

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai dengan Juli 2012 di Laboratorium Kimia Anorganik FMIPA Universitas Lampung. Analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *UV* dilakukan di Laboratorium Biokimia 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. 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 adalah : alat-alat gelas, satu set alat refluks, *hot plate stirrer*, kertas saring *Whatman* No. 42, cawan petri, desikator, spektrofotometer *UV Carry Win UV 32* dan spektrofotometer *IR Thermo Nicolet Avatar 360*, *microelemental analyzer* (analisis unsur) serta mikroskop dengan *Haemocytometer Fuch Rosental* (0,200 mm x 0,0625 mm<sup>2</sup>) dan alat *multiwell plate tissue culture* (uji aktivitas antikanker).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : dibutyltin(IV) diklorida, difenyltin(IV) diklorida, trifenyltin(IV) klorida, NaOH, metanol *p.a.*, akuabides, asam 3-hidroksibenzoat, dan isolat sel leukemia L-1210 BATAN, Jakarta Selatan.

### C. Metode Penelitian

Prosedur untuk sintesis masing-masing senyawa organotin(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).

#### 1. Sintesis senyawa dibutyltin(IV) oksida [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnO]

Dibutyltin(IV) diklorida [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>] sebanyak 0,03 mol (9,12 gram) direaksikan dengan 0,06 mol (2,40 gram) NaOH untuk mengganti ligan klor dengan oksida dalam 50 mL metanol *p.a.*, selanjutnya endapan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* No. 42, lalu dicuci dengan akuabides dan metanol *p.a.* Pencucian endapan dengan akuabides berfungsi untuk menghilangkan garam NaCl yang masih tercampur di dalam endapan. Pencucian dengan metanol *p.a.* untuk menghilangkan pengotor-pengotor organik yang bersifat polar seperti senyawa awal yang tidak ikut bereaksi. Endapan didiamkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu untuk menghasilkan (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnO. Kristal (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> dan (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnO dikarakterisasi dengan spektrofotometer *UV* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), spektrofotometer *IR* dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

## 2. Sintesis senyawa dibutiltimah(IV) di-3-hidroksibenzoat [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>Sn(OCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>]

Senyawa dibutiltimah(IV) oksida [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>2</sub>SnO] sebanyak 0,74 gram direaksikan dengan asam 3-hidroksibenzoat (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OHCOOH) sebanyak 0,82 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL metanol *p.a.*, dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5 dan 6 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu sampai diperoleh kristal kering. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985). Dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer* dan diuji sifat antikankernya terhadap sel leukemia L-1210. Asam 3-hidroksibenzoat juga dikarakterisasi dengan spektrofotometer *UV* dan spektrofotometer *IR* sebagai perbandingan.

## 3. Sintesis senyawa difeniltimah(IV) dihidroksida [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Sn(OH)<sub>2</sub>]

Difeniltimah(IV) diklorida [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>] sebanyak 0,03 mol (10,32 gram) direaksikan dengan 0,06 mol (2,40 gram) NaOH untuk mengganti ligan klor dengan hidroksida dalam 50 mL metanol *p.a.*, selanjutnya endapan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* No 42, lalu dicuci dengan akuabides dan metanol *p.a.* kemudian didiamkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu untuk menghasilkan (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Sn(OH)<sub>2</sub>. Kristal (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub> dan (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Sn(OH)<sub>2</sub> dikarakterisasi dengan spektrofotometer *UV*

pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), spektrofotometer *IR* dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

#### **4. Sintesis senyawa difeniltimah(IV) di-3-hidroksibenzoat [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Sn(OCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>]**

Senyawa difeniltimah(IV) dihidroksida (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Sn(OH)<sub>2</sub> sebanyak 0,92 gram direaksikan dengan asam 3-hidroksibenzoat (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OHCOOH) sebanyak 0,82 gram dengan perbandingan mol 1: 2 dalam 30 mL metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5 dan 6 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu sampai diperoleh kristal kering. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985). Kandungan unsur C dan H dianalisis dengan alat *microelemental analyzer* dan diuji sifat antikankernya terhadap sel leukemia L-1210.

#### **5. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnOH]**

Trifeniltimah(IV) klorida [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnCl] sebanyak 0,03 mol (11,56 gram) direaksikan dengan 0,03 mol (1,20 gram) NaOH untuk mengganti ligan klor dengan hidroksida dalam 50 mL metanol *p.a.*, selanjutnya endapan yang dihasilkan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* No. 42, lalu dicuci dengan akuabides dan metanol *p.a.* kemudian didiamkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu untuk menghasilkan (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnOH. Kristal

(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnCl dan (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnOH dikarakterisasi dengan spektrofotometer *UV* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), spektrofotometer *IR* dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*.

#### **6. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) 3-hidroksibenzoat [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>Sn(OCOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)]**

Senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SnOH sebanyak 1,10 gram direaksikan dengan asam 3-hidroksibenzoat (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OHCOOH) sebanyak 0,41 gram dengan perbandingan mol 1:1 dalam 30 mL metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, 5 dan 6 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator selama kurang lebih 2 minggu sampai diperoleh kristal kering. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985). Kandungan unsur C dan H dianalisis dengan alat *microelemental analyzer* dan 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 seberat 10,4 g yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 L air steril (A). Kemudian 1,3 g NaHCO<sub>3</sub> 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 (C). Keperluan uji, digunakan 15 mL *calf bovine serum* yang 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 leukemia 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  $2 \times 10^6$  sel/mL.

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 ( $2 \times 10^6$  sel/mL) dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's culture* sebanyak 1 mL dalam setiap sumuran. Percobaan dilakukan triplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dalam inkubator 5%  $\text{CO}_2$  karena di udara hanya terdapat 5%  $\text{CO}_2$ .

Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer neubauer improved*. *Haemocytometer neubaur 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. Gambar 5 merupakan alat *haemocytometer neubaur improved*.



**Gambar 5.** *Haemocytometer neubauer improved*.

Untuk membedakan antara sel hidup dengan sel mati maka sebelum dilakukan penghitungan, 90  $\mu$ L suspensi dimasukkan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran) dan ditambah 10  $\mu$ L larutan 1% larutan *tryphan blue* dan dihomogenkan. Campuran sampel uji yang telah diwarnai *tryphan blue* sebanyak 10  $\mu$ L larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer neubauer improved*. 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 anti log.  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebanyak 50% setelah masa inkubasi 48 jam. Aktivitas kristal (isolat) dikatakan aktif sebagai anti kanker bila nilai  $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$  (Mans, 2000).