

SKRIPSI

HANNY AFRILIA KALANA

**UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA
ASAM O-(3-TRIFLUOROMETILBENZOIL) SALISILAT
PADA MENCIT DENGAN METODE *WRITHING TEST***

FF 92/05

Kal

u



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2005**

LEMBAR PENGESAHAN

**UJI AKTIVITAS ANALGESIK SENYAWA
ASAM O-(3-TRIFLUOROMETILBENZOIL) SALISILAT
PADA MENCIT DENGAN METODE *WRITHING TEST***

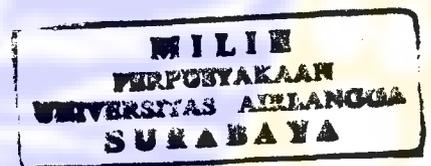
SKRIPSI

**Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2005**

Oleh :

**Hanny Afrilia Kalana
NIM. 059912132**

**Skripsi ini telah disetujui
tanggal 13 Januari 2005 oleh :**



Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nuzul W. Diyah'.

Dra. Nuzul W. Diyah, M.Si., Apt
NIP. 132011698

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bambang Tri Purwanto'.

Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt
NIP. 131470996

 ALLAH adalah sumber cahaya bagi langit dan bumi. Perumpamaan cahaya-Nya seperti bejana yang tidak tembus, didalamnya ada pelita; pelita itu yang tertanam dalam kaca; kaca itu ceria bagaikan bintang bersinar, yang menyala karena minyak zaitun yang penuh berkah, tidak karena timur atau karena barat; minyaknya sendiri bercahaya meski tidak tersentuh api.

Cahaya berselaput cahaya.  ALLAH memberi petunjuk dengan cahaya-Nya kepada orang yang Ia kehendaki. Demikian Ia membuat perumpamaan bagi segenap manusia. ALLAH Mahatahu akan segala hal


(AN NUUR : 35)

THE COLOUR OF LIVE

 Hidup ini penuh dengan Warna . Apa sebenarnya arti dari Warna ? Hanya kita yang tahu. Tapi sebenarnya dengan banyaknya warna, kita harusnya lebih bersyukur pada ALLAH. Mengapa? Karena ALLAH masih sayang kita, masih memperhatikan kita.

Disaat kita sedang senang, ALLAH memberi kita ujian yang mungkin bisa membuat kita menangis, tapi jika kita lulus dari

ujian itu kita akan dapat nilai plus dari-Nya.  Disaat kita sedih, ALLAH akan menghibur kita dengan kebahagiaan. Amazing!

Itulah Warna kehidupan.  Kita tinggal mengikuti alur kehidupan, tapi jangan sampai tersesat. Ikuti jalan ALLAH dengan begitu kita akan bahagia didunia dan diakhirat

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul **“Uji Aktivitas Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat Pada Mencit Dengan Metode *Writhing Test*”** yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapat bantuan, baik berupa dorongan moral ataupun material serta tenaga dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah.
2. Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt, selaku Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan segenap staf dosen pengajar dan karyawan yang telah memberikan bantuan dan fasilitas yang diperlukan.
3. Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, Msi., Apt selaku pembimbing utama dan dosen wali yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing dan memberi dorongan baik moril maupun materiil kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt selaku pembimbing serta yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing dan memberi dorongan baik moril maupun materiil kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Drs. Soemadi, Apt dan Drs. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.
6. Seluruh dosen pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Pak Tukijo dan Pak Tanto di laboratorium Kimia Medisinal.
8. Ayahanda dr. Soegihantoko, SpPD, mama Rr. Rini, mas Ali, mbak Lucky dan adekku Brevmana yang telah memberikan dorongan semangat dan do'a restu dimasa-masa sulit saat menyelesaikan skripsi ini ,

9. Saudara-saudaraku, yitu Yoppy 'brother', Meutia 'sister' dan Afrit 'adek' yang dengan kesabaran memberikan dorongan semangat dan selalu menemani dengan keceriaan.
10. Teman-teman seperjuangan dalam halaqah, ukhti tersayang, yaitu Ita M., Pipit, Ririn, Hartini, Neny, Henni dan yang lainnya.
11. Teman-teman satu proyek yaitu Suhriyah, Wiwin dan Ira atas kerjasamanya selama ini.
12. Adek-adekku tercinta, Widia'01, Dewi MNQP'02, Puspita'02 dan Cintya'02.
13. Teman-teman seangkatan 1999.
14. Semua pihak yang tidak mungkin disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan tambahan ilmu pengetahuan yang bermanfaat.

Surabaya, Januari 2005

Penulis

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS ANALGESIK ASAM O-(3-TRIFLUOROMETIL-BENZOIL)SALISILAT PADA MENCIT DENGAN METODE *WRITHING TEST*

Hanny Afrilia Kalana

Dalam rangka pengembangan calon obat baru dari kelompok obat-obat AINS telah disintesis senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat yang diduga mempunyai aktivitas analgesik. Oleh karena itu, perlu diketahui apakah senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik dan bagaimana potensi analgesiknya jika dibandingkan dengan asam asetilsalisilat.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas analgesik senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat secara intraperitoneal pada mencit dengan metode *writhing test* dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas analgesiknya, sebagai pembanding digunakan asam asetilsalisilat.

Senyawa uji diberikan secara intraperitoneal pada mencit 30 menit sebelum induksi nyeri oleh larutan asam asetat 0,6 % intraperitoneal. Respon nyeri yang berupa frekuensi geliat diamati 5 menit setelah induksi nyeri selama 30 menit. Aktivitas analgesik dinyatakan sebagai ED₅₀ yang ditentukan berdasarkan hubungan antara log dosis dengan persentase hambatan nyeri.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai ED₅₀ hambatan nyeri 70,97 mg/kg sedangkan asam asetilsalisilat sebagai pembanding mempunyai ED₅₀ hambatan nyeri sebesar 85,56 mg/kg. Dapat disimpulkan bahwa senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar daripada asam asetilsalisilat.

Dari penelitian ini disarankan agar asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai senyawa obat baru dengan aktivitas analgesik.

ABSTRACT

The Analgesic Activity of O-(3-Trifluorometilbenzoil)salicylic Acid was Tested in Mice Using Writhing Test Method

The research to study the analgesic activity of O-(3-trifluorometilbenzoil)salicylic acid had been done. The analgesic activity of the compound was tested by writhing test method using acetylsalicylic acid as reference. The results showed that O-(3-trifluorometilbenzoil)salicylic acid has ED₅₀ 70.97 mg/kg, while acetylsalicylic acid, as reference, has ED₅₀ 85.56 mg/kg. It is conclude that O-(3-trifluorometilbenzoil)salicylic acid has more potent analgesic activity than acetylsalicylic acid.

Key Word : O-(3-trifluorometilbenzoil)salicylic acid, analgesic activity, writhing test

DAFTAR ISI

| | HALAMAN |
|---|----------------|
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| KATA PENGANTAR | iii |
| RINGKASAN | v |
| ABSTRACT | vi |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR LAMPIRAN | xi |
| | |
| BAB 1 PENDAHULUAN | |
| I.1. Latar Belakang Permasalahan | 1 |
| I.2. Rumusan Masalah | 5 |
| I.3. Tujuan Penelitian | 5 |
| I.4. Hipotesis | 5 |
| I.5. Manfaat Penelitian | 6 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Tinjauan tentang Nyeri | 7 |
| 2.2. Tinjauan tentang Analgetika Non Narkotik | 8 |
| 2.3. Tinjauan tentang Mekanisme Kerja Obat Antiinflamasi Nonsteroid | 10 |
| 2.4. Tinjauan tentang Senyawa Turunan Salisilat | 13 |
| 2.5. Tinjauan tentang Senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat | 14 |
| 2.6. Tinjauan tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik | 15 |
| 2.6.1. Metode Stimulasi Panas | 15 |
| 2.6.2. Metode Stimulasi Listrik | 16 |
| 2.6.3. Metode Stimulasi Tekanan | 17 |
| 2.6.4. Metode Stimulasi Kimiawi | 17 |

| | |
|--|----|
| 2.7. Penentuan ED ₅₀ dengan Analisis Regresi | 18 |
| BAB III KERANGKA KONSEPTUAL | 20 |
| BAB IV BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN | |
| 3.1. Bahan | 22 |
| 3.1.1. Bahan Kimia | 22 |
| 3.1.2. Hewan coba | 22 |
| 3.2. Alat | 23 |
| 3.3. Metode Penelitian | 23 |
| 3.3.1. Analisis Kualitatif | 23 |
| 3.3.1.1. Pemeriksaan Organoleptis | 23 |
| 3.3.1.2. Pemeriksaan Kualitatif | 23 |
| 3.3.2. Uji aktivitas Analgesik | 24 |
| 3.3.2.1. Persiapan Hewan Coba | 24 |
| 3.3.2.2. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6% | 24 |
| 3.3.2.3. Pembuatan Sediaan Uji | 25 |
| 3.3.2.4. Pemberian Sediaan Uji Pada Mencit | 25 |
| 3.3.2.4. Pelaksanaan Uji Aktivitas | 25 |
| 3.4. Analisa Data | 26 |
| 3.4.1. Penentuan % Hambatan Nyeri | 26 |
| 3.4.2. Penentuan ED ₅₀ Aktivitas Analgesik | 26 |
| BAB V HASIL PENELITIAN | |
| 5.1 Identifikasi Senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat Secara Kualitatif | 28 |
| 5.1.1 Identifikasi Senyawa Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat | 28 |
| 5.1.1.1 Pemeriksaan Organoleptis | 28 |
| 5.1.1.2 Penentuan Jarak Lebur | 28 |
| 5.1.1.3 Hasil Pemeriksaan dengan KLT | 29 |
| 5.2 Uji Aktivitas Analgesik | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.2.1 Penentuan Frekuensi Respon Nyeri | 29 |
| 5.2.2 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri | 32 |
| 5.3 Penentuan ED ₅₀ | 34 |
| BAB VI PEMBAHASAN | 36 |
| BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN | 40 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | | Halaman |
|--------------|--|----------------|
| V.1 | Jarak Lebur Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat | 28 |
| V.2 | Hasil Pemeriksaan Dengan KLT Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat | 29 |
| V.3 | Frekuensi Geliat Pada Mencit dalam Kelompok Dosis Senyawa Uji Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat Dan Kelompok Kontrol | 30 |
| V.4 | Frekuensi Geliat Pada Mencit dalam Kelompok Dosis Senyawa Pembanding Asam asetilsalisilat Dan Kelompok Kontrol | 31 |
| V.5 | Hasil Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri Pada Kelompok Yang Diberi Senyawa Uji Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)- salisilat dan Asam asetilsalisilat | 32 |
| V.6 | ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)- salisilat dan Asam asetilsalisilat | 34 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | | Halaman |
|---------------|--|----------------|
| 2.1 | Biosintesis Prostaglandin | 12 |
| 2.2 | Struktur Asam O-(3-triflurometilbenzoil)salisilat Dan Asam asetilsalisilat | 15 |
| 3.1 | Skema Kerangka Konseptual | 21 |
| 4.1 | Rancangan Percobaan Uji Aktivitas Analgesik | 27 |
| 5.1 | Kurva Hubungan Antara Log Dosis Dengan % Hambatan dari Asam O-(3-Triflurometilbenzoil)salisilat | 33 |
| 5.2 | Kurva Hubungan Antara Log Dosis Dengan % Hambatan dari Asam asetilsalisilat | 33 |
| 5.3 | Mencit sebelum diberi perlakuan | 35 |
| 5.4 | Mencit setelah diberi perlakuan | 35 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | | Halaman |
|-----------------|---|----------------|
| 1 | Hasil Perhitungan ANOVA Antar Kelompok Dosis Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat | 44 |
| 2 | Hasil Perhitungan ANOVA Antar Kelompok Dosis Senyawa Asam asetilsalisilat | 45 |
| 3 | Hasil Perhitungan % Hambatan Nyeri | 46 |
| 4 | Hasil Perhitungan ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Kelompok Uji masing-masing Senyawa | 48 |
| 5 | Hasil Analisis Regresi Antara Log Dosis Dengan % Hambatan Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat | 49 |
| 6 | Hasil Analisis Regresi Antara Log Dosis Dengan % Hambatan Asam asetilsalisilat | 50 |
| 7 | Spektrofotometri Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)-salisilat | 51 |
| 8 | Tabel F | 53 |
| 9 | Tabel r | 54 |
| 10 | Penyuntikkan Secara Intraperitoneal | 55 |

BAB I

PENDAHULUAN

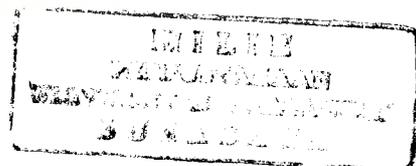
I.1. Latar Belakang Permasalahan

Aktivitas biologis suatu senyawa berhubungan dengan struktur kimia (Siswandono dan Soekardjo, 2000) yang disebut dengan farmakofor. Grup farmakofor adalah grup yang dapat merespon aktivitas biologis (Korolkovas, 1970).

Analgetika adalah zat-zat yang memiliki efek mengurangi atau melenyapkan rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran. Rasa nyeri dalam kebanyakan hal hanya merupakan suatu gejala, yang fungsinya adalah melindungi dan memberikan tanda bahaya tentang adanya gangguan-gangguan di dalam tubuh seperti peradangan (rematik, encok), infeksi kuman atau kejang otot. Sebab-sebab rasa nyeri adalah rangsangan mekanis atau kimiawi, yang dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan dan melepaskan zat-zat tertentu yang disebut mediator (perantara) nyeri seperti histamin, serotonin, bradikinin dan prostaglandin (Tjay dan Raharja , 2002). Masalah timbul bila nyeri menjadi berkepanjangan dan merugikan penderita. Oleh karena itu, berbagai upaya telah dilakukan oleh manusia untuk menekan atau meringankan rasa nyeri tersebut bahkan sampai hari ini pengaruh nyeri atau rasa sakit ini adalah penyebab utama pasien menemui dokternya untuk meminta pengobatan (Ekasari, 1998).

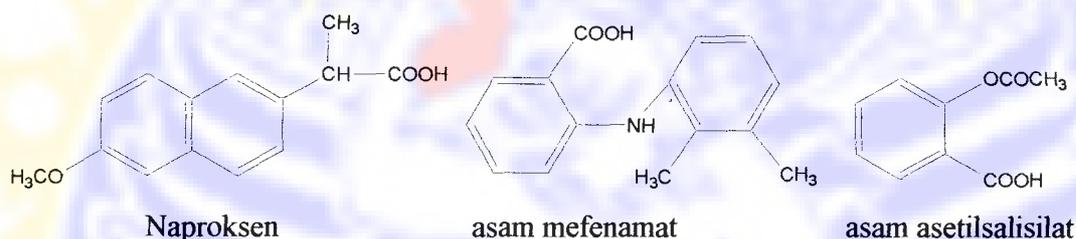
Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik. Analgetika narkotik digunakan untuk mengurangi rasa sakit yang sedang sampai berat dan analgetika non narkotik digunakan untuk menghilangkan rasa nyeri yang ringan sampai sedang (Siswandono dan Soekardjo,2000). Analgetika non narkotik lebih banyak digunakan daripada analgetika narkotik karena mudah didapat tanpa resep dari dokter dan pada umumnya masyarakat menderita rasa nyeri yang ringan. Analgetika non narkotik yang sering disebut sebagai analgetika-antipiretik dan antiinflamasi non steroid (AINS) telah digunakan secara meluas.

Obat anti-inflamasi nonsteroid (AINS) merupakan suatu kelompok obat yang heterogen, bahkan beberapa obat sangat berbeda secara kimia. Walaupun demikian obat-obat ini ternyata memiliki banyak persamaan dalam hal efek terapi maupun efek samping. Kemajuan penelitian dalam dasawarsa terakhir ini memberikan penjelasan mengapa kelompok heterogen tersebut memiliki kesamaan efek terapi dan efek samping. Ternyata



sebagian besar efek terapi dan efek sampingnya berdasarkan atas penghambatan biosintesis prostaglandin (PG) (Ganiswarna, 1995). Obat AINS terutama bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase yang berperan mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin yang merupakan salah satu mediator nyeri.

Struktur kimia obat-obat golongan AINS mempunyai ciri-ciri umum yaitu: adanya 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 obat golongan AINS yang paling dikenal dan banyak digunakan adalah dari turunan salisilat. Obat golongan AINS ini sering disebut sebagai obat mirip aspirin (aspirin-like drugs) (Ganiswarna, 1995). Diantara turunan asam asetilsalisilat yang masih digunakan hingga kini, seperti natrium salisilat, metil salisilat, dan salisilamida, asam asetilsalisilat (aspirin) merupakan turunan terpenting. Asam asetilsalisilat (Aspirin) merupakan prototip analgetika antiinflamasi. Para pakar mempunyai konsensus bahwa asam asetilsalisilat adalah antiinflamasi yang lebih poten daripada asam salisilat. Aktivitas analgesiknya hampir seluruhnya dari asam asetilsalisilat utuh (Scherrer, 1974). Hingga kini obat-obat AINS masih dinilai dengan membandingkannya terhadap asam asetilsalisilat dan asam asetilsalisilat adalah obat pilihan pertama untuk keadaan rematik (Gringauz, 1997). Asam asetilsalisilat adalah analgesik antipiretik dan antiinflamasi yang sangat luas digunakan dan digolongkan dalam obat bebas. Selain itu, obat ini merupakan standar dalam menilai efek obat sejenis (Ganiswarna, 1995).

Asam asetilsalisilat diperoleh dari reaksi Anhidrida asam, yaitu mereaksikan asam salisilat dengan anhidrida asetat sehingga menghasilkan asam asetilsalisilat dan asam asetat.

Senyawa tersebut juga dapat diperoleh dari reaksi klorida asam yang sangat reaktif, yaitu dengan mereaksikan asam salisilat dengan asetil klorida (Fessenden, 1984). Karena asam asetilsalisilat memiliki efek yang merugikan antar lain menimbulkan iritasi lambung dan menyebabkan pendarahan, maka sejak tahun 1960-an telah dilakukan sintesis senyawa turunan salisilat dengan tujuan memperoleh obat yang relatif kurang toksik dan lebih tinggi aktivitasnya daripada aspirin (Diyah, 1998).

Beberapa cara yang dilakukan adalah melakukan modifikasi pada gugus fenolat asam salisilat. Turunan dengan modifikasi pada gugus fenolat dapat diabsorpsi secara utuh ke sirkulasi darah (Willette, R. E., 1991). Atom hidrogen gugus ini dapat diganti dengan gugus selain asetil tanpa menghilangkan aktivitasnya, seperti pada senyawa : asam fenasetilsalisilat dan asam (*o*-difenilasetoksi)benzoat, asam *n*-heksil-O-karboksifenilkarbonat, 2-(*o*-karboksifenoksi)tetrahidropiran dan asam O-(4-aminobenzoil)salisilat (Diyah dkk, 2002)

Telah disintesis senyawa asam O-(4-butylbenzoil)salisilat, analog benzoil asam asetilsalisilat, yang menunjukkan aktivitas antiinflamasi lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat (Diyah, 1998). Aktivitas antiinflamasi tersebut dinyatakan dalam ED₅₀ melalui hambatan edema yang terinduksi dengan karagenan. Berdasarkan analisis hubungan kuantitatif struktur dan aktivitas diketahui bahwa terdapat pengaruh sifat lipofilik dan sterik substituen pada atom oksigen fenolat terhadap aktivitas antiinflamasi senyawa. Dari uji aktivitas analgesik diperoleh data ED₅₀ aktivitas analgesik senyawa asam O-(4-butylbenzoil)salisilat yang tidak berbeda bermakna dengan asam asetilsalisilat (Diyah dkk, 1998).

Untuk mencari senyawa baru turunan salisilat dengan aktivitas analgesik-antiinflamasi optimal telah dilakukan sintesis senyawa analog asam O-benzoilsalisilat yang lain, yaitu asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat. Makin bertambah bagian molekul yang bersifat non polar maka akan terjadi perubahan sifat kimia fisika, seperti kenaikan titik didih, berkurangnya kelarutan dalam air, dan meningkatnya koefisien partisi lemak/air. Perubahan sifat ini diikuti dengan peningkatan aktivitas biologis sampai tercapai aktivitas maksimum (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Aktivitas biologis suatu senyawa obat merupakan efek yang timbul dari rangkaian proses absorpsi, distribusi sampai dengan interaksi obat dengan reseptor. Sifat lipofilik, elektronik dan sterik obat dapat berperan pada setiap proses sehingga perubahan struktur akan menyebabkan perubahan aktivitas.

Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat, merupakan turunan asam salisilat dengan modifikasi pada gugus fenolat ; senyawa ini merupakan ester salisilat asam benzoat. Dengan masuknya gugus trifluorometilbenzoil pada atom oksigen gugus fenolat asam salisilat maka senyawa yang dihasilkan akan mempunyai sifat lipofilik dan sterik lebih besar daripada asam asetilsalisilat. Log P dari asam asetilsalisilat (tetapan F Rekker) adalah 1,370 dan asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat adalah 3,785 sedangkan sifat sterik asam asetilsalisilat (parameter B_1 sterimol) adalah 1,35 dan asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat adalah 3,68 (Diyah, 1998). Senyawa tersebut memiliki aktivitas antiinflamasi yang cukup tinggi, tetapi belum diketahui aktivitas analgesiknya (Diyah dkk, 2001). Mengingat bahwa aktivitas antiinflamasi senyawa turunan asam salisilat dipengaruhi sifat lipofilik dan sterik, maka dengan peningkatan sifat lipofilik dan steriknya, senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat akan mempunyai aktivitas analgesik yang tinggi pula.

Untuk menguji bioaktivitas suatu senyawa kimia lazim digunakan hewan yang dibuat sakit (*disease model*). Sakit atau keadaan abnormal ini dapat dibuat secara genetik, kimiawi atau fisik (Hakim, 2001). Untuk menguji aktivitas analgesik dapat digunakan hewan mencit yang mengalami nyeri terinduksi secara mekanis, listrik, atau kimiawi

Untuk mengetahui apakah senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat memiliki aktivitas analgesik yang bermakna maka dilakukan uji aktivitas analgesik. Pada penelitian ini digunakan metode yang menggunakan zat kimia sebagai penginduksi nyeri (metode *writhing test*). Metode ini dapat untuk menguji aktivitas analgesik senyawa AINS karena nyeri yang ditimbulkan oleh senyawa kimia yang digunakan melibatkan mediator inflamasi. Disamping itu, metode ini sederhana, mudah pelaksanaan dan pengamatannya. Metode *writhing test* merupakan metode uji aktivitas yang memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis analgetika yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri. Cara ini lebih disukai karena dapat diperoleh perkiraan kuantitas aktivitas analgetika (Turner, 1965).

Senyawa yang dapat digunakan sebagai penginduksi nyeri adalah fenilkinon, bradikinin, larutan KCl 2 %, larutan asam asetat dan histamin (Turner, 1965). Diyah *et al* (2002) menggunakan larutan asam asetat 0,6% dengan volume 0,01 ml/ g bb secara intraperitoneal; Studiawan (1995), Setiawati (1998), Ekasari (1998), Turnip (1998) dan Kresnamurti (2002) menggunakan larutan asam asetat 0,6% dengan volume 10 ml/ kg bb. Pada penelitian ini digunakan larutan asam asetat 0,6 % karena nyeri yang terjadi akibat induksi kimiawi bahan ini berhubungan dengan faktor inflamasi.

Respon nyeri yang tampak akibat rangsangan kimiawi adalah menggeliatnya mencit setelah pemberian senyawa penginduksi nyeri. Aktivitas analgesik senyawa uji ditentukan berdasarkan kemampuannya menurunkan frekuensi respon nyeri. Obat dinyatakan mempunyai aktivitas analgesik bila mempunyai ED_{50} aktivitas analgesik yang sebanding atau lebih besar daripada ED_{50} senyawa pembanding. Sebagai senyawa pembanding digunakan asam asetilsalisilat yang merupakan standar untuk senyawa analgesik-antiinflamasi, disamping itu asam asetilsalisilat juga merupakan turunan salisilat.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka dapat dirumuskan bahwa permasalahan dalam penelitian ini adalah :

- Apakah senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik
- Bagaimana potensi analgesiknya jika dibandingkan dengan asam asetilsalisilat.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- Mengetahui aktivitas analgesik senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dengan metode *writhing test*
- Mengetahui potensi analgesik asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dengan menggunakan senyawa pembanding asam asetilsalisilat.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah

- Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik
- Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar daripada asam asetilsalisilat.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna mengenai data aktivitas analgesik senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat untuk kemudian dapat dimanfaatkan dan dikembangkan lebih lanjut dalam rangka mendapatkan senyawa dengan aktivitas penekan rasa nyeri yang lebih besar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Nyeri

Nyeri dipandang sebagai suatu sindroma dari sensasi yang sangat tidak menyenangkan (Gringauz, 1997). Nyeri dapat dikelompokkan sebagai nyeri akut dan kronik. Nyeri akut dihasilkan dari penyakit, kecelakaan, zat kimia, atau rangsangan fisik (seperti panas). Nyeri kronik didapatkan dari fisik, emosional, dan stres sosial. Secara klinik, nyeri akut meliputi nyeri gigi akut, nyeri persalinan, dan nyeri pasca bedah. Berdasarkan asalnya, nyeri dibedakan menjadi nyeri viseral dan nyeri somatik. Nyeri viseral adalah nyeri yang berasal dari bagian nonskeletal, contohnya nyeri lambung, kejang usus, dan kolik. Obat analgesik non narkotika atau analgesik-antiinflamasi umumnya tidak efektif pada keadaan seperti ini. Nyeri somatik adalah nyeri yang berasal dari otot dan tulang, meliputi nyeri kepala, nyeri terkilir, atau nyeri artritis, yang dapat dihilangkan dengan menggunakan obat analgesik-antiinflamasi (Gringauz, 1997). Rasa nyeri merupakan suatu gejala, yang fungsinya adalah melindungi dan memberikan tanda bahaya tentang adanya gangguan-gangguan di tubuh seperti peradangan (rematik, encok), infeksi-infeksi atau kejang otot (Tjay dan Rahardja, 2002).

Penyebab nyeri antara lain adalah rangsangan mekanis atau kimiawi, yang dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan dan melepaskan zat-zat tertentu yang disebut mediator (perantara) nyeri. Zat-zat ini lalu merangsang reseptor nyeri yang terletak pada ujung-ujung saraf di kulit, selaput lendir dan jaringan / organ lainnya. Dari tempat ini rangsangan dialirkan melalui saraf-saraf sensoris ke Sistem Saraf Pusat (SSP) melalui sumsum tulang belakang ke thalamus dan kemudian ke pusat nyeri di dalam otak besar. Di sini rangsangan dinyatakan sebagai nyeri (Tjay dan Rahardja, 2002).

Mediator-mediator nyeri yang terpenting adalah histamin, serotonin (5-hidroksitriptamin), bradikinin dan prostaglandin, serta ion-ion kalium. Zat-zat ini menyebabkan 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 (Gan, 1999).

Berdasarkan proses terjadinya nyeri tersebut diatas, maka nyeri dapat dilawan dengan beberapa cara, yakni dengan: (Tjay dan Rahardja, 2002)

- (1) Merintang pembenturan rangsangan dalam reseptor nyeri perifer, oleh analgetika perifer (analgetika-antiinflamasi).
- (2) Merintang penyaluran rangsangan nyeri dalam saraf sensoris, misalnya dengan anestetika lokal.
- (3) Blokade pusat nyeri dalam SSP dengan analgetika sentral (narkotika) atau dengan anestetika umum.

Pengobatan nyeri dengan analgetika tergantung dari jenis nyeri, yaitu:

- (1) Nyeri yang ringan, seperti sakit gigi, kepala, otot pada infeksi virus, nyeri selama haid, keseleo dan sebagainya, dapat diobati dengan analgetika perifer, misalnya asam asetilsalisilat atau parasetamol.
- (2) Nyeri ringan yang menahun, seperti rematik dan artrosis, diobati dengan analgetika (atau zat-zat lain) yang berkhasiat antiinflamasi, antara lain asam asetilsalisilat, ibuprofen, indometasin.
- (3) Nyeri yang hebat, seperti nyeri organ-organ dalam (lambung, usus) antara lain akibat kolik pada serangan batu ginjal dan batu empedu, diobati dengan analgetika sentral (narkotika).
- (4) Nyeri hebat yang menahun, misalnya kanker, atau kadang-kadang rematik dan neuralgia, diobati dengan obat-obat yang berefek kuat seperti analgetika narkotik fentanil, dekstromoramide (Tjay dan Rahardja, 2002).

2.2 Tinjauan Tentang Analgetika Non Narkotik

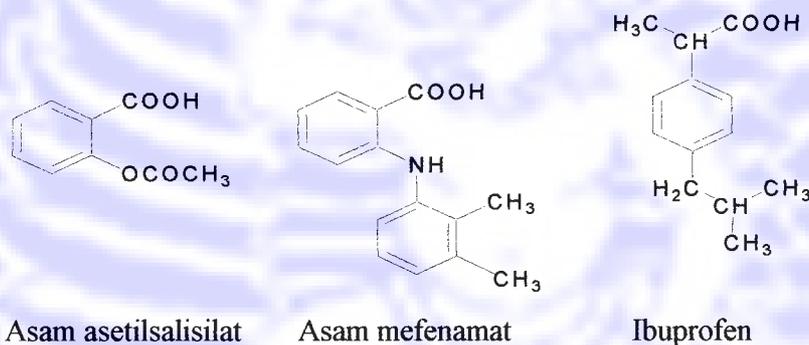
Analgetika adalah senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, digunakan untuk menghilangkan rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran.

Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik (analgetik-antipiretik) (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Obat analgetika-antipiretik mempunyai kemampuan meredakan nyeri ringan dan efektif dalam menurunkan demam ke tingkat normal. Yang termasuk kelompok ini adalah senyawa turunan anilin seperti : asetanilida, fenasetin, dan asetaminofen (Gringauz, 1997).

Analgetika non narkotik sering pula disebut analgetik-antipiretik dan antiinflamasi non steroid (AINS). Analgetika non narkotik bekerja pada perifer dan sistem saraf pusat. Obat golongan ini digunakan untuk mengurangi rasa sakit yang ringan sampai sedang (analgesik), untuk menurunkan suhu badan pada keadaan panas badan tinggi (antipiretika) dan sebagai anti radang (antinflamasi) untuk pengobatan rematik. Analgetika non narkotik digunakan untuk pengobatan simptomatik, yaitu hanya meringankan gejala penyakit, tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit. (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Analgetika non narkotik yang mempunyai aktivitas analgesik dan antiinflamasi disebut AINS.

Contoh-contoh AINS berdasarkan kelompok struktur adalah turunan asam salisilat, misalnya metil salisilat, asam asetilsalisilat ; turunan asam N-arilantranilat misalnya asam mefenamat, asam flufenamat ; turunan asam arilasetat misalnya diklofenak Na, ibuprofen ; turunan asam heteroarilasetat misalnya indometasin; turunan oksikam misalnya piroksikam, tenoksikam.



Wöhler secara tidak langsung memperkenalkan sintesis urea pada tahun 1928. Dia menunjukkan bahwa sintesis kimia dapat digunakan untuk membuat dan memproduksi obat. Analgesik sintetik pertama yang digunakan sebagai obat adalah salisilat. Aslinya senyawa ini terdapat dalam (metil salisilat, salisin) dan kemudian disintesis oleh ahli kimia. Obat lain yang mula-mula dibuat orang adalah asetanilid (1886), fenasetin (1887) dan aspirin (1899) (Willette, R.E., 1991).

Struktur kimia obat AINS 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). Gugus anionik ini merupakan gugus farmakoforik bagi senyawa-senyawa AINS. Senyawa yang paling dikenal dan banyak digunakan adalah dari turunan salisilat. Asam asetilsalisilat merupakan prototipe analgetika antiinflamasi. Hingga kini obat-obat AINS masih dinilai dengan membandingkannya terhadap aspirin dan aspirin adalah obat pilihan pertama untuk keadaan rematik (Gringauz, 1997).

Analgetika non narkotik menimbulkan efek analgesik dengan cara menghambat secara langsung dan selektif enzim-enzim yang mengkatalisis biosintesis prostaglandin, yaitu siklooksigenase, sehingga mencegah sensitisasi reseptor nyeri (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Aktivitas analgesik jauh lebih lama dibanding golongan analgetika narkotik, tetapi tidak menimbulkan ketagihan dan tidak menimbulkan efek samping sentral yang merugikan (Gan, 1995).

2.3 Tinjauan Tentang Mekanisme Kerja Obat Antiinflamasi Nonsteroid

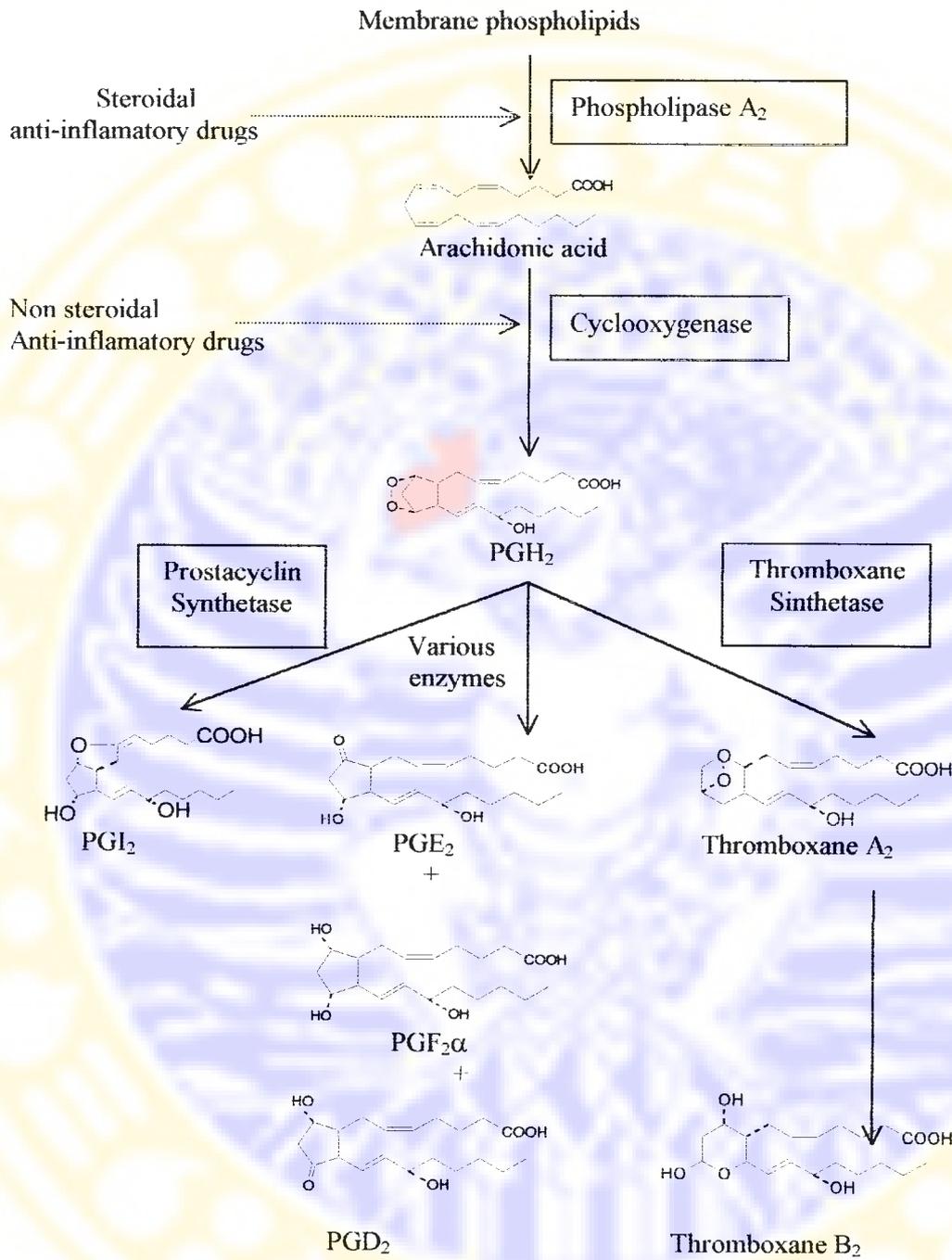
Efek terapi maupun efek samping obat antiinflamasi nonsteroid sebagian besar tergantung dari penghambatan biosintesis prostaglandin. Mekanisme kerja yang berhubungan dengan sistem sintesis prostaglandin ini mulai dilaporkan mulai tahun 1971 oleh Vane dan kawan-kawan yang memperlihatkan secara *invitro* bahwa dosis rendah aspirin dan indometasin dapat menghambat produksi prostaglandin. Penelitian lanjutan telah membuktikan bahwa prostaglandin akan dilepas bilamana sel mengalami kerusakan. Obat antiinflamasi nonsteroid secara umum tidak menghambat biosintesis leukotrien, yang diketahui ikut berperan dalam inflamasi (Gan, 1999).

Semua obat golongan AINS mempunyai kemampuan menghambat siklooksigenase dan mengakibatkan penghambatan sintesis prostaglandin. Sayangnya, hambatan sintesis prostaglandin dalam mukosa lambung seringkali mengakibatkan kerusakan gastrointestinal. Efek samping yang lebih serius meliputi perdarahan gastrointestinal dan perforasi (Neal, 1992). Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara yang berbeda. Khusus parasetamol hambatan prostaglandin terjadi bila lingkungannya rendah kadar peroksida, seperti di hipotalamus. Lokasi inflamasi biasanya mengandung banyak peroksida yang dihasilkan oleh leukosit. Ini menjelaskan mengapa parasetamol tidak mempunyai efek antiinflamasi. Aspirin menghambat siklooksigenase dengan mengasetilasi gugus aktif serin dari enzim ini. Trombosit sangat rentan terhadap penghambatan ini karena sel ini tidak

mampu mengadakan regenerasi enzimnya sehingga dosis aspirin 40 mg sehari telah cukup untuk menghambat siklooksigenase trombosit manusia selama masa hidup trombosit yaitu 8-11 hari (Gan, 1999).

Fenomena inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskuler, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan inflamasi. Selama berlangsungnya fenomena inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, 5-hidroksitriptamin (5-HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin. Obat mirip aspirin tidak berefek terhadap mediator-mediator kimiawi tersebut kecuali prostaglandin. Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian menunjukkan bahwa prostaglandin menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Obat mirip aspirin tidak mempengaruhi hiperalgesia atau nyeri yang ditimbulkan oleh efek langsung prostaglandin. Ini menunjukkan bahwa sintesis prostaglandin yang dihambat oleh golongan obat ini dan bukannya blokade langsung.

Pada keadaan demam, keseimbangan antara produksi dan hilangnya panas terganggu tetapi dapat dikembalikan oleh obat mirip aspirin. Peningkatan suhu tubuh pada keadaan patologik diawali oleh pelepasan suatu zat pirogen endogen atau sitokin seperti interleukin-1 (IL-1) yang memacu pelepasan prostaglandin yang berlebihan di daerah preoptik hipotalamus. Obat mirip aspirin menekan efek zat pirogen endogen dengan menghambat sintesis prostaglandin. Tetapi demam yang timbul akibat pemberian prostaglandin tidak dipengaruhi oleh obat tersebut, demikian pula peningkatan suhu oleh sebab lain seperti latihan fisik (Gan, 1999).



Gambar 2.1 Biosintesis Prostaglandin



2.4. Tinjauan tentang Senyawa Turunan Salisilat

Menurut sejarahnya, salisilat adalah diantara kelompok pertama yang dikenalkan sebagai analgesik. Laroux, pada tahun 1827, mengisolasi salisin, dan piria, pada tahun 1838 membuat asam salisilat dari minyak wintergreen (metil salisilat); dan Kolbe dan Lautermann (1860) secara sintetik membuat dari fenol. Natrium salisilat diperkenalkan pada tahun 1875 oleh Buss, diikuti dengan diperkenalkan fenil salisilat oleh Nencki pada tahun 1886, digunakan pada pengobatan rematik dan sebagai antipiretika pertama kali pada 1985 (Insel, 1992). Aspirin, atau asam asetil salisilat, pertama kali dibuat oleh Gerhardt pada tahun 1853, tetapi tetap terselubung sampai Felix Hofmann menemukan aktifitas farmakologinya pada tahun 1899. Dia diuji dan diperkenalkan dalam pengobatan oleh Dreser, yang memberi nama aspirin dengan mengambil “a” dari asetil dan menambah “spirin”, nama kuno dari salisilat atau asam spirat, diturunkan dari sumber alami tanaman spirea. (Willette, R.E., 1991).

Aspirin diperkenalkan dalam pengobatan oleh Dresser pada tahun 1899. Dibuat dengan mengubah asam salisilat, yang pertama kali dibuat oleh Kolbe pada tahun 1874, dengan anhidrida asetat. Atom hidrogen pada gugus fenolat dari asam salisilat telah diganti dengan gugus asetil, dapat juga dilakukan dengan menggunakan asetil klorida dengan asam salisilat atau keton dengan asam salisilat. (Willette, R.E., 1991).

Asam asetilsalisilat merupakan asam lemah, pada lambung yang bersifat asam akan terdapat dalam bentuk tidak terionisasi, mudah larut dalam lemak sehingga mudah menembus membran lambung. Perbandingan obat yang larut dalam lemak dan yang larut dalam air dinyatakan dengan koefisien partisi. Koefisien partisi daripada asam asetilsalisilat adalah 2,0 dengan % penyerapan 21% (Siswandono dan Soekardjo,2000). Untuk aktivitas antiinflamasi, asam asetilsalisilat terikat dengan protein-plasma 150-300 µg/ml dalam tubuh (Sweetman, 2002).

Farmakologi salisilat dan senyawa turunannya, secara umum menunjukkan aksi antipiretik pada pasien demam dengan menaikkan eliminasi panas badan melalui mobilisasi air dan berakibat pengenceran darah. Ini menghasilkan perspirasi, menyebabkan dilatasi kulit. Hal ini tidak terjadi pada suhu normal, aksi antipiretik dan analgesik diyakini terjadi didaerah hipotalamik otak. Beberapa orang memperkirakan bahwa salisilat menunjukkan aktivitas analgesik dengan efek pada keseimbangan air, menurunkan udem yang umumnya bersama-sama artralgia. Dalam keadaan ini aspirin sangat efektif.

Efek farmakologis turunan salisilat adalah dapat meredakan rasa nyeri melalui aksi perifer. Nyeri pasca operasi atau yang berasal dari inflamasi dapat dikendalikan dengan baik, sedangkan nyeri yang berasal dari organ dalam umumnya tidak dapat diredakan. Turunan salisilat dapat menurunkan suhu tubuh yang tinggi dengan cepat, tetapi tidak menurunkan suhu tubuh normal.

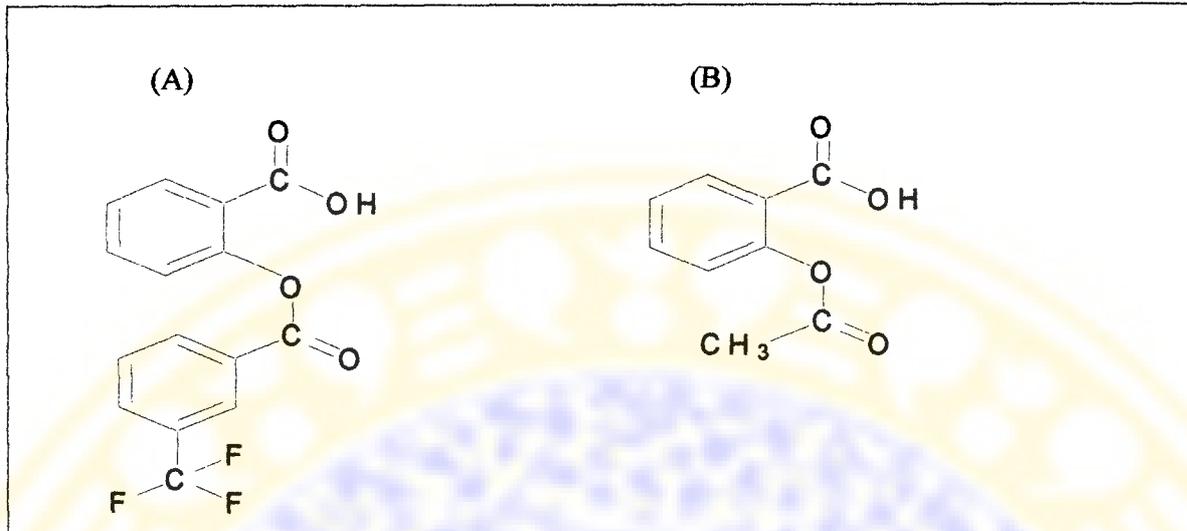
2.5. Tinjauan tentang Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat

Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat merupakan ester fenolat asam salisilat. Atom hidrogen gugus fenolat diganti dengan gugus benzoil tersubstitusi trifluorometil pada posisi 3, dengan demikian turunan ini analog dengan asam asetilsalisilat. Beberapa turunan asam O-benzoilsalisilat yang telah disintesis antara lain : asam O-(4-aminobenzoil)salisilat, asam O-(4-bromobenzoil)salisilat (Diyah, 1998), dan asam O-(4-butylbenzoil)salisilat (Diyah dkk, 2002).

Senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dibuat berdasarkan reaksi Schotten-Baumann yang dimodifikasi (Diyah dkk., 2001). Asam salisilat direaksikan dengan 3-trifluorometilbenzoil klorida dalam pelarut THF dengan penambahan NaOH 10% untuk menjaga pH sekitar 7. Senyawa hasil sintesis direkristalisasi dengan aseton.

Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat, $C_{15}H_9F_3O_4$, mempunyai bobot molekul 310. Senyawa ini berupa zat padat putih, tidak larut air, tetapi larut dalam etanol, metanol, kloroform dan aseton; larutan dalam metanol menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 222 nm (Diyah dkk, 2001).

Berdasarkan uji aktivitas antiinflamasi dengan metode edema terinduksi karagenan pada kaki tikus diketahui bahwa pada penggunaan secara oral senyawa ini mempunyai ED_{50} (mg/kg) lebih rendah daripada asam asetilsalisilat tetapi secara molar (mmol/kg) sebanding dengan asam asetilsalisilat. ED_{50} asam asetilsalisilat adalah 78 mg/kg (0,43 mmol/kg), sedangkan ED_{50} asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat adalah 143 mg/kg (0,46 mmol/kg). Senyawa ini aktivitas analgesiknya belum diketahui.



Gambar 2.2. Struktur asam O-(3-trifluorometilbenzoyl)salisilat (A) dan asam asetilsalisilat (B)

2.6 Tinjauan Tentang Metode Pengujian aktivitas Analgesik

Metode-metode pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menilai kemampuan zat uji untuk menekan atau menghilangkan nyeri yang diinduksi pada hewan coba (mencit, tikus, marmot), yang meliputi induksi secara mekanik, teknik, elektrik dan secara kimia. Pada umumnya daya kerja analgesik pada hewan dinilai dengan (Dipalma,1971).

- (1) Mengukur besarnya peningkatan stimulus nyeri yang harus diberikan sampai ada respon nyeri
- (2) Jangka waktu ketahanan hewan terhadap stimulus nyeri
- (3) Peranan frekuensi respon nyeri.

2.6.1 Metode Stimulasi Panas

Penggunaan stimulasi rangsangan panas diberikan secara radiasi dengan intensitas tetap. Metode ini dikenal dengan *tail flick* dari D'amour-Smith. Sebagai sumber radiasi digunakan tegangan 6-8 volt yang dilengkapi satu refraktor untuk memfokuskan radiasi panas lampu melalui suatu lensa menuju ujung ekor tikus yang terletak 6 inci dibawah lampu.

Jenis uji yang lain yang mirip dengan prinsip di atas adalah metode yang digunakan oleh Bass dan Van Der brook. Perbedaannya yaitu lampu yang digunakan 100 watt, lama penyinaran direkam secara otomatis pada pencatat waktu. Metode ini lebih memudahkan

pengamatan respon hewan dengan pemakaian stop watch dibandingkan metode dengan panas radiasi pada *tail flick* dari D'amour-Smith yang sangat melelahkan mata.

Stimulus panas dapat juga diberikan secara konduksi, dikenal sebagai metode *Hot Plate* dari Wolf dan Mc.Donald. Hewan coba (mencit) diamati waktu reaksinya setelah diletakkan diatas *Hot Plate*. Pada suhu dibawah 50°C mencit memberikan reaksi yang tidak teratur. Pada suhu 55°C waktu reaksinya 30 detik, dan pada suhu 60°C waktu reaksinya 20 detik. Reaksi atau respon yang ditunjukkan antara lain: menjilat kaki, mengangkat kaki, menendang kaki atau meloncat keluar dari silinder. Mencit akan menunjukkan reaksi-reaksi tersebut jika dikenakan pada kondisi-kondisi yang tidak menyenangkan (Domer, 1971).

Keuntungan metode stimulasi panas (Lineberry, 1981) :

- (1) rangsangannya alami
- (2) mudah dikontrol
- (3) tidak menyebabkan kerusakan jaringan walaupun rangsangan untuk menimbulkan rasa sakit dilakukan berkali-kali
- (4) dapat digunakan pada subyek yang bergerak ataupun tidak bergerak.

2.6.2 Metode Stimulasi Listrik.

Stimulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain: (Lineberry, 1981)

- (1) melalui jaringan listrik pada lantai
- (2) dengan elektrode yang ditempelkan pada kulit
- (3) dengan elektrode yang ditanam pada *ganglia sensoris* atau pada tempat susunan saraf pusat.

Pada metode ini digunakan binatang besar seperti kera *Macaca mulata*. Elektroda aliran listrik dipasang di *ganglion gaseri* atau telinga. Kemudian kera dilatih dengan memberikan arus tertentu. Apabila kera merasa kesakitan dan dapat menyentuh level tertentu yang tersedia maka arus akan turun satu tingkat secara otomatis. Dengan demikian akan dapat diukur ambang rasa sakitnya. Kemudian setelah perlakuan, percobaan diulang kembali. Bila ambang rasa sakit meningkat setelah perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa obat tersebut memiliki efek analgetika. Metode ini memerlukan perlengkapan khusus yang rumit. Metode yang lain adalah metode pulpa gigi, tetapi hal ini sulit dilakukan karena memerlukan ketrampilan yang tinggi (Domer, 1971).

Keuntungan: (Lineberry, 1981)

- (1) dapat dikontrol dengan mudah dengan menggunakan stimulator arus listrik yang dipertahankan konstan walaupun terjadi fluktuasi daya tahan subyek
- (2) dapat digunakan dan diukur dengan mudah
- (3) dapat menghasilkan tingkatan-tingkatan sakit yang tinggi tanpa merusak jaringan
- (4) dapat diulang dengan interval yang sangat pendek
- (5) onsetnya cepat
- (6) dapat digunakan pada segala macam spesies.

2.6.3 Metode Stimulasi Tekanan.

Tekanan diberikan pada ekor tikus menggunakan suatu 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).

Keuntungan metode ini antara lain : rangsangannya alami dan dapat digunakan dengan mudah tanpa peralatan mekanik atau elektronik yang mahal. Kendala penggunaan metode ini antara lain:

- (1) meskipun stimulasi tekanan adalah stimulasi alami yang digunakan, kontrol dan ukuran parameter stimulus yang baik sulit dicapai tanpa peralatan mekanik dan elektronik yang mahal
- (2) metode ini hanya dapat digunakan jika hewan coba telah dibius karena akan terjadi kesulitan pada kontrol dan pengukuran jika digunakan pada hewan coba yang bergerak

2.6.4 Metode Stimulasi Kimiawi.

Stimulasi kimiawi yang diterapkan pada hewan kecil berupa *Mus musculus* adalah berupa penyuntikan secara intraperitoneal bahan-bahan yang dapat menimbulkan respon karakteristik seperti menggeliat, meregang, atau kontraksi otot-otot abdomen. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Siegmund dkk. menggunakan fenilkinon 0,02 % sebanyak 0,25 ml. Nickander dkk. 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).

Pemilihan metode pengujian aktivitas analgesik tidak hanya pengukuran intensitas, tetapi juga lama kerja obat untuk menghindari kerusakan permanen suatu jaringan akibat observasi berulang. Metode uji aktivitas yang memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis analgetika yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri lebih disukai karena dapat diperoleh perkiraan kuantitas aktivitas analgetika.

Efektivitas analgetika tidak dapat dinilai dengan menggunakan obyek sehat. Eksperimen menggunakan obyek sehat berguna untuk penilaian ada tidaknya efek serta potensi analgetika suatu bahan. Sedangkan pengukuran pada subyek sakit berguna untuk menentukan efektivitas bahan pada keadaan yang paling sesuai untuk keadaan klinis (Turner, 1965).

Pada metode ini aktivitas analgesik ditentukan dengan mengamati frekuensi konstiksi abdominal (geliat) 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 menggambarkan kemampuan senyawa meningkatkan “ambang nyeri” (Diyah dkk, 2002).

2.7. Penentuan ED₅₀ Dengan Analisis Regresi

Variasi biologis dalam aktivitas obat merupakan alasan penting mengapa pengobatan 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. Ada tiga tipe pengukuran kuantitatif pada efek obat terhadap hewan coba, yaitu : efek individu, dengan mengukur dosis efektif individu terhadap hewan coba; efek bertingkat, yaitu dengan mengukur efek obat terhadap tiap-tiap hewan coba dalam satu kelompok uji, dengan dosis yang bervariasi; Efek kuantal, yaitu mengukur respons “ semua atau tidak “ (*all or none* = respons kuantal) dari suatu kelompok hewan coba, dengan menentukan persen respons. Di sini pengamatan hanyalah mengenai masalah terjadi atau tidak terjadinya efek pada tiap hewan coba, seperti hewan yang mati atau yang menunjukkan gejala respons tertentu (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

ED_{50} adalah dosis yang digunakan efektif terhadap 50 % hewan coba. Dosis yang digunakan pada umumnya merupakan kelipatan dua (misal 25, 50, 100, 125, 200 mg / Kg BB dst). Nilai ED_{50} berbeda-beda untuk setiap cara pemberian. Bila respon adalah kematian maka ED_{50} menjadi LD_{50} (Median Letal Dose) atau dosis kematian untuk 50 % hewan coba.

ED_{50} aktivitas analgesik berdasarkan metode *writhing test* adalah dosis yang menimbulkan efek hambatan 50 % berdasarkan kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri.

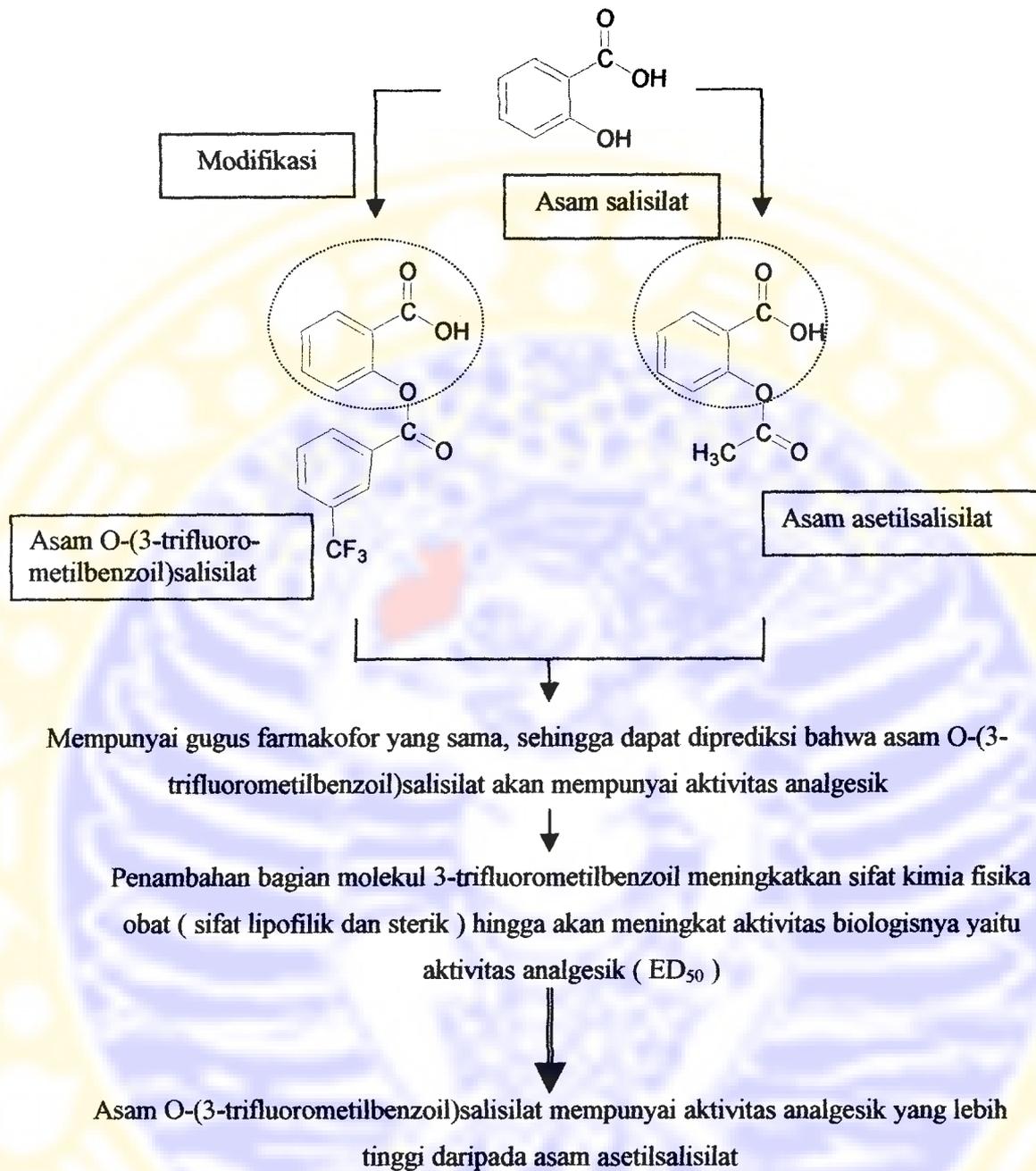
Nilai ED_{50} dan LD_{50} dapat dihitung dengan menggunakan metode grafik. Kurva hubungan dosis dengan respon biologis pada umumnya memberikan gambaran yang sigmoid, sehingga agar menjadi garis lurus perlu dilakukan analisis regresi dengan menjadikan nilai x logaritmik / probit. Litchfied dan fertig (1941) telah memperkenalkan cara grafik untuk menggambarkan kurva-dosis efek yang kemudian disederhanakan dan digunakan oleh Miller dan Trainler (1944) untuk menghitung perkiraan nilai ED_{50} atau LD_{50} dengan menggunakan kertas grafik log probit. Efek transformasi grafik adalah meregangkan akhir kurva sigmoid yang diperoleh dengan memplot respon terhadap logaritma dosis sehingga menjadi garis lurus. Untuk menghitung ED_{50} dapat digunakan komputer program SPSS (Lien, 1978).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Telah disintesis senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan dibuat dengan mengubah atom hidrogen fenolat dengan gugus benzoil tersubstitusi trifluorometil pada posisi 3. Dengan demikian turunan ini analog dengan asam asetilsalisilat. Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai gugus farmakofor yang sama dengan asam asetilsalisilat. Dengan hanya mengganti gugus OH pada asam salisilat, maka senyawa ini akan mempunyai aktivitas yang sama dengan asam asetilsalisilat, yaitu analgesik-antiinflamasi.

Dari data yang didapatkan pada peneliti sebelumnya diketahui bahwa aktivitas antiinflamasi turunan salisilat, asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai sifat lipofilik dan sterik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat (Diyah dkk, 2001). Hal ini disebabkan adanya penambahan gugus besar yang bersifat non polar akan terjadi peningkatan aktivitas dari senyawa ini (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Sehingga asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat akan mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat.



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

BAB IV

BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN

3.1. Bahan

3.1.1. Bahan Kimia

- Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat (Diyah dkk, 2001 *)
- Asam asetilsalisilat (Sigma)
- Asam asetat glasial (E. Merck)
- Natrium karboksimetilselulosa (Sigma)
- Air suling steril
- Alkohol 70%
- Kapas steril
- Kieselgel GF₂₅₄ (E. Merck)
- Kloroform p.a (E. Merck)
- Aseton p.a (E. Merck)
- Etil asetat p.a (E. Merck)

3.1.2. Hewan Coba

Sebagai hewan coba digunakan mencit *Mus musculus* galur BLAB/C, jantan, dewasa berumur 2-3 bulan, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh, dengan berat antara 20 -25 g (Pusvetna, Surabaya).

Untuk satu senyawa digunakan minimal 60 ekor. Mencit dibagi menjadi dua kelompok yaitu :

- Kelompok dosis (25, 50, 100, 125, 200 mg/kg senyawa obat) masing-masing 10 ekor
- Kelompok kontrol (tanpa obat), 10 ekor

Sebelum diberi perlakuan mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama satu minggu.

*) Diyah, N. W., Sardjoko, L. Hakim., 2001. Sintesis dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat. **Majalah Farmasi Airlangga**. Vol.1. No. 3. hal. 56-67.

3.2. Alat

- Alat-alat untuk pembuatan sediaan
- Neraca analitik Sartorius 2472
- Fisher *Electrothermal melting point apparatus*
- Alat-alat gelas (erlenmeyer, batang pengaduk, beker glass, dll)
- Timbangan menciit (Ohaus)
- Spuit 1ml dan 2 ml
- Jarum suntik
- Stop watch
- Bejana Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
- Wadah menciit beserta tutupnya

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Analisis Kualitatif

3.3.1.1. Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan meliputi bentuk, bau, dan rasa.

3.3.1.2. Pemeriksaan Kualitatif (Auterhoff & Kovar, 1987)

1. Reaksi besi (III) klorida :

- a. Larutan zat direaksikan dengan FeCl_3 , terbentuk warna kuning/coklat.
- b. Larutan zat dalam air direaksikan dengan pereaksi FeCl_3 , dimasak sebentar, lalu didinginkan kembali. Terbentuk warna ungu.

2. Uji titik leleh menggunakan Fisher *electrothermal melting point apparatus*

Sedikit zat digerus halus kemudian dimasukkan kedalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya tertutup. Selanjutnya pipa kapiler dimasukkan kedalam alat penentu titik leleh dan diamati suhu zat tersebut mulai meleleh sampai semua zat meleleh. Percobaan diulang tiga kali dan dicatat jarak leburnya.

3. Uji KLT menggunakan fase gerak beberapa campuran pelarut serta penampak bercak lampu UV 254 nm. Pelarut/campuran pelarut yang digunakan sebagai fase gerak adalah kloroform-aseton (80 : 20) dan etil asetat-metanol (85 : 15)
Bejana KLT diisi eluen, didiamkan hingga jenuh. Kemudian sejumlah zat dilarutkan dalam aseton kemudian ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diberi

batas atas 1 cm dan batas bawah 2 cm, lempeng dimasukkan dalam bejana KLT yang telah jenuh dengan pelarut. Elusi dilakukan sampai pelarut mencapai batas atas pada lempeng KLT.

4. Pemeriksaan spektrum ultraviolet senyawa dalam pelarut metanol menggunakan alat spektrofotometer ultraviolet-visibel. Sejumlah zat dilarutkan dalam metanol kemudian diamati serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm.

3.3.2. Uji Aktivitas Analgesik

Aktivitas analgesik ditentukan dengan metode penghambatan nyeri terinduksi secara kimiawi (*Writhing Test*). Sebagai penginduksi nyeri digunakan larutan asam asetat 0,6 % (Diyah, 2002).

3.3.2.1. Persiapan hewan coba.

Sejumlah mencit berbobot 20-25 g dibagi dalam beberapa kelompok, yaitu 5 kelompok dosis (25, 50, 100, 125, 200 mg/kg) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 10 ekor. Untuk senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat digunakan mencit minimal 60 ekor dan untuk senyawa pembanding (asam asetilsalisilat) minimal 60 ekor.

Sebelum percobaan, mencit dipuasakan semalam tetapi tetap diberi minum. Mencit dalam kelompok dosis akan diberi senyawa uji asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat atau senyawa pembanding (asam asetilsalisilat) dosis tertentu secara bertingkat (25, 50, 100, 125, 200 mg/kg), sedangkan mencit dalam kelompok kontrol tidak diberi senyawa uji/pembanding, hanya diberi larutan CMC Na 0,5 %.

3.3.2.2. Pembuatan larutan asam asetat 0,6 % .

Dipipet sejumlah 0,6 ml asam asetat glasial dimasukkan dalam air suling, kemudian dimasukkan labu ukur dan diencerkan dengan air suling steril hingga diperoleh volume 100 ml.

3.3.2.3. Pembuatan sediaan uji

Sediaan uji meliputi suspensi asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan suspensi asam asetilsalisilat. Suspensi dibuat segera sebelum uji aktivitas dilakukan dan tidak disimpan untuk digunakan diwaktu yang lain.

- a. Pembuatan mucilago untuk 100 ml suspensi, ditimbang 500 mg CMC Na ditaburkan diatas air suling panas 30 ml dan dibiarkan mengembang selama sekitar 5 menit, kemudian digerus hingga homogen.
- b. Untuk dosis 25, 50, 100, 125, 200 mg, ditimbang berturut-turut 250, 500, 1000, 1250, 2000 mg senyawa digerus dan dicampur merata dengan mucilago CMC Na sampai homogen, kemudian dipindahkan kedalam labu ukur, dan ditambah air suling hingga diperoleh volume 100 ml. 5 macam sediaan uji masing-masing mengandung senyawa 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, dan 20 mg/ml

3.3.2.4. Pemberian sediaan uji pada mencit.

Mencit pada masing-masing kelompok dosis (25, 50, 100, 125, 200 mg/kg berat badan) akan diberi suspensi sejumlah volume, yaitu dengan rumus :

$$\frac{\text{BB (g)} \times \text{Dosis (mg/g)}}{\text{Kadar sediaan (mg/ml)}}$$

Jika bobot mencit 20 g, maka :

Untuk dosis 25 mg/kg BB (0,025 mg/g) diberi 0,2 ml sediaan 2,5mg/ml.

untuk dosis 50 mg/kg BB (0,05 mg/g) diberi 0,2 ml sediaan 5 mg/ml.

untuk dosis 100 mg/kg BB (0,100 mg/g) diberi 0,2 ml sediaan 10 mg/ml

untuk dosis 125 mg/kg BB (0,125 mg/g) diberi 0,2 ml sediaan 12,5 mg/ml

untuk dosis 200 mg/kg BB (0,2 mg/g) diberi 0,2 ml sediaan 20 mg/ml

3.3.2.4. Pelaksanaan uji aktivitas. (Diyah, 2002)

Ditimbang 10 mencit dengan bobot tertentu dan diberi tanda dengan nomor kemudian diberi sediaan uji dosis tertentu secara intraperitoneal (i.p). 30 menit setelah pemberian sediaan, mencit tersebut disuntik dengan larutan asam asetat 0,6 % volume 0,1 ml/g berat badan secara i.p.

5 menit setelah penyuntikan dengan larutan asam asetat (penginduksi nyeri), respons geliat pada mencit diamati selama 30 menit dan dicatat frekuensi geliat untuk tiap kelompok yang diberi obat (25, 50, 100, 125, 200 mg/kg) maupun kelompok kontrol (yang tidak diberi obat) dari senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan asam asetilsalisilat. Data frekuensi geliat pada tiap kelompok tersebut dirata-rata.

3.4. Analisa Data

3.4.1. Penentuan % Hambatan Nyeri.

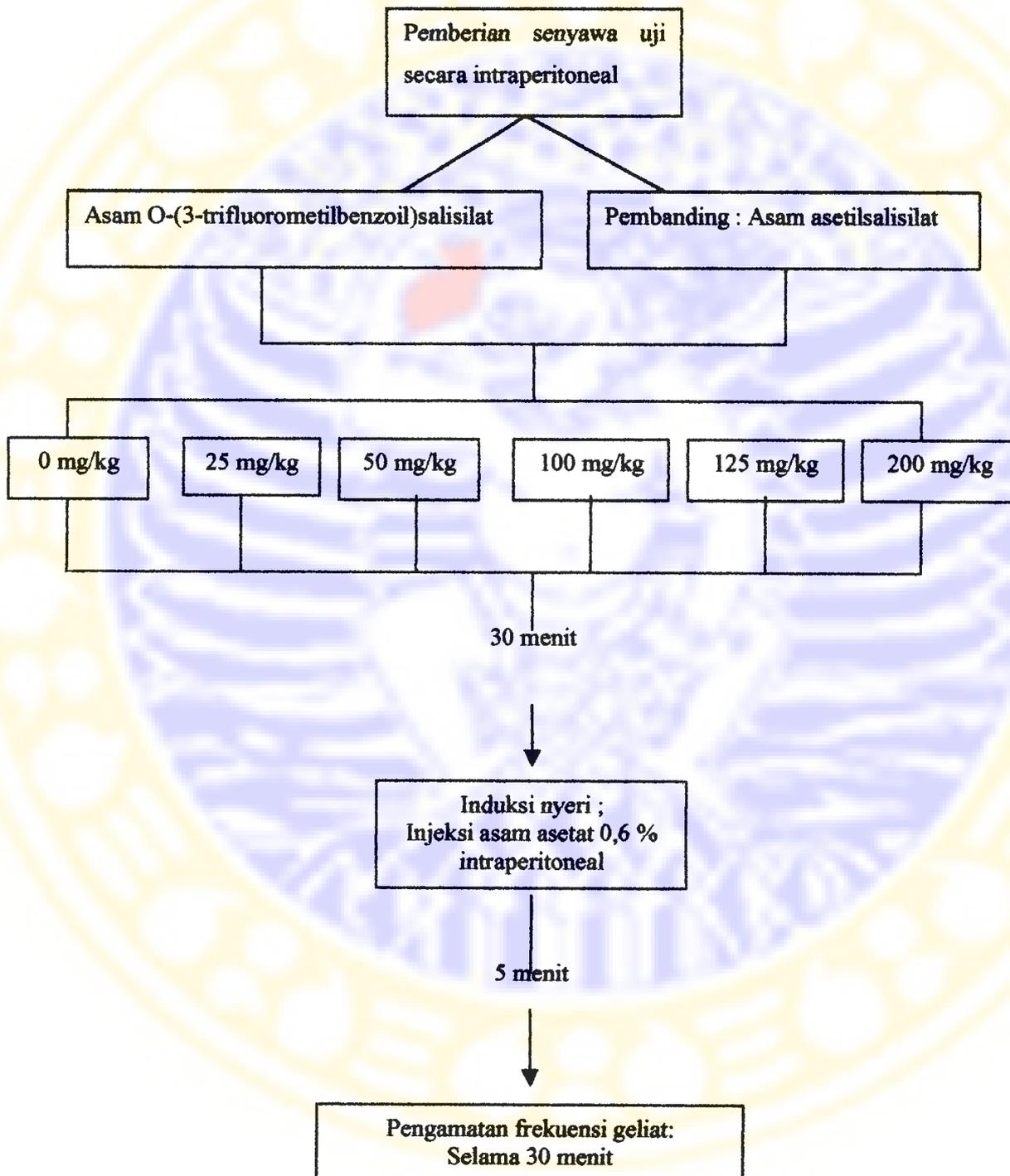
Dari data frekuensi geliat pada mencit dalam masing-masing kelompok dosis dan kelompok kontrol dari senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan senyawa pembanding, selama selang waktu 30 menit dihitung persentase (%) hambatan nyeri dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inh} = 100 - \frac{\Sigma \text{ respon kelompok dosis}}{\Sigma \text{ respon kelompok kontrol}} \times 100$$

3.4.2. Penentuan ED₅₀ aktivitas analgesik

Dari data % hambatan nyeri pada tiap kelompok dosis, dibuat kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri. ED₅₀ hambatan nyeri adalah dosis yang menghasilkan efek hambatan 50 % pada kurva hubungan antara dosis dengan persentase hambatan nyeri.

Untuk menentukan ED₅₀ aktivitas analgesik, data dianalisis statistik dengan cara regresi probit log menggunakan bantuan komputer program SPSS 11.0 (Lien, 1987). Sebagai variabel bebas adalah log dosis, sedangkan variabel tergantung adalah persentase hambatan nyeri.

**RANCANGAN PERCOBAAN
UJI AKTIVITAS ANALGESIK**

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 IDENTIFIKASI SENYAWA ASAM O-(3-TRIFLUOROMETILBENZOIL)- SALISILAT SECARA KUALITATIF

5.1.1 Identifikasi Senyawa Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat

5.1.1.1 Pemeriksaan Organoleptis

Bentuk : Padatan

Warna : Putih

Kelarutan : Tidak larut dalam air, tetapi larut dalam etanol, metanol, kloroform, aseton.

5.1.1.2 Penentuan Jarak Lebur

Tabel V.1 Jarak lebur senyawa Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat

| Replikasi | Jarak Lebur (°C) | Pustaka |
|-----------|------------------|---------|
| 1 | 84-86 | 85-87 |
| 2 | 84-86 | |
| 3 | 84-86 | |

Dari tabel V.1 dapat diketahui bahwa hasil jarak lebur yang diperoleh dari penelitian telah sesuai dengan hasil dari pustaka (Diyah dkk, 2001).

5.1.1.3 Hasil Pemeriksaan Dengan KLT

Dihitung dari harga $R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh eluen}}$

Tabel V.2 Hasil pemeriksaan dengan KLT senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoi)-salisilat

| Pelarut campuran | Jarak yang ditempuh oleh zat (cm) | Jarak yang ditempuh oleh pelarut (cm) | Harga Rf | Pustaka |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------|---------|
| Kloroform-aseton (8:2) | 1,4 | 5 | 0,28 | 0,28 |
| Etilasetat-metanol (8,5:1,5) | 2,2 | 5 | 0,44 | 0,44 |

Dari tabel V.2 didapatkan hasil yang telah sesuai dengan pustaka (Diyah dkk, 2001)

5.2 UJI AKTIVITAS ANALGESIK

Aktivitas obat analgetika ditentukan dengan cara menghitung penurunan frekuensi geliat (respon Nyeri) yang diinduksi secara kimia pada mencit dalam kelompok dosis terhadap mencit dalam kelompok kontrol.

5.2.1 Penentuan Frekuensi Respon Nyeri

Hasil pengamatan frekuensi geliat (respon nyeri) yang terjadi akibat induksi larutan asam asetat pada mencit kelompok senyawa uji asam O-(3-trifluorometilbenzoi)salisilat dosis 25, 50, 100, 125, 200 mg/kg bb dan pada mencit kelompok kontrol (tanpa senyawa uji) dapat dilihat pada tabel V.3. Sedangkan hasil pengamatan frekuensi geliat pada mencit kelompok uji asam asetilsalisilat dan pada mencit kelompok kontrol dapat dilihat pada tabel V.4

Tabel V.3 Frekuensi geliat pada mencit dalam kelompok dosis senyawa uji Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat dan kelompok kontrol.

| No. | Frekuensi geliat mencit pada kelompok dosis dan kelompok kontrol | | | | | |
|-----------|--|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | Kontrol | 25 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg | 125 mg/kg | 200 mg/kg |
| 1. | 35 | 30 | 15 | 9 | 7 | 4 |
| 2. | 37 | 31 | 16 | 10 | 11 | 4 |
| 3. | 46 | 31 | 17 | 11 | 14 | 6 |
| 4. | 46 | 35 | 17 | 18 | 17 | 9 |
| 5. | 51 | 38 | 18 | 18 | 18 | 10 |
| 6. | 55 | 40 | 25 | 19 | 22 | 10 |
| 7. | 55 | 51 | 26 | 25 | 22 | 14 |
| 8. | 57 | 52 | 27 | 28 | 25 | 18 |
| 9. | 58 | 53 | 46 | 30 | 28 | 19 |
| 10. | 63 | 54 | 48 | 36 | 31 | 24 |
| Rata-rata | 50,3 | 41,5 | 25,5 | 20,4 | 19,5 | 11,8 |
| SD | 9,1779 | 9,9917 | 12,1587 | 9,1554 | 7,5609 | 6,7791 |

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok dosis senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat, maka dilakukan uji ANOVA. Dari analisis tersebut diperoleh harga F hitung = 14,099 dan P = 0,000 (lampiran 1)

Tabel V.4 Frekuensi geliat pada mencit kelompok dosis senyawa pembanding Asam asetilsalisilat dan kelompok kontrol.

| No. | Frekuensi geliat pada mencit kelompok dosis dan kelompok kontrol | | | | | |
|-----------|--|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | Kontrol | 25 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg | 125 mg/kg | 200 mg/kg |
| 1. | 78 | 68 | 49 | 26 | 20 | 18 |
| 2. | 81 | 69 | 52 | 30 | 27 | 21 |
| 3. | 88 | 70 | 52 | 32 | 28 | 23 |
| 4. | 90 | 72 | 53 | 35 | 29 | 24 |
| 5. | 91 | 74 | 53 | 37 | 31 | 25 |
| 6. | 94 | 75 | 57 | 40 | 39 | 25 |
| 7. | 97 | 78 | 69 | 42 | 40 | 26 |
| 8. | 98 | 80 | 70 | 46 | 45 | 26 |
| 9. | 98 | 90 | 76 | 55 | 45 | 28 |
| 10. | 99 | 95 | 82 | 58 | 55 | 30 |
| Rata-rata | 91,4 | 77,1 | 61,3 | 40,1 | 35,9 | 24,6 |
| SD | 6,9599 | 8,5763 | 11,8326 | 10,4504 | 10,6609 | 3,2311 |

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok dosis senyawa asam asetilsalisilat, maka dilakukan uji ANOVA. Didapatkan harga F hitung = 48,776 dan $P = 0,000$ (lampiran 2).

Harga F hitung lebih besar daripada F tabel (2,40) dan P kurang dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok dosis dari senyawa asam O-(3-triflurometilbenzoi)salisilat dan asam asetilsalisilat. Selanjutnya data frekuensi geliat tiap kelompok dosis dari masing-masing senyawa dapat digunakan untuk menghitung % hambatan nyeri

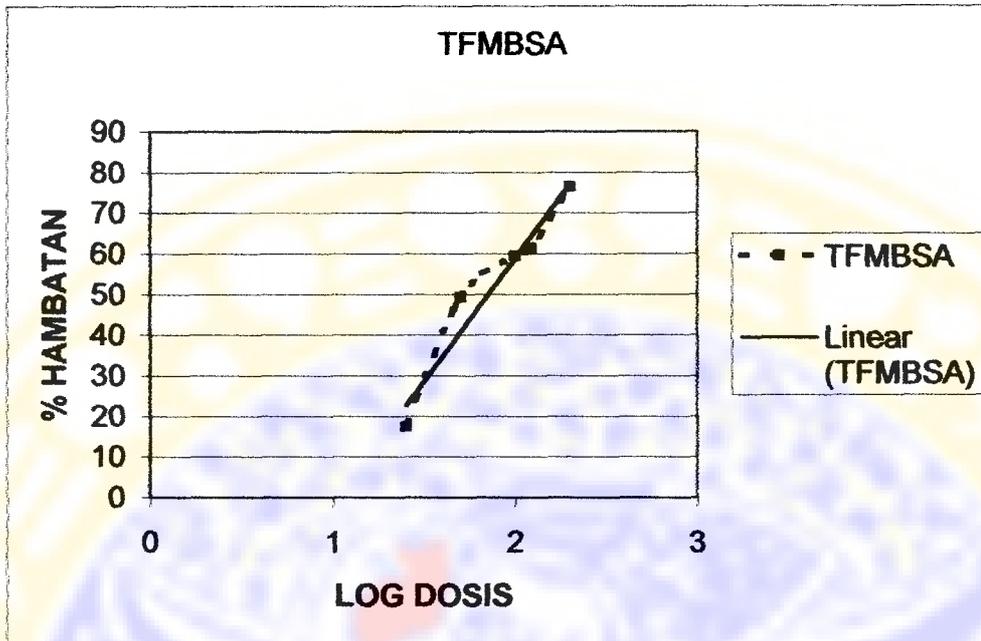
5.2.2 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri

Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri dapat dilihat pada tabel V.5. Cara perhitungan persentase hambatan nyeri masing-masing kelompok senyawa uji dapat dilihat pada lampiran 3.

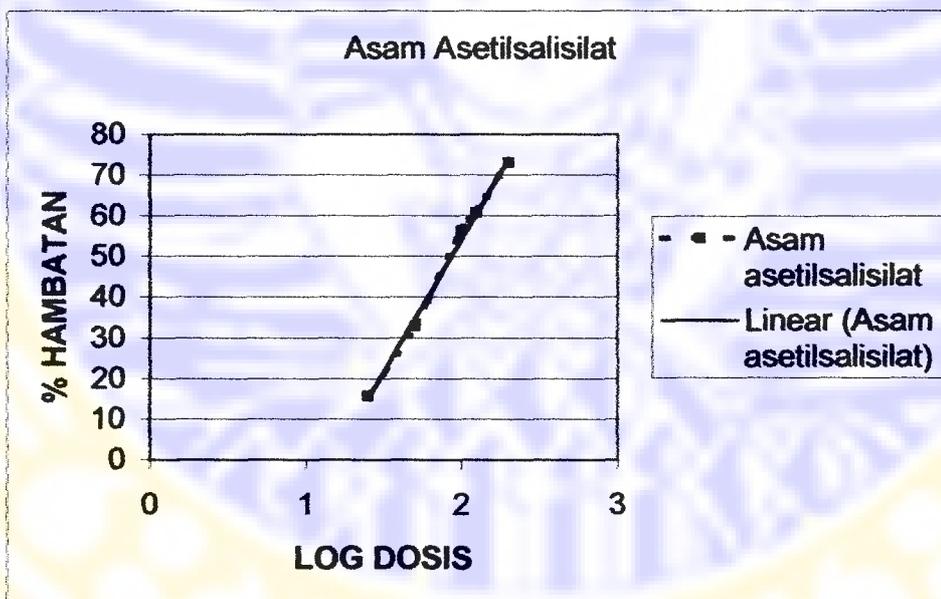
Tabel V.5 Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri pada kelompok yang diberi senyawa uji asam O-(3-Trifluorometilbenzoi)salisilat (TFMBSA) dan asam asetilsalisilat.

| Dosis (mg/kg) | Rata-rata frekuensi geliat | | % hambatan | |
|------------------|----------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| | TFMBSA | Asam asetilsalisilat | TFMBSA | Asam asetilsalisilat |
| 25 mg/kg bb | 41,5 | 77,1 | 17,49 | 15,64 |
| 50 mg/kg bb | 25,5 | 61,3 | 49,30 | 32,93 |
| 100 mg/kg bb | 20,4 | 40,1 | 59,44 | 56,13 |
| 125 mg/kg bb | 19,5 | 35,9 | 61,23 | 60,72 |
| 200 mg/kg bb | 11,8 | 24,6 | 76,54 | 73,08 |
| Kontrol | 50,3 | 91,4 | | |

Dari tabel V.5 didapatkan kurva hubungan antara log dosis dengan % hambatan



Gambar 5.1 Kurva hubungan antara log dosis dengan % hambatan dari Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat (TFMBSA)



Gambar 5.2 Kurva hubungan antara log dosis dengan % hambatan dari asam asetilsalisilat

5.3 Penentuan ED₅₀

Berdasarkan data log dosis dan persentase hambatan pada tabel V.5, dapat ditentukan persamaan dengan analisis statistik regresi (lampiran 4 dan 5) dan diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Hubungan antara log dosis dengan % hambatan asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat :

$$Y = 60,558X - 62,100$$

$$(n = 5 ; r = 0,971 ; F \text{ hitung} = 14,099)$$

2. Hubungan antara log dosis dengan % hambatan asam asetilsalisilat :

$$Y = 65,214X - 76,044$$

$$(n = 5 ; r = 0,998 ; F \text{ hitung} = 48,776)$$

Persamaan-persamaan tersebut mempunyai r hitung lebih besar daripada r tabel (0,754) sehingga dapat disimpulkan ada hubungan linear antara log dosis dengan % hambatan. Selanjutnya persamaan tersebut digunakan untuk menghitung ED₅₀ aktivitas analgesik.

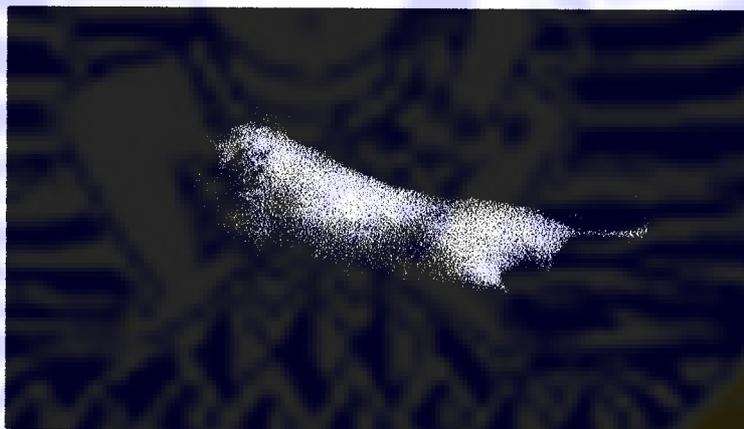
Hasil penentuan ED₅₀ aktivitas analgesik dengan metode *writhing test* dapat dilihat pada tabel V.6. Cara perhitungan ED₅₀ masing-masing kelompok senyawa uji dapat dilihat pada lampiran 4

Tabel V.6 ED₅₀ Aktivitas Analgesik Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat dan asam asetilsalisilat.

| Senyawa | BM | ED ₅₀ |
|---|-----|------------------|
| Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat | 310 | 70,97 mg/kg |
| Asam asetilsalisilat | 180 | 85,66 mg/kg |



Gambar 5.3 Mencit sebelum diberi perlakuan



Gambar 5.4 Mencit setelah diberi perlakuan

BAB VI

PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini yang diuji aktivitas analgesiknya adalah senyawa turunan asam salisilat yaitu asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat. Bahan penelitian ini diduga mempunyai aktivitas analgesik berdasarkan dua hal: pertama, strukturnya yang mempunyai ciri-ciri umum obat-obat golongan AINS dan sebagai turunan asam salisilat yang analog dengan asam asetilsalisilat, maka asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat akan memiliki aktivitas sebagai analgesik. Kedua, hasil penelitian sebelumnya (Diyah dkk, 2001) menyebutkan bahwa senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi, sehingga diharapkan senyawa ini mempunyai aktivitas analgesik.

Sebagai langkah awal dalam penelitian ini dilakukan uji kualitatif yang meliputi pengamatan organoleptis, penentuan jarak lebur terhadap senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan pemeriksaan senyawa dengan kromatografi Lapis Tipis (KLT). Langkah ini dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas senyawa tersebut sehingga dapat digunakan sebagai bahan penelitian lebih lanjut. Hasil yang diperoleh dari penentuan jarak lebur diketahui bahwa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai jarak lebur 84-86 °C, sedangkan pada pemeriksaan dengan KLT didapatkan hasil yang telah sesuai dengan pustaka. Dengan 2 pelarut yang berbeda menghasilkan 1 noda yang sesuai harga Rf yang sama dengan pustaka yaitu dengan pelarut kloroform-aseton, harga Rf = 0,28 sedangkan dengan pelarut etilasetat-metanol didapatkan harga Rf = 0,44 (Diyah dkk,2001). Telah dilakukan pengujian terhadap senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, IR, NMR, MS pada peneliti sebelumnya (lampiran 6).

Pada penelitian ini, aktivitas analgesik dilakukan dengan cara penghambatan nyeri akibat induksi kimia (*writhing test*), dan sebagai induktor nyeri digunakan asam asetat yang diberikan pada mencit secara intraperitoneal. Metode ini digunakan untuk uji aktivitas analgesik senyawa antiinflamasi non steroid (AINS) karena nyeri yang timbul akibat induksi oleh asam asetat dianggap berhubungan dengan pelepasan mediator dalam

peristiwa inflamasi. Disamping itu, metode ini dipilih karena reproduibel, relatif sederhana dan mudah pelaksanaan serta pengamatannya. Aktivitas obat analgesik dilakukan dengan menilai kemampuannya dalam menekan atau menghilangkan nyeri akibat induksi secara kimia (Lineberry, 1981). Aktivitas hambatan nyeri ditentukan dengan cara mengamati penurunan frekuensi geliat dengan adanya pemberian senyawa analgesik dibandingkan dengan frekuensi geliat tanpa adanya senyawa tersebut. Pengamatan dilakukan selama 30 menit setelah selang lima menit dari induksi kimiawi. Obat diberikan beberapa saat sebelum induksi nyeri dengan harapan pada saat diuji, senyawa sudah terabsorpsi dan bekerja pada tempat kerjanya.

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok dosis senyawa uji, baik untuk senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dan senyawa asam asetilsalisilat maka dilakukan uji ANOVA. Hasil perhitungan ANOVA (Lampiran 1 dan 2) menunjukkan bahwa ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antar kelompok dosis. Setelah diketahui ada perbedaan yang bermakna maka selanjutnya dapat dihitung persentase hambatan nyeri untuk setiap kelompok dosis. Makin tinggi dosis maka frekuensi geliat akan semakin kecil untuk tiap-tiap senyawa. Hal ini menunjukkan kemampuan senyawa semakin besar dengan meningkatkan dosis. Diketahui harga F hitung > F tabel dan harga $P < 0,05$ pada $\alpha = 0,05$. Untuk senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat diperoleh harga F hitung = 14,099 dan $P = 0,000$ sedangkan senyawa asam asetilsalisilat mempunyai harga F hitung = 48,776 dan $P = 0,000$. Harga F tabel untuk (5;55) pada $\alpha = 0,05$ adalah 2,40.

Pada tabel V.4 dapat dilihat bahwa dari dosis 25 mg/kg bb sampai dengan dosis 200 mg/kg bb, senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat menunjukkan frekuensi geliat (respon nyeri) yang lebih kecil daripada senyawa asam asetilsalisilat. Hal ini dapat berarti bahwa efek analgesik yang dimiliki oleh senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat lebih besar daripada asam asetilsalisilat. Untuk memastikannya, lebih lanjut diamati hasil perhitungan persentase hambatan nyeri.

Pada tabel V.5 terlihat bahwa pada dosis 25 mg/kg bb sampai dengan dosis 200 mg/kg bb, senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat memberikan persentase hambatan nyeri lebih besar daripada asam asetilsalisilat.

Setelah diketahui persentase hambatan nyeri pada berbagai dosis untuk tiap senyawa, selanjutnya dilakukan penentuan ED_{50} hambatan nyeri, yang dihitung berdasarkan data dosis dan persentase hambatan pada tabel V.6 dengan analisis regresi $\log x$ (lampiran 4 dan 5). Berdasarkan hasil penentuan ED_{50} , senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai ED_{50} sebesar 70,97 mg/kg dan senyawa asam asetilsalisilat sebagai pembanding mempunyai ED_{50} sebesar 85,56 mg/kg. Berdasarkan hal tersebut, maka senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat dapat dinyatakan aktif sebagai senyawa analgesik sehingga bisa dikembangkan lebih lanjut sebagai calon obat kelompok AINS.

Senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat bersifat lebih lipofilik daripada asam asetilsalisilat. Hal ini disebabkan adanya penambahan gugus 3-trifluorometilbenzoil pada rantai samping yang bersifat lipofilik. Parameter lipofilik merupakan parameter yang berpengaruh pada proses penembusan membran biologis oleh molekul senyawa organik (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Pada umumnya, membran biologis mempunyai struktur lipoprotein yang bertindak sebagai membran semipermeabel. Parameter lipofilik yang biasa digunakan dalam studi hubungan kuantitatif struktur aktivitas yaitu logaritma koefisien partisi ($\log p$), tetapan fragmentasi f , tetapan kromatografi R_m dan tetapan π Hansh (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai nilai sterimol B_1 .

Aktivitas biologis turunan asam salisilat dipengaruhi oleh sifat lipofilik dan sterik. Berdasarkan metode Rekker, senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai harga $\log p = 3,785$ sedangkan senyawa asam asetilsalisilat mempunyai harga $\log p = 1,370$. Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai nilai parameter sterik harga $B_1 = 3,68$ sedangkan asam asetilsalisilat mempunyai harga $B_1 = 1,35$ (Diyah, 1998). Berdasarkan harga $\log p$ dan sterimol B_1 tersebut, senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat bersifat lebih lipofilik dan mempunyai sifat sterik yang lebih besar dibandingkan dengan senyawa asam asetilsalisilat sehingga hal ini dapat mempengaruhi aktivitas analgesik dari senyawa tersebut. Senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas yang lebih besar daripada asam asetilsalisilat. Sifat lipofilik ini dapat mempengaruhi sifat kimia fisika senyawa dari absorpsi, distribusi hingga pada tempat kerja obat. Pengaruh sterik senyawa terhadap

aktivitas terutama yang berhubungan dengan interaksinya dengan reseptor (Sardjoko, 1993).

Mekanisme kerja senyawa golongan AINS adalah dengan menghambat enzim siklooksigenase (prostaglandin sintetase). Jika reseptor senyawa analgesik yang dimaksud adalah enzim siklooksigenase maka perlu diketahui apakah aktivitas biologis yang ditunjukkan oleh senyawa uji pada hewan coba berhubungan dengan kemampuannya dalam menghambat enzim siklooksigenase.

Pada penelitian ini, pemberian obat ditentukan 30 menit sebelum induksi nyeri agar pada saat diuji, senyawa sudah terabsorpsi dan bekerja pada tempat kerjanya. Efek senyawa diamati secara langsung setelah senyawa berada pada tempat kerja, tidak diamati pengaruh waktu absorpsi atau distribusi senyawa. Untuk mengetahui pengaruh bentuk ester terhadap kecepatan timbulnya efek, maka perlu dilakukan penelitian tentang farmakokinetik senyawa.

Hasil uji aktivitas biologis yang telah dilakukan dapat digunakan sebagai dasar untuk mengembangkan senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoi)salisilat sebagai calon obat kelompok AINS. Namun demikian, masih banyak studi yang masih harus dilakukan untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap, baik dari aspek farmakodinamik/farmakologik dan farmakokinetik senyawa.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

- (1) Senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik yang dinyatakan dengan ED_{50} sebesar 70,97 mg/ kg.
- (2) Potensi aktivitas analgesik senyawa asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat yang ditentukan dengan metode *writhing test* lebih besar daripada aktivitas analgesik asam asetilsalisilat yang mempunyai ED_{50} sebesar 85,66 mg/kg.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disarankan agar asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai senyawa obat baru dengan aktivitas analgesik.

DAFTAR PUSTAKA

- Auterhoff, H., Kovar, K. A., 1987, **Identifikasi Obat**. Ed. 4. ITB. Bandung
- Diyah, N.W., 1998. Hubungan Struktur dan Aktivitas Antiinflamasi Turunan asam Salisilat. **Tesis**. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Diyah, N. W., Sardjoko, L. Hakim., 2001. Sintesis dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa Asam O-(3-trifluorometilbenzoi)salisilat. **Majalah Farmasi Airlangga**. Vol.1. No. 3. hal. 56-67.
- Diyah, N.W., Purwanto, B.T., Susilowati, R., 2002. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam O-(4-Butilbenzoi)salisilat Hasil Sintesis Pada Mencit, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. **Farmakope Indonesia**, Edisi keempat, Jakarta, hal. 31
- Dipalma, J.R., 1971. **Drill's Pharmacology in Medicine**, 4 th edition. Mc. Graw Hill Book Comp. Ablakiston Publication. p. 272 – 276.
- Domer, FR., 1971. **Animal Experimental in Pharmacological analysis**. Charles Thomas Publisher. USA. p. 275 – 317.
- Ekasari, W., Prajogo, B., Widyawaruyawanti, A., Rahman, A., Sukardiman., 1998. Uji analgetika Daun Pronojiwo (*Pachystachys coccinea*) Dengan Metode Writhing Test, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, hal. 1-4.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S., 1984. **Kimia Organik**. Diterjemahkan oleh A.H. Pudjaatmaka. Edisi ke-2. Erlangga, Jakarta
- Gan, S., 1995. **Farmakologi dan Terapi**, Edisi keempat, Bagian Farmakologi fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Gringauz, A., 1997. **Introduction to Medicinal Chemistry How Drugs Act and Why**. Willey-VCH, p. 141-167.
- Hakim, L., 2001. Uji Farmakologi dan Toksikologi Senyawa pada Hewan Coba. **Seminar Nasional kimia Medisinal II**. Fakultas farmasi Universitas Airlangga.
- Korolkovas, A., 1970. **Essentials of Molecular Pharmacology Background for drug Design**, Joh Wiley and Son, Inc., USA
- Kresnamukti A., 2002. Khasiat Analgetika Ekstrak Daun Psidium Guajava L Pada Mencit Dengan Metode Writhing Test, **Jurnal obat Bahan Alam**, Vol. 1, No.1, hal. 26-30

- Kreyzig, E., 1970. **Introductory Mathematical Statistics Principles and Methods**. Joh Wiley and Son, Inc., Newyork.
- Lien, E.J., 1978. **SAR : Side Effect and Drug Design**, Marcel Dekker Inc., Newyork, p. 451-452.
- Lineberry, C.G., 1981. **Laboratory Animal in Pain Research**, Academic Press, Inc., U.S.A., p. 243-248.
- Neal, M.J., 1992. **Medical Pharmacology at Glance**, 2 nd ed., Blackwell Scientific Publications, p. 70.
- Purwanto, B.T., dan Sondakh, R., 1998. **Metabolisme dan Rancangan Obat dalam** Siswandono dan Soekardjo, B., 1998. **Prinsip-prinsip Rancangan Obat**, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 235-300.
- Scherrer, R. A., 1974. Introduction to the Chemistry of Antiinflammatory and Antiarthritic Agents, Dalam R. A. Scherrer dan M. W. Whitehouse (eds.). **Antiinflammatory Agents Chemistry and Pharmacology**, Vol. I, Academic Press, New York, p. 33-39, 75-83.
- Setiawati L, 1998. Studi Hubungan Kuantitatif Sifat Kimia Fisika (Lipofilik, Elektronik, Sterik) dengan Analgetika dari Turunan Asam Salisilat Pada Mencit, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal 2**, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 295-307.
- Studiawan H., 1995. Studi Khasiat Analgetika Rimpang Beberapa Tanaman Suku Zingiberaceae Dengan Metode Geliat Dan Profil Kandungannya Secara Densitometri, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 44 – 49.
- Suhriyah., 2004. Uji Aktivitas Analgesik Asam *Para*-metoksisinamat dan Metil *Para*-metoksisinamat Dengan Metode *Writhing Test* Pada Mencit. **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Sweetman S. C., 2002. **Martindale : The Complete Drug Reference**. Edisi 33, Pharmaceutical Press, p.16-17.
- Tjay T. H., Rahardja K., 2002. **Obat – obat Penting**, edisi ketiga, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal. 295-297.

Turner, R. A., 1965. **Screening Method in Pharmacology**. Vol. I. Academic press. New York. p. 100 – 117.

Willette, R. E., 1991. Analgesic Agents. Dalam J. N. Delgado dan W. A. Remers (eds.). **Wilson and Gisvold's Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. 9th Ed. J. B. Lippincott, Philadelphia. p. 656-662.

Lampiran 1

Hasil perhitungan ANOVA antar kelompok dosis senyawa
asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat

Oneway**Descriptives**

TFMBSA

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | 25.00 | 10 | | |
| 50.00 | 10 | 25.5000 | 12.1587 | 3.8449 | 16.8022 | 34.1978 | 15.00 | 48.00 |
| 100.00 | 10 | 20.4000 | 9.1554 | 2.8952 | 13.8506 | 26.9494 | 9.00 | 36.00 |
| 125.00 | 10 | 19.5000 | 7.5609 | 2.3910 | 14.0913 | 24.9087 | 7.00 | 31.00 |
| 200.00 | 10 | 11.8000 | 6.7791 | 2.1437 | 6.9506 | 16.6494 | 4.00 | 24.00 |
| Total | 50 | 23.7400 | 13.4116 | 1.8967 | 19.9285 | 27.5515 | 4.00 | 54.00 |

ANOVA

TFMBSA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 4902.120 | 4 | 1225.530 | 14.099 | .000 |
| Within Groups | 3911.500 | 45 | 86.922 | | |
| Total | 8813.620 | 49 | | | |

Lampiran 2

Hasil perhitungan ANOVA antar kelompok dosis senyawa asam asetilsalisilat

Oneway**Descriptives**

ASA

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| 25.00 | 10 | 77.1000 | 9.0363 | 2.8575 | 70.6358 | 83.5642 | 68.00 | 95.00 |
| 50.00 | 10 | 61.3000 | 11.8326 | 3.7418 | 52.8354 | 69.7646 | 49.00 | 82.00 |
| 100.00 | 10 | 40.1000 | 10.4504 | 3.3047 | 32.6242 | 47.5758 | 28.00 | 58.00 |
| 125.00 | 10 | 35.9000 | 10.6809 | 3.3713 | 28.2736 | 43.5264 | 20.00 | 55.00 |
| 200.00 | 10 | 24.8000 | 3.4059 | 1.0770 | 22.1836 | 27.0364 | 18.00 | 30.00 |
| Total | 50 | 47.8000 | 21.1429 | 2.9901 | 41.7913 | 53.8087 | 18.00 | 95.00 |

ANOVA

ASA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 17798.800 | 4 | 4449.700 | 48.776 | .000 |
| Within Groups | 4105.200 | 45 | 91.227 | | |
| Total | 21904.000 | 49 | | | |

Lampiran 3**Perhitungan % hambatan nyeri**

$$\% \text{ HAMBATAN NYERI} = 100 - \frac{\Sigma \text{ respon kelompok dosis}}{\Sigma \text{ respon kelompok kontrol}} \times 100$$

a). Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat**1. Dosis 25 mg/kg BB**

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{41,5}{50,3} \times 100 \\ &= 17,49 \% \end{aligned}$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{25,5}{50,3} \times 100 \\ &= 49,30 \% \end{aligned}$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{20,4}{50,3} \times 100 \\ &= 59,44 \% \end{aligned}$$

4. Dosis 125 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{19,5}{50,3} \times 100 \\ &= 61,23 \% \end{aligned}$$

5. Dosis 200 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{11,8}{50,3} \times 100 \\ &= 76,54 \% \end{aligned}$$

b). Asam Asetilsalisilat**1. Dosis 25 mg/kg BB**

$$\begin{aligned}\% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{77,1}{91,4} \times 100 \\ &= 15,64 \%\end{aligned}$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\begin{aligned}\% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{61,3}{91,4} \times 100 \\ &= 32,93 \%\end{aligned}$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\begin{aligned}\% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{40,1}{91,4} \times 100 \\ &= 56,13 \%\end{aligned}$$

4. Dosis 125 mg/kg BB

$$\begin{aligned}\% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{35,9}{91,4} \times 100 \\ &= 60,72 \%\end{aligned}$$

5. Dosis 200 mg/kg BB

$$\begin{aligned}\% \text{ Hambatan} &= 100 - \frac{24,6}{91,4} \times 100 \\ &= 73,08 \%\end{aligned}$$

Lampiran 4**Hasil Perhitungan ED₅₀ Aktivitas Analgesik Kelompok Uji masing-masing Senyawa****a. Asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat**

Bila % hambatan = 50, maka

$$50 = 60,558 \times \log ED_{50} - 62,100$$

$$ED_{50} = \text{Antilog} \left[\frac{50 + 62,100}{60,558} \right]$$

$$ED_{50} = 70,97 \text{ mg/kg}$$

b. Asam asetilsalisilat

Bila % hambatan = 50, maka

$$50 = 65,214 \times \log ED_{50} - 76,044$$

$$ED_{50} = \text{Antilog} \left[\frac{50 + 76,044}{65,214} \right]$$

$$ED_{50} = 85,66 \text{ mg/kg}$$

Lampiran 5

**Hasil Analisis Regresi Antara Log Dosis Dengan % Hambatan
Asam O-(3-Triflurometilbenzoil)salisilat**

Regression**Variables Entered/Removed^a**

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|---------------------|-------------------|--------|
| 1 | LOGDOS ^b | . | Enter |

- a. All requested variables entered.
b. Dependent Variable: HAMBATAN

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .971 ^a | .944 | .925 | 6.0351 |

- a. Predictors: (Constant), LOGDOS

ANOVA^b

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 1828.520 | 1 | 1828.520 | 50.203 | .006 ^a |
| | Residual | 109.268 | 3 | 36.423 | | |
| | Total | 1937.788 | 4 | | | |

- a. Predictors: (Constant), LOGDOS
b. Dependent Variable: HAMBATAN

Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|--------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | -62.100 | 16.439 | | -3.777 | .032 |
| | LOGDOS | 60.558 | 8.547 | .971 | 7.085 | .006 |

- a. Dependent Variable: HAMBATAN

Lampiran 6

Hasil Analisis Regresi Antara Log Dosis Dengan % Hambatan Asam asetilsalisilat

Regression**Variables Entered/Removed^a**

| Model | Variables Entered | Variables Removed | Method |
|-------|---------------------|-------------------|--------|
| 1 | LOGDOS ^a | . | Enter |

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: HAMBAT

Model Summary

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|
| 1 | .998 ^a | .996 | .995 | 1.6007 |

a. Predictors: (Constant), LOGDOS

ANOVA^b

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|----|-------------|---------|-------------------|
| 1 | Regression | 2120.504 | 1 | 2120.504 | 827.609 | .000 ^a |
| | Residual | 7.687 | 3 | 2.562 | | |
| | Total | 2128.190 | 4 | | | |

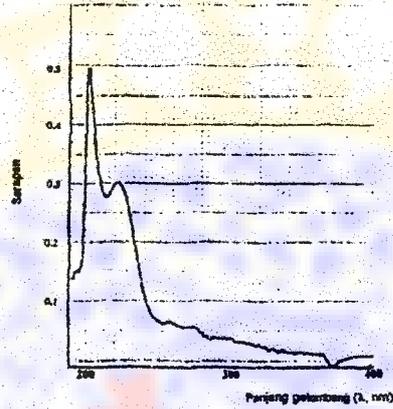
a. Predictors: (Constant), LOGDOS

b. Dependent Variable: HAMBAT

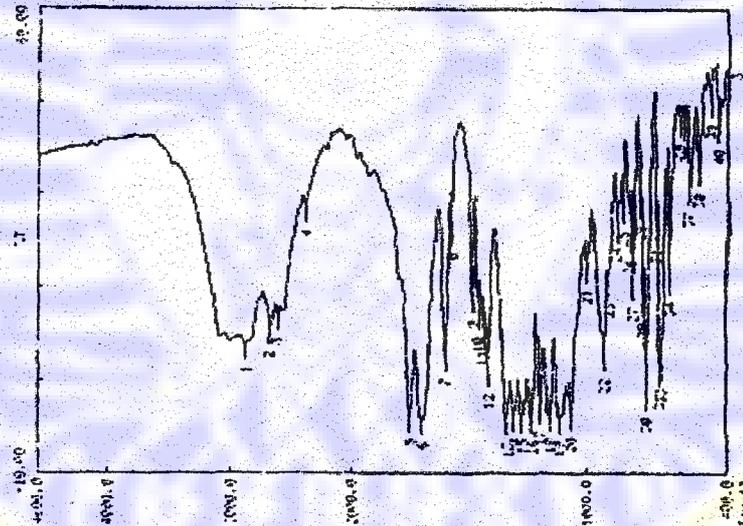
Coefficients^a

| Model | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|---------|------|
| | | B | Std. Error | Beta | | |
| 1 | (Constant) | -76.044 | 4.360 | | -17.440 | .000 |
| | LOGDOS | 65.214 | 2.267 | .998 | 28.768 | .000 |

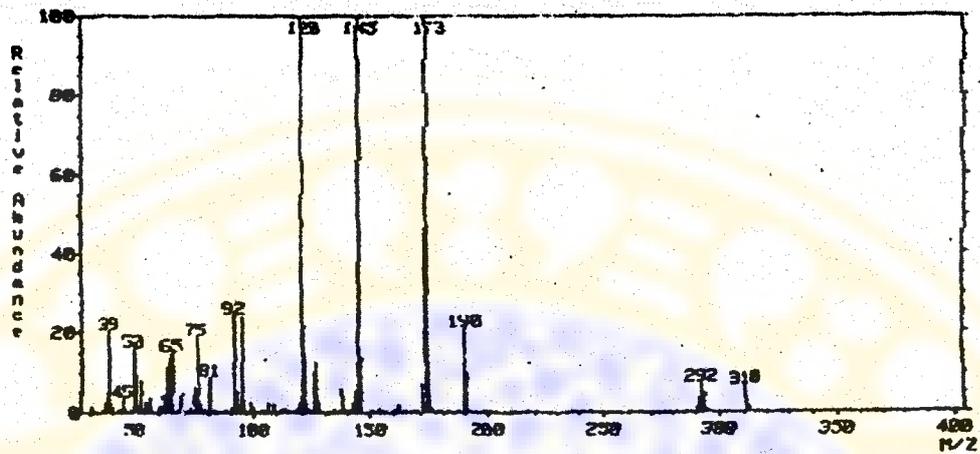
a. Dependent Variable: HAMBAT

Lampiran 7 *)**Spektrofotometri Senyawa Asam O-(3-Trifluorometilbenzoil)salisilat**

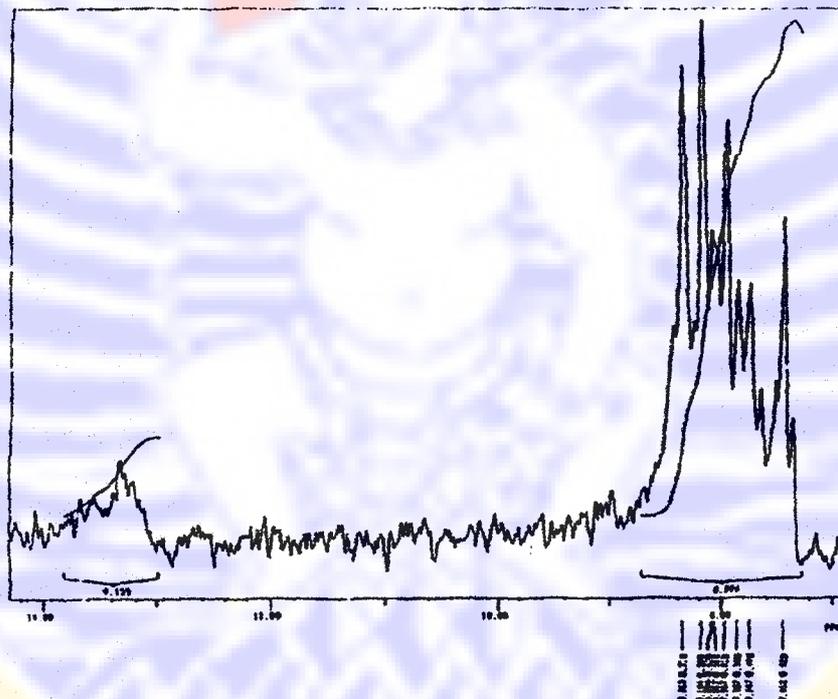
- Spektra ultraviolet senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat 0,005 mg/ml dalam metanol



- Spektra inframerah senyawa asam O-(3trifluorometilbenzoil)salisilat sebagai tablet KBr.



➤ Spektra massa (GCMS-EI) senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoi)salisilat



➤ Spektra NMR senyawa asam O-(3-trifluorometilbenzoi)salisilat dalam DMSO-d₆

*) Diyah, N.W., 1998. Hubungan Struktur dan Aktivitas Antiinflamasi Turunan asam Salisilat. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.

Lampiran 8

Tabel F

| n | $m = 1$ | $m = 2$ | $m = 3$ | $m = 4$ | $m = 5$ | $m = 6$ | $m = 7$ | $m = 8$ | $m = 9$ |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 161 | 200 | 216 | 225 | 230 | 234 | 237 | 239 | 241 |
| 2 | 18.5 | 19.0 | 19.2 | 19.2 | 19.3 | 19.3 | 19.4 | 19.4 | 19.4 |
| 3 | 10.1 | 9.55 | 9.28 | 9.12 | 9.01 | 8.94 | 8.89 | 8.85 | 8.81 |
| 4 | 7.71 | 6.94 | 6.59 | 6.39 | 6.26 | 6.16 | 6.09 | 6.04 | 6.00 |
| 5 | 6.61 | 5.79 | 5.41 | 5.19 | 5.05 | 4.95 | 4.88 | 4.82 | 4.77 |
| 6 | 5.99 | 5.14 | 4.76 | 4.51 | 4.35 | 4.23 | 4.21 | 4.15 | 4.10 |
| 7 | 5.59 | 4.74 | 4.35 | 4.12 | 3.97 | 3.87 | 3.79 | 3.73 | 3.68 |
| 8 | 5.32 | 4.46 | 4.07 | 3.84 | 3.69 | 3.58 | 3.50 | 3.44 | 3.39 |
| 9 | 5.12 | 4.26 | 3.86 | 3.63 | 3.48 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.18 |
| 10 | 4.96 | 4.10 | 3.71 | 3.48 | 3.33 | 3.22 | 3.14 | 3.07 | 3.02 |
| 11 | 4.84 | 3.98 | 3.59 | 3.36 | 3.20 | 3.09 | 3.01 | 2.93 | 2.90 |
| 12 | 4.75 | 3.89 | 3.49 | 3.26 | 3.11 | 3.00 | 2.91 | 2.85 | 2.80 |
| 13 | 4.67 | 3.81 | 3.41 | 3.18 | 3.03 | 2.92 | 2.83 | 2.77 | 2.71 |
| 14 | 4.60 | 3.74 | 3.34 | 3.11 | 2.96 | 2.85 | 2.76 | 2.70 | 2.65 |
| 15 | 4.54 | 3.68 | 3.29 | 3.06 | 2.90 | 2.79 | 2.71 | 2.64 | 2.59 |
| 16 | 4.49 | 3.63 | 3.24 | 3.01 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.59 | 2.54 |
| 17 | 4.45 | 3.59 | 3.20 | 2.96 | 2.81 | 2.70 | 2.61 | 2.55 | 2.49 |
| 18 | 4.41 | 3.55 | 3.16 | 2.93 | 2.77 | 2.66 | 2.58 | 2.51 | 2.46 |
| 19 | 4.38 | 3.52 | 3.13 | 2.90 | 2.74 | 2.63 | 2.54 | 2.48 | 2.42 |
| 20 | 4.35 | 3.49 | 3.10 | 2.87 | 2.71 | 2.60 | 2.51 | 2.45 | 2.39 |
| 22 | 4.30 | 3.44 | 3.05 | 2.82 | 2.66 | 2.55 | 2.46 | 2.40 | 2.34 |
| 24 | 4.26 | 3.40 | 3.01 | 2.78 | 2.62 | 2.51 | 2.43 | 2.36 | 2.30 |
| 26 | 4.23 | 3.37 | 2.98 | 2.74 | 2.59 | 2.47 | 2.39 | 2.32 | 2.27 |
| 28 | 4.20 | 3.34 | 2.95 | 2.71 | 2.56 | 2.45 | 2.36 | 2.29 | 2.24 |
| 30 | 4.17 | 3.32 | 2.92 | 2.69 | 2.53 | 2.42 | 2.33 | 2.27 | 2.21 |
| 32 | 4.15 | 3.30 | 2.90 | 2.67 | 2.51 | 2.40 | 2.31 | 2.24 | 2.19 |
| 34 | 4.13 | 3.28 | 2.88 | 2.65 | 2.49 | 2.38 | 2.29 | 2.21 | 2.17 |
| 36 | 4.11 | 3.26 | 2.87 | 2.63 | 2.48 | 2.36 | 2.28 | 2.21 | 2.15 |
| 38 | 4.10 | 3.24 | 2.85 | 2.62 | 2.46 | 2.35 | 2.26 | 2.19 | 2.14 |
| 40 | 4.08 | 3.23 | 2.84 | 2.61 | 2.45 | 2.34 | 2.25 | 2.18 | 2.12 |
| 50 | 4.03 | 3.18 | 2.79 | 2.56 | 2.40 | 2.29 | 2.20 | 2.13 | 2.07 |
| 60 | 4.00 | 3.15 | 2.76 | 2.53 | 2.37 | 2.25 | 2.17 | 2.10 | 2.04 |
| 70 | 3.98 | 3.13 | 2.74 | 2.50 | 2.35 | 2.23 | 2.14 | 2.07 | 2.02 |
| 80 | 3.96 | 3.11 | 2.72 | 2.49 | 2.33 | 2.21 | 2.13 | 2.06 | 2.00 |
| 90 | 3.95 | 3.10 | 2.71 | 2.47 | 2.32 | 2.20 | 2.11 | 2.04 | 1.99 |
| 100 | 3.94 | 3.09 | 2.70 | 2.46 | 2.31 | 2.19 | 2.10 | 2.03 | 1.97 |
| 150 | 3.90 | 3.06 | 2.66 | 2.43 | 2.27 | 2.16 | 2.07 | 2.00 | 1.94 |
| 200 | 3.89 | 3.04 | 2.65 | 2.42 | 2.25 | 2.14 | 2.06 | 1.98 | 1.93 |
| 1000 | 3.85 | 3.00 | 2.61 | 2.38 | 2.22 | 2.11 | 2.02 | 1.95 | 1.89 |
| ∞ | 3.84 | 3.00 | 2.60 | 2.37 | 2.21 | 2.10 | 2.01 | 1.94 | 1.88 |

Dikutip dari : Kreyszig, E., 1970, *Introductory Mathematical Statistics Principles and Methods*, Joh wiley and Son, Inc., Newyork.

Lampiran 9

Tabel 1

| No | gelas | P | Preduksi bebas | | | | No | gelas | P | Preduksi bebas | | | |
|----|-------|-----|----------------|-------|-------|-------|-----|-------|-----|----------------|------|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | .05 | .01 | .897 | .989 | .999 | .989 | 24 | .05 | .01 | .308 | .470 | .923 | .562 |
| 2 | .05 | .01 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 25 | .05 | .01 | .496 | .565 | .609 | .642 |
| 3 | .05 | .01 | .990 | .995 | .997 | .998 | 26 | .05 | .01 | .381 | .487 | .800 | .633 |
| 4 | .05 | .01 | .878 | .930 | .950 | .961 | 27 | .05 | .01 | .374 | .454 | .306 | .545 |
| 5 | .05 | .01 | .917 | .976 | .983 | .987 | 28 | .05 | .01 | .478 | .546 | .500 | .624 |
| 6 | .05 | .01 | .811 | .861 | .912 | .930 | 29 | .05 | .01 | .367 | .445 | .498 | .536 |
| 7 | .05 | .01 | .917 | .919 | .962 | .970 | 30 | .05 | .01 | .420 | .528 | .482 | .615 |
| 8 | .05 | .01 | .754 | .816 | .874 | .898 | 31 | .05 | .01 | .361 | .439 | .490 | .529 |
| 9 | .05 | .01 | .874 | .917 | .937 | .949 | 32 | .05 | .01 | .463 | .539 | .573 | .606 |
| 10 | .05 | .01 | .707 | .795 | .839 | .867 | 33 | .05 | .01 | .355 | .432 | .482 | .521 |
| 11 | .05 | .01 | .894 | .886 | .911 | .927 | 34 | .05 | .01 | .456 | .522 | .563 | .594 |
| 12 | .05 | .01 | .686 | .754 | .807 | .838 | 35 | .05 | .01 | .349 | .426 | .476 | .514 |
| 13 | .05 | .01 | .796 | .853 | .895 | .904 | 36 | .05 | .01 | .449 | .514 | .548 | .581 |
| 14 | .05 | .01 | .602 | .697 | .750 | .786 | 37 | .05 | .01 | .325 | .397 | .449 | .482 |
| 15 | .05 | .01 | .765 | .827 | .880 | .882 | 38 | .05 | .01 | .418 | .481 | .523 | .556 |
| 16 | .05 | .01 | .602 | .697 | .750 | .786 | 39 | .05 | .01 | .304 | .373 | .419 | .455 |
| 17 | .05 | .01 | .735 | .800 | .836 | .861 | 40 | .05 | .01 | .393 | .454 | .494 | .536 |
| 18 | .05 | .01 | .576 | .671 | .726 | .763 | 41 | .05 | .01 | .288 | .353 | .397 | .432 |
| 19 | .05 | .01 | .708 | .776 | .814 | .840 | 42 | .05 | .01 | .372 | .430 | .470 | .501 |
| 20 | .05 | .01 | .553 | .648 | .703 | .741 | 43 | .05 | .01 | .273 | .336 | .379 | .412 |
| 21 | .05 | .01 | .684 | .753 | .793 | .821 | 44 | .05 | .01 | .354 | .410 | .449 | .479 |
| 22 | .05 | .01 | .532 | .627 | .680 | .722 | 45 | .05 | .01 | .250 | .308 | .348 | .380 |
| 23 | .05 | .01 | .661 | .732 | .773 | .802 | 46 | .05 | .01 | .335 | .377 | .414 | .442 |
| 24 | .05 | .01 | .514 | .608 | .664 | .703 | 47 | .05 | .01 | .232 | .286 | .324 | .354 |
| 25 | .05 | .01 | .644 | .712 | .755 | .785 | 48 | .05 | .01 | .302 | .351 | .386 | .413 |
| 26 | .05 | .01 | .497 | .590 | .646 | .686 | 49 | .05 | .01 | .217 | .269 | .304 | .332 |
| 27 | .05 | .01 | .623 | .694 | .737 | .766 | 50 | .05 | .01 | .283 | .330 | .362 | .389 |
| 28 | .05 | .01 | .444 | .532 | .587 | .628 | 51 | .05 | .01 | .195 | .244 | .274 | .300 |
| 29 | .05 | .01 | .561 | .633 | .678 | .710 | 52 | .05 | .01 | .268 | .314 | .343 | .368 |
| 30 | .05 | .01 | .433 | .520 | .575 | .615 | 53 | .05 | .01 | .205 | .254 | .288 | .315 |
| 31 | .05 | .01 | .589 | .659 | .705 | .738 | 54 | .05 | .01 | .267 | .312 | .343 | .368 |
| 32 | .05 | .01 | .423 | .509 | .563 | .604 | 55 | .05 | .01 | .195 | .244 | .274 | .300 |
| 33 | .05 | .01 | .537 | .608 | .652 | .683 | 56 | .05 | .01 | .228 | .266 | .294 | .316 |
| 34 | .05 | .01 | .413 | .498 | .542 | .582 | 57 | .05 | .01 | .174 | .216 | .246 | .269 |
| 35 | .05 | .01 | .526 | .598 | .641 | .674 | 58 | .05 | .01 | .198 | .244 | .275 | .297 |
| 36 | .05 | .01 | .404 | .488 | .542 | .582 | 59 | .05 | .01 | .148 | .198 | .225 | .247 |
| 37 | .05 | .01 | .515 | .583 | .630 | .663 | 60 | .05 | .01 | .206 | .244 | .270 | .290 |
| 38 | .05 | .01 | .396 | .479 | .530 | .572 | 61 | .05 | .01 | .138 | .172 | .196 | .215 |
| 39 | .05 | .01 | .505 | .574 | .619 | .652 | 62 | .05 | .01 | .181 | .212 | .234 | .253 |
| 40 | .05 | .01 | .374 | .457 | .512 | .552 | 63 | .05 | .01 | .113 | .144 | .160 | .176 |
| 41 | .05 | .01 | .487 | .562 | .617 | .657 | 64 | .05 | .01 | .148 | .174 | .192 | .208 |
| 42 | .05 | .01 | .358 | .441 | .496 | .536 | 65 | .05 | .01 | .128 | .151 | .167 | .180 |
| 43 | .05 | .01 | .471 | .546 | .601 | .641 | 66 | .05 | .01 | .167 | .192 | .208 | .223 |
| 44 | .05 | .01 | .342 | .425 | .480 | .520 | 67 | .05 | .01 | .109 | .133 | .149 | .163 |
| 45 | .05 | .01 | .455 | .529 | .584 | .624 | 68 | .05 | .01 | .143 | .162 | .178 | .192 |
| 46 | .05 | .01 | .328 | .411 | .466 | .506 | 69 | .05 | .01 | .124 | .143 | .159 | .173 |
| 47 | .05 | .01 | .441 | .515 | .570 | .610 | 70 | .05 | .01 | .162 | .182 | .198 | .213 |
| 48 | .05 | .01 | .315 | .398 | .453 | .493 | 71 | .05 | .01 | .106 | .126 | .142 | .156 |
| 49 | .05 | .01 | .428 | .502 | .557 | .597 | 72 | .05 | .01 | .140 | .160 | .176 | .190 |
| 50 | .05 | .01 | .301 | .384 | .439 | .479 | 73 | .05 | .01 | .119 | .139 | .155 | .169 |
| 51 | .05 | .01 | .414 | .488 | .543 | .583 | 74 | .05 | .01 | .153 | .173 | .189 | .203 |
| 52 | .05 | .01 | .287 | .370 | .425 | .465 | 75 | .05 | .01 | .137 | .157 | .173 | .187 |
| 53 | .05 | .01 | .399 | .473 | .528 | .568 | 76 | .05 | .01 | .171 | .191 | .207 | .221 |
| 54 | .05 | .01 | .270 | .353 | .408 | .448 | 77 | .05 | .01 | .115 | .135 | .151 | .165 |
| 55 | .05 | .01 | .382 | .456 | .511 | .551 | 78 | .05 | .01 | .149 | .169 | .185 | .199 |
| 56 | .05 | .01 | .254 | .337 | .392 | .432 | 79 | .05 | .01 | .133 | .153 | .169 | .183 |
| 57 | .05 | .01 | .366 | .440 | .495 | .535 | 80 | .05 | .01 | .167 | .187 | .203 | .217 |
| 58 | .05 | .01 | .237 | .320 | .375 | .415 | 81 | .05 | .01 | .119 | .139 | .155 | .169 |
| 59 | .05 | .01 | .349 | .423 | .478 | .518 | 82 | .05 | .01 | .153 | .173 | .189 | .203 |
| 60 | .05 | .01 | .220 | .303 | .358 | .398 | 83 | .05 | .01 | .137 | .157 | .173 | .187 |
| 61 | .05 | .01 | .332 | .406 | .461 | .501 | 84 | .05 | .01 | .171 | .191 | .207 | .221 |
| 62 | .05 | .01 | .203 | .286 | .341 | .381 | 85 | .05 | .01 | .115 | .135 | .151 | .165 |
| 63 | .05 | .01 | .315 | .389 | .444 | .484 | 86 | .05 | .01 | .149 | .169 | .185 | .199 |
| 64 | .05 | .01 | .227 | .310 | .365 | .405 | 87 | .05 | .01 | .133 | .153 | .169 | .183 |
| 65 | .05 | .01 | .339 | .413 | .468 | .508 | 88 | .05 | .01 | .167 | .187 | .203 | .217 |
| 66 | .05 | .01 | .210 | .293 | .348 | .388 | 89 | .05 | .01 | .151 | .171 | .187 | .201 |
| 67 | .05 | .01 | .322 | .396 | .451 | .491 | 90 | .05 | .01 | .185 | .205 | .221 | .235 |
| 68 | .05 | .01 | .193 | .276 | .331 | .371 | 91 | .05 | .01 | .119 | .139 | .155 | .169 |
| 69 | .05 | .01 | .305 | .379 | .434 | .474 | 92 | .05 | .01 | .153 | .173 | .189 | .203 |
| 70 | .05 | .01 | .217 | .300 | .355 | .395 | 93 | .05 | .01 | .137 | .157 | .173 | .187 |
| 71 | .05 | .01 | .329 | .403 | .458 | .498 | 94 | .05 | .01 | .171 | .191 | .207 | .221 |
| 72 | .05 | .01 | .199 | .282 | .337 | .377 | 95 | .05 | .01 | .135 | .155 | .171 | .185 |
| 73 | .05 | .01 | .311 | .385 | .440 | .480 | 96 | .05 | .01 | .149 | .169 | .185 | .199 |
| 74 | .05 | .01 | .223 | .306 | .361 | .401 | 97 | .05 | .01 | .133 | .153 | .169 | .183 |
| 75 | .05 | .01 | .335 | .409 | .464 | .504 | 98 | .05 | .01 | .167 | .187 | .203 | .217 |
| 76 | .05 | .01 | .206 | .289 | .344 | .384 | 99 | .05 | .01 | .151 | .171 | .187 | .201 |
| 77 | .05 | .01 | .318 | .392 | .447 | .487 | 100 | .05 | .01 | .185 | .205 | .221 | .235 |
| 78 | .05 | .01 | .189 | .272 | .327 | .367 | 101 | .05 | .01 | .119 | .139 | .155 | .169 |
| 79 | .05 | .01 | .301 | .375 | .430 | .470 | 102 | .05 | .01 | .153 | .173 | .189 | .203 |
| 80 | .05 | .01 | .213 | .296 | .351 | .391 | 103 | .05 | .01 | .137 | .157 | .173 | .187 |
| 81 | .05 | .01 | .325 | .399 | .454 | .494 | 104 | .05 | .01 | .171 | .191 | .207 | .221 |
| 82 | .05 | .01 | .195 | .278 | .333 | .373 | 105 | .05 | .01 | .135 | .155 | .171 | .185 |
| 83 | .05 | .01 | .307 | .381 | .436 | .476 | 106 | .05 | .01 | .149 | .169 | .185 | .199 |
| 84 | .05 | .01 | .219 | .302 | .357 | .397 | 107 | .05 | .01 | .133 | .153 | .169 | .183 |
| 85 | .05 | .01 | .331 | .405 | .460 | .500 | 108 | .05 | .01 | .167 | .187 | .203 | .217 |
| 86 | .05 | .01 | .202 | .285 | .340 | .380 | 109 | .05 | .01 | .151 | .171 | .187 | .201 |
| 87 | .05 | .01 | .314 | .388 | .443 | .483 | 110 | .05 | .01 | .185 | .205 | .221 | .235 |
| 88 | .05 | .01 | .185 | .268 | .323 | .363 | 111 | .05 | .01 | .119 | .139 | .155 | .169 |
| 89 | .05 | .01 | .297 | .371 | .426 | .466 | 112 | .05 | .01 | .153 | .173 | .189 | .203 |
| 90 | .05 | .01 | .209 | .292 | .347 | .387 | 113 | .05 | .01 | .137 | .157 | .173 | .187 |
| 91 | .05 | .01 | .321 | .395 | .450 | .490 | 114 | .05 | .01 | .171 | .191 | .207 | .221 |
| 92 | .05 | .01 | .191 | .274 | .329 | .369 | 115 | .05 | .01 | .135 | .155 | .171 | .185 |
| 93 | .05 | .01 | .303 | .377 | .432 | .472 | 116 | .05 | .01 | .149 | .169 | .185 | .199 |
| 94 | .05 | .01 | .215 | .298 | .353 | .393 | 117 | .05 | .01 | .133 | .153 | .169 | .183 |
| 95 | .05 | .01 | .327 | .401 | .456 | .496 | 118 | .05 | .01 | .167</ | | | |

Lampiran 10



Penyuntikan secara Intraperitoneal