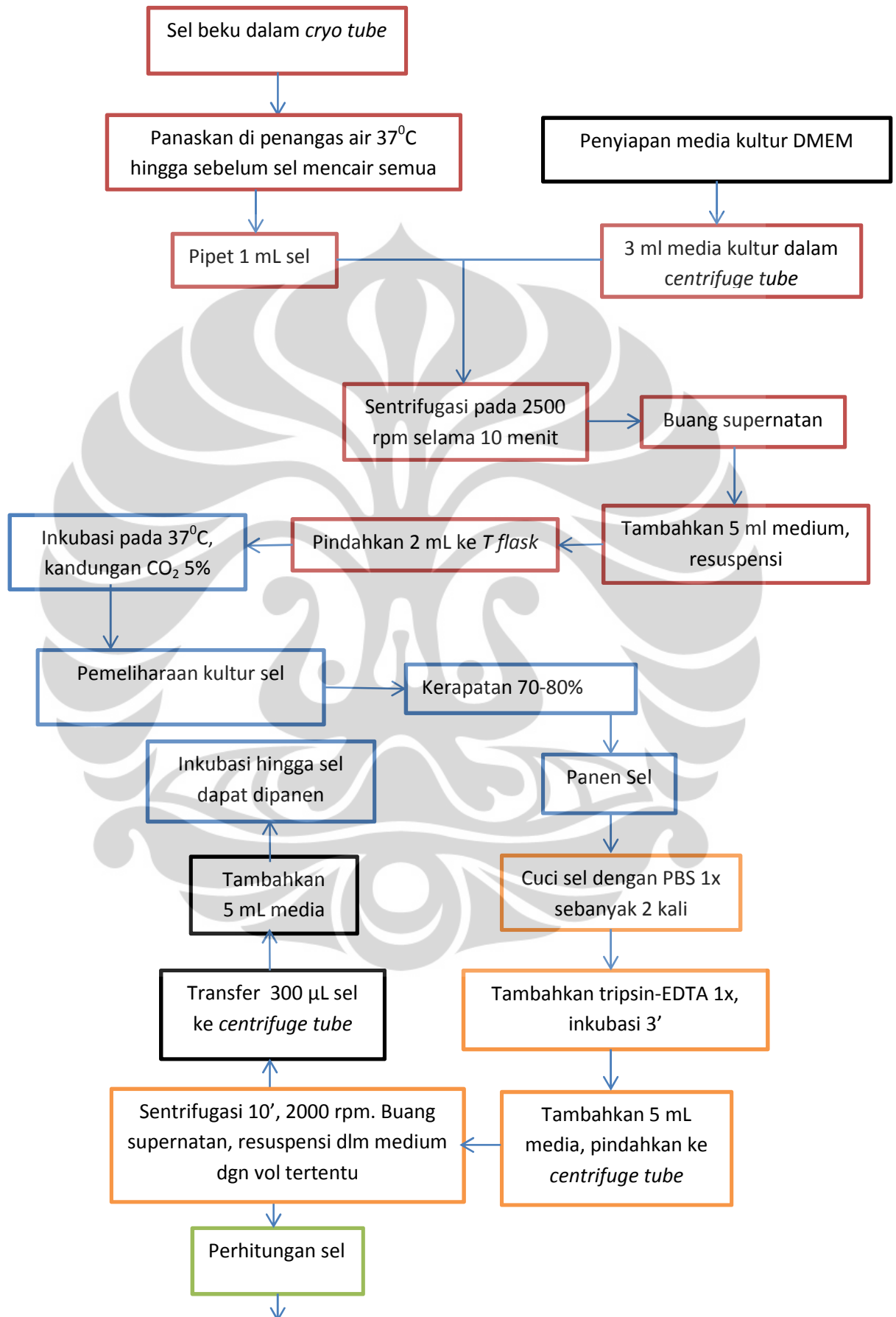
Lampiran 1. Bagan kerja penelitian



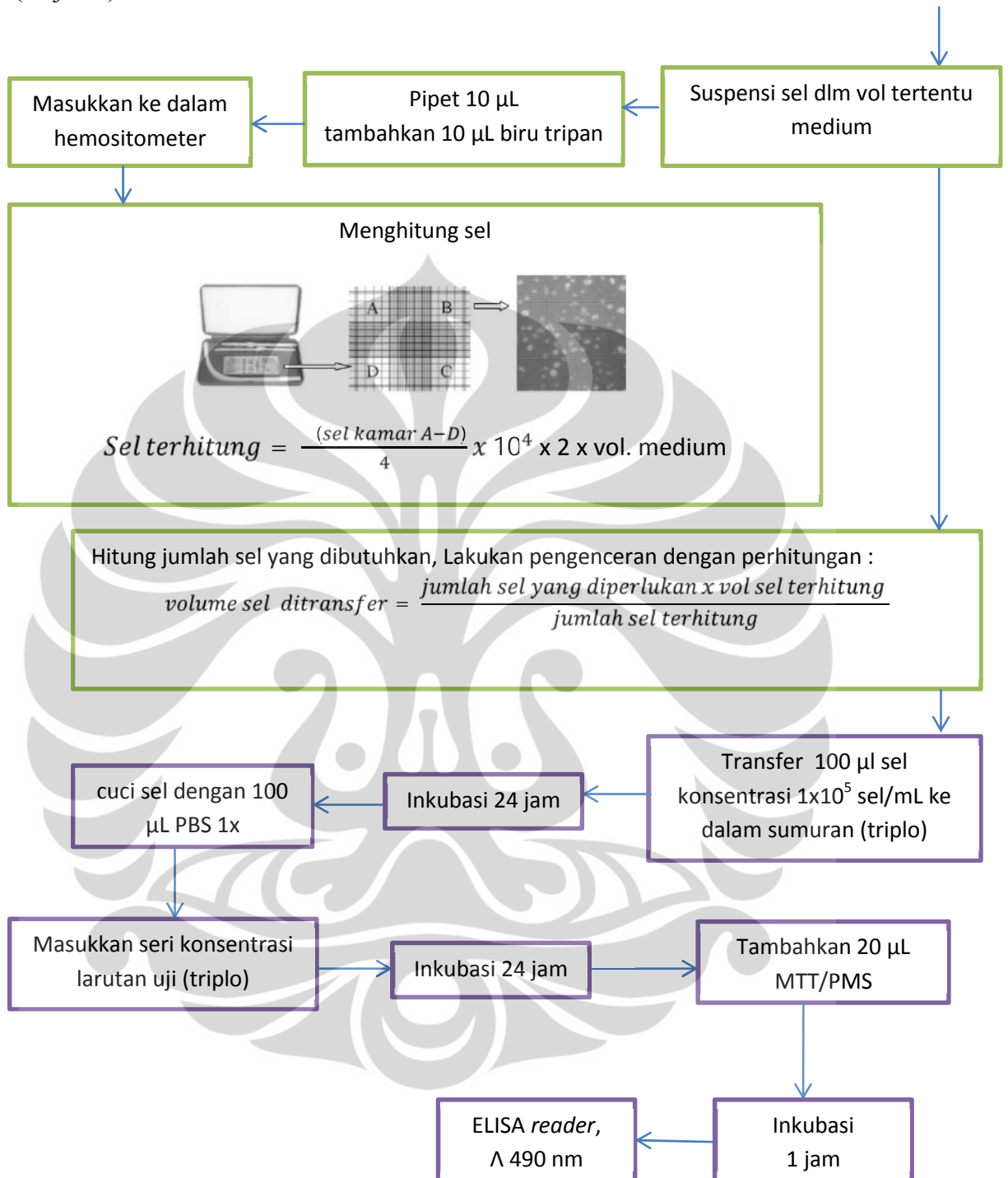
Keterangan :

- Larutan Nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4
- - - Koloid Nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4

Lampiran 2. Penyiapan dan uji sitotoksitas terhadap sel kanker MCF-7



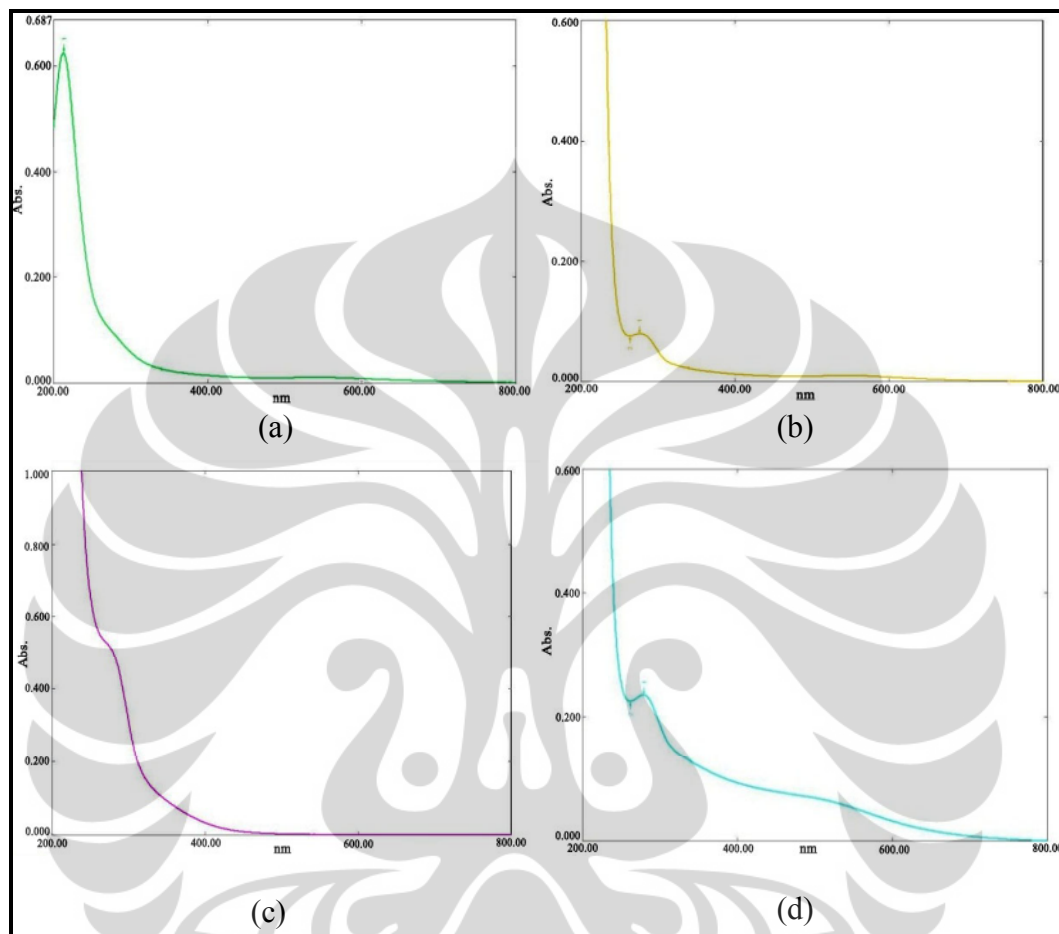
(lanjutan)



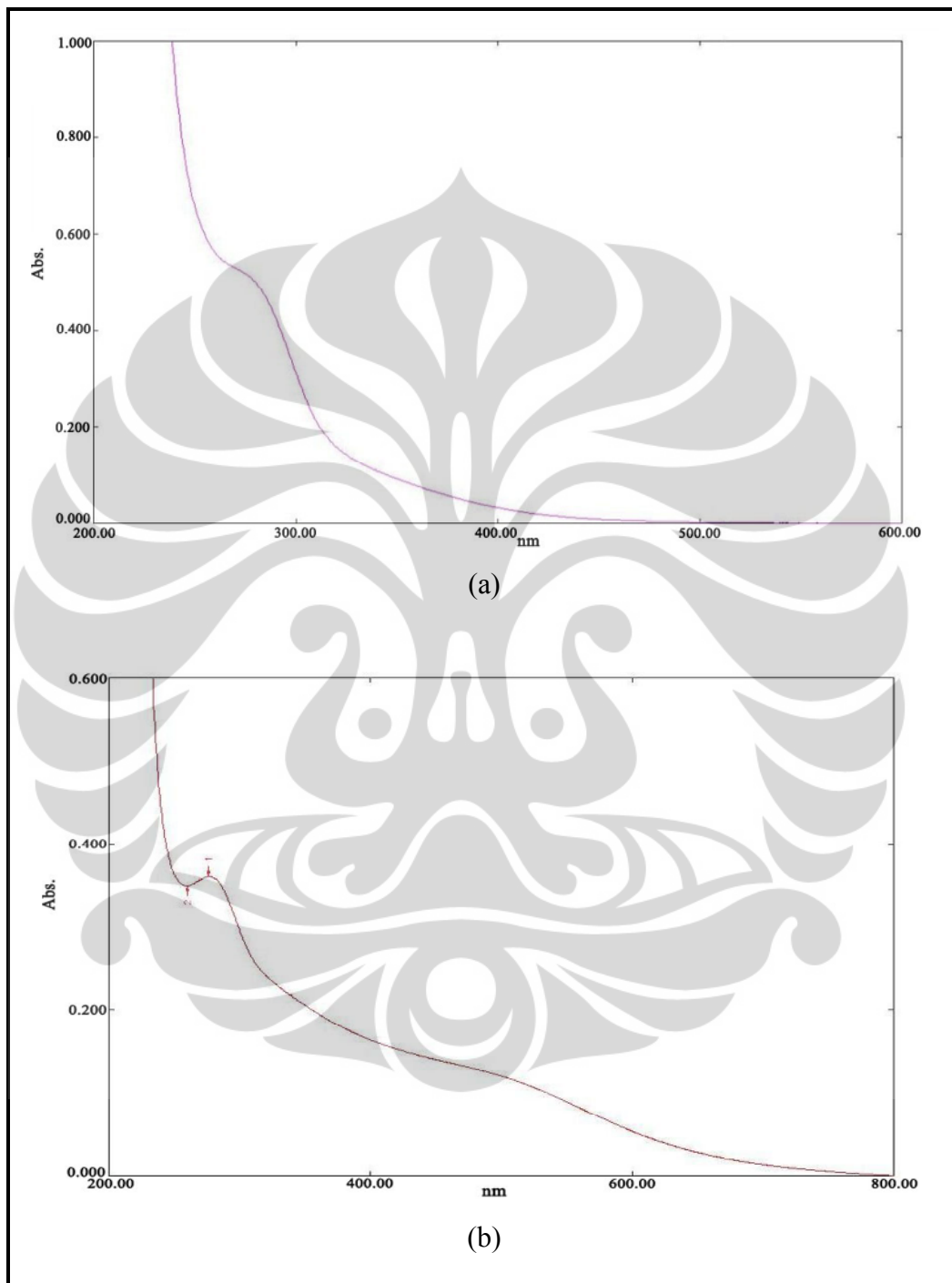
Lampiran 3. Foto larutan (a) nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4, (b) nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 (c) dendrimer PAMAM G4 dan (d) kontrol positif sisplatin



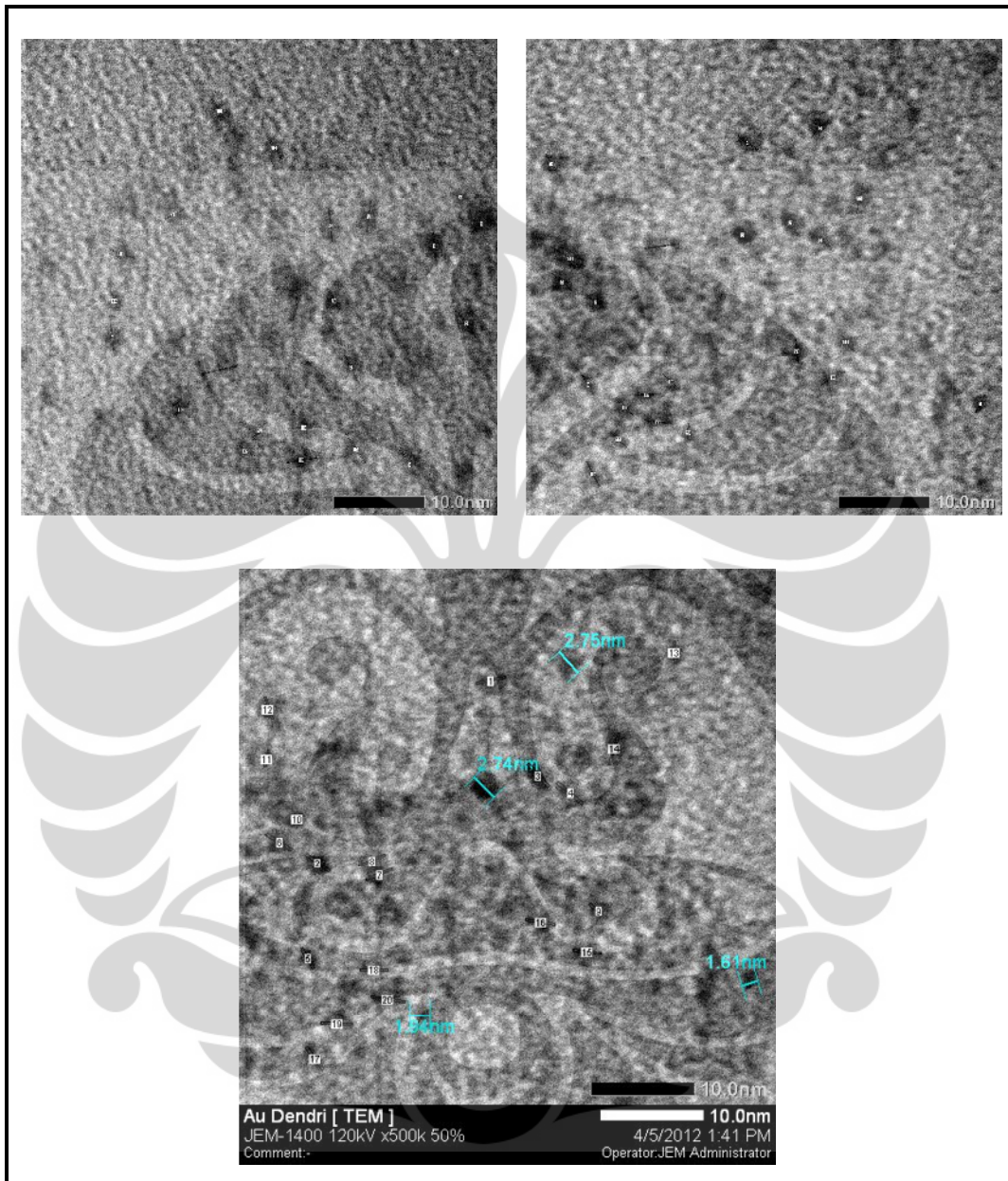
Lampiran 4. Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) HAuCl_4 (b) dendrimer PAMAM G4 (c) Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 dan (d) Au^0 -dendrimer PAMAM G4



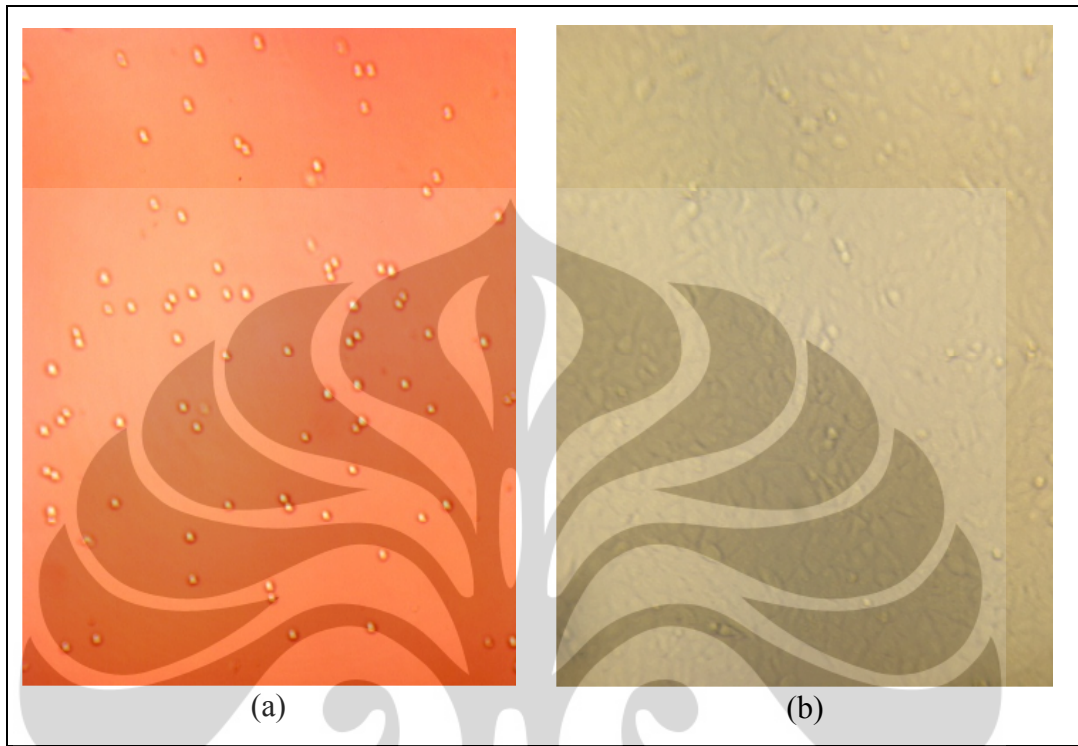
Lampiran 5. Kurva spektrum serapan UV-Vis (a) Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 (b) Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 6 minggu



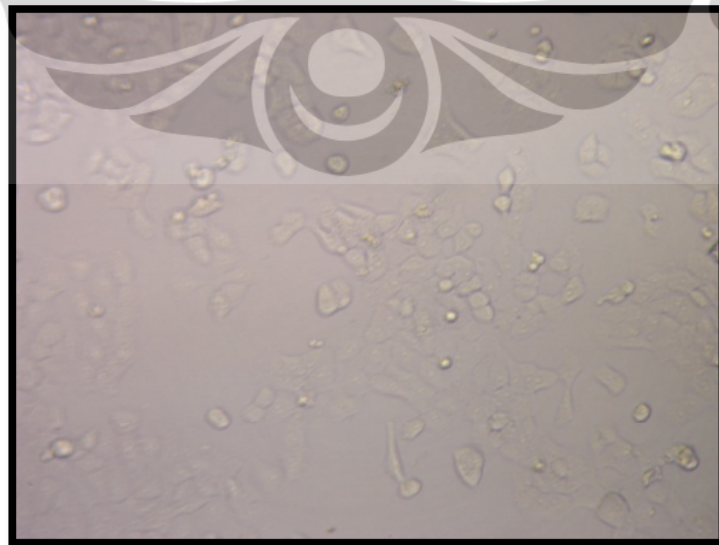
Lampiran 6. Hasil analisa nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM)



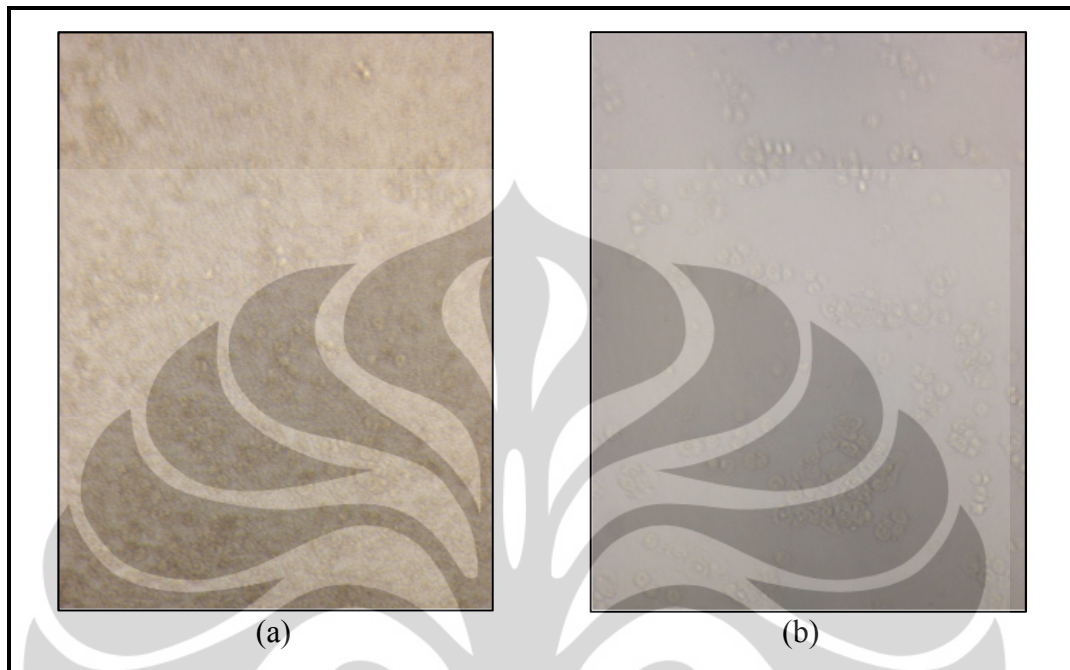
Lampiran 7. Mikroskopis sel MCF-7 sesaat setelah proses pencairan sel beku dan belum melekat pada dasar labu kultur (a) serta setelah inkubasi 4 hari dan mencapai kerapatan 80-90% (b)



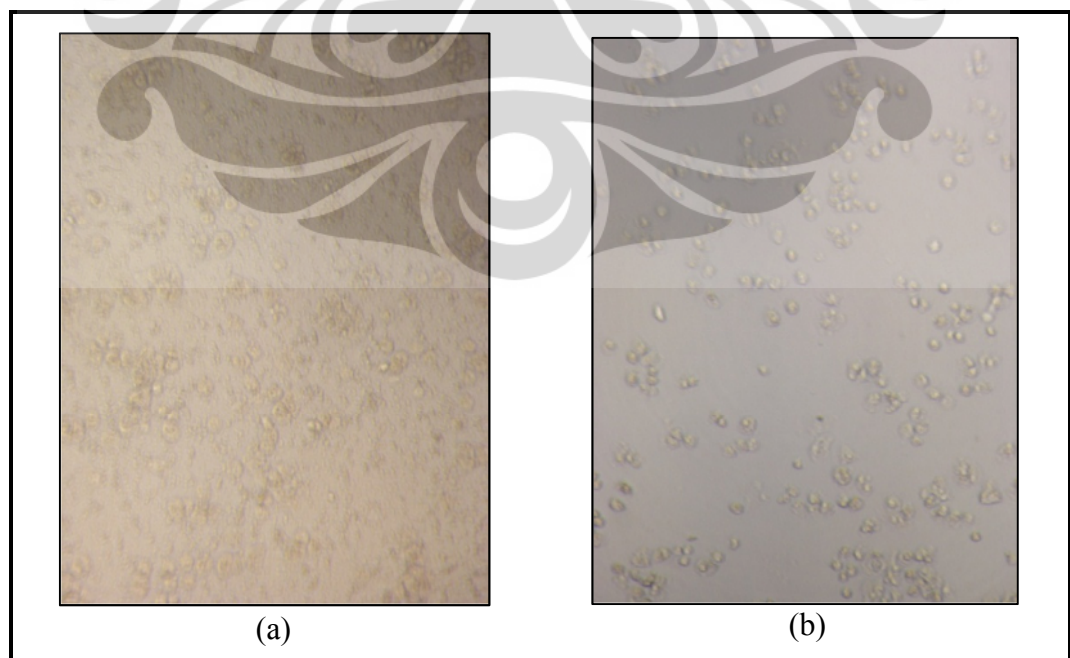
Lampiran 8. Mikroskopis sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam sebagai kontrol negatif



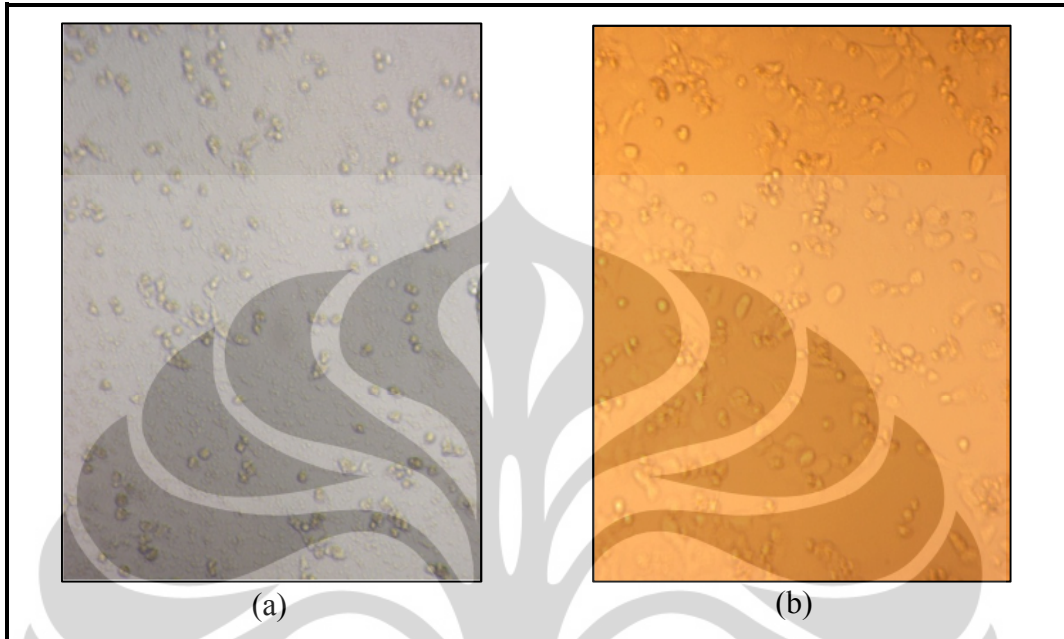
Lampiran 9. Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 μ M dan (b) 3,125 μ M



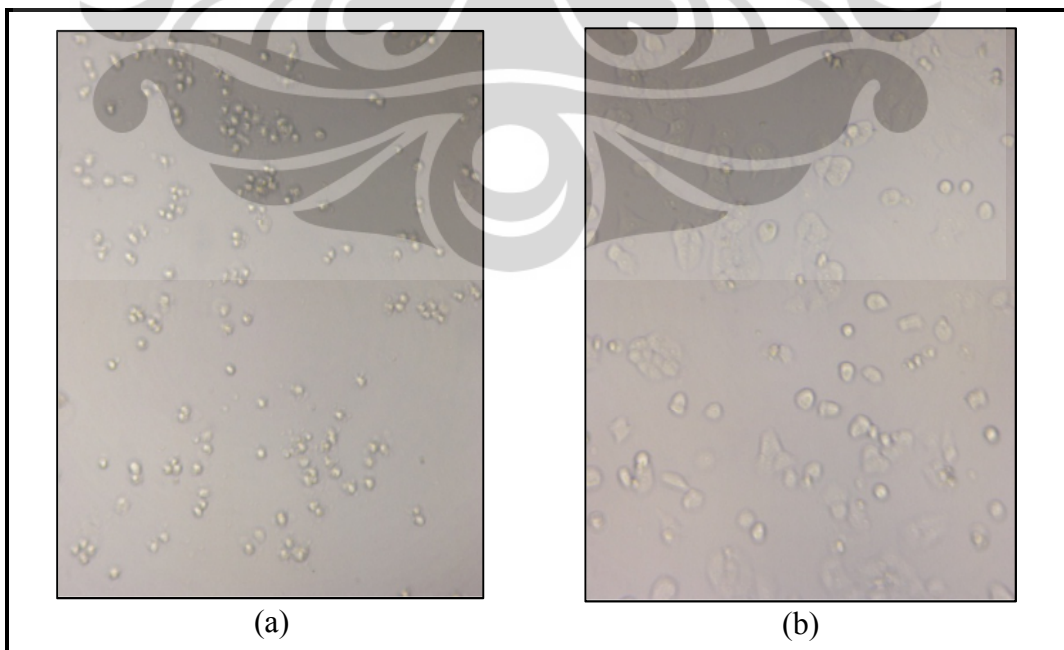
Lampiran 10. Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 μ M dan (b) 3,125 μ M



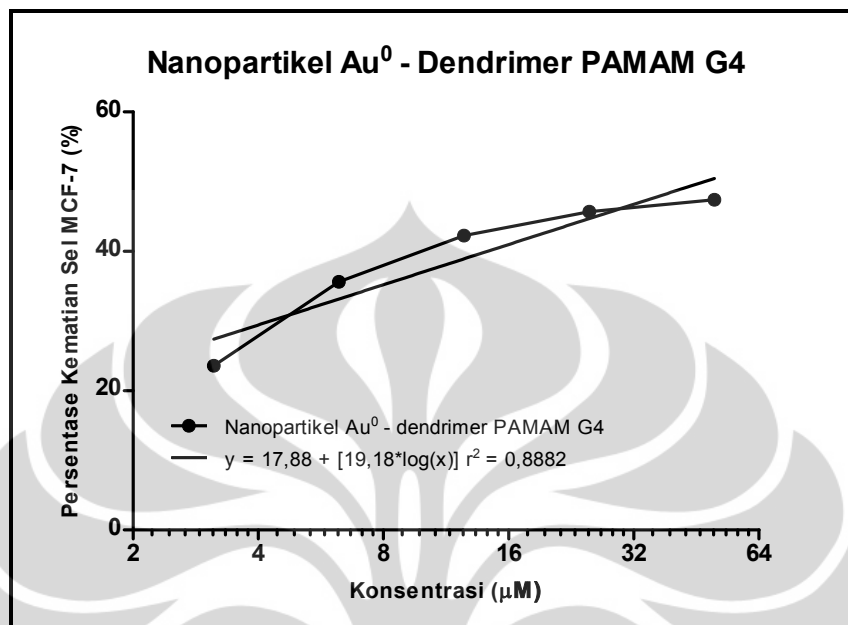
Lampiran 11. Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan dendrimer PAMAM G4 selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 μM dan (b) 3,125 μM



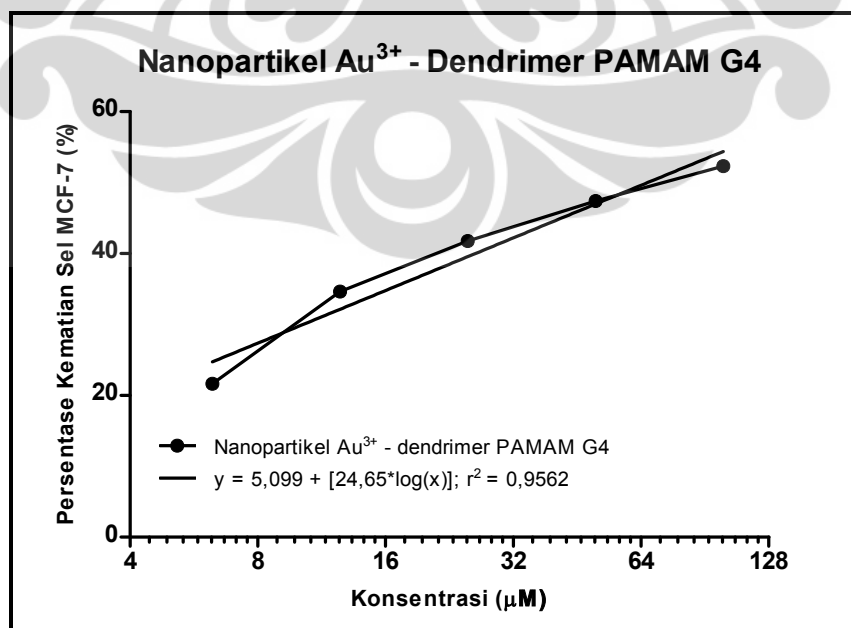
Lampiran 12. Mikroskopis sel MCF-7 setelah pemaparan kontrol positif cisplatin selama 24 jam pada konsentrasi (a) 100 μM dan (b) 3,125 μM



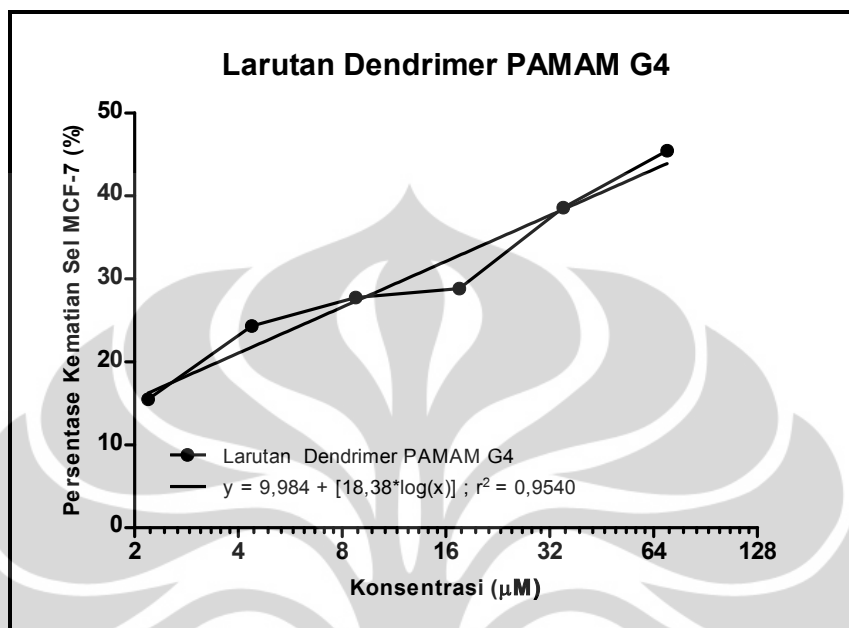
Lampiran 13. Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO₂ 95%



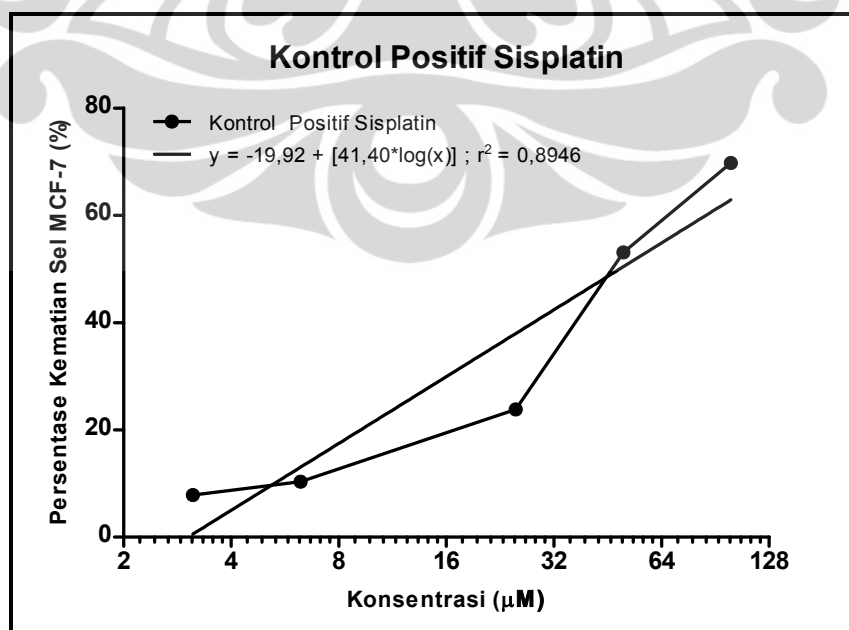
Lampiran 14. Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO₂ 95%



Lampiran 15. Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO₂ 95%



Lampiran 16. Grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 dari kontrol positif sisplatin setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C dan kandungan atmosfer CO₂ 95%



Lampiran 17. Penentuan ukuran partikel nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 dari *Transmission Electron Microscope* (TEM) sebelum masa penyimpanan menggunakan program *Image J Analysis*

No.	Diameter (nm)	No.	Diameter (nm)	No.	Diameter (nm)
1.	2.929	23.	1.940	45.	2.323
2.	2.860	24.	3.043	46.	3.128
3.	3.065	25.	3.360	47.	2.970
4.	3.207	26.	3.367	48.	2.711
5.	2.145	27.	2.443	49.	2.450
6.	2.901	28.	3.372	50.	2.470
7.	2.721	29.	3.446	51.	2.699
8.	2.731	30.	3.200	52.	2.540
9.	2.209	31.	3.395	53.	2.851
10.	1.677	32.	2.719	54.	3.086
11.	1.678	33.	1.996	55.	2.400
12.	2.313	34.	3.213	56.	2.574
13.	2.150	35.	2.986	57.	3.571
14.	3.239	36.	3.424	58.	2.379
15.	2.811	37.	2.108	59.	3.476
16.	2.944	38.	2.963	60.	2.626
17.	2.732	39.	2.598	61.	3.113
18.	2.737	40.	2.207	62.	2.815
19.	3.044	41.	3.471	63.	2.365
20.	3.291	42.	3.277	64.	2.171
21.	2.750	43.	3.011	65.	2.620
22.	2.740	44.	2.282	66.	3.067

Lampiran 18. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam

Konsentrasi (μM)	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
100,000	0,217	0,219	46,68	46,19*
50,000	0,227	0,214	44,23	47,42
25,000	0,237	0,221	41,77	45,70
12,500	0,254	0,235	37,59	42,26
6,250	0,272	0,262	33,17	35,63
3,125	0,303	0,311	25,55	23,59
0,000	0,407	0,407	0,00	0,00

* data tidak digunakan

Lampiran 19. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam

Konsentrasi (μM)	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
100,000	0,196	0,194	51,84	52,33
50,000	0,218	0,214	46,44	47,42
25,000	0,237	0,237	41,77	41,77
12,500	0,268	0,266	34,15	34,64
6,250	0,306	0,319	24,82	21,62
3,125	0,321	0,295	21,13	27,52*
0,000	0,407	0,407	0,00	0,00

*data tidak digunakan

Lampiran 20. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan dendrimer PAMAM G4 setelah inkubasi 24 jam

Konsentrasi (μM)	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
100,000	0,222	0,216	45,45	46,93
50,000	0,250	0,246	38,57	39,56
25,000	0,249	0,269	38,82	33,91
12,500	0,294	0,285	27,76	29,98
6,250	0,308	0,314	24,32	22,85
3,125	0,344	0,332	15,48	18,43
0,000	0,407	0,407	0,00	0,00

Lampiran 21. Serapan dan persentase kematian (permati) sel MCF-7 dari larutan kontrol positif sisplatin setelah inkubasi 24 jam

Konsentrasi (μM)	Serapan 1	Serapan 2	Permati 1	Permati 2
100,000	0,129	0,123	68,80	69,78
50,000	0,224	0,191	44,96	53,07
25,000	0,294	0,310	27,76	23,83
12,500	0,347	0,410	14,74	-0,74*
6,250	0,359	0,365	11,79	10,32
3,125	0,390	0,375	4,18	7,86
0,000	0,407	0,407	0,00	0,00

* data tidak digunakan

Lampiran 22. Nilai IC_{50} (μM) larutan uji yang diperoleh melalui persamaan dari grafik hubungan konsentrasi dengan persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam

Larutan Uji	Nilai IC_{50} (μM)
Au^0 -dendrimer PAMAM G4	131,86*
	47,28
Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4	73,79*
	66,30
Dendrimer PAMAM G4	150,36
	114,82*
Sisplatin	57,84*
	48,85

* Nilai IC_{50} terpilih berdasarkan linearitas terbaik dari regresi kurva kubungan antara persentase kematian sel MCF-7 dengan konsentrasi larutan uji

Lampiran 23. Perhitungan pengenceran bahan untuk pembuatan nanopartikel Au–dendrimer PAMAM G4

1. Perhitungan Mol

$$M \text{ HAuCl}_4 = 2 \text{ mmol/l} = 0,002 \text{ M}$$

$$\text{Au} : \text{Dendrimer} = 1 : 0,7$$

$$M \text{ dendrimer PAMAM} = \frac{0,7}{1} \times 0,002 \text{ M} = 0,0014 \text{ M}$$

$$M \text{ NaBH}_4 = 20 \text{ mmol/l} = 0,02 \text{ M}$$

2. Perhitungan Pembuatan Larutan HAuCl₄ (0,002 M)

$$\text{BM HAuCl}_4 = 339,79 \text{ g/mol}$$

$$M = 0,002 \text{ M}$$

$$v = 1,0 \text{ ml}$$

$$n = M \times v$$

$$= 0,002 \text{ M} \times 1,0 \text{ ml}$$

$$= 0,002 \text{ mmol}$$

$$\text{Larutan Induk } 30 \% \text{ b/b ; } m_{\text{total}} = 10 \text{ g; } v = 6,1 \text{ ml}$$

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

$$M = \frac{3 \text{ g} / 339,79 \text{ g/mol}}{6,1 \text{ ml}}$$

$$M = 1,445 \text{ M}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1,445 \text{ M} \times V_1 = 0,002 \text{ M} \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,1383 \text{ ml}$$

3. Perhitungan Pembuatan Larutan Dendrimer PAMAM G4 (0,0014 M)

$$\text{BM dendrimer PAMAM G4 (etilendiamin core)} = 14214,17 \text{ g/mol}$$

$$n \text{ Au} : n \text{ PAMAM G4} = 1,34 : 1$$

$$n \text{ PAMAM} = \frac{1}{1,34} \times 0,002 \text{ mmol}$$

$$= 0,0014 \text{ mmol}$$

(lanjutan)

$$v \text{ PAMAM} = 8,5 \text{ ml}$$

$$M \text{ PAMAM} = \frac{0,0014 \text{ mmol}}{8,5 \text{ ml}}$$

$$= 0,00016 \text{ M}$$

Larutan induk 10% b/b; $m_{\text{total}} = 2,5 \text{ g}$; $v = 3,075 \text{ ml}$

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

$$M = \frac{0,25 \text{ g} / 14214,17 \text{ g/mol}}{3,075 \text{ ml}}$$

$$M = 0,0057 \text{ M}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$0,0057 \text{ M} \times V_1 = 0,00016 \text{ M} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,288 \text{ ml}$$

3. Larutan NaBH₄ (0,02 M)

$$\text{BM NaBH}_4 = 37,83 \text{ g/mol}$$

$$M = 0,02 \text{ M}$$

$$v = 0,5 \text{ ml}$$

Larutan induk 12% b/b; $v_{\text{total}} = 25 \text{ ml}$; $m_{\text{total}} = 34,375 \text{ g}$

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

$$M = \frac{4,125 \text{ g} / 37,83 \text{ g/mol}}{25 \text{ ml}}$$

$$M = 4,3616 \text{ M}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$4,3616 \text{ M} \times V_1 = 0,02 \text{ M} \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,458 \text{ ml}$$

Lampiran 24. Analisis deskriptif nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 sebelum masa penyimpanan menggunakan SPSS 20

		Statistic	Std. Error
	Mean	2.77424	.056508
	95% Confidence Interval for Lower Bound	2.66139	
	Upper Bound	2.88710	
	5% Trimmed Mean	2.78879	
	Median	2.78050	
	Variance	.211	
diameter	Std. Deviation	.459070	
	Minimum	1.677	
	Maximum	3.571	
	Range	1.894	
	Interquartile Range	.685	
	Skewness	-.360	.295
	Kurtosis	-.490	.582

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
diameter	.071	66	.200 [*]	.975	66	.194

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

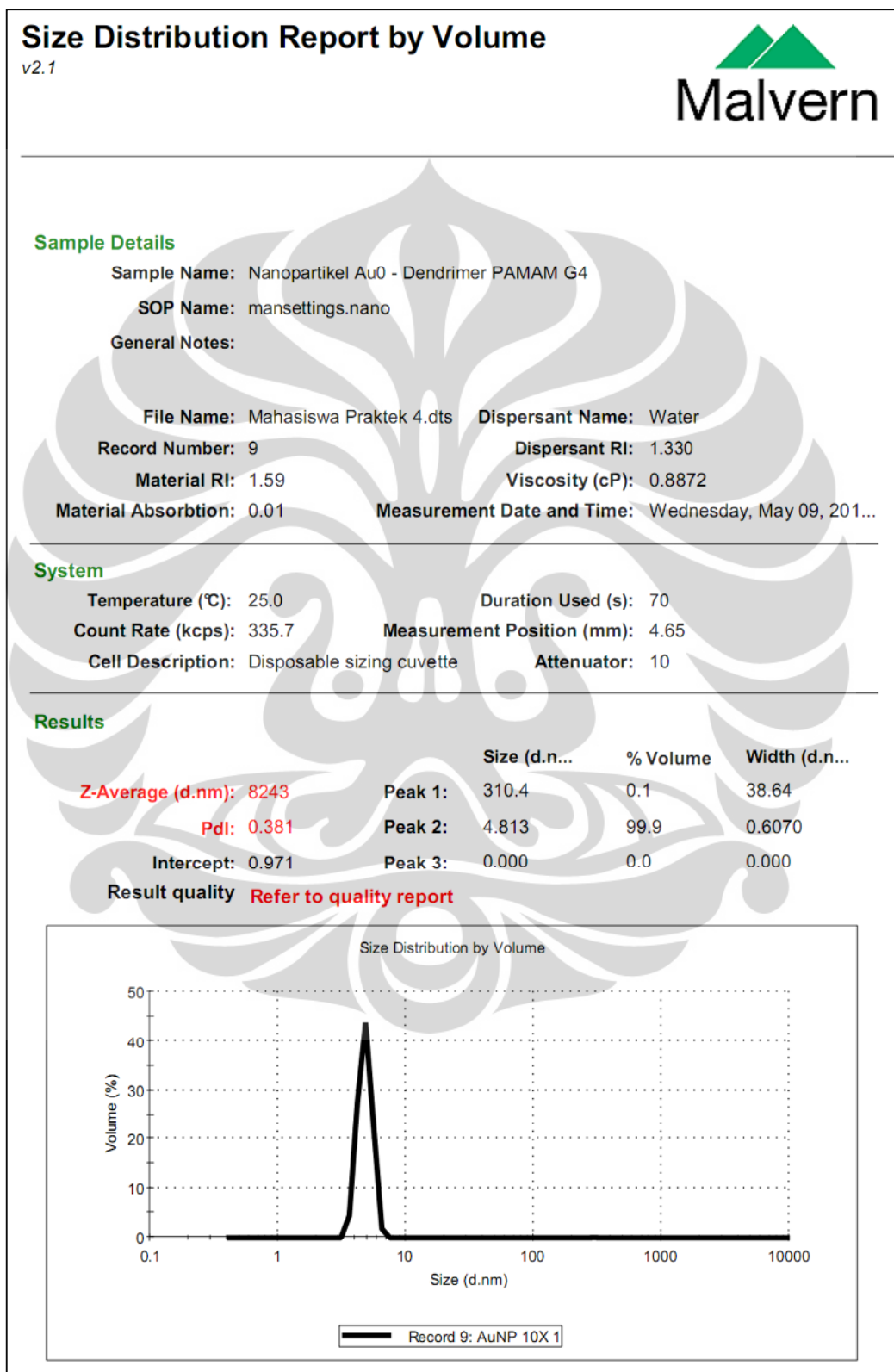
(lanjutan)

Statistics

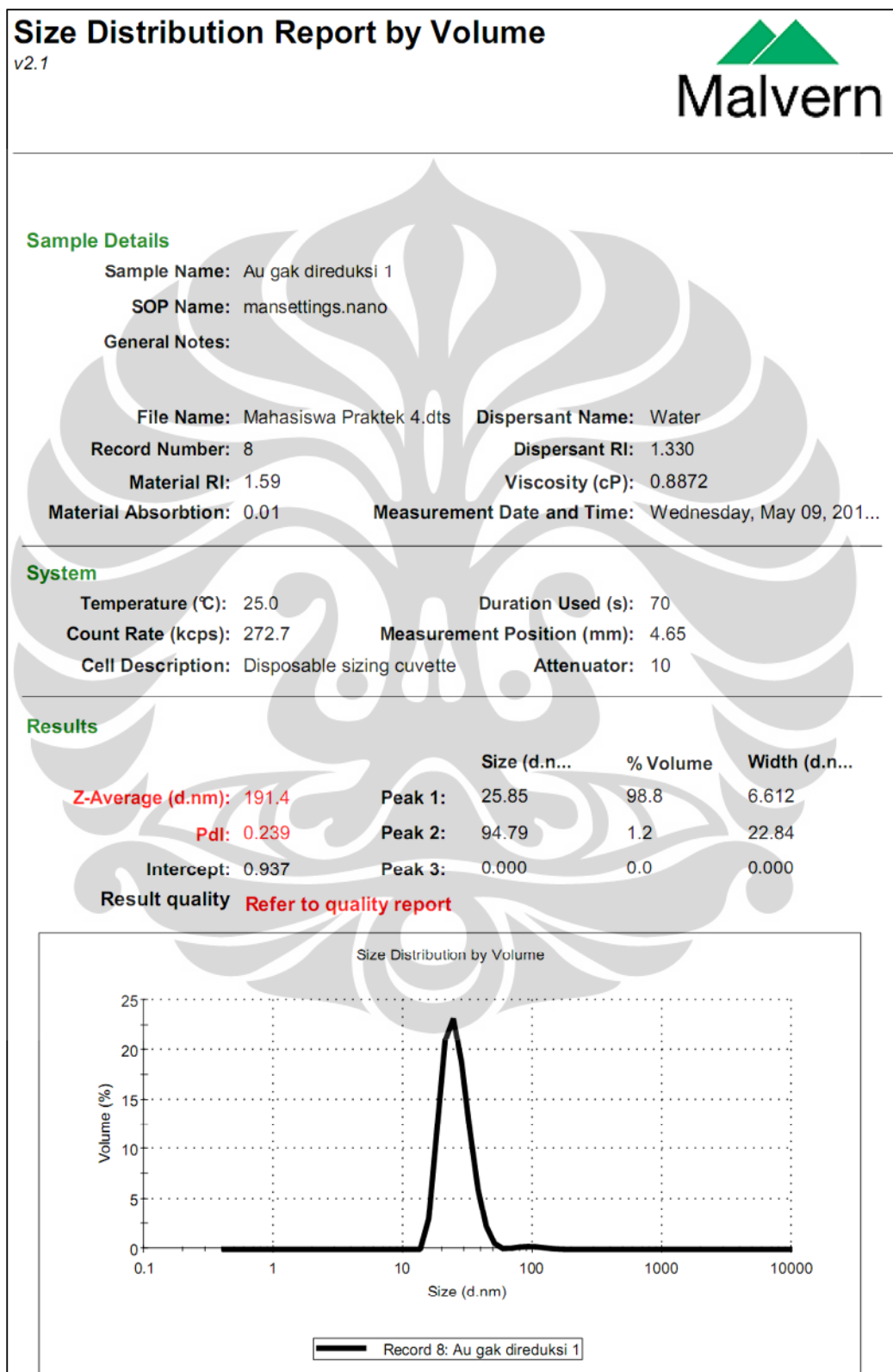
diameter

N	Valid	66
	Missing	6
Mean		2.77424
Std. Deviation		.459070
Variance		.211
Range		1.894
Percentiles	10	2.14850
	20	2.33980
	25	2.43225
	30	2.54340
	40	2.71740
	50	2.78050
	60	2.94780
	70	3.06290
	75	3.11675
	80	3.21060
90	3.37890	

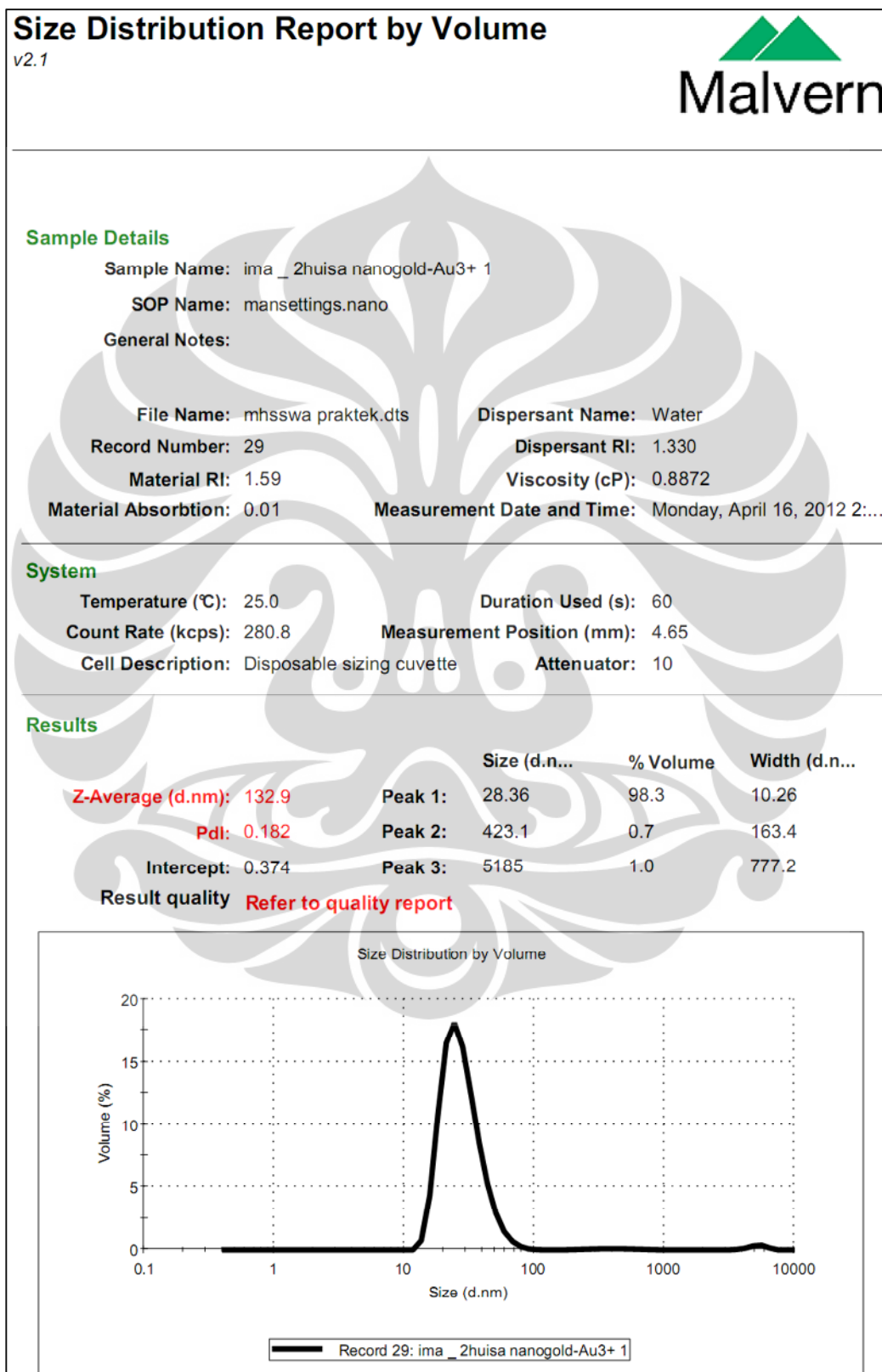
Lampiran 25. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au⁰-dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 4 minggu menggunakan metode *Dynamic Light Scattering (DLS)*




Lampiran 26. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 sebelum penyimpanan selama 4 minggu menggunakan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS)




Lampiran 27. Hasil penetapan ukuran nanopartikel Au³⁺-dendrimer PAMAM G4 setelah penyimpanan selama 4 minggu menggunakan metode *Dynamic Light Scattering (DLS)*



Lampiran 28. Spesifikasi sel MCF-7

 Product Information Sheet for ATCC® HTB-22™																			
<p>Cell Line Designation: MCF-7 ATCC® Catalog No. HTB-22™</p>																			
<p>Table of Contents:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cell Line Description • Biosafety Level • Use Restrictions • Handling Procedure for Frozen Cells • Handling Procedure for Flask Cultures • Subculturing Procedure • Medium Renewal • Complete Growth Medium • Cryoprotectant Medium • References • Warranty 	<p>No DM were detected. Chromosome 20 was nullisomic and X was disomic. Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.</p> <p>Purified DNA from this line is available as ATCC® HTB-22D™ (10µg) Total RNA from this line is available as ATCC® HTB-22R™ (100µg)</p>																		
<p>Cell Line Description</p> <p>Organism: <i>Homo sapiens</i> (human) Tissue: mammary gland; breast adenocarcinoma; derived from metastatic site; pleural effusion Age: 69 years Gender: female Ethnicity: Caucasian Morphology: epithelial Doubling time: about 29 hours Growth Properties: adherent Oncogene: wnt7h + Antigens Expressed: Blood Type O; Rh+ Products: insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) BP-2; BP-4; BP-5 DNA profile (STR analysis)</p> <table border="0"> <tr><td>Amelogenin:</td><td>X</td></tr> <tr><td>CSF1PO:</td><td>10</td></tr> <tr><td>D13S317:</td><td>11</td></tr> <tr><td>D16S539:</td><td>11,12</td></tr> <tr><td>D5S818:</td><td>11,12</td></tr> <tr><td>D7S820:</td><td>8,9</td></tr> <tr><td>TH01:</td><td>6</td></tr> <tr><td>TPOX:</td><td>9,12</td></tr> <tr><td>vWA:</td><td>14,15</td></tr> </table> <p>Depositor: C.M. McGrath Comments: The MCF7 line retains several characteristics of differentiated mammary epithelium including ability to process estradiol via cytoplasmic estrogen receptors and the capability of forming domes. Growth of MCF7 cells is inhibited by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha). Secretion of IGFBP's can be modulated by treatment with anti-estrogens. Karyology: modal number = 82; range = 66 to 87. The stemline chromosome numbers ranged from hypotriploidy to hypotetraploidy, with the 2S component occurring at 1%. There were 29 to 34 marker chromosomes per S metaphase; 24 to 28 markers occurred in at least 30% of cells, and generally one large submetacentric (M1) and 3 large subtelocentric (M2, M3, and M4) markers were recognizable in over 80% of metaphases.</p>	Amelogenin:	X	CSF1PO:	10	D13S317:	11	D16S539:	11,12	D5S818:	11,12	D7S820:	8,9	TH01:	6	TPOX:	9,12	vWA:	14,15	<p>Biosafety Level: 1 Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the following publication: <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i>, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1999. The entire text is available online at www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm.</p> <p>Use Restrictions These cells are distributed for research purposes only. ATCC recommends that individuals contemplating commercial use of any cell line first contact the originating investigator to negotiate an agreement. Third party distribution of this cell line is discouraged, since this practice has resulted in the unintentional spreading of cell lines contaminated with inappropriate animal cells or microbes.</p> <p>Handling Procedure for Frozen Cells To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.</p> <p>SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes). 2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. <i>All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.</i> 3. It is recommended that the cryoprotective agent be removed immediately. Centrifuge the cell suspension at
Amelogenin:	X																		
CSF1PO:	10																		
D13S317:	11																		
D16S539:	11,12																		
D5S818:	11,12																		
D7S820:	8,9																		
TH01:	6																		
TPOX:	9,12																		
vWA:	14,15																		
<p>American Type Culture Collection P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.atcc.org</p>	<p>800-638-6597 or 703-365-2700 Fax: 703-365-2750 E-mail: tech@atcc.org Or contact your local distributor.</p>																		

(lanjutan)

	Product Information Sheet for ATCC® HTB-22™
<p>approximately 125 xg for 5 to 10 minutes. Discard the supernatant and resuspend the cell pellet in an appropriate amount of fresh growth medium.</p>	
<p>4. Transfer the cell pellet to an appropriate size vessel. <i>It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).</i></p> <p>5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.</p> <p>Note: Present batches of MCF7 cells are exhibiting the following growth pattern: The cells usually attach as three-dimensional clusters and eventually grow to a 80-90% confluent monolayer. However, we are finding that most of the clusters remain in suspension until after the 2nd subculture. After first subculture all the cells will not attach. There will be clusters in suspension. Break up the clusters the best you can by gently pipetting with a small bore pipette (5 ml or smaller). After a few days incubation, the cells should reattach as three-dimensional islands (there will be some clusters that do not reattach). Growth will eventually spread out from the islands and the culture should, after the second subculture, flatten and become 70-80% confluent.</p> <p>Handling Procedure for Flask Cultures The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.</p> <p>1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).</p> <p>2. If the cells are still attached, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.</p> <p>3. If the cells are not attached, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 ml of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.</p>	<p>Subculturing Procedure Volumes used in this protocol are for 75 cm² flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes. Note: if floating cells are present, it is recommended that they be transferred at the first two (2) subcultures as described below. It is not necessary to transfer floating cells for subsequent subcultures.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Remove culture medium to a centrifuge tube. 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum, which contains trypsin inhibitor. 3. Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually with 5 to 10 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal. 4. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Transfer the cell suspension to the centrifuge tube with the medium and cells from Step #1 and spin at approximately 125 xg for 5 to 10 minutes. Discard the supernatant. 6. Resuspend the cell pellet in fresh growth medium. Add appropriate aliquots of cell suspension to new culture vessels. Maintain cultures at a cell concentration between 2x10⁴ and 2 x 10⁵ cells/cm². Subcultivation Ratio: 1:3 to 1:6. 7. Place culture vessels in incubators at 37°C. Note: For more information on enzymatic dissociation and subculturing of cell lines consult Chapter 13 in Culture Of Animal Cells: A Manual Of Basic Technique by R. Ian Freshney, 5th edition, published by Wiley-Liss, N.Y., 2005. <p>Medium Renewal Two to three times weekly</p> <p>Complete Growth Medium The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0.01mg/ml bovine insulin • fetal bovine serum to a final concentration of 10% <p>This medium is formulated for use with a 5% CO₂ in air atmosphere.</p>
<hr/>	
<p>American Type Culture Collection P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.atcc.org</p>	<p>800-638-6597 or 703-365-2700 Fax: 703-365-2750 E-mail: tech@atcc.org Or contact your local distributor.</p>

(lanjutan)

ATCC[®]	Product Information Sheet for ATCC[®] HTB-22TM
<p>ATCC tested fetal bovine serum is available as ATCC[®] Catalog No. 30-2020 (500ml) or ATCC[®] Catalog No. 30-2021 (100ml).</p>	
<p>Cryoprotectant Medium Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC[®] Catalog No. 4-X.</p>	
<p>Additional Information Additional product and technical information can be obtained from the catalog references and the ATCC Web site at www.atcc.org, or by e-mail at tech@atcc.org.</p>	
<p>References (additional references may be available in the catalog at www.atcc.org)</p> <p>Sugarman BJ et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. <i>Science</i> 230: 943-945, 1985 PubMed: 86044518</p> <p>Takahashi K and Suzuki K. Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells. <i>Int. J. Cancer</i> 55: 453-458, 1993 PubMed: 93388025</p> <p>Brandes LJ and Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. <i>Cancer Res.</i> 43: 2831-2835, 1983 PubMed: 83206536</p> <p>Lan MS et al. Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. <i>Cancer Res.</i> 50: 2997-3001, 1990 PubMed: 90242270</p> <p>Pratt SE and Pollak MN. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. <i>Cancer Res.</i> 53: 5193-5198, 1993 PubMed: 94036798</p> <p>Huguet EL et al. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. <i>Cancer Res.</i> 54: 2615-2621, 1994 PubMed: 94221588</p> <p>Soule HD et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> 51: 1409-1416, 1973 PubMed: 74054239</p> <p>Bellet D et al. Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells. <i>Cancer Res.</i> 57: 516-523, 1997 PubMed: 97164677</p> <p>Littlewood-Evans AJ et al. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. <i>Cancer Res.</i> 57: 5386-5390, 1997 PubMed: 98053913</p> <p>Komarova EA et al. Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. <i>Cancer Res.</i> 57: 5217-5220, 1997 PubMed: 98053886</p> <p>van Dijk MA et al. A functional assay in yeas for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. <i>Cancer Res.</i> 57: 3478-3485, 1997 PubMed: 97413630</p> <p>Landers JE et al. Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. <i>Cancer Res.</i> 57: 3562-3568, 1997 PubMed: 97413643</p> <p>Umekita Y et al. Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 93: 11802-11807, 1996 PubMed: 97030277</p> <p>Zamora-Leon SP et al. Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 93: 1847-1852, 1996 PubMed: 96312501</p> <p>Geiger T et al. Antitumor activity of a PKC-alpha antisense oligonucleotide in combination with standard chemotherapeutic agents against various human tumors transplanted into nude mice. <i>Anti-Cancer Drug Des.</i> 13: 35-45, 1998 PubMed: 98134516</p> <p>Jang SI et al. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. <i>J. Biol. Chem.</i> 271: 24105-24114, 1996 PubMed: 96394543</p> <p>Lee JH et al. The proximal promoter of the human transglutaminase 3 gene. <i>J. Biol. Chem.</i> 271: 4561-4568, 1996 PubMed: 96224044</p> <p>Chang K and Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 93: 136-140, 1996 PubMed: 96133892</p> <p>Zhu X et al. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 93: 6091-6095, 1996 PubMed: 96234095</p> <p>Bacus SS et al. Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. <i>Mol. Carcinog.</i> 3: 350-362, 1990 PubMed: 91119659</p> <p>Hay, R. J., Caputo, J. L., and Macy, M. L., Eds. (1992), ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 2nd edition, Published by ATCC.</p> <p>Caputo, J. L., Biosafety procedures in cell culture. <i>J. Tissue Culture Methods</i> 11:223-227, 1988.</p> <p>Fleming, D.O., Richardson, J. H., Tulis, J.J. and Vesley, D., (1995) Laboratory Safety: Principles and Practice. Second edition, ASM press, Washington, DC.</p>	
<p>ATCC Warranty The viability of ATCC products is warranted for 30 days from the date of shipment. If you feel there is a problem with this product, contact Technical Services by phone at 800-638-6597 or 703-365-2700 or by e-mail at tech@atcc.org. Or you may contact your local distributor.</p>	
<p>American Type Culture Collection P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108 USA www.atcc.org</p>	<p>800-638-6597 or 703-365-2700 Fax: 703-365-2750 E-mail: tech@atcc.org Or contact your local distributor.</p>

Lampiran 29. Perhitungan jumlah kepadatan sel MCF-7

Volume suspensi sel yang akan digunakan untuk pengujian sitotoksitas adalah 5 ml. Jumlah sel terhitung dalam keempat bidang besar hemositometer adalah sebanyak 272 sel. Saat penambahan larutan tripan biru, terjadi pengenceran 2 kali terhadap suspensi sel. Setiap bidang besar pada hemositometer memiliki volume 10^{-4} ml. Sehingga jumlah sel dapat dihitung berdasarkan persamaan (3.1).

$$\text{Jumlah sel} = \frac{282}{4} \times 10^4 \times 2 \times 5$$

$$\text{Jumlah sel} = 6,8 \times 10^6 \text{ sel dalam 5 ml medium.}$$

$$\text{Kepadatan sel dalam suspensi induk untuk uji adalah} = \frac{6,8 \times 10^6}{5} = 1,36 \times 10^6 \text{ sel}$$

Lampiran 30. Perhitungan penyediaan suspensi sel MCF-7 untuk pengujian sitotoksitas

Pada setiap mikroplat, diperlukan $1,0 \times 10^5$ sel/ml sehingga suspensi sel uji induk yang diperlukan untuk mengisi 96 sumur (pembulatan menjadi 100 sumur) dihitung berdasarkan rumus :

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2$$

P_1 : Jumlah kepadatan sel induk ($6,8 \times 10^5$ sel/ml)

V_1 : Volume sel induk yang diperlukan

P_2 : Jumlah kepadatan sel yang diinginkan dalam sumur uji

V_2 : Volume yang dibutuhkan untuk mengisi mikroplat uji

$$P_1 \times V_1 = P_2 \times V_2$$

$$1,36 \times 10^6 \times V_1 = 1,0 \times 10^5 \times 10 \text{ ml}$$

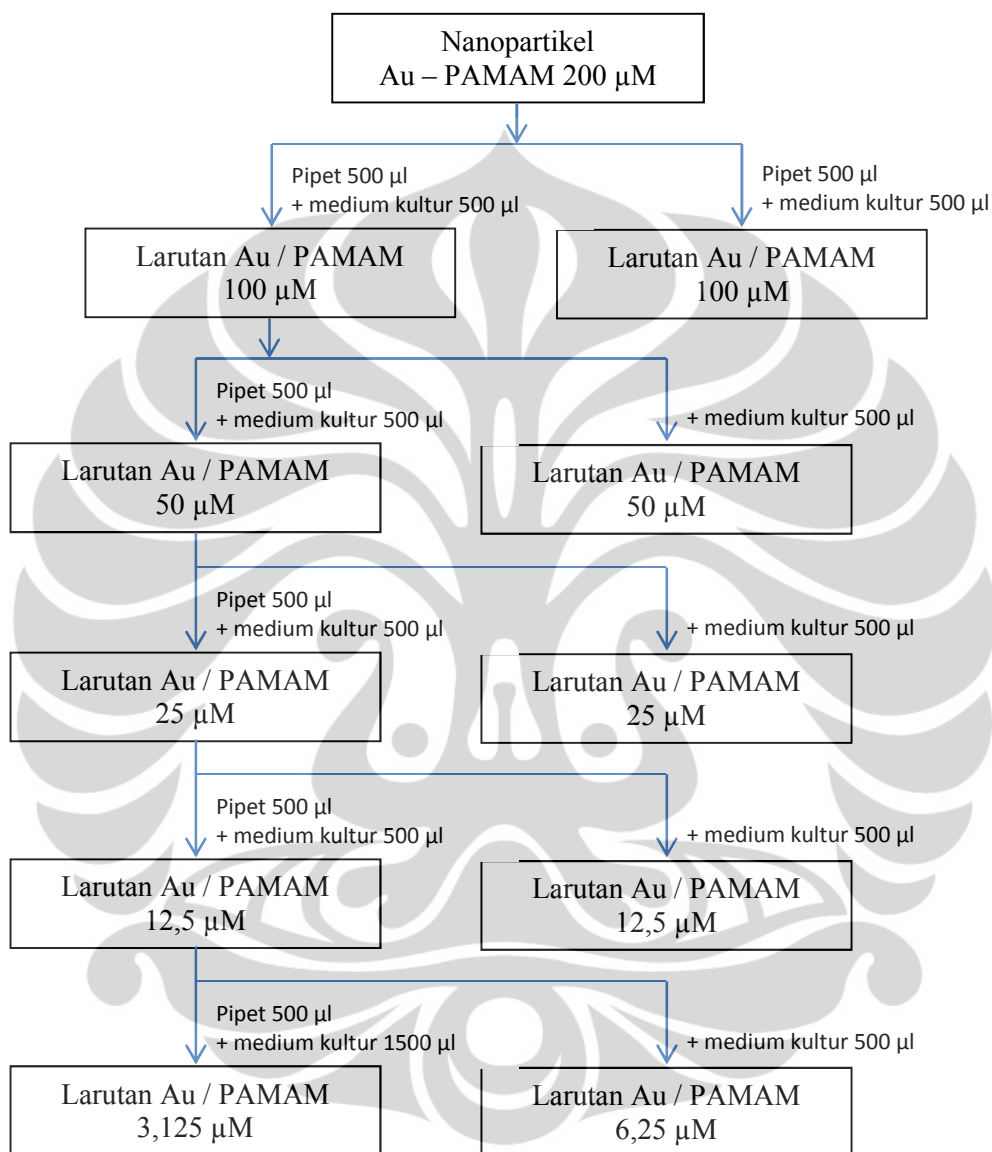
$$V_1 = 1,36 \text{ ml}$$

$$= 1360 \mu\text{l}$$

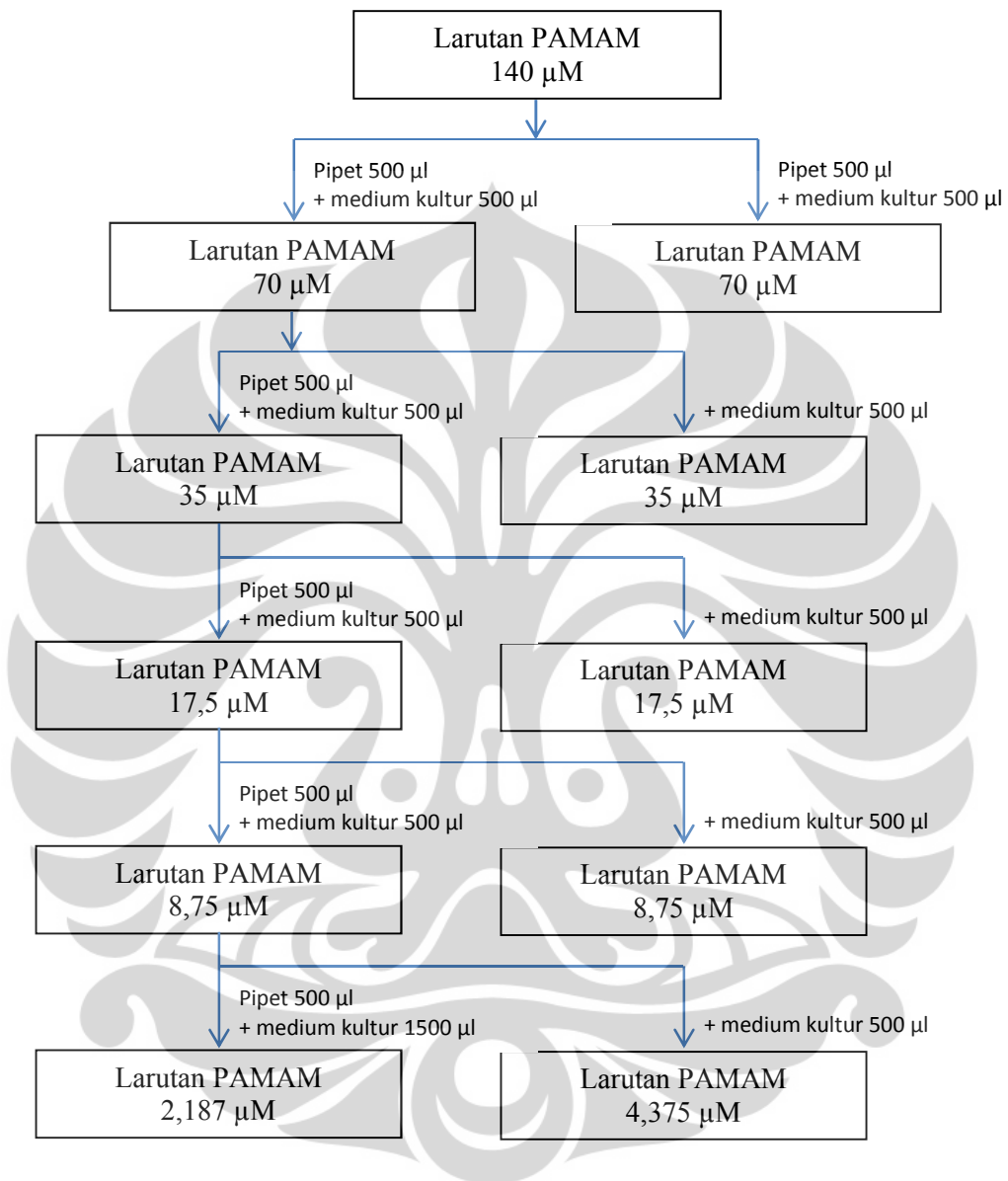
$$\begin{aligned} \text{Volume medium kultur DMEM yang ditambahkan} &= 10.000 \mu\text{l} - 1360 \mu\text{l} \\ &= 8640 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Perhitungan dilakukan untuk pengisian 1 mikroplat uji. Oleh karena itu, pembuatan suspensi sel uji dilakukan triplo untuk mengisi 3 mikroplat uji.

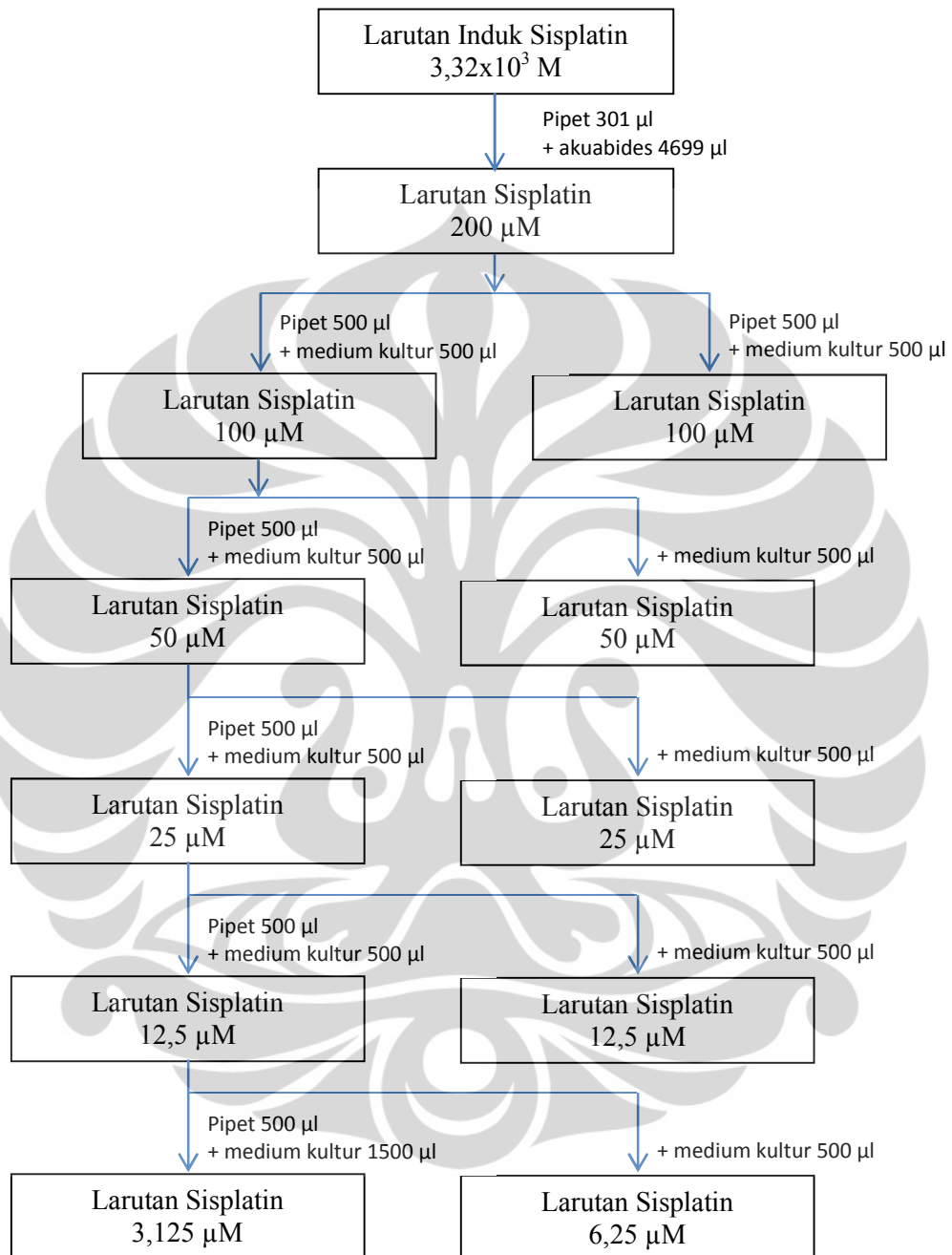
Lampiran 31. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan nanopartikel Au-dendrimer PAMAM G4 untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7



Lampiran 32. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan dendrimer PAMAM G4 untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7



Lampiran 33. Bagan pembuatan variasi konsentrasi larutan kontrol positif sisplatin untuk pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7



Lampiran 34. Pemetaan pengujian sitotoksitas terhadap sel MCF-7 pada mikroplat 96 sumuran

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A1	A1	B1	B1	B1	C1	C1	C1	D1	D1	D1
B	A2	A2	A2	B2	B2	B2	C2	C2	C2	D2	D2	D2
C	A3	A3	A3	B3	B3	B3	C3	C3	C3	D3	D3	D3
D	A4	A4	A4	B4	B4	B4	C4	C4	C4	D4	D4	D4
E	A5	A5	A5	B5	B5	B5	C5	C5	C5	D5	D5	D5
F	A6	A6	A6	B6	B6	B6	C6	C6	C6	D6	D6	D6
G	S	S	S	S	S	S	M	M	M	M	M	M
H	S	S	S	S	S	S	M	M	M	M	M	M

Keterangan :

1. Sumur pada kolom 1 – kolom 3 berisi 100 μL suspensi sel dan larutan uji Nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 (larutan uji 1) dengan berbagai konsentrasi :
 1. A1 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 100 μM
 2. A2 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 50 μM
 3. A3 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 25 μM
 4. A4 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 12,5 μM
 5. A5 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 6,25 μM
 6. A6 ; Larutan uji 1 dengan konsentrasi 3,125 μM
2. Sumur pada kolom 4 – kolom 6 berisi 100 μL suspensi sel dan larutan uji Nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 (larutan uji 2) dengan berbagai konsentrasi :
 1. B1 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 100 μM
 2. B2 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 50 μM
 3. B3 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 25 μM
 4. B4 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 12,5 μM
 5. B5 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 6,25 μM
 6. B6 ; Larutan uji 2 dengan konsentrasi 3,125 μM

(lanjutan)

3. Sumur pada kolom 7 – kolom 9 berisi 100 μL suspensi sel dan larutan kontrol positif sisplatin (larutan uji 3) dengan berbagai konsentrasi :
 1. C1 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 100 μM
 2. C2 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 50 μM
 3. C3 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 25 μM
 4. C4 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 12,5 μM
 5. C5 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 6,25 μM
 6. C6 ; Larutan uji 3 dengan konsentrasi 3,125 μM
4. Sumur pada kolom 10 – kolom 12 berisi 100 μL suspensi sel dan larutan dendrimer PAMAM G4 (larutan uji 4) dengan berbagai konsentrasi :
 1. D1 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 100 μM
 2. D2 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 50 μM
 3. D3 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 25 μM
 4. D4 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 12,5 μM
 5. D5 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 6,25 μM
 6. D6 ; Larutan uji 4 dengan konsentrasi 3,125 μM
5. Sumur kolom 1 – kolom 6 pada baris G dan baris H berisi suspensi sel dalam 100 μL medium kultur.
6. Sumur kolom 7 – kolom 12 pada baris G dan baris H berisi 100 μL medium kultur.

Lampiran 35. Perhitungan nilai IC_{50} nanopartikel Au^0 -dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 21,23 + [13,57 \times \log(x)]$

$$y_1 = 21,23 + [13,57 \times \log(x_1)]$$

$$50 = 21,23 + [13,57 \times \log(x_1)]$$

$$\log x_1 = \frac{50 - 21,23}{13,57}$$

$$\log x_1 = 2,120$$

$$x_1 = 131,86 \mu M$$

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 17,88 + [19,18 \times \log(x)]$

$$y_2 = 17,88 + [19,18 \times \log(x_2)]$$

$$50 = 17,88 + [19,18 \times \log(x_2)]$$

$$\log x_2 = \frac{50 - 17,88}{19,18}$$

$$\log x_2 = 1,675$$

$$x_2 = 47,27 \mu M$$

Lampiran 36. Perhitungan nilai IC_{50} nanopartikel Au^{3+} -dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 9,931 + [21,45 \times \log(x)]$

$$y_1 = 9,931 + [21,45 \times \log(x_1)]$$

$$50 = 9,931 + [21,45 \times \log(x_1)]$$

$$\log x_1 = \frac{50 - 9,931}{21,45}$$

$$\log x_1 = 1,868$$

$$x_1 = 73,793 \mu M$$

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 5,099 + [24,65 \times \log(x)]$

$$y_2 = 5,099 + [24,65 \times \log(x_2)]$$

$$50 = 5,099 + [24,65 \times \log(x_2)]$$

$$\log x_2 = \frac{50 - 5,099}{24,65}$$

$$\log x_2 = 1,822$$

$$x_2 = 66,304 \mu M$$

Lampiran 37. Perhitungan nilai IC_{50} dendrimer PAMAM G4 terhadap sel MCF-7

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 9,984 + [18,38 \times \log(x)]$

$$y_1 = 9,984 + [18,38 \times \log(x_1)]$$

$$50 = 9,984 + [18,38 \times \log(x_1)]$$

$$\log x_1 = \frac{50 - 9,984}{18,38}$$

$$\log x_1 = 2,177$$

$$x_1 = 150,36 \mu M$$

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan $y = 11,56 + [18,66 \times \log(x)]$

$$y_2 = 11,56 + [18,66 \times \log(x_2)]$$

$$50 = 11,56 + [18,66 \times \log(x_2)]$$

$$\log x_2 = \frac{50 - 11,56}{18,66}$$

$$\log x_2 = 2,060$$

$$x_2 = 114,82 \mu M$$

Lampiran 38. Perhitungan nilai IC₅₀ kontrol positif sisplatin terhadap sel MCF-7

Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari persamaan $y = -22,87 + [41,35 \times \log(x)]$

$$y_1 = -22,87 + [41,35 \times \log(x_1)]$$

$$50 = -22,87 + [41,35 \times \log(x_1)]$$

$$\log x_1 = \frac{50 + 22,87}{41,35}$$

$$\log x_1 = 1,762$$

$$x_1 = 57,84 \mu M$$

Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari persamaan $y = -19,92 + [41,40 \times \log(x)]$

$$y_2 = -19,92 + [41,40 \times \log(x_2)]$$

$$50 = -19,92 + [41,40 \times \log(x_2)]$$

$$\log x_2 = \frac{50 + 19,92}{41,40}$$

$$\log x_2 = 1,688$$

$$x_2 = 48,85 \mu M$$

Lampiran 39. Uji distribusi normal Shapiro-Wilk terhadap data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam menggunakan SPSS 20

Tujuan : Mengetahui normalitas distribusi data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam dari larutan uji

Hipotesis :

H_0 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam tidak terdistribusi secara normal

H_1 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam terdistribusi secara normal

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi > 0,05

Hasil :

Tests of Normality						
obat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
permati au0	.209	12	.155	.872	12	.068
au3	.158	12	.200*	.919	12	.277
pamam	.159	12	.200*	.957	12	.740
sisplatin	.238	11	.081	.858	11	.054

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Kesimpulan :

Nilai signifikansi hasil uji Shapiro-Wilk > 0,05 sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Data persentase kematian sel MCF-7 keempat larutan uji dinyatakan terdistribusi secara normal.

Lampiran 40. Uji homogenitas Levene data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam menggunakan SPSS 20

Tujuan : Mengetahui homogenitas data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam

Hipotesis :

H_0 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam tidak homogen

H_1 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam homogen

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi $> 0,05$

Hasil :

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Permati	Based on Mean	10.568	3	43	.000
	Based on Median	4.462	3	43	.008
	Based on Median and with adjusted df	4.462	3	17.799	.017
	Based on trimmed mean	9.718	3	43	.000

Kesimpulan :

Nilai signifikansi hasil uji homogenitas Levene $< 0,05$ sehingga H_0 gagal ditolak. Data persentase kematian sel MCF-7 keempat larutan uji dinyatakan tidak homogen.

Lampiran 41. Uji homogenitas transformasi data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam berdasarkan nilai *Power Estimation* uji Levene menggunakan SPSS 20

Nilai *Power Estimation* berdasarkan uji homogenitas Levene :

Slope : -1,740

Power : 2,740

Maka data persentase kematian ditransformasi menjadi bentuk kuadrat dan dilakukan uji homogenitas kembali (Dahlan, 2011).

Tujuan : Mengetahui homogenitas data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam

Hipotesis :

H_0 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam tidak homogen

H_1 = Data persentase kematian sel MCF-7 setelah pemaparan larutan uji selama 24 jam homogen

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi $> 0,05$

Hasil :

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
squaremati	Based on Mean	9.980	3	43	.000
	Based on Median	2.330	3	43	.088
	Based on Median and with adjusted df	2.330	3	13.396	.121
	Based on trimmed mean	8.576	3	43	.000

Kesimpulan :

Nilai signifikansi hasil uji homogenitas Levene $< 0,05$ sehingga H_0 gagal ditolak. Hasil transformasi data persentase kematian sel MCF-7 keempat larutan uji dinyatakan tidak homogen.

Lampiran 42. Uji Kruskal-wallis data persentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam

Tujuan : Mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antar persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai perlakuan

Hipotesis :

H_0 = Tidak ada perbedaan bermakna antara data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai perlakuan

H_1 = Ada perbedaan bermakna antara data persentase kematian sel MCF-7 pada berbagai perlakuan

Level Signifikansi : 0,05

Kriteria Pengujian : H_0 ditolak dan H_1 diterima jika signifikansi $< 0,05$

Hasil :

obat	N	Mean Rank
permati au0	12	28.79
au3	12	26.71
pamam	12	21.00
sisplatin	11	19.09
Total	47	

	permati
Chi-Square	3.919
df	3
Asymp. Sig.	.270

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: obat

Kesimpulan :

Nilai signifikansi hasil uji Kruskal-wallis $> 0,05$ sehingga H_0 gagal ditolak. Data persentase kematian sel MCF-7 antar larutan uji dinyatakan tidak memiliki perbedaan bermakna secara statistik.



Lampiran 43. Sertifikat analisis H₂AuCl₄**SIGMA-ALDRICH**[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Gold(III) chloride solution – 99.99% trace metals basis, 30 wt. % in dilute HCl

Product Number: 484385
 Lot Number: MKBH8233
 Brand: ALDRICH
 MDL Number: MFCD00011322
 Quality Release Date: 16 AUG 2011

H₂AuCl₄

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Yellow to Orange	Orange
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Gravimetric Analysis		18.0 %
% Au After Reduction With Sulfite		
ICP Major Analysis	Confirmed	Confirms
Confirms Au Component		
Trace Metal Analysis	≤ 200.0 ppm	3.5 ppm
Boron (B)		0.6 ppm
Calcium (Ca)		2.0 ppm
Iron (Fe)		0.3 ppm
Sodium (Na)		0.6 ppm
Purity	Meets Requirements	Meets Requirements
99.99% Based On Trace Metals Analysis		



Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Lampiran 44. Sertifikat analisis dendrimer Poli(amidoamin) (PAMAM) generasi 4

SIGMA-ALDRICH®
sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
 PAMAM dendrimer, ethylenediamine core, generation 4.0 solution - 10 wt. % in methanol

Product Number: 412449
 Lot Number: MKBG8078
 Brand: ALDRICH
 MDL Number: MFCD00197936
 Formula: C622H1248N250O124
 Formula Weight: 14,214.17 g/mol
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 29 MAR 2011

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Titration by HCL		9.4%
Approximately 10%		
Residue on Evaporation		10.1%
Approximately 10%		
Vendor Information	Conforms	Conforms
Starburst is a Registered Trademark of Dendritech, Inc.		



Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, Wisconsin US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Lampiran 45. Sertifikat analisis natrium borohidrat (NaBH_4)

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Sodium borohydride solution - SWS, ~12 wt. % in 14 M NaOH

NaBH_4

Product Number: 452904
Lot Number: 68696LM
Brand: ALDRICH
MDL Number: MFCD00003518
Formula: H4BNa
Formula Weight: 37.83 g/mol
Expiration Date: SEP 2015

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless to Very Faint Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Viscous Liquid	Viscous Liquid
Hydrogen Evolution NaBH_4	11.85 - 12.15 %	12.09 %
Rohm and Haas data Product of Supplier Rohm and Haas	Confirmed	Confirmed



Jennifer Baughman, Manager
Quality Control
Sheboygan Falls, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1