

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini termasuk gabungan dari penelitian jenis eksperimental laboratorik dan eksperimental komputasi. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu tahap preparasi sintesis, tahap sintesis dan tahap optimasi menggunakan komputasi. Tahap preparasi sintesis dilakukan untuk menguji metode sintesis yang digunakan. Metode dikatakan benar apabila didapatkan rendemen GVT-0, sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya. Tahap sintesis dilakukan peneliti jika metode yang digunakan telah dinyatakan benar pada tahap preparasi sintesis. Tahapan sintesis adalah tahapan peneliti membuat sampel GVT-0 dengan perbedaan kadar katalis asam yang digunakan. Tahapan terakhir dari penelitian ini adalah tahap optimasi menggunakan komputasi yang digunakan untuk melihat pengaruh dari variasi kadar katalis asam yang digunakan dalam sintesis, serta melihat kadar optimum katalis asam yang digunakan dalam sintesis.

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

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2014 sampai Januari 2015, di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Terpadu Farmasi Universitas Ahmad Dahlan dan Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Kadar asam klorida pekat yang digunakan sebagai katalisator.
2. Variabel tergantung : Hasil rendemen sintesis senyawa GVT-0
3. Variabel terkendali : Ratio perbandingan vanilin dan aseton, lama pemanasan, serta suhu pemanasan sintesis GVT-0

### D. Variabel Operasional

Variabel operasional dari penelitian pengaruh kadar katalis asam pada rendemen sintesis senyawa antikanker gamavuton-0 (GVT-0) adalah :

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar asam klorida pekat yang digunakan sebagai katalisator sintesis senyawa GVT-0. Asam klorida pekat 37 % yang digunakan berasal dari Merck dan khusus untuk sintesis.
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah hasil rendemen sintesis senyawa GVT-0 dari senyawa *starting material* aseton dan vanilin dengan menggunakan katalis asam dengan kadar yang bervariasi
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah ratio perbandingan vanilin dan aseton yang digunakan (2:1). Berdasarkan perbandingan ratio tersebut, jumlah vanilin yang digunakan adalah 4,141 gram dan vanilin 1 ml. Selain itu suhu dan lamanya pemanasan diatur menggunakan skala suhu 4,5 *heating mantel* dalam waktu 1,5 jam.

## E. Instrumen Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan bahan dan alat-alat sebagai berikut :

1. Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat gelas yang lazim digunakan, yaitu gelas Beker Pyrex, tabung reaksi Pyrex, Erlenmeyer Pyrex, labu alas bulat, stirrer, corong, corong pisah), kondensor, *mantel heat*, cawan porselen, kertas saring (*Whatman* 40), Neraca analitik, pipet ukur 1 dan 5ml, propipet, mikropipet, plat KLT GF<sub>254</sub>, bejana untuk KLT, kapiler untuk menotolkan sampel, Spektroskopi IR Shimazu FTIR 8201PC, TLC Scanner 4 CAMAG
2. Bahan penelitian yang digunakan adalah vanilin pro sintesis, aseton pro sintesis (Merck), HCl pekat 37% (Merck), Asam asetat glasial (Merck), Na sulfat anhidrat, kloroform pro analisis (Merck), etanol p.a (Merck) dan Aquades.

## 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 vanilin 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, 2:1. Langkah-langkah yang dilakukan adalah menyiapkan menyiapkan larutan vanilin

dengan melarutkan 4,141 gr vanilin menggunakan 8 ml etanol dalam gelas Erlenmeyer. Pelarutan dilakukan dengan menggunakan bantuan *magnetic stirrer* dengan kecepatan pada skala 4. 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 (20  $\mu$ l, 40  $\mu$ l, 60 $\mu$ l, dan 80 $\mu$ l). Setelah itu larutan vanilin dengan aseton dicampur dengan mengikuti perbandingan *starting material* vanilin : aseton (2:1). Aseton-HCl 1 ml dan larutan vanilin dimasukkan dalam labu alas bulat. Kondensor dipasang dan diatur diatas labu alas bulat dan *mantel heat* dibawah labu alas bulatnya. Air yang mengalir kondensor dibuat selalu dingin. *Mantel heat* diatur pada skala panas 4,5. Pemanasan dilakukan selama 1,5 jam. 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. Larutan digojog sampai bentuk kristal hilang dan pisahkan fase kloroformnya. Fase kloroform dimasukkan dalam cawan porselen lalu diberikan sedikit Na sulfat anhidrat dan aduk. Pelarut dihilangkan dengan melakukan pemanasan menggunakan penangas air sampai tersisa residu hitam hijau tua pekat. Sedikit asam asetat glasial dicampurkan dalam cawan porselen lalu diaduk. Setelah itu, cawan porselen ditempatkan dalam air es dan

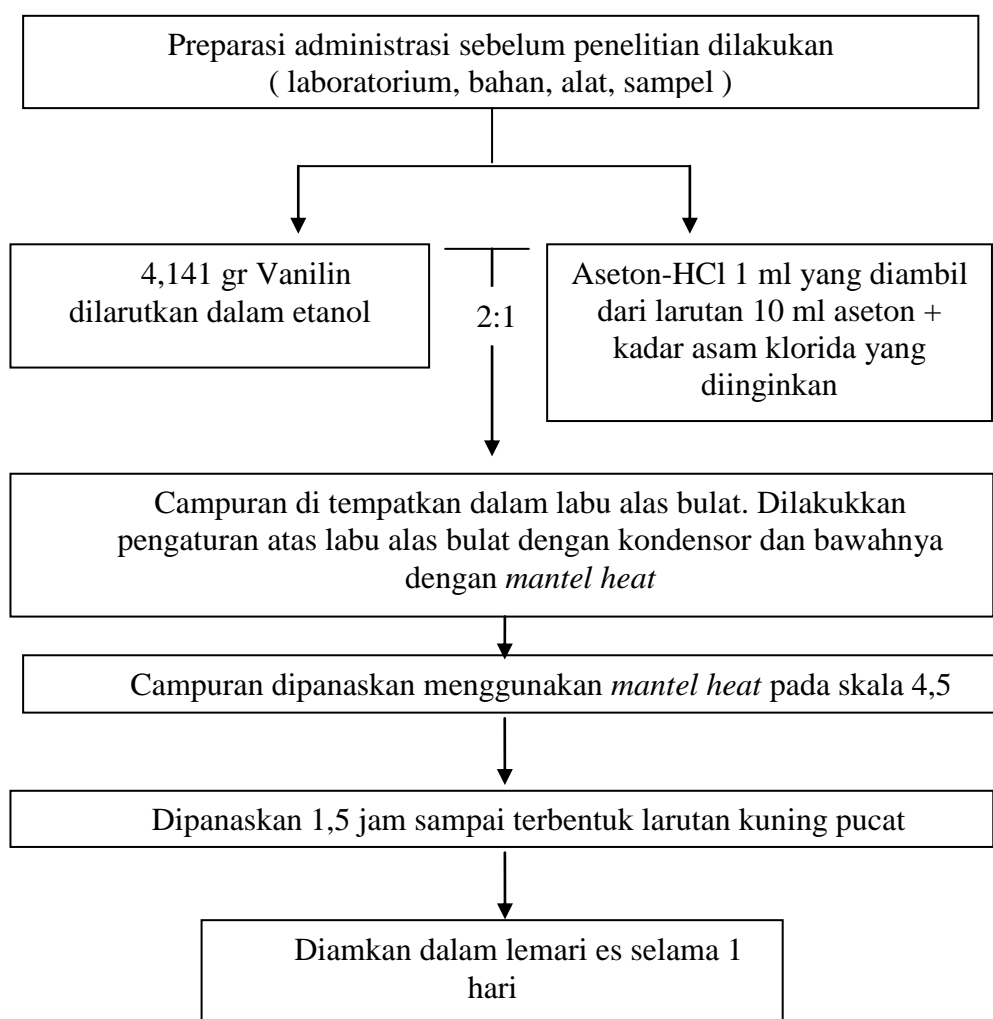
aquadest dicampurkan dalam cawan porselen sampai bau asam asetat glasial hilang. Kemudian disaring dengan cepat dalam keadaan dingin dengan corong *buchner*. Sambil menunggu rendemen kering, aquadest dipanaskan sampai pada suhu 70-80°C. Rendemen yang telah kering lalu dimasukkan dalam gelas beker, lalu dimasukkan sedikit demi sedikit aquadest yang telah dipanaskan tersebut dan diaduk. Rendemen akan meleleh menjadi bentuk kental. Rendemen diaduk selama 1 menit lalu disaring. Rendemen yang didapat dikeringkan dengan diangin-anginkan atau dengan menggunakan oven. Rendemen yang didapat dihitung.

### **3. Optimasi menggunakan Regresi Polinomial Orde Dua dan Uji Hipotesis**

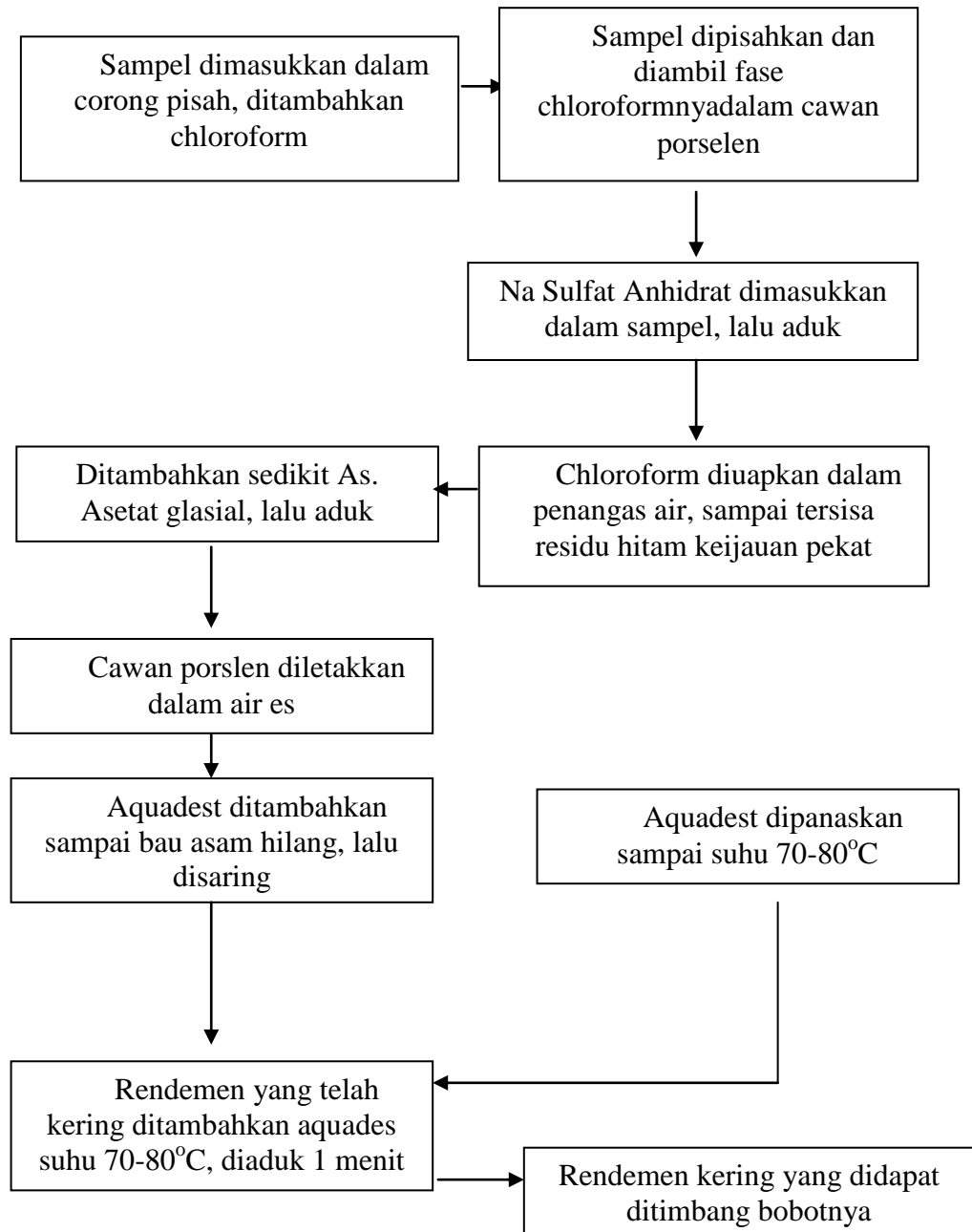
Optimasi proses sintesis dilakukan dengan menggunakan software *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*. Sebelum memasukkan data, dibuat pengaturan *acceptable quality level* menjadi 10%. Perubahan ini akan mengubah parameter penerimaan data hasil regresi polinomial orde dua dan uji *one-way Anova* dari 0,05 menjadi 0,1 dengan ketepatan hasil 90%. Data dimasukkan dalam lembar data. Pilih *improve* lalu pilih *regression analysis*, pilih *one factor*, pilih *polynomial regression*. Data kadar dimasukkan dalam kolom X dan rendemen yang dihasilkan dalam kolom Y lalu klik ok. Lembar hasil yang didapat menunjukkan kurva hubungan rendemen yang didapat dengan kadar asam yang diberikan, *One-way Anova*, fungsi regresi polinomialnya, serta interpretasi hasil untuk melihat kebermaknaan data yang didapat. Rumus fungsi regresi polinomial pada lembar hasil tersebut dapat digunakan untuk prediksi rendemen yang didapat secara teoritis apabila diberikan kadar asam tertentu.

### G. Skema langkah kerja

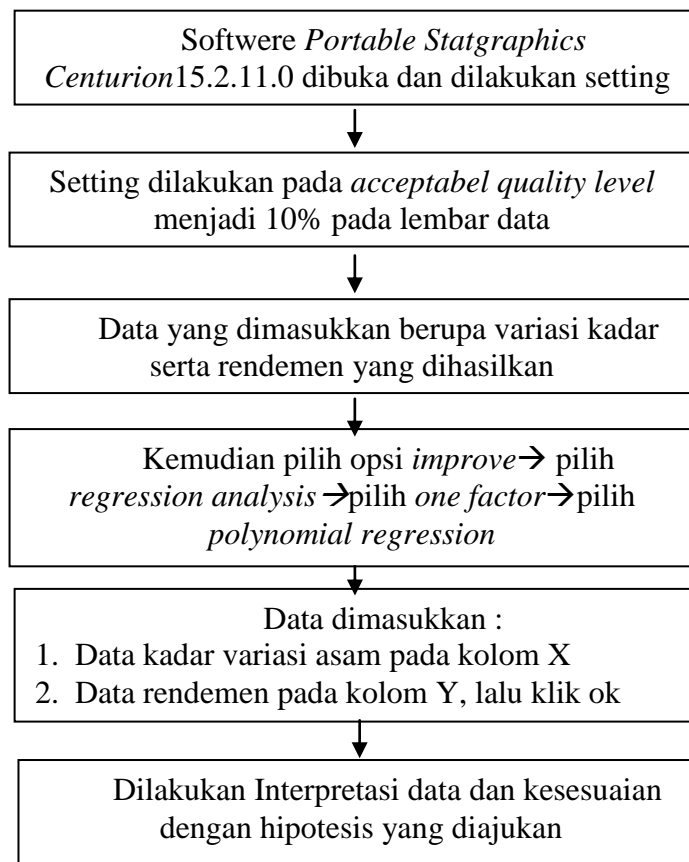
Penelitian ini secara eksperimental terbagi menjadi dua uji, yaitu uji secara laboratorium dan uji teoritis komputasi untuk mencari kadar optimal katalis asam dan kadar teoritis rendemen GVT-0 yang akan didapat. Dalam uji laboratorium termasuk didalamnya adalah sintesis GVT-0, isolasi GVT-0 dari rendemen yang didapat, dan analisis serta perhitungan hasil rendemen. Adapun langkah kerja tersebut bisa dilihat pada Gambar 7, Gambar 8, dan Gambar 9.



**Gambar 7.** Skema Uji Laboatorium 1 (sintesis GVT-0)



**Gambar 8.** Skema Uji Laboratorium 2 (isolasi GVT-0)



**Gambar 9.** Analisis Regresi Polinomial Orde Dua dan Uji Hipotesis Data

#### H. Analisis data

Hasil dari eksperimen berdasarkan desain eksperimen yang sudah dilakukan kemudian dianalisis menggunakan statistik software “*Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*” untuk menentukan variabel yang mempengaruhi besarnya rendemen dan juga untuk mengetahui efek dari masing-masing faktor dan juga standar deviasi dari masing-masing data terhadap model yang sudah ditetapkan (Persamaan 1). Kualitas dari data terhadap Persamaan 1 ditentukan dengan besarnya nilai  $R^2$ . Nilai signifikansi data dicari dengan melakukan analisis dengan analysis of variance (ANOVA), dengan nilai “probability” 10% (Lin *et al.*, 2009).