

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan tema sintesis senyawa 6-hidroksi-2-(piridin-2-il)-4H-kromen-4-on yang mempunyai aktifitas sebagai antikanker, antiinflamasi, antiosteoporosis, antidiabetes, dan antioksidan.

B. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Juni-Maret tahun 2017-2018.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel dalam penelitian

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama radiasi *microwave* dalam reaksi.
- b. Variabel tergantung adalah produk ruahan yang dihasilkan.

2. Definisi Operasional

1. *Microwave* adalah alat yang digunakan sebagai industri untuk mensintesis senyawa dengan pemanasan yang dapat diatur pada suhu yang diinginkan. Untuk penelitian ini digunakan alat *microwave* yang biasa digunakan untuk memanaskan makanan.
2. Produk ruahan pada penelitian ini adalah produk hasil setelah sintesis dilakukan.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam proses sintesis adalah *microwave* SIGMATIC (Model SMD-20WGD 220V/50Hz), mortir–stamper kaca, dan alat-alat gelas pada umumnya (*Iwaki pyrex*), kromatografi lapis tipis (silika gel 60 GF²⁵⁴ dan KLT-chamber) (CAMAG), lampu sinar uv-vis 366 nm dan 254 nm, pipet ukur (*Iwaki pyrex*), pipet volume (*Iwaki pyrex*), propipet (*Iwaki pyrex*), syringe (Hamilton), cawan petri (*Iwaki pyrex*), densitometri (CAMAG), dan LC-MS (LPPT UGM).

2. Bahan Penelitian

Raw material yang digunakan adalah 1-(2,5-dihidroksifenil)-3-piridin-2-il-propenon disintesis oleh Wibowo, (2013), I₂ (E. Merck), DMSO (E. Merck), etil asetat (E. Merck)

dan N-heksan (E. Merck) sebagai fase gerak, etanol (E. Merck) dan alkohol 96% (Brataco).

E. Cara Kerja

1. Validasi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan analisis KLT

Sebelum melakukan sintesis senyawa 6-hidroksi-2-(piridin-2-il)-4H-kromen-4-on dipastikan *raw material* (1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon) yang digunakan murni. Analisis kemurnian dilakukan menggunakan metode KLT dengan fase gerak (etil asetat dan N-heksan 9 :1) dan fase diam silika 60 GF₂₅₄ berdasarkan yang telah dilakukan Wibowo, (2013).

2. Sintesis senyawa 6-hidroksi-2-(piridin-2-il)-4H-kromen-4-on (Menezes *et al.*, 2009)

Sintesis senyawa 6-hidroksi-2-(piridin-2-il)-4H-kromen-4-on mengadopsi metode yang digunakan oleh Menezes *et al.*, (2009). Alat-alat dibersihkan menggunakan alkohol 96% sebelum digunakan. Sintesis dilakukan dengan melarutkan 0.5 mmol senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-3-piridin-2-il-propenon dalam pelarut DMSO sebanyak 3 tetes menggunakan pipet tetes kemudian ditambahkan larutan I₂ sebanyak 0.5 mmol dalam wadah yang telah berisi *raw material*. Diradiasi menggunakan *microwave* selama waktu yang telah diatur pada power 140 *watt* (lampiran 2). Langkah selanjutnya

diinginkan selama 1-2 jam dilanjutkan ketahap uji dengan KLT-densitometri (lampiran 3).

3. **Proses optimasi waktu dan perbandingan massa *raw material* hasil sintesis yang paling optimal dengan uji semikuantitatif menggunakan KLT-Densitometer (CAMAG)**

a. Siapkan kondisi reaksi sintesis dalam percobaan I, II, III, dan IV pada tabel 1, hasil reaksi I, II, III dan IV dianalisis dengan KLT-densitometri.

Tabel 1. Percobaan kondisi reaksi sintesis

Percobaan	Massa <i>raw material</i> (mmol)	Massa I ₂ (mmol)	Volume DMSO (tetes)	Daya <i>microwave</i> (watt)	Waktu <i>microwave</i> (menit)
I	0.2	0.5	3 tetes	140	4
II	0.2	0.5	3 tetes	140	2
III	0.5	0.5	3 tetes	140	2
IV	0.5	0.5	3 tetes	140	4

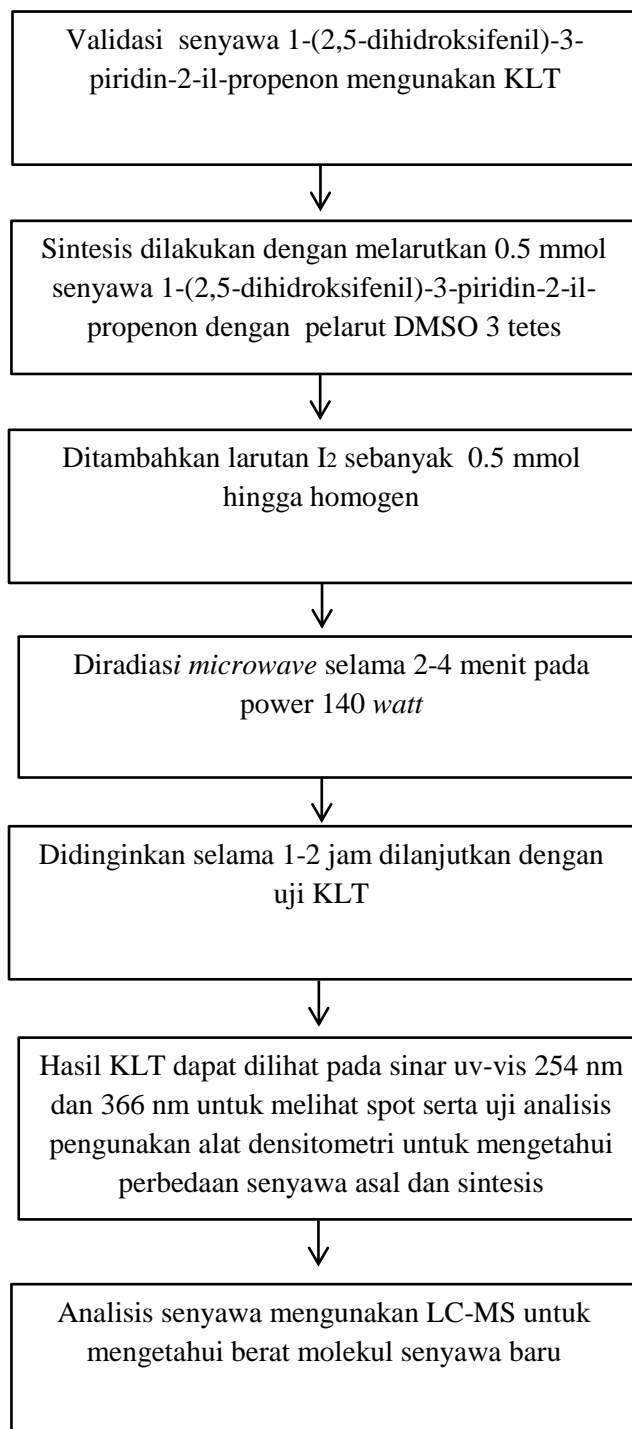
b. Plat silika 60 GF₂₅₄ 5 x 10 cm disiapkan, fase gerak yang disiapkan etil asetat dan N-heksan 9:1 yang sudah untuk dimasukan dalam wadah sampai jenuh. *Raw material* (1-(2,5-dihidroksifenil)-3-piridin-2-il-propenon) dan percobaan sintesis dilarutkan dengan etanol. *Raw material* dan percobaan sintesis ditotolkan menggunakan sirge sebanyak 10 kali pada plat silika gel 60 GF₂₅₄. Plat silika 60 GF₂₅₄ yang telah ditotoli *raw*

material dan percobaan sintesis dimasukkan kedalam wadah yang berisi fase gerak. Langkah selanjutnya adalah dianalisis dengan densitometri (CAMAG). Hasil percobaan masing-masing dibandingkan antara waktu sintesis dan jumlah *raw material* yang paling optimal terbentuknya senyawa baru hasil sintesis (lampiran 3).

4. Analisis berat molekul senyawa hasil reaksi menggunakan LC-MS

Hasil sintesis dilarutkan dalam etanol kemudian diinjeksikan dalam alat LC-MS dengan kondisi sebagai berikut : sistem ESI (*Electrospray ionisation*) model ion positif, temperatur ruangan 23° C, fase gerak *water 0,1% formic acid* dan MeOH secara isokratik dengan aliran rata – rata 0.5 ml/menit, dan menggunakan detektor massa. Dari analisis LC-MS diperoleh kromatogram LC dan spektrum massa (lampiran 4).

1. Skema Langkah Kerja



Gambar 8. Tahap dalam sintesis senyawa baru