

**SKRIPSI
SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT ASAM
KOJIK**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF KOJIC
ACID DERIVATIVES**

Disusun dan diajukan oleh

**LIVIA AURELLIA PIANTO
N011 17 1001**



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

SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT ASAM KOJIK

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF KOJIC ACID
DERIVATIVES**

SKRIPSI

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

**LIVIA AURELLIA PIANTO
N011 17 1001**

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

SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT ASAM KOJIK

LIVIA AURELLIA PIANTO

N011.17.1001



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 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI
SINTESIS DAN KARAKTERISASI DERIVAT ASAM KOJIK

Disusun dan diajukan oleh:

LIVIA AURELLIA PIANTO
N011 17 1001


Telah dipertahankan di hadapan Panitia yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas
Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 30 Mei 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

Rt. 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 di bawah ini:

Nama : Livia Aurellia Pianto

NIM : N011 17 1001

Program Studi : Farmasi

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan Judul "Sintesis dan Karakterisasi Derivat Asam Kojik" 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, Mei 2021

Yang menyatakan



Livia Aurellia Pianto

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan yang Maha Esa atas berkat, tuntunan, dan kasih-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai syarat untuk menyelesaikan studi S1 dan mendapat gelar sarjana pada Program Studi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Atas berkat Tuhan, dukungan dan bantuan berbagai pihak, kendala-kendala dalam penyusunan skripsi ini dapat penulis selesaikan. Oleh karena itu, penulis dengan tulus mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada 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 waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing selama penelitian hingga skripsi ini selesai.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt., Bapak Achmad Himawan, S.Si., M.Si., Apt., dan Ibu Sandra Aulia Mardikasari, S.Si, M.Farm., Apt. selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran terhadap skripsi penulis. Penulis juga berterima kasih kepada Bapak Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt. dan Bapak Muh. Akbar Bahar, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. selaku penasehat akademik penulis atas waktu dan arahan selama penulis menjalani studi. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dekan, para Wakil Dekan, semua dosen dan staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu dan fasilitas yang telah diberikan selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan penelitian ini.

Terkhusus kepada Yayasan Karya Salemba Empat (KSE) dan Give2Asia, segenap Korps Asisten Kimia Farmasi, dan Paguyuban Karya Salemba Empat Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan penulis untuk belajar dan melatih *softskill*, serta seluruh teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Akhirnya, semua ini tiada artinya tanpa dukungan, doa, dan motivasi dari kedua orangtua tercinta dan kedua adik penulis yang selalu mendampingi penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna dan masih banyak kekurangan. Oleh sebab itu, penulis sangat mengharapkan adanya kritik, saran, dan masukan yang membangun dari semua pembaca untuk perbaikan penelitian ini kedepannya. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, Mei 2021

Livia Aurellia Pianto

ABSTRAK

LIVIA AURELLIA PIANTO *Sintesis dan Karakterisasi Derivat Asam Kojik*
(dibimbing oleh Yusnita Rifai dan Risfah Yulianty).

Asam kojik merupakan salah satu jenis pemutih kulit, bekerja dengan menghambat enzim tirosinase dan memiliki beragam aktivitas. Namun adanya beberapa kekurangan sehingga perlu dilakukan sintesis derivat asam kojik menggunakan Mannich *base* untuk meningkatkan lipofilisitas senyawa dengan membentuk ikatan C-C dan C-N. Senyawa hasil sintesis berupa cairan merah agak kental dengan *yield* sebesar 47,08%. Senyawa hasil sintesis ini dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa, inframerah, UV-Vis, dan ¹H-NMR. Berdasarkan spektra IR, senyawa hasil sintesis ini diketahui memiliki gugus *amine*, aldehid, dan benzena yang tidak ditemukan pada asam kojik, serta memiliki satu gugus hidroksil. Senyawa hasil sintesis ini mengandung unsur Mannich *base* tetapi kemurniannya masih rendah meskipun berdasarkan profil KLT hanya ditemukan satu spot tunggal. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa derivat asam kojik dapat disintesis dengan Mannich *base*.

Kata kunci : asam kojik, aminometilasi, Mannich *base*

ABSTRACT

LIVIA AURELLIA PIANTO *Synthesis and Characterization of Kojic Acid Derivatives* (supervised by Yusnita Rifai and Risfah Yulianty).

Kojic acid is a skin lightening, a tyrosinase inhibitor and has various biologic activities. However, kojic acid has several weakness, hence, synthesis of kojic acid derivative is carried out with Mannich base. Mannich base can increase lipophilicity by forming C-C and C-N bond. The synthesized compound is a slightly thick red liquid and yield of 47,08%. This synthesized compound is characterized using mass spectrophotometer, infrared spectrophotometer, UV-Vis spectrophotometer, and ¹H-NMR. According to IR spectra, this synthesized compound consists of amine, aldehyde, and benzene groups which are not found in kojic acid, and also consists of a hydroxyl group. This synthesized compound contains Mannich base elements but has low purity even though a single spot is found in TLC profile. Based on the obtain data, it can be concluded that kojic acid derivative can be synthesized using Mannich base.

Keywords : aminomethylation, kojic acid, Mannich base

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Melanin, Melanosit, dan Melanogenesis	5
II.2 Klasifikasi Senyawa Depigmentasi	6
II.3 Definisi dan Karakteristik Asam Kojik	8
II.4 Mekanisme Kerja Asam Kojik	12
II.5 Hasil Studi Asam Kojik terhadap Melanogenesis	13
II.6 Indikasi dari Asam Kojik dan Derivatnya	14
II.7 Modifikasi Asam Kojik dengan Mannich <i>Base</i>	14

II.8 Karakterisasi Derivat Asam Kojik	
II.8.1 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Melting Point</i>	15
II.8.2 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC) atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	16
II.8.3 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Ultraviolet-Visible Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer UV-Vis)	18
II.8.4 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Infrared Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer IR)	21
II.8.5 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Mass Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer Massa)	23
II.8.6 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR)	25
BAB III METODE PENELITIAN	
III.1 Alat dan Bahan	29
III.2 Cara Kerja	
III.2.1 Sintesis dan Purifikasi Derivat Asam Kojik	30
III.2.2 Karakterisasi Derivat Asam Kojik	
III.2.2.1 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Melting Point</i>	30

III.2.2.2 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC) atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	31
III.2.2.3 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Ultraviolet-Visible Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer UV-Vis)	31
III.2.2.4 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Infrared Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer IR)	32
III.2.2.5 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan <i>Mass Spectrophotometer</i> (Spektrofotometer Massa)	32
III.2.2.6 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR)	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Skema Reaksi Sintesis Derivat Asam Kojik	34
IV.2 Pemerian Senyawa Hasil Sintesis Derivat Asam Kojik	34
IV.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Sintesis Derivat Asam Kojik	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	45
V.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Mekanisme Kerja Senyawa Depigmentasi	7
2. Hasil NMR Asam Kojik	11
3. Pemerian Senyawa Hasil Sintesis Derivat Asam Kojik	34
4. Hasil Karakterisasi Spektrofotometer UV-Vis Asam Kojik dan Senyawa Derivat Asam Kojik	38
5. Hasil Karakterisasi Spektrofotometer IR Asam Kojik dan Senyawa Derivat Asam Kojik	40
6. Hasil Karakterisasi $^1\text{H-NMR}$ IR Asam Kojik dan Senyawa Derivat Asam Kojik	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Mekanisme Melanogenesis	6
2. Struktur Asam Kojik	8
3. Spektra UV Asam Kojik	11
4. Spektra HPLC Asam Kojik	11
5. Mekanisme Asam Kojik Menghambat Tirosinase dalam Biosintesis Melanin	12
6. Mekanisme Asam Kojik Menghambat Aktivitas Enzim Tirosinase	12
7. Skema Instrumen Spektrofotometer UV-Vis	19
8. Pita Absorpsi Gugus Kromofor	20
9. Skema Instrumen Spektrofotometer IR	22
10. Karakteristik <i>Peak</i> Absorpsi pada Spektrofotometer IR	22
11. Skema Instrumen Spektrofotometer Massa	24
12. Skema Instrumen NMR	26
13. <i>Chemical Shift</i> ^1H NMR	27
14. <i>Chemical Shift</i> ^{13}C NMR	28
15. Skema <i>Proposed Reaction</i> Sintesis Derivat Asam Kojik dengan Mannich <i>Base</i>	34
16. Proses refluks derivat asam kojik	53

17. Hasil refluks derivat asam kojik	53
18. Hasil refluks derivat asam kojik setelah di- <i>freezer</i> semalaman	53
19. Proses filtrasi vakum derivat asam kojik	53
20. Cairan cuci derivat asam kojik dengan aseton <i>pro analysis</i> hangat	54
21. Cairan cuci derivat asam kojik dengan etanol <i>pro analysis</i> hangat	54
22. Penetralkan cairan cuci derivat asam kojik dengan etanol <i>pro analysis</i> hangat	54
23. Proses rotavapor cairan cuci derivat asam kojik dengan etanol <i>pro analysis</i> hangat (dinetralkan)	54
24. Hasil rotavapor cairan cuci derivat asam kojik dengan etanol <i>pro analysis</i> hangat (dinetralkan)	55
25. Monitoring purifikasi dengan fase gerak aseton:heksan (3:1)	55
26-29. Monitoring purifikasi dengan fase gerak metanol:air (9:1)	55-56
30. Derivat asam kojik (sebelum diuapkan)	57
31. Cairan cuci derivat asam kojik dengan etanol <i>pro analysis</i> hangat (yang telah dinetralkan)	57
32. Skema <i>Proposed Reaction Mechanism</i> Sintesis Derivat Asam Kojik dengan Mannich <i>Base</i>	59
33. Titik Leleh Asam Kojik	60
34. Spektra UV Asam Kojik 10 ppm	61
35. Spektra UV Derivat Asam Kojik 10 ppm	62
36. Spektra IR Asam Kojik	63
37. Spektra IR Derivat Asam Kojik	63

38. Spektra <i>Mass Spectrophotometer</i> Derivat Asam Kojik	65
39. Spektra $^1\text{H-NMR}$ Asam Kojik	66
40. Spektra $^1\text{H-NMR}$ Derivat Asam Kojik Jurnal	66
41. Spektra $^1\text{H-NMR}$ Derivat Asam Kojik	67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Sintesis dan Karakterisasi Derivat Asam Kojik	52
2. Gambar Penelitian	53
3. Perhitungan <i>Yield</i>	58
4. Skema <i>Proposed Reaction Mechanism</i>	59
5. Data Penelitian	60

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Saat ini sejumlah bahan pemutih kulit populer digunakan diantaranya hidrokuinon, asam kojik, monobenzil eter hidrokuinon, asam gentis, asam azelat, *licorice*, arbutin, retinoid, *niacinamide*, *mequinol*, kedelai, vitamin C, kortikosteroid, *hydroxystilbene*, glutation, *alosein*, asam glikolat, n-asetil glukosamin, ekstrak tanaman, dan melatonin (Sakamoto *et al.*, 2017). Arbutin, hidrokuinon, asam azelat, dan asam kojik bekerja dengan cara menghambat enzim tirosinase. Hidrokuinon terbukti memiliki efek mutagenik dan sitotoksik terhadap melanosit, menyebabkan kulit kering ataupun iritasi hingga terjadinya hiperpigmentasi inflamasi, dan karsinogenesis sehingga hidrokuinon telah dilarang penggunaannya di Asia. Dengan demikian, sebagai alternatif dari hidrokuinon digunakan asam kojik (Ashooriha *et al.*, 2018; Saeedi *et al.*, 2019).

Asam kojik dan derivatnya memiliki beragam aktivitas diantaranya sebagai bakteriostatik, antiinflamasi, insektisidal, antibiotik, sitotoksik, antitumor, antifungal, antineoplastik, antiproliferatif, anti-HIV, antikonvulsan, antikanker, antibakteri, antimikroba, antivirus, pestisida, radioprotektif, antidiabetes, dan penghambat aktivitas enzim tirosinase (Wei *et al.*, 2011; Balakrishna *et al.*, 2015; Hashemi and Emami, 2015).

Asam kojik dan derivatnya digunakan dalam krim, *lotion*, dan sabun sebagai pemutih atau pencerah kulit. Senyawa tersebut bekerja dengan cara memblokir pembentukan pigmen melanin pada kulit sehingga resiko kerusakan kulit akibat paparan sinar matahari berlebih seperti *sunburn*, kanker kulit, dan stress oksidatif dapat dicegah (Saeedi *et al.*, 2019; Ola *et al.*, 2019).

Asam kojik memiliki efikasi, stabilitas, dan penetrasi yang rendah; berpotensi mengiritasi kulit; bersifat sitotoksik; tidak stabil selama penyimpanan; sensitif terhadap suhu, radiasi, pH, dan kelembaban sehingga penggunaan asam kojik terbatas dan menurunkan nilai jualnya (Ashooriha *et al.*, 2018; Saghaie *et al.*, 2013; Lajis *et al.*, 2017). Sifat asam kojik yang larut dalam air mengakibatkan asam kojik tidak akan stabil dalam formulasi kosmetika (Chen *et al.*, 2002; Ashari *et al.*, 2009). Hipersensitivitas asam kojik berpotensi mengakibatkan dermatitis sehingga asam kojik dikombinasikan dengan kortikosteroid topikal (Hashemi and Emami, 2015).

Kekurangan-kekurangan dari asam kojik menjadi tujuan dilakukannya sintesis derivat asam kojik, selain itu sintesis derivat asam kojik dapat meningkatkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase. Menurut Kim *et al* (2002), substitusi pada 7-hidroksi dengan gugus penghubung (*connecting groups*) dan pada 7-hidroksimetil dengan gugus hidrofobik dapat meningkatkan aktivitas penghambatan enzim tirosinase sehingga senyawa yang dihasilkan memiliki stabilitas lebih baik dibandingkan asam kojik dan efek samping yang lebih rendah pada kulit (Kim *et al.*, 2002).

Esterifikasi merupakan salah satu metode untuk meningkatkan lipofilisitas asam kojik karena senyawa ester memiliki stabilitas terhadap pH, suhu, cahaya, dan penyimpanan yang baik, serta larut dalam minyak sehingga lebih mudah diserap kulit (Ashari *et al.*, 2009). Derivat ester asam kojik dari asam laurat dan asam oleat dengan lipase dari *Candida antarctica* dan *Pseudomonas cepacia* dapat meningkatkan lipofilisitas asam kojik, namun esterifikasi gugus hidroksil pada C₇ asam kojik sulit dilakukan dengan katalis kimia (Raku and Tokiwa, 2003).

Proses esterifikasi asam kojik dapat dilakukan secara kimiawi, tetapi bahan yang digunakan mahal dan tidak alami. Suhu yang tinggi selama proses esterifikasi dapat mendegradasi senyawa ester tersebut, sehingga menghasilkan produk sampingan yang tidak diinginkan, *yield* yang rendah, kompleks, dan sulit dimurnikan (Ashari *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2002).

Derivat asam kojik dapat disintesis menggunakan Mannich *base* sehingga derivat yang dihasilkan memiliki aktivitas biologis sebagai antikonvulsan, antibakteri, antifungal, antimikobakterial, anti-aging, antioksidan, antitirozinase, dan antivirus dengan sitotoksitas. Mannich *base* tidak dapat mengalkilasi gugus hidroksil dan amino yang menyebabkan mutagen dan genotoksik sehingga dapat bersifat sebagai antikarsinogen. Reaksi Mannich *base* menggunakan senyawa amina untuk meningkatkan lipofilisitas senyawa, membutuhkan waktu reaksi yang lebih singkat, dan menghasilkan *yield* yang lebih banyak (Karakaya *et al.*, 2019).

Berdasarkan stabilitas, kelarutan, dan efek samping asam kojik maka dalam penelitian ini dilakukan sintesis menggunakan Mannich *base* dan senyawa amina (aminometilasi) sehingga lipofilisitas asam kojik meningkat. Aminometilasi merupakan reaksi pembentukan ikatan C-C dan C-N berdasarkan reaksi Mannich menggunakan formaldehid (Mondal *et al.*, 2017).

I.2 Rumusan Masalah

Apakah senyawa derivat asam kojik dapat disintesis secara aminometilasi menggunakan Mannich *base* dan bagaimanakah karakteristik senyawa tersebut?

I.3 Tujuan Penelitian

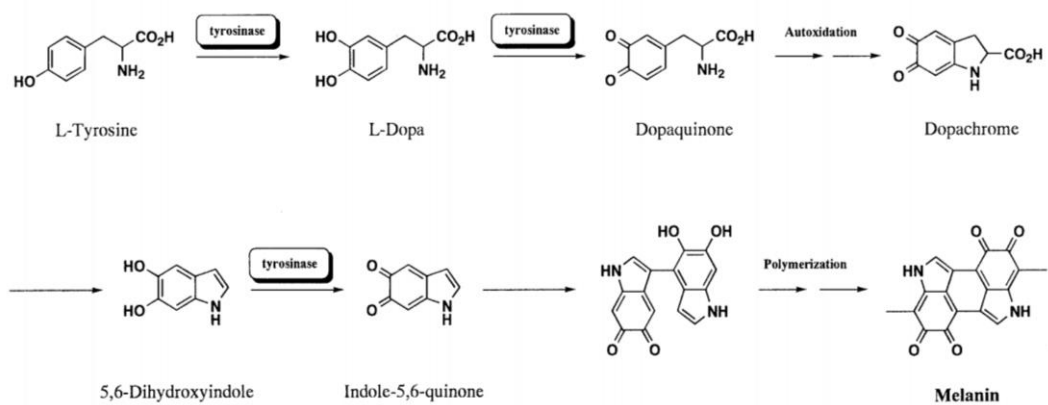
Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis senyawa derivat asam kojik melalui proses aminometilasi pada asam kojik dan melakukan karakterisasi senyawa hasil sintesis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Melanin, Melanosit, dan Melanogenesis

Melanin melindungi kulit dari efek berbahaya seperti radiasi UV, stress oksidatif, dan kerusakan DNA. Pigmen melanin terdiri dari tiga jenis, yaitu feomelanin, eumelanin, dan neuromelanin. Feomelanin dan eumelanin terdapat pada kulit, iris, dan vaskular telinga bagian dalam, sedangkan neuromelanin terdapat di otak. Reaksi oksidasi dan reaksi kompleks mengubah warna eumelanin dan feomelanin dalam tubuh masing-masing menjadi coklat hingga hitam dan kuning hingga coklat kemerahan. Melanin merupakan polimer kompleks yang berasal dari tirosin dan senyawa intermediet lainnya, disintesis oleh melanosit di melanosom. Melanosit terletak di lapisan basale (lapisan terbawah epidermis). Jumlah melanosit pada setiap orang mirip, tetapi komposisi feomelanin dan eumelanin yang berbeda-beda serta distribusi melanin baik secara vertikal dan horizontal pada lapisan kulit menghasilkan warna kulit yang beragam pada setiap orang (Masum *et al.*, 2019; Boo, 2019; Saeedi *et al.*, 2019; Hasil *et al.*, 2020).



Gambar 1. Mekanisme Melanogenesis (Morisaki and Ozaki, 1996)

Melanogenesis merupakan proses pembentukan melanin oleh melanosit di kulit. Melanogenesis berhubungan dengan tiga jenis enzim, yaitu tirosinase, *tyrosinase related protein I* (Trp 1), dan *tyrosinase related protein II* (Trp II). Enzim tirosinase merupakan penentu utama terhadap kulit. Enzim tirosinase mengandung tembaga dan bekerja dengan mengkatalisis dua reaksi biosintesis melanin, yaitu reaksi hidrosilasi tirosin menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) melalui *monophenolase* dan reaksi oksidasi L-DOPA menjadi o-dopaquinon melalui *diphenolase*. Dopaquinon dikonversi secara nonenzimatis menjadi *dopachrome*, lalu menjadi *dihydroxyindoles* yang memproduksi pigmen melanin (Hasil *et al.*, 2020; Saghaie *et al.*, 2013; Balakrishna *et al.*, 2015; Masum *et al.*, 2019).

II.2 Klasifikasi Senyawa Depigmentasi

Gangguan pigmentasi kulit disebabkan oleh distribusi, struktur, dan fungsi dari melanosit yang tidak normal (Khezri *et al.*, 2020). Senyawa depigmentasi dapat menghambat melanogenesis dan membantu menyembuhkan hiperpigmentasi dikategorikan menjadi tiga, yakni mengontrol

tirosinase, menghambat transfer melanosom, dan antioksidan. Senyawa depigmentasi yang mengontrol tirosinase dikategorikan berdasarkan mekanismenya menjadi **menghambat aktivitas tirosinase**, mereduksi produksi dari tirosinase, dan meningkatkan degradasi tirosinase (Sakamoto *et al.*, 2017; Couteau and Coiffard, 2016).

Tabel 1. Mekanisme Kerja Senyawa Depigmentasi (Sakamoto *et al.*, 2017; Couteau and Coiffard, 2016)

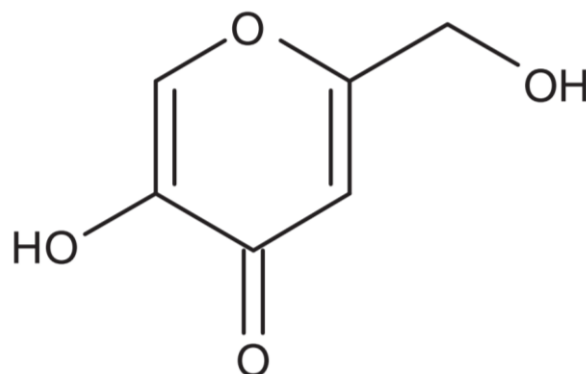
Mekanisme Kerja		Contoh Senyawa
mengontrol tirosinase	menghambat aktivitas tirosinase	hidrokuinon, arbutin, asam kojik , asam azelat, 4-n-butilresorsinol, <i>mequinol</i> , resveratrol, oksiresvaretral, dan asam elagik
	mereduksi produksi tirosinase	sfingosin-1-fosfat, asam lisofosfatidik, <i>ceramide</i> , dan sfingosilfosforilkolin
	meningkatkan degradasi tirosinase	asam linolenat, asam linoleat, asam oleat, dan fosfolipase D2
menghambat transfer melanosom		<i>centareuidine</i> , <i>niacinamide</i> (vitamin B3), lektin, dan neoglikoprotein
antioksidan		asam askorbat, α -tokoferol, 6-hidroksi-3,4-dihidroksumarin, dan asam α -lipoat (<i>thiotic acid</i>)

Hidrokuinon, arbutin, dan asam kojik dapat menghambat aktivitas tirosinase sehingga dapat memutihkan kulit. Namun arbutin dan bentuk aglikonnya yakni hidrokuinon dapat mengiritasi kulit dan menyebabkan dermatitis (Couteau and Coiffard, 2016; Taddeo *et al.*, 2019). Hidrokuinon dapat mengiritasi kulit; menyebabkan dermatitis (penyembuhan dengan steroid topikal), *exogenous ochronosis*, *sooty hyperpigmentation* yang sulit diobati (Afifah *et al.*, 2018); perubahan warna pada kuku; bersifat sitotoksik terhadap melanosit; bahkan dapat mengakibatkan kematian. Metabolit

hidrokuinon bersifat toksik terhadap sumsum tulang (Couteau and Coiffard, 2016). Senyawa yang dapat menghambat sintesis melanin dapat digunakan sebagai pencerah kulit (Khezri *et al.*, 2020).

II.3 Definisi dan Karakteristik Asam Kojik

Asam kojik (berasal dari kata “*Koji*”) merupakan asam organik dan hasil fermentasi aerobik berbagai jenis fungi diantaranya *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii*, *A. parasiticus*, *Penicillium*, bakteri basil penghasil asam asetat seperti *Acetobacter*, dan juga proses fermentasi makanan Asia seperti kecap dan *wine* sebagai media dari fungi ataupun inokulum (Saeedi *et al.*, 2019).



Gambar 2. Struktur Asam Kojik (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4-piron) (C₆H₆O₄) (Saeedi *et al.*, 2019; Ando, 2017; Sakamoto *et al.*, 2017; Goldberg and Rokem, 2009)

Struktur asam kojik terdiri dari cincin benzena dengan dua gugus hidroksi sehingga asam kojik bersifat polar. Gugus hidroksil pada C₅ dari cincin γ -piron menghasilkan sifat asam lemah pada molekul asam kojik. Asam kojik dapat membentuk garam terhadap logam-logam seperti Na, Zn, Cu, Ca, Ni, dan Cd sehingga asam kojik dimanfaatkan sebagai pengkhelat logam. Asam kojik bersifat reaktif dan digunakan dalam produk industri sebagai piridon, piridin, eter, pewarna azo, **Mannich base** atau *beta-amino-ketone* (dibentuk

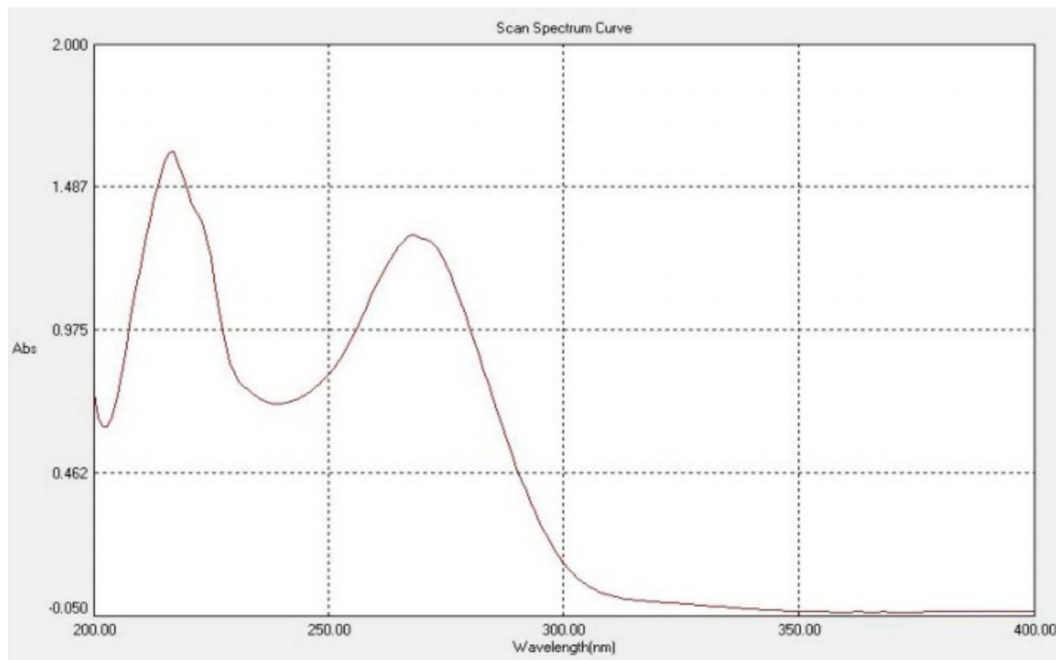
berdasarkan reaksi dari amina, aldehid, dan *carbon acid*), dan produk *cyanoethylation*. Asam kojik memiliki sifat yang mudah larut dalam air, etanol, dan aseton. Derivat asam kojik yang efektif berupa senyawa ester, laurat, dipalmitat, dan etil fosfonat dengan aldehid (Ishak *et al.*, 2018; Saeedi *et al.*, 2019; Goldberg and Rokem, 2009).

Asam kojik diabsorpsi ke dalam kulit diperkirakan sebesar 0,03-0,06 mg/kg/hari. Asam kojik secara signifikan cenderung berpenetrasi ke dalam dermis dan epidermis dengan laju penetrasi sebesar $16,98 \pm 10,28\%$; $3,58 \pm 2,38$ ^{14}C -mgEq/cm² pada kulit yang diobati atau dilakukan perawatan. Konsentrasi plasma asam kojik pada enam wanita Jepang *postmenopause* yang diberikan krim asam kojik 1% dengan 1 ng/mL menunjukkan bahwa asam kojik tidak berpenetrasi transdermal ke dalam darah (Saeedi *et al.*, 2019).

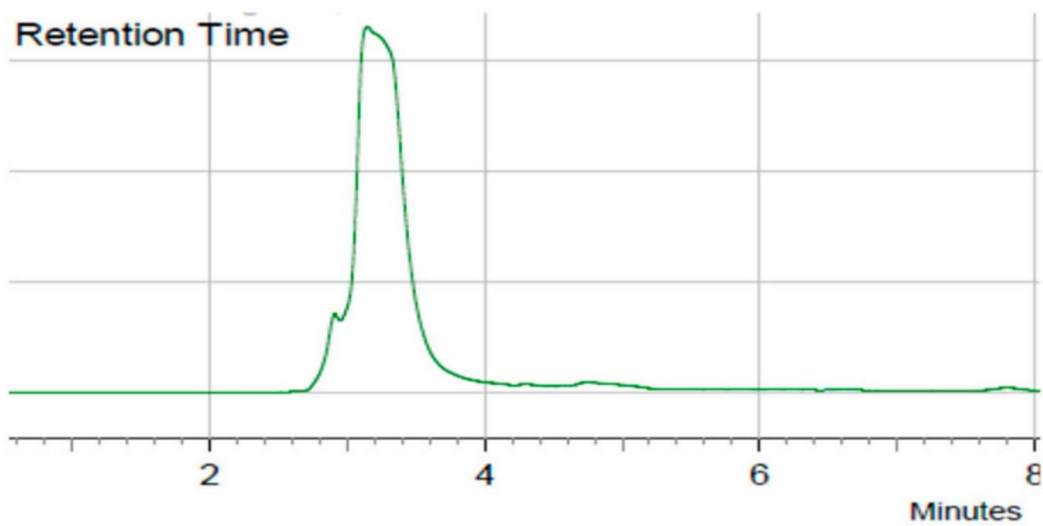
Asam kojik dan derivatnya digunakan dengan konsentrasi 1-4% sebagai pencerah kulit. Dosis asam kojik dalam formulasi *skin care* menurut *Cosmetic Ingredient Review Expert Panel* (CIREP) dan *European Commission's Scientific Committee* seharusnya 1%. Konsentrasi terbaik asam kojik dalam sediaan topikal sebesar $\leq 1\%$. Efek samping dari penggunaan asam kojik melebihi 1% mengakibatkan dermatitis khususnya pada kulit yang sensitif, diikuti oleh iritasi, ruam, peradangan, gatal, dan sakit. Penggunaan asam kojik dalam jangka waktu panjang mengakibatkan kulit menjadi sensitif terhadap *sunburn* dan kanker kulit pada kulit yang rusak. Oleh sebab itu,

penggunaan asam kojik dikombinasikan bersama kortikosteroid topikal untuk mengurangi efek iritasi (Khezri *et al.*, 2020; Saeedi *et al.*, 2019; Hashemi and Emami, 2015).

Asam kojik dapat mengkhelat logam Cd^{2+} , Cu^{2+} , dan Co^{2+} . Larutan asam kojik dan besi (III) pada pH 2-3 akan membentuk khelat besi (III) kojat yang stabil dan berwarna merah gelap. Larutan asam kojik berkonsentrasi $5,0 \times 10^{-3}$ M dan pH 3, 7, dan 8 mengalami fotodegradasi dan setelah dua jam tidak ada asam kojik yang terdeteksi dalam larutan, kecuali pada larutan pH 5. Asam kojik sebanyak 51,2% dalam larutan berkonsentrasi $1,7 \times 10^{-2}$ M dan pH 5 tidak terdegradasi setelah diradiasi UVB selama lima jam. Asam kojik tidak stabil pada pH 5,1-7,6 dan hanya stabil pada pH 2,3. Asam kojik dapat teroksidasi dalam air pada kondisi aerob dan membuat larutan berubah menjadi coklat dalam waktu 15 hari. Stabilitas asam kojik dipengaruhi oleh oksidasi, radiasi cahaya, dan suhu (Murakami, 1962; Gallarate *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015; Nishimura *et al.*, 1995).



Gambar 3. Spektra UV Asam Kojik (Ola *et al.*, 2019)



Gambar 4. Spektra HPLC Asam Kojik (Ola *et al.*, 2019)

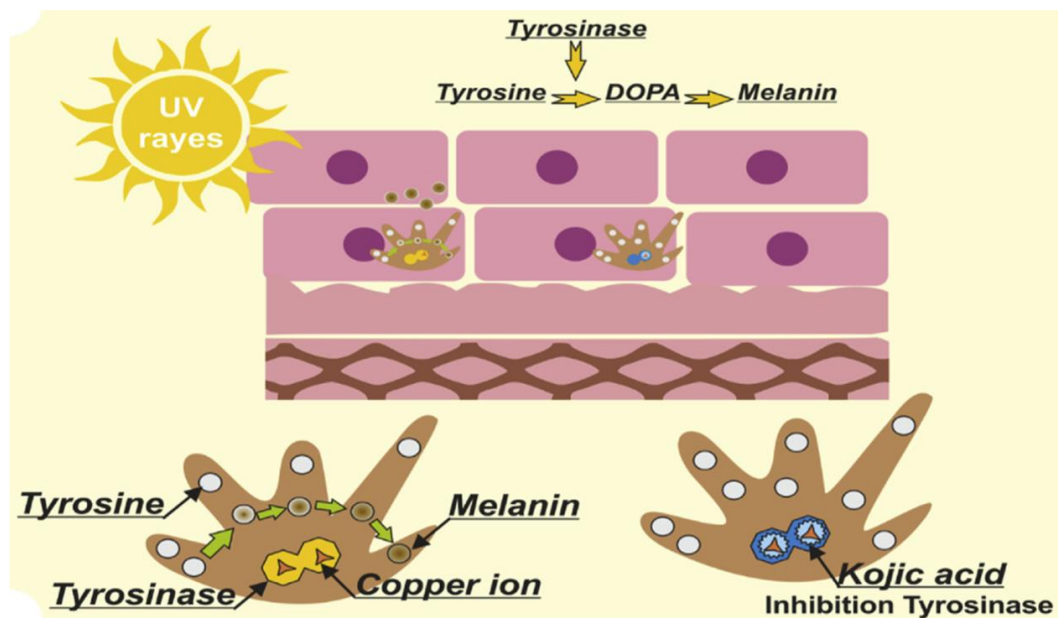
Tabel 2. Hasil NMR Asam Kojik (Ola *et al.*, 2019)

No	Kojic Acid		
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}^a$
1			
2	-	170.41	

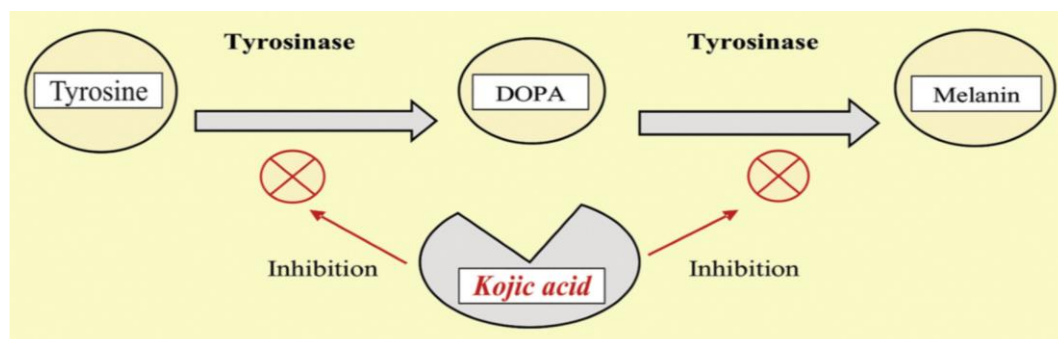
3	6.49 s, 1H	110.74	6.53
4	-	176.86	
5	-	147.37	
6	7.95 s, 1H	141.0	7.98
7	4.40 s, 2H	61.18	4.43

^a Evidenti *et al.*, 2009

II.4 Mekanisme Kerja Asam Kojik



Gambar 5. Mekanisme Asam Kojik Menghambat Tirosinase dalam Biosintesis Melanin (Saeedi *et al.*, 2019)



Gambar 6. Mekanisme Asam Kojik Menghambat Aktivitas Enzim Tirosinase (Saeedi *et al.*, 2019)

Paparan sinar UV mengakibatkan ion tembaga (Cu^{2+}) dalam enzim tirosinase pada sisi aktif membuat tirosinase menjadi lebih aktif. Gugus hidroksil menyerupai fenolik pada asam kojik menargetkan dan secara kompetitif mengkhelat logam Cu^{2+} pada melanosit sehingga aktivitas enzim tirosinase dihambat dan pembentukan melanin dapat dicegah (Masaki, 2017; Ando, 2017; Ashooriha *et al.*, 2018; Hasil *et al.*, 2020; Saeedi *et al.*, 2019).

II.5 Hasil Studi Asam Kojik terhadap Melanogenesis

Asam kojik dan derivat esternya mampu menghambat pembentukan melanin dan aktivitas tirosinase pada sel melanoma B16F1 serta menghambat aktivitas selular dari NF- κ B pada keratinosit. Kultur sel B-16 MEM yang mengandung 10% serum janin sapi diberikan senyawa depigmentasi dengan konsentrasi tertentu. Setelah lima hari, sel tersebut diberi formalin dan diwarnai oleh amonium perak nitrat, premelanosom menjadi hitam. Ketika premelanosom tidak berwarna dalam bahan depigmentasi, artinya penghambatan proses melanogenesis berhasil. Penghambatan proses melanogenesis juga terjadi ketika air yang berisi ikan *goldfish* hitam diberi asam kojik dan setelah 1-2 bulan ikan tersebut berubah warna menjadi coklat kekuningan. Ketika disimpan dalam air tanpa asam kojik, warna ikan berubah kembali menjadi warna asli ikan. Senyawa penghambat melanogenesis berpotensi sebagai pencerah kulit. Oleh sebab itu, asam kojik sangat efektif dan aman dalam menghambat melanogenesis, karena tidak merusak sel ataupun fungsi sel tersebut (Boo, 2019; Saeedi *et al.*, 2019).

II.6 Indikasi dari Asam Kojik dan Derivatnya

Asam kojik dan derivatnya dalam bidang farmasi dan obat-obatan dimanfaatkan sebagai antifungal, antibakteri, analgesik, antiinflamasi, antioksidan, senyawa sitotoksik, penghambat tirosinase, senyawa radioprotektif, aktivasi makrofag, obat-obat depigmentasi, penyembuhan luka, efek modulator terhadap proliferasi sel kanker, antidiabetik, pengobatan Schizophrenia kronik, dan pengkhelat besi untuk penyembuhan luka pada pengobatan topikal. Asam kojik dan derivatnya dalam bidang kosmetika digunakan sebagai pemutih, perawatan melasme, pengobatan dan penghambat hiperpigmentasi, depigmentasi, perawatan terhadap penuaan kulit, penghambat terhadap UV-A dan UV-B (Saeedi *et al.*, 2019).

Asam kojik sebagai anti-*aging* dapat mencerahkan kulit akibat paparan sinar matahari, *age spot*, atau bekas luka. Asam kojik berperan sebagai antioksidan terhadap ROS (*reactive oxygen species*) berlebih dalam tubuh. Asam kojik dan derivatnya bermanfaat menangani penyakit yang berkaitan dengan kelebihan besi seperti β -talasemia dan anemia. Asam kojik membentuk kompleks logam kojat yang stabil terhadap garam-garam logam diantaranya Al, Cr, Co, Cu, Au, In, Fe, Ni, Mn, Pa, Va, dan Zn (Saeedi *et al.*, 2019; Hashemi and Emami, 2015).

II.7 Modifikasi Asam Kojik dengan Mannich Base

Derivat asam kojik disintesis untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas penghambatan dari enzim tirosinase, serta menurunkan efek samping dari

asam kojik (Kim *et al.*, 2002; Ashari *et al.*, 2009; Raku and Tokiwa, 2003; Kobayashi *et al.*, 1995). Derivat asam kojik dapat dibuat dengan melibatkan dua gugus hidroksil, substitusi pada posisi 6 atau dengan mengganti cincin atom oksigen dengan atom nitrogen dari amonia atau senyawa *amine* untuk memperoleh γ -pyridon (Beélik and Purves, 1955).

Modifikasi asam kojik dengan Mannich *base* dilakukan karena waktu reaksi lebih singkat, jumlah *yield* yang dihasilkan lebih banyak, dan penggunaan senyawa amina untuk meningkatkan lipofilisitas senyawa. Mannich *base* merupakan senyawa dengan struktur NCH_2X , atom karbon utama menjadi elektrofilik karena atom karbon tersebut diapit oleh dua senyawa heteroatom dan salah satu atom tersebut adalah nitrogen (Karakaya *et al.*, 2019; Testa, 2007).

II.8 Karakterisasi Derivat Asam Kojik

II.8.1 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan *Melting Point*

Melting point atau titik leleh menjadi identitas penting suatu senyawa karena setiap senyawa memiliki titik leleh dan jarak lebur yang berbeda, dan adanya pengotor dapat diketahui karena pengotor dapat menurunkan titik leleh suatu senyawa. Titik leleh suatu senyawa ditentukan ketika suatu senyawa melebur sempurna dan tidak ada padatan yang tersisa. Jarak lebur suatu senyawa berada dalam rentang suhu ketika senyawa di dalam pipa kapiler mulai meleleh hingga meleleh seluruhnya tanpa tersisa sedikitpun.

Aparatus penentuan titik leleh senyawa terdiri dari bejana kaca yang berisi cairan, pemanas terkontrol, termometer, kaca pembesar, dan pipa kapiler (berdiameter dalam 0,9-1,1 mm, tebal 0,1-0,15 mm, dan tertutup pada salah satu lubangnya) (Pavia *et al.*, 2018; Anonim, 2006).

Senyawa yang akan ditentukan titik lelehnya dimasukkan ke dalam pipa kapiler dengan cara mengetuk-ngetukkan pipa kapiler pada kaca arloji berisi senyawa analit setinggi 2-3 mm. Pipa kapiler tersebut dimasukkan ke dalam aparatus. Senyawa dipanaskan dengan laju pemanasan 1-2°C/menit. Senyawa yang dianalisis akan melunak, nampak basah, dan menyusut di dalam pipa kapiler. Jarak lebur senyawa mulai ditentukan ketika setetes cairan senyawa muncul dan berakhir ketika seluruh padatan senyawa meleleh (Gilbert and Martin, 2016).

II.8.2 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC) atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat menentukan tingkat kemurnian suatu senyawa. Fase diam umumnya silika gel (berukuran 2-25 μm) dan fase gerak umumnya campuran pelarut organik. Lempeng KLT silika gel F254 *ready-for-use* tahan abrasi, mengandung indikator fluoresensi, mudah diaktivasi dengan cara dioven pada suhu 110°C-120°C selama 30 menit, dan dapat dipotong menjadi lebih kecil (Kar, 2005; Watson, 2012). Fase diam yang bersifat lebih polar dibandingkan fase geraknya disebut *normal-phase chromatography* (NP). Pada fase diam ini, senyawa yang lebih polar akan

terpisah lebih dulu dan peningkatan polaritas fase gerak akan menurunkan waktu pemisahan senyawa (Skoog *et al.*, 2014). Semakin polar suatu senyawa maka senyawa tersebut akan semakin kuat diadsorpsi oleh silika gel, sehingga waktu kontak senyawa dengan fase gerak akan semakin singkat dan jarak tempuh noda akan lebih pendek (Watson, 2012).

Analisis KLT meliputi aspek kualitatif dan kuantitatif. Aspek kualitatif KLT berupa nilai R_f yang dipengaruhi oleh perbedaan koefisien partisi (perbedaan kelarutan terhadap fase gerak dan fase diam). Nilai R_f selalu konstan untuk setiap senyawa dalam proses analisis yang sama. Selain itu, terdapat nilai R_{st} yang merupakan perbandingan antara R_f sampel terhadap R_f baku. Nilai R_f selalu <1 dan nilai R_{st} dapat >1 (Kar, 2005).

$$R_f = \text{jarak tempuh noda/jarak tempuh fase gerak} \quad (\text{Kar, 2005})$$

$$R_{st} = R_f \text{ noda} : R_f \text{ baku} \quad (\text{Kar, 2005})$$

Aspek kuantitatif KLT ditinjau dari pemisahan komponen senyawa berdasarkan tingkat presisi dan akurasi yang lebih tinggi melalui metode langsung (*direct method*) dan tak langsung (*indirect method*). Pengukuran dengan metode langsung dilakukan langsung pada lapisan adsorben, dengan mengukur luas noda, densitometri, dan spektrofotometri baik inframerah, reflektan, atau metode *spark chamber method*. Pengukuran pada metode tak langsung dilakukan dengan memisahkan senyawa dari adsorben setelah dielusi, menggunakan metode kolorimetri, fluorimetri, radiometri, *flame-*

photometry, spektrofotometri UV, gravimetri, polarografi, atau *vapourphase chromatography* (Kar, 2005).

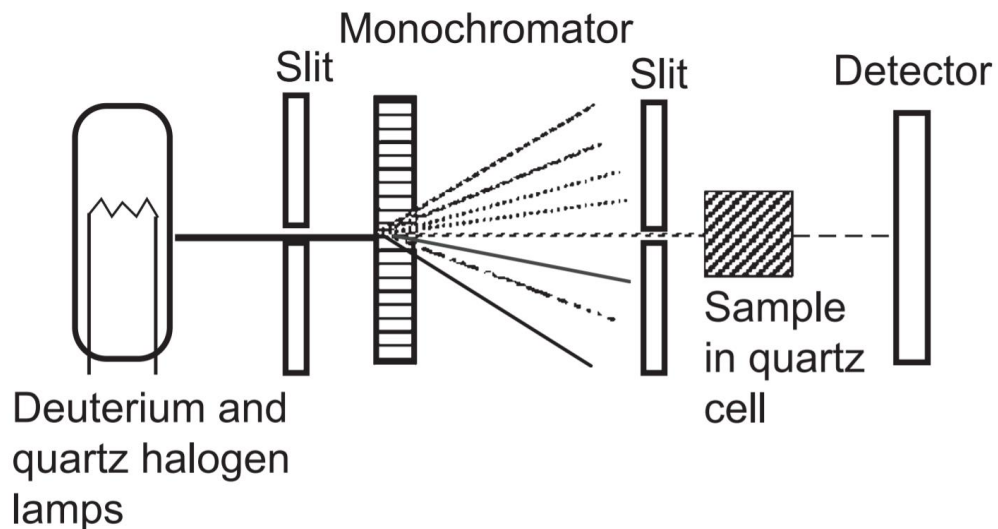
Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dalam pelarut yang mudah menguap dan ditotolkan pada fase diam (lempeng KLT). Setelah pelarut sampel menguap, lempeng KLT yang telah ditotol sampel dimasukkan ke dalam chamber tertutup yang telah jenuh oleh uap pelarut pengembang. Setelah proses pengembangan selesai dan fase diam telah terbasahi oleh pelarut pengembang, lempeng tersebut dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan (Kar, 2005).

II.8.3 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan *Ultraviolet-Visible Spectrophotometer* (Spektrofotometer UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis digunakan secara luas, memiliki sensitivitas yang tinggi, selektivitas sedang hingga tinggi, akurat, mudah penggunaannya, dan dapat mendeteksi gugus kromofor dalam analit (Skoog *et al.*, 2014; Watson, 2012).

Molekul-molekul senyawa berada dalam keadaan atau tingkat energi terendah (*lowest energy*) yang disebut keadaan dasar (*ground state*). Senyawa akan mengalami peningkatan energi (*higher energy*) dan tereksitasi (*excited state*) ketika molekul senyawa mengabsorpsi sinar dengan frekuensi yang tepat (Kar, 2005). Larutan senyawa akan dilewati oleh radiasi dengan panjang gelombang 200-700 nm sehingga elektron yang terikat pada suatu molekul tereksitasi untuk mencapai kondisi kuantum lebih tinggi dan larutan

akan menyerap energi. Semakin panjang suatu gelombang maka semakin rendah energi yang diserap (Watson, 2012).



Gambar 7. Skema Instrumen Spektrofotometer UV-Vis (Watson, 2012)

Instrumen spektrofotometer UV-Vis terdiri dari sumber cahaya, monokromator, dan sistem optik. Sumber cahaya berupa lampu deuterium (λ 190-350 nm untuk daerah sinar UV) dan lampu halogen atau tungsten (λ 350-900 nm untuk daerah sinar tampak). Monokromator digunakan untuk mendispersikan cahaya ke dalam panjang gelombang tertentu. Sistem optik berfungsi untuk membagi cahaya agar dapat melewati dua sampel kompartemen (Watson, 2012).

Pemilihan panjang gelombang, variabel yang mempengaruhi absorpsi, hubungan antara absorbansi dan konsentrasi, dan metode penambahan baku perlu diperhatikan dalam proses analisis. Intensitas absorbansi molekul dipengaruhi ada tidaknya gugus kromofor, pelarut, suhu, ion anorganik, pH,

konsentrasi elektrolit, dan gugus pengganggu. Absorbansi ideal yang dapat terukur antara 0,4-1,0 (Kar, 2005; Skoog *et al.*, 2014; Watson, 2012).

Pelarut dalam analisis spektrofotometer UV-Vis ialah air (pelarut umum untuk sejumlah bahan anorganik), metanol dan etanol 96% (pelarut untuk senyawa polar dengan kelarutan rendah dan tidak untuk menganalisis sampel dengan panjang gelombang di bawah 210 nm), dan sikloheksana (pelarut umum untuk senyawa aromatik) (Kar, 2005).

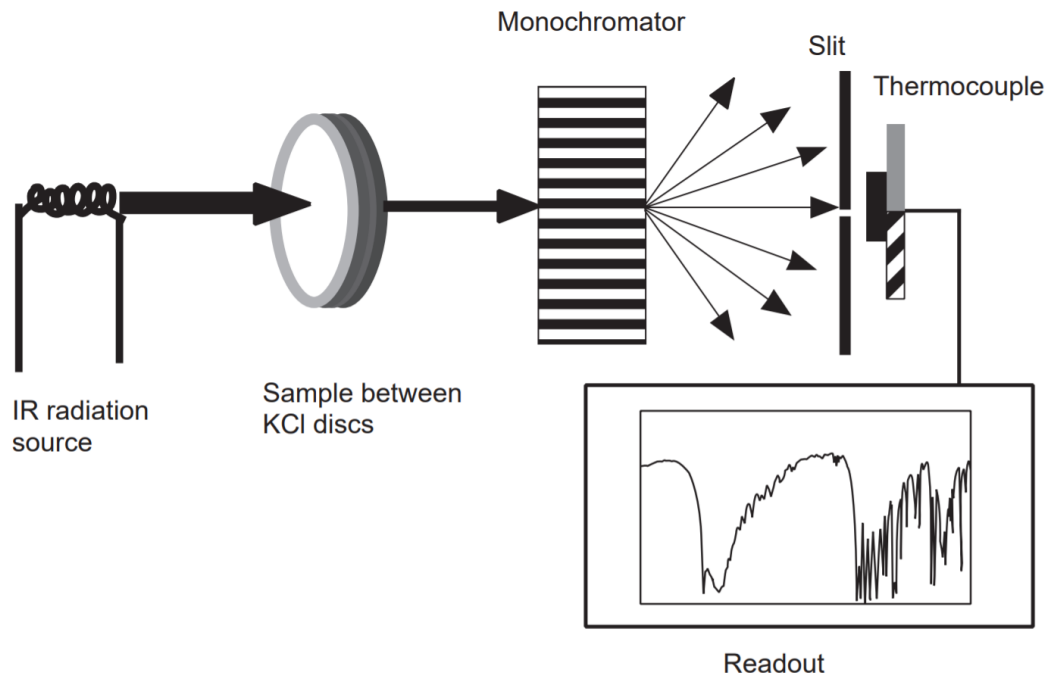
S.No.	Chromophore	System	λ_{\max}	ϵ_{\max}	λ_{\max}	Examples
1.	Acetylide	$-\text{C} \equiv \text{C}-$	175-180	6000	—	Acetylene
2.	Azo	$-\text{N} = \text{N}-$	285-400	3-25	—	Azomethane
3.	Aldehyde	$-\text{CHO}$	210	strong	280-300	Acetaldehyde
4.	Carboxyl	$-\text{COOH}$	200-210	50-70	—	Acetic acid
5.	Nitrile	$-\text{C} \equiv \text{N}$	160	—	—	Acetonitrile
6.	Nitro	$-\text{NO}_2$	210	strong	—	Nitromethane
7.	Thioketone	$\text{C} = \text{S}$	205	strong	—	Thiobenzophenone
8.	Esters	$-\text{COOR}$	205	50	—	Ethyl acetate
9.	Ether	$-\text{O}-$	185	1000	—	Diethyl ether
10.	Amine	$-\text{NH}_2$	195	2800	—	Methyl amine
11.	Thiol	$-\text{SH}$	195	1400	—	Thiophenol
12.	Iodide	$-\text{I}$	260	400	—	Methyl iodide
13.	Bromide	$-\text{Br}$	208	300	—	Ethyl bromide
14.	Sulphone	$-\text{SO}_2-$	180	—	—	Dapsone
15.	Nitroso	$-\text{N} = \text{O}$	302	100	—	<i>p</i> -Nitroso phenol

Gambar 8. Pita Absorpsi Gugus Kromofor (Kar, 2005)

II.8.4 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan *Infrared Spectrophotometer* (Spektrofotometer IR)

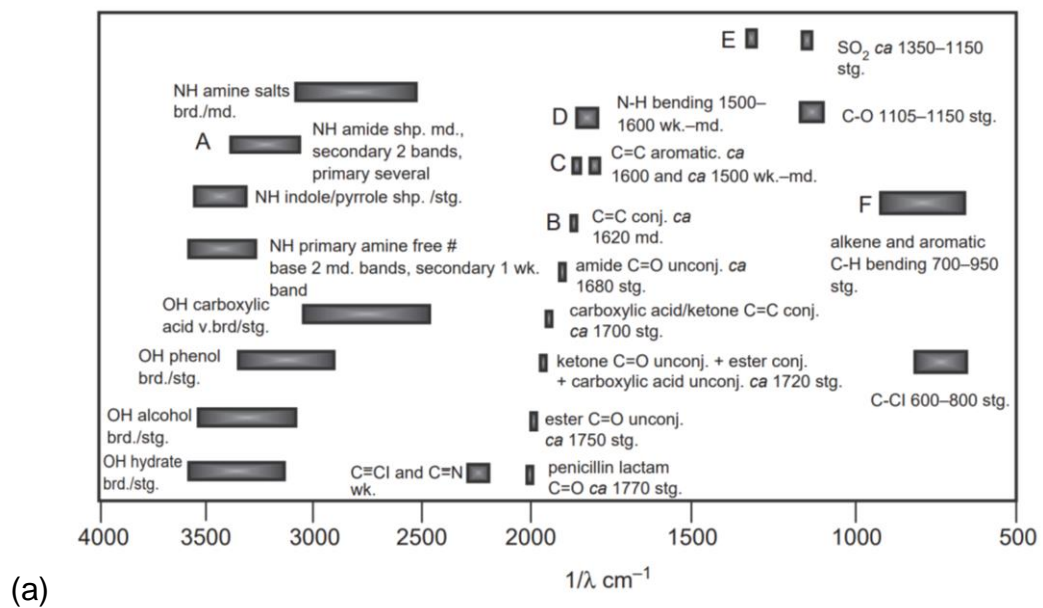
Spektrofotometer IR mampu mengidentifikasi gugus fungsi pada panjang gelombang inframerah yakni 400 cm^{-1} hingga 4000 cm^{-1} (2500-20.000 nm). Gugus fungsi senyawa analit akan mengabsorpsi radiasi sehingga molekul mengalami *stretching* ataupun *bending*. Daerah *fingerprint* ($< 1500\text{ cm}^{-1}$) merupakan daerah identitas senyawa yang ditandai dengan absorpsi senyawa yang sangat kompleks dan sulit untuk menentukan gugus fungsinya. Oleh sebab itu, penentuan gugus fungsi dilakukan pada panjang gelombang $> 1500\text{ cm}^{-1}$ (Skoog *et al.*, 2014; Watson, 2012).

Prosedur preparasi sampel sebelum dianalisis dapat dilakukan dengan beberapa cara, dua diantaranya melalui metode *mull* dan disk KBr. Preparasi dengan metode disk KBr digunakan 1% sampel dari total berat KBr *IR grade* yang digunakan. Sekitar 200 mg serbuk tergerus halus dimasukkan ke dalam *die block* dan dikompres menjadi *disc* di bawah vakum dengan tekanan 800 kPa (Watson, 2012; Kar, 2005).



Gambar 9. Skema Instrumen Spektrofotometer IR (Watson, 2012)

Cahaya melewati sampel yang akan dianalisis, monokromator akan mendispersi cahaya tersebut menjadi panjang gelombang dan akan dideteksi oleh detektor menjadi suatu spektrum (Watson, 2012).



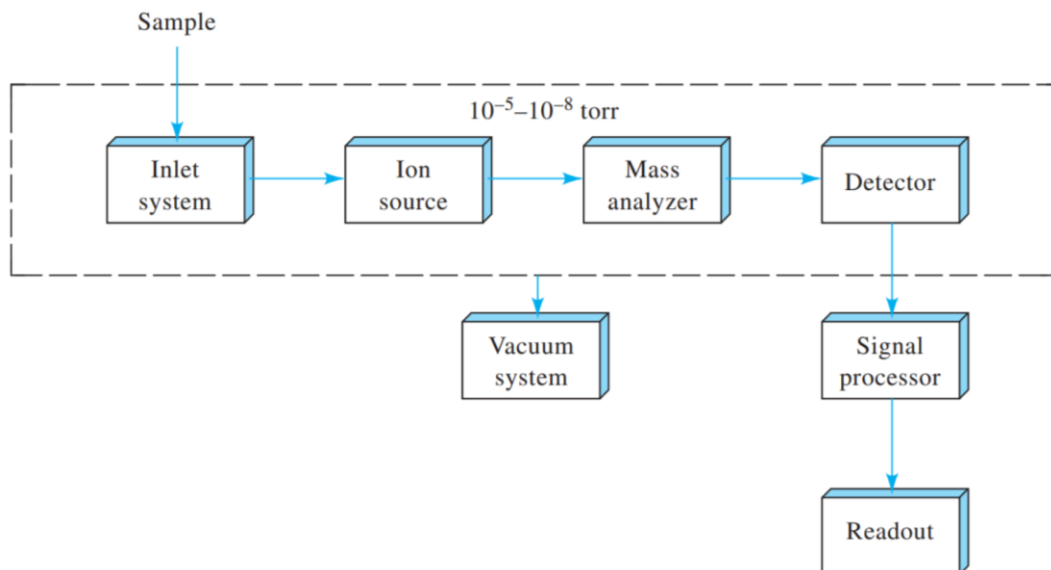
	Functional Group	Absorption Peaks		
		Wavenumber, cm^{-1}	Wavelength, μm	
(b)	O—H	Aliphatic and aromatic	3600–3000	2.8–3.3
	NH ₂	Also secondary and tertiary	3600–3100	2.8–3.2
	C—H	Aromatic	3150–3000	3.2–3.3
	C—H	Aliphatic	3000–2850	3.3–3.5
	C≡N	Nitrile	2400–2200	4.2–4.6
	C≡C—	Alkyne	2260–2100	4.4–4.8
	COOR	Ester	1750–1700	5.7–5.9
	COOH	Carboxylic acid	1740–1670	5.7–6.0
	C=O	Aldehydes and ketones	1740–1660	5.7–6.0
	CONH ₂	Amides	1720–1640	5.8–6.1
	C=C—	Alkene	1670–1610	6.0–6.2
	ϕ —O—R	Aromatic	1300–1180	7.7–8.5
	R—O—R	Aliphatic	1160–1060	8.6–9.4

Gambar 10. Karakteristik *Peak Absorpsi* pada Spektrofotometer IR (a) pada molekul obat (stg. = kuat, md. = medium, wk. = lemah, brd. = luas, shp. = tajam, conj. = konjugasi, v.brd. = sangat luas); (b) pada berbagai gugus fungsi (Watson, 2012; Skoog *et al.*, 2014)

II.8.5 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan *Mass Spectrophotometer* (Spektrofotometer Massa)

Spektrofotometer massa mengidentifikasi massa molekul suatu senyawa, proses berlangsung ketika molekul senyawa diberi energi dan terionisasi atau terfragmentasi pada daerah *high-vacuum* dengan berbagai metode produksi ion. Ion-ion tersebut akan dipisahkan berdasarkan nilai m/z (*mass-to-charge*). Spektrofotometer massa sensitif dalam menentukan identitas suatu senyawa atau pengotor secara spesifik. Metode ionisasi dalam spektroskopi massa ada dua macam, yakni ESI (*electron spray ionization*) dan EI (*electron ionization*) (Watson, 2012; Skoog *et al.*, 2014). Sumber ion spektrofotometer massa terdiri dari sumber fase gas dan sumber desorpsi. *Electron ionization* (EI) menggunakan sumber ion fase gas, molekul dibombardir dengan elektron berenergi tinggi dan terfragmen. *Electron spray*

ionization (ESI) menggunakan sumber ion desorpsi, molekul diionisasikan oleh medan listrik dan menghasilkan ion bermuatan. Metode sumber desorpsi dapat diaplikasikan pada senyawa yang volatil dan tidak stabil terhadap suhu (Skoog *et al.*, 2014).

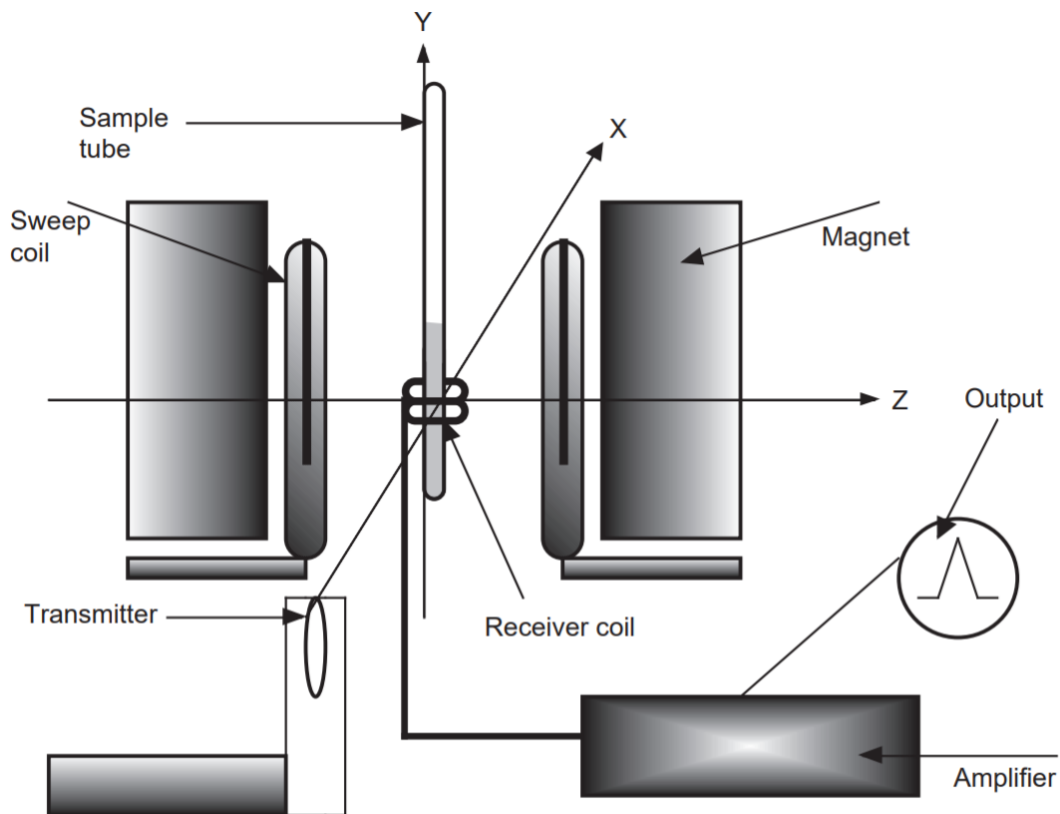


Gambar 11. Skema Instrumen Spektrofotometer Massa (Skoog *et al.*, 2014)

Sampel memasuki sistem inlet, terionisasi dan berubah menjadi ion gas melalui pembombardiran dengan elektron, foton, ion, atau molekul. Ion-ion sampel tersebut dipisahkan berdasarkan rasio m/z dalam *mass analyzer*, kemudian nilai m/z tersebut dikonversi menjadi signal elektrik oleh *ion transducer*. Massa senyawa analit diketahui dengan melihat m/z pada ion molekul karena ion radikal memiliki massa molekul yang sama dengan analit. Dalam spektra terdapat peak tertinggi yang disebut *base peak* (Skoog *et al.*, 2014).

II.8.6 Karakterisasi Derivat Asam Kojik dengan Menggunakan ^1H -*Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Nuclear magnetic resonance dapat mengkarakterisasi struktur senyawa secara tepat, menentukan pengotor, potensial untuk campuran *fingerprint*, dan dapat menganalisis obat secara kuantitatif dengan baik. Radiasi dengan energi rendah pada daerah *radiofrequency* mengeksitasi atom seperti proton atau ^{13}C sehingga terjadi pertukaran posisi spin. Rentang frekuensi eksitasi dan pola pemisahan kompleks yang dihasilkan menjadi karakteristik struktur kimia senyawa analit. Prinsip dalam NMR ialah semakin kuat gaya magnetik maka semakin besar frekuensi radiasi yang diperlukan untuk memutar spin. NMR tergolong tidak sensitif dalam menganalisis senyawa dengan bobot <1 mg untuk proton NMR dan <5 mg untuk ^{13}C NMR (Watson, 2012).



Gambar 12. Skema Instrumen NMR (Watson, 2012)

Senyawa yang akan dianalisis dilarutkan dalam pelarut deuterium untuk memastikan tidak ada pengganggu terhadap signal dari proton. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tube kaca yang berukuran 3, 5, 10 mm dan diputar pada medan magnet ± 30 revolusi/detik (Watson, 2012).

Frekuensi ketika proton diabsorpsi direkam sebagai *chemical shift* dalam ppm (*parts per million*) dan setiap signal yang proporsional terhadap jumlah proton yang mengabsorpsi radiasi direkam sebagai integral. Integrasi menunjukkan jumlah proton suatu signal resonansi pada frekuensi tertentu. *Multiplicity* atau *splitting* atau pola *coupling* setiap sinyal disebabkan adanya

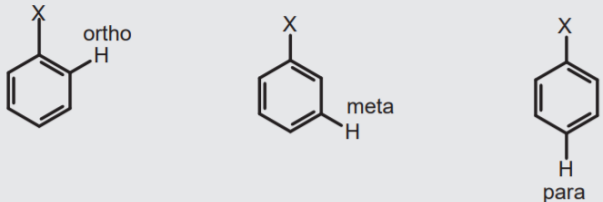
spin proton atom tetangga. *Multiplicity* memiliki pola $n+1$, di mana n merupakan jumlah proton tetangga (Watson, 2012).

Group	δ ppm	Group	δ ppm	Group	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

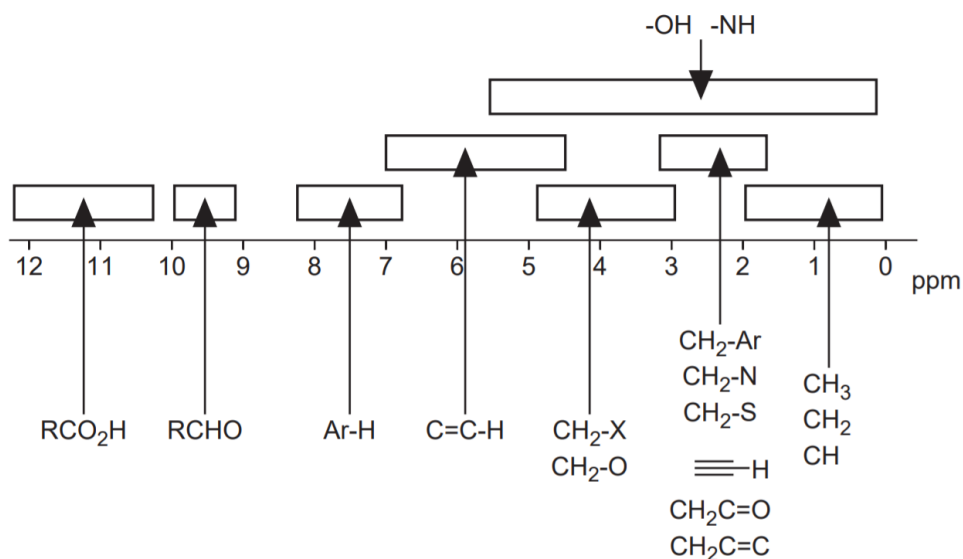
(a)

X	Compound, CH ₃ X						
	F	O	Cl	Br	I	H	Si
Electronegativity of X	4.00	3.50	3.10	2.80	2.50	2.10	1.80
Chemical shift, δ /ppm	4.26	3.40	3.05	2.68	2.16	0.20	0

(b)

Substituent X			
	H ortho	H meta	H para
NO ₂	0.94	0.18	0.39
OH	-0.49	-0.13	-0.20
NH ₂	-0.76	-0.25	-0.63
Cl	0.01	-0.06	-0.08
COOH	0.80	0.16	0.25
NH ₃ ⁺	0.40	0.20	0.20
CH ₃	-0.16	-0.09	-0.17
OR	-0.46	-0.1	-0.46
CH ₃ -CO-NH	-0.12	-0.07	-0.21
COOR	0.71	0.1	0.21

(c)



(d)

Gambar 13. *Chemical Shift* ^1H NMR (a) dari proton nonaromatik yang terikat pada karbon; (b) pergeseran proton CH_3 dan hubungannya dengan substituent elektronegatif; (c) dari proton yang terikat pada cincin aromatik; dan (d) dari berbagai gugus fungsi (Watson, 2012)

Group	δ ppm	Group	δ ppm	Group	δ ppm
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-C}$	5–20	$\text{C-H}_2\text{C}^{13}\text{-N}$	35–65	$(\text{C})_3\text{C}^{13}\text{-C-N}$	50–70
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-C=C}$	15–30	$\text{C-H}_2\text{C}^{13}\text{-O}$	55–75	$(\text{C})_3\text{C}^{13}\text{-C-O}$	70–90
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-Ar}$	ca 20	$(\text{C})_2\text{HC}^{13}\text{-C}$	25–55	ArC^{13}H	115–135
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-COO}$	ca 20	$(\text{C})_2\text{HC}^{13}\text{-CO}$	40–70	$\text{ArC}^{13}\text{-C}$	137–147
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-CO}$	22–32	$(\text{C})_2\text{HC}^{13}\text{-Ar}$	ca 40	$\text{ArC}^{13}\text{-Cl}$	135
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-N}$	25–40	$(\text{C})(\text{O})\text{HC}^{13}\text{-Ar}$	70–80	ArC^{13}CO	137
$\text{H}_3\text{C}^{13}\text{-O}$	45–55	$(\text{C})_2\text{HC}^{13}\text{-N}$	45–75	$\text{ArC}^{13}\text{-N}$	145–155
$\text{C-H}_2\text{C}^{13}\text{-C}$	16–46	$(\text{C})_2\text{HC}^{13}\text{-O}$	65–85	$\text{ArC}^{13}\text{-O}$	150–160
$\text{C-H}_2\text{C}^{13}\text{-CO}$	30–50	$(\text{C})_3\text{C}^{13}\text{-C}$	35–55	$\text{c}^{13}=\text{O}$	170–200
$\text{C-H}_2\text{C}^{13}\text{-Ar}$	ca 30	$(\text{C})_3\text{C}^{13}\text{-C-CO}$	45–65		
$\text{O-H}_2\text{C}^{13}\text{-Ar}$	60–70	$(\text{C})_3\text{C}^{13}\text{-C-Ar}$	45–65		

Gambar 14. *Chemical Shift* ^{13}C NMR (Watson, 2012)