

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai dengan Juni 2013 di Laboratorium Kimia Anorganik FMIPA Universitas Lampung. Analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dilakukan di Laboratorium Kimia Anorganik FMIPA Universitas Lampung dan analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *IR* dilakukan di Laboratorium Instrumentasi FMIPA Universitas Islam Indonesia. Analisis unsur dengan menggunakan *microelemental analyzer* dilakukan di *School of Chemical and Food Technology*, Universiti Kebangsaan Malaysia. Sedangkan uji aktivitas antikanker dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR) BATAN, Jakarta Selatan.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, gelas ukur, erlenmeyer, gelas kimia, satu set alat refluks, *hot plate stirrer*, kertas saring *Whatman* No. 42, desikator, spektrofotometer *IR* (karakterisasi), spektrofotometer *UV-Vis*, *microelemental analyzer* (analisis unsur) serta mikroskop dengan *haemocytometer*

Fuch Rosental (0,200 mm x 0,0625 mm²) dan alat *multi well plate tissue's culture* (uji aktivitas antikanker).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, dibutiltimah(IV) diklorida, difeniltimah(IV) diklorida, trifeniltimah(IV) klorida, NaOH, metanol *p.a.*, akuabides, asam 3-nitrobenzoat, toluen, dan isolat sel leukemia L-1210 BATAN, Jakarta Selatan.

C. Metode Penelitian

Prosedur untuk sintesis masing-masing senyawa organotimah(IV) karboksilat pada penelitian ini diadopsi dari prosedur yang dilakukan oleh Szorscik *et al.* (2002); Hadi *et al.* (2008); Hadi *et al.* (2009); dan Hadi and Rilyanti (2010).

Untuk proses rekristalisasi terhadap senyawa hasil sintesis diadopsi dari prosedur yang dilakukan oleh Bonire *et al.* (1998).

1. Sintesis senyawa dibutiltimah(IV) oksida [(C₄H₉)₂SnO]

Dibutiltimah(IV) diklorida [(C₄H₉)₂SnCl₂] sebanyak 0,045 mol (13,68 gram) direaksikan dengan 0,09 mol (3,6 gram) NaOH untuk mengganti ligan klor dengan oksida dalam 50 mL pelarut metanol *p.a.*, endapan yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring *Whatman* No. 42, lalu dicuci dengan akuabides untuk menghilangkan garam NaCl yang masih tercampur dalam endapan. Selain itu, endapan juga dicuci dengan menggunakan metanol *p.a.* untuk menghilangkan pengotor-pengotor organik yang bersifat polar seperti senyawa awal yang tidak ikut bereaksi. Endapan didiamkan dalam desikator

sampai dihasilkan $(C_4H_9)_2SnO$. Kristal $(C_4H_9)_2SnCl_2$ dan $(C_4H_9)_2SnO$ kemudian dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), serta dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

2. Sintesis senyawa dibutyltimah(IV) di-3-nitrobenzoat [[$(C_4H_9)_2Sn(m-OCOC_6H_4NO_2)_2$]

Senyawa dibutyltimah(IV) oksida [$(C_4H_9)_2SnO$] sebanyak 0,747 gram direaksikan dengan asam 3-nitrobenzoat ($m-C_6H_4NO_2COOH$) sebanyak 1,002 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5, dan 6 jam dengan pemanas pada suhu $60^\circ C$. Setelah reaksi sempurna, metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering. Kemudian direkristalisasi dengan pelarut toluen sebanyak 10 mL. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks siap untuk dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer* serta diuji sifat antikankernya terhadap sel leukemia L-1210. Sebagai perbandingan, asam 3-nitrobenzoat juga dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis*.

3. Sintesis senyawa difenyltimah(IV) dihidroksida [(C_6H_5)₂Sn(OH)₂]

Difenyltimah(IV) diklorida [$(C_6H_5)_2SnCl_2$] sebanyak 0,045 mol (15,48 gram) direaksikan dengan 0,09 mol (3,6 gram) NaOH dalam 50 mL pelarut metanol *p.a.*, endapan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman*

No. 42, lalu dicuci dengan akuabides dan metanol *p.a.*, kemudian didiamkan dalam desikator sampai dihasilkan $(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$. Kristal $(C_6H_5)_2SnCl_2$ dan $(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$ dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

4. Sintesis senyawa difeniltimah(IV) di-3-nitrobenzoat [[$(C_6H_5)_2Sn(m-OCOC_6H_4NO_2)_2$]

Senyawa difeniltimah(IV) dihidroksida [$(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$] sebanyak 0,921 gram direaksikan dengan asam 3-nitrobenzoat (*m*- $C_6H_4NO_2COOH$) sebanyak 1,002 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5 dan 6 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering. Kemudian direkristalisasi dengan 10 mL pelarut toluen. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer* serta diuji sifat antikankernya terhadap sel leukemia L-1210.

5. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida [(C_6H_5)₃SnOH]

Trifeniltimah(IV) klorida [$(C_6H_5)_3SnCl$] sebanyak 0,045 mol (17,325 gram) direaksikan dengan 0,045 mol (1,8 gram) NaOH dalam 50 mL pelarut metanol *p.a.*, endapan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* No. 42, lalu dicuci dengan akuabides dan metanol *p.a.*, kemudian

didiamkan dalam desikator sampai dihasilkan $(C_6H_5)_3SnOH$. Kristal $(C_6H_5)_3SnCl$ dan $(C_6H_5)_3SnOH$ dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

6. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) 3-nitrobenzoat [[$(C_6H_5)_3Sn(m-OCOC_6H_4NO_2)$]

Senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida [$(C_6H_5)_3SnOH$] sebanyak 1,101 gram direaksikan dengan asam 3-nitrobenzoat ($m-C_6H_4NO_2COOH$) sebanyak 0,501 gram dengan perbandingan mol 1:1 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5, dan 6 jam dengan pemanas pada suhu $60^\circ C$. Setelah reaksi sempurna, metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering. Kemudian direkristalisasi dengan pelarut toluen sebanyak 10 mL. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), serta dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer* serta diuji sifat antikankernya terhadap sel leukemia L-1210.

7. Pengujian aktivitas antikanker terhadap sel leukemia L-1210

Prosedur untuk pengujian aktivitas antikanker pada penelitian ini diadopsi dari prosedur yang dilakukan oleh Katrin dan Winarno, 2008. Pembuatan media RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*) seberat 10,4 gram yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 L air steril (larutan A) kemudian

1,3 gram NaHCO_3 dilarutkan dalam 50 mL air steril (larutan B). Sebanyak 25 mL larutan B ditambahkan ke dalam 475 mL larutan A, maka diperoleh 500 mL media (larutan C). Untuk keperluan uji, 15 mL *calf bovine serum* ditambahkan ke dalam 85 mL larutan C. Semua pekerjaan dilakukan di ruang steril. Sel leukemia L-1210 yang menjadi target uji aktivitas antikanker ini adalah sel leukimia yang diperoleh dari sel limfosit tikus putih betina jenis DBA (*Dilute Brown Non-Agouti Mouse*) yang berumur 8 bulan. Sel leukemia ini diperoleh dari *The Institute of Physical and Chemical Research, Japan*. Sel leukemia disuspensikan ke dalam media yang telah mengandung *calf bovine serum* sehingga jumlah sel sekitar 2×10^6 sel/mL.

Pengujian aktivitas dilakukan terhadap sampel uji yang dilarutkan dalam metanol. Pengujian aktivitas sitotoksik sampel uji dilakukan dengan 5 variasi dosis yaitu 1, 2, 4, 8, dan 16 $\mu\text{g/mL}$. Media yang telah mengandung suspensi sel leukemia L-1210 (2×10^6 sel/mL) dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's culture* sebanyak 1 mL dalam setiap sumuran. Sebagai kontrol digunakan 10 μL metanol yang telah ditambahkan 990 μL suspensi sel. Percobaan dilakukan triplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO_2 .



Gambar 4. *Multi well plate tissue's culture* (Sulistriani, 2012).

Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer Neubauer improved*. *Haemocytometer Neubauer improved* merupakan alat yang digunakan untuk menghitung atau menentukan jumlah sel per satuan volume. Di dalam *haemocytometer* terdapat sebuah ruang yang digunakan untuk menghitung sel tersebut (Caprette, 2007). Suspensi sel dimasukkan ke dalam ruang dan harus cukup encer, agar sel atau partikel lain tidak tumpang tindih satu sama lain di *grid* dan harus merata. Jumlah sel yang hidup digunakan untuk menentukan persentase inhibisi zat uji terhadap sel leukemia L-1210 tersebut.

Untuk membedakan antara sel hidup dengan sel mati maka sebelum dilakukan penghitungan, 90 μL suspensi dimasukkan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran) dan ditambah 10 μL larutan 1% larutan *tryphan blue* dan dihomogenkan. Campuran sampel uji yang telah diwarnai *tryphan blue* sebanyak 10 μL larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer Neubauer improved*.



Gambar 5. *Haemocytometer Neubauer improved* (Caprette, 2007).

Setelah itu, jumlah sel yang masih hidup dihitung di bawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai bulatan bening dengan bintik biru inti sel di tengah bulatan, sedangkan sel mati terlihat sebagai bercak biru pekat yang bentuknya tidak teratur.

Persentase penghambatan zat uji terhadap pertumbuhan sel leukemia L-1210

dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100\%$$

A: jumlah sel hidup dalam media yang mengandung zat uji.

B: jumlah sel hidup dalam media yang tidak mengandung zat uji (kontrol).

Selanjutnya data persentase inhibisi diplotkan ke tabel probit untuk memperoleh nilai probit, kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi (x) dan probit (y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = a + bx$. Selanjutnya memasukkan nilai $y = 5$ (probit dari 50%), maka diperoleh nilai x (log konsentrasi), nilai IC_{50} dengan mengkonversikan nilai log konsentrasi ke bentuk antilog. IC_{50} yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebanyak 50% setelah masa inkubasi 48 jam. Aktivitas kristal (isolat) dikatakan aktif sebagai antikanker bila nilai $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ (Mans *et al.*, 2000).