

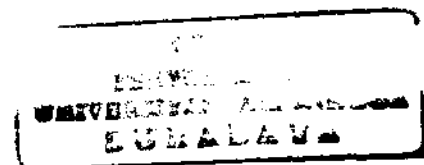
SKRIPSI

RANI NUR BADRIYAH

**PENENTUAN SIFAT ELEKTRONIK (pKa) DAN
STERIK (R_m) SERTA UJI AKTIVITAS ANALGESIK
ASAM O-(4-KLOROBENZOIL)SALISILAT DAN
ASAM O-(2,4-DIKLOROBENZOIL)SALISILAT**



FF 122/08
Bad
o



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2007**

Lembar Pengesahan

PENENTUAN SIFAT ELEKTRONIK (pK_a) DAN STERIK (R_m) SERTA UJI AKTIVITAS ANALGESIK ASAM O-(4-KLOROBENZOIL)SALISILAT DAN ASAM O-(2,4-DIKLOROBENZOIL)SALISILAT

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2007

Oleh :

RANI NUR BADRIYAH
NIM : 050312802

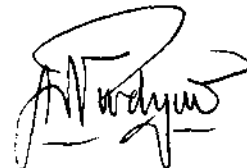
Skripsi ini telah disetujui
tanggal 23 Agustus 2007 oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta



Ir. Hj. Rully Susilowati, MS.
NIP. 131 569 381



Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si.
NIP. 132 011 698

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas karunia dan rahmat-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Skripsi yang berjudul "PENENTUAN SIFAT ELEKTRONIK (pK_a) DAN STERIK (R_M) SERTA UJI AKTIVITAS ANALGESIK ASAM *O*-(4-KLORO BENZOIL)SALISILAT DAN ASAM *O*-(2,4-DIKLOROBENZOIL)SALISILAT" ini diajukan sebagai syarat untuk menjadi Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ir. Hj. Rully Susilowati, MS. dan Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si selaku pembimbing yang telah tulus ikhlas membimbing dan memberikan dorongan moril dan materiil sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
2. Prof. Dr. GN. Astika, Apt. dan Prof. Dr. rer. nat. H. Mohammad Yuwono, Apt., MS. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.
3. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med.dr. H. Puruhito, yang kemudian dijabat oleh Prof. Dr. H. Fasich, Apt. atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan program Sarjana.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, Apt., MS. yang kemudian dijabat oleh Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt., MS. atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan program Sarjana.
5. Prof. Dr. Siswandono, Apt., MS. selaku Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas laboratorium untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Dra. Dewi Isadiartuti, M.Si., selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan akademik sehingga penulis dapat menyelesaikan studi S1 tepat waktu.

7. Orang tuaku tercinta, yang mencurahkan kasih sayang sepanjang hidupnya kepada penulis, memberikan dukungan finansial, semangat dan doa sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Sahabatku dan seseorang yang telah menemaniku dan memberikan semangat untuk terus maju dan menyelesaikan skripsi ini.
9. Teman-temanku di Kimia Medisinal, atas bantuan dan kebersamaan kita dalam menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman seperjuangan angkatan 2003, terutama non reguler genap, atas persahabatan dan kebersamaan kita selama ini.
11. Pak Tukijo, Pak Tanto dan Mas Mahfud atas bantuannya dalam mengerjakan skripsi ini.
12. Semua pihak yang telah membantu menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas kebaikan yang telah diberikan dengan pahala yang berlipat ganda.

Penulis telah berusaha semaksimal mungkin dalam penyusunan skripsi ini. Namun, penulis tetap mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Skripsi ini penulis persembahkan kepada almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Airlangga agar dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu farmasi pada khususnya dan bagi masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Agustus 2007

Penulis

RINGKASAN

PENENTUAN SIFAT ELEKTRONIK (pK_a) DAN STERIK (R_M) SERTA UJI AKTIVITAS ANALGESIK ASAM *O*-(4-KLOROBENZOIL)SALISILAT DAN ASAM *O*-(2,4-DIKLOROBENZOIL)SALISILAT

Rani Nur Badriyah

Senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat mempunyai perbedaan struktur dalam jumlah gugus Cl pada cincin benzoil. Adanya 2 gugus kloro pada senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat menyebabkan lipofilisitasnya lebih besar, sehingga ditinjau dari peran lipofilik dalam penembusan membran diperkirakan aktivitasnya lebih besar pula. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas analgesik kedua senyawa hampir sama yang dinyatakan dalam persentase hambatan nyeri pada dosis 100 mg/kg BB. Dengan demikian perbedaan sifat lipofilik tidak mempengaruhi aktivitas kedua senyawa tersebut. Oleh karena itu perlu diteliti bagaimana pengaruh sifat elektronik dan sterik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat terhadap aktivitas analgesiknya.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menentukan nilai pK_a sebagai sifat elektronik dan nilai refraksi molar (R_M) sebagai sifat sterik serta menguji aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat sehingga dapat diketahui bagaimana pengaruh kedua sifat kimia fisika tersebut terhadap aktivitas analgesiknya. Selain menyebabkan lipofilitas yang berbeda, adanya gugus Cl pada jumlah dan posisi berbeda akan menyebabkan perbedaan pK_a (sifat elektronik) dan R_M (sifat sterik). Dengan adanya perbedaan kedua sifat tersebut maka aktivitas analgesiknya berbeda.

Penentuan nilai pK_a sebagai sifat elektronik dilakukan dengan metode spektrofotometri. Metode ini tergantung pada penentuan secara langsung rasio bentuk molekuler terhadap ionik dalam 1 seri larutan dapar yang pH-nya terukur. Untuk memperoleh rasio bentuk molekul dan bentuk ionik, dilakukan pengukuran serapan larutan senyawa dalam dapar pH 1 (senyawa dalam bentuk molekuler) dan dalam dapar pH 12 (senyawa dalam bentuk ionik) serta dalam dapar berbagai pH antara 1-12 (senyawa dalam bentuk campuran molekuler dan ionik). Pengukuran serapan larutan pada berbagai pH dilakukan pada λ analitik menggunakan blanko larutan dapar pH yang sesuai. Nilai pK_a dihitung berdasarkan persamaan Handerson-Hasselbach.

Nilai refraksi molar (R_M) sebagai sifat sterik senyawa uji ditentukan dengan cara mengukur indeks bias dan densitas larutan senyawa dalam aseton. Kemudian nilai R_M senyawa dihitung dengan persamaan Lorenz-Lorentz menggunakan hasil perhitungan R_M solven (aseton) dan R_M larutan senyawa.

Uji aktivitas analgesik dilakukan dengan metode *writhing test* menggunakan mencit. Senyawa uji diberikan pada dosis 75, 150 dan 300 mg/kg BB secara intraperitoneal pada mencit 20 menit sebelum induksi nyeri oleh larutan asam asetat 0,6% sejumlah 0,01 ml/g BB secara intraperitoneal. Respon nyeri berupa

frekuensi geliat diamati selama 30 menit terhitung 5 menit setelah induksi nyeri. Dari data frekuensi geliat dihitung persentase hambatan nyeri berdasarkan perbandingan frekuensi geliat pada kelompok dosis dengan kelompok kontrol. Aktivitas analgesik dinyatakan sebagai ED_{50} yang ditentukan berdasarkan hubungan antara log dosis dengan persentase hambatan nyeri menggunakan 3 dosis senyawa uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat memiliki pK_a sebesar $5,31 \pm 0,07$ sedangkan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat memiliki pK_a sebesar $5,03 \pm 0,06$. Nilai pK_a kedua senyawa hampir sama sehingga dapat dinyatakan bahwa senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat memiliki keasaman yang hampir sama. Harga R_M yang diperoleh untuk senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat sebesar $96,30 \pm 0,00$ cc/mol dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat sebesar $107,97 \pm 2,89$ cc/mol. Hasil uji aktivitas analgesik menunjukkan bahwa senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat mempunyai aktivitas analgesik lebih tinggi daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat. ED_{50} senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat sebesar 148,25 mg/kg, sedangkan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat mempunyai ED_{50} sebesar 174,18 mg/kg. Karena senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat memiliki keasaman hampir sama, maka yang menyebabkan perbedaan aktivitas kedua senyawa tersebut adalah R_M . Aktivitas analgesik asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat yang lebih kecil daripada asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat dapat terjadi karena volume molarnya yang lebih besar. Kemungkinan volume senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat yang besar memberikan halangan sterik pada interaksi dengan reseptor.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat dipengaruhi oleh R_M (sifat sterik). Nilai R_M senyawa yang lebih besar akan menurunkan aktivitas analgesiknya.

Untuk mendapatkan aktivitas analgesik yang tinggi, sebaiknya dilakukan modifikasi senyawa dengan gugus/substituen yang dapat menghasilkan nilai pK_a senyawa sekitar 5-6, R_M yang menggambarkan volume molar senyawa yang tidak lebih besar daripada asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat dan sifat lipofilik kurang dari asam *O*-(2,4-diklorobenzoil) salisilat.

ABSTRACT**The Study of Electronic (pKa) and Steric Properties (R_M) and Analgesic Activities of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid and *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid**

This research was aim to determine the electronic (pKa) and steric properties (R_M) and analgesic activities of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid and *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid and study the influence of these electronic and steric properties on the analgesic activity of the compounds. pKa, represents as electronic property, was determined by spectrophotometry. R_M (molar refractivity) was determined by measured the refractive index and density of the solution of the compound. The R_M of solid compound calculated by Lorenz-Lorentz equation. The analgesic activity of the compound were tested on mice using writhing test methods and was represented by ED_{50} . The results showed that *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid has similar in acidity with *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid. The pKa of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid was 5.31 ± 0.07 and pKa *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid was 5.03 ± 0.06 . The R_M of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid was smaller than *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid. The R_M of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid was 96.30 ± 0.00 cc/mol, while R_M of *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid was 107.97 ± 2.89 cc/mol. The ED_{50} of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid was 148.25 mg/kg and ED_{50} of *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid was 174.18 mg/kg. The analgesic activity of *O*-(4-chlorobenzoyl)salicylic acid was higher than *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid. It can be concluded that the acidity of the compounds did not influence their analgesic activities, while the higher the steric property, the lower analgesic activity.

Keyword : *O*-(2,4-chlorobenzoyl)salicylic acid, *O*-(2,4-dichlorobenzoyl)salicylic acid, pKa, molar refractivity, analgesic activity

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas	
2.1.1 Parameter Lipofilik	6
2.1.2 Parameter Elektronik.....	8
2.1.3 Parameter Sterik	11
2.2 Tinjauan tentang Nyeri.....	13
2.3 Tinjauan tentang Analgetik Non Narkotik.....	14
2.4 Tinjauan tentang Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS).....	15
2.5 Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Obat AINS	16
2.6 Tinjauan tentang Senyawa Turunan Salisilat.....	17
2.7 Tinjauan tentang Senyawa Turunan Benzoil Salisilat	
2.7.1 Tinjauan tentang Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat.....	18
2.7.2 Tinjauan tentang Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat.....	19

2.8 Tinjauan tentang Uji Aktivitas Analgesik	
2.8.1 Metode Stimulasi Panas	20
2.8.2 Metode Stimulasi Listrik.....	20
2.8.3 Metode Stimulasi Tekanan.....	21
2.8.4 Metode Stimulasi Kimiawi	21
2.9 Tinjauan tentang ED ₅₀	22
BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL	23
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan Penelitian	
4.1.1 Bahan Kimia.....	25
4.1.2 Hewan Coba	25
4.2 Alat Penelitian	26
4.3 Metode Penelitian	
4.3.1 Penentuan pKa	26
4.3.2 Penentuan Refraksi Molar (R _M)	29
4.3.3 Uji Aktivitas Analgesik.....	30
4.4 Analisis Data	
4.4.1 Penentuan % Hambatan Nyeri	32
4.4.2 Penentuan ED ₅₀	33
BAB V. HASIL PENELITIAN	
5.1 Penentuan pKa Senyawa	
5.1.1 Penentuan pKa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	35
5.1.2 Penentuan pKa Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	37
5.2 Penentuan Refraksi Molar (R _M)	
5.2.1 Penentuan Refraksi Molar Aseton	40
5.2.2 Penentuan Refraksi Molar Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat....	40
5.2.3 Penentuan Refraksi Molar Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil) salisilat.....	41
5.3 Uji Aktivitas Analgesik	
5.3.1 Penentuan Frekuensi Geliat.....	42
5.3.2 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri	43
5.3.3 Penentuan ED ₅₀	44

BAB VI. PEMBAHASAN.....	46
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	52
7.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	56



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
V.1 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Analitik Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil) salisilat.....	35
V.2 Penentuan pKa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	36
V.3 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Analitik Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil) salisilat.....	38
V.4 Penentuan pKa Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	38
V.5 Penentuan R_M Aseton pada suhu 30° C	40
V.6 Penentuan R_M Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat pada suhu 30° C.....	40
V.7 Penentuan R_M Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada suhu 30° C.....	41
V.8 Frekuensi Geliat pada Kelompok Dosis Senyawa Uji Asam <i>O</i> -(4-kloro benzoil)salisilat dan Kelompok Kontrol	42
V.9 Frekuensi Geliat pada Kelompok Dosis Senyawa Uji Asam <i>O</i> -(2,4-dikloro benzoil)salisilat dan Kelompok Kontrol	42
V.10 Persentase Hambatan Nyeri Senyawa Uji Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat.....	43
V.11 ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Senyawa Uji Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Molekul Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS).....	16
2.2 Struktur Molekul Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	19
2.3 Struktur Molekul Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	20
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	24
4.1 Kerangka Rancangan Uji Aktivitas Analgesik	34
5.1 Spektra Larutan Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat pada pH 1 dan pH 12 ...	35
5.2 Spektra Larutan Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat pada berbagai pH (4,4; 4,6; 4,8; 5).....	37
5.3 Spektra Larutan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada pH 1 dan pH 12.....	37
5.4 Spektra Larutan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada berbagai pH (4,6; 4,8; 5; 5,2).....	39
5.5 Kurva Hubungan antara Log Dosis Senyawa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil) salisilat dan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat dengan % Hambatan Nyeri.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Perhitungan Refraksi Molar Aseton.....	56
2 Perhitungan Refraksi Molar Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	57
3 Perhitungan Refraksi Molar Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	58
4 Hasil ANOVA Frekuensi Geliat Antar Kelompok Dosis Senyawa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	59
5 Hasil ANOVA % Hambatan Nyeri Antar Kelompok Dosis Senyawa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	61
6 Perhitungan % Hambatan Nyeri.....	63
7 Hasil Analisis Regresi antara Log Dosis dengan % Hambatan Nyeri Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	64
8 Hasil Analisis Regresi antara Log Dosis dengan % Hambatan Nyeri Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	65
9 Perhitungan ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Kelompok Uji Masing-masing Senyawa	66
10 Tabel r	67
11 Gambar Penyuntikan Mencit secara Intraperitoneal	68
12 Gambar Mencit Sebelum dan Sesudah diberi Induksi Nyeri	69
13 Hasil Identifikasi Senyawa Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat.....	70
14 Hasil Identifikasi Senyawa Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat.....	72

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Nyeri adalah perasaan yang melibatkan fisiologis (sensoris) dan psikologis (emosional) yang tidak enak. Rasa nyeri merupakan suatu gejala, yang berfungsi melindungi tubuh dan sebagai tanda adanya gangguan di jaringan. Rasa ini disebabkan rangsangan mekanis, kimiawi atau fisik (kalor atau listrik) pada reseptornya yang dapat memicu pelepasan mediator kemudian diteruskan ke pusat nyeri dan menimbulkan kerusakan pada jaringan (Gringauz, 1997; Tjay dan Rahardja, 2002).

Rasa nyeri dapat dihilangkan dengan pemberian analgetika yaitu senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, digunakan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Analgetik narkotik memiliki aktivitas yang lebih besar dibanding analgetika non narkotik. Pada umumnya golongan ini menimbulkan euforia dan ketergantungan fisik atau kecanduan dengan cepat terjadi bila digunakan terus menerus (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Analgetik non narkotik dibedakan berdasar atas struktur kimianya yaitu analgetik-antipiretika dan obat antiinflamasi non steroid (AINS). Analgetik-antipiretika digunakan untuk pengobatan simptomatik (gejala), tidak untuk menyembuhkan. Contohnya adalah parasetamol, metampiron, asetanilida (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Kelompok obat antiinflamasi non steroid (AINS) merupakan obat pilihan untuk mengatasi rasa nyeri ringan sampai sedang (analgesik) dan menurunkan demam (Gringauz, 1997). Mekanisme kerjanya terutama melalui hambatan biosintesis prostaglandin pada jalur siklooksigenase (COX) dari metabolisme asam arakhidonat (Katzung, 2002).

Aspirin (asam asetil salisilat) adalah AINS turunan salisilat yang paling banyak digunakan dan merupakan prototip obat analgesik anti inflamasi (Gringauz, 1997). Aspirin merupakan AINS yang mempunyai aktivitas anti inflamasi tinggi dan aktivitas analgesiknya sebanding dengan parasetamol, analgetika non narkotik yang kuat (Diyah dkk., 2002). Efek dari aspirin yang merugikan adalah timbulnya gangguan pada saluran cerna seperti iritasi lambung, dispepsia, ulcer dan perdarahan (Foye, 1995; Katzung, 2002).

Karena aspirin mempunyai beberapa efek yang merugikan, banyak AINS lain yang dikembangkan dalam usaha untuk memperbaiki efektifitas dan mengurangi toksisitas (Katzung, 2002). Salah satu cara yang dilakukan adalah dengan memodifikasi pada gugus fenolat asam salisilat. Turunan dengan modifikasi pada gugus fenolat dapat diabsorpsi secara utuh ke sirkulasi darah (Willete, 1991). Atom hidrogen gugus ini dapat diganti dengan gugus selain asetil tanpa menghilangkan aktivitasnya, seperti pada senyawa turunan asam *O*-benzoil salisilat. Turunan asam *O*-benzoil salisilat yang telah disintesis di antaranya adalah asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat (Diyah dkk., 2006).

Kedua senyawa tersebut telah disintesis berdasarkan model pendekatan Topliss. Topliss memodifikasi struktur dengan menggunakan prinsip dasar pendekatan hubungan struktur dan aktivitas model Hansch yang melibatkan 3 parameter yaitu lipofilik, elektronik dan sterik. Modifikasinya adalah dengan memasukkan gugus-gugus yang mempunyai sifat lipofilik, elektronik dan sterik tertentu pada posisi tertentu struktur senyawa induk dan diharapkan dapat memberikan aktivitas lebih tinggi dibanding aktivitas senyawa induk (Siswandono dan Soekardjo, 1998). Dari ketiga sifat tersebut, sifat lipofilik berperan dalam penembusan senyawa ke dalam membran biologis untuk mencapai reseptor sehingga memberikan aktivitas. Oleh karena itu, berdasarkan metode Topliss, maka yang pertama dilakukan untuk mendapatkan aktivitas yang lebih besar adalah dengan meningkatkan lipofilitas senyawa (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

Gugus Cl (klor) adalah gugus yang mempunyai nilai $\pi(+)$ cukup besar yaitu 0,70 sehingga dapat meningkatkan lipofilisitas senyawa. Senyawa hasil sintesis yaitu asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat merupakan analog aspirin yang dibuat dengan mensubstitusi gugus 4-kloro benzoil pada atom hidrogen gugus fenolat asam salisilat. Senyawa lainnya yaitu asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat yang memiliki 2 kloro pada gugus benzoil mempunyai nilai $\pi(+)$ yang lebih besar yaitu 1,42 sehingga lipofilitasnya lebih besar (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

Berdasarkan teori, adanya peningkatan lipofilisitas senyawa dapat meningkatkan aktivitas. Tetapi pada penelitian sebelumnya, diketahui aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat hampir sama. Persentase hambatan nyeri yang dihasilkan asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat pada dosis 100 mg/kgBB adalah sebesar 45,00%, sedangkan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada dosis yang sama menghasilkan sebesar 44,82% (Diyah dkk., 2006). Berdasarkan hal tersebut, perlu diteliti sifat kimia fisika mana yang mempengaruhi aktivitas tersebut dan, sesuai dengan model Topliss yang berprinsip pada HKSA Hansch, sifat kimia fisika tersebut adalah elektronik dan sterik.

Pada penelitian ini, akan ditentukan sifat elektronik dan sterik serta aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Sifat elektronik berpengaruh pada proses distribusi obat, interaksi obat dengan reseptor dan kemampuan suatu senyawa untuk membentuk molekul-molekul ion dalam larutan. Sifat ini dapat ditunjukkan oleh pKa yaitu suatu tetapan ionisasi senyawa yang bersifat asam yang menentukan jumlah bentuk molekul dan ion dalam larutan. pKa dapat ditentukan dengan metode titrasi asam-basa, titrasi potensiometri atau dengan metode spektrofotometri. Pada penelitian ini digunakan metode spektrofotometri (Connors, 1967; Albert and Serjeant, 1971). Sedangkan sifat sterik berperan dalam proses interaksi molekul dengan reseptor dan dapat ditunjukkan oleh Refraksi Molar (R_M) yaitu ukuran volume molar yang menunjukkan besarnya suatu molekul senyawa. R_M dapat ditentukan berdasarkan teori elektromagnetik Lorenz dan Lorentz (Maron and Lando, 1974).

Uji aktivitas analgesik dapat dilakukan dengan menggunakan rangsangan secara kimiawi untuk menginduksi nyeri (*Writhing test*), secara fisik dengan memaparkan benda panas pada kulit hewan coba, seperti metode *hot plate* atau pemberian tekanan pada ekor mencit (*flick test*). Pada penelitian ini uji aktivitas dilakukan dengan metode *Writhing test* yang menggunakan senyawa kimia sebagai penginduksi nyeri yaitu asam asetat pada hewan coba mencit. Senyawa lain yang bisa digunakan sebagai penginduksi nyeri adalah fenilkinon, bradikinin dan larutan KCl 2% (Domer, 1971). Metode ini dapat menguji aktivitas analgesik karena nyeri yang ditimbulkan oleh senyawa kimia yang digunakan melibatkan mediator inflamasi. Selain sederhana, metode ini mudah dalam pelaksanaan dan pengamatan (Turner, 1965). Respon nyeri yang tampak akibat rangsangan kimiawi ini adalah menggeliatnya mencit setelah pemberian senyawa penginduksi nyeri. Aktivitas analgesik senyawa uji ditentukan berdasarkan kemampuannya menurunkan frekuensi respon nyeri yang dihitung sebagai % hambatan nyeri pada satu dosis tertentu. Potensi analgesik senyawa uji dinyatakan dalam ED_{50} , yaitu dosis yang menghasilkan efek hambatan nyeri sebesar 50% berdasarkan kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri yang diperoleh dengan menentukan % hambatan nyeri pada berbagai dosis. ED_{50} menyatakan ukuran baku aktivitas biologis.

1.2 Rumusan Masalah

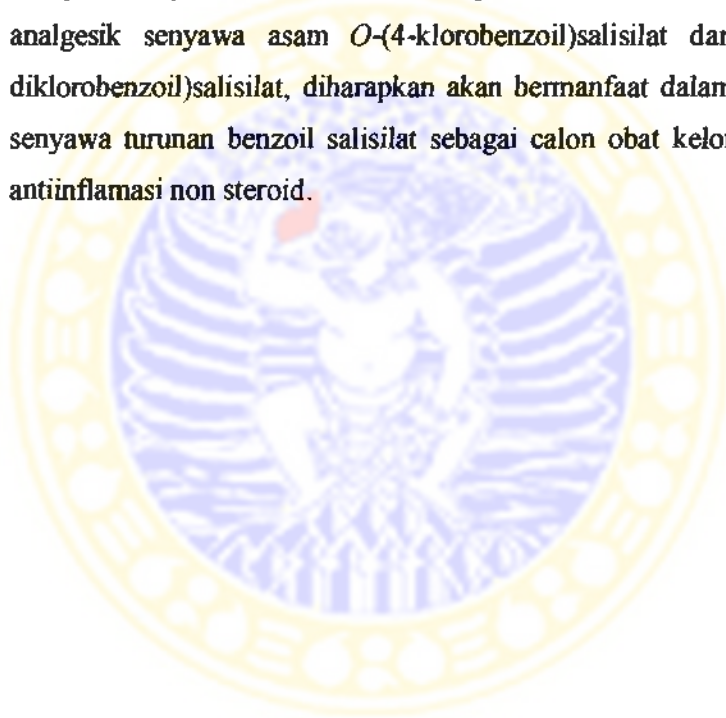
1. Berapa harga sifat elektronik (pK_a) dan sterik (R_M) senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat ?
2. Berapa harga ED_{50} senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat ?
3. Bagaimana pengaruh sifat elektronik dan sterik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat terhadap aktivitas analgesiknya ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan sifat elektronik (pK_a) dan sterik (R_M) senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.
2. Menentukan ED_{50} aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.
3. Mengetahui pengaruh sifat elektronik (pK_a) dan sterik (R_M) senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat terhadap aktivitas analgesiknya.

1.4 Manfaat Penelitian

Dengan mengetahui sifat elektronik (pK_a) dan sterik (R_M) serta aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat, diharapkan akan bermanfaat dalam pengembangan senyawa turunan benzoil salisilat sebagai calon obat kelompok analgesik-antiinflamasi non steroid.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas

Crum, Brown dan Fraser mengemukakan konsep pertama kali bahwa aktivitas biologis suatu senyawa berhubungan dengan struktur kimianya. Dari penelitian, mereka memberikan postulat bahwa efek biologis suatu senyawa merupakan fungsi dari struktur kimianya (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Perkembangan studi pendekatan hubungan struktur dan aktivitas biologis menjadi pesat setelah tahun 1960-an yang dipelopori oleh **Corwin Hansch** dan kawan-kawan yang menghubungkan struktur kimia dan aktivitas biologis obat melalui sifat-sifat kimia fisika umum. Kemudian, pengembangan hubungan kuantitatif antara aktivitas biologis dan parameter yaitu lipofilik, elektronik dan sterik lebih diintensifkan (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Hubungan kuantitatif struktur kimia dan aktivitas biologis obat (HKSA) adalah bagian penting dari rancangan obat dalam usaha untuk mendapatkan obat baru dengan aktivitas lebih besar, selektivitas yang lebih tinggi, toksisitas/efek samping sekecil mungkin dan kenyamanan lebih besar. Selain itu dengan HKSA, biaya lebih hemat karena faktor coba-coba ditekan sekecil mungkin sehingga jalur sintesis lebih pendek (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Adapun parameter sifat kimia fisika yang sering digunakan dalam HKSA adalah parameter lipofilik, elektronik dan sterik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

2.1.1 Parameter Lipofilik

Suatu senyawa obat untuk dapat memberikan aktivitas harus mampu menembus membran biologis dan mencapai jaringan target dalam jumlah yang cukup untuk menimbulkan aktivitas (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Obat yang lebih larut dalam lemak atau lipofilik lebih mudah menembus membran biologis daripada obat yang bersifat hidrofily. Akan tetapi jika terlalu lipofilik maka tidak dapat terlarut dalam cairan sel sehingga aktivitas menurun (Shargel, 1988).

Parameter lipofilik yang sering digunakan dalam HKSA adalah logaritma koefisien partisi (Log P), tetapan π Hansch dan tetapan kromatografi Rm (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Logaritma koefisien partisi (Log P). Koefisien partisi adalah tetapan keseimbangan suatu senyawa dalam pelarut non polar/polar, yang secara logaritma berhubungan dengan energi bebas.

Logaritma koefisien partisi (log P) adalah parameter lipofilik yang merupakan karakteristik dari gugus-gugus kimia yang disubstitusikan dalam senyawa induk (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

$$\log P = \log C_o - \log C_w$$

Keterangan :

C_o : kadar obat dalam pelarut minyak (pelarut non polar)

C_w : kadar obat dalam air (pelarut polar)

Tetapan π Hansch. Pada tahun 1964, **Hansch** telah membuat suatu tetapan parameter lipofilik π dari substituen-substituen berdasarkan koefisien partisi dalam sistem pelarut 1-oktanol/air, yang didapatkan melalui persamaan sebagai berikut (Siswandono dan Soekardjo, 2000) :

$$\pi_X = \log P_{SX} - \log P_{SH}$$

Keterangan :

π_X : tetapan dukungan gugus X terhadap sifat kelarutan senyawa induk dalam sistem pelarut 1-oktanol/air

P_{SX} : koefisien partisi sistem 1-oktanol/air senyawa induk yang tersubstitusi gugus X

P_{SH} : koefisien partisi sistem 1-oktanol/air senyawa induk

$\pi (+)$ berarti substituen dapat meningkatkan kelarutan senyawa induk dalam pelarut non polar (oktanol), relatif terhadap H.

$\pi (-)$ berarti substituen dapat meningkatkan kelarutan senyawa induk dalam pelarut polar (air), relatif terhadap H.

Tetapan kromatografi Rm. Bila kelarutan suatu senyawa dalam pelarut yang satu jauh lebih besar dibandingkan pelarut lainnya atau senyawa sangat sukar larut dalam pelarut yang digunakan, maka penentuan koefisien partisi dengan percobaan akan mengalami kesulitan. Untuk mengatasi hal tersebut, pada

tahun 1965 **Boyce dan Milborrow** memperkenalkan parameter lain yang masih berhubungan dengan koefisien partisi yaitu parameter kromatografi R_m (*retention modified*), yang dapat dinyatakan melalui persamaan berikut :

$$R_m = \log \{ (1/R_f) - 1 \}$$

Nilai R_f diperoleh dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Fasa Balik (KLTFB) yang berdasarkan pada prinsip kromatografi partisi. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel yang diimpregnasi dengan pelarut non polar, seperti oktanol, sedangkan fasa gerak adalah air atau campuran air yang didapat pada pH 7,4 dengan metanol atau aseton (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

2.1.2 Parameter Elektronik

Parameter elektronik berkaitan dengan tetapan ionisasi (pK_a) yang menentukan bentuk terionkan dan tak terionkan dari suatu senyawa pada pH tertentu, sifat oksidasi-reduksi atau reaktivitas senyawa dan pengaruh bagian substituen terhadap reaktivitas bagian molekul yang tidak mengalami perubahan (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan elektronik yang sering digunakan dalam HKSA adalah tetapan σ Hammett, tetapan σ^* Taft dan tetapan disosiasi (pK_a) (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan σ Hammett. Tetapan ini diperkenalkan Hammett sebagai tetapan substituen untuk meramalkan tetapan keseimbangan dan tetapan kecepatan untuk suatu reaksi kimia (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan σ^* Taft. Tetapan ini diperkenalkan Taft sebagai tetapan elektronik σ^* untuk senyawa alifatik berdasarkan kecepatan hidrolisis ester tersubstitusi $X-COOCH_3$ (K_{SX}) dan ester induk $H_3C-COOCH_3$ (K_{SCH_3}) dalam suasana asam (a) dan basa (b), yang dapat dilihat pada persamaan :

$$\sigma^* = 1/2,48 [\log (K_{SX}/K_{SCH_3})_b - \log (K_{SX}/K_{SCH_3})_a]$$

Keterangan :

K_{SX} : tetapan kecepatan hidrolisis ester $X-COOCH_3$

K_{SCH_3} : tetapan kecepatan hidrolisis ester $H_3C-COOCH_3$

a,b : suasana hidrolisis, a (asam) atau b (basa)

2,48 : tetapan yang didapatkan pada skala

Parameter ini menunjukkan pentingnya ionisasi atau kerapatan muatan pada pusat alifatik yang dapat mempengaruhi sisi aktif (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan disosiasi (pKa). Pada proses penembusan membran, diperlukan bentuk molekul yang mudah larut dalam lemak sehingga lebih mudah menembus membran daripada bentuk ion. Jika molekul mudah menembus membran, kemungkinan jumlah obat yang berinteraksi dengan reseptor akan besar.

Handerson dan Hasselbach menggunakan persamaan untuk asam lemah dan basa lemah guna menyatukan hubungan antara pKa dan pH (Martin, 1993) :

$$\text{Untuk asam lemah} : \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{garam}]}{[\text{asam}]} \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{Untuk basa lemah} : \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{basa}]}{[\text{garam}]} \dots\dots\dots(2)$$

Pada umumnya obat adalah asam lemah atau basa lemah yang bisa terdapat dalam bentuk tak terionkan atau terionkan. Derajat ionisasi tergantung pada tetapan disosiasi (pKa) dan pH lingkungan. Sifat molekul ini dapat berpengaruh besar terhadap perjalanan melintasi membran biologis. Molekul yang tidak dapat terionkan mempunyai kelarutan dalam lemak lebih besar sehingga dapat menembus membran lebih mudah dibandingkan dalam bentuk terionkan (Foye, 1995).

Penentuan pKa secara Spektrofotometri. Nilai pKa suatu senyawa dapat ditentukan dengan metode titrasi asam-basa, titrasi potensiometri atau dengan metode spektrofotometri. Penentuan pKa dengan metode spektrofotometri tergantung penentuan secara langsung rasio spesies/bentuk molekuler (molekul netral) terhadap spesies ionik dalam satu seri larutan dapar yang nilai pH-nya sudah diukur (Connors, 1967; Albert and Serjeant, 1971).

Untuk tujuan tersebut lebih dahulu harus dibuat spektrum bentuk molekuler dan bentuk ionik. Spektrum diperoleh dengan mengukur serapan larutan senyawa dalam larutan dapar yang pH-nya diatur sedemikian sehingga senyawa yang akan diamati berada seluruhnya dalam bentuk molekuler. Cara yang sama dilakukan

untuk memperoleh spektrum senyawa dalam bentuk ionik seluruhnya (Albert and Serjeant, 1971).

Berdasarkan spektrum tersebut, dipilih panjang gelombang yang menghasilkan perbedaan serapan paling besar antara serapan bentuk molekuler dan bentuk ionik, yang disebut panjang gelombang analitik. Pada panjang gelombang analitik ini, serapan larutan senyawa pada berbagai pH diamati untuk menentukan nilai pKa (Albert and Serjeant, 1971).

Untuk menghitung nilai pKa senyawa yang bersifat asam digunakan persamaan sebagai berikut (Connors, 1967; Albert and Serjeant, 1971) :

$$\text{Jika } a_{A^-} > a_{HA} \quad : \quad pK_a = pH + \log \frac{a_{A^-} - a_{obs}}{a_{obs} - a_{HA}} \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Jika } a_{A^-} < a_{HA} \quad : \quad pK_a = pH + \log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}} \dots\dots\dots (4)$$

- a_{HA} : serapan senyawa dalam bentuk molekuler
 a_{A^-} : serapan senyawa dalam bentuk ionik
 a_{obs} : serapan senyawa dalam pH yang diamati

Untuk senyawa yang bersifat asam, a_{HA} adalah serapan larutan senyawa dalam suasana asam (pH=1) dan a_{A^-} adalah serapan larutan senyawa dalam suasana basa (pH=12 atau lebih). Untuk senyawa yang bersifat basa kebalikannya.

Panjang gelombang analitik yang ideal adalah yang pada panjang gelombang tersebut salah satu bentuk mempunyai serapan sangat kuat, sedangkan bentuk yang lain tidak mempunyai serapan. Keadaan ini dapat didekati dengan beberapa kondisi perbedaan serapan antara bentuk molekuler dengan bentuk ionik, yang dapat dipilih sesuai urutan sebagai berikut (Albert and Serjeant, 1971):

- Beda serapan puncak bentuk molekuler terhadap lembah bentuk ionik, atau sebaliknya.
- Beda serapan antara puncak bentuk molekuler dengan puncak bentuk ionik, atau sebaliknya.
- Beda serapan antara puncak bentuk molekuler dengan bahu bentuk ionik, atau sebaliknya.
- Beda serapan antara lembah bentuk molekuler dengan lembah bentuk ionik, atau sebaliknya.

2.1.3 Parameter Sterik

Sifat sterik sangat berperan dalam proses interaksi molekul dengan reseptor karena proses interaksi tersebut sangat dipengaruhi oleh ikatan kimia, kerapatan elektron, ukuran molekul dan efek stereokimia. Tetapan sterik substituen dapat diukur berdasarkan sifat meruah gugus-gugus dan efek gugus pada kontak obat dengan sisi reseptor yang berdekatan (Smith, 1988; Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan sterik yang sering digunakan dalam HKSA adalah tetapan E_s Taft, tetapan sterimol Verloop, refraksi molar dan parakor (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan E_s Taft. Tetapan E_s adalah logaritma kecepatan hidrolisis yang dikatalisis oleh asam, pada kondisi pelarut, suhu dan keasaman yang sama, dari ester $X-COOCH_3$ dibandingkan dengan metil asetat, yang dapat dilihat pada persamaan (Siswandono dan Soekardjo, 2000) :

$$E_s = \log (K_{SX}/K_{SCH_3})_a$$

Keterangan :

K_{SX} : tetapan kecepatan hidrolisis ester $X-COOCH_3$

K_{SCH_3} : tetapan kecepatan hidrolisis ester $H_3C-COOCH_3$

a : suasana hidrolisis asam

Refraksi Molar (R_M). Tetapan refraksi molar (*molar refraction*= M_R), yang dikenal sebagai parameter ruah (*bulk*), dihitung melalui persamaan **Lorenz-Lorentz** sebagai berikut (Siswandono dan Soekardjo, 2000) :

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{M}{d} \dots\dots\dots(5)$$

Keterangan :

R_M : refraksi molar zat (padat, cair)

n : indeks refraksi

M : berat molekul senyawa

d : densitas/massa jenis, diukur pada suhu yang sama dengan penentuan n

Refraksi molar untuk zat padat ditentukan dengan cara melarutkan zat (solut) terlebih dahulu dalam solven, kemudian mengukur indeks bias serta densitas larutan. Refraksi molar larutan adalah (Maron, 1974) :

$$R_{12} = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \times \frac{(N_1 M_1 + N_2 M_2)}{d} \dots\dots(6)$$

R_{12} : refraksi molar larutan
 M_1 dan M_2 : berat molekul solven (1) dan solut (2)
 N_1 dan N_2 : fraksi molekul solven (1) dan solut (2) dalam larutan

Untuk menghitung refraksi molar zat (solut) dalam larutan digunakan persamaan (Maron and Lando, 1974) :

$$R_{12} = N_1 R_1 + N_2 R_2$$

$$R_2 = \frac{R_{12} - (N_1 R_1)}{N_2} \dots\dots\dots(7)$$

R_1 dan R_2 masing-masing adalah refraksi molar solven (1) dan solut (2). Jadi selain indeks bias dan densitas larutan yang harus diukur, indeks bias solven sudah harus diketahui.

Parakor. Parameter ruah (*bulk*) yang lain adalah parakor [P], sebuah volume molar (V) yang telah dikoreksi dari kekuatan daya tarik intermolekul yaitu dengan mengalikannya dengan tegangan permukaan. Dari parameter ini, dapat diperkirakan bahwa efek sterik serupa dengan efek meruah sehingga semakin besar nilai positif dari substituen, efek steriknya semakin besar (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Tetapan sterimol Verloop. Salah satu kritik terhadap tetapan-tetapan sterik di atas adalah hanya mengukur salah satu aspek saja dari bentuk molekul. Sebagai contoh: parakor hanya menggambarkan total volume gugus. Untuk memperbaiki kelemahan pengukuran tersebut, **Verloop** dan kawan-kawan (1976), memperkenalkan parameter sterik baru dari substituen, yaitu tetapan sterimol yang berdasarkan model pengisian ruang, dengan mengukur sudut dan jarak ikatan substituen yang merupakan gugus fungsi penting dalam molekul obat yaitu tetapan-tetapan L , B_1 , B_2 , B_3 , B_4 , dan B_5 . Nilai L (panjang substituen), B_1 (lebar minimum substituen), B_3 , B_4 , dan B_5 (lebar maksimum substituen) ditentukan

dengan memproyeksikan gugus-gugus di sekitar atau yang tegak lurus dengan L aksis. Pengukuran jarak substituen dilakukan dengan bantuan komputer program sterimol (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

2.2 Tinjauan tentang Nyeri

Nyeri adalah perasaan sensoris dan emosional yang berkaitan dengan (ancaman) kerusakan jaringan. Keadaan psikis sangat mempengaruhi nyeri, seperti emosi yang dapat menimbulkan sakit kepala, tetapi dapat pula menghindarkan sensasi rangsangan nyeri. Rasa nyeri merupakan suatu gejala, yang berfungsi melindungi tubuh dan sebagai tanda adanya gangguan di jaringan (Tjay dan Rahardja, 2002).

Nyeri dapat dikelompokkan sebagai nyeri akut dan nyeri kronik. Nyeri akut didapat dari penyakit, kecelakaan, zat kimia atau rangsangan fisik (seperti panas). Secara klinik, nyeri akut seperti nyeri persalinan dan nyeri pasca bedah. Nyeri kronik diperoleh dari fisik, emosional dan stres. Berdasarkan asalnya, nyeri dibedakan menjadi nyeri visceral dan nyeri somatik. Nyeri visceral adalah nyeri yang berasal dari bagian nonskeletal, misalnya nyeri lambung. Sedangkan nyeri somatik adalah nyeri yang berasal dari otot dan tulang, meliputi nyeri kepala, terkilir (Gringauz, 1997).

Rasa nyeri dapat disebabkan oleh rangsangan mekanis, kimiawi atau fisik (kalor, listrik) dan dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan sehingga memicu pelepasan zat yang disebut mediator nyeri. Zat tersebut mengaktifasi reseptor nyeri di ujung saraf bebas di kulit, mukosa dan jaringan lain. Rangsangan ini dialirkan melalui saraf via sumsum tulang belakang, sumsum lanjutan dan otak tengah. Dari *thalamus* impuls diteruskan ke pusat nyeri di otak besar dan impuls dirasakan sebagai nyeri (Tjay dan Rahardja, 2002).

Mediator nyeri disebut juga autacoida dan terdiri antara lain histamin, serotonin, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Bradikinin dan prostaglandin dapat mengakibatkan reaksi radang dan kejang pada jaringan otot, yang selanjutnya mengaktifasi reseptor-reseptor nyeri (Tjay dan Rahardja, 2002). Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian telah membuktikan bahwa prostaglandin

menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Prostaglandin menimbulkan keadaan hiperalgesia, kemudian mediator kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata (Ganiswarna, 1995).

Berdasarkan proses terjadinya nyeri, rasa nyeri dapat dilawan dengan beberapa cara, yaitu (Tjay dan Rahardja, 2002) :

1. Merintanginya terbentuknya rangsangan pada reseptor nyeri perifer dengan analgetika perifer (non narkotik).
2. Merintanginya penyaluran rangsangan di saraf-saraf sensoris, misalnya dengan anestetik lokal.
3. Blokade pusat nyeri di SSP dengan analgetika sentral (narkotika) atau dengan anestetik umum.

2.3 Tinjauan tentang Analgetik Non Narkotik

Analgetika adalah senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, digunakan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Analgetik non narkotik digunakan untuk mengurangi rasa sakit yang ringan sampai sedang, juga untuk menurunkan suhu badan pada keadaan panas badan tinggi dan sebagai antiradang untuk pengobatan rematik (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Obat-obat tersebut terbukti dapat mempengaruhi metabolisme atau kerja sejumlah mediator biokimia dan sel pada proses peradangan. Obat tersebut bekerja sebagai analgesik perifer dan kemudian sebagai obat anti radang non steroid sehingga golongan ini menjadi lebih populer (Foye, 1995).

Berdasarkan struktur kimianya, analgetika non narkotik dibagi menjadi dua kelompok, yaitu analgetik-antipiretik (turunan anilin dan para-aminofenol, dan turunan 5-pirazolon) dan obat antiinflamasi non steroid (turunan salisilat, turunan 5-pirazolidindion, turunan N-arilantranilat, turunan asam anilasetat, turunan heteroarilasetat, turunan oksikam, dan turunan lain-lain) (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

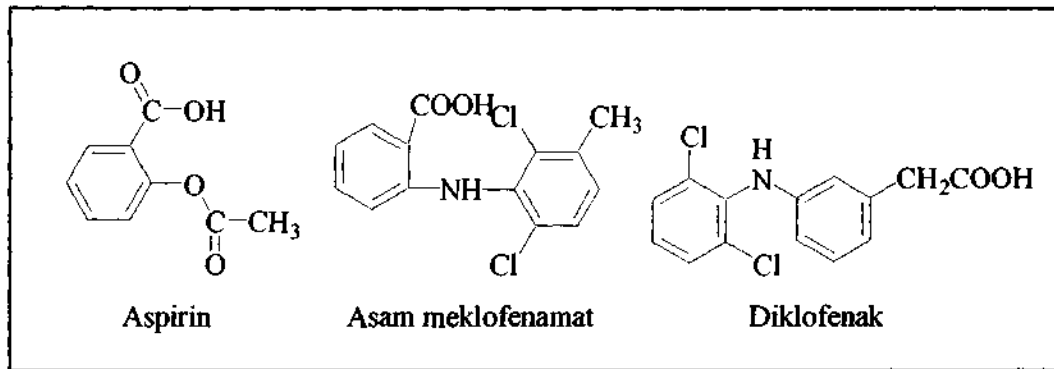
2.4 Tinjauan tentang Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS)

Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS) pada umumnya digunakan untuk mengurangi rasa nyeri dan mengatasi peradangan akut dan kronik serta peradangan pada rematik. Berdasarkan struktur kimianya, AINS dapat dikelompokkan menjadi beberapa golongan struktur, diantaranya: turunan asam salisilat, asam antranilat, asam arilasetat, asam indolasetat, pirazolon, dan sulfonamida siklis (oksikam). Senyawa-senyawa tersebut mempunyai potensi analgesik sangat beragam, tetapi memiliki banyak kesamaan sifat, seperti bersifat asam dan menunjukkan sifat antiinflamasi yang bermanfaat secara klinik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Struktur kimia AINS yang sangat beragam mempunyai ciri-ciri umum, yaitu mempunyai dua cincin yang berhubungan langsung atau melalui "jembatan" atom/gugus pendek. Salah satu cincin bertindak sebagai pengemban bagian hidrofobik molekul, pada umumnya berupa cincin aromatik atau sikloalkana yang dapat disubstitusi dengan alkil atau radikal apolar lainnya. Pada beberapa senyawa, bagian ini dapat berupa rantai hidrokarbon. Cincin kedua adalah aromatik atau heterosiklik dan mempunyai gugus anionik yang umumnya adalah gugus karboksilat (Diyah dkk., 2002).

Senyawa yang paling banyak digunakan adalah turunan salisilat yaitu aspirin yang merupakan prototip obat analgesik anti-inflamasi. Hingga kini AINS masih dinilai dengan membandingkannya terhadap aspirin dan aspirin merupakan obat pilihan pertama untuk pengobatan keadaan rematik (Gringauz, 1997).

Obat-obat dari salisilat dan turunannya mempunyai efek antipiretik dan analgesik, tetapi sifat antiinflamasi yang membuat obat-obat ini paling baik dalam menangani gangguan-gangguan dengan rasa sakit yang dihubungkan dengan intensitas proses inflamasi (Katzung, 2002).



Gambar 2.1 Struktur Molekul Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS)

2.5 Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Obat Antiinflamasi Non Steroid (AINS)

Semua obat AINS memiliki kemampuan dalam menghambat siklooksigenase (COX) yang mengakibatkan penghambatan biosintesis prostaglandin yang bertanggung jawab terhadap efek terapi yang dihasilkan (Neal, 2002).

Fenomena inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskular, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Selama berlangsungnya fenomena inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal yaitu histamin, bradikinin, PG, leukotrien. Karena adanya migrasi sel ke daerah ini, maka terjadi lisis membran lisozim dan lepasnya enzim pemecah. Obat mirip aspirin dikatakan tidak berefek terhadap mediator-mediator kimiawi tersebut kecuali PG (Wilmana, 1995). Prostaglandin mempunyai peran yang penting dalam inflamasi untuk menghasilkan vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskular (Neal, 2002).

Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara yang berbeda. Pada parasetamol, hambatan biosintesis prostaglandin hanya terjadi bila lingkungan rendah kadar peroksid, padahal di lokasi inflamasi biasanya mengandung banyak kadar peroksid yang dihasilkan oleh leukosit sehingga efek anti-inflamasinya praktis tidak ada. Sedangkan aspirin menghambat dengan mengasetilasi gugus aktif serin enzim (Wilmana, 1995).

2.6 Tinjauan tentang Senyawa Turunan Salisilat

Salisilat adalah salah satu diantara kelompok pertama yang dikenalkan sebagai analgesik. Leroux, pada tahun 1827, mengisolasi glikosida salisin dan tahun 1838, Piria membuat asam salisilat dari salisin. Cahours (1844) menghasilkan asam salisilat dari minyak *wintergreen* (metil salisilat); dan Kolbe dan Lautermann membuat secara sintetik dari fenol pada tahun 1860. Natrium salisilat diperkenalkan oleh Buss (1875), kemudian diikuti dengan fenil salisilat oleh Nencki pada tahun 1886. Aspirin (asetilsalisilat) pertama kali dibuat oleh Gerhardt pada tahun 1853, tetapi tidak diketahui hingga Felix Hofmann menemukan aktivitas farmakologinya pada tahun 1899. Selanjutnya aspirin diuji dan diperkenalkan dalam pengobatan oleh Dreser, yang memberi nama aspirin dengan mengambil "a" dari asetil dan menambahkan "spirin", nama kuno dari salisilat atau asam spirat diturunkan dari sumber alami dari tanaman spirea (Willette, 1991).

Asam salisilat adalah asam organik sederhana dengan pKa 2,98 sedangkan aspirin mempunyai pKa 3,45. Natrium salisilat dan aspirin adalah obat antiinflamasi yang sama efektifnya, walaupun aspirin mungkin lebih efektif sebagai analgesik. Salisilat dengan cepat diserap oleh lambung dan usus kecil bagian atas, menghasilkan kadar puncak plasma dalam 1-2 jam. Aspirin diserap dengan cara yang sama dan dihidrolisis cepat (waktu paruh serum 15 menit) menjadi asam asetat dan salisilat oleh esterase-esterase dalam jaringan dan darah (Budavari, 2001; Katzung, 2002).

Asam salisilat mempunyai efek analgesik-antipiretik dan antirematik, tetapi tidak digunakan secara oral karena toksik. Yang banyak digunakan sebagai analgesik adalah turunannya, terutama untuk mengurangi rasa sakit pada nyeri kepala, sakit otot dan sakit yang berhubungan dengan rematik. Efek samping yang timbul adalah iritasi lambung baik akut yang mungkin berhubungan dengan gugus karboksilat yang asam, maupun kronik karena penghambatan PGE₁ dan PGE₂, suatu vasodilator mukosa lambung sehingga sekresi asam meningkat dan menyebabkan kerusakan lambung (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Untuk meningkatkan aktivitas analgesik-antipiretik dan menurunkan efek samping, dilakukan modifikasi struktur dengan cara yaitu (Siswandono dan Soekardjo, 2000) :

1. Mengubah gugus karboksil melalui pembentukan garam, ester, atau amida.
2. Substitusi pada gugus hidroksil.
3. Modifikasi pada gugus karboksil dan hidroksil.
4. Memasukkan gugus hidroksil atau gugus yang lain pada cincin aromatik atau mengubah gugus-gugus fungsional.

2.7 Tinjauan tentang Senyawa Turunan Benzoil Salisilat

Turunan asam *O*-benzoilsalisilat merupakan ester fenolat asam salisilat. Atom hidrogen gugus fenolat diganti dengan gugus benzoil tersubstitusi, dengan demikian turunan ini analog dengan aspirin. Beberapa turunan asam *O*-benzoilsalisilat yang telah dibuat antara lain asam *O*-(4-aminobenzoil)salisilat, asam *O*-(4-bromobenzoil)salisilat, asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat (Diyah, 1998), asam *O*-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat (Diyah dkk., 2002), asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat (Diyah dkk., 2006).

Senyawa-senyawa tersebut disintesis berdasarkan metode *Schotten-Baumann* dengan modifikasi pelarut, yaitu mereaksikan asam salisilat dengan benzoil klorida tersubstitusi dalam pelarut tertentu. Reaksi tersebut adalah substitusi nukleofilik, asam salisilat bertindak sebagai nukleofil, sedangkan benzoil klorida digunakan sebagai turunan karboksil yang aktif (Diyah dkk., 2002).

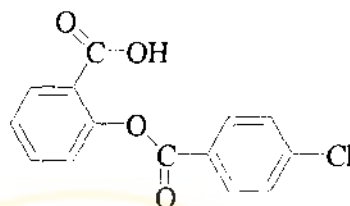
2.7.1 Tinjauan tentang Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dibuat berdasarkan metode *Schotten-Baumann* dengan modifikasi pelarut, dengan cara mereaksikan 4-klorobenzoil klorida dengan asam salisilat dalam pelarut piridina (Diyah dkk., 2006).

Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat, $C_{14}H_9O_4Cl$, berupa serbuk kristal putih, tidak berbau, mempunyai berat molekul 276,5 dan jarak lebur 120-121° C.

Senyawa ini tidak larut dalam air tetapi larut dalam aseton, etanol, metanol, kloroform dan etil asetat. Larutan dalam metanol menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 235 nm.

Berdasarkan uji aktivitas analgesik dengan metode *Writhing test* pada mencit, diketahui bahwa persentase hambatan nyeri yang dihasilkan dengan dosis 100 mg/kgBB sebesar 45,00% (Diyah dkk., 2006).



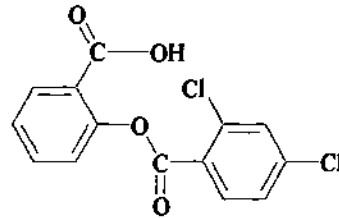
Gambar 2.2 Struktur Molekul Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

2.7.2 Tinjauan tentang Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dibuat berdasarkan metode *Schotten-Baumann* dengan modifikasi pelarut, dengan cara mereaksikan 2,4-diklorobenzoil klorida dengan asam salisilat dalam pelarut piridina (Diyah dkk., 2006).

Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat, $C_{14}H_8O_4Cl_2$, berupa serbuk kristal putih, tidak berbau, mempunyai berat molekul 311,0 dan jarak lebur 149-150° C. Senyawa ini tidak larut dalam air tetapi larut dalam aseton, etanol, metanol, kloroform dan etil asetat. Larutan dalam metanol menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 232,6 nm.

Berdasarkan uji aktivitas analgesik dengan metode *Writhing test* pada mencit, diketahui bahwa persentase hambatan nyeri yang dihasilkan dengan dosis 100 mg/kgBB sebesar 44,82% (Diyah dkk., 2006).



Gambar 2.3 Struktur Molekul Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

2.8 Tinjauan tentang Uji Aktivitas Analgesik

Metode uji aktivitas analgesik digunakan untuk menilai kemampuan senyawa uji dalam menekan atau menghilangkan rasa “nyeri inflamasi” akibat rangsangan pada hewan coba. Rangsangan yang diberikan dapat berupa rangsangan fisik (tekanan, panas, listrik) atau kimiawi (Gringauz, 1997). Dengan menggunakan hewan coba, ambang nyeri dapat ditentukan secara reproduibel dengan mengukur respon refleksnya terhadap rangsangan panas, tekanan, atau listrik.

2.8.1 Metode Stimulasi Panas

Rangsangan panas dapat dihasilkan dengan memaparkan benda panas pada kulit hewan, seperti pada metode *hot plate*, atau melalui penyinaran lampu pada kulit. Pada metode *hot plate*, hewan coba diamati waktu reaksinya setelah diletakkan di atas *hot plate*. Reaksi atau respon yang ditunjukkan oleh hewan coba antara lain memijat kaki, mengangkat kaki, menendang hingga meloncat keluar dari silinder (Domer, 1971).

2.8.2 Metode Stimulasi Listrik

Rangsangan listrik dihasilkan dengan menempelkan elektrode pada kulit atau menanamnya pada ganglia sensorik atau tempat-tempat tertentu dalam susunan saraf pusat. Metode ini memerlukan perlengkapan khusus yang rumit. Metode yang lain adalah metode pulpa gigi, tetapi hal ini sulit dilakukan karena memerlukan keterampilan yang tinggi (Domer, 1971).

2.8.3 Metode Stimulasi Tekanan

Tekanan diberikan pada ekor tikus menggunakan alat *syringe* yang merupakan suatu rangkaian tertutup yang terdiri dari suatu minyak mineral yang dihubungkan melalui pipa T dengan *syringe* lain. Peningkatan besar tekanan akan menyebabkan tikus berontak berusaha melepaskan diri atau mencicit. Hasil percobaan ini akan bernilai kualitatif saja dan tidak dapat diulang-ulang karena ekor tikus menjadi cedera akibat penekanan sehingga mempengaruhi hasil percobaan selanjutnya (Domer, 1971).

2.8.4 Metode Stimulasi Kimiawi

Stimulasi kimiawi yang diterapkan pada hewan coba yaitu *Mus musculus* ini pertama kali diperkenalkan oleh Siegmund dan kawan-kawan dengan menggunakan fenilkinon 0,02% sebanyak 0,25 ml. Nickander dan kawan-kawan berhasil menggunakan larutan asetat 0,6% sebanyak 10 ml/kg BB yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Bahan kimia lain yang digunakan sebagai bahan penginduksi nyeri yaitu bradikinin, larutan KCl 2% dan histamin (Turner, 1965).

Rangsangan kimiawi dilakukan dengan memberikan senyawa kimia tertentu yang dapat menimbulkan rasa nyeri (penginduksi nyeri). Respon nyeri yang timbul setelah suntikan secara intraperitoneal senyawa penginduksi ini adalah konstiksi dan pemanjangan yang menjalar ke dinding sepanjang perut, yang tampak sebagai gerakan menggeliat (*writhing test*). Siegmund dan kawan-kawan (1957) menyebut gerakan ini dengan istilah respon "konstiksi abdominal" (Diyah dkk., 2002).

Untuk uji aktivitas analgesik digunakan metode *Writhing test* yang menggunakan zat kimia yaitu asam asetat sebagai penginduksi nyeri pada hewan coba mencit (Domer, 1971). Metode ini dapat menguji aktivitas analgesik karena nyeri yang ditimbulkan oleh senyawa kimia yang digunakan melibatkan mediator inflamasi. Selain itu, metode ini sederhana, mudah pelaksanaan dan pengamatannya (Turner, 1965).

Pada metode ini aktivitas analgesik ditentukan dengan mengamati frekuensi konstiksi abdominal pada kelompok hewan yang diberi senyawa uji

dibandingkan dengan frekuensi konstiksi abdominal pada kelompok yang tidak diberi senyawa uji (kontrol). Frekuensi konstiksi yang terjadi selama periode waktu tertentu menunjukkan derajat nyeri yang dirasakan hewan coba. Penurunan frekuensi konstiksi abdominal karena adanya senyawa analgesik yang menggambarkan kemampuan senyawa meningkatkan “ambang nyeri” (Diyah dkk., 2002).

2.9 Tinjauan tentang Penentuan ED_{50}

Variasi biologis dalam aktivitas obat merupakan alasan penting mengapa pengobatan individu harus individualistik dan perlu diatur sesuai kebutuhan individu pasien. Hal ini juga menjelaskan bahwa tidak ada generalisasi tentang keefektifan dan keamanan obat yang dapat disimpulkan atas dasar uji coba klinik dengan sejumlah sampel yang kecil (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

Ada tiga tipe pengukuran kuantitatif pada efek obat terhadap hewan coba, yaitu efek individu, efek bertingkat dan efek kuantal. Pengukuran efek individu yaitu dengan mengukur dosis efektif individu terhadap hewan coba. Pada efek bertingkat dilakukan dengan mengukur efek obat terhadap tiap-tiap hewan coba dalam satu kelompok uji dengan dosis yang bervariasi. Sedangkan efek kuantal yaitu mengukur respon “semua atau tidak” (*all or none* = respons kuantal) dari suatu kelompok hewan coba, dengan menentukan persen respon. Pada efek kuantal, pengamatan hanyalah mengenai masalah terjadi atau tidak terjadinya efek pada tiap hewan coba, seperti hewan yang mati atau menunjukkan gejala respon tertentu (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

ED_{50} efek bertingkat adalah dosis efektif yang menghasilkan efek 50%. Nilai ED_{50} ini diperoleh dengan mengukur efek obat pada dosis yang bervariasi. Dosis yang digunakan pada umumnya merupakan kelipatan dua, misalnya 50, 100, 200 mg/kg BB dan seterusnya (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

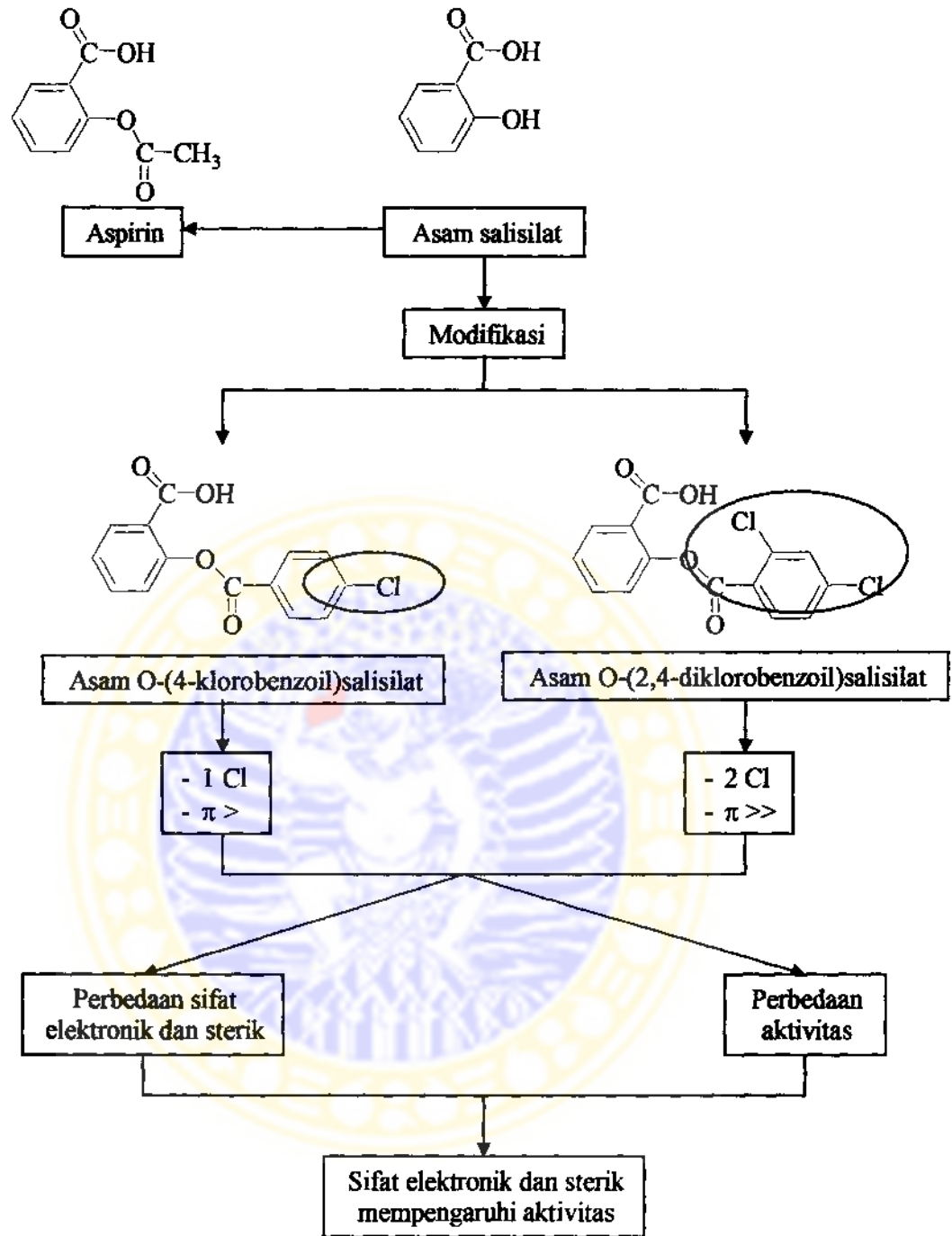
ED_{50} aktivitas analgesik adalah dosis yang menghasilkan efek hambatan nyeri sebesar 50% berdasarkan kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri. Nilai ED_{50} dapat dihitung dengan menggunakan kurva hubungan dosis-efek yang diperoleh dari analisis regresi antara dosis sebagai variabel bebas (x) dan % hambatan nyeri sebagai variabel tergantung (y).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Telah disintesis suatu senyawa dengan memasukkan gugus kloro yang mempunyai nilai $\pi(+)$ cukup besar yaitu 0,70 sehingga dapat meningkatkan lipofilisitas senyawa. Senyawa hasil sintesis yaitu asam *O*-(4-klorobenzoil) salisilat merupakan analog aspirin yang dibuat dengan mensubstitusi gugus 4-kloro benzoil pada atom hidrogen gugus fenolat asam salisilat. Senyawa lainnya yaitu asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat yang memiliki 2 kloro pada gugus benzoil mempunyai nilai $\pi(+)$ yang lebih besar yaitu 1,42. Dengan adanya 2 gugus kloro maka lipofilisitas senyawa meningkat dan aktivitasnya akan meningkat jika sifat lipofilik berpengaruh pada aktivitas.

Pada hasil penelitian sebelumnya, diketahui bahwa aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat hampir sama. Berdasarkan hal tersebut, ada sifat kimia fisika lain yang berpengaruh terhadap aktivitas selain sifat lipofilik, yaitu elektronik dan sterik. Oleh karena itu, akan ditentukan sifat elektronik sebagai nilai pKa dan sterik sebagai nilai refraksi molar (R_M) serta aktivitas analgesik kedua senyawa tersebut. Aktivitas kedua senyawa diukur dalam bentuk ED_{50} sebagai ukuran baku aktivitas biologis.



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan yaitu :

- a). Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat (Laboratorium Kimia Medisinal)
- b). Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat (Laboratorium Kimia Medisinal)
- c). Asam asetat glasial p.a (E.Merck)
- d). Asam sitrat p.a (Riedel-de Haen)
- e). HCl pekat p.a (E.Merck)
- f). KCl p.a (E.Merck)
- g). NaOH p.a (E.Merck)
- h). Etanol p.a (E.Merck)
- i). Na_2HPO_4 p.a (E.Merck)
- j). Aseton teknis (Riedel-de Haen)
- k). Aseton p.a (E.Merck)
- l). Natrium karboksimetilselulosa (Sigma)
- m). Air suling (aquadest)
- n). Aqua pro injeksi
- o). Kapas steril

4.1.2 Hewan Coba

Dalam penelitian ini digunakan mencit *Mus musculus* galur BLAB/C, jantan, dewasa, berumur 2-3 bulan, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh, berat antara 20-30 gram (Pusvetma, Surabaya). Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasikan dengan lingkungan percobaan selama seminggu dengan diberi minum dan pakan standar.

4.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan yaitu :

- a). Alat-alat gelas
- b). Refraktometer ABBE
- c). Spektrofotometer UV-Vis *double beam* Perkin Elmer lambda EZ 201
- d). Piknometer
- e). pH meter Schott Instrumen
- f). Neraca analitik Adventurer Ohaus
- g). Timbangan mencit AND

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Penentuan Parameter pKa

4.3.1.1 Pembuatan Larutan Dapar

- a). Pembuatan Larutan pH 1 (Weast, 1985) :
Diambil 25 mL 0,2 M KCl, ditambahkan 67 mL 0,2 M HCl dan ditambah air suling ad 100,0 mL.
- b). Pembuatan Larutan pH 4,4 (Dean, 1972) :
Diambil 44,10 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditambahkan 55,90 mL 0,1 M asam sitrat.
- c). Pembuatan Larutan pH 4,6 (Dean, 1972) :
Diambil 46,75 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditambahkan 53,25 mL 0,1 M asam sitrat.
- d). Pembuatan Larutan pH 4,8 (Dean, 1972) :
Diambil 49,30 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditambahkan 50,70 mL 0,1 M asam sitrat.
- e). Pembuatan Larutan pH 5 (Dean, 1972) :
Diambil 51,50 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditambahkan 48,50 mL 0,1 M asam sitrat.
- f). Pembuatan Larutan pH 5,2 (Dean, 1972) :
Diambil 53,60 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan ditambahkan 46,40 mL 0,1 M asam sitrat.

g). Pembuatan Larutan pH 12 (Weast, 1985) :

Diambil 25 mL 0,2 M KCl, ditambahkan 6 mL 0,2 M NaOH dan ditambah air suling ad 100,0 mL.

4.3.1.2 Pembuatan Larutan Uji Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Ditimbang dengan seksama 50 mg asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat, dilarutkan dalam 30 mL etanol. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100,0 mL dan ditambahkan aquadest hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan induk 500 mg/L.

Dari larutan induk, dibuat beberapa larutan uji pada berbagai pH dengan cara sebagai berikut :

- a). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 1 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.
- b). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 4,4 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.
- c). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 4,6 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.
- d). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 4,8 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.
- e). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 5 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.
- f). Dipipet 0,5 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 12 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 10 mg/L.

4.3.1.3 Pembuatan Larutan Uji Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Ditimbang dengan seksama 50 mg asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat, dilarutkan dalam 70 mL etanol. Kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100,0 mL dan ditambahkan aquadest hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan induk 500 mg/L. Larutan dapar dibuat dengan mencampur larutan dapar pH tertentu dengan etanol absolut (1:1), kemudian diatur hingga pH yang diinginkan.

Dari larutan induk, dibuat beberapa larutan uji pada berbagai pH dengan cara sebagai berikut :

- a). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 1 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.
- b). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 4,6 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.
- c). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 4,8 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.
- d). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 5 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.
- e). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 5,2 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.
- f). Dipipet 2,0 mL larutan induk, dimasukkan labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar pH 12 hingga tepat tanda. Diperoleh kadar larutan uji 40 mg/L.

4.3.1.4 Penentuan Panjang Gelombang Analitik

Masing-masing larutan uji pH 1 dari kedua senyawa diamati serapannya pada panjang gelombang antara 200–400 nm dengan spektrofotometer terhadap blanko larutan dapar pH 1, disimpan dan direkam spektrumnya. Dengan cara yang sama, diukur larutan uji pH 12 dari masing-masing senyawa terhadap blanko

larutan dapar pH 12 sehingga diperoleh spektra dari larutan pH 1 dan pH 12. Dari kedua spektra masing-masing senyawa tersebut, dipilih panjang gelombang yang mempunyai perbedaan serapan terbesar.

4.3.1.5 Penentuan pKa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Larutan uji pH 4,4 diukur serapannya pada panjang gelombang analitik dengan spektrofotometer terhadap blanko larutan dapar pH 4,4. Dengan cara yang sama, diukur 3 larutan pH lainnya terhadap blanko larutan dapar pH yang sesuai sehingga diperoleh data absorban (a_{obs}) pada 4 macam larutan senyawa uji pada pH 4,4; 4,6; 4,8 dan 5. Larutan uji pH 1 dan 12 diukur serapannya dengan cara yang sama terhadap blanko larutan dapar pH yang sesuai sehingga diperoleh data absorban pada pH 1 (a_{HA}) dan pH 12 (a_A). Nilai pKa dihitung dengan persamaan (3) atau (4).

4.3.1.6 Penentuan pKa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Larutan uji pH 4,6 diukur serapannya pada panjang gelombang analitik dengan spektrofotometer terhadap blanko larutan dapar pH 4,6. Dengan cara yang sama, diukur 3 larutan pH lainnya terhadap blanko larutan dapar pH yang sesuai sehingga diperoleh data absorban (a_{obs}) pada 4 macam larutan senyawa uji pada pH 4,6; 4,8; 5 dan 5,2. Larutan uji pH 1 dan 12 diukur serapannya dengan cara yang sama terhadap blanko larutan dapar pH yang sesuai sehingga diperoleh data absorban pada pH 1 (a_{HA}) dan pH 12 (a_A). Nilai pKa dihitung dengan persamaan (3) atau (4).

4.3.2 Penentuan Parameter Refraksi Molar (R_M)

4.3.2.1 Pembuatan Larutan Senyawa Uji

Ditimbang senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat masing-masing 250 mg, dilarutkan dalam 30,0 mL aseton.

4.3.2.2 Penentuan Densitas dan Indeks Bias Aseton

Sejumlah tertentu aseton ditentukan densitas dan indeks biasnya. Nilai densitas dan indeks bias digunakan untuk menentukan refraksi molar solven (R_1) dengan menggunakan persamaan (5).

4.3.2.3 Penentuan Refraksi Molar Larutan Senyawa Uji

Sejumlah tertentu larutan senyawa uji ditentukan densitas dan indeks biasnya. Data indeks bias dan densitas digunakan untuk menghitung refraksi molar larutan (R_{12}) dengan menggunakan persamaan (6).

4.3.2.4 Penentuan Refraksi Molar Senyawa Uji

Refraksi molar senyawa uji (R_2) dihitung berdasarkan data dari R_1 dan R_{12} dengan menggunakan persamaan (7).

4.3.3 Uji Aktivitas Analgesik

Aktivitas analgesik ditentukan dengan metode penghambatan nyeri terinduksi secara kimiawi (*Writhing test*). Sebagai penginduksi nyeri digunakan larutan asam asetat 0,6%.

4.3.3.1 Persiapan Hewan Coba

Sejumlah mencit berbobot 20-30 gram dibagi dalam beberapa kelompok yaitu 3 kelompok dosis dan kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 6 ekor. Sebelum perlakuan, mencit dipuasakan semalam dengan hanya diberi minum. Mencit dalam kelompok dosis diberi senyawa uji dosis tertentu (75, 150, 300 mg/kg BB), sedangkan dalam kelompok kontrol tidak diberi senyawa uji, hanya diberi larutan CMC Na 0,5%.

4.3.3.2 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6%

Sejumlah 0,6 mL asam asetat glasial diencerkan dengan aqua pro injeksi hingga diperoleh volume 100 mL.

4.3.3.3 Pembuatan Sediaan Uji

Sediaan uji yang dibuat meliputi suspensi asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Suspensi sediaan uji harus dibuat segera sebelum uji aktivitas dilakukan dan tidak dapat disimpan untuk digunakan di waktu lain.

a). Untuk dosis 75, 150 dan 300 mg/kg BB, senyawa uji yang diperlukan untuk mencit dengan berat 30 gram adalah :

- Dosis 75 mg/kg BB

$$\text{Senyawa uji} = 75 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ g}}{1000} = 2,25 \text{ mg (dalam 0,5 mL)}$$

- Dosis 150 mg/kg BB

$$\text{Senyawa uji} = 150 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ g}}{1000} = 4,5 \text{ mg (dalam 0,5 mL)}$$

- Dosis 300 mg/kg BB

$$\text{Senyawa uji} = 300 \text{ mg} \times \frac{30 \text{ g}}{1000} = 9 \text{ mg (dalam 0,5 mL)}$$

b). Untuk membuat sediaan 25 mL, maka senyawa uji yang ditimbang untuk dosis 75, 150 dan 300 mg/kg BB berturut-turut adalah 112,5; 225 dan 450 mg.

c). Sebanyak 125 mg CMC Na ditaburkan di atas air panas 7,5 mL dan dibiarkan hingga mengembang selama 5 menit, kemudian digerus sampai terbentuk musilago. Senyawa uji ditimbang, digerus dan dicampur merata dengan musilago CMC Na, kemudian ditambah aqua pro injeksi hingga volume 25 mL.

Sesuai prosedur tersebut, 1 mL sediaan uji masing-masing mengandung 4,5 mg; 9 mg dan 18 mg.

4.3.3.4 Pemberian Sediaan Uji

Untuk setiap dosis (75, 150 dan 300 mg/kg BB) berdasarkan berat badan mencit, akan diberi suspensi sejumlah volume tertentu sedemikian sehingga jumlah senyawa obat yang diberikan sesuai dengan yang ditetapkan untuk masing-masing dosis.

Untuk mencit dengan berat 30 g, senyawa uji yang harus diinjeksikan adalah 0,5 mL.

Jika mencit bobotnya kurang dari 30 gram, maka volume yang harus diinjeksikan adalah = $\frac{\text{berat badan (g)}}{30 \text{ g}} \times 0,5 \text{ mL}$.

4.3.3.5 Pelaksanaan Uji Aktivitas

Ditimbang masing-masing 6 mencit tiap kelompok dengan bobot tertentu dan diberi nomor. Untuk kelompok dosis, mencit diberi suspensi senyawa uji sesuai bobot badan secara intra peritoneal (i.p.). Sedangkan kelompok kontrol diberi larutan CMC Na 0,5% dengan rute yang sama. Dua puluh (20) menit setelah pemberian sediaan, mencit yang sama disuntik dengan larutan asam asetat 0,6% sejumlah 0,01 mL/g BB secara intra peritoneal. Lima (5) menit setelah penyuntikan asam asetat 0,6%, diamati respon nyeri dari mencit berupa frekuensi geliat secara 30 menit.

4.4 Analisis Data

4.4.1 Penentuan % Hambatan Nyeri

Data yang diperoleh dari pengamatan geliat selama 30 menit ditulis dalam tabel.

Tabel frekuensi geliat :

No. mencit	Frekuensi Geliat						
	Senyawa 1			Senyawa 2			Kontrol
	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
Rata2							
SD							

Keterangan :	senyawa 1	= asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat
	Senyawa 2	= asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat
	Dosis 1	= 75 mg/kg BB
	Dosis 2	= 150 mg/kg BB
	Dosis 3	= 300 mg/kg BB
	Kontrol	= larutan CMC-Na 0,5%

Berdasarkan data yang diperoleh, untuk melihat adanya data yang bermakna antar dosis senyawa uji, maka data dianalisis menggunakan ANOVA.

Aktivitas hambatan nyeri senyawa uji dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \left(\frac{f_K - f_T}{f_K} \right) \times 100$$

Keterangan : f_T = rata-rata jumlah geliat pada kelompok dosis

f_K = rata-rata jumlah geliat pada kelompok kontrol

4.4.2 Penentuan ED_{50}

Aktivitas analgesik untuk tiap senyawa dinyatakan dalam ED_{50} . ED_{50} aktivitas analgesik adalah dosis yang menghasilkan hambatan nyeri sebesar 50% pada kurva hubungan antara log dosis dan % hambatan nyeri. Kurva tersebut diperoleh dari analisis regresi log dosis sebagai sumbu x yang merupakan variabel bebas dan % hambatan nyeri sebagai sumbu y yang merupakan variabel tergantung.

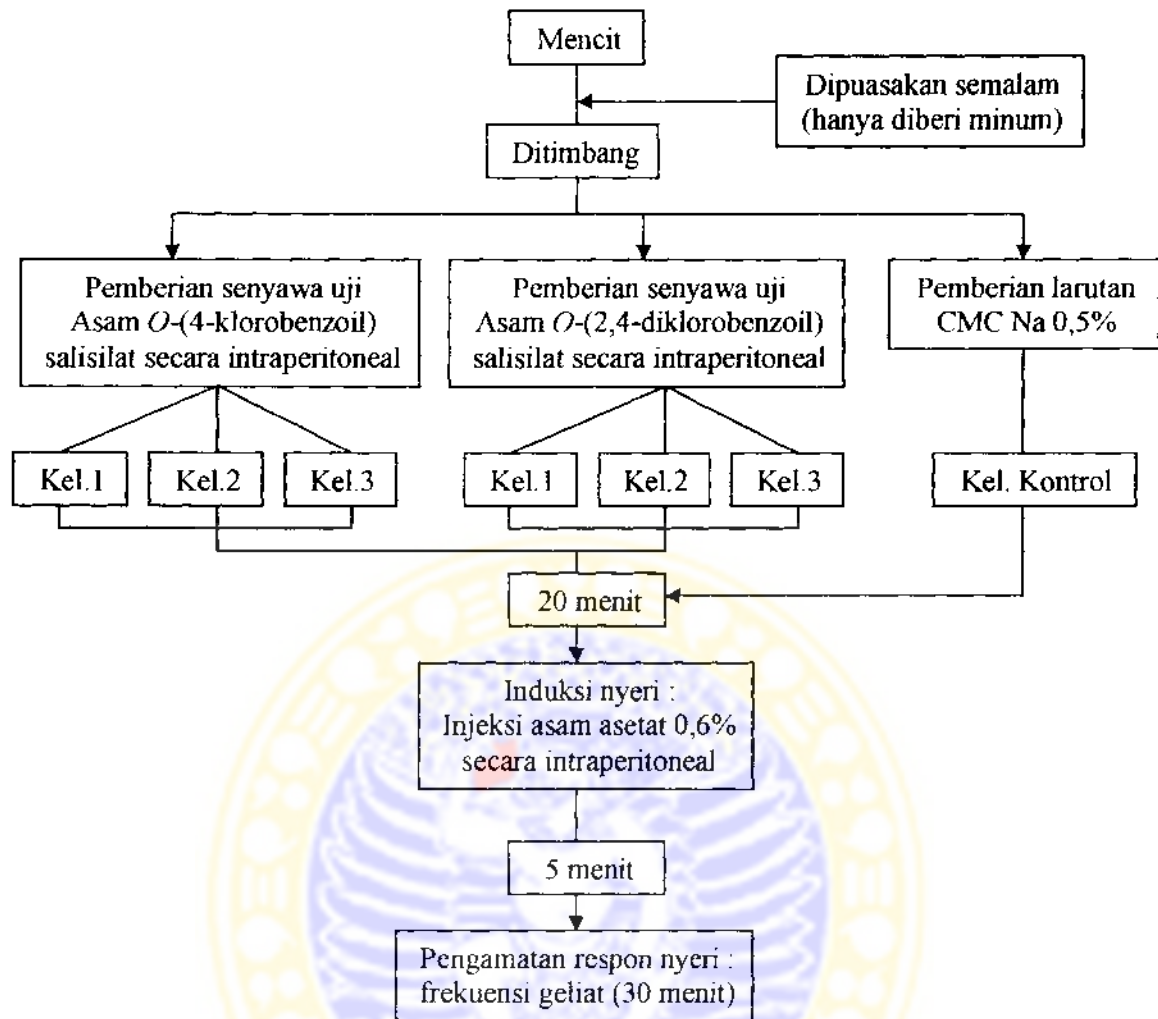
Persamaan regresi antara log dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) :

$$y = bx + a$$

ED_{50} dapat dihitung dengan rumus :

$$50 = b (\log ED_{50}) + a$$

$$ED_{50} = \text{antilog} \left(\frac{50 - a}{b} \right)$$



Gambar 4.1 Kerangka Uji Aktivitas Analgesik

Keterangan :

- Kelompok 1 : Kelompok mencit yang diberi dosis 75 mg/kg BB
- Kelompok 2 : Kelompok mencit yang diberi dosis 150 mg/kg BB
- Kelompok 3 : Kelompok mencit yang diberi dosis 300 mg/kg BB
- Kelompok kontrol : Kelompok mencit yang diberi larutan CMC Na 0,5%

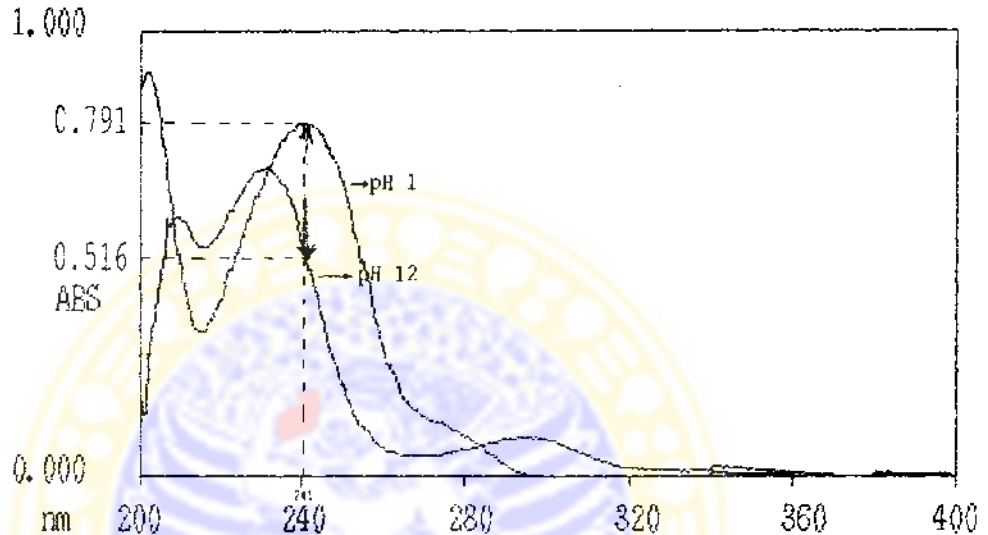
BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Penentuan pKa Senyawa

5.1.1 Penentuan pKa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

5.1.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Analitik



Gambar 5.1 Spektra Larutan Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat pada pH 1 dan pH 12

Tabel V.1 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Analitik Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Panjang gelombang (nm)	Absorban (a)		
	a_{HA}	a_{A^-}	$\Delta a (a_{HA} - a_{A^-})$
240	0,788	0,530	0,258
240,5	0,791	0,516	0,275
241*	0,792	0,490	0,302

* = λ analitik

a_{HA} = absorban pada pH 1

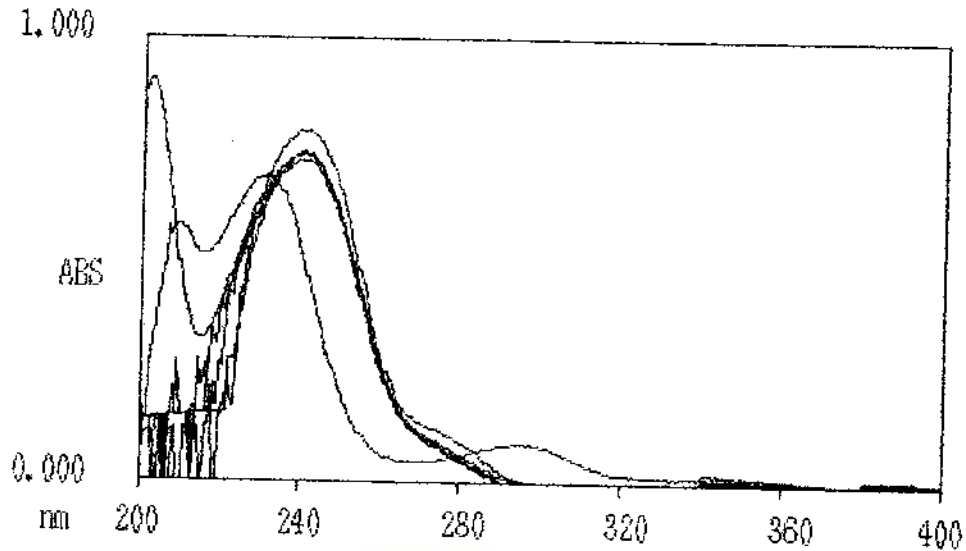
a_{A^-} = absorban pada pH 12

Berdasarkan gambar 5.1 dan tabel V.1. panjang gelombang (λ) analitik asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat adalah 241 nm.

5.1.1.2 Penentuan Nilai pKa

Tabel V.2 Penentuan pKa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Replikasi I					
Kadar = 10,66 mg/L					
λ analitik = 241 nm					
a_{HA} = 0,792					
a_{A^-} = 0,490					
1	2	3	4	5	6
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5
4,40	0,743	0,253	0,049	0,71	5,11
4,61	0,738	0,248	0,054	0,66	5,27
4,80	0,730	0,240	0,062	0,59	5,39
5,00	0,725	0,235	0,067	0,54	5,54
Nilai pKa					5,33 ± 0,18
Replikasi II					
Kadar = 10,26 mg/L					
a_{HA} = 0,741					
a_{A^-} = 0,445					
1	2	3	4	5	6
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5
4,41	0,704	0,259	0,037	0,85	5,26
4,61	0,687	0,242	0,054	0,65	5,26
4,80	0,683	0,238	0,058	0,61	5,41
5,00	0,673	0,228	0,068	0,53	5,53
Nilai pKa					5,37 ± 0,13
Replikasi III					
Kadar = 10,54 mg/L					
a_{HA} = 0,911					
a_{A^-} = 0,514					
1	2	3	4	5	6
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5
4,41	0,848	0,334	0,063	0,72	5,13
4,60	0,817	0,303	0,094	0,51	5,11
4,80	0,809	0,295	0,102	0,46	5,26
5,00	0,806	0,292	0,105	0,44	5,44
Nilai pKa					5,24 ± 0,15

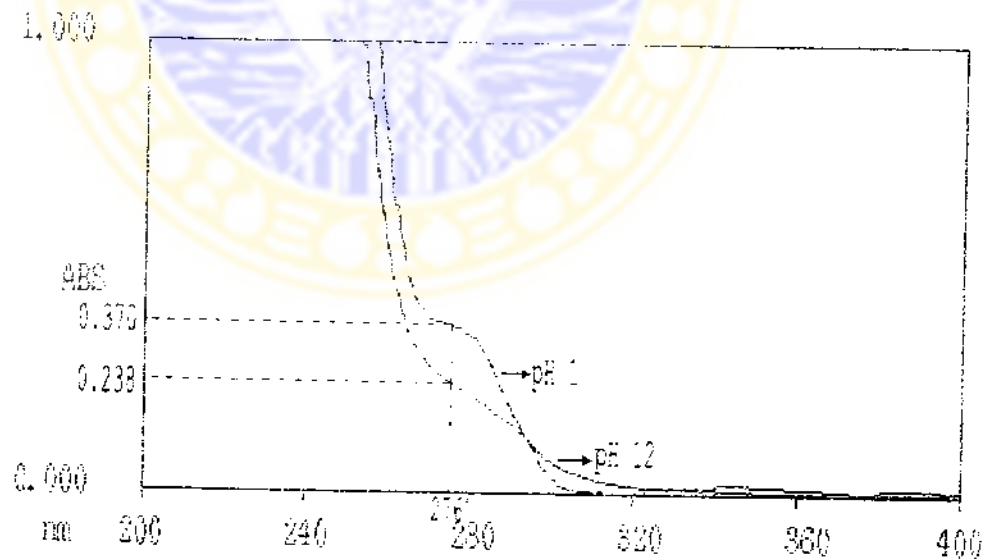


Gambar 5.2 Spektra Larutan Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat pada berbagai pH (4,4; 4,6; 4,8; 5)

Berdasarkan tabel V.2, maka harga pKa rata-rata asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat = $5,31 \pm 0,07$.

5.1.2 Penentuan pKa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

5.1.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Analitik



Gambar 5.3 Spektra Larutan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada pH 1 dan pH 12

Tabel V.3 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Analitik Asam *O*-(2,4-dikloro benzoil)salisilat

Panjang gelombang (nm)	Absorban (a)		
	a_{HA}	a_{A^-}	$\Delta a (a_{HA} - a_{A^-})$
275,5	0,371	0,242	0,129
276*	0,370	0,238	0,132
276,5	0,370	0,238	0,132

* - λ analitik a_{HA} = absorban pada pH 1 a_{A^-} = absorban pada pH 12

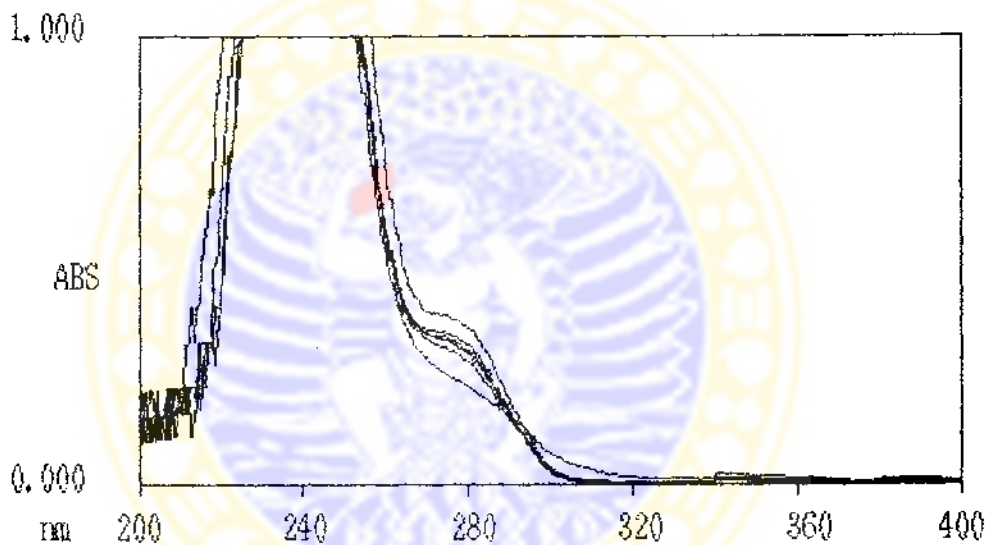
Berdasarkan gambar 5.3 dan tabel V.3, panjang gelombang (λ) analitik asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat adalah 276 nm.

5.1.2.2 Penentuan Nilai pKa

Tabel V.4 Penentuan pKa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Replikasi I						
Kadar = 40,08 mg/L						
λ analitik = 276 nm						
a_{HA} = 0,370						
a_{A^-} = 0,238						
1	2	3	4	5	6	
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5	
4,60	0,332	0,094	0,038	0,39	4,99	
4,81	0,319	0,081	0,051	0,20	5,01	
5,01	0,315	0,077	0,055	0,15	5,16	
5,20	0,297	0,059	0,073	-0,09	5,11	
Nilai pKa					5,07 ± 0,08	
Replikasi II						
Kadar = 40,40 mg/L						
a_{HA} = 0,332						
a_{A^-} = 0,182						
1	2	3	4	5	6	
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5	
4,61	0,288	0,106	0,044	0,38	4,99	
4,81	0,277	0,095	0,055	0,24	5,05	
5,01	0,263	0,081	0,069	0,07	5,08	
5,20	0,250	0,068	0,082	-0,08	5,12	
Nilai pKa					5,06 ± 0,05	

Replikasi III					
Kadar = 42,16 mg/L					
a_{HA} = 0,403					
a_{A^-} = 0,245					
1	2	3	4	5	6
pH	a_{obs}	$a_{obs} - a_{A^-}$	$a_{HA^-} - a_{obs}$	$\log \frac{a_{obs} - a_{A^-}}{a_{HA^-} - a_{obs}}$	pKa = pH + kolom 5
4,62	0,343	0,098	0,060	0,21	4,83
4,82	0,333	0,088	0,070	0,10	4,92
5,02	0,322	0,077	0,081	-0,12	5,00
5,21	0,316	0,071	0,087	-0,09	5,12
Nilai pKa					4,97 ± 0,12



Gambar 5.4 Spektra Larutan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada berbagai pH (4,6; 4,8; 5; 5,2)

Berdasarkan tabel V.4, maka harga pKa rata-rata asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat = $5,03 \pm 0,06$.

Hasil di atas menunjukkan bahwa harga pKa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat hampir sama sehingga asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat memiliki keasaman hampir sama.

5.2 Penentuan Refraksi Molar (R_M)

5.2.1 Penentuan Refraksi Molar Aseton

Untuk menentukan nilai Refraksi Molar aseton (R_1) perlu ditetapkan nilai densitas dan indeks biasnya pada suhu 30° C. Hasil penentuan indeks bias, densitas dan R_M aseton dapat dilihat pada tabel V.5 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 1.

Tabel V.5 Penentuan R_M Aseton pada suhu 30° C

No.	Densitas (g/cc)	Indeks bias	R_M aseton (cc/mol)
1	0,7780	1,3560	16,31
2	0,7792	1,3560	16,29
3	0,7785	1,3560	16,30
R_M aseton rata-rata			16,30 ± 0,01

5.2.2 Penentuan Refraksi Molar Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Nilai Refraksi Molar (R_M) asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat ditentukan berdasarkan nilai R_M larutan zat dalam aseton (R_{12}) dan nilai R_M aseton (R_1). Hasil penentuan indeks bias, densitas dan R_M asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dapat dilihat pada tabel V.6 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 2.

Tabel V.6 Penentuan R_M Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat pada suhu 30° C

No.	Massa zat (g)	Fraksi mol zat	Fraksi mol aseton	Densitas larutan (g/cc)	Indeks bias larutan	R_M larutan (cc/mol)	R_M zat (cc/mol)
1	0,2503	0,002	0,998	0,7789	1,3572	16,46	96,30
2	0,2509	0,002	0,998	0,7791	1,3572	16,46	96,30
3	0,2519	0,002	0,998	0,7796	1,3574	16,46	96,30
R_M zat rata-rata							96,30±0,00

Berdasarkan tabel V.6, maka harga R_M rata-rata asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat = 96,30±0,00 cc/mol.

5.2.3 Penentuan Refraksi Molar Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Nilai Refraksi Molar (R_M) asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat ditentukan berdasarkan nilai R_M larutan zat dalam aseton (R_{12}) dan nilai R_M aseton (R_1). Hasil penentuan indeks bias, densitas dan R_M asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dapat dilihat pada tabel V.7 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 3.

Tabel V.7 Penentuan R_M Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat pada suhu 30° C

No.	Massa zat (g)	Fraksi mol zat	Fraksi mol aseton	Densitas larutan (g/cc)	Indeks bias larutan	R_M larutan (cc/mol)	R_M zat (cc/mol)
1	0,2519	0,002	0,998	0,7806	1,3579	16,48	106,30
2	0,2548	0,002	0,998	0,7803	1,3578	16,48	106,30
3	0,2509	0,002	0,998	0,7800	1,3578	16,49	111,30
R_M zat rata-rata							107,97±2,89

Berdasarkan tabel V.7, maka harga R_M rata-rata asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat = $107,97 \pm 2,89$ cc/mol.

Hasil di atas menunjukkan bahwa harga refraksi molar (R_M) asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat lebih kecil daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat sehingga ukuran volume senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat lebih besar.

5.3 Uji Aktivitas Analgesik

Aktivitas analgesik senyawa uji ditentukan dengan cara mengukur kemampuannya dalam menekan atau menghilangkan rasa nyeri yang diinduksi secara kimia, yaitu dengan mengamati frekuensi geliat selama 30 menit setelah dilakukan induksi larutan asam asetat 0,6% sejumlah 0,01 ml/g BB secara intra peritoneal pada mencit yang telah diberi senyawa uji, dibandingkan dengan mencit yang tidak diberi senyawa uji (kontrol). Kemudian dihitung persentase hambatan nyeri.

5.3.1 Penentuan Frekuensi Geliat

Hasil pengamatan frekuensi geliat pada kelompok mencit yang telah diberi senyawa uji dosis 75, 150, 300 mg/kg BB dapat dilihat pada tabel V.8 dan V.9.

Tabel V.8 Frekuensi Geliat pada Kelompok Dosis Senyawa Uji Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan Kelompok Kontrol

No.	Frekuensi geliat pada tiap kelompok dosis			
	75 mg/kg BB	150 mg/kg BB	300 mg/kg BB	Kontrol
1	32	22	10	45
2	33	24	11	47
3	35	25	12	49
4	36	26	13	50
5	36	27	15	52
6	38	28	15	53
Rata2	35,00	25,33	12,67	49,33
SD	2,19	2,16	2,07	3,01

Tabel V.9 Frekuensi Geliat pada Kelompok Dosis Senyawa Uji Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dan Kelompok Kontrol

No.	Frekuensi geliat pada tiap kelompok dosis			
	75 mg/kg BB	150 mg/kg BB	300 mg/kg BB	Kontrol
1	34	24	13	44
2	34	25	14	44
3	35	26	15	47
4	36	27	16	47
5	38	28	17	52
6	39	29	18	53
Rata2	36,00	26,50	15,50	47,83
SD	2,10	1,87	1,87	3,87

Dari tabel V.8 dan V.9, terlihat bahwa frekuensi geliat kelompok dosis senyawa uji selalu lebih kecil dibanding dengan kontrol dan semakin tinggi dosis asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat, frekuensi geliat makin berkurang. Untuk memastikan apakah ada perbedaan bermakna antara kelompok dosis dengan kelompok kontrol maka dilakukan ANOVA.

Hasil ANOVA antar kelompok pada senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat, asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dosis 75, 150, 300 mg/kg BB, dan kontrol menghasilkan harga $p=0,000$. Diketahui harga $p<0,05$ pada $\alpha=0,05$ berarti ada perbedaan bermakna frekuensi geliat di antara kelompok tersebut (lampiran 4). Hasil uji LSD menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok dosis untuk senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dengan kelompok kontrol masing-masing senyawa. Selain itu, juga terdapat perbedaan bermakna antar kelompok dosis senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan antar kelompok dosis asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Adanya penurunan frekuensi geliat pada kelompok dosis senyawa uji dibanding kelompok kontrol menunjukkan bahwa senyawa uji mempunyai kemampuan menghambat nyeri sehingga dihitung % hambatan nyeri.

5.3.2 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri

Berdasarkan data frekuensi geliat pada kelompok senyawa uji dosis 75, 150, 300 mg/kg BB dan kelompok kontrol, maka dihitung persentase hambatan nyeri yang hasilnya dapat dilihat pada tabel V.10 dan cara perhitungannya dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel V.10 Persentase Hambatan Nyeri Senyawa Uji Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Dosis (mg/kg BB)	% Hambatan Nyeri	
	Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat
75	29,05	24,73
150	48,65	44,60
300	74,32	67,59

Dari tabel V.10 dapat terlihat bahwa % hambatan nyeri kelompok dosis senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat lebih besar daripada kelompok dosis senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Selanjutnya, dilakukan perhitungan untuk menentukan ED_{50} aktivitas analgesik. Dari tabel V.10 dapat dibuat kurva hubungan antara log dosis dengan % hambatan nyeri.

5.3.3 Penentuan ED₅₀

Berdasarkan data log dosis sebagai sumbu x dengan % hambatan nyeri sebagai sumbu y, dapat diperoleh persamaan regresi yang dihitung dengan bantuan program SPSS (lampiran 7 dan 8) dengan hasil sebagai berikut :

- a. Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

$$y = 75,450 x - 113,808$$

$$(n = 3 ; r \text{ hitung} = 0,997 ; P = 0,049 ; r \text{ tabel}_{(0,05)} = 0,950)$$

- b. Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

$$y = 71,433 x - 110,085$$

$$(n = 3 ; r \text{ hitung} = 0,999 ; P = 0,027 ; r \text{ tabel}_{(0,05)} = 0,950)$$

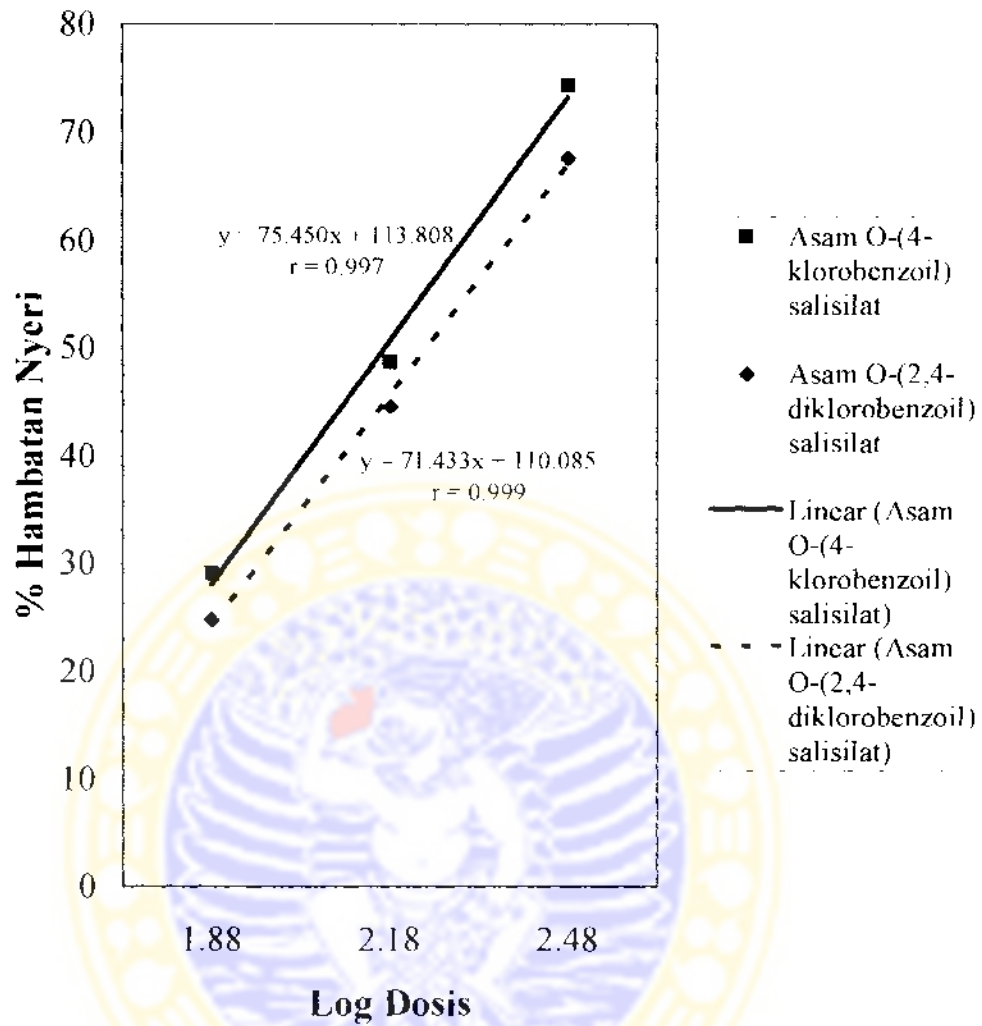
Persamaan-persamaan tersebut mempunyai r hitung lebih besar dari r tabel dan $P < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan ada hubungan linier antara log dosis dengan % hambatan nyeri. Selanjutnya persamaan tersebut digunakan untuk menghitung ED₅₀ aktivitas analgesik.

Hasil penentuan ED₅₀ aktivitas analgesik dengan metode *writhing test* dapat dilihat pada tabel V.11. Cara perhitungan ED₅₀ masing-masing senyawa uji dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel V.11 ED₅₀ Aktivitas Analgesik Senyawa Uji Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Senyawa	ED ₅₀
Asam <i>O</i> -(4-klorobenzoil)salisilat	148,25 mg/kg BB
Asam <i>O</i> -(2,4-diklorobenzoil)salisilat	174,18 mg/kg BB

Berdasarkan hasil ED₅₀ aktivitas analgesik diketahui bahwa senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik lebih tinggi daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.



Gambar 5.5 Kurva Hubungan antara Log Dosis Senyawa Asam O-(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam O-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dengan % Hambatan Nyeri

BAB VI

PEMBAHASAN

Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat adalah senyawa analog aspirin hasil sintesis yang atom hidrogen gugus fenolatnya digantikan dengan gugus benzoil tersubstitusi. Gugus Cl memiliki nilai $\pi(+)$ sebesar 0,70 yang dapat meningkatkan lipofilisitas senyawa. Dibanding asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat, asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat memiliki 2 kloro dengan nilai $\pi(+)$ lebih besar yaitu 1,42 sehingga lipofilitasnya meningkat dan ditinjau dari peran lipofilik dalam penembusan membran diperkirakan aktivitasnya lebih besar pula. Akan tetapi, pada hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa aktivitas analgesik kedua senyawa hampir sama. Aktivitas analgesik dinyatakan dalam persentase hambatan nyeri pada dosis 100 mg/kg BB yaitu untuk senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat sebesar 45,00%, sedangkan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat sebesar 44,82% (Diyah dkk., 2006). Dengan demikian perbedaan sifat lipofilik tidak mempengaruhi aktivitas kedua senyawa. Oleh karena itu perlu diteliti sifat kimia fisika yang berpengaruh terhadap aktivitas tersebut.

Pada penelitian ini ditentukan sifat elektronik dan sterik serta aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Kedua senyawa tersebut memiliki perbedaan pada gugus/substituen pada posisi cincin benzoil sehingga terdapat perbedaan pKa (sifat elektronik) dan R_M (sifat sterik). Dengan adanya perbedaan kedua sifat tersebut maka aktivitas analgesiknya berbeda. Aktivitas analgesik kedua senyawa ditentukan dalam bentuk ED_{50} yaitu ukuran baku aktivitas biologis.

pKa menggambarkan banyaknya senyawa yang terionisasi dalam larutan. Senyawa analgesik-antiinflamasi non steroid (AINS) memiliki gugus yang bersifat asam sehingga memiliki keasaman tertentu dengan pKa berkisar antara 3-6. Adanya Cl, F, atau atom halogen lainnya pada suatu senyawa sering dapat meningkatkan aktivitas. pKa menentukan reaktivitas suatu senyawa untuk dapat berinteraksi dengan reseptor (Shen, 1981). Pada penelitian ini pKa ditentukan dengan metode spektrofotometri. Metode ini tergantung pada penentuan secara

langsung rasio bentuk molekuler terhadap bentuk ionik dalam 1 seri larutan dapar yang pH-nya terukur. Hal yang pertama dilakukan adalah dengan membuat spektrum bentuk molekuler dan bentuk ionik. Spektrum bentuk molekuler diperoleh dengan mengukur serapan larutan senyawa dalam larutan dapar yang pH-nya diatur sehingga senyawa yang akan diamati seluruhnya berada dalam bentuk molekuler. Cara yang sama dilakukan untuk mendapat spektrum bentuk ionik. Sebelum membuat spektrum, dibuat larutan induk terlebih dahulu dengan kadar 500 mg/L, kemudian dibuat larutan uji pada berbagai pH dengan mengencerkan larutan induk dengan masing-masing larutan dapar yang pH-nya telah diukur. Pada penelitian ini, spektrum bentuk molekuler didapat dengan mengukur larutan senyawa dalam larutan dapar pH 1, dan spektrum bentuk ionik pada larutan dapar pH 12. Berdasarkan spektrum tersebut, dipilih panjang gelombang analitik yaitu panjang gelombang yang menghasilkan perbedaan serapan terbesar antara bentuk molekuler dan ionik. Dari spektrum panjang gelombang yang diperoleh antara 200-400 nm diketahui λ analitik asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat adalah 241 nm (tabel V.1) dan untuk asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat adalah 276 nm (tabel V.2).

Untuk menentukan nilai pKa senyawa, dilakukan pengukuran serapan larutan senyawa uji pada berbagai pH yang diamati pada λ analitik yang telah ditentukan. Larutan dapar yang digunakan untuk menentukan pKa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat adalah pH 4,4; 4,6; 4,8 dan 5. Sedangkan untuk senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat adalah pH 4,6; 4,8; 5 dan 5,2. Penentuan pKa kedua senyawa uji direplikasi 3 kali dan dari hasil perhitungan, diperoleh pKa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat sebesar 5,31 (tabel V.3) dan pKa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat sebesar 5,03 (tabel V.4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai pKa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat hampir sama sehingga dinyatakan bahwa kedua senyawa memiliki keasaman yang hampir sama.

Refraksi molar (R_M) adalah salah satu tetapan sterik dan merupakan ukuran volume molar yang menunjukkan besarnya suatu molekul senyawa. Efek dari sifat sterik berperan pada kedekatan kontak yang terjadi antara obat dengan sisi reseptor (Smith, 1988). R_M untuk zat padat ditentukan dengan cara melarutkan zat

terlebih dahulu dalam solven kemudian mengukur indeks bias dan densitas larutan pada suhu yang sama. Selain itu, indeks bias dan densitas solven juga harus diukur. Solven yang digunakan dalam penelitian ini adalah aseton dan pengukuran dilakukan pada suhu 30° C. Setelah mendapat data-data tersebut, dapat dihitung R_M solven (R_1) dan R_M larutan (R_{12}). Refraksi molar zat dalam larutan (R_2) dihitung dari harga R_1 dan R_{12} . Dari penelitian yang dilakukan, diperoleh R_M zat asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat adalah 96,30 cc/mol (tabel V.6) dan R_M asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat adalah 107,97 cc/mol (tabel V.7). Hasil tersebut menunjukkan bahwa harga R_M senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat lebih besar daripada asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat sehingga dinyatakan bahwa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat memiliki volume molar yang lebih besar.

Pada penelitian ini, uji aktivitas analgesik dilakukan dengan cara penghambatan nyeri akibat induksi kimia (*writhing test*). Sebagai induktor nyeri digunakan asam asetat yang diberikan pada mencit secara intraperitoneal. Aktivitas hambatan nyeri ditentukan dengan cara mengamati penurunan frekuensi geliat dengan adanya pemberian senyawa analgesik dibandingkan tanpa adanya senyawa tersebut (kontrol). Obat diberikan 20 menit sebelum induksi nyeri dengan tujuan agar pada saat diuji senyawa sudah terabsorpsi dan bekerja pada tempat kerjanya. Pengamatan dilakukan 30 menit setelah selang lima menit dari pemberian induksi asam asetat. Waktu lima menit ini menunjukkan mula kerja asam asetat dalam menimbulkan nyeri.

Pada tabel frekuensi geliat kelompok dosis senyawa uji asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan kelompok kontrol (tabel V.8) serta asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dan kelompok kontrol (tabel V.9) diketahui bahwa frekuensi geliat kelompok dosis selalu lebih kecil daripada kelompok kontrol dan semakin tinggi dosis senyawa uji, maka frekuensi geliat makin berkurang. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok dosis senyawa uji dengan kontrol antar kelompok dosis masing-masing senyawa uji, maka dilakukan ANOVA. Hasil perhitungan ANOVA (lampiran 4), diketahui nilai $p=0.000$ pada $\alpha=0.05$. Nilai $p<0.05$ menunjukkan bahwa ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok yang diuji. Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan bermakna, yaitu :

- antara kelompok dosis dengan kontrol untuk masing-masing senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat
- antar kelompok dosis untuk senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat
- antar kelompok dosis untuk senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Adanya perbedaan frekuensi geliat pada kelompok senyawa uji dibanding kelompok kontrol menunjukkan bahwa senyawa uji mempunyai kemampuan menghambat nyeri. Selanjutnya dapat dihitung persentase hambatan nyeri pada setiap kelompok dosis masing-masing senyawa uji.

Pada tabel V.8 dan tabel V.9 terlihat bahwa mulai dosis 75 mg/kg BB hingga 300 mg/kg BB, asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat menunjukkan frekuensi geliat lebih kecil daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Untuk mengetahui apakah ada perbedaan kemampuan menghambat nyeri (aktivitas analgesik) antara senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat maka dilakukan ANOVA terhadap persentase hambatan nyeri pada tiap kelompok dosis masing-masing senyawa. Hasil perhitungan ANOVA (lampiran 5), diketahui nilai $p=0,000$ pada $\alpha=0,05$. Nilai $p<0,05$ menunjukkan bahwa ada perbedaan persentase hambatan nyeri yang bermakna antara senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Pada tabel V.10 dapat dilihat bahwa pada rentang dosis tersebut, asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat memberikan persentase hambatan nyeri lebih besar daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Hal ini menunjukkan bahwa efek analgesik yang dimiliki asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat lebih besar daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Untuk mengetahui kuantitas aktivitas analgesik selanjutnya dilakukan penentuan ED_{50} aktivitas analgesik.

ED_{50} aktivitas analgesik dihitung berdasarkan dosis dan persentase hambatan nyeri pada tabel V.10 dengan menggunakan analisis regresi antara log dosis (variabel x) dengan % hambatan nyeri (variabel y) (lampiran 7 dan 8). Berdasarkan hasil penentuan ED_{50} aktivitas analgesik, asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat mempunyai ED_{50} sebesar 148,25 mg/kg dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat mempunyai ED_{50} sebesar 174,18 mg/kg. Dari hasil perhitungan ED_{50}

aktivitas analgesik tersebut diketahui bahwa senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik lebih tinggi daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.

Adanya perbedaan aktivitas dapat disebabkan oleh perbedaan kemampuan senyawa mencapai tempat aksi dan berinteraksi dengan reseptor. Berdasarkan hasil penentuan nilai pKa, R_M serta ED_{50} diketahui senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat yang aktivitas analgesiknya lebih tinggi mempunyai nilai pKa hampir sama dengan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dan nilai R_M lebih kecil daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat. Pada umumnya pKa senyawa analgesik-antiinflamasi non steroid berkisar antara 3-6 (Shen, 1981). Senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat memiliki nilai pKa yang memenuhi persyaratan sehingga keduanya memiliki aktivitas analgesik. Karena senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat memiliki keasaman hampir sama, maka yang menyebabkan perbedaan aktivitas kedua senyawa tersebut adalah R_M . Aktivitas analgesik asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat yang lebih kecil daripada asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dapat terjadi karena volume molarnya yang lebih besar. Kemungkinan volume senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat yang besar memberikan halangan sterik pada interaksi dengan reseptor. Bila ditinjau dari nilai log P senyawa yang sudah diketahui, asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat yang kurang lipofilik (log P=3,63) daripada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat (log P=4,19) mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar. Hal ini menunjukkan bahwa sifat lipofilik asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat sudah memenuhi persyaratan untuk menghasilkan aktivitas analgesik dan peningkatan sifat lipofilik pada asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat justru menurunkan aktivitas analgesiknya.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dipengaruhi oleh R_M (sifat sterik). Nilai R_M senyawa yang lebih besar akan menurunkan aktivitas analgesiknya.

Untuk mendapatkan aktivitas analgesik yang tinggi, sebaiknya dilakukan modifikasi senyawa dengan gugus/substituen yang dapat menghasilkan nilai pKa senyawa sekitar 5-6, R_M yang menggambarkan volume molar senyawa yang tidak lebih besar daripada asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan sifat lipofilik kurang dari asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Sifat elektronik (pKa) :

- pKa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat = $5,31 \pm 0,07$
- pKa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat = $5,03 \pm 0,06$

Sifat sterik (R_M) :

- R_M asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat = $96,30 \pm 0,00$ cc/mol
- R_M asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat = $107,97 \pm 2,89$ cc/mol

2. ED_{50} aktivitas analgesik :

- ED_{50} asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat = 148,25 mg/kg
- ED_{50} asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat = 174,18 mg/kg

3. Aktivitas analgesik senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat dipengaruhi oleh R_M (sifat sterik). Makin besar harga R_M senyawa, aktivitas analgesiknya menurun.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan disarankan bahwa untuk mendapatkan aktivitas analgesik yang tinggi, sebaiknya dilakukan modifikasi senyawa dengan gugus/substituen yang dapat menghasilkan nilai pKa senyawa sekitar 5-6, R_M yang menggambarkan volume molar senyawa yang tidak lebih besar daripada asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan sifat lipofilik kurang dari asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, A. and Serjeant, E.P., 1971. **Ionization Constants of Acid and Bases**. 2nd edition. Edinburgh: T&A Constable Ltd., pp. 44-50.
- Budavari, S. (Eds.), 2001. **The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals**, Thirteenth Edition, Whitehouse Station, New York: Merck & Co Inc.
- Connors, K.A., 1967. **A Textbook of Pharmaceutical Analysis**. New York: John Wiley & Sons Inc., pp. 168-171, 203-204.
- Dean, J.A. (Ed.), 1972. **Lange's Handbook of Chemistry**. Thirteenth Edition. New York: McGraw-Hill Book Company pp. 5-100 – 5-105.
- Diyah, N.W., 1998. Hubungan Struktur dan Aktivitas Antiinflamasi Turunan Asam Salisilat. **Tesis**. Yogyakarta: Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Diyah, N.W., Purwanto, B.T., dan Susilowati, R., 2002. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam *O*-(4-Butilbenzoil)Salisilat Hasil Sintesis pada Mencit. **Laporan Penelitian**. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Diyah, N.W., Soekardjo, B., Purwanto, Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., dan Susilowati R., 2006. Modifikasi Struktur dan Uji Aktivitas Analgesik Turunan Asam *O*-Asil Salisilat dalam rangka Memperoleh Senyawa Analgesik-Antiinflamasi yang Poten. **Laporan Penelitian**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Domer, F.R., 1971. **Animal Experiments in Pharmacological Analysis**. Springfield: Charles Thomas Publisher, pp. 275-314.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S., 1986. **Kimia Organik**. Edisi Ketiga. Jilid 2. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Foye, W.O., 1995. **Principles of Medicinal Chemistry**. Fourth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 545-548.
- Gringauz, A., 1997. **Introduction to Medicinal Chemistry, How Drugs Act and Why**. New York: Wiley-VCH, pp. 141-167.

- Maron, S.H. and Lando, J.B., 1974. **Fundamentals of Physical Chemistry**. New York: Macmillan Publishing Co. Inc., pp. 182-184.
- Martin, A., 1993. **Physical Pharmacy**. Fourth Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 169-170.
- Morrison, R.T. and Boyd, R.N., 1987. **Morrison and Boyd, Organic Chemistry**. Fifth Edition. Boston: Allyn and Bacon, Inc.
- Neal, M.J., 2002. **Medical Pharmacology at Glance**. Fourth Edition. Oxford: Blackwell Publishing Comp., p. 70.
- Shargel, L., 1988. **Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan**. Edisi Kedua. Surabaya: Airlangga University Press, hal 86-91.
- Shen, T.Y., 1981. Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents. *In* : Manfred E. Wolff (Eds.). **Burger's Medicinal Chemistry**. Fourth Edition. Part III. New York: John Wiley & Sons, pp. 1220-1221.
- Siswandono dan Soekardjo B. (Eds.), 1998. **Prinsip-Prinsip Rancangan Obat**. Surabaya: Airlangga University Press, hal 101-106, 167-171.
- Siswandono dan Soekardjo B. (Eds.), 2000. **Kimia Medisinal**. Buku 1. Surabaya: Airlangga University Press, hal 261-273.
- Siswandono dan Soekardjo B. (Eds.), 2000. **Kimia Medisinal**. Buku 2. Surabaya: Airlangga University Press, hal 283, 291-297.
- Smith, H.J., 1998. **Smith and Williams, Introduction to the Principles of Drug Design**. Second Edition. Wright, London: Butterwood & Co. (Publishers) Ltd., pp. 240-248.
- Tjay, T.H. dan Rahardja, K., 2002. **Obat-Obat Penting**. Edisi Kelima. Jakarta: Penerbit PT. Elex Media Komputindo, hal 295-296.
- Turner, R.A., 1965. **Screening Method in Pharmacology**. New York: Academic Press, pp. 100-117.
- Weast, R.C. (Ed.), Ph.D., 1985. **Handbook of Chemistry and Physics**. 64th Edition. Florida: CRC Press, p. D-150.

Willete, R.E., 1991. Analgesic Agents. *In* : J.N. Delgado and W.A. Remers (Eds.). **Wilson and Gisvold's Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. Ninth Edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, pp. 650-662.

Wilmana, P.F., 1995. Analgesik-Antipiretik Analgesik Anti-inflamasi Nonsteroid dan Obat Piri. *Dalam* : S. Ganiswarna (Eds.). **Farmakologi dan Terapi**. Edisi keempat. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal 207-210.



Lampiran 1**Perhitungan Refraksi Molar (R_M) Aseton**

Contoh Perhitungan Refraksi Molar Aseton :

$$\text{BM aseton (M)} = 58,08$$

$$\text{Densitas aseton (d)} = 0,7780$$

$$R_1 = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \times \frac{M}{d}$$

$$R_1 = \frac{1,3560^2 - 1}{1,3560^2 + 2} \times \frac{58,08}{0,7780} = 16,31 \text{ cc/mol}$$

Untuk replikasi 2 dan 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.



Lampiran 2**Perhitungan Refraksi Molar Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat**

Contoh Perhitungan Refraksi Molar Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat :

$$\text{BM aseton } (M_1) = 58,08$$

$$\text{BM asam } O\text{-(4-klorobenzoil)salisilat } (M_2) = 276,5$$

$$R_M \text{ aseton } (R_1) = 16,30$$

$$\text{Indeks bias larutan} = 1,3572$$

$$\text{Densitas larutan } (d) = 0,7789 \text{ g/mL}$$

$$R_M \text{ larutan } (R_{12}) = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \times \frac{(N_1 M_1 + N_2 M_2)}{d}$$

$$R_M \text{ zat } (R_2) = \frac{R_{12} - (N_1 R_1)}{N_2}$$

$$\text{Massa asam } O\text{-(4-klorobenzoil)salisilat} = 0,2503 \text{ g}$$

$$\text{Mol zat} = \frac{0,2503 \text{ g}}{276,5} = 9,05 \times 10^{-4}$$

$$\text{Massa aseton} = 0,7786 \text{ g/mL} \times 30,0 \text{ mL} = 23,36 \text{ g}$$

$$\text{Mol aseton} = \frac{23,36 \text{ g}}{58,08} = 0,40$$

$$\text{Fraksi mol aseton } (N_1) = \frac{0,4}{9,05 \times 10^{-4} + 0,4} = 0,998$$

$$\text{Fraksi mol zat } (N_2) = \frac{9,05 \times 10^{-4}}{9,05 \times 10^{-4} + 0,4} = 0,002$$

$$R_{12} = \frac{(1,3572^2 - 1)}{(1,3572^2 + 2)} \times \frac{(0,998 \times 58,08 + 0,002 \times 276,5)}{0,7789} = 16,46 \text{ cc/mol}$$

$$R_2 = \frac{16,46 - (0,998 \times 16,30)}{0,002} = 96,30 \text{ cc/mol}$$

Untuk replikasi 2 dan 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.

Lampiran 3**Perhitungan Refraksi Molar Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat**

Contoh Perhitungan Refraksi Molar Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat :

$$\text{BM aseton } (M_1) = 58,08$$

$$\text{BM asam } O\text{-(2,4-diklorobenzoil)salisilat } (M_2) = 311$$

$$R_M \text{ aseton } (R_1) = 16,30$$

$$\text{Indeks bias larutan} = 1,3579$$

$$\text{Densitas larutan } (d) = 0,7806 \text{ g/mL}$$

$$R_M \text{ larutan } (R_{12}) = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \times \frac{(N_1 M_1 + N_2 M_2)}{d}$$

$$R_M \text{ zat } (R_2) = \frac{R_{12} - (N_1 R_1)}{N_2}$$

$$\text{Mol zat} = \frac{0,2519 \text{ g}}{311} = 8,10 \times 10^{-4}$$

$$\text{Massa aseton} = 0,7786 \text{ g/mL} \times 30,0 \text{ mL} = 23,36 \text{ g}$$

$$\text{Mol aseton} = \frac{23,36 \text{ g}}{58,08} = 0,40$$

$$\text{Fraksi mol aseton } (N_1) = \frac{0,4}{8,19 \times 10^{-4} + 0,4} = 0,998$$

$$\text{Fraksi mol zat } (N_2) = \frac{8,19 \times 10^{-4}}{8,19 \times 10^{-4} + 0,4} = 0,002$$

$$R_{12} = \frac{(1,3579^2 - 1)}{(1,3579^2 + 2)} \times \frac{(0,998 \times 58,08 + 0,002 \times 311)}{0,7806} = 16,48 \text{ cc/mol}$$

$$R_2 = \frac{16,48 - (0,998 \times 16,30)}{0,002} = 106,30 \text{ cc/mol}$$

Untuk replikasi 2 dan 3 dilakukan perhitungan dengan cara yang sama seperti di atas.

Lampiran 4

**Hasil ANOVA Frekuensi Geliat Antar Kelompok Dosis Senyawa
Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat**

Oneway

ANOVA

geliat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7735.146	7	1105.021	179.800	.000
Within Groups	245.833	40	6.146		
Total	7980.979	47			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: geliat
LSD

(I) kelp	(J) kelp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrolCI	kontrolCI2	1.500	1.431	.301	-1.39	4.39
	d75CI	14.333(*)	1.431	.000	11.44	17.23
	d75CI2	13.333(*)	1.431	.000	10.44	16.23
	d150CI	24.000(*)	1.431	.000	21.11	26.89
	d150CI2	22.833(*)	1.431	.000	19.94	25.73
	d300CI2	36.667(*)	1.431	.000	33.77	39.56
	d300CI2	33.833(*)	1.431	.000	30.94	36.73
kontrolCI2	kontrolCI	-1.500	1.431	.301	-4.39	1.39
	d75CI	12.833(*)	1.431	.000	9.94	15.73
	d75CI2	11.833(*)	1.431	.000	8.94	14.73
	d150CI	22.500(*)	1.431	.000	19.61	25.39
	d150CI2	21.333(*)	1.431	.000	18.44	24.23
	d300CI2	35.167(*)	1.431	.000	32.27	38.06
	d300CI2	32.333(*)	1.431	.000	29.44	35.23
d75CI	kontrolCI	-14.333(*)	1.431	.000	-17.23	-11.44
	kontrolCI2	-12.833(*)	1.431	.000	-15.73	-9.94
	d75CI2	-1.000	1.431	.489	-3.89	1.89
	d150CI	9.667(*)	1.431	.000	6.77	12.56
	d150CI2	8.500(*)	1.431	.000	5.61	11.39
	d300CI2	22.333(*)	1.431	.000	19.44	25.23
	d300CI2	19.500(*)	1.431	.000	16.61	22.39

d75Cl2	kontrolCl	-13.333(*)	1.431	.000	-16.23	-10.44
	kontrolCl2	-11.833(*)	1.431	.000	-14.73	-8.94
	d75Cl	1.000	1.431	.489	-1.89	3.89
	d150Cl	10.667(*)	1.431	.000	7.77	13.56
	d150Cl2	9.500(*)	1.431	.000	6.61	12.39
	d300Cl2	23.333(*)	1.431	.000	20.44	26.23
	d300Cl	20.500(*)	1.431	.000	17.61	23.39
d150Cl	kontrolCl	-24.000(*)	1.431	.000	-26.89	-21.11
	kontrolCl2	-22.500(*)	1.431	.000	-25.39	-19.61
	d75Cl	-9.667(*)	1.431	.000	-12.56	-6.77
	d75Cl2	-10.667(*)	1.431	.000	-13.56	-7.77
	d150Cl2	-1.167	1.431	.420	-4.06	1.73
	d300Cl2	12.667(*)	1.431	.000	9.77	15.56
	d300Cl	9.833(*)	1.431	.000	6.94	12.73
d150Cl2	kontrolCl	-22.833(*)	1.431	.000	-25.73	-19.94
	kontrolCl2	-21.333(*)	1.431	.000	-24.23	-18.44
	d75Cl	-8.500(*)	1.431	.000	-11.39	-5.61
	d75Cl2	-9.500(*)	1.431	.000	-12.39	-6.61
	d150Cl	1.167	1.431	.420	-1.73	4.06
	d300Cl2	13.833(*)	1.431	.000	10.94	16.73
	d300Cl	11.000(*)	1.431	.000	8.11	13.89
d300Cl2	kontrolCl	-36.667(*)	1.431	.000	-39.56	-33.77
	kontrolCl2	-35.167(*)	1.431	.000	-38.06	-32.27
	d75Cl	-22.333(*)	1.431	.000	-25.23	-19.44
	d75Cl2	-23.333(*)	1.431	.000	-26.23	-20.44
	d150Cl	-12.667(*)	1.431	.000	-15.56	-9.77
	d150Cl2	-13.833(*)	1.431	.000	-16.73	-10.94
	d300Cl	-2.833	1.431	.055	-5.73	.06
d300Cl	kontrolCl	-33.833(*)	1.431	.000	-36.73	-30.94
	kontrolCl2	-32.333(*)	1.431	.000	-35.23	-29.44
	d75Cl	-19.500(*)	1.431	.000	-22.39	-16.61
	d75Cl2	-20.500(*)	1.431	.000	-23.39	-17.61
	d150Cl	-9.833(*)	1.431	.000	-12.73	-6.94
	d150Cl2	-11.000(*)	1.431	.000	-13.89	-8.11
	d300Cl2	2.833	1.431	.055	-.06	5.73

* The mean difference is significant at the .05 level.

Keterangan :

KontrolCl : kelompok kontrol senyawa asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

KontrolCl2 : kelompok kontrol senyawa asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

d75Cl : kelompok dosis 75 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

d75Cl2 : kelompok dosis 75 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

d150Cl : kelompok dosis 150 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

d150Cl2 : kelompok dosis 150 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

d300Cl : kelompok dosis 300 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

d300Cl2 : kelompok dosis 300 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Lampiran 5

**Hasil ANOVA % Hambatan Nyeri Antar Kelompok Dosis Senyawa
Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat dan Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat**

Oneway

ANOVA

hmbtnyeri					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12051.116	5	2410.223	783.950	.000
Within Groups	92.234	30	3.074		
Total	12143.350	35			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: hmbtnyeri
LSD

(I) kelp	(J) kelp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
d75Cl	d75Cl2	4.33167(*)	1.01233	.000	2.2642	6.3991
	d150Cl	-19.76000(*)	1.01233	.000	-21.8275	-17.6925
	d150Cl2	-15.59500(*)	1.01233	.000	-17.6625	-13.5275
	d300Cl	-45.50333(*)	1.01233	.000	-47.5708	-43.4359
	d300Cl2	-38.71833(*)	1.01233	.000	-40.7858	-36.6509
d75Cl2	d75Cl	-4.33167(*)	1.01233	.000	-6.3991	-2.2642
	d150Cl	-24.09167(*)	1.01233	.000	-26.1591	-22.0242
	d150Cl2	-19.92667(*)	1.01233	.000	-21.9941	-17.8592
	d300Cl	-49.83500(*)	1.01233	.000	-51.9025	-47.7675
	d300Cl2	-43.05000(*)	1.01233	.000	-45.1175	-40.9825
d150Cl	d75Cl	19.76000(*)	1.01233	.000	17.6925	21.8275
	d75Cl2	24.09167(*)	1.01233	.000	22.0242	26.1591
	d150Cl2	4.16500(*)	1.01233	.000	2.0975	6.2325
	d300Cl	-25.74333(*)	1.01233	.000	-27.8108	-23.6759
	d300Cl2	-18.95833(*)	1.01233	.000	-21.0258	-18.8909
d150Cl2	d75Cl	15.59500(*)	1.01233	.000	13.5275	17.6625
	d75Cl2	19.92667(*)	1.01233	.000	17.8592	21.9941
	d150Cl	-4.16500(*)	1.01233	.000	-6.2325	-2.0975
	d300Cl	-29.90833(*)	1.01233	.000	-31.9758	-27.8409
	d300Cl2	-23.12333(*)	1.01233	.000	-25.1908	-21.0559

d300Cl	d75Cl	45.50333(*)	1.01233	.000	43.4359	47.5708
	d75Cl2	49.83500(*)	1.01233	.000	47.7675	51.9025
	d150Cl	25.74333(*)	1.01233	.000	23.6759	27.8108
	d150Cl2	29.90833(*)	1.01233	.000	27.8409	31.9758
	d300Cl2	6.78500(*)	1.01233	.000	4.7175	8.8525
d300Cl2	d75Cl	38.71833(*)	1.01233	.000	36.6509	40.7858
	d75Cl2	43.05000(*)	1.01233	.000	40.9825	45.1175
	d150Cl	18.95833(*)	1.01233	.000	16.8909	21.0258
	d150Cl2	23.12333(*)	1.01233	.000	21.0559	25.1908
	d300Cl	-6.78500(*)	1.01233	.000	-8.8525	-4.7175

* The mean difference is significant at the .05 level.

Keterangan :

- d75Cl : kelompok dosis 75 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat
d75Cl2 : kelompok dosis 75 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat
d150Cl : kelompok dosis 150 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat
d150Cl2 : kelompok dosis 150 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat
d300Cl : kelompok dosis 300 mg/kg BB asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat
d300Cl2 : kelompok dosis 300 mg/kg BB asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Lampiran 6**Perhitungan % Hambatan Nyeri**

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{f_k - f_T}{f_k} \right) \times 100$$

Keterangan : f_T = rata-rata jumlah geliat pada kelompok dosis

f_k = rata-rata jumlah geliat pada kelompok kontrol

1. Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

- Dosis 75 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{49,33 - 35,00}{49,33} \right) \times 100 = 29,05\%$$

- Dosis 150 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{49,33 - 25,33}{49,33} \right) \times 100 = 48,65\%$$

- Dosis 300 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{49,33 - 12,67}{49,33} \right) \times 100 = 74,32\%$$

2. Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

- Dosis 75 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{47,83 - 36,00}{47,83} \right) \times 100 = 24,73\%$$

- Dosis 150 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{47,83 - 26,50}{47,83} \right) \times 100 = 44,60\%$$

- Dosis 300 mg/kg BB

$$\% \text{ Hambatan Nyeri} = \left(\frac{47,83 - 15,50}{47,83} \right) \times 100 = 67,59\%$$

Lampiran 7

**Hasil Analisis Regresi antara Log Dosis dengan % Hambatan Nyeri
Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat**

Regression**Variables Entered/Removed^b**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	logdosis ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: hmbtnyeri

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.997 ^a	.994	.988	2.47807

a. Predictors: (Constant), logdosis

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1024.686	1	1024.686	166.865	.049 ^a
	Residual	6.141	1	6.141		
	Total	1030.827	2			

a. Predictors: (Constant), logdosis

b. Dependent Variable: hmbtnyeri

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-113.808	12.813		-8.882	.071
	logdosis	75.450	5.841	.997	12.918	.049

a. Dependent Variable: hmbtnyeri

Lampiran 8

**Hasil Analisis Regresi antara Log Dosis dengan % Hambatan Nyeri
Asam O-(2,4-diklorobenzoil)salisilat**

Regression**Variables Entered/Removed^b**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	logdosis ^a	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: hmbtnyeri

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.999 ^a	.998	.996	1.27373

a. Predictors: (Constant), logdosis

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	918.490	1	918.490	566.130	.027 ^a
	Residual	1.622	1	1.622		
	Total	920.112	2			

a. Predictors: (Constant), logdosis

b. Dependent Variable: hmbtnyeri

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-110.085	6.586		-16.715	.038
	logdosis	71.433	3.002	.999	23.793	.027

a. Dependent Variable: hmbtnyeri

Lampiran 9**Perhitungan ED₅₀ Aktivitas Analgesik Kelompok Uji
Masing-masing Senyawa****1. Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat**

$$y = 75,450 x - 113,808$$

Bila % hambatan = 50, maka :

$$50 = 75,450 \times \log ED_{50} - 113,808$$

$$\log ED_{50} = 2,171$$

$$ED_{50} = \text{antilog } 2,171$$

$$ED_{50} = 148,25 \text{ mg/kg}$$

2. Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

$$y = 71,433 x - 110,085$$

Bila % hambatan = 50, maka :

$$50 = 71,433 \times \log ED_{50} - 110,085$$

$$\log ED_{50} = 2,241$$

$$ED_{50} = \text{antilog } 2,241$$

$$ED_{50} = 174,18 \text{ mg/kg}$$

Lampiran 10

Tabel r

Degrees of Freedom	5%	1%	Degrees of Freedom	5%	1%
1	.997	1.000	24	.388	.496
2	.950	.990	25	.381	.487
3	.878	.959	26	.374	.478
4	.811	.917	27	.367	.470
5	.754	.874	28	.361	.463
6	.707	.834	29	.355	.456
7	.666	.798	30	.349	.449
8	.632	.765	35	.325	.418
9	.602	.735	40	.304	.393
10	.576	.708	45	.288	.372
11	.553	.684	50	.273	.354
12	.532	.661	60	.250	.325
13	.514	.641	70	.232	.302
14	.497	.623	80	.217	.283
15	.482	.606	90	.205	.267
16	.468	.590	100	.195	.254
17	.456	.575	125	.174	.228
18	.444	.561	150	.159	.208
19	.433	.549	200	.138	.181
20	.423	.537	300	.113	.148
21	.413	.526	400	.098	.128
22	.404	.515	500	.088	.115
23	.396	.505	1,000	.062	.081

Dikutip dari: Snecedor G.W. and Cochran W.G., 1968. Statistical Methods, 6th Ed., The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Lampiran 11

Gambar Penyuntikan Mencit secara Intraperitoneal



Penyuntikan mencit secara intraperitoneal

Lampiran 12

Gambar Mencit Sebelum dan Sesudah diberi Induksi Nyeri

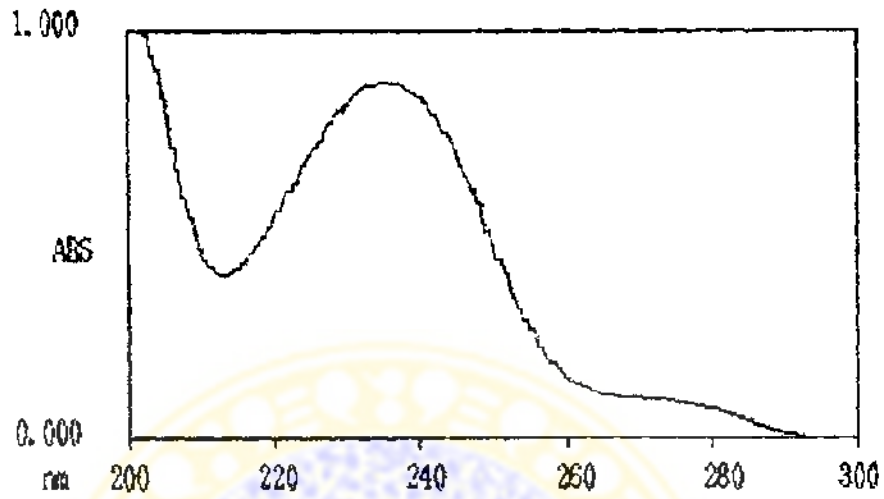
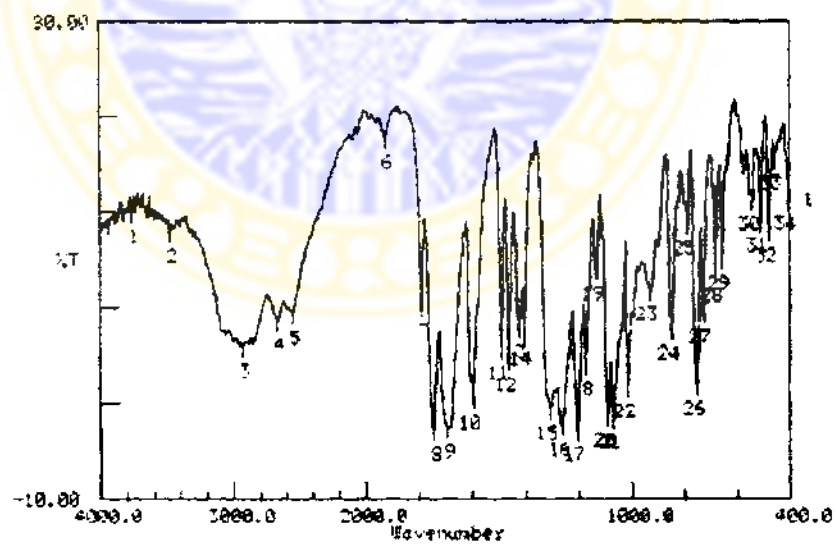


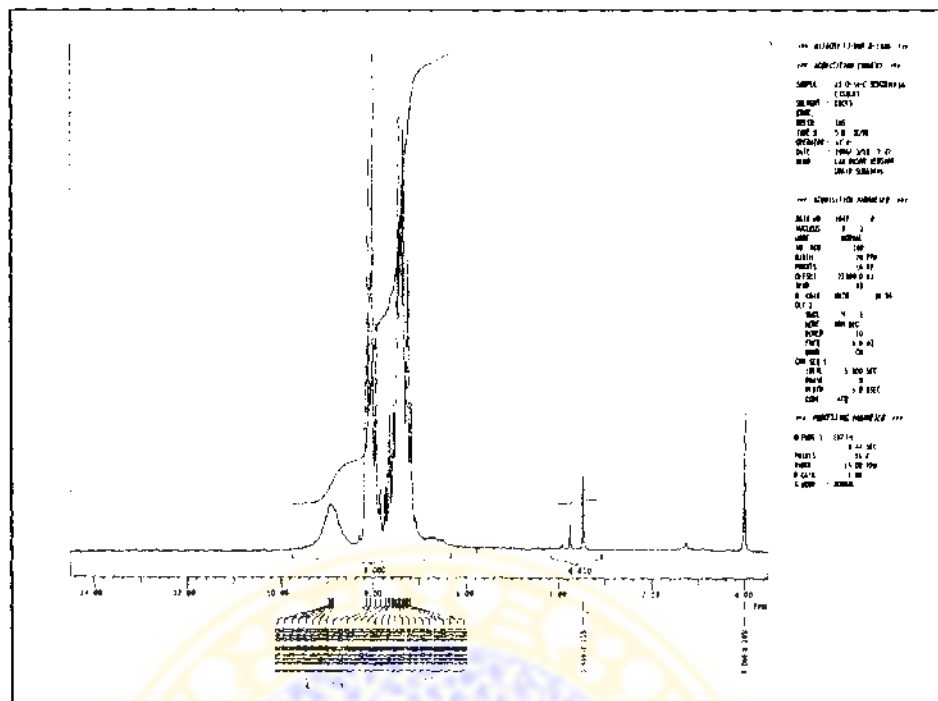
Mencit sebelum diberi induksi nyeri



Mencit sesudah diberi induksi nyeri

Lampiran 13

Hasil Identifikasi Senyawa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat(*)Spektrum Ultraviolet Senyawa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilatSpektrum Inframerah Senyawa Asam *O*-(4-klorobenzoil)salisilat

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Asam *O*-(4-klorobenzoi)salisilat

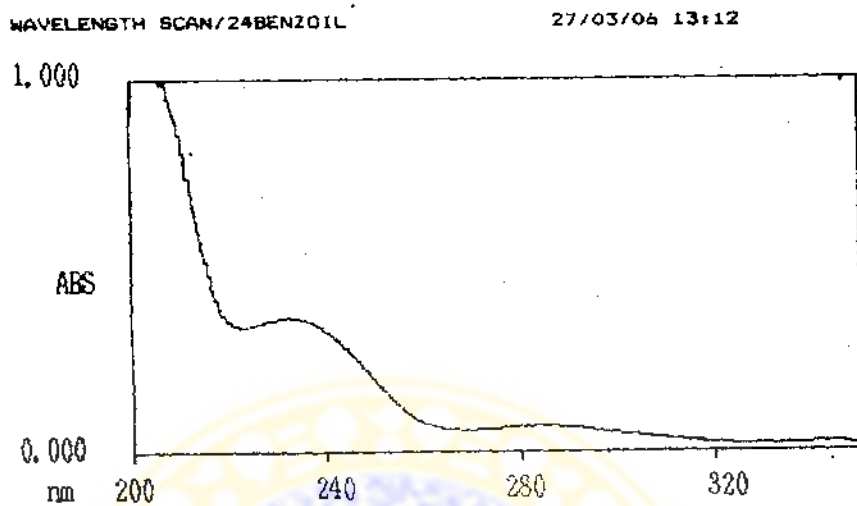
Hasil Pemeriksaan :

Spektra Ultraviolet	λ maks. (metanol) : 236,0 nm
Spektra Inframerah (KBr, ν maks., cm^{-1})	2926 (regang O–H karboksilat), 2650 (regang C–H aromatis), 1739 (regang –C=O ester), 1691 (regang –C=O asam), 1585 (regang C=C aromatik), 1259 (regang =C–O ester), 1089 (regang C–Cl aromatis), 765 (lentur C–H aromatis)
Spektra NMR- ^1H (δ , ppm, CDCl_3)	8,91 (H dari COOH , 1H, singlet); 7,95 (H dari =CH benzena, 3H, multiplet); 7,56 (H dari =CH benzena, 5H, multiplet).

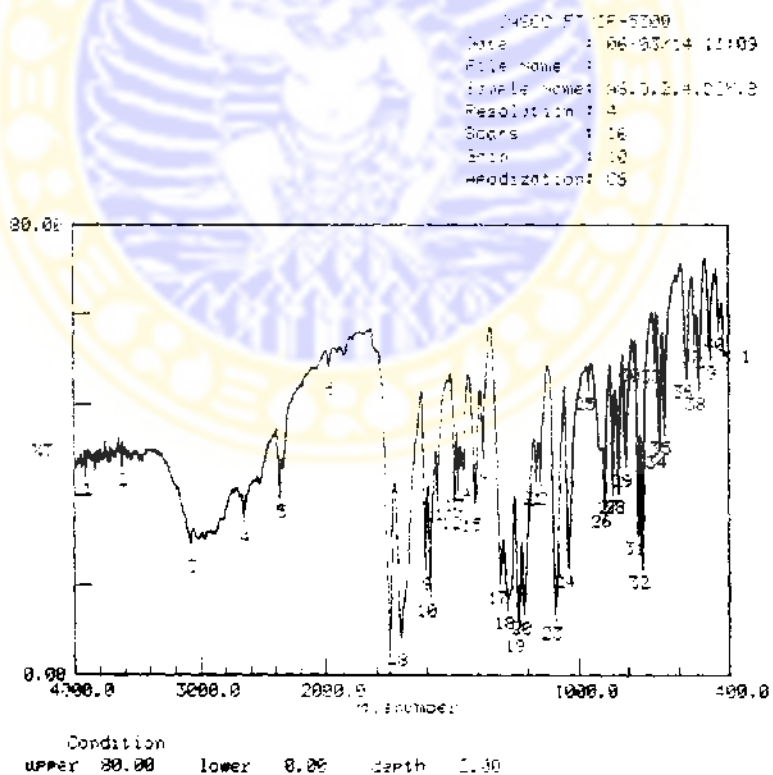
(*) Diyah, N.W., Soekardjo, B., Purwanto, Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., dan Susilowati R., 2006. Modifikasi Struktur dan Uji Aktivitas Analgesik Turunan Asam *O*-Asil Salisilat dalam rangka Memperoleh Senyawa Analgesik-Antiinflamasi yang Poten. **Laporan Penelitian**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Lampiran 14

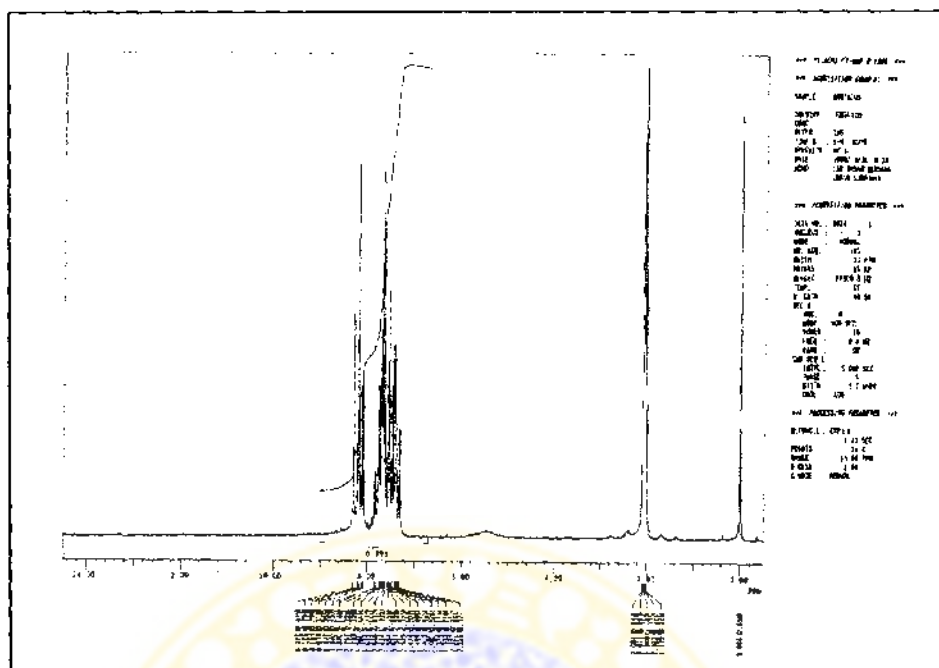
Hasil Identifikasi Senyawa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat(**)



Spektrum Ultraviolet Senyawa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat



Spektrum Inframerah Senyawa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Asam *O*-(2,4-diklorobenzoil)salisilat

Hasil Pemeriksaan :

Spektra Ultraviolet	λ maks. (metanol) : 239,0 nm
Spektra Inframerah (KBr, ν maks., cm^{-1})	3076 (regang O-H karboksilat), 2652 (regang C-H aromatis), 1747 (regang $\text{C}=\text{O}$ ester), 1701 (regang $\text{C}=\text{O}$ asam), 1604 (regang $\text{C}=\text{C}$ aromatik), 1238 (regang $\text{C}=\text{O}$ ester), 1091 (regang C-Cl aromatis), 775 (lentur C-H aromatis)
Spektra NMR- ^1H (δ , ppm, CDCl_3)	8,20 (H dari $=\text{CH}$ benzena, 2H, multiplet); 7,64 (H dari $=\text{CH}$ benzena, 5H, multiplet).

(**) Diyah, N.W., Soekardjo, B., Purwanto, Siswandono, Hardjono, S., Purwanto, B.T., dan Susilowati R., 2006. Modifikasi Struktur dan Uji Aktivitas Analgesik Turunan Asam *O*-Asil Salisilat dalam rangka Memperoleh Senyawa Analgesik-Antiinflamasi yang Poten. **Laporan Penelitian**. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.