

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai dengan September 2015 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 Universitas Islam Indonesia. Untuk analisis unsur yakni dengan menggunakan *microelemental analyzer* dilakukan di *School of Chemical and Food Technology*, Universiti Kebangsaan Malaysia, dan analisis senyawa menggunakan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) dilakukan di *School of Chemical Science, University in Malaysia*. Sedangkan uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gelas ukur, gelas kimia, bulp, pinset, cawan petri, erlenmeyer, pipet gondok, satu set alat refluks, *hot plate stirrer*, *desikator*, *laminar airflow*, *autoclave*, *incubator*, spektrofotometer *IR* (karakterisasi), spektrofotometer *UV-Vis*, spektrofotometer *NMR*, *microelemental analyzer* (analisis unsur).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam 3-nitrobenzoat, difeniltimah(IV) oksida, trifeniltimah(IV) hidroksida, metanol *p.a.*, akuabides, aquades, metanol, media agar NA (*Nutrient Agar*), NaCl, DMSO, bakteri *B. subtilis*.

C. Metode Penelitian

Prosedur untuk sintesis masing-masing senyawa

organotimah(IV) 3-nitrobenzoat 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 Difeniltimah(IV) di-3-nitrobenzoat [(C₆H₅)₂Sn(*m*-OCOC₆H₄NO₂)₂]

Pada sintesis ini digunakan senyawa difeniltimah(IV) oksida[(C₆H₅)₂SnO] sebanyak 0,8935 gram direaksikan dengan asam 3-nitrobenzoat (*m*-C₆H₄NO₂COOH) sebanyak 1,0128 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks selama 4 jam dengan pemanas pada suhu 58-59⁰C. Setelah reaksi sempurna dalam waktu 4 jam, senyawa hasil sintesis dimasukkan dalam botol vial, lalu metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering. Kristal senyawa hasil sintesis kemudian dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR*, spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm,

spektrofotometri *NMR*, dan *microelemental analyzer* (analisis unsur) (Sudjadi, 1985).

2. Sintesis Senyawa Trifeniltimah(IV) 3-nitrobenzoat [(C₆H₅)₃Sn(*m*-OCOC₆H₄NO₂)]

Pada sintesis ini digunakan senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida [(C₆H₅)₃SnOH] sebanyak 1,101 gram direaksikan dengan asam 3-nitrobenzoat (*m*-C₆H₄NO₂COOH) sebanyak 0,5064 gram dengan perbandingan mol 1:1 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan waktu 4 jam dengan pemanas pada suhu 58-59 °C. Setelah reaksi sempurna, metanol diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering. Kristal senyawa hasil sintesis kemudian dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* yang diukur pada panjang gelombang 190-380 nm, spektrofotometri *NMR*, dan *microelemental analyzer* (analisis unsur) (Sudjadi, 1985).

3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

a. Penyiapan Media Uji

Media uji, disiapkan dengan pembuatan NA. Sebanyak 2,8 gram NA kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades dan dipanaskan, setelah itu disterilkan dalam *autoclave* dengan pemanasan pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Pada media NA steril yang telah dibuat, kemudian dituang ke dalam cawan

petri yang telah disterilisasi sebanyak 15 mL/cawan. Perlakuan tersebut dilakukan dalam alat *Laminar Air Flow*. Kemudian media didinginkan agar memadat, dan diamati ada atau tidaknya kontaminan. Jika tidak terlihat adanya kontaminan, maka media ini dapat digunakan untuk pengujian sampel (Ismiyati, 2010).

b. Uji Bioaktivitas Dengan Metode Difusi Agar (Cara Cakram)

Disiapkan sampel dan media uji sebanyak 2-3 ose bakteri *B. subtilis* diencerkan dengan air salin yang dibuat dari akuades steril: NaCl (0,084 %) sebanyak 2 mL sebagai suspensi bakteri. Pada suspensi bakteri yang telah dibuat, kemudian dituang ke atas media NA yang telah dibuat sebelumnya dan diratakan di atas permukaan media menggunakan batang L. Sebanyak 3 kertas cakram diletakkan pada permukaan agar yang masing-masing telah ditetesi dengan larutan senyawa organotin(IV) 3-nitrobenzoat atau senyawa awal, kontrol negatif, dan satu kertas cakram yang lainnya ditetesi larutan kontrol positif sebanyak 0,8 mL, kemudian diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 25-30 °C dan diamati selama 2-3 hari untuk dilihat zona hambatnya. Senyawa yang memiliki konsentrasi penghambatan paling efektif akan kembali diuji dengan metode dilusi (Ismiyati, 2010).

c. Uji Bioaktivitas Dengan Metode Dilusi Agar

Dari hasil pengujian metode difusi didapatkan senyawa yang memiliki aktivitas dan konsentrasi penghambatan paling efektif. Kemudian senyawa dilarutkan dalam pelarut DMSO. Selanjutnya senyawa uji dicampurkan ke dalam 15 mL media agar dengan volume yang bervariasi yakni 0,5;1;1,5;2 dan 2,5 mL.

Suspensi bakteri *B. subtilis* diratakan tepat di atas permukaan media NA yang telah tercampur dengan senyawa kimia uji, kemudian diinkubasi pada suhu 25-30 °C selama 2-3 hari. Kemudian diamatai pertumbuhan bakteri setiap harinya.

Senyawa kimia uji yang paling efektif adalah senyawa yang memiliki variasi volume kecil namun memiliki daya penghambat pertumbuhan bakteri yang besar (Ismiyati, 2010).