

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dan eksperimental komputasi. Adapun tahapan dari penelitian ini yaitu : Proses sintesis senyawa dan optimasi.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus tahun 2014 sampai Februari 2015, di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Varasi perbandingan vanilin dan aseton.
2. Variabel tergantung : GVT-0 hasil sintesis.
3. Variabel terkendali : Katalis asam, suhu pemanasan, dan lama pemanasan.
4. Variabel tidak terkendali : Pelarut Etanol dan lama pengadukan.

D. Definisi Operasional

1. Variabel bebas adalah variabel yang ditentukan di dalam penelitian yaitu variasi perbandingan vanilin dan aseton.
2. Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel lainnya yaitu GVT-0 hasil sintesis.
3. Variabel terkendali adalah variabel yang dikendalikan dalam penelitian ini yaitu katalis asam, suhu pemanasan dan lama pemanasan.

4. Variabel tidak terkontrol adalah variabel yang tidak bisa dikendalikan dalam sintesis yaitu jumlah pelarut etanol yang diperlukan untuk melarutkan vanilin sebelum sintesis dan lama pengadukan untuk melarutkan etanol.
5. Gamavuton-0 (GVT-0) merupakan senyawa analog turunan kurkumin yang mempunyai aktivitas antikanker.
6. Sintesis GVT-0 menggunakan reaksi Claisen-Schmidt dengan katalis asam.
7. Optimasi nilai maksimum pada sintesis perbandingan bahan penyusun sintesis GVT-0 menggunakan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

a. Sintesis dan pemurnian GVT-0

Alat yang digunakan untuk sintesis senyawa GVT-0 adalah gelas Beker Pyrex, tabung reaksi Pyrex, Erlenmeyer Pyrex, labu alas bulat Pyrex, corong, corong pisah, cawan petri, kondensor, *magnetic stirrer* CIMAREC[®], *mantle heat* KDM-1000[®], kertas saring, neraca analitik Mettler Toledo[®], pipet ukur 1 dan 5ml, propipet, *white tip*, pH indikator universal, mikropipet Socorex swiss, pelat KLT silika gel 60 GF₂₅₄, *chamber* KLT, spektroskopi IR Shimadzu[®], FTIR-8201PC[®], TLC SCANNER 4 CAMAG[®].

b. Optimasi nilai maksimum

Alat yang digunakan untuk optimasi nilai maksimum menggunakan sebuah komputer yang dilengkapi dengan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion* 15.2.11.0.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada sintesis GVT-0 adalah vanilin teknis (Brataco[®]), aseton pro sintesis (Sigma Aldrick[®]), asam klorida pekat 37% (Merck[®]), Asam asetat glasial (Brataco[®]), Na sulfat anhidrat (Brataco[®]), Kloroform pro analisis (Merck[®]), etanol pro analisis (Sigma Aldrick[®]) dan Aquades (Brataco[®]).

F. Cara Kerja

1. Sintesis Gamavuton-0 (GVT-0)

Sintesis GVT-0 menggunakan metode SAMTISAR (Samhoedi-Timmerman-Sardjiman) yang telah dilakukan modifikasi. Pada sintesis GVT-0 dengan *starting material* vanilin dan aseton menggunakan reaksi kondensasi Claisen-Schmidt. Sintesis GVT-0 dilakukan dengan perbandingan vanilin dan aseton 2:1 ; 3:1, 4:1 dan 5:1. Vanilin dilarutkan dalam etanol 96% dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut. Aseton ditambahkan asam klorida pekat (HCl) sebagai katalis pada reaksi tersebut. Kemudian direaksikan di dalam labu alas bulat dengan pemanasan menggunakan *heating mantle* dan kondensor sebagai pendingin. Reaksi ini dijalankan selama 1,5 jam. Hasil dari reaksi tersebut terbentuk senyawa berwarna kuning

kecoklatan. Proses selanjutnya adalah didinginkan pada suhu 1-4°C selama 12 jam.

2. Pemurnian Gamavuton-0 (GVT-0)

Pemurnian senyawa dilakukan dengan metode maserasi. Setelah didinginkan selama 12 jam akan terdapat kristal. Langkah selanjutnya adalah ditambahkan kloroform sampai kristal larut kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Fase kloroform ditampung di dalam cawan porselen. Cawan porselen yang berisi senyawa GVT-0 ditambahkan Na-Sulfat anhidrat kemudian diuapkan menggunakan penangas air hingga terbentuk residu berwarna hitam kehijauan.

Residu yang berwarna hitam kehijauan tersebut ditambahkan asam asetat glasial hingga larut setelah itu dilanjutkan penambahan aquades hingga terbentuk senyawa kristal kuning kehijauan. Senyawa berbentuk kristal tersebut disaring menggunakan corong dengan kertas saring dan dibilas menggunakan aquades hingga bau asam asetat glasial hilang. Senyawa yang telah disaring kemudian dimasukkan ke dalam *Beaker glass* dan ditambahkan aquades panas suhu 70-80°C lalu diaduk hingga larut dan terdapat senyawa berwarna kuning kecoklatan dan disaring menggunakan kertas saring kemudian hasil dikeringkan dan ditimbang.

3. Analisis Kemurnian dan Elusidasi Struktur.

a. Spektrofotometri UV-Vis.

Hasil senyawa yang telah dimurnikan dilarutkan ke dalam etanol. Hal yang sama dilakukan pada vanilin. Kemudian masing-masing dianalisis

dengan spektrofotometri UV-Vis menggunakan kuvet. Hasil yang didapat berupa kromatogram yang menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa yang diuji.

b. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sejumlah senyawa hasil pemurnian dilarutkan dalam etanol. Kemudian ditotolkan di lempeng silka gel GF 254 menggunakan pipa kapiler kemudian di elusi menggunakan bejana yang berisi fase gerak kloroform dan etil setat dengan perbandingan 5 : 1. Jarak elusi 8 cm serta menggunakan vanilin sebagai standar atau pembanding. Deteksi dilakukan dengan sinar tampak dan sinar UV pada λ 254 dan 366, nilai R_f GVT-0 dan vanilin dihitung menggunakan Persamaan (3). Hasil KLT yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan Densitometri. Deteksi dilakukan dengan menggunakan sinar UV dan sinar tampak untuk mengetahui panjang gelombang maksimum yang diserap oleh vanilin dan GVT-0.

c. Elusidasi gugus fungsi dengan (FTIR)

Senyawa GVT-0 dan vanilin yang berbentuk serbuk dibentuk pelet KBr dengan cara dikempa, kemudian pelet dianalisis dengan FTIR. Analisis menggunakan FTIR bertujuan untuk melihat gugus fungsional dari GVT-0 hasil sintesis dan vanilin sebagai standarnya.

4. Optimasi perbandingan *starting material*.

Optimasi perbandingan *starting material* dilakukan dengan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*. Analisis yang digunakan

adalah regresi polinomial orde 2 dan uji ANOVA. Analisis dilakukan dengan memasukkan perbandingan *starting material* pada kolom X dan berat GVT-0 hasil sintesis pada kolom Y. Analisis ini bertujuan untuk mendapatkan nilai optimal dari perbandingan vanilin dan aseton. Analisis data yang dihasilkan berupa kurva hubungan perbandingan *starting material* dengan berat GVT-0. Selain itu akan dapat dilihat apakah perubahan perbandingan *starting material* akan mengubah berat GVT-0 hasil secara signifikan. Selanjutnya, berdasarkan kurva hubungan perbandingan *starting material* dengan berat GVT-0 akan bisa didapatkan nilai optimal dari perbandingan *starting material* untuk menghasilkan berat GVT-0 yang maksimal.

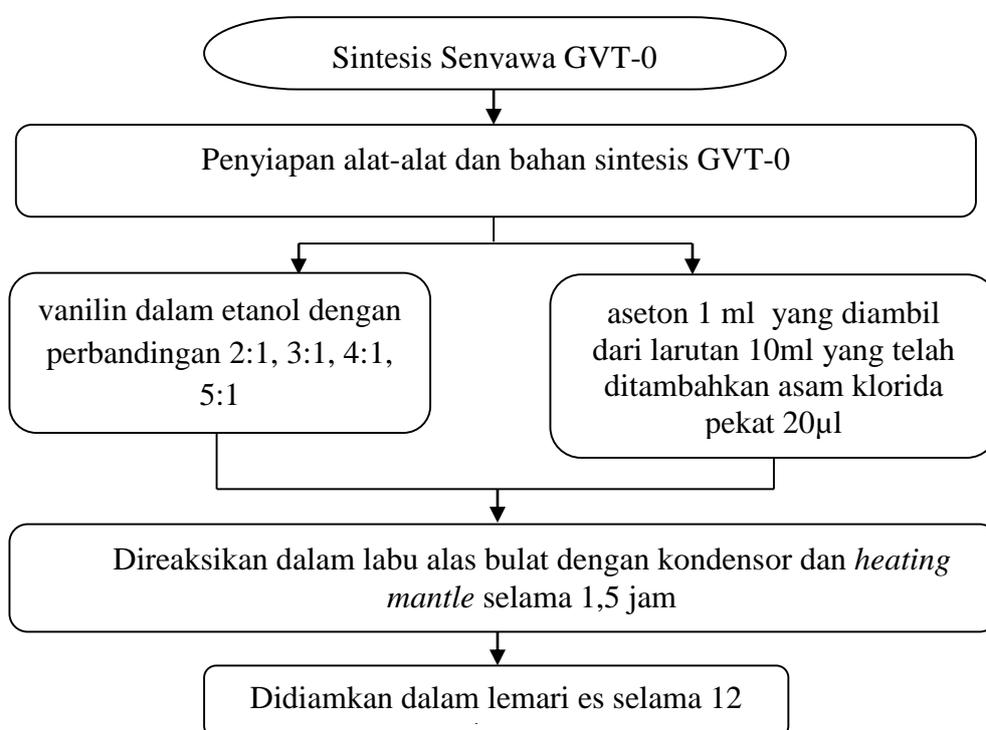
G. Skema langkah kerja

Sintesis dan pemurnian GVT-0 dilakukan di Laboratorium, sedangkan optimasi dilakukan dengan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*. Skema langkah kerja dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.

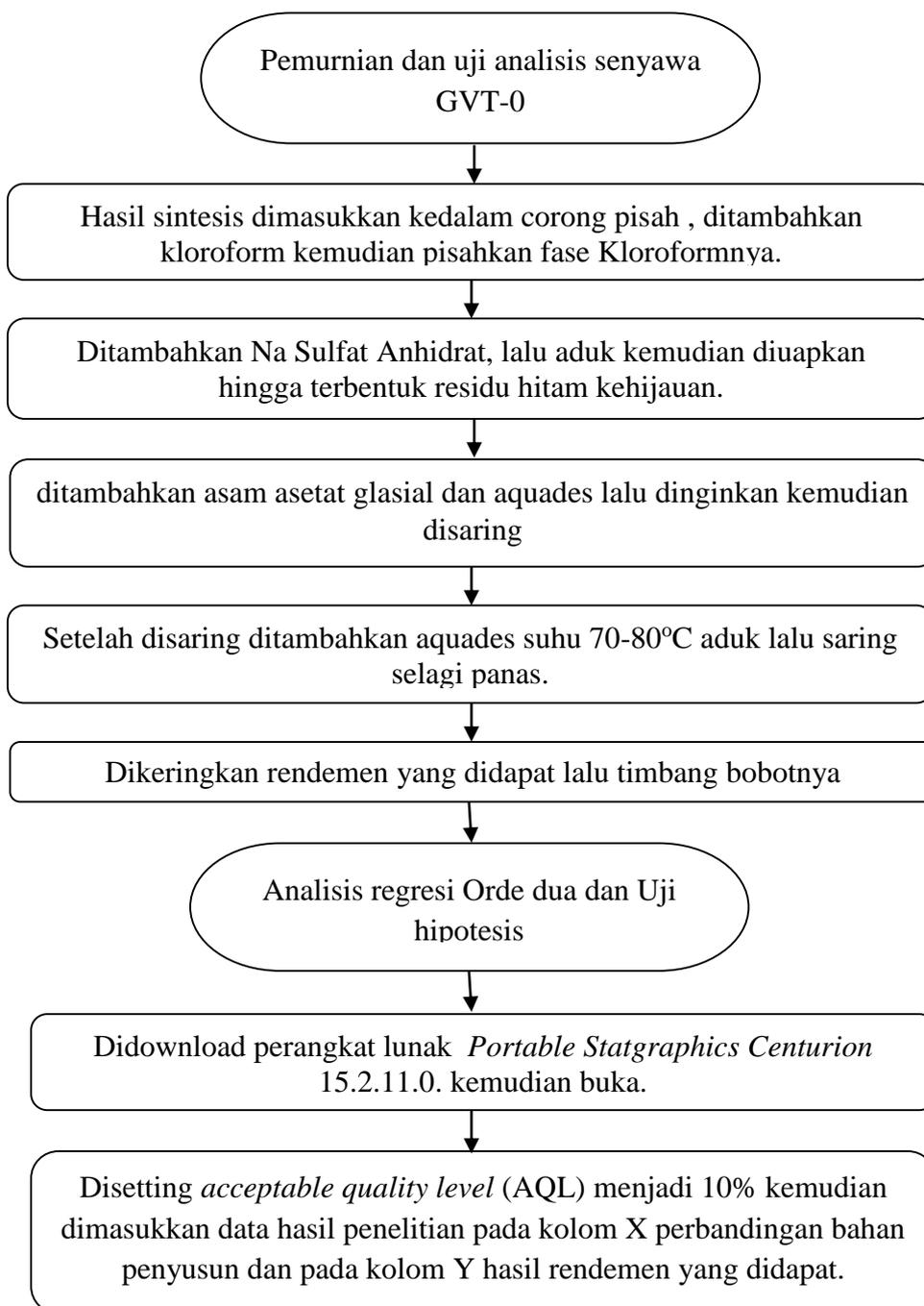
H. Analisis data

Pada penelitian ini dilakukan uji kualitatif diantaranya uji KLT, densitometri, spektrofotometri, dan FTIR. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa yang diduga GVT-0. Untuk uji kuantitatif pada penelitian ini dilakukan dengan menimbang berat GVT-0 hasil sintesis. Optimasi perbandingan *starting material* sintesis senyawa GVT-0 menggunakan perangkat lunak *Portable Statgraphics Centurion 15.2.11.0*. Lim dkk mengemukakan bahwa parameter statistik dapat digunakan untuk menentukan variabel-variabel yang mempengaruhi besarnya rendemen dan juga untuk mengetahui efek-efek dari

masing-masing faktor dan juga standar deviasi dari masing-masing data terhadap model yang sudah ditetapkan. Kualitas dari data ditentukan dengan besarnya nilai R^2 . *Statistical significance* dianalisis dengan *analysis of variance* (ANOVA), pada nilai AQL yang telah ditentukan. Nilai *P-Value* yang tidak melebihi 10%.



Gambar 5. Sintesis GVT-0.



Gambar 6. Pemurnian dan Optimasi GVT-0.