

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Dalam melakukan penelitian ini, peneliti menggunakan penelitian yang termasuk gabungan dari penelitian jenis eksperimental laboratorik dan eksperimental komputasi. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yang terdiri dari, tahap preparasi, tahap sintesis, dan tahap optimasi menggunakan komputasi. Untuk menguji metode sintesis yang digunakan peneliti menggunakan tahap preparasi sintesis. Metode yang digunakan dapat dikatakan benar apabila didapatkan rendemen GVT-0, sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya. Tahap kedua adalah tahap sintesis, tahapan yang dapat dilakukan oleh peneliti jika metode yang digunakan telah dinyatakan benar pada tahap preparasi sintesis. Tahapan sintesis adalah tahapan yang dilakukan peneliti dalam membuat sampel GVT-0 dengan perbedaan kadar katalis asam, perbandingan *starting material*, dan lama pemanasan yang digunakan. Tahapan akhir dari penelitian ini adalah tahap optimasi menggunakan komputasi yang digunakan peneliti untuk melihat jumlah eksperimental yang efisien dalam hal waktu dan biaya serta melihat kondisi optimum sintesis GVT-0.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Dalam melakukan penelitian ini, peneliti melaksanakan penelitian dari bulan Juni sampai Desember 2016 di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan

Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Kadar asam klorida pekat yang digunakan sebagai katalisator, *ratio starting material*, dan lama pemanasan sintesis GVT-0.
2. Variabel Tergantung : Hasil rendemen sintesis senyawa GVT-0
3. Variabel Terkendali : Suhu pemanasan sintesis GVT-0 dan kondisi analisis.
4. Variabel Tidak Terkendali : Pelarut etanol dan lama pengadukan.

### D. Definisi Operasional

Variabel operasional dari penelitian aplikasi *response surface methodology* pada optimasi sintesis senyawa antikanker gamavuton-0 (GVT-0) adalah :

1. Variabel bebas adalah variabel yang ditentukan didalam penelitian yaitu kadar asam klorida pekat 37% yang digunakan sebagai katalisator, *ratio starting material* vanilin dan aseton, dan lama pemanasan sintesis GVT-0 diatur dengan skala suhu 4,5 *heating mantel*.
2. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel lainnya, dalam penelitian ini variabel tergantung menggunakan hasil rendemen sintesis senyawa GVT-0.
3. Variabel terkendali adalah variabel yang dikendalikan dalam penelitian, yaitu pada suhu pemanasan sintesis GVT-0 dan kondisi analisis.

4. Variabel tidak terkendali adalah variabel yang tidak dapat dikendalikan dalam penelitian, yaitu jumlah pelarut etanol yang dibutuhkan untuk melarutkan vanilin sebelum sintesis dilakukan dan lama pengadukan untuk melarutkan vanilin.
5. Gamavuton-0 (GVT-0) adalah senyawa analog kurkumin yang mempunyai aktivitas biologis sebagai anti kanker dari aseton dan vanilin dengan menggunakan reaksi Claisen-Schmidt.
6. Optimasi kondisi optimum pada sintesis GVT-0 menggunakan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0* yaitu aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM).

#### **E. Instrumen Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan alat dan bahan sebagai berikut:

##### **1. Alat**

- a. Sintesis dan pemurnian GVT-0

Alat yang digunakan berupa alat-alat gelas yang sering digunakan, yaitu gelas Beker Pyrex, labu alas bulat Pyrex, corong, corong Buchner, cawan porselen, *heating mantle* KDM-1000<sup>®</sup>, kondensor, mortir, stamper, kertas saring (*whatman* 40), neraca analitik, propipet, mikropipet Socorex swiss, pipet ukur 1, 5, dan 10 ml, *white tip*, pH indikator universal, plat KLT silika gel 60 GF<sub>254</sub>, bejana untuk KLT, FTIR-8201PC<sup>®</sup>, Melting Point Apparatus DMP100, Spektrofotometri UV-Vis Double Beam Jasco v730, Densitometri Camag.

b. Optimasi kondisi optimum pada sintesis GVT-0

Alat yang digunakan untuk optimasi kondisi optimum pada sintesis GVT-0 menggunakan seperangkat komputer dengan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0* yaitu aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM).

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vanilin teknis (Brataco<sup>®</sup>), asam klorida pekat 37% (Merck<sup>®</sup>), asam asetat glasial (Brataco<sup>®</sup>), aseton pro sintesis (Sigma Aldrick<sup>®</sup>), etanol pro analisis (Sigma Aldrick<sup>®</sup>), Na sulfat anhidrat (Brataco<sup>®</sup>), aquades (Brataco<sup>®</sup>), dan Kloroform pro analisis (Merck<sup>®</sup>).

## F. Cara Kerja

### 1. Sintesis Gamavuton-0 (GVT-0)

Sintesis Gamavuton-0 (GVT-0) dilakukan menggunakan metode yang pernah dilakukan oleh penelitian sebelumnya yaitu metode SAMTISAR (Samboedi-Timmerman Sardjiman) yang telah dimodifikasi. Metode ini menggunakan aseton dan vanillin sebagai *starting material* GVT-0 dan asam klorida sebagai senyawa katalis pemberi suasana asam pada proses sintesisnya. Proses sintesis dilakukan dengan menggunakan perbandingan *starting material* vanilin : aseton yaitu seperti pada tabel 3 hasil desain eksperimen. Langkah – langkah yang dilakukan adalah menyiapkan larutan vanilin menggunakan ethanol

dalam gelas Beaker. Pelarutan dilakukan dengan menggunakan bantuan mortir dan stamper. Selain itu dipersiapkan juga larutan aseton yang telah dicampur dalam asam klorida, caranya dengan mencampurkan 10 ml aseton dengan kadar variasi asam klorida yang telah ditentukan seperti pada tabel 3 hasil desain eksperimen. Setelah itu campur larutan vanilin dengan aseton dengan mengikuti variasi perbandingan *starting material* vanilin : aseton yang telah ditentukan. Aseton asam 1 ml (0,01361mol) dan larutan vanilin dimasukkan dalam labu alas bulat. Pasang dan *setting* kondensor diatas labu alas bulat dan *heating mantle* dibawah labu alas bulatnya. Buat air yang mengalir kondensor selalu dingin. *Heating mantle* disetting pada skala panas 4,5. Lakukan pemanasan sesuai dengan tabel 3 hasil desain eksperimen. Hasil yang didapat berupa larutan kuning sedikit kecoklatan. Setelah pemanasan selesai labu alas bulat diambil, ditutup mulutnya lalu didinginkan sehari dalam lemari pendingin. Setelah didinginkan hasil yang didapat berupa larutan kuning agak kecoklatan dengan sedikit kristal.

## **2. Isolasi Senyawa Gamavuton-0 ( GVT-0 )**

Untuk isolasinya dilakukan dengan cara maserasi sampel. Sampel yang telah didinginkan dipisahkan menggunakan corong pisah. Sampel dimasukkan dalam corong pisah, lalu ditambahkan kloroform. Gojog sampai bentuk kristal hilang, pisahkan fase kloroformnya. Ambil fase kloroformnya dalam cawan porselen lalu berikan sedikit Na sulfat anhidrat dan aduk. Hilangkan pelarutnya dengan melakukan pemanasan

menggunakan penangas air sampai tersisa residu hitam hijau tua pekat. Campurkan sedikit asam asetat glasial lalu aduk. Setelah itu tambahkan aquades dingin dalam cawan porselen sampai bau asam asetat glasial hilang. Panaskan aquades sampai pada suhu 70-80°C, lalu masukkan sedikit demi sedikit aquades yang telah dipanaskan tersebut dalam cawan porselen dan aduk. Rendemen akan meleleh menjadi bentuk kental, aduk selama 1 menit lalu saring. Rendemen yang didapat dapat dikeringkan dengan diangin-anginkan atau dengan menggunakan oven. Hitung rendemen yang didapat

### **3. Analisis Kemurnian dan Elusidasi Struktur**

#### **a. Kromatografi Lapis Tipis ( KLT )**

Hasil KLT yang didapatkan dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan Densitometri. Deteksi yang dilakukan menggunakan sinar UV-Vis pada  $\lambda$  200-800 nm untuk mengetahui panjang gelombang maksimum yang diserap oleh vanilin dan GVT-0.

Dalam uji analisis KLT ini peneliti melarutkan sejumlah senyawa hasil pemurnian dengan etanol, selanjutnya senyawa tersebut ditotolkan di lempeng silika gel GF 254 dengan menggunakan pipa kapiler, kemudian di elusi menggunakan bejana yang berisi fase gerak kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 5 : 1. Menggunakan vanilin sebagai standar atau pembanding dengan jarak elusi 8cm. Nilai  $R_f$  GVT-0 dan vanilin yang dihitung menggunakan Persamaan (4)

**b. Densitometri**

Uji kualitatif menggunakan densitometri merupakan tindak lanjut dari uji KLT. Dimana lempeng KLT yang sudah didapatkan nilai  $R_f$  nya lalu dianalisa dengan densitometri untuk mengetahui serapan panjang gelombang dari vanilin dan GVT-0.

**c. Spektrofotometri UV-Vis**

Tujuan peneliti menggunakan uji analisis spektrofotometri UV-Vis dalam penelitian ini adalah peneliti dapat memperoleh hasil analisis berupa kromatogram yang menggambarkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa yang diuji. Analisis spektrofotometri UV-Vis dalam penelitian ini menggunakan hasil senyawa yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam etanol dan vanilin yang dilarutkan dalam etanol, kemudian kedua senyawa tersebut dianalisis dengan spektrofotometri menggunakan kuvet, setelah itu peneliti akan melihat kromatogram yang diperoleh.

**d. Titik Lebur**

Hasil yang diperoleh dari uji kualitatif menggunakan Melting Point Apparatus DMP 100 adalah untuk mengetahui rentang temperatur dari pertama kali kristal dari meleleh hingga kristal meleleh sempurna.

#### 4. Optimasi Aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM)

Desain eksperimen adalah pendekatan sistematika dalam investigasi dari suatu sistem atau proses. Dalam penelitian berbasis eksperimen menggunakan metode konvensional, untuk menginvestigasi efek dari setiap faktor dilakukan dengan memvariasi variabel faktor yang dipelajari dan menjaga konstan untuk faktor-faktor yang lain. Dengan metode ini mempunyai kelemahan yaitu memerlukan jumlah eksperimen yang sangat banyak. Sebagai contoh apabila kita akan mempelajari 6 faktor dengan 7 variabel, maka total dari jumlah eksperimen adalah  $7^6$  yang berarti 117649 eksperimen harus dilakukan, yang berarti akan memerlukan banyak waktu dan bahan untuk eksperimen. Dengan mengaplikasikan desain eksperimen maka masalah ini akan bisa diatasi. Dalam melakukan optimasi sintesis GVT-0 dalam penelitian ini digunakan RSM, yang nantinya dapat memberikan gambaran pasti jumlah eksperimen dan kondisi optimum sintesis GVT-0 yang dapat menghasilkan rendemen GVT-0 maksimal.

Desain eksperimen dalam optimasi sintesis gamavuton-0 (GVT-0) terdiri dari tiga faktor yaitu kadar katalis asam klorida 37%, raw *starting material*, dan lama pemanasan. Desain eksperimen tersebut dibuat dengan menggunakan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0* yaitu Aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM).

Faktor-faktor yang digunakan dalam optimasi sintesis GVT-0 melalui desain eksperimen Box Benhken RSM adalah faktor katalis dengan kadar terendah 40 mikroliter dan kadar tertinggi 60 mikroliter, faktor

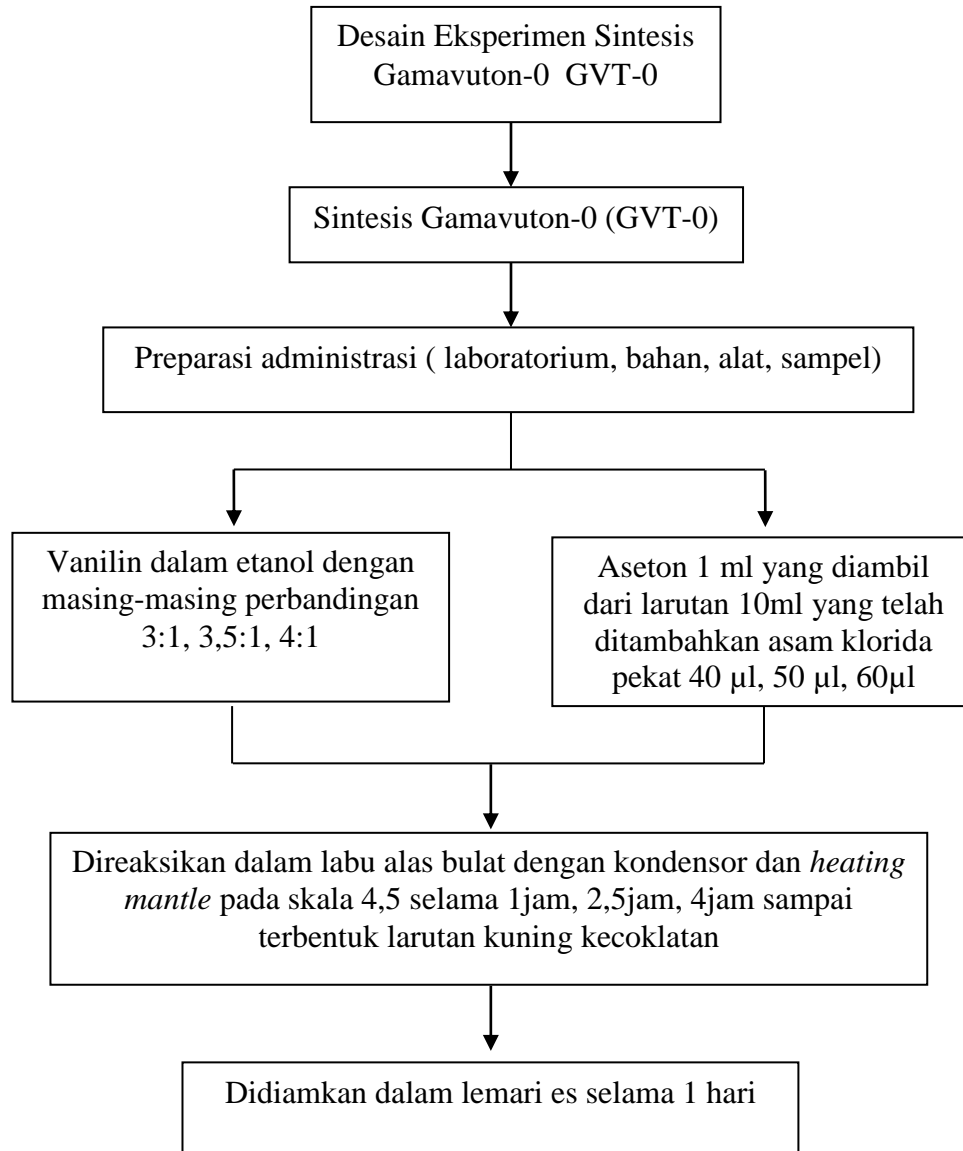


perbandingan mol raw starting material dengan kadar terendah 3 dan tertinggi 4, serta faktor lama pemanasan dengan waktu terendah 1 jam dan waktu tertinggi 4 jam. Respon yang diharapkan dari desain eksperimen tersebut adalah hasil rendemen yang maksimum dalam miligram dengan melakukan percobaan sebanyak 15 kali sesuai dengan desain eksperimen yang sudah diperoleh. Desain eksperimen Box Benhken sintesis GVT-0 dapat dilihat pada Tabel 3.

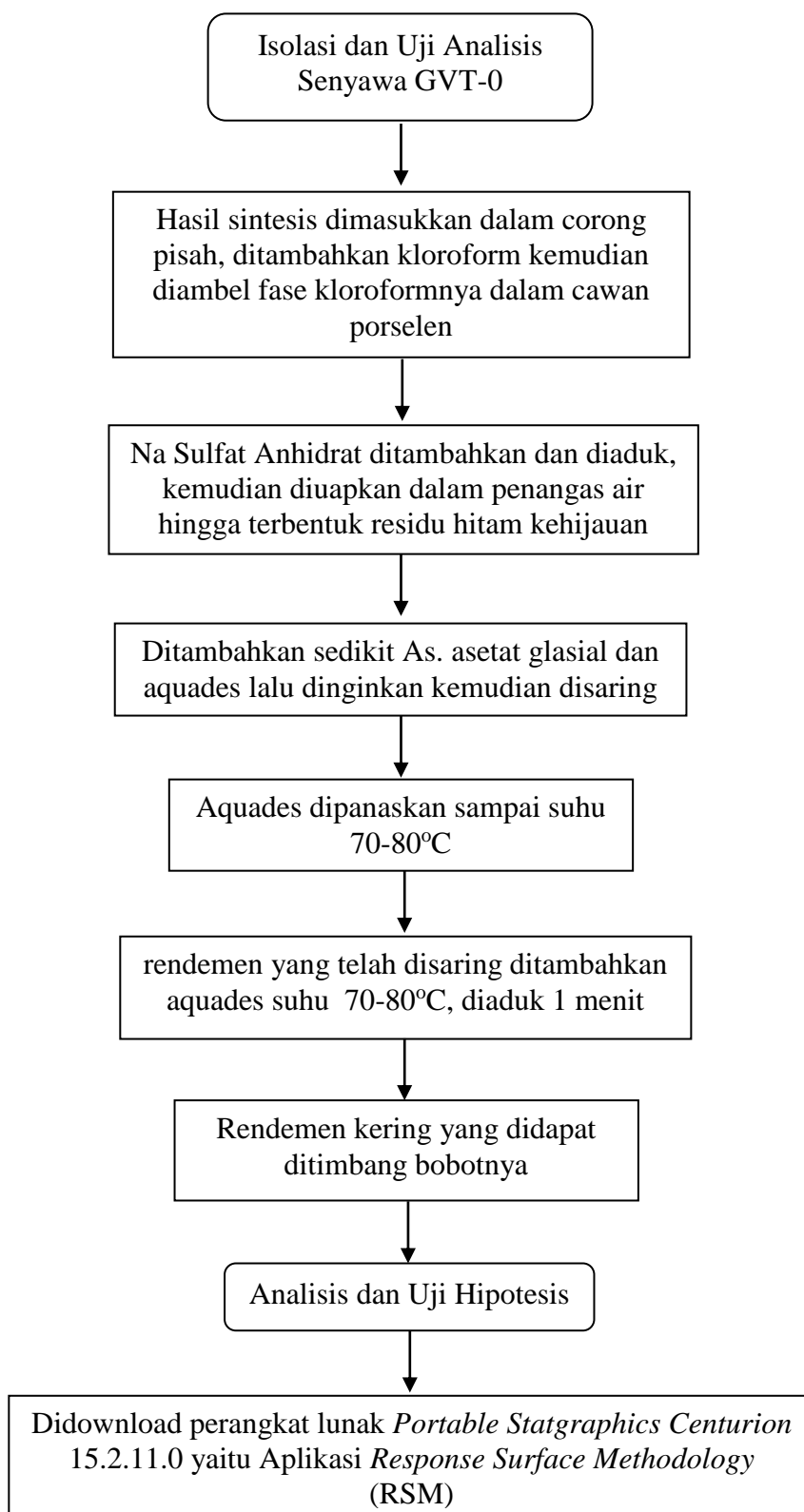
Percobaan Ke	Starting Material	Katalis ( $\mu$ l)	Waktu Lama Pemanasan (Jam)
1	4	40	2,5
2	3	60	2,5
3	4	60	2,5
4	3	40	2,5
5	4	50	1
6	3,5	60	1
7	4	50	4
8	3	50	1
9	3,5	40	1
10	3	50	4
11	3,5	50	2,5
12	3,5	50	2,5
13	3,5	50	2,5
14	3,5	40	4
15	3,5	60	4

**Tabel 2. Desain Eksperimen Sintesis GVT-0**

### G. Skema Langkah Kerja



**Gambar 7. Desain dan Sintesis GVT-0**



**Gambar 8. Isolasi dan Optimasi GVT-0**

## H. Analisis Data

Dalam penelitian ini akan dilakukan uji kualitatif, diantaranya uji KLT, Densitometri, Spektrofotometri UV-Vis, dan Titik Lebur. Uji kualitatif ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa yang diduga GVT-0. Sedangkan untuk uji kuantitatif dalam penelitian ini akan dilakukan dengan menimbang berat GVT-0 hasil sintesis. Optimasi berbagai kadar katalis asam, perbandingan *raw starting material*, dan lama pemanasan pada sintesis senyawa GVT-0 menggunakan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0* yaitu aplikasi *Response Surface Methodology* (RSM). Dalam menggunakan aplikasi RSM ini, akan mempermudah peneliti untuk menemukan jumlah eksperimen secara pasti dan kondisi optimum sintesis GVT-0 yang dapat menghasilkan rendemen maksimal sehingga dapat mempersingkat waktu dan menghemat biaya.