

SKRIPSI

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT KOJIL
TIOETER DARI ASAM KOJIK DAN
N-ASETILSISTEIN**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF KOJYL
THIOETHER DERIVATIVE FROM KOJIC ACID AND
N-ACETYLCYSTEINE**

Disusun dan diajukan oleh

**SRI MAILANI
N011 17 1334**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT KOJIL THIOETER DARI
ASAM KOJIK DAN N-ASETILSISTEIN**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF KOJYL THIOETHER
DERIVATIVE FROM KOJIC ACID AND N-ACETYLCYSTEINE**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**SRI MAILANI
N011 17 1334**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT KOJIL TIOETER DARI
ASAM KOJIK DAN N-ASETILSISTEIN**

SRI MAILANI

N011 17 1334

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping



Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. NIP. 19751117 200012 2 001

Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19780716 200312 2 001

Pada tanggal ?? Juni 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT KOJIL THIOETER DARI
ASAM KOJIK DAN N-ASETILSISTEIN

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF KOJYL THIOETHER
DERIVATIVE FROM KOJIC ACID AND N-ACETYLCYSTEINE

Disusun dan diajukan oleh:

SRI MAILANI
N011 17 1334

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada tanggal 15 Juni 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001



Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19780716 200312 2 001

Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini;

Nama : Sri Mailani
NIM : N011 17 1334
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Sintesis Dan Karakterisasi Derivat Kojil Tioeter Dari Asam Kojik Dan N-Asetilsistein adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 22 Juni 2021
Yang menyatakan



Sri Mailani

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabiil 'alamiin segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, berupa kesehatan, kekuatan ilmu yang sempurna dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak kesulitan yang dihadapi, dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Rasa syukur, ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya dan penghargaan setinggi - tingginya kepada:

1. Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan yang sudah tidak bisa penulis ungkapkan dengan kata-kata.
2. Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt dan Ibu Sumarheni, S.Si., M.Sc., Apt. selaku penguji yang dengan baik hati memberikan masukan dan saran dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dekan Fakultas Farmasi, Wakil Dekan I, Wakil Dekan II, Wakil Dekan III, dan Seluruh Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi

Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya dan membimbing penulis selama masa studi S1 juga seluruh staf segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi sehingga menyelesaikan penelitian ini.

4. Sahabat-sahabat penulis, Shafa Haura Suharto, Andi Dalauleng, Andi Nur Aulia El Firman, Rusmainnah, Adelia Dwidayanti, Aprilia Holi Ta'bi, Geo Tudingan, Asma Aris, Aisyah Andiani, dan Elma Pebryna Putri untuk setiap dukungan, membantu penulis dan doa yang diberikan kepada penulis.
5. Teman seperjuangan penelitian asam kojik, Livia Aurellia Pianto.
6. Korps Asisten Kimia Farmasi yang sudah berbaik hati memberikan ilmunya dan membantu penulis, khususnya Kak Hariyanto Dwi Saputra, Kak Ririn Priska Winata, Muhammad Syahir Hariawan Safar, Dewi Arifyana, Putri Utami Haris.
7. Teman-teman angkatan "CLOSTRI17IUM" yang telah bersama-sama dengan penulis dari awal dan sama-sama berjuang untuk meraih mimpi di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya khususnya kepada orang tua penulis yaitu Bapak Oei Ka Liong, Ibu Hasnawiah yang selalu memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang, serta doa yang tulus yang selalu mengiringi langkah penulis. Saudara penulis, Ferdy Winardy, Widya Ayu Wandira, dan Ahmad Muttawalli yang selalu memerikan motivasi dan hiburan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan dan masih terdapat banyak kesalahan yang tidak disadari oleh penulis. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah diberikan dan semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembangunan dan pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang Farmasi. Aamiin.

Makassar,..... Juni 2021

Sri Mailani

ABSTRAK

SRI MAILANI. *Sintesis Dan Karakterisasi Derivat Kojil Tioeter Dari Asam Kojik Dan N-Asetilsistein* (dibimbing oleh Yusnita Rifai dan Risfah Yulianty).

Penelitian tentang sintesis dan karakterisasi derivat kojil tioeter dari asam kojik dan N-asetilsistein telah dilakukan dengan tujuan penelitian untuk melakukan sintesis derivat kojil tioeter melalui proses tionasi pada asam kojik menggunakan Mannich *base* yang direaksikan dengan N-asetilsistein. Tionasi dilakukan untuk memperoleh senyawa derivat kojil tioeter dengan efektivitas yang lebih baik dibandingkan dengan asam kojik dalam menghambat sintesis melanin. Senyawa hasil sintesis berupa kristal berwarna merah dengan *yield* sebesar 12,28%. Produk yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan *melting point analyzer*, spektrofotometer UV-Vis, *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR), *Proton Nuclear Magnetic Resonance* (¹H-NMR) dan spektrofotometer massa (ESI-MS). Hasil karakterisasi memberikan informasi bahwa produk yang diperoleh diduga adalah derivat kojil tioeter dengan titik leleh >360°C dan asam kojik 153,5°C. Panjang gelombang maksimum yang dimiliki oleh senyawa hasil sintesis terdapat pada 225,2; 276,4; dan 304 nm.

Kata kunci : asam kojik, kojil tioeter, Mannich *base*, N-asetilsistein

ABSTRACT

SRI MAILANI. *Synthesis and Characterization of Kojyl Thioether Derivative from Kojic Acid and N-Acetylcysteine* (supervised by Yusnita Rifai, and Risfah Yulianty).

Research on the synthesis and characterization of kojyl thioether derivative from kojic acid and n-acetylcysteine has been carried out with the aim of researching the synthesis of kojyl thioether derivative through the kojic acid thionation process using Mannich base which was reacted with N-acetylcysteine. Tionation was carried out to obtain kojyl thioether derivative compound with better effectiveness compared to kojic acid in inhibiting melanin synthesis. The synthesized compound is a red crystal with a yield of 12.28%. The product obtained were characterized using a melting point analyzer, UV-Vis spectrophotometer, Fourier Transform Infra Red (FT-IR), Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) and mass spectrophotometer (ESI-MS). The characterization results provide information that the product obtained is a kojyl thioether derivative with a melting point of $> 360^\circ\text{C}$ and kojic acid $153,5^\circ\text{C}$. The maximum wavelength the synthesized compound is at 225,2; 276,4; and 304 nm.

Keywords : kojic acid, kojyl thioether, Mannich base, N-acetylcysteine

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Melanin, Melanosit, Melanogenesis	6
II.2 Klasifikasi Senyawa Depigmentasi	7
II.3 Asam Kojik	9
II.4 Modifikasi Asam Kojik dengan Mannich <i>Base</i>	12
II.5 Analisis Kemurnian Senyawa	13
II.5.1 Kromatografi Lapis Tipis	13
II.6 Karakterisasi Senyawa Derivat Kojil Tioeter	14
II.6.1 Pengujian Titik Lebur	14
II.6.2 Spektrofotometri UV-Vis	15
II.6.3 Spektrofotometri Inframerah (FT-IR)	18

	halaman
II.6.4 Spektrofotometri Massa	21
II.6.5 <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ($^1\text{H-NMR}$)	22
BAB III METODE PENELITIAN	26
III.1 Alat dan Bahan	26
III.2 Metode Kerja	26
III.2.1 Sintesis Senyawa Derivat Kojil Tioeter	26
III.2.2 Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis	28
III.2.2.1 Kromatografi Lapis Tipis	28
III.2.2.2 Analisis Titik Leleh (<i>Melting Point</i>)	28
III.2.2.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (Spektrofotometri UV-Vis)	29
III.2.2.4 Penentuan Gugus Fungsi (<i>Fourier Transform Infra Red</i>)	29
III.2.2.5 Penentuan Jumlah Proton (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)	29
III.2.2.6 Penentuan Berat Molekul (ESI-MS)	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1 Senyawa Hasil Sintesis Derivat Kojil Tioeter	31
IV.2 Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	39
V.1 Kesimpulan	39
V.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Klasifikasi agen depigmentasi dan mekanisme kerjanya	8
2. Pita absorpsi gugus fungsi pada spektrofotometri inframerah	20
3. Perkiraan nilai pergeseran kimia untuk proton non-aromatik yang terikat pada karbon	25
4. ^1H pergeseran bagian CH_3 dalam hubungannya dengan substituen elektronegatif	25
5. Nilai pergeseran kimiawi untuk proton yang terpasang pada cincin aromatik	25
6. Nilai R_f dan organoleptis senyawa hasil sintesis	31
7. Hasil karakterisasi spektrofotometri UV-Vis senyawa asam kojik dan derivat kojil tioeter	34
8. Hasil karakterisasi FT-IR senyawa asam kojik dan derivat kojil tioeter	35
9. Hasil karakterisasi $^1\text{H-NMR}$ senyawa asam kojik dan derivat kojil tioeter	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Mekanisme reaksi melanogenesis	7
2. Struktur asam kojik (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4-piron) (C ₆ H ₆ O ₄)	9
3. Diagram skematis Spektrofotometer UV-Vis	17
4. Ragam vibrasi	19
5. Skema instrumen spektrofotometer IR	21
6. Komponen spektrometer massa	22
7. Skema instrumen NMR	23
8. Skema nilai pergeseran kimia berbagai bagian fungsional	25
9. Skema <i>proposed reaction mechanism</i> sintesis derivat kojil tioeter dengan Mannich base	27
10. <i>Proposed mechanism reaction</i> sintesis derivat kojil tioeter	33
11. Proses refluks derivat kojil tioeter	46
12. Hasil refluks asam kojik dengan Mannich base	46
13. Penambahan N-asetilsistein dan campuran etanol : air (1:1)	46
14. Hasil refluks sintesis derivat kojil tioeter	46
15. Monitoring reaksi (A= Asam kojik, B= Hasil refluks tahap 1, C=Hasil refluks tahap 2)	46
16. Endapan hasil saring	46
17. Hasil saring endapan setelah dicuci dengan aseton	47
18. Hasil KLT (A=Asam kojik, B=endapan yang dilarutkan dengan etanol, eluen aseton : heksan (3:2))	47
19. Senyawa derivat kojil tioeter	47

Gambar	halaman
20. Hasil KLT (A=Asam Kojik, B=Derivat kojil tioeter yang dilarutkan dengan etanol, eluen aseton : heksan (3:2))	47
21. Titik leleh asam kojik	48
22. Spektra spektrofotometri UV-Vis (a) asam kojik, (b) derivat kojil Tioeter	49
23. Spektra FT-IR (a) asam kojik, (b) derivat kojil tioeter	50
24. Spektra ¹ H-NMR (a) asam kojik, (b) derivat kojil tioeter	51
25. Spektra ESI-MS derivat kojil tioeter	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja	45
2. Gambar penelitian	46
3. Data penelitian	48
4. Perhitungan	53

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Radiasi ultraviolet (UVR) merupakan salah satu faktor eksternal penyebab kelainan warna pada kulit yang biasa disebut dengan hiperpigmentasi. Selain itu, hiperpigmentasi terjadi karena adanya paparan berulang radiasi ultraviolet ke suberitemal yang akan mengaktifkan sintesis melanin, sehingga terjadi peningkatan jumlah melanin pada kulit manusia (Chatatikun *et al.*, 2020). Tahap pertama dalam sintesis melanin dikatalisis oleh enzim tirosinase, sehingga penghambatan enzim tirosinase menjadi salah satu target yang digunakan untuk mengatasi masalah hiperpigmentasi kulit karena dapat menghambat melanogenesis, sehingga dapat menurunkan produksi melanin dalam tubuh (Kim *et al.*, 2019; Pillaiyar *et al.*, 2017).

Inhibitor tirosinase yang banyak digunakan saat ini dalam bidang kosmetik sebagai pencerah kulit dan agen depigmentasi untuk pengobatan gangguan hiperpigmentasi pada kulit seperti hidrokuinon, arbutin, asam kojik, asam azelat dan asam L-askorbat (Chatatikun *et al.*, 2020; Choi *et al.*, 2014). Hidrokuinon merupakan agen paling populer untuk mengobati hiperpigmentasi karena dapat menghambat aktivitas tirosinase. Namun hidrokuinon telah dilarang penggunaannya di Asia karena tingkat karsinogenosisnya, selain itu hidrokuinon juga memiliki banyak efek samping termasuk iritasi kulit, depigmentasi permanen,

toksisitas, mutagenisitas, dan ochronosis eksogen dari penggunaan jangka panjang. Hidrokuinon menyebabkan kerusakan permanen melanosom dan melanosit oleh radikal bebas semikuinon yang dihasilkan selama reaksi enzimatik (Chatatikun *et al.*, 2020; Couteau dan Coiffard, 2016; Lee *et al.*, 2016; Saeedi *et al.*, 2019). Asam kojik diperkenalkan oleh FDA sebagai alternatif dari hidrokuinon, sehingga dapat digunakan pada pasien yang tidak dapat mentolerir hidrokuinon (Hashemi dan Emami, 2015; Saeedi *et al.*, 2019).

Asam kojik merupakan produk bahan kimia yang diperoleh dari berbagai jenis jamur seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarii*, dan *Aspergillus parasiticus* (Saeedi *et al.*, 2019). Asam kojik diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase (Pillaiyar *et al.*, 2017). Asam kojik digunakan sebagai pencerah dan depigmentasi kulit karena memiliki kemampuan untuk mengkhelat ion logam transisi Cu^{2+} di situs aktif enzim. Asam kojik juga memiliki sifat antioksidan, mencegah konversi o-quinone menjadi L-DOPA yang pada akhirnya akan membentuk melanin (Asadzadeh *et al.*, 2016; Karakaya *et al.*, 2019; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2014). Namun, penggunaan asam kojik dalam kosmetik dibatasi karena sitotoksisitasnya. Selain itu, asam kojik memiliki efikasi, penetrasi dan lipofilisitas rendah yang dapat menyebabkan iritasi kulit, serta tidak stabil selama penyimpanan. Sehingga banyak derivat atau turunan asam kojik yang dikembangkan dengan memodifikasi struktur sehingga dapat meningkatkan keamanan,

sifat farmakokinetik dan kemampuan khelatingnya (Asadzadeh *et al.*, 2016; Ashooriha *et al.*, 2019; Karakaya *et al.*, 2019; Saghaie *et al.*, 2013).

Asam kojik memiliki struktur yang sangat baik untuk penelitian dalam bidang kimia medisinal (Saeedi *et al.*, 2019). Aktivitas biologis asam kojik disebabkan oleh struktur γ -piranonnya yang memiliki gugus hidroksil enolik. Sehingga berdasarkan hal tersebut, berbagai turunan asam kojik dimodifikasi pada posisi C-2 gugus hidroksil untuk meningkatkan aktivitas penghambatan tirosinase. Dalam uji tirosinase, adanya hubungan tioeter, gugus normal alkil dan sikloalkil merupakan faktor kritis untuk aktivitas penghambatan tirosinase (Choi *et al.*, 2014). Berdasarkan analisis hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas pada derivat asam kojik mengungkapkan bahwa hubungan sulfida dan gugus hidrofobik seperti n-pentil, n-heptil, dan sikloheksil memiliki aktivitas penghambatan yang lebih tinggi pada enzim tirosinase (Rho *et al.*, 2010a).

Modifikasi senyawa asam kojik telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh Rho *et al* (2010), telah menghasilkan beberapa senyawa modifikasi dari asam kojik yang memiliki gugus tioeter, seperti senyawa kojil tioeter [2-(sikloheksiltiometil)-5-hidroksi-4H-piran-4-on], yang menunjukkan aktivitas paling potensial pada uji tirosinase dengan IC_{50} sebesar 0,087 μ M, dibandingkan dengan asam kojik 97,38 μ M (Rho *et al.*, 2010a). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Choi *et al* (2014), senyawa 2-(sikloheksiltiometil)-5-hidroksi-4H-piran-4-on, yang memiliki hubungan tioeter dan gugus hidrofobik sikloheksana menunjukkan bahwa senyawa

tersebut lebih efektif dibandingkan asam kojik dalam menghambat produksi melanin.

Derivat asam kojik dapat disintesis dengan metode Mannich *base* karena sifat asam kojik seperti fenol, sehingga mudah mengalami aminometilasi pada posisi orto yang memiliki gugus hidroksil enolik dalam reaksi Mannich. Pada penelitian yang dilakukan oleh O'Brien *et al* (1960), menunjukkan bahwa turunan asam kojik yang disintesis dengan Mannich *base* terjadi pada posisi C-6 asam kojik menggunakan dimetilamin, dietilamin, piperidin, morpoline, piperidin atau 4-metilpiperazin dan asam klorokojik (Aytemir dan Özçelik, 2011).

Mannich *base* lebih disukai karena memungkinkan penggunaan pelarut yang lebih ramah lingkungan. Keuntungan dari metode ini adalah bahwa campuran reaksi homogen, karena reaktan dilarutkan dalam pelarut di awal reaksi. Selain itu, reaksi produk akhir semakin sedikit larut dalam etanol pada akhir prosedur sehingga dapat dengan mudah diisolasi dengan penyaringan (Roman, 2013). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Roman (2013), Pada penggantian bagian dialkilamin pada *Ketonic Mannich base* dengan tionasi atau penambahan gugus tiol akan mengarah ke pembentukan tioeter. Adapun salah satu senyawa yang memiliki gugus tiol yaitu N-asetilsistein.

N-asetilsistein merupakan turunan dari asam amino L-sistein dengan gugus asetil yang melekat pada atom nitrogennya, dan merupakan *prodrug* sistein serta prekursor glutation. N-asetilsistein seperti

kebanyakan tiol (R-SH) berfungsi sebagai nukleofil (pasangan elektron penyumbang). N-asetilsistein telah digunakan sebagai agen mukolitik dan pengobatan berbagai gangguan seperti keracunan parasetamol, kardiotoxicitas yang diinduksi doksorubisin, angina pectoris stabil, cedera jantung iskemia-reperfusion, sindrom gangguan pernapasan akut, bronkitis, toksisitas akibat kemoterapi, HIV/AIDS, toksisitas logam berat, dan gangguan kejiwaan termasuk skizofrenia, gangguan bipolar, dan kecanduan (Pei *et al.*, 2018; Samuni *et al.*, 2013).

Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan sintesis melalui proses tionasi dengan menggunakan Mannich *base* pada asam kojik yang direaksikan dengan N-asetilsistein untuk memperoleh derivat kojil tioeter dan mengetahui karakteristik derivat hasil sintesis tersebut.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah senyawa derivat kojil tioeter dapat disintesis melalui proses tionasi pada asam kojik menggunakan Mannich *base* yang direaksikan dengan N-asetilsistein dan bagaimana karakteristik senyawa tersebut?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis senyawa derivat kojil tioeter melalui proses tionasi pada asam kojik menggunakan Mannich *base* yang direaksikan dengan N-asetilsistein serta melakukan karakterisasi terhadap senyawa hasil sintesis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Melanin, Melanosit, Melanogenesis

Melanin merupakan pigmen warna yang terdapat pada makhluk hidup. Melanin merupakan pigmen warna yang terdapat pada beberapa bagian tubuh makhluk hidup seperti otak, rambut, mata dan kulit. Pada manusia, terdapat 3 jenis melanin yaitu eumelanin, pheomelanin, dan neuromelanin. Pigmen melanin pada kulit manusia terdiri dari campuran eumelanin dan pheomelanin. Eumelanin merupakan pigmen warna dengan dominan coklat kehitaman dan pheomelanin merupakan pigmen warna yang dominan kuning kemerahan. Sedangkan neuromelanin adalah pigmen polimer gelap yang diproduksi dalam populasi tertentu dari neuron katekolaminergik di otak, sebagian besar terletak di substansia nigra dan dalam proporsi yang lebih rendah di lokus coeruleus (D'Mello *et al.*, 2016; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2014; Solano, 2014; Suryaningsih, 2020). Melanin memiliki beberapa fungsi bagi tubuh salah satunya yaitu melindungi kulit manusia dari paparan radiasi sinar UV melalui fotoabsorpsi atau dengan menetralkan radikal bebas di kulit (Saqib *et al.*, 2015; Suryaningsih, 2020).

Melanogenesis merupakan proses pembentukan pigmen melanin oleh melanosit di melanosom. Melanosit terletak di lapisan basal kulit. Proses melanogenesis diinisiasi oleh tirosinase setelah kulit terpapar

2003). Agen depigmentasi merupakan senyawa yang dapat menghambat melanogenesis dan dapat digunakan untuk mengatasi masalah hiperpigmentasi. Senyawa depigmentasi dapat diklasifikasikan berdasarkan tahapannya dalam menghambat sintesis melanin seperti yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi agen depigmentasi dan mekanisme kerjanya

Tahap sintesis melanin	Deposisi	Molekul aktif
Sebelum sintesis melanin	Transkripsi tirosinase	Tretinoin, c-2 ceramide
	Glikosilasi tirosinase	PaSSO ₃ Ca
	Penghambatan plasmin	Asam traneksamat
Selama sintesis melanin	Penghambatan tirosinase	Hidrokuinon, mequinol, asam azelat, asam kojik, arbutin, deoksiarbutin, ekstrak <i>licorice</i> , <i>rucinol</i> , Nasetil glukosamin, 2,5-dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanon, resveratrol, oksiresveratrol, asam ellagic, metil gentsiate, 4-hidroksianisol
	Penghambatan peroksidase	Senyawa fenolik
	Penangkap spesies oksigen reaktif	Asam askorbat, asam askorbat palmitat, asam tiotik, hidrokumarin
Setelah sintesis melanin	Degradasi tirosinase	Asam linoleat, asam α -linoleat
	Penghambatan transfer melanosom	Niasinamid, <i>serine protease inhibitor</i> , retinoid, lesiti, neoglikoprotein, penghambat tripsin kedelai
	Akselerasi pergantian kulit	Asam laktat, asam glikolat, asam linoleat, asam retinoat
	Pengaturan lingkungan melanosit	Kortikosteroid, glabiridin
	Interaksi dengan tembaga	Asam kojik, asam askorbat
	Penghambatan pematangan melanosom	Arbutin dan deoksiarbutin
	Penghambatan protease reseptor teraktivasi-2	Penghambat tripsin kedelai

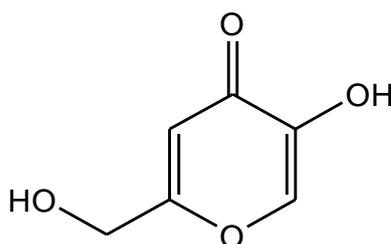
Sumber : Shankar *et al.* Evidence-Based Treatment for Melasma: Expert Opinion and a Review. Online. Dermatol Ther.2014

Senyawa depigmentasi juga dapat diklasifikasikan berdasarkan mekanisme kerjanya menjadi tiga yaitu mengontrol tirosinase,

menghambat transfer melanosom, dan antioksidan. Senyawa depigmentasi yang mengontrol tirosinase dikategorikan menjadi (i) menghambat aktivitas tirosinase seperti arbutin, asam azelat, asam kojik, 4-n-butilresorsinol, (ii) pengurangan produksi tirosinase seperti spingosin-1-fosfat, asam lisofatidik, ceramide, spingolifosforikolin, (iii) peningkatan degradasi tirosinase seperti asam linolenik, asam linoleik, asam oleat, fosfolipase D2. Senyawa depigmentasi yang menghambat transfer melanosom seperti centaureidin, niasinamide (Vitamin B₁₂), lektin, neoglikoprotein. Senyawa depigmentasi yang berfungsi sebagai antioksidan seperti asam askorbat, α -tokoferol, 6-hidroksi-3,4-dihidroksikumarin, asam tiotik, dan resveratrol (Shin dan Park, 2014).

II.3 Asam Kojik

Asam kojik merupakan produk bahan kimia yang diperoleh dari berbagai jenis jamur seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamarii*, dan *Aspergillus parasiticus* (Saeedi et al., 2019).



Gambar 2. Struktur asam kojik (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4-piron) (C₆H₆O₄) (Saeedi et al., 2019)

Asam kojik memiliki cincin gammapiron yang bersifat reaktif pada cincinnya sendiri di setiap situasi, sehingga dapat digunakan dalam produksi beberapa produk dengan nilai industri, termasuk khelat logam,

piridin, piridin, eter, pewarna azo, mannich base, dan produk sianetilasi. Struktur molekul asam kojik yang terdiri dari cincin benzen dengan dua gugus hidroksil membuatnya polar dan sedikit larut dalam pelarut organik polar dan air terutama pada suhu kamar. Aktivitas biologis asam kojik disebabkan oleh struktur γ -piranonnya yang memiliki gugus hidroksil enolik pada posisi C5 dan struktur tersebut memberikan sifat asam lemah pada molekul asam kojik, serta dapat menyebabkan asam kojik mengarah pada pembentukan garam oleh beberapa logam seperti natrium, seng, tembaga, kalsium, nikel, dan kadmium, sehingga asam kojik bermanfaat sebagai pengkhelat logam (Choi *et al.*, 2014; Ishak *et al.*, 2018; Saeedi *et al.*, 2019).

Analisis TG-DSC asam kojik memiliki titik leleh 427,89 K, dan berat asam kojik tetap konstan bila suhunya lebih rendah dari 429,13 K, setelah diatas suhu tersebut asam kojik mulai mengalami dekomposisi. Kelarutan asam kojik pada suhu 298,15 K (25°C) secara berurutan adalah dimetilsulfoksida (DMSO) > N-metilpirolidon > N,N-dimetilasetamida > N,N-dimetilformamida (DMF) > 2-metoksietanol > 2-etoksietanol > asam asetat > metanol > 1,4-dioksan > etanol > air > n-propanol > aseton > etil asetat (Sun *et al.*, 2021). Asam kojik tidak stabil pada pH 5,1-7,6 dan stabil pada pH 2,3 (Wang *et al.*, 2015). Asam kojik sensitif terhadap kelembaban, sangat tidak stabil, mudah teroksidasi dan berubah warna (Ishak *et al.*, 2018),

Asam kojik dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri seperti makanan, farmasi, kosmetik, pertanian, dan lingkungan. Asam kojik dan turunannya memiliki berbagai aktivitas biologis diantaranya termasuk antimikroba, antivirus, antitumor, antidiabetes, antikanker, anti-parasit dan aktivitas pestisida, insektisida, antioksidan, antiproliferatif, antiinflamasi, dan sebagai agen pencerah kulit karena memiliki aktivitas penghambatan tirosinase (Saeedi *et al.*, 2019).

Asam kojik digunakan sebagai pencerah dan depigmentasi kulit karena memiliki aktivitas sebagai pengkhelat, penghambatan tirosinase dan polifenoloksidase. Asam kojik bekerja menghambat aktivitas enzim tirosinase yang merupakan metaloenzim dengan mengandung dua ion tembaga (Cu^{2+}) di situs aktif. Adanya paparan sinar UV yang mengakibatkan ion tembaga (Cu^{2+}) di situs aktif membuat tirosinase menjadi lebih aktif, dalam hal ini asam kojik yang memiliki gugus hidroksil enolik akan bekerja secara kompetitif sebagai pengkhelat mengikat logam Cu^{2+} dan mencegahnya mengaktifkan tirosinase, sehingga terhambatnya aktivitas tirosinase menyebabkan pembentukan melanin juga dapat dicegah. Asam kojik juga memiliki sifat antioksidan, mencegah konversi o-quinone menjadi L-DOPA yang pada akhirnya akan membentuk melanin (Asadzadeh *et al.*, 2016; Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2014; Rho *et al.*, 2010a; Saeedi *et al.*, 2019).

II.4 Modifikasi Asam Kojik dengan Mannich Base

Derivat asam kojik dikembangkan dengan memodifikasi strukturnya sehingga dapat meningkatkan keamanan, sifat farmakokinetik dan kemampuan khelatingnya. Penggunaan metode sintesis dengan Mannich *base* biasanya lebih banyak digunakan untuk meningkatkan lipofilisitas senyawa, sehingga dapat meningkatkan penetrasi ke dalam sel oleh adanya struktur hidrofobik. (Asadzadeh *et al.*, 2016; Karakaya *et al.*, 2019).

Derivat asam kojik dapat disintesis dengan metode Mannich *base* karena sifat asam kojik seperti fenol, sehingga mudah mengalami aminometilasi pada posisi orto yang memiliki gugus hidroksil enolik dalam reaksi Mannich. Turunan asam kojik yang disintesis dengan Mannich *base* terjadi pada posisi C-6 asam kojik menggunakan dimetilamin, dietilamin, piroolidin, morpoline, piperidin atau 4-metilpiperazin dan asam klorokojik (Aytemir dan Özçelik, 2011). Modifikasi asam kojik menjadi derivat kojil tioeter telah menunjukkan sangat menghambat aktivitas tirosinase (Asadzadeh *et al.*, 2016; Rho *et al.*, 2010a).

Modifikasi asam kojik dengan mannich *base* dilakukan karena memungkinkan penggunaan pelarut yang lebih ramah lingkungan. Produk Mannich dibentuk melalui reaksi tiga komponen yang mengandung asam C-H, formaldehida dan amina sekunder. Mannich *base* direaksikan dengan nukleofil baik di dalam air (untuk senyawa yang larut dalam air)

atau dalam campuran etanol-air (untuk senyawa yang tidak larut dalam air) (Barta *et al.*, 2018; Roman, 2013).

II.5 Analisis Kemurnian Senyawa

II.5.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Prinsip dari pemisahan pada KLT didasarkan atas adsorpsi senyawa-senyawa oleh fase diam dan fase gerak. Pemisahan dapat terjadi akibat perbedaan kepolaran antara senyawa-senyawa dalam campuran dengan fase diam dan fase gerak. Perbedaan kepolaran inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan yang diamati melalui tampaknya bercak atau noda dengan nilai R_f (*Retardation factor*) yang berbeda berdasarkan kecepatan migrasi tiap senyawa (Leba, 2017).

Proses pemindahan solut dari fase gerak ke fase diam disebut dengan sorpsi, sementara itu proses sebaliknya (pemindahan solut dari fase diam ke fase gerak) disebut dengan desorpsi. Kedua proses ini terjadi secara terus menerus selama pemisahan kromatografi yang berada dalam kesetimbangan dinamis. Salah satu jenis mekanisme sorpsi yaitu adsorpsi yang merupakan penyerapan solut pada permukaan fase diam. Adsorpsi pada permukaan melibatkan interaksi-interaksi seperti ikatan hidrogen, penarikan dipol-dipol, dan penarikan yang diinduksi oleh dipol. Solut akan bersaing dengan fase gerak untuk berikatan dengan sisi-sisi polar pada permukaan adsorben (fase diam). Semakin polar solut maka

semakin tertahan kuat ke dalam adsorben yang bersifat polar. Solut polar, terutama yang mampu membentuk ikatan hidrogen, akan terikat kuat pada adsorben sehingga dibutuhkan fase gerak yang cukup polar untuk mengelusnya. Solut-solut non polar tidak mempunyai afinitas atau mempunyai afinitas yang rendah terhadap adsorben polar (Gandjar dan Rohman, 2007).

Perpindahan noda pada plat KLT dapat digambarkan dengan faktor retardasi (R_f). Nilai R_f dapat dihitung dengan perbandingan:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \quad (1)$$

Nilai maksimum R_f adalah 1 dan nilai ini diperoleh ketika noda mempunyai perbandingan distribusi dan faktor retensi sama dengan nol yang berarti noda berpindah dengan kecepatan dan posisi yang sama dengan fase gerak. Sedangkan, nilai minimum R_f adalah 0 dan nilai ini diperoleh ketika noda tertahan pada posisi titik awal di permukaan fase diam. Nilai R_f yang baik adalah antara 0,2 – 0,8 (Gandjar dan Rohman, 2007).

II.6 Karakterisasi Senyawa Derivat Kojil Tioeter

II.6.1 Pengujian Titik Lebur

Titik lebur suatu senyawa adalah temperatur ketika tekanan uap antara fase padatan dan cairan adalah sama. Pengujian titik lebur dilakukan untuk beberapa tujuan yaitu (1) jika suatu senyawa telah diketahui, maka titik lebur akan membantu karakterisasi sampel; (2) jika suatu senyawa belum diketahui, maka titik lebur dicatat untuk

memungkinkan karakterisasi lebih lanjut; (3) kisaran titik lebur menunjukkan kemurnian suatu senyawa, senyawa yang tidak murni akan meleleh pada kisaran suhu yang luas. Suatu senyawa yang murni akan melebur secara berulang pada rentang temperatur yang sempit yaitu kurang dari 1°C (Williamson dan Masters, 2010).

II.6.2 Spektrofotometri UV-Vis

Kisaran panjang gelombang untuk radiasi UV-Vis adalah 200-800 nm, untuk radiasi UV kisaran panjang gelombangnya adalah 200-400 nm, sementara radiasi sinar tampak mempunyai kisaran panjang gelombang 400-800 nm. Radiasi pada kisaran panjang gelombang ini (200-800 nm) mempunyai energi yang cukup untuk mengeksitasi elektron valensi dalam beberapa atom dan molekul. Spektroskopi UV-Vis termasuk ke dalam spektroskopi molekuler karena melibatkan eksitasi elektron valensi suatu molekul (Gandjar dan Rohman, 2018).

Jika suatu molekul bergerak dari suatu tingkat energi ke tingkat energi yang lebih rendah maka beberapa energi akan dilepaskan. Energi yang dilepaskan dapat berupa sebagai radiasi dan dapat dikatakan telah terjadi emisi radiasi. Jika suatu molekul bergerak ke tingkat energi yang lebih tinggi maka terjadi peristiwa penyerapan (absorpsi) energi oleh molekul. Suatu grafik yang menghubungkan antara banyaknya sinar yang diserap dengan frekuensi atau panjang gelombang sinar merupakan spektrum absorpsi. Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang

menyerap radiasi, sehingga spektra absorpsi dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pengukuran serapan cahaya oleh analit didasarkan pada hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Hukum Lambert-Beer dinyatakan sebagai berikut :

$$\text{Log } I_0/I = A = abc \quad (2)$$

Keterangan :

I_0 = Intensitas sinar mula-mula

I = Intensitas sinar setelah melalui larutan dengan ketebalan b

A = Absorban

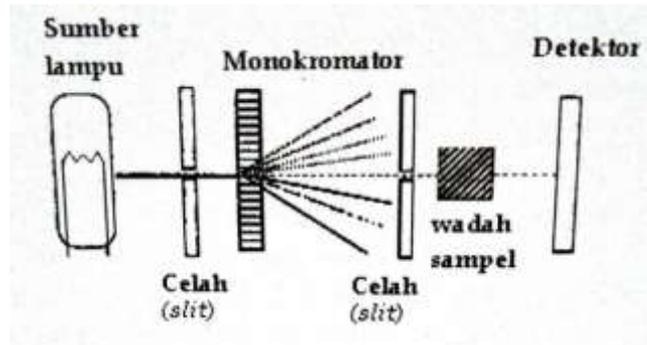
a = Absorptivitas

b = Tebal kuvet (cm)

c = Konsentrasi

Senyawa yang dapat diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis adalah senyawa yang mengandung gugus kromofor dan auksokrom. Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak. Kromofor adalah gugus yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dimana jika beberapa kromofor saling berikatan maka dapat menggeser absorpsi ke panjang gelombang lebih tinggi. Contoh dari kromofor seperti $C=C$, $C=O$, $C \equiv C$, $N=N$, $-NO_2$, $N=O$. Auksokrom adalah gugus fungsional yang memiliki pasangan elektron bebas dimana gugus auksokrom ini terikat

pada gugus kromofor. Terikatnya aoksokrom pada kromofor mengakibatkan pergeseran batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih tinggi. Contoh dari aoksokrom seperti $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$ (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 3. Diagram skematis Spektrofotometer UV-Vis (Gandjar dan Rohman, 2007)

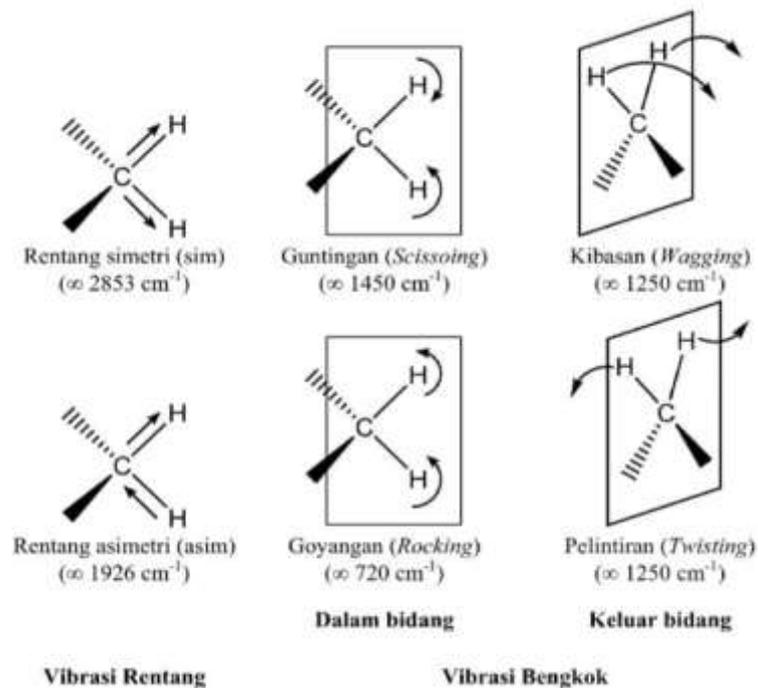
Adapun komponen-komponen dari spektrofotometri UV-Vis adalah:

- a. Sumber lampu seperti jenis lampu deuterium untuk pengukuran daerah UV pada panjang gelombang 190-350 nm dan lampu halogen kuarsa atau tungsten untuk pengukuran daerah visibel pada panjang gelombang 350-900 nm.
- b. Monokromator digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen analit yang panjang gelombangnya ditentukan melalui celah (slit).
- c. Optik dirancang untuk memecah sumber sinar sehingga sumber sinar mampu melewati dua kompartemen pada spektrofotometer berkas ganda.

II.6.3 Spektrofotometri Inframerah (FT-IR)

Spektrofotometri inframerah digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dari suatu molekul (Sastrohamidjojo, 2018). Daerah inframerah tengah (*Middle Infrared*, MIR) yaitu dari 4000 cm^{-1} ($\lambda = 2.5\ \mu\text{m}$) hingga 400 cm^{-1} ($\lambda = 25\ \mu\text{m}$). Gugus fungsi atau ikatan molekul dari senyawa analit akan menyerap radiasi elektromagnetik, sehingga akan menyebabkan ikatan molekul meregang atau bengkok. Panjang gelombang radiasi yang diserap merupakan karakteristik ikatan yang menyerapnya, dimana setiap tipe ikatan yang berbeda memiliki sifat frekuensi vibrasi yang berbeda. Daerah *fingerprint* atau daerah sidik jari (Pita absorpsi $<1500\text{ cm}^{-1}$) merupakan daerah identitas senyawa yang ditandai dengan absorpsi senyawa yang sangat kompleks dan sulit untuk menentukan gugus fungsinya, sehingga penentuan gugus fungsinya dilakukan pada daerah gugus fungsi dengan pita absorpsi $>1500\text{ cm}^{-1}$ (Gauglitz dan Moore, 2014; Sastrohamidjojo, 2018; Watson, 2012).

Seperti halnya dengan tipe penyerapan energi yang lain, maka molekul akan tereksitasi ke tingkatan energi yang lebih tinggi bila molekul menyerap radiasi inframerah. Hanya frekuensi (energi) tertentu dari radiasi inframerah yang akan diserap oleh molekul. Penyerapan radiasi inframerah sesuai dengan perubahan energi yang memiliki orde dari 2 hingga 10 kkal/mol. Radiasi dalam kisaran energi ini sesuai frekuensi vibrasi rentang (*stretching*) dan vibrasi bengkok (*bending*) atau deformasi dari ikatan kovalen dalam kebanyakan molekul (Sastrohamidjojo, 2018).



Gambar 4. Ragam vibrasi (Sastrohamidjojo, 2018)

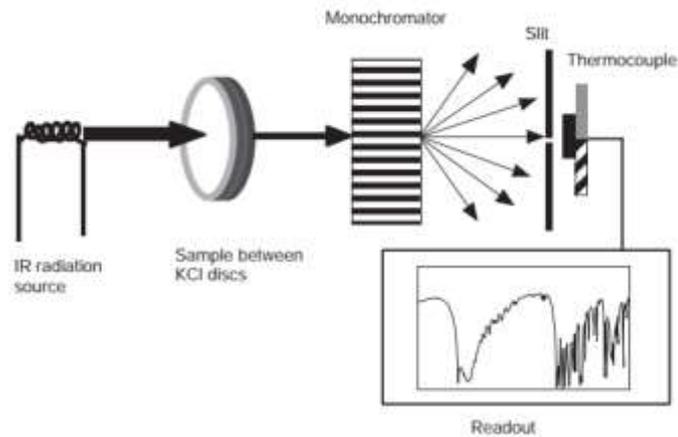
Ada dua jenis instrumen spektrofotometer inframerah yang digunakan untuk memperoleh spektrum inframerah. Pertama, instrumen dispersif yang menggunakan monokromator untuk memilih masing-masing bilangan gelombang secara berurutan untuk memantau intensitasnya setelah radiasi melewati sampel. Jika cahaya telah melewati sampel, cahaya tersebut didispersikan sehingga satu bilangan gelombang atau sedikit bilangan gelombang dapat dipantau secara berurutan dengan detektor yang melintasi rentang spektrum tersebut. Kedua, instrumen inframerah transformasi fourier (*Fourier transform infrared, FT-IR*) memiliki prinsip yang sama kecuali monokromator yang digantikan oleh suatu interferometer. Instrumen ini menghasilkan sumber radiasi dengan masing-masing bilangan gelombang tanpa memerlukan dispersi.

Keuntungan teknik ini adalah seluruh hasil pindai spektrum dapat diperoleh dalam waktu 1 detik, dibandingkan dengan instrumen dispersif yang memerlukan waktu 2-3 menit untuk mendapatkan satu spektrum (Watson, 2012).

Tabel 2. Pita absorpsi gugus fungsi pada spektrofotometri inframerah

Jenis ikatan	Tipe Vibrasi	Frekuensi (cm ⁻¹)
C-H	Alkana	3000-2850 cm ⁻¹
	-CH ₃	1450-1375 cm ⁻¹
	-CH ₂ -	1465 cm ⁻¹
	Aldehid	2900-2800 cm ⁻¹
	Aromatik	3150-3050 cm ⁻¹
C=C	Alkena	1680-1600 cm ⁻¹
	Aromatik	1600 dan 1475 cm ⁻¹
C≡C	Alkuna	2250-2100 cm ⁻¹
C=O	Aldehid	1740-1720 cm ⁻¹
	Keton	1725-1705 cm ⁻¹
	Asam karboksilat	1725-1700 cm ⁻¹
	Ester	1750-1730 cm ⁻¹
	Amida	1700-1640 cm ⁻¹
	Anhidrida	1810 dan 1760 cm ⁻¹
	Asam klorida	1800 cm ⁻¹
C-O	Alkohol, eter, ester, asam karboksilat, amhidrida	1300-1000 cm ⁻¹
O-H	Alkohol, fenolik	3650-3200 cm ⁻¹
	Asam Karboksilat	3400-2400 cm ⁻¹
N-H	Amin dan amida	3500-3100 cm ⁻¹
C-N	Amin	1350-1000 cm ⁻¹
C=N	Imin dan Oxim	1690-1640 cm ⁻¹
C≡N	Nitril	2260-2240 cm ⁻¹
X=C=Y	Allen, ketenes, isosianat, isotiosianat	2270-1940 cm ⁻¹
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 dan 1350 cm ⁻¹
S-H	Mercaptan	2550 cm ⁻¹
S=O	Sulfoksida	1050 cm ⁻¹
	Sulfon, sulfonil klorida, sulfat, dan sulfonamida	1375-1300 cm ⁻¹
		1350-1140 cm ⁻¹
C-X	Fluorida	1400-1000 cm ⁻¹
	Klorida	785-540 cm ⁻¹
	Bromida, Iodida	<667 cm ⁻¹

Sumber : Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R. *Introduction to Spectroscopy*. Fifth Edition. Cengage Learning. USA. 2015. Hal. 29

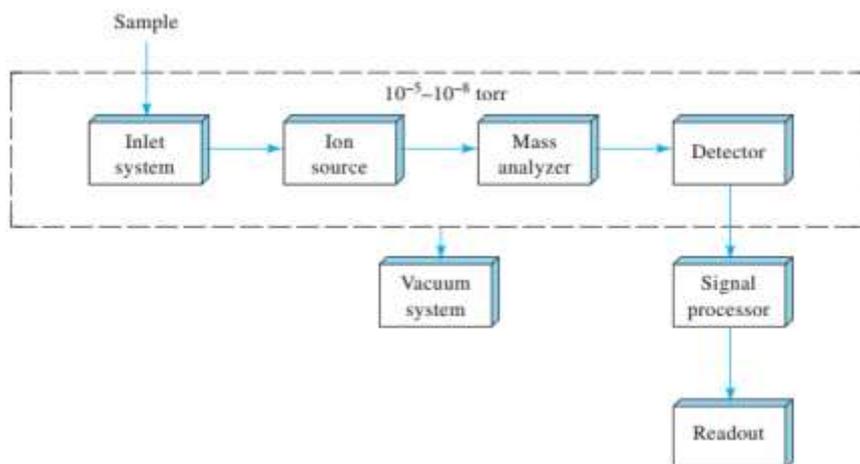


Gambar 5. Skema instrumen spektrofotometer IR (Watson, 2012)

II.6.4 Spektrofotometri Massa

Spektrometer massa digunakan untuk mengidentifikasi massa molekul suatu senyawa, proses Molekul bermuatan atau fragmen molekul dihasilkan di daerah vakum tinggi, atau segera sebelum sampel memasuki daerah vakum tinggi, menggunakan berbagai metode untuk produksi ion. Ion-ion tersebut dihasilkan dalam fase gas sehingga mereka bisa kemudian dimanipulasi dengan penerapan medan listrik atau magnet untuk memungkinkan penentuan berat molekulnya (Watson, 2012).

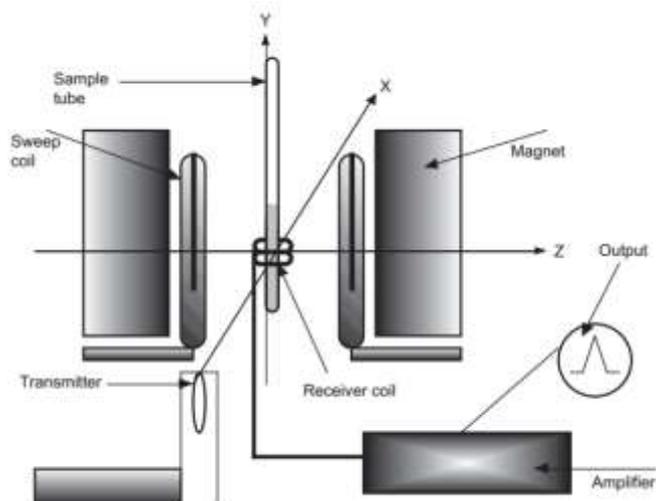
Spektrometri massa (MS) adalah metode analitik di mana ion-ion gas diproduksi dan kemudian dikenai medan magnet dan listrik dalam ruang hampa tinggi untuk analisis rasio massa/muatan (Gauglitz dan Moore, 2014).



Gambar 6. Komponen spektrometer massa (Skoog *et al.*, 2014)

II.6.5 Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) merupakan suatu instrumen yang digunakan untuk mengkarakterisasi struktur senyawa secara tepat, menentukan pengotor, serta dapat menganalisis obat secara kuantitatif. Prinsip dalam NMR ialah sampel dapat menyerap radiasi elektromagnetik di daerah frekuensi radio yang digunakan untuk mengeksitasi atom, seperti proton atau ^{13}C , sehingga putarannya berubah dari sejajar menjadi sejajar dengan medan magnet yang diterapkan. Rentang frekuensi yang diperlukan untuk eksitasi dan pola pemisahan kompleks yang dihasilkan merupakan karakteristik dari struktur kimia senyawa analit. Semakin besar kekuatan medan magnetnya, semakin besar frekuensi radiasi yang diperlukan untuk menyebabkan putaran pada suatu inti agar sejajar dengan medan magnet (Watson, 2012).



Gambar 7. Skema instrumen NMR (Watson, 2012)

Sampel dianalisis dalam larutan dengan menggunakan pelarut deuterasi untuk memastikan tidak ada gangguan terhadap sinyal dari proton. Frekuensi ketika diserapnya proton dalam molekul direkam sebagai pergeseran kimia (*Chemical shift*) dalam ppm (*Parts per million*) dan luas setiap sinyal sebanding dengan jumlah proton yang menyerap radiasi direkam sebagai integral. Pola multiplisitas (*Multiplicity*) atau pemisahan (*Splitting*) atau kopleng (*Coupling*) dari setiap sinyal disebabkan adanya spin proton atom tetangga, sehingga setiap sinyal proton dipecah menjadi dua atau lebih baris mengikuti aturan $n+1$, di mana n adalah jumlah proton tetangga. Pola pemisahan yang lebih kompleks akan muncul jika konstanta kopleng atom tetangga tidak setara (Watson, 2012).

Untuk memperoleh pengukuran yang kuantitatif diperlukan suatu titik rujukan dalam hal ini digunakan tetrametilsilana (TMS), $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, dimana semua protonnya saling simetris dan ekuivalen, serta protonnya lebih terlindungi dibandingkan hampir semua proton organik lainnya

sehingga menghasilkan satu puncak absorpsi pada ujung kanan dari spektrum NMR dan menunjuk nol pada skala δ sedangkan absorpsi proton lain ditemukan dibawah medan absorpsi TMS. Selisih antara posisi absorpsi TMS dan posisi absorpsi suatu proton tertentu disebut pergeseran kimia (*Chemical shift*), yang ditandai dengan simbol δ dan dinyatakan sebagai bagian per juta (ppm) (Fessenden dan Fessenden, 2010; Silverstein *et al.*, 2005).

Ada tiga faktor utama yang memengaruhi pergeseran kimiawi yaitu efek induktif oleh gugus elektronegatif, *deshielding* karena kerapatan elektron berkurang (disebabkan karena adanya atom elektronegatif), anisotropik (karena medan magnet yang dihasilkan oleh ikatan π). Semakin proton terlindungi oleh kerapatan elektron di sekitarnya, semakin rendah nilai δ nya. Jika proton terikat pada sistem yang menarik elektron dari lingkungan kimianya, seperti kelompok elektronegatif, atau kelompok yang mempengaruhi lingkungannya dengan menciptakan medan yang berlawanan dengan medan magnet yang diterapkan, seperti proton yang terikat pada sebuah cincin aromatik, nilai δ nya akan meningkat, yaitu akan beresonansi pada medan yang lebih rendah (frekuensi yang lebih rendah) sedangkan proton alifatik akan beresonansi pada medan yang lebih tinggi (frekuensi yang lebih tinggi) (Watson, 2012).

Tabel 3. Perkiraan nilai pergeseran kimia untuk proton non-aromatik yang terikat pada karbon

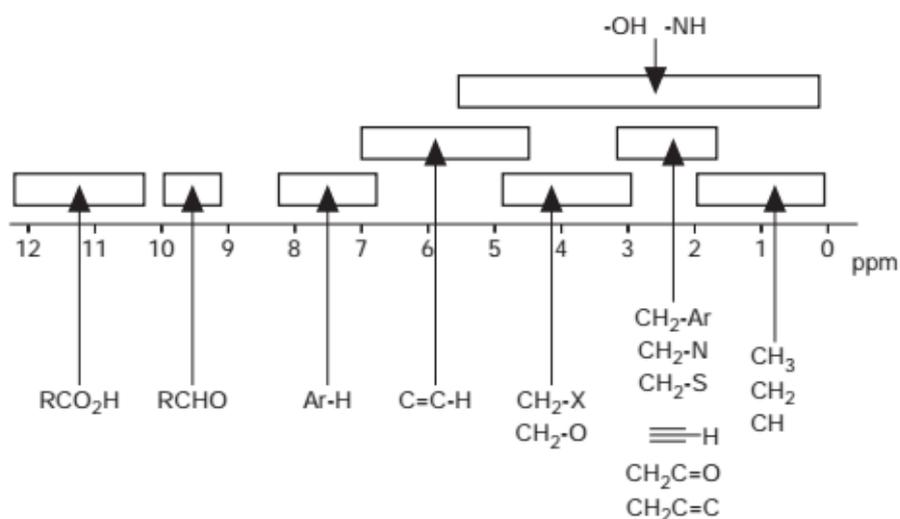
Gugus	δ ppm	Gugus	δ ppm	Gugus	δ ppm
CH ₃ -C	0.9	R-CH ₂ -C	1.4	CH-C	1.5
CH ₃ -C-O	1.3	R-CH ₂ -C-N	1.4	CH-C-O	2.0
CH ₃ -C=C	1.6	R-CH ₂ -C-O	1.9	CH-CO-N	2.4
CH ₃ -CO	2.0	R-CH ₂ -CO-N	2.2	CH-CO	2.7
CH ₃ -CO-N	2.0	R-CH ₂ -C=C	2.3	CH-N	2.8
CH ₃ -N	2.4	R-CH ₂ -CO	2.4	CH-Ar	3.3
CH ₃ -Ar	2.3	R-CH ₂ -N	2.5	CH-O	3.9
CH ₃ -O	3.3	R-CH ₂ -Ar	2.9	CH-N-CO	4.0
CH ₃ N ⁺ (R) ₃	3.3	R-CH ₂ -O	3.6	CH-Cl	4.2
CH ₃ -O-CO	3.7	R-CH ₂ -O-CO	4.1	R-CH=C	4.5–6.0

Sumber : Watson. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Third Edition. Churchill Livingstone. Elsevier. 2012. Hal. 170

Tabel 4. ¹H pergeseran bagian CH₃ dalam hubungannya dengan substituen elektronegatif

X	Senyawa, CH ₃ X						
	F	O	Cl	Br	I	H	Si
Elektronegativitas dari X	4.00	3.50	3.10	2.80	2.50	2.10	1.80
Pergeseran kimia, δ /ppm	4.26	3.40	3.05	2.68	2.16	0.20	0

Sumber : Watson. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Third Edition. Churchill Livingstone. Elsevier. 2012. Hal. 171



Gambar 8. Skema nilai pergeseran kimia berbagai bagian fungsional (Watson, 2012)