

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juli 2013 di Laboratorium Kimia Anorganik FMIPA Universitas Lampung. Analisis senyawa menggunakan spektrofotometer *IR* dilakukan di Laboratorium Instrumentasi FMIPA Universitas Islam Indonesia dan analisis dengan spektrofotometer *UV-Vis* dilakukan di Laboratorium Kimia Anorganik dan Fisik FMIPA Universitas Lampung. 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 adalah: gelas kimia, gelas ukur, pipet tetes, batang pengaduk, corong pisah, erlenmeyer, satu set alat refluks, *hot plate stirrer*, kertas saring *Whatman* No. 42, desikator, spektrofotometer *IR Thermo Nicolet Avatar 360*, spektrofotometer *UV Cary Win UV 32*, *microelemental analyzer Fision EA 1108* (analisis unsur),

mikroskop dengan *Haemecytometer Fuch Rosental* ($0,200 \text{ nm} \times 0,0625 \text{ mm}^2$) dan alat *multiwell plate tissue culture* (uji aktivitas kanker).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dibutyltimah(IV) diklorida, difenyltimah(IV) diklorida, trifenyltimah(IV) klorida, NaOH, metanol *p.a.*, akuabides, asam 4-nitrobenzoat, toluena, 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 Bonire *et al.* (1998); Szorscik *et al.*(2002); Hadi *et al.* (2008); Hadi *et al.* (2009), dan Hadi and Rilyanti (2010).

1. Sintesis senyawa dibutyltimah(IV) oksida $[(C_4H_9)_2SnO]$

Dibutyltimah(IV) diklorida $[(C_4H_9)_2SnCl_2]$ 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.*, 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 untuk menghasilkan $(C_4H_9)_2SnO$. Kristal $(C_4H_9)_2SnCl_2$ dan $(C_4H_9)_2SnO$ dikarakterisasi dengan spektrofotometer *UV-Vis* 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-4-nitrobenzoat [(C₄H₉)₂Sn(OCOC₆H₄(NO₂)₂)]

Senyawa dibutiltimah(IV) oksida [(C₄H₉)₂SnO] sebanyak 0,747 gram direaksikan dengan asam 4-nitrobenzoat (C₆H₄NO₂)₂COOH) sebanyak 1,002 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, dan 5 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering, kristal kering tersebut dilarutkan dalam toluena dengan dibantu pemanasan hingga larut seluruhnya, lalu didinginkan dengan es dalam keadaan masih panas, senyawa murni akan mengendap, kemudian dapat dipisahkan dari pelarutnya. Setelah itu, dilakukan pengeringan kembali dengan desikator hingga diperoleh kristal dengan berat konstan. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* 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. Sebagai perbandingan, asam 4-nitrobenzoat juga dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan *UV-Vis*.

3. Sintesis senyawa difeniltimah(IV) dihidroksida [(C₆H₅)₂Sn(OH)₂]

Difeniltimah(IV) diklorida [(C₆H₅)₂SnCl₂] sebanyak 0,045 mol (15,48 gram) direaksikan dengan 0,09 mol (3,6 gram) NaOH untuk mengganti ligan klor dengan hidroksida dalam 50 mL pelarut metanol *p.a.*, selanjutnya endapan yang dihasilkan disaring dengan kertas saring *Whatman* No. 42, lalu dicuci

dengan akuabides dan metanol *p.a.* kemudian didiamkan di dalam desikator untuk menghasilkan $(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$. Kristal $(C_6H_5)_2SnCl_2$ dan $(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$ dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan *UV-Vis* 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 4-nitrobenzoat [(C₆H₅)₂Sn(OCOC₆H₄(NO₂)₂)]

Senyawa difeniltimah(IV) dihidroksida $(C_6H_5)_2Sn(OH)_2$ sebanyak 0,921 gram direaksikan dengan asam 4-nitrobenzoat $(C_6H_4(NO_2)_2COOH)$ sebanyak 1,002 gram dengan perbandingan mol 1:2 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, dan 5 jam dengan pemanas pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering, kristal kering tersebut dilarutkan dalam toluena dengan dibantu pemanasan hingga larut seluruhnya, lalu didinginkan dengan es dalam keadaan masih panas, senyawa murni akan mengendap, kemudian dapat dipisahkan dari pelarutnya. Setelah itu, dilakukan pengeringan kembali dengan desikator hingga diperoleh kristal dengan berat konstan. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tinggi dari variasi waktu refluks tersebut siap untuk di karakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985). Dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer* dan diuji sifat antikankernya terhadap sel leukimia L-1210.

5. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida [(C₆H₅)₃SnOH]

Trifeniltimah(IV) klorida [(C₆H₅)₃SnCl] sebanyak 0,045 mol (17,34 gram) direaksikan dengan 0,045 mol (1,8 gram) NaOH untuk menggantikan ligan klor dengan hidroksida dalam 50 mL pelarut 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 untuk menghasilkan (C₆H₅)₃SnOH. Kristal (C₆H₅)₃SnCl dan (C₆H₅)₃SnOH dikarakterisasi dengan spektrofotometri *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 190-380 nm (Sudjadi, 1985), dan dianalisis kandungan unsur C dan H dengan alat *microelemental analyzer*

6. Sintesis senyawa trifeniltimah(IV) 4-nitrobenzoat [(C₆H₅)₃Sn(OCOC₆H₄(NO₂)₂)

Senyawa trifeniltimah(IV) hidroksida (C₆H₅)₃SnOH sebanyak 1,101 gram direaksikan dengan asam 4-nitrobenzoat (C₆H₄(NO₂)₂COOH) sebanyak 0,501 gram dengan perbandingan mol 1:1 dalam 30 mL pelarut metanol *p.a.* dan direfluks dengan variasi waktu 3, 4, dan 5 jam dengan pemanasan pada suhu 60°C. Setelah reaksi sempurna, metanol *p.a.* diuapkan dan dikeringkan di dalam desikator sampai diperoleh kristal kering, kristal kering tersebut dilarutkan dalam toluena dengan dibantu pemanasan hingga larut seluruhnya, lalu didinginkan dengan es dalam keadaan masih panas, senyawa murni akan mengendap, kemudian dapat dipisahkan dari pelarutnya. Setelah itu, dilakukan pengeringan kembali dengan desikator hingga diperoleh kristal dengan berat konstan. Kristal hasil senyawa dengan rendemen tertinggi dari

variasi waktu refluks tersebut siap untuk dikarakterisasi dengan spektrofotometer *IR* dan spektrofotometer *UV-Vis* 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.

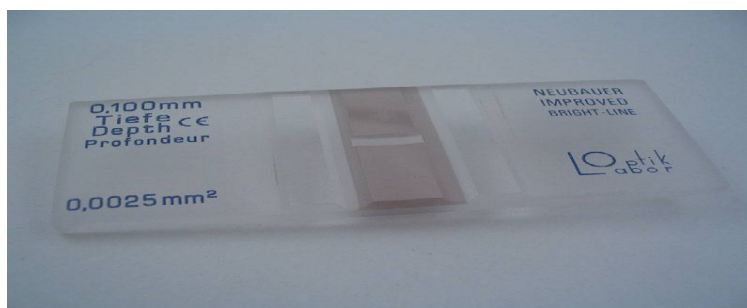
7. Pengujian Aktivitas Antikanker terhadap Sel Leukemia L-1210

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 gram yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 liter air steril (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 (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 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 2×10^6 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 (2×10^6 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 .

Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer Neubauer improved*. 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*. *Haemocytometer Neubauer improved* merupakan sebuah alat yang digunakan untuk menghitung atau menentukan jumlah sel per satuan volume. Suspensi sel dimasukan dalam ruang tersebut, dan suspense harus cukup encer agar sel atau partikel lain tidak tumpang tindih di *grid* dan harus merata (Caprette, 2007). Alat *haemocytometer Neubauer improved* dapat dilihat pada Gambar 4 berikut.



Gambar 4. *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 $y = a + bx$. Dengan 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 $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$.