

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari sampai Juni 2015 di Laboratorium Kimia Anorganik-Fisik. Analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *IR* dilakukan di Laboratorium Instrumentasi FMIPA Universitas Islam Indonesia dan analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dilakukan di Laboratorium Kimia Anorganik FMIPA Universitas Lampung. Analisis spektrometer *NMR* dilakukan di *School of Chemical Science University Sains Malaysia* sedangkan analisis unsur menggunakan analisis mikroelementer dilakukan di *School of Food Technology and Chemical Science* Universiti Kebangsaan Malaysia. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas dalam laboratorium, neraca analitik, *hot plate stirrer*, kertas saring *Whatman* No. 42, desikator, spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis*, spektrometer *NMR*, dan analisis mikroelementer (analisis unsur).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah zat-zat kimia dengan PA (*Pro Analysis*) yang terdiri dari: difeniltimah(IV) oksida, dibutiltimah(IV) oksida, asam 4-Nitrobenzoat, metanol, media agar NA (*Nutrient Agar*), dan DMSO.

C. Metode Penelitian

1. Sintesis senyawa difeniltimah(IV) di(4-nitrobenzoat) (Szorcsik *et al.*, 2002)

Senyawa difeniltimah(IV) oksida $[(C_6H_5)_2SnO]$ sebanyak 0,8935 gram direaksikan dengan 1,0231 gram asam 4-nitrobenzoat ($C_6H_4(COOH)NO_2$) dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks selama 4 jam dengan pemanas pada suhu $59^\circ C$. Setelah reaksi sempurna, metanol diuapkan dan dikeringkan dalam desikator hingga diperoleh kristal kering (Hadi *et al.*, 2012). Kristal hasil senyawa dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), spektrometer *NMR* dan dianalisis kandungan unsur C, H dan N menggunakan analisis mikroelementer serta diuji sifat antibakterinya terhadap bakteri *Bacillus sp.*

2. Sintesis senyawa dibutiltimah(IV) di(4-nitrobenzoat) (Szorcsik *et al.*, 2002)

Senyawa dibutiltimah(IV) oksida $[(C_4H_9)_2SnO]$ sebanyak 0,7620 gram direaksikan dengan asam 4-nitrobenzoat ($C_6H_4(COOH)NO_2$) sebanyak 1,0231 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks selama 4 jam dengan pemanas pada suhu $59^\circ C$. Setelah reaksi sempurna,

metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering (Hadi *et al.*, 2012). Kristal hasil senyawa dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), spektrometer *NMR* dan dianalisis kandungan unsur C, H dan N menggunakan analisis mikroelementer serta diuji sifat antibakterinya terhadap bakteri *Bacillus sp.*

3. Pengujian Bioaktivitas

a. Penyiapan Media Uji

Penyiapan media uji, dilakukan dengan pembuatan NA. Sebanyak 2,8 gram NA dilarutkan dalam 100 mL aquades kemudian dipanaskan dan disterilkan dalam *autoclave* pada temperatur 90°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media NA steril kemudian dituang ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Perlakuan tersebut dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Kemudian media didinginkan agar memadat, jika tidak terlihat adanya kontaminan, maka media ini dapat digunakan untuk pengujian sampel.

b. Uji Bioaktivitas Dengan Metode Difusi Agar (Coyle, 2005)

Sebanyak 1 mata ose bakteri *Bacillus sp* diencerkan dengan 1 mL air salin kemudian digunakan sebagai suspensi bakteri. Kemudian suspensi bakteri tersebut dioleskan ke media uji menggunakan *cotton*. Sebanyak 3 kertas cakram diletakkan pada permukaan agar. Pada kertas cakram pertama diberikan senyawa awal dan

senyawa hasil sintesis dengan variasi konsentrasi 100; 200; 300; 400 ppm. Senyawa awal yang digunakan yaitu dibutyltin(IV) oksida dan difenyltin(IV) oksida, sedangkan senyawa hasil sintesis terdiri dari dibutyltin(IV) di(4-nitrobenzoat) dan difenyltin(IV) di(4-nitrobenzoat). Kertas cakram kedua diberikan kontrol negatif yaitu pelarut senyawa inhibitor. Kertas cakram terakhir diberi larutan kontrol positif yaitu *drug reference*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25-30 °C dan setelahnya diamati untuk melihat zona hambatnya. Senyawa yang memiliki konsentrasi penghambatan paling efektif kembali diuji dengan metode dilusi.

c. Uji Bioaktivitas Dengan Metode Dilusi Agar (Hadi *et al.*, 2008)

Dari hasil pengujian secara difusi didapatkan senyawa organotin(IV) 4-nitrobenzoat yang memiliki konsentrasi penghambatan paling efektif, kemudian senyawa tersebut dicampurkan ke dalam 15 mL media agar dengan variasi volume 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 mL. Kemudian campuran media dengan senyawa antibakteri disterilisasi menggunakan *autoclave* pada temperatur 90°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Suspensi bakteri *Bacillus sp.* kemudian dioleskan menggunakan *cotton* setelah media dingin dan memadat dan diinkubasi pada suhu 25-30 °C selama 24 jam. Senyawa kimia uji yang paling efektif adalah senyawa yang memiliki variasi volume kecil namun memiliki daya penghambat pertumbuhan bakteri yang besar.