

SINTESIS DAN UJI ANTIOKSIDAN SENYAWA (E)-1-(2-KLOROFENIL)-3-P-TOLILPROP-2-EN-1-ON

Eti Meirina Brahmana¹, Rena Lestari²

Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Universitas Pasir Pengaraian

Email : etimeirina.brahmana.upp@gmail.com

Abstract

Halogen substituted analog compound chalcone(*E*)-1-(2-chlorophenyl)-3-p-tolylprop-2-en-1-on was synthesized from 4-methylbenzaldehyde as aldehydes with 2-chloroacetophenone, as ketones by using aldol condensation reaction. The compound resulted rendement with value of 60,08% and characterized by using UV, IR, MS, and ¹HNMR. Test of antioxidant activity using DPPH method showed that those compounds have low potency as antioxidant agent LC50 with value 620,4506ppm.

Keywords: Antioxidant, DPPH, Chalcone, dan Synthesis

PENDAHULUAN

Senyawa kalkon merupakan senyawa aromatik yang memiliki dua cincin dan dihubungkan oleh tiga karbon α , β tak jenuh (Choudhary and Juyal, 2011). Senyawa kalkon dapat disintesis melalui kondensasi *Claisen-Schmidt* dari suatu aldehyd dan keton aromatik dengan katalis asam maupun basa (Jayapal dkk, 2010). Katalis basa yang umum digunakan adalah NaOH (Choudhary and Juyal, 2011) dan KOH (Tiwari dkk, 2010). Sedangkan, katalis asam yang biasa digunakan adalah HCl (Jayapal et al, 2010), SOCl₂ (Jayapal and Sreedhar, 2011), H₂SO₄ dan zeolit (Kakati and Sarma, 2011).

Sintesis kalkon pada penelitian ini menggunakan metode *Microwave Assisted Organic Synthesis* (MAOS) yaitu kalkon disintesis dengan bantuan teknologi radiasi gelombang mikro (Vaismaa, 2009). Kelebihan dari metode ini adalah waktu retensi yang singkat, produk yang murni dan rendemen yang tinggi (Varma, 1999 dan Hayes, 2002). Senyawa kalkon yang diperoleh akan diuji bioaktivitasnya sebagai antioksidan dan antijamur.

Antioksidan merupakan senyawa memiliki kemampuan untuk menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit berbahaya seperti kanker, penyakit yang berhubungan dengan kardiovaskular dan penyakit degeneratif (Barhe dan Tchouya, 2014). Pengujian antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) secara spektrofotometri, karena metode ini memiliki kelebihan yaitu sederhana, mudah, cepat, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel dalam pengujian. Parameter yang digunakan dalam metode ini adalah *IC*₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan dalam menangkap radikal DPPH sebanyak 50% (Zou, Lu dan Wei, 2004).

Berdasarkan uraian diatas dapat diketahui bahwa kalkon telah banyak digunakan untuk berbagai tujuan medis. Senyawa kalkon yang akan disintesis adalah senyawa kalkon yang tersubstitusi halogen (E)-1-(2-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on. Senyawa

ini sudah pernah disintesis oleh peneliti (Brahmana, 2015) dan diuji biokativitasnya sebagai antibakteri dan diperoleh kesimpulan bahwa senyawa tersebut berpotensi sebagai antibakteri, sehingga peneliti tertarik untuk melanjutkan pengujian bioaktivitas selanjutnya yaitu pengujian antioksidan. Namun, peneliti harus mensintesis kembali senyawanya karena jumlah yang terbatas dalam penelitian sebelumnya. Penelitian ini juga merupakan langkah awal dalam pencarian antioksidan alternatif.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 1 tahun yaitu tahun 2017-2018. Sintesis senyawa analog kalkon dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Pasir Pengaraian, perekaman UV dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA UR, analisis produk dengan HPLC dan uji antioksidan dilakukan di Laboratorium HPLC FMIPA UR, dan analisis produk melalui spektroskopi IR, MS, ¹H-NMR dilakukan di ITB-Bandung.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan destilasi, alat penentu titik leleh *Fisher Johns melting point apparatus* (SMP 11-Stuart[®]), lampu ultraviolet 254/366 nm (Camag[®]), timbangan analitik, alat Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S[®]), HPLC (UFLC Prominance-Shimadzu[®], detector SPD 20AD), spektrofotometer FTIR (Shimadzu, IR Prestige-21), spektrofotometer MS Water LCT Premier XE, spektrometer NMR (AGILENT 500 MHz), oven *microwave* Samsung ME 109 F, inkubator, Vortex (*Stuart Scientific*), autoclave, *laminar air flow*, *hot plate*, corong *Buchner* (Desaga), mikropipet 50-200 µL (Socorex), serta alat-alat gelas dan non gelas yang lazim digunakan di Laboratorium.

Bahan-bahan yang digunakan adalah yaitu 4-metibenzaldehid (Merck), 2-kloroasetofenon (Merck), natrium hidroksida (Merck), kalium hidroksida (Merck), asam klorida (Merck), indikator universal (Merck), plat KLT GF₂₅₄, *n*-heksan, etil asetat, metanol, etanol absolut, aquades, *deionized water*, ninhidrin dan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

Prosedur Kerja

a. Sintesis senyawa kalkon

Sebanyak 5 mmol 2-kloroasetofenon (Merck) dan etanol absolut (5 mL) di masukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan tetes demi tetes KOH 6 N (2 mL). Campuran tersebut diaduk selama 5 menit, lalu 5 mmol 4-metibenzaldehid (Merck) dimasukkan ke dalam campuran. Campuran diiradiasi dengan menggunakan *microwave* selama 2-5 menit, dengan interval waktu 30 detik. Setelah itu, campuran dibiarkan selama 20 jam untuk memaksimalkan hasil reaksi (endapan) yang diperoleh. Sebanyak 15 mL aquades dingin ditambahkan ke dalam campuran dan pH campuran dinetralkan dengan HCl. Endapan yang terbentuk kemudian disaring dengan corong *Buchner*, dicuci dengan *n*-heksan dingin, dan divakum hingga kering. Tahapan reaksi diamati dengan KLT. Produk yang diperoleh diuji kemurniannya dengan uji KLT, titik leleh, dan analisis HPLC.

b. Uji KLT

Eluen disiapkan dengan perbandingan tertentu dan dibiarkan menguap pada *chamber* tertutup agar uapnya menjadi jenuh. Sampel dilarutkan pada pelarut yang sesuai

dan ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 0,7 cm dari tepi bawah plat silika gel GF₂₅₄. Plat dimasukkan ke dalam *chamber* dan eluen dibiarkan naik sampai garis akhir. Plat diangkat, dikeringkan dan noda dilihat dengan bantuan lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Jika hanya ada satu noda, maka dapat disimpulkan senyawa tersebut sudah murni. Analisis KLT dengan perbandingan eluen yang berbeda dapat digunakan untuk memastikan kemurnian senyawa tersebut, kemudian ditentukan harga R_f nya.

c. Pemurnian dengan teknik rekristalisasi

1. Pemurnian senyawa

Senyawa yang berupa padatan yang telah diperoleh dimasukkan ke dalam gelas beker. Pelarut etilasetat dipanaskan. Kemudian padatan dilarutkan dengan etilasetat yang telah dipanaskan secara tetes demi tetes sampai semua padatan larut. Larutan yang diperoleh disaring dan filtratnya ditampung di dalam erlenmeyer. Larutan didinginkan sampai terbentuk kristal, kemudian disaring dengan menggunakan corong Buchner, dicuci dengan *n*-heksan dingin dan divakum hingga kering, lalu diuji kemurniannya melalui uji KLT, uji titik leleh, dan analisis HPLC.

2. Analisis kemurnian dengan HPLC

Senyawa yang berupa padatan dilarutkan menggunakan metanol (*HPLC grade*) (8 µg dalam 3 mL metanol). Larutan kemudian disaring dengan penyaring Whatman 0,2 µm. Sebanyak 20 µL filtrat tersebut diinjeksikan ke dalam kolom, kemudian sampel C₁-C₇ dianalisis menggunakan pelarut asetonitril (*HPLC grade*) dan air (*aquabides*). Kolom yang digunakan adalah *Shim-pack* VP-ODS dengan panjang dan diameternya yaitu 150 x 4,6 mm menggunakan metode gradien elusi.

d. Analisis produk

Produk murni yang diperoleh kemudian ditentukan strukturnya dengan spektrofotometer UV, IR, MS dan spektroskopi ¹H-NMR.

e. Uji Antioksidan (Thangaraj, 2016)

1. Uji Pendahuluan

Tiga buah tabung reaksi masing-masing ditambahkan dengan larutan DPPH dan air deionisasi, larutan rutin 25 µg/mL, dan larutan sampel 5 mg/mL sebanyak 1,0 mL, kemudian ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 3 mL. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik dan didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit, warna larutan diamati (pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali).

2. Penentuan *Operating time* (OT)

Tiga buah labu ukur 5 mL masing-masing ditambahkan dengan larutan DPPH dan larutan rutin 5, 15, dan 25 µg/mL sebanyak 1,0 mL kemudian ditambah dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan divortex selama 30 detik dan dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 517 nm tiap 5 menit selama 1 jam (pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali).

3. Penetapan panjang gelombang maksimum

Tiga buah labu ukur 10 mL masing-masing ditambah larutan DPPH sebanyak 0,5; 1,0; dan 1,5 mL, kemudian ditambah dengan metanol p.a hingga tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi DPPH sebesar 0,020; 0,040; dan 0,060 mM. Larutan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan divortex selama 30 detik, lalu didiamkan selama OT. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 400-600 nm.

4. Pengukuran Absorbansi Larutan Kontrol DPPH

Larutan DPPH sebanyak 2,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambah dengan metanol p.a hingga tanda batas. Setelah OT, larutan dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum (pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali). Larutan ini digunakan sebagai larutan kontrol untuk menguji larutan pembanding dan uji.

5. Pengukuran Absorbansi Larutan Rutin dan Uji

Larutan DPPH sebanyak 2,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambah dengan 2 mL larutan pembanding dan larutan uji pada berbagai seri konsentrasi yang telah dibuat, kemudian ditambah dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan di vortex selama 30 detik, lalu didiamkan selama OT. Setelah OT, larutan dibaca serapannya dengan menggunakan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum (pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali).

6. Estimasi Aktivitas Antioksidan dan Analisis Hasil

Berdasarkan hasil diatas dihitung nilai % IC dan IC_{50} . Aktivitas penangkapan radikal DPPH (% IC) dihitung berdasarkan rumus:

$$\% IC = \frac{(A_{kontrol} - A_{sampel})}{A_{kontrol}} \times 100$$

Keterangan :

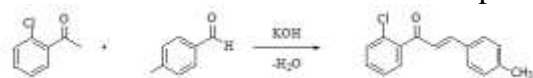
$A_{kontrol}$ = Absorbansi tidak mengandung sampel

A_{sampel} = Absorbansi sampel

Data aktivitas tersebut dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linear dengan sumbu x adalah konsentrasi larutan uji maupun pembanding, sedangkan sumbu y adalah % IC (Thangaraj, 2016).

Hasil dan Pembahasan

Sintesis senyawa kalkon (*E*)-1-(2-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on melalui reaksi kondensasi *aldol* yaitu suatu ikatan karbon-karbon baru yang terbentuk antara atom karbon α dari satu senyawa karbonil dan atom karbon karbonil yang lainnya. Keasaman atom hidrogen α dari senyawa karbonil memungkinkan senyawa karbonil tersebut untuk bereaksi dengan yang lainnya sehingga menghasilkan suatu produk gabungan keduanya. Reaksi ini dikatalis oleh suatu basa seperti KOH.



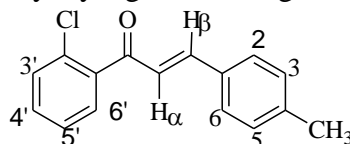
Gambar 1. Reaksi sintesis senyawa kalkon (*E*)-1-(2-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on

Hasil sintesis diperoleh berupa kristal berwarna kuning dengan berat 0,7692 g (60,08%). Jarak leleh: 72-73⁰C. Hasil pengujian menggunakan KLT didapat harga Rf: 0,73 dengan sistem eluen *n*-heksana : etil asetat (9:1). Pemeriksaan kromatogram HPLC menunjukkan satu puncak t_R : 12,5 menit pada panjang gelombang 202 dan 308 nm. Pemeriksaan spektrum UV-Vis diperoleh λ maks pada panjang gelombang 308 nm dengan absorbansi 0,850. Pemeriksaan spektrum IR (KBr) terdapat vibrasi ikatan pada bilangan gelombang 815 cm^{-1} (C-Cl), 1506 cm^{-1} (C=C dari benzena), 1595 cm^{-1} (C=O dari keton), 3055 cm^{-1} (C-H dari benzena) dan 3448 cm^{-1} (*Overtone* dari C=O). Dari pemeriksaan spektrum ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) terdapat 6 sinyal yang setara dengan 13 atom H. Sinyal-sinyal tersebut pada geser kimia δ_H 7,469 ppm (d: 8; 1H); 7,43 ppm (d: 16; 1H),

7,35-7,47 ppm (m, 4H), 7,21 ppm (d: 7,5; 1H); 7,10 ppm (d: 16; 1H); 2,38 ppm (s; 3H). Spektrum massa (HR-MS) m/z : 256,0661 dengan formula $C_{16}H_{13}OCl$.

Spektrum IR Kalkon menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 815 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus C-Cl, 1506 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus C=C dari benzena dan 1595 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya C=O dari keton. Serapan pada bilangan 3055 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya C-H dari benzena, dan bilangan gelombang pada 3448 cm^{-1} menunjukkan *overtone* yang mengindikasikan adanya C=O.

Dari pemeriksaan spektrum 1H -NMR senyawa (*E*)-1-(2-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on dalam pelarut $CDCl_3$ terdapat 7 sinyal yang setara dengan 13 atom.



Gambar 2. Struktur Kalkon

Sinyal pada δ_H 7,46 ppm (duplet) dengan konstanta kopling (J) 8 Hz memiliki integritas 1 proton, sinyal pada δ_H 7,35-7,47 ppm (multiplet) memiliki integritas 4 proton (*overlapping*), sinyal pada δ_H 7,21 ppm (duplet) dengan konstanta kopling (J) 7,5 Hz memiliki integritas 1 proton, sinyal pada δ_H 7,10 ppm (duplet) dengan konstanta kopling (J) 16,0 Hz memiliki integritas 1 proton dan sinyal pada δ_H 2,38 ppm (singlet) memiliki integritas 3 proton.

Sinyal pada δ_H 7,10 ppm (duplet) dengan konstanta kopling (J) 16 Hz memiliki integritas 1 proton mencirikan secara spesifik posisi *trans* atom H_α dengan atom H_β yang memiliki konstanta kopling (J) 16 Hz (Gambar 4.6). Sinyal duplet pada δ_H 7,10 ppm tersebut berarti mempunyai satu atom H tetangga. Sedangkan sinyal pada δ_H 2,38 ppm (singlet) memiliki integritas 3 proton mencirikan secara spesifik adanya gugus metil ($-CH_3$).

Pemeriksaan spektrum senyawa massa resolusi tinggi (HR-MS) senyawa-senyawa kalkon tersubstitusi halogen tersebut telah murni karena perbedaan berat molekul sebenarnya dengan secara teoritis sangat kecil yaitu Berat Molekul Teoritis (m/z) sebesar 256,0654 dan Berat Molekul Percobaan (m/z) sebesar 256,0661 dengan Formula $C_{16}H_{13}OCl$.

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan digunakan untuk mengevaluasi peredaman radikal bebas yang memiliki prinsipkerja yaitu DPPH akan tereduksi oleh proses donasi hidrogen atau elektron sehingga warnanya akan berubah dari violet ke kuning dengan perubahan intensitas warna yang sebanding dengan jumlah donasi elektron yang diikuti dengan penurunan absorbansi DPPH (Dris dan Jain, 2004). Dimana, semakin besar penurunan absorbansi DPPH maka semakin kuat pula aktivitas antioksidan.

Nilai antioksidan ekstrak ditentukan berdasarkan nilai IC50 yaitu konsentrasi kalkon yang menyebabkan reduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC50 maka semakin aktif sampel tersebut dalam menangkap radikal DPPH atau semakin baik aktivitas antioksidannya (Morales-Gonzalez, 2013).

Persentase inhibisi ditentukan dengan membandingkan absorbansi DPPH murni terhadap absorbansi DPPH yang ditambah kalkon pada panjang gelombang 516,5 nm. Hasil penelitian menunjukkan inhibisi DPPH oleh kalkon berbanding lurus dengan konsentrasi kalkon, yang berarti semakin besar konsentrasi kalkon, persentase inhibisinya juga semakin tinggi.

Senyawa kalkon bekerja sebagai antioksidan melalui pemutusan reaksi berantai (*chain reaction*) radikal dan mendonorkan atom hidrogennya sehingga dihasilkan radikal bebas yang lebih stabil (Nimse & Pal, 2015). Kemampuan antioksidan kalkon memiliki nilai IC50 620,4506ppm dan tergolong antioksidan lemah (Jacoeb et al., 2011).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa protein yang terkandung dalam *Rasbora argyrotaeniase* sebesar 6,65% dan *Rasborarutteni* sebesar 3,44 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Barhe, T.A dan Tchouya, G.R. 2014. Comparative Study of the Anti-oxidant Activity of the Total Polyphenols Extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L Merr., Yellow Tea and Red Wine through Reaction with DPPH Free Radical. *Arabian Journal of Chemistry*. 9:1-8.
- Brahmana, E.M. 2015. Sintesis dan uji antibakteri senyawa (E)-1-(2-klorofenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on. *Jurnal Ilmiah Edu Research* 4(2):103-108.
- Choudhary, A.N., & Juyal, V. 2011. Synthesis of chalcone and their derivatives as antimicrobial agents. *International journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences*, 3(3): 125-128.
- Jayapal, M.R., Prasad, K.S., & Sreedhar, N.Y. 2010. Synthesis and Characterization of 2,6-Dihydroxy Substituted Chalcones Using PEG-400 as a Recyclable Solvent. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2(8): 450-458.
- Kakati, D., & Sarma, J.C. 2011. Microwave Assisted Solvent Free Synthesis of 1,3-Diphenylpropanones. *Chemistry Central Journal*. 5(8): 1-5.
- Tiwari, B., Pratapwar, A.S., Tapas, A.R., Butle, S.R., & Vatkar, B.S. 2010. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Chalcone Derivatives. *International Journal of ChemTech Research*. 1(2): 499-503.
- Vaismaa, M. 2009, Development of benign synthesis of some terminal α -hydroxy ketones and aldehydes. Disertasi: Faculty of Science University of Oulu.
- Varma, R.S. 1999. Solvent-free organic syntheses using supported reagents and microwave irradiation. *Green Chem.*, 1(1), pp. 43-55.
- Zou, Y., Lu, Y dan Wei, D. 2004. Antioxidant Activity of a Flavonoid-Rich Extract of *Hypericum perforatum* L. In vitro. *J. Agric. Food Chem* 52: 5032-5039.