

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

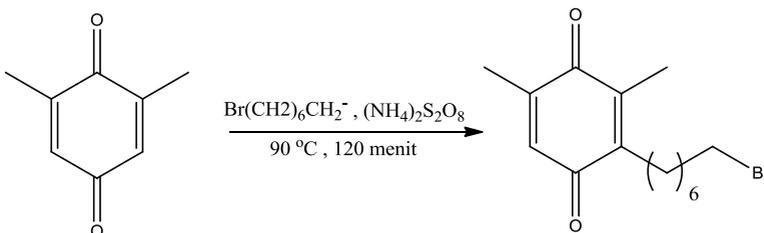
4.1 Sintesis senyawa bromoalkilkuinon

Modifikasi struktur senyawa turunan timokuinon yang dilakukan yaitu penambahan gugus alkil C7 pada cincin kuinoid membentuk senyawa bromoalkilkuinon. Sintesis dilakukan dengan mereaksikan 2,6-dimetil-1,4-benzokuinon sebagai *starting material* dengan 8-bromooktanoat, AgNO_3 , dan $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ menggunakan pelarut $\text{AcCN}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1). Reaksi terjadi dalam dua tahap yaitu dekarboksilasi dan alkilasi.

Senyawa 2,6-dimetil-1,4-benzokuinon ditambahkan dengan 8-bromooktanoat dan AgNO_3 kemudian dipanaskan hingga mencapai suhu $90\text{ }^\circ\text{C}$. Pada tahap ini terjadi reaksi dekarboksilasi yang diinisiasi oleh AgNO_3 yaitu pelepasan gugus karboksilat dari asam 8-bromooktanoat menghasilkan 7-bromoheptanida dan gas CO_2 . Berikut adalah persamaan reaksi dekarboksilasi dengan mekanisme reaksi ditunjukkan pada **Lampiran C**.



Reaksi dihentikan dan dilakukan penambahan $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ yang telah dilarutkan dalam H_2O . Reaksi dilanjutkan dengan suhu yang dijaga $90\text{ }^\circ\text{C}$. Pada tahap ini terjadi reaksi alkilasi dimana alkil 7-bromoheptanida hasil reaksi dekarboksilasi tersubstitusi pada cincin kuinoid di posisi C-3 atau C-5. Berikut adalah persamaan reaksi alkilasi dengan mekanisme reaksi ditunjukkan pada **Lampiran C**.



Gambar 4.1 Reaksi alkilasi DBQ menjadi bromoheptilkuinon

Hasil reaksi yang diperoleh memiliki dua fasa berwarna kuning dan kuning pekat dengan residu padatan berwarna hijau yang selanjutnya diekstrak menggunakan pelarut dietil eter dan dikeringkan dengan Na_2SO_4 . Hasil ekstraksi diuji menggunakan KLT menghasilkan 3 noda dengan nilai Rf yang berbeda. *Crude product* dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksana : kloroform (7:3). Fraksi-fraksi yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $54\text{ }^\circ\text{C}$ dan kecepatan 50 rpm. Karakterisasi produk dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan $^1\text{H-NMR}$.

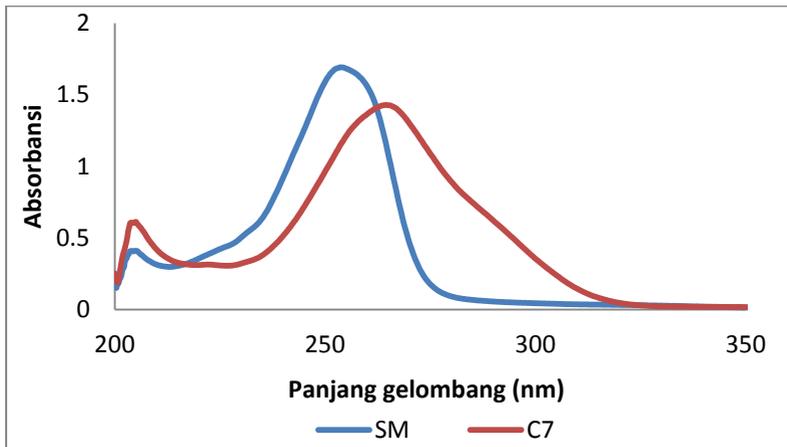
Produk bromoalkilasi 2-(7-bromoheptil)-3,5-dimetil-1,4-benzokuinon yang diperoleh berwujud cairan berwarna kuning kecoklatan dengan *yield* 17,143 %. Hasil karakterisasi produk bromoalkilasi menggunakan KLT dengan eluen n-heksana: kloroform (7:3) ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Karakterisasi produk bromoalkilasi C7 dengan KLT

Produk	Wujud	Warna	Rf
DBQ	Padat	Kuning	0.225
C7	Cair	Kuning kecoklatan	0.375

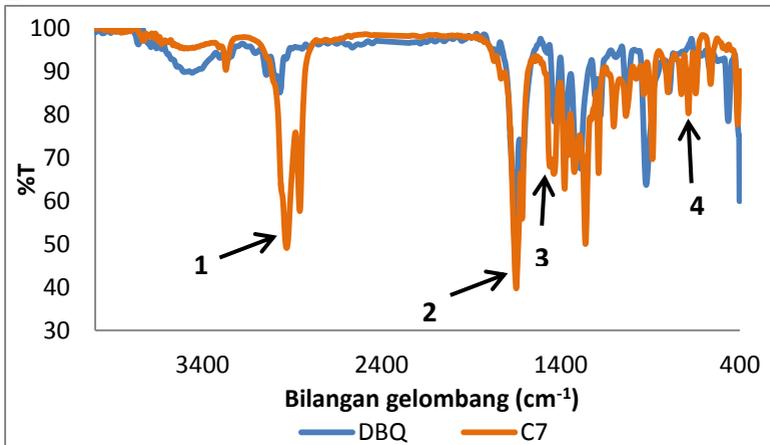
Berdasarkan hasil uji KLT menunjukkan nilai Rf dari produk bromoalkilasi lebih tinggi dari pada *starting material* Dimetil Benzokuinon (DBQ). Hasil ini menunjukkan bahwa produk bromoalkilasi bersifat lebih nonpolar dari pada DBQ. Hal ini disebabkan karena penambahan gugus alkil pada DBQ menyebabkan penurunan kepolaran senyawa.

Hasil karakterisasi produk bromoalkilasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis ditunjukkan pada **Gambar 4.2**. Berdasarkan spektrum UV-Vis yang terbentuk dapat diketahui terjadinya pergeseran bathokromik dari produk bromoalkilasi C7 dibandingkan dengan *starting material* DBQ dimana panjang gelombang maksimum DBQ sebesar 253,60 nm sedangkan panjang gelombang maksimum produk bromoalkilasi meningkat menjadi 264,40 nm. Pergeseran bathokromik ini terjadi akibat adanya penambahan gugus alkil hasil bromoalkilasi dimana secara teori akan menggeser panjang gelombang maksimum 10-15 nm [31].



Gambar 4.2 Perbandingan spektrum UV-Vis DBQ dan produk alkilasi C7

Hasil karakterisasi produk bromoalkilasi menggunakan spektrofotometer FT-IR ditunjukkan pada **Gambar 4.3** dan **Tabel 4.2**.



Gambar 4.3 Perbandingan spektrum FTIR DBQ dan produk alkilasi C7

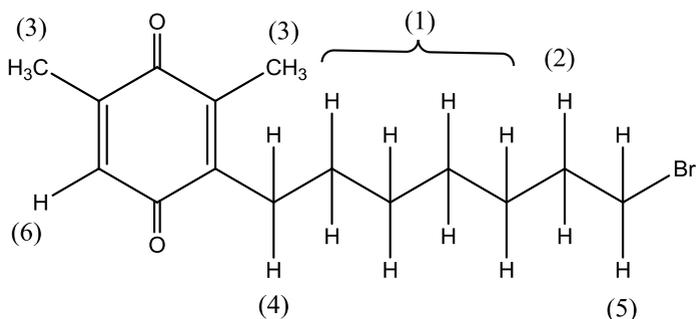
Tabel 4.2 Hasil interpretasi gugus fungsi spektrum FTIR DBQ dan produk bromoalkilasi C7

No	Bilangan gelombang DBQ (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang C7 (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
1	2969,01	2930,43	C-H sp ³
2	1655,57	1647,86	C=O keton
3	1433,77	1437,63	CH ₂
4	-	687,37	C-Br

Berdasarkan spektrum FTIR di atas dapat diketahui bahwa terjadi perbedaan yang signifikan dari spektrum FTIR DBQ dan produk bromoalkilasi C7. Pada bilangan gelombang 2930 cm⁻¹ terjadi peningkatan intensitas yang tinggi mengindikasikan peningkatan gugus C-H sp³ dari produk bromoalkilasi C7. Selain itu terdapat puncak baru pada bilangan gelombang 687,37 yang mengindikasikan terbentuknya ikatan C-Br hasil bromoalkilasi

Karakterisasi menggunakan ¹H-NMR dilakukan untuk mengetahui secara pasti struktur dari senyawa produk alkilasi C7. Spektra ¹H-NMR memberikan informasi mengenai jumlah dan posisi proton dari senyawa hasil sintesis. Spektra ¹H-NMR produk bromoalkilasi ditunjukkan pada **Gambar 4.5** dengan hasil interpretasinya ditunjukkan pada **Gambar 4.4** dan **Tabel 4.3**.

Berdasarkan hasil interpretasi spektra ¹H-NMR dari produk bromoalkilasi dapat diketahui terdapat 6 macam puncak proton H dengan lingkungan yang berbeda. Pergeseran kimia menunjukkan lingkungan proton yang berbeda dari setiap jenis proton. Nilai integral menunjukkan jumlah proton yang terikat. Sedangkan *splitting* menunjukkan jumlah proton terdekat dari salah satu jenis proton.

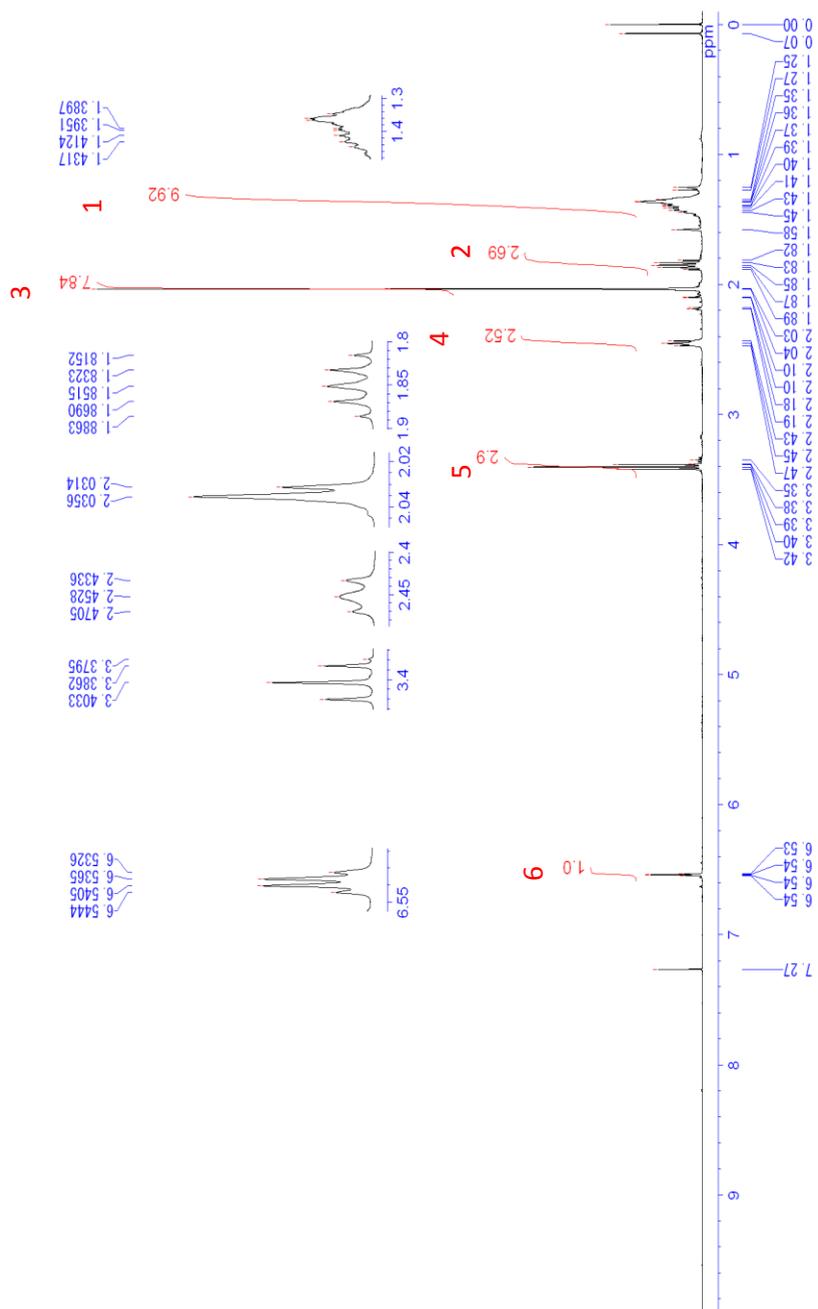


Gambar 4.4. Struktur senyawa dan lingkungan proton produk bromoalkilasi C7

Tabel 4.3. Hasil interpretasi spektra $^1\text{H-NMR}$ produk bromoalkilasi C7

Jenis proton	Jumlah proton	<i>Splitting</i>	δ (ppm)	<i>J-Coupling</i> (Hz)
1 R-CH ₂ -R	10	multiplet	1.35	6,92 ; 7,72
2 R-CH ₂ -R	2	Kuintet	1.85	6,92 ; 7,68
3 Ar-CH ₃	7	Singlet	2.03;2.04	-
4 Ar-CH ₂ -R	2	Triplet	2.45	7,68
5 R-CH ₂ -Br	3	Triplet	3.39	7,68
6 Ar-H	1	Kuintet	6.54	1,56 ; 1,6

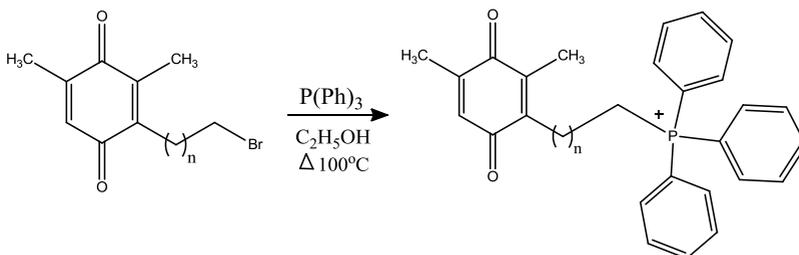
Pada pergeseran kimia 6,54 ppm menunjukkan terdapat satu proton terikat yang mengindikasikan bahwa salah satu sisi cincin kuinoid telah tersubstitusi oleh alkil. Pada pergeseran kimia 3,39 ppm terjadi *splitting* triplet yang bersesuaian dengan lingkungan dari proton yang terikat atom C yang mengikat atom Br dan atom C dengan 2 atom hidrogen terikat. Selain itu jenis proton lain yang tertera pada **Tabel 4.3** dan **Gambar 4.5** telah sesuai dengan struktur senyawa 2-(7-bromoheptil)-3,5-dimetil-1,4-benzokuinon.



4.2 Sintesis senyawa trifenilfosfonium bromida

Modifikasi struktur senyawa turunan timokuinon selanjutnya yaitu penambahan gugus trifenilfosfonium bromida pada produk bromoalkilasi C7. Modifikasi ini bertujuan untuk memudahkan senyawa obat menembus mitokondria dengan adanya ion bermuatan positif. Atom yang terionisasi harus dikelilingi oleh residu hidrofobik besar seperti gugus fenil yang mampu menstabilkan muatan positif melalui delokalisasi elektron sehingga ion menjadi bersifat permeabel pada membran [12].

Produk bromoalkilasi C7 yaitu 2-(7-bromoheptil)-3,5-dimetil-1,4-benzokuinon ditambahkan dengan trifenilfosfin sebagai *starting material* dan dilarutkan dalam etanol. Selanjutnya campuran dipanaskan pada suhu 100 °C dalam *stainless steel autoclave* dengan pemanas *oil bath* selama 8 jam. Pada tahap ini terjadi reaksi substitusi antara C-Br dengan gugus trifenilfosfonium dengan reaksi yang ditunjukkan pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6 Reaksi penambahan gugus trifenilfosfonium bromida pada produk bromoalkilasi C7

Selanjutnya pelarut dihilangkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 68 °C dengan kecepatan 40 rpm. Hasil dari evaporasi diperoleh cairan pekat berwarna hitam. Residu dari *crude product* diendapkan dengan penambahan dietil eter pada *crude product* yang telah dilarutkan dalam diklorometana (CH_2Cl_2). *Crude product* dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen campuran $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ (1:7). Selanjutnya produk dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dilakukan karakterisasi produk menggunakan KLT, spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR.

Produk hasil reaksi yang diperoleh berwujud cairan berwarna kuning kecoklatan dengan *yield* 40,35 %. Hasil karakterisasi produk bromoalkilasi menggunakan KLT ditunjukkan pada **Tabel 4.4**.

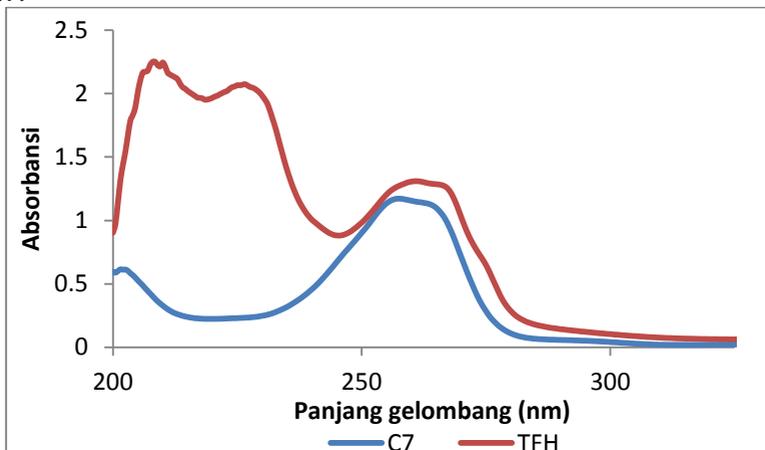
Tabel 4.4 Karakterisasi produk trifenilfosfoniumheptil dengan KLT

Produk	Wujud	Warna	Rf ¹	Rf ²
C7	Cair	Kuning kecoklatan	0.92	0.5
TFH	Cair	Kuning kecoklatan	0.4	0

Keterangan: ¹ metanol:kloroform (1:4) ² n-heksana:kloroform (7:3)

Berdasarkan hasil uji KLT menunjukkan nilai Rf dari produk trifenilfosfoniumheptil (TFH) lebih rendah dari pada *starting material* bromoheptil (C7). Hasil ini menunjukkan bahwa produk trifenilfosfoniumheptil bersifat lebih polar dari pada produk bromoheptil. Hal ini disebabkan adanya muatan positif dari atom P pada gugus fosfonium yang meningkatkan kepolaran senyawa.

Hasil karakterisasi produk trifenilfosfoniumheptil menggunakan spektrofotometer UV-Vis ditunjukkan pada **Gambar 4.7**.



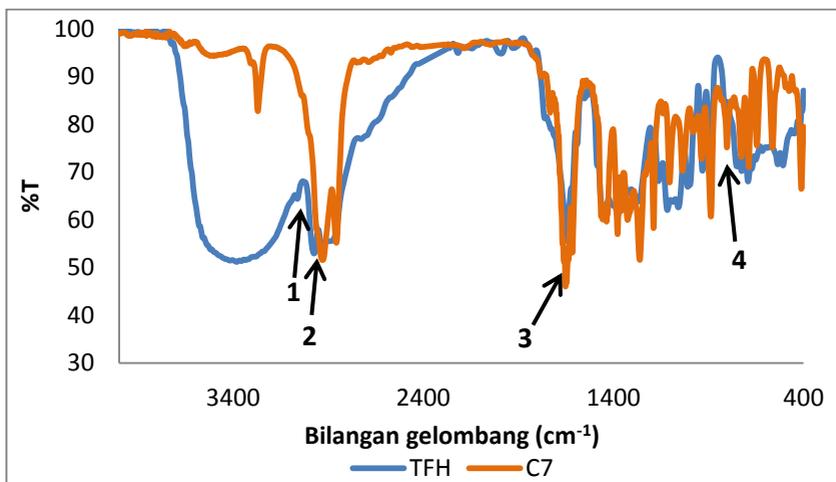
Gambar 4.7 Perbandingan spektrum UV-Vis C7 dan TFH

Berdasarkan spektrum UV-Vis yang terbentuk dapat diketahui bahwa produk trifenilfosfoniumheptil memiliki 3 puncak dengan absorbansi tinggi yaitu pada panjang gelombang 208,0 nm; 226,5 nm; dan 261 nm. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian dari

Antonenko (2008), yaitu berdasarkan hasil karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis senyawa hasil sintesis trifenilfosfonium bromida dengan perpanjangan alkil C5 dan C10 menunjukkan tiga puncak dengan absorbansi tinggi pada panjang gelombang 198 nm, 226 nm, dan 260 nm. Puncak pada panjang gelombang 226 nm merupakan puncak dari trifenilfosfin [31] sedangkan puncak pada panjang gelombang 260 nm merupakan puncak dari cincin kuinoid yang tersubstitusi alkil.

Hasil spektrum UV-Vis dari TFH dibandingkan dengan C7 memiliki perbedaan jumlah puncak, dimana pada bromoheptil hanya terdapat satu puncak dengan panjang gelombang maksimum 257,5 nm. Nilai ini mendekati panjang gelombang dari salah satu puncak trifenilfosfoniumheptil yaitu 260 nm yang menunjukkan puncak dari cincin kuinoid tersubstitusi alkil.

Hasil karakterisasi produk trifenilfosfoniumheptil menggunakan spektrofotometer FT-IR ditunjukkan pada **Gambar 4.8** dan **Tabel 4.5**.



Gambar 4.8 Perbandingan spektrum FTIR C7 dengan TFH

Tabel 4.5 Hasil interpretasi gugus fungsi spektrum FTIR produk C7 dan TFH

No	Bilangan gelombang C7 (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang TFH (cm ⁻¹)	Gugus fungsi
1	-	3059,65	C-H sp ²
2	2930,43	2932,36	C-H sp ³
3	1647,86	1647,86	C=O keton
4	687,37	-	C-Br

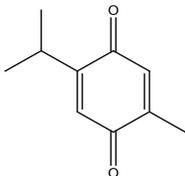
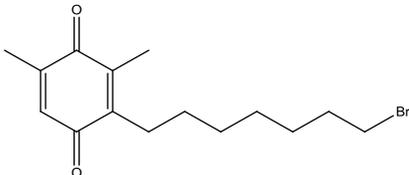
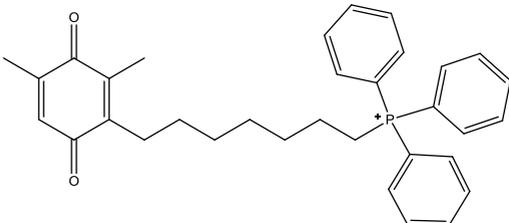
Berdasarkan spektrum FTIR di atas dapat diketahui bahwa terjadi beberapa perbedaan dari spektrum FTIR C7 dan TFH. Pada bilangan gelombang 3059,65 cm⁻¹ terjadi peningkatan intensitas yang menunjukkan terbentuknya gugus C-H sp² dari produk TFH disebabkan adanya gugus fenil yang terikat pada ujung rantai alkil. Selain itu puncak C-Br yang sebelumnya ada pada bilangan gelombang 687,37 tidak terbentuk pada spektrum FTIR dari produk TFH. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan C-Br dari bromoheptil terlepas dan tersubstitusi oleh gugus trifenilfosfonium.

4.3 Uji *in silico*

Uji aktivitas secara *in silico* dilakukan menggunakan *Molecular docking* yaitu pemodelan interaksi antara ligan dan makromolekul dalam keadaan paling stabil. Pemodelan ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas suatu obat berdasarkan interaksi ligan sebagai obat dengan makromolekul yang menjadi target obat [8]. Ligan yang digunakan yaitu timokuinon (TQ), bromoheptil (C7), dan trifenilfosfoniumheptil (TFH). Sedangkan makromolekul yang digunakan yaitu *glycogen phosphorylase* (GPA) sebagai target obat antidiabetes [29]. Struktur makromolekul GPA diunduh melalui www.rcsb.org.

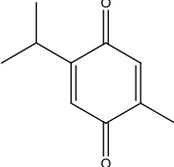
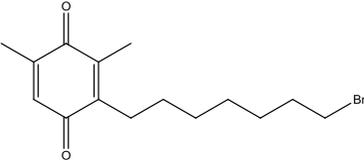
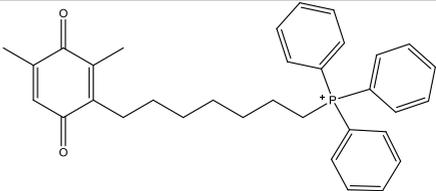
Data yang diperoleh dari uji *in silico* yaitu nilai log P, ΔG° , Ki, LD50, LC50 dan asam amino dari makromolekul yang berinteraksi dengan ligan. Dari nilai Ki dapat dihitung IC₅₀ dari ligan terhadap makromolekul target. Data nilai log P dari ligan TQ, C7, dan TFH hasil optimasi dengan Hyperchem dapat dilihat pada **Tabel 4.6**, sedangkan data prediksi toksisitas (LD₅₀ dan LC₅₀) dari ligan TQ, C7, dan TFH ditunjukkan pada **Tabel 4.7**.

Tabel 4.6 Nilai Log P ligan hasil optimasi dengan Hyperchem

Ligan	Log P	Struktur senyawa ligan
TQ	2.80	
C7	4.79	
TFH	4.68	

Koefisien partisi (Log P) merupakan rasio konsentrasi suatu senyawa dalam fasa organik dan fasa air yang menunjukkan lipofilisitas suatu ligan dan dapat digunakan sebagai indikasi kemampuan obat dalam menembus sistem biologis tubuh [32]. Berdasarkan data pada **Tabel 4.7** dapat diketahui bahwa nilai log P dari TFH lebih tinggi dari timokuinon dan lebih rendah dari C7. Hal ini menunjukkan bahwa produk TFH memiliki nilai lipofilisitas lebih tinggi dari timokuinon sehingga memiliki kemampuan menembus membran biologis lebih baik. Nilai log P dari TFH sebesar 4,68 sudah memenuhi aturan Lipinski sebagai syarat obat yaitu memiliki nilai log P < 5 [32].

Tabel 4.7 Prediksi nilai toksisitas (LD_{50} dan LC_{50}) ligan dengan TEST

Ligan	LD_{50} (mg/kg)	LC_{50} (mg/L)	Struktur senyawa ligan
TQ	620,48	6,26	
C7	562,36	0,45	
TFH	-	-	

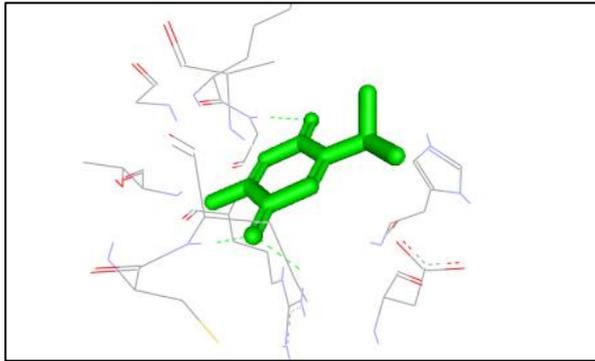
Berdasarkan data prediksi nilai LD_{50} dan LC_{50} dapat diketahui tingkat toksisitas dari ligan TQ, C7 dan TFH. LD_{50} merupakan dosis yang dibutuhkan untuk mematikan 50% populasi hewan uji yang dinyatakan dalam mg zat per kg berat badan (mg/kg). LC_{50} merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk mematikan 50% populasi hewan uji yang dinyatakan dalam mg/L [33]. Nilai LD_{50} dan LC_{50} dari ligan C7 lebih rendah dibandingkan dengan timokuinon menunjukkan tingkat toksisitas ligan C7 lebih rendah dari timokuinon. Sedangkan nilai LD_{50} dan LC_{50} ligan TFH tidak dapat terprediksi karena nilai yang terlalu besar. Hal ini menunjukkan tingkat toksisitas dari ligan TFH sangat rendah dibandingkan dengan ligan TQ dan C7.

Data hasil *docking* ligan timokuinon, C7 dan TFH ditunjukkan pada **Tabel 4.8** dengan interaksi yang ditunjukkan pada **Gambar 4.9- 4.11**.

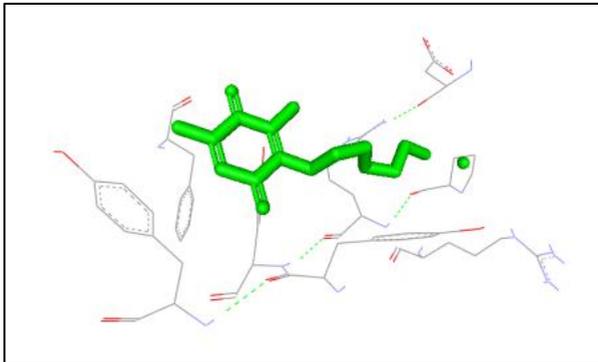
Tabel 4.8 Data hasil *docking* ligan dengan makromolekul GPA

Ligan	Ki (μm)	ΔG° (kcal/mol)	IC ₅₀ (ppm)	Asam amino	
TQ	49.15	-5.69	16.132	LYS128	GLY129
				ALA126	HIS93
				GLY127	TYR131
				LYS125	ARG130
				ASP92	CYS124
C7	72.21	-5.65	45.231	ASP324	ARG172
				PRO169	TYR177
				PHE279	TYR176
				ARG173	TYR180
TFH	1,28	-8,04	3.315	ASN323	TYR176
				ASP324	TYR177
				PRO169	TYR180
				ARG172	PHE279
				ARG173	PRO281

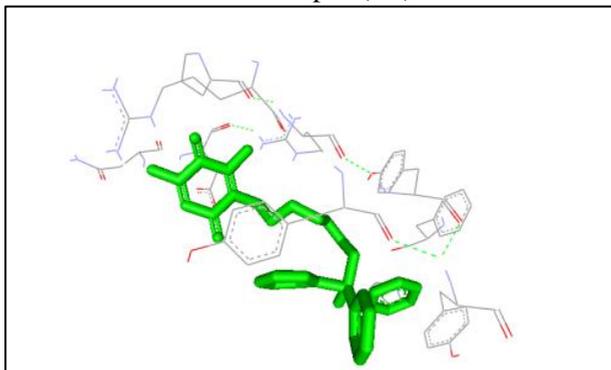
Konstanta Inhibisi (Ki) berhubungan dengan IC₅₀ yang menunjukkan kuantitas obat yang dibutuhkan untuk menghambat proses biologis pada tubuh. Nilai Ki dibutuhkan sebagai acuan dalam menentukan efektifitas suatu senyawa sebagai obat [9]. Berdasarkan **Tabel 4.8** dapat diketahui nilai Ki dan IC₅₀ dari produk C7 lebih tinggi dari pada timokuinon menunjukkan aktivitas ligan C7 pada GPA sebagai reseptor antidiabetes kurang baik dibandingkan dengan timokuinon. Sedangkan nilai Ki dan IC₅₀ dari produk TFH jauh lebih rendah dibandingkan timokuinon dan C7 menunjukkan aktivitas ligan TFH pada GPA sebagai reseptor antidiabetes sangat baik dibandingkan ligan timokuinon dan C7. Energi ikat (ΔG°) dari senyawa TFH lebih rendah dari timokuinon dan C7. Hal ini menunjukkan energi yang dibutuhkan ligan TFH untuk berikatan dengan makromolekul GPA lebih rendah dibandingkan dengan timokuinon dan C7.



Gambar 4.9 Interaksi makromolekul GPA dengan ligan timokuinon



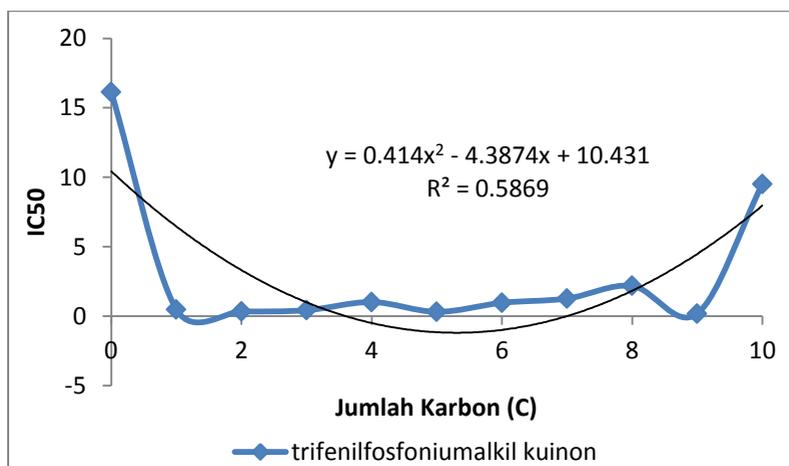
Gambar 4.10 Interaksi makromolekul GPA dengan ligan bromoheptil (C7)



Gambar 4.11 Interaksi makromolekul GPA dengan ligan trifenilfosfoniumheptil (TFH)

Asam amino dari makromolekul GPA yang berikatan dengan ketiga ligan yaitu tirosin, arginin, dan asam aspartat pada posisi asam amino yang berbeda. Selain itu terdapat asam amino yang berikatan dengan ligan C7 dan TFH yaitu fenilalanin dan prolin. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan gugus alkil C7 dan trifenilfosfonium menyebabkan terbentuknya ikatan dengan asam amino baru.

Gambar 4.10 menunjukkan kurva QSAR hubungan antara variasi jumlah rantai karbon terhadap IC₅₀ (ppm) ligan berdasarkan interaksinya pada makromolekul GPA dengan data hasil *docking* dijabarkan pada **Lampiran B.3.4**.



Gambar 4.12 Kurva QSAR hubungan antara IC₅₀ dengan jumlah karbon pada makromolekul GPA

Berdasarkan kurva QSAR terdapat penurunan nilai IC₅₀ cukup signifikan dari jumlah karbon 0 (timokuinon) dengan penambahan jumlah karbon 1 sampai dengan 5. Sedangkan penambahan jumlah karbon selanjutnya hingga jumlah karbon 10 cenderung mengalami peningkatan IC₅₀. Hal ini menunjukkan bahwa ligan trifenilfosfoniumalkil dengan variasi jumlah rantai karbon C1 sampai dengan C5 memiliki aktivitas yang semakin baik pada makromolekul GPA dengan nilai IC₅₀ optimum 1,103 ppm pada jumlah karbon 5 dan mengalami penurunan aktivitas dengan

penambahan jumlah karbon lebih dari 5. Hal ini disebabkan konformasi ligan trifenilfosfoniumalkil dengan jumlah karbon lebih dari 5 tidak bersesuaian dengan sisi inhibitor dari makromolekul GPA sehingga nilai IC_{50} semakin rendah.

Berdasarkan uji *in silico*, modifikasi struktur trifenilfosfoniumheptil memberikan aktivitas inhibisi lebih baik terhadap makromolekul GPA dibandingkan dengan timokuinon. Variasi penambahan jumlah karbon 1 sampai dengan 5 pada ligan trifenilfosfoniumalkil menyebabkan penurunan nilai IC_{50} sesuai dengan teori. Sedangkan penambahan jumlah karbon lebih dari 5 mengalami peningkatan nilai IC_{50} . Hal ini disebabkan konformasi ligan dengan variasi karbon berbeda mengalami interaksi yang berbeda dengan asam amino dari makromolekul GPA sesuai dengan teori *lock and key*, dimana senyawa obat sebagai kunci dan reseptor sebagai gembok. Reseptor dapat menerima senyawa obat dengan sisi aktif yang bersesuaian dengan reseptor tersebut [34]. Berdasarkan hal ini, direkomendasikan untuk variasi penambahan jumlah karbon pada senyawa trifenilfosfoniumalkil selanjutnya dilakukan dengan variasi jumlah karbon tidak lebih dari 5.