

### III. METODE PENELITIAN

#### III.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, alat-alat KLT, spektrofotometer, mikropipet, dan tip mikropipet. Bahan yang digunakan adalah aseton pa, metanol 95%, etanol absolut, difenilpikrilhidrazil (DPPH), Butilhidroksitoluen (BHT), Vitamin C, benzaldehid, plat KLT, 2'-Hidroksi asetofenon, 3'-Dihidroksi asetofenon, sinamaldehyda, HCl, BaOH.10H<sub>2</sub>O, dan heksana.

#### III.2. Prosedur Kerja

##### III.2.1. Sintesis

###### III.2.1.1. Sintesis senyawa 2'-hidroksi kalkon

Benzaldehida (0,0105 mol; 1,1142 g), 2'-hidroksi asetofenon (0,01 mol; 1,3615 g), barium hidroksida oktahidrat (0,0055 mol; 1,7351 g) dan 10 ml etanol absolut dicampurkan ke dalam labu bulat yang telah dilengkapi *magnetic stirer* dan kondensor refluks. Campuran reaksi di atas dibiarkan selama 2,5 jam hingga didapatkan padatan yang sulit diaduk dengan *magnetic stirer*. Padatan yang didapat didinginkan, kemudian dilarutkan dengan 50 ml HCL 1N. Padatan tersebut akan mengendap di dasar larutan. Padatan dikumpulkan dengan menyaringnya menggunakan corong buchner, dicuci dengan 50 ml aquades kemudian etanol absolut. Uji kemurnian senyawa ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan pengukuran titik leleh dari padatan tersebut.

###### III.2.1.2. Sintesis senyawa 3'-hidroksi kalkon

Benzaldehida (0,0105 mol; 1,1179 g), 3'-hidroksi asetofenon (0,01 mol; 1,3618 g), barium hidroksida oktahidrat (0,0055 mol; 1,7355 g) dan 10 ml etanol absolut dicampurkan ke dalam labu bulat yang telah dilengkapi *magnetic stirer* dan kondensor refluks. Campuran reaksi di atas dibiarkan selama 2,5 jam hingga didapatkan padatan yang sulit diaduk dengan *magnetic stirer*. Padatan yang didapat didinginkan, kemudian dilarutkan dengan 50 ml HCl 1N. Padatan tersebut akan mengendap di dasar larutan. Padatan dikumpulkan dengan menyaringnya



menggunakan corong buchner, dicuci dengan 50 ml aquades kemudian 50 ml heksana dan dikeringkan pada suhu 40<sup>0</sup>C. Rekristalisasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol absolut dan heksana. Uji kemurnian senyawa ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan pengukuran titik leleh dari padatan tersebut.

### III.2.1.3. Sintesis senyawa (2E,4E)-1-(3-hidroksifenil)-5-fenilpenta-2,4-dien-1-on

Sinamaldehida (0,0105 mol; 1,3903 g) dan 3'-hidroksi asetofenon (0,01 mol; 1,3612 g), barium hidroksida oktahidrat (0,0055 mol; 1,7364 g) dan 10 ml etanol absolut dicampurkan ke dalam labu bulat yang telah dilengkapi *magnetic stirrer* dan kondensor refluks. Campuran reaksi di atas dibiarkan selama 2,5 jam hingga didapatkan padatan yang sulit diaduk dengan *magnetic stirrer*. Padatan yang didapat didinginkan, kemudian dilarutkan dengan 50 ml HCl 1N. Padatan tersebut akan mengendap di dasar larutan. Padatan dikumpulkan dengan menyaringnya menggunakan corong buchner, dicuci dengan 50 ml aquades kemudian 50 ml heksana dan keringkan pada suhu 40<sup>0</sup>C selama 24 jam. Rekristalisasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol absolut dan heksana. Uji kemurnian senyawa ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan pengukuran titik leleh dari padatan tersebut.

### III.2.2. Analisa Produk

Produk murni yang diperoleh ditentukan strukturnya dengan spektroskopi UV, IR, NMR proton <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C, dan MS yang dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serong, Tangerang.

### III.2.3. Uji Antioksidan

Uji bioaktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH hasil modifikasi Tagashira & Ohtake (1998). Ekstrak dilarutkan dalam metanol dan dibuat berbagai seri konsentrasi. Blanko merupakan campuran 4 ml DPPH 0,004% ditambah 1 ml metanol 95%. Sedangkan larutan sampel terdiri dari 4 ml DPPH 0,004% ditambah 1 ml ekstrak (dibuat dalam beberapa konsentrasi).

Blanko dan sampel diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-tampak berkas tunggal Shimidzu 1240 pada  $\lambda$  517 nm.

Aktivitas penghambatan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{[\text{DPPH}]_0 - [\text{DPPH}]_s}{[\text{DPPH}]_0} \times 100\%$$

$[\text{DPPH}]_0$  = Absorbansi DPPH awal

$[\text{DPPH}]_s$  = Absorbansi DPPH akhir yang tersisa

Dilakukan triplo. Uji antioksidan senyawa sintesis dibandingkan dengan BHT dan Vitamin C sebagai kontrol positif.