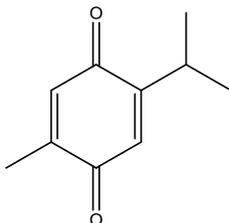


## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Timokuinon dan turunannya

Timokuinon adalah komponen bioaktif utama yaitu sekitar 25% terkandung dalam minyak atsiri *Nigella sativa* [13]. Timokuinon dengan rumus molekul  $C_{10}H_{12}O_2$  memiliki berat molekul 164,20 g/mol. Titik didih sebesar 230-232 °C dan titik leleh sebesar 45-47 °C [14]. Berikut adalah struktur dari senyawa Timokuinon:



**Gambar 2.1** Struktur senyawa Timokuinon

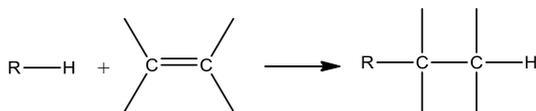
Hasil dari penelitian telah menunjukkan bahwa timokuinon memiliki kemampuan meregulasi aktivitas biologis dalam tubuh, diantaranya yaitu sebagai antitumor, anti-inflamasi, antibakteri, antidiabetes, antihipertensi, dan antikanker [13]. Potensi timokuinon sebagai senyawa obat terhambat oleh masalah bioavailabilitas senyawa tersebut. Kelarutan yang rendah dalam air dan tingginya lipofilisitas timokuinon menyebabkan efektivitas dan bioavailabilitas timokuinon sebagai obat rendah [15].

Untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa timokuinon, Antonenko et al. (2008) melakukan modifikasi struktur pada senyawa turunan timokuinon dengan melakukan adisi  $C_{10}$  dan  $C_5$  pada cincin kuinon untuk meningkatkan lipofilisitas ligan sehingga mampu meningkatkan kemampuan ligan dalam menembus membran sel. Berdasarkan penelitian dari Ravindran et al. (2010) peningkatan bioavailabilitas timokuinon berhasil dilakukan melalui formulasi nano yaitu memasukkan timokuinon pada nanopartikel poli (laktida-co-glikosida). Modifikasi struktur timokuinon dengan penambahan gugus alkil lebih baik dibandingkan dengan modifikasi secara fisik karena lebih meminimalisir masalah stabilitas suatu senyawa. Adisi gugus alkil dapat menyelesaikan masalah lipofilisitas sedangkan

adisi halogen pada ujung alkil dapat mengatasi masalah kelarutan senyawa turunan timokuinon [16].

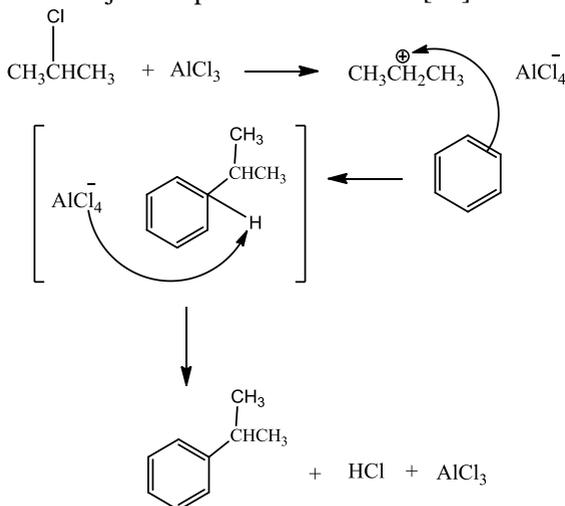
## 2.2 Alkilasi dan Dekarboksilasi

Adisi senyawa hidrokarbon jenuh (R-H) pada alkena untuk menghasilkan hidrokarbon jenuh dengan berat molekul lebih tinggi dikenal dengan alkilasi,. Reaksi alkilasi pada alkena ditunjukkan pada **Gambar 2.2** [17].



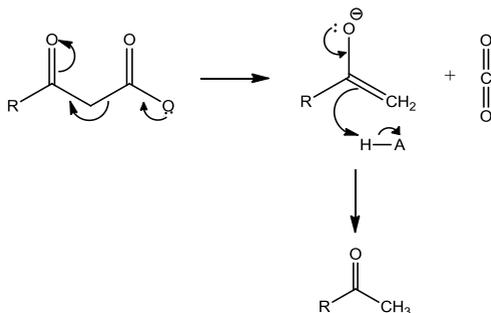
**Gambar 2.2** Reaksi alkilasi pada alkena

Reaksi alkilasi pada cincin benzena dikenal dengan reaksi alkilasi Friedel-Crafts. Reaksi ini dapat terjadi dengan mereaksikan senyawa aromatis dengan alkil klorida dengan  $AlCl_3$  sebagai katalis atau alkil bromida dengan  $FeBr_3$  untuk menghasilkan karbokation elektrofil,  $R^+$ . Baik  $AlCl_3$  maupun  $FeBr_3$  bekerja dengan mengkatalisasi disosiasi alkil halida. Mekanisme reaksi alkilasi Friedel Crafts ditunjukkan pada **Gambar 2.3**. [18]



**Gambar 2.3** Mekanisme reaksi alkilasi Friedel Crafts

Reaksi dekarboksilasi merupakan reaksi dimana atom karbon dalam wujud karbon dioksida terlepas dari molekul organik yang lebih besar [19]. Mekanisme reaksi dekarboksilasi dapat ditunjukkan pada reaksi retro aldol *cleavage* pada **Gambar 2.4**

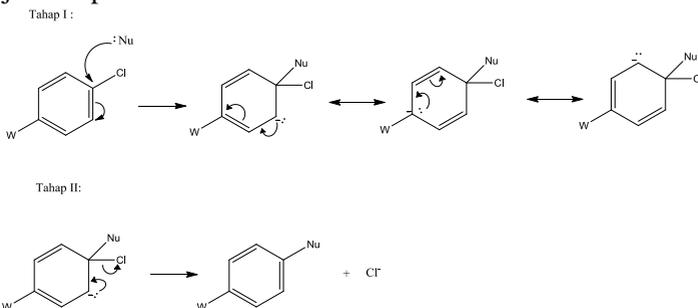


**Gambar 2.4** Mekanisme reaksi dekarboksilasi

Elektron dari ikatan karbon-karbon yang terputus mengalami stabilisasi untuk selanjutnya terjadi reaksi dekarboksilasi dengan pelepasan karbon dioksida. Elektron distabilkan melalui pembentukan enolat. Hal ini menunjukkan bahwa gugus karbonil harus berada pada posisi beta terhadap gugus karboksilat [19].

### 2.3 Substitusi Aromatis

Reaksi substitusi senyawa aromatis terbagi menjadi dua macam yaitu reaksi substitusi nukleofilik dan elektrofilik. Reaksi substitusi nukleofilik pada senyawa aromatis dapat terjadi melalui mekanisme adisi-eliminasi dan eliminasi-adisi. Mekanisme reaksi adisi-eliminasi ditunjukkan pada **Gambar 2.5**.

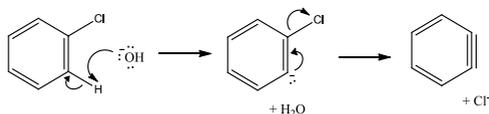


**Gambar 2.5** Mekanisme substitusi nukleofilik (adisi-eliminasi)

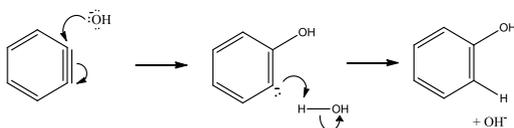
Tahap pertama yaitu adisi nukleofilik menghasilkan karbanion yang stabil dengan ikatan C-Nu yang baru. Tahap kedua yaitu lepasnya *leaving group* dari cincin aromatis sehingga terbentuk produk berupa cincin aromatis yang terikat dengan nukleofil [20].

Mekanisme reaksi eliminasi-adisi nukleofilik ditunjukkan pada **Gambar 2.6**.

Tahap I :



Tahap II:



**Gambar 2.6** Mekanisme substitusi nukleofilik (eliminasi-adisi)

Tahap pertama yaitu eliminasi atom H dan X (*leaving group*) dari dua atom karbon yang bersebelahan pada cincin aromatis membentuk intermediet benzuna yang reaktif. Tahap kedua yaitu adisi nukleofil dan protonasi membentuk produk substitusi. [20]

### 2.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) termasuk dalam kromatografi planar sederhana yang paling banyak digunakan dalam teknik pemisahan. Seperangkat KLT meliputi bejana tertutup yang berisi pelarut dan plat tipis yang dilapisi fasa diam. Teknik pemisahan KLT dapat digunakan untuk pemisahan senyawa campuran, analisis kualitatif dan semi kuantitatif [21]. Fasa diam yang digunakan pada umumnya yaitu alumina atau silika gel merupakan senyawa polar. Sedangkan fasa gerak yang digunakan bersifat non polar. Pemisahan akan terjadi ketika suatu komponen tertahan pada fasa diam lebih kuat dibandingkan dengan komponen yang lain [22].

Tahapan pemisahan menggunakan KLT yaitu sejumlah kecil sampel ditetaskan di dekat bagian ujung fasa diam sebagai titik awal

pemisahan (zona inisiasi). Selanjutnya sampel dikeringkan. Ujung fasa diam dengan zona inisiasi ditempatkan pada fasa gerak yang biasanya berupa campuran dua sampai empat pelarut murni yang diletakkan di dalam bejana tertutup. Setelah dibiarkan beberapa saat, komponen dari campuran akan mengalami migrasi dengan laju yang berbeda-beda sesuai dengan kepolaran dari masing-masing komponen senyawa [21]. Perbandingan antara jarak senyawa dari titik awal terhadap jarak pelarut dari titik awal disebut dengan nilai  $R_f$ . Nilai  $R_f$  merupakan cara yang paling umum untuk menunjukkan tingkat kepolaran komponen-komponen dalam suatu senyawa yang telah dipisahkan [22].

## 2.4 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan lain yang umum digunakan untuk pemisahan senyawa organik. Prinsip dasar dari kromatografi kolom sama dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), namun dapat digunakan untuk pemisahan senyawa dengan kuantitas lebih besar. Kromatografi kolom sangat efektif digunakan untuk mengumpulkan komponen hasil pemisahan [23].

Fasa diam yang digunakan pada umumnya sama dengan KLT yaitu alumina dan silika. Senyawa yang lebih polar akan tertahan lebih lama pada fasa diam, sedangkan senyawa yang kurang polar akan terelusi melewati kolom lebih cepat [23]. Dalam preparasi awal kolom, kapas dimasukkan pada dasar kolom untuk mencegah silika keluar dari kolom. Selanjutnya silika dimasukkan dalam kolom. Lapisan diratakan menggunakan spatula agar pemisahan terjadi secara merata. Pada bagian atas silika ditambahkan pasir pantai agar elusi berjalan pada waktu yang bersamaan. Kolom dibilas dengan eluen non-polar untuk membasahi dan memadatkan silika. Pelarut yang umumnya digunakan yaitu n-heksana dan kloroform [24].

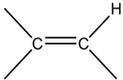
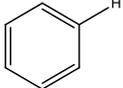
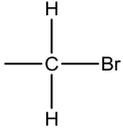
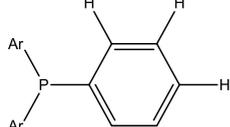
## 2.5 Spektroskopi *Nucleic Magnetic Resonance* (NMR)

*Nucleic Magnetic Resonance* (NMR) merupakan teknik spektroskopi yang didasarkan pada sifat kemagnetan dari inti atom. Ketika ditempatkan pada medan magnet yang kuat, inti atom tertentu akan mengalami resonansi dengan frekuensi tertentu pada daerah gelombang radio. Variasi dari frekuensi yang dihasilkan mampu memberikan informasi tentang struktur molekul dari suatu senyawa

[25]. Spektra dari NMR merupakan hubungan antara intensitas absorbs atau emisi (sumbu y) terhadap frekuensi (sumbu x). Luas area di bawah puncak spektra atau nilai integral sebanding dengan jumlah proton yang terdapat pada suatu atom [26].

Pada spektra  $^1\text{H-NMR}$ , atom hidrogen yang ekuivalen akan memberikan sinyal  $^1\text{H-NMR}$  yang sama. Sehingga dapat diketahui bahwa jumlah sinyal dari spektra  $^1\text{H-NMR}$  dapat memberikan informasi mengenai jumlah atom hidrogen ekuivalen pada suatu senyawa. *Chemical shift* suatu sinyal pada spektra  $^1\text{H-NMR}$  dapat memberikan informasi mengenai tipe hidrogen yang menghasilkan sinyal tersebut. *Splitting* dari sinyal  $^1\text{H-NMR}$  dapat memberikan prediksi jumlah atom H dari atom yang bersebelahan melalui aturan  $(n+1)$  [20]. Nilai *Chemical shift* (ppm) dari beberapa tipe proton untuk spektra  $^1\text{H-NMR}$  ditunjukkan pada **Tabel 2.1**.

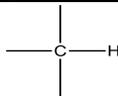
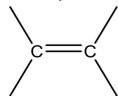
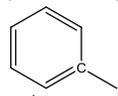
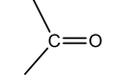
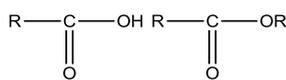
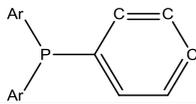
**Tabel 2.1** Karakteristik *Chemical shift* berdasarkan tipe proton pada  $^1\text{H-NMR}$

Tipe proton	<i>Chemical shift</i> (ppm)
$\text{RCH}_3$	$\pm 0,9$
$\text{R}_2\text{CH}_2$	$\pm 1,3$
$\text{R}_3\text{CH}$	$\pm 1,7$
	4,5-6
	6,5-8
	2,5-4
	7,2-7,8

Perkembangan spektroskopi  $^{13}\text{C-NMR}$  masih terhambat dibandingkan dengan  $^1\text{H-NMR}$  disebabkan rendahnya kelimpahan

dan momen magnetik dari isotop  $^{13}\text{C}$ . Sama halnya dengan  $^1\text{H}$ -NMR, spektroskopi  $^{13}\text{C}$ -NMR juga menerapkan aturan (n+1) dalam menginterpretasikan *splitting* pada sinyal spektra yang terbentuk [20]. Nilai *Chemical shift* (ppm) dari beberapa tipe karbon untuk spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR ditunjukkan pada **Tabel 2.2**.

**Tabel 2.2** Karakteristik *Chemical shift* berdasarkan tipe karbon pada  $^{13}\text{C}$ -NMR

Tipe Karbon	<i>Chemical Shift</i> (ppm)
	5-45
	100-140
	120-150
	160-210
	25-65
	160-185
	128-138

## 2.6 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang terdiri atas sumber radiasi UV dan *visible*, sel yang dilewati oleh sinar, dan detektor yang berfungsi untuk mengukur banyaknya cahaya yang ditransmisikan melewati sel. Spektrofotometer UV-Vis yang telah dilengkapi program komputer dapat digunakan untuk membuat kurva kalibrasi untuk menentukan konsentrasi suatu sampel. Daerah tampak (*visible*) berada pada rentang panjang gelombang 800-400

nm, sedangkan daerah UV berada pada rentang panjang gelombang 400-200 nm [27].

## 2.7 Spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR)

Spektrometer *Fourier Transform IR* (FT-IR) berdasarkan pada transisi yang terjadi antara tingkat energy vibrasi molekuler yaitu vibrasi ulur dan tekuk pada ikatan antar atom. Instrumen spektrometer FT-IR terdiri dari sumber radiasi IR (2,5-15  $\mu\text{m}$ ), tempat sampel, detektor dan *plotter*. Pada spectrometer IR terbaru, spektra yang terbentuk akan disimpan secara digital. Beberapa metode yang digunakan untuk preparasi sampel yaitu menggunakan pelet KBr dan NaCl window [27]. Spektra IR terbagi atas 5 zona berdasarkan karakteristik gugus fungsi yang aktif IR yang ditunjukkan pada **Tabel 2.3**:

**Tabel 2.3** Daerah serapan Infra merah berdasarkan vibrasi ikatan gugus fungsi

Gugus Fungsi	Daerah serapan ( $\text{cm}^{-1}$ )
C—H	sp <sup>3</sup> : 3000-2850 sp <sup>2</sup> : 3100-3000 Aromatis : 3150-3050 Trifenilfosfin : 3000-3060
C=C	1680-1600
C—O	1300-1100
C=O	Keton : 1725-1705 Asam Karboksilat : 1725-1700 Ester : 1750-1730
O—H	Alkohol : 3000-2500 Asam Karboksilat : 3600-3000
C—Br	500-600

## 2.9 Molecular Docking

*Molecular Docking* merupakan pemodelan interaksi antara 2 molekul dalam keadaan yang paling stabil. Pemodelan ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas suatu obat berdasarkan interaksi ligan sebagai obat dengan makromolekul yang menjadi target obat. Berdasarkan sifat dari ligan dan target dapat diprediksikan struktur tiga dimensi dari kompleks yang telah dioptimasi berdasarkan energi total sistem [8].

Konstanta inhibisi ( $K_i$ ) berhubungan dengan nilai konsentrasi inhibisi ( $IC_{50}$ ) yang menunjukkan kuantitas obat yang dibutuhkan untuk menghambat proses biologis pada tubuh. Nilai  $K_i$  dibutuhkan sebagai acuan dalam menentukan efektifitas suatu senyawa sebagai obat [9]. Berikut adalah persamaan yang menunjukkan hubungan antara konstanta inhibisi ( $K_i$ ) dengan  $IC_{50}$  dan energi ikat ( $\Delta G^\circ$ ) [28].

$$\Delta G^\circ = RT (\ln K_i)$$

$$K_i = e^{\frac{\Delta G}{RT}}$$



Jika  $[R] \gg \gg$ , maka  $[RL] = [R]$  sehingga  $[L]$  dapat diabaikan dan didapatkan  $K_d = [L]$

$$K_d = [L]$$

( $K_i \sim K_d$ )

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{[L]}}$$

$$K_i = \frac{IC_{50}}{2}$$

$$IC_{50} = 2K_i$$

## 2.10 Makromolekul target senyawa timokuinon

Makromolekul yang menjadi target senyawa timokuinon dan turunannya yaitu *Glycogen phosphorylase* (GPA). GPA berperan dalam mengkatalisasi pemecahan glikogen menjadi glukosa-1-fosfat dalam hati dan membran. Inhibitor farmakologis GPA telah dikembangkan dan dipelajari sebagai terapi potensial untuk

mengatasi hiperglikemia yang berhubungan dengan diabetes tipe 2 [29]. Mekanisme inhibisi GPA yaitu senyawa obat akan terikat pada sisi inhibitor GPA pada wujud yang kurang aktif sehingga dapat mencegah transformasi GPA menjadi enzim yang lebih aktif. Dalam model diabetes *murine*, inhibitor GPA berperan dalam mengurangi aktivitas GPA dalam hati dan mengurangi hiperglikemia tanpa menimbulkan hipoglikemia [30].