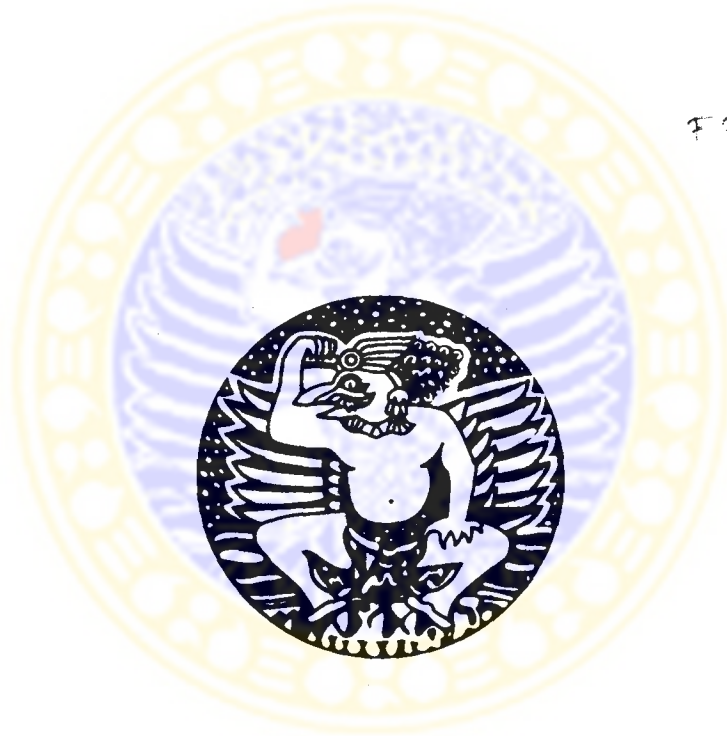


SKRIPSI

RIZNA SUKMA WARDANI

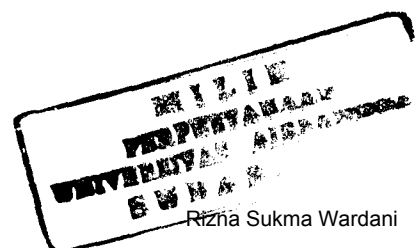
**SINTESIS SENYAWA
N-(4-HIDROKSIFENIL)-4-BROMOBENZAMIDA
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**



F 1 23 46

Wardani
S

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



Lembar Pengesahan

**SINTESIS SENYAWA
N-(4-HIDROKSIFENIL)-4-BROMOBENZAMIDA
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

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

Oleh :

**RIZNA SUKMA WARDANI
NIM : 050312809**

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama



**Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt.
NIP. 130 809 079**

Pembimbing Serta



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

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT serta sholawat dan salam selalu ditujukan kepada Nabi Muhammad SAW. Hanya berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Sintesis Senyawa N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan Uji Aktivitas Analgesik Pada Mencit (*Mus musculus*)**, guna memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam menyelesaikan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak oleh karena itu perkenankan penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof. Dr. Achmad Syahrani, MS., Apt. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan pendidikan program Sarjana.
2. Bapak Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
3. Bapak Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Ir.Hj.Rully Susilowati, MS. selaku pembimbing serta, dan Ibu Yunita nita, S.Si, M.Pharm., Apt. selaku dosen wali atas semua bantuan, bimbingan, perhatian dan nasehat selama penulis menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Kepala Bagian Kimia Farmasi dan Kepala Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penelitian ini.
5. Bapak Drs.H. Harjana, M.Sc., Apt. dan Ibu Dra. Juni Ekowati, M.Si., Apt., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.
6. Bapak dan Ibu staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Bapak Tukidjo dan Bapak Sutanto di Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, serta Bapak Machfud dan bapak Yanto, yang telah banyak memberikan bantuan selama penyelesaian skripsi ini.
8. Yang paling saya hormati dan sayangi kedua orangtua saya, Ayahanda H.Mudjiono dan Ibunda Hj.Gusti Tuti Handayani atas semua doa, cinta, kasih

sayang, pengorbanan, perhatian, dorongan dan semangat yang begitu tulus dan ikhlas.

9. Kakakku Rizki M.R dan Adikku Riztri Bonita K.D yang selalu memberikan doa, perhatian, dorongan serta semangat.
10. Mas Arista yang selalu setia untuk memberi semangat, doa dan pengorbanan yang tiada hentinya.
11. Teman-teman skripsi di Laboratorium Kimia Medisinal, terutama teman-teman seperjuangan yang telah bekerja keras bersama, antara lain Filia, Sylvy, Erik, Mbak Henny, Novieta, Retno, Anjar.
12. Sahabatku yang tercinta Dewi W.S, Shintami, Arina, Achmed dan Kartika yang telah memberi semangat selama skripsi dan kesan yang tak terlupakan.
13. Buat Teman-teman seperjuanganku atau angkatan 2003 terimakasih telah memberikan motivasi.
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan. Untuk itu penulis mengharapkan masukan baik kritik maupu saran dari semua pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Surabaya, Juli 2007

Penulis

RINGKASAN

SINTESIS SENYAWA *N*-(4-HIDROKSIFENIL)-4-BROMO BENZAMIDA DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*)

Rizna Sukma Wardani

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis dan uji aktivitas analgesik senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida untuk mengetahui aktivitas analgesik berdasarkan persentase hambatan nyeri sehubungan dengan sifat lipofiliknya yang tinggi.

Sintesis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dilakukan dengan mereaksikan *p*-aminofenol dengan 4-bromobenzoil klorida. Pada struktur *p*-aminofenol, gugus hidroksi dan -NH₂ dapat bereaksi dengan 4-bromobenzoil klorida, tetapi karena gugus -NH₂ mempunyai sifat nukleofil yang lebih besar dibanding gugus hidroksi maka reaksi asilasi akan terjadi pada gugus -NH₂. Reaksi tersebut adalah substitusi nukleofilik dan *p*-aminofenol bertindak sebagai nukleofil. Sintesis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida berdasarkan metode *Schotten-Baumann* yang dimodifikasi, dengan menggunakan basa piridin yang berfungsi sebagai pelarut dan penetral HCl dari hasil reaksi.

Senyawa hasil sintesis diuji kemurniannya dengan uji jarak lebur dan kromatografi lapis tipis (KLT), selanjutnya identifikasi struktur dilakukan dengan spektrofotometer ultraviolet, spektrofotometer inframerah dan spektrometer magnet inti (¹H-NMR). Uji aktivitas analgesik dilakukan dengan memberikan senyawa penginduksi nyeri pada mencit secara intraperitoneal dengan metode hambatan nyeri (*writhing test*). Senyawa uji *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dengan dosis tertentu (25, 50, dan 100 mg/kg BB) diberikan 20 menit sebelum induksi nyeri oleh larutan asam asetat 0,6% volume 0,01 ml/g BB. Respon nyeri konstiksi abdominal diamati setelah pemberian induksi nyeri selama 30 menit. Aktivitas analgesik ditunjukkan berdasarkan presentase hambatan nyeri yang dihitung dari frekuensi geliat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 17,59%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 34,59%, dan pada dosis 100 mg/kg BB sebesar 54,89%. Sedangkan parasetamol sebagai pembanding pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 15,34%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 32,03%, dan pada dosis 100 mg/kg BB sebesar 52,33%. Berdasarkan hasil uji Anova satu arah pada derajat kepercayaan 0,5, dapat disimpulkan bahwa senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibanding parasetamol.

Sebagai saran adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas, sifat farmakokinetika, dan kemampuan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dalam menghambat enzim siklooksigenase.

ABSTRACT

The synthesis and the activity analgesic test of *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide in mice (*Mus musculus*)

The research purposed to synthesis of *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide and to determine its analgesic activity in mice (*Mus musculus*) was done. The synthesis of *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide was carried out by reacting *p*-aminophenol with 4-bromobenzoyl chloride. The product of synthesis was recrystallized with ethanol and According to the ultraviolet spectrophotometric, infra red and ¹H-NMR spectroscopic analysis, it was concluded that the (synthesis) compound was *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide. The analgesic activity was tested using writhing test method. The results exhibit that in the dose 25 mg/kg mice body-weight, the pain-inhibition percentage of *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide was 17.59%, in the dose 50 mg/kg mice body-weight was 34.59%. In the dose 100 mg/kg mice body weight was 54.89%. However, the standard compound paracetamol in the dose 25 mg/kg mice body-weight, the pain-inhibition percentage was 15.34%, in the dose 50 mg/kg mice body-weight was 32.03%, and in the dose 100 mg/kg mice body-weight was 52.33%. It concluded that the *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide had analgesic activity and was higher than paracetamol.

Key word: synthesis *N*-(4-hydroxyphenyl)-4-bromobenzamide, analgesic activity

2.5.3	Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometer Ultraviolet	14
2.5.4	Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometer Inframerah.....	14
2.5.5	Identifikasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti (¹ H-NMR).....	15
2.6	Tinjauan tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik ..	15
2.6.1	Metode Stimulasi Panas.....	16
2.6.2	Metode Stimulasi Listrik.....	16
2.6.3	Metode Stimulasi Tekanan.....	17
2.6.4	Metode Stimulasi Kimiawi	17
BAB III	KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian.....	19
3.2	Skema Kerangka Konseptual	21
BAB IV	METODE PENELITIAN	
4.1	Bahan Penelitian.....	22
4.1.1	Bahan Kimia.....	22
4.1.2	Hewan Coba	23
4.2	Alat.....	23
4.3	Prosedur Sintesis Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida.....	24
4.4	Analisis Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida	25
4.4.1	Pemeriksaan Organoleptis dan reaksi warna.....	25
4.4.2	Pemeriksaan Kemurnian Senyawa	25
4.4.3	Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis	25
4.4.4	Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis	26
4.4.5	Analisis dengan spektrofotometer FT-IR.....	26
4.4.6	Analisis dengan spektrometer Resonansi Magnet Inti (¹ H-NMR)	26
4.5	Prosedur Uji Aktivitas Analgesik.....	26

4.5.1	Persiapan Hewan Coba	26
4.5.2	Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6% dan Natrium karboksimetilselulosa 0,5%.....	27
4.5.3	Perhitungan Dosis	27
4.5.4	Pembuatan Sediaan Senyawa Uji.....	27
4.5.5	Perhitungan Sediaan Senyawa Uji	27
4.5.6	Pelaksanaan Uji Aktivitas	28
4.6	Analisis Data	30
4.6.1	Anova	30
BAB V	HASIL PENELITIAN	
5.1	Hasil Penelitian	32
5.1.1	Hasil Sintesis Senyawa	32
5.2	Analisis Kualitatif Senyawa Hasil Sintesis	32
5.2.1	Pemeriksaan Organoleptis dan Kelarutan	32
5.2.2	Hasil Penentuan Jarak Lebur Senyawa Hasil Sintesis	33
5.2.3	Hasil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Hasil Sintesis	33
5.3	Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis	34
5.3.1	Identifikasi senyawa hasil sintesis dengan Spektrofotometer UV-Vis	34
5.3.2	Identifikasi senyawa hasil sintesis dengan Spektrofotometer Inframerah	36
5.3.3	Identifikasi senyawa hasil sintesis dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$)	38
5.4	Uji Aktivitas Analgesik	41
5.4.1	Penentuan Frekuensi Geliat (Respon Nyeri)	41
5.4.2	Penentuan Persentase Hambatan Nyeri	43
5.5	Penentuan ED_{50}	44
BAB VI	PEMBAHASAN	46

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN.....	52
7.2 SARAN	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1.1 Turunan Anilin dan <i>p</i> -aminofenol.....	3
2.1 Mekanisme Reaksi Asilasi Secara Umum	11
2.2 Mekanisme Reaksi Asilasi Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida.....	12
3.1 Kerangka Konseptual	21
4.1 Sintesis Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida.....	24
4.2 Bagan Uji Aktivitas.....	29
5.1 Spektra Ultraviolet Senyawa <i>p</i> -aminofenol Dalam Pelarut Metanol	35
5.2 Spektra Ultraviolet Senyawa Hasil Sintesis Dalam Pelarut Metanol	35
5.3 Spektra Inframerah Senyawa <i>p</i> -aminofenol Dalam Pellet KBr	36
5.4 Spektra Inframerah Senyawa Hasil Sintesis Dalam Pellet KBr.....	37
5.5 Spektra ¹ H-NMR Senyawa <i>p</i> -aminofenol Dalam Pelarut DMSO-D ₆	39
Spektra ¹ H-NMR Senyawa Hasil Sintesis Dalam Pelarut DMSO-D ₆	40
5.7 Kurva Hubungan Antara Dosis Dengan % Hambatan Nyeri Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida	44
5.8 Kurva Hubungan Antara Dosis Dengan % Hambatan Nyeri Senyawa Parasetamol	44
6.1 Struktur Senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1	Perhitungan Presentase Hasil Sintesis 57
Lampiran 2	Hasil perhitungan ANOVA dan Tukey HSD antar kelompok kontrol CMC-Na 0,5% dengan antar kelompok dosis senyawa pembanding parasetamol, serta antar kelompok dosis senyawa uji <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida..... 58
Lampiran 3	Hasil analisis regresi antara dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) parasetamol 60
Lampiran 4	Hasil analisis regresi antara dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) dari senyawa <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida 61
Lampiran 5	Perhitungan % hambatan nyeri 62
Lampiran 6	Hasil perhitungan ED ₅₀ aktivitas analgesik masing-masing kelompok senyawa 63
Lampiran 7	Tabel F 64
Lampiran 8	Tabel r 65
Lampiran 9	Penyuntikan mencit secara intraperitoneal 66
Lampiran 10	Mencit sebelum perlakuan dan mencit setelah perlakuan 67

BAB 1

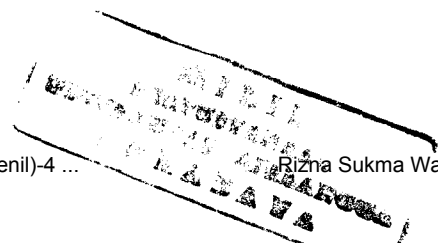
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Rasa nyeri dalam kebanyakan hal hanya merupakan suatu gejala, yang berfungsi melindungi tubuh. Nyeri didefinisikan sebagai isyarat bahaya adanya gangguan di jaringan, seperti peradangan (rematik, encok), infeksi jasad renik, atau kejang otot. Nyeri yang disebabkan oleh rangsangan mekanik, kimiawi atau fisis (kalor, listrik), dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan. Rangsangan tersebut dapat memicu pelepasan zat-zat tertentu yang disebut mediator nyeri (Tjay dan Rahardjo, 2002).

Pada umumnya penderita sakit kepala dan nyeri badan diobati dengan obat-obat penghilang rasa sakit (analgesik). Analgesik adalah senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, dilakukan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Analgesik bekerja dengan meningkatkan nilai ambang persepsi rasa sakit. Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekuler, analgesik dibagi menjadi dua golongan yaitu analgesik narkotik dan non narkotik (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Analgesik narkotika bekerja pada sistem saraf pusat (SSP) dan khusus digunakan untuk menghalau rasa nyeri hebat seperti fractura dan kanker (Foye, 1981). Namun dalam penggunaan opioid ini harus dalam pengawasan karena opioid memiliki efek samping yang berbahaya seperti ketergantungan obat. Sedangkan Analgesik non narkotik digunakan untuk mengurangi rasa nyeri ringan sampai sedang tanpa mempengaruhi SSP atau menurunkan kesadaran, juga tidak menimbulkan ketagihan. Salah satu contoh senyawa analgesik non narkotik adalah asetilsalisilat, diklofenak, asam mefenamat, dan parasetamol.

Kebanyakan analgesik juga berdaya antipiretik. Oleh karena itu, obat ini tidak hanya digunakan sebagai obat nyeri, melainkan juga pada gangguan demam (infeksi virus atau kuman, salesma, pilek) dan peradangan. Kombinasi dari dua atau lebih analgetika sering kali digunakan, karena terjadi efek potensiasi (Tjay dan Rahardjo, 2002). Analgesik-antipiretik digunakan untuk pengobatan



simptomatik, yaitu meringankan gejala penyakit, tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Karena semakin bervariasinya jenis penyakit tuntutan penemuan obat baru semakin meningkat dalam bidang kefarmasian. Selain itu banyaknya efek samping yang dapat ditimbulkan oleh kelompok analgesik-antipiretik. Hal tersebut mendorong penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan struktur obat baru. Penemuan obat baru tersebut bertujuan untuk pengobatan suatu jenis penyakit tertentu, meningkatkan aktivitas obat, menurunkan efek samping yang merugikan, memperpanjang masa kerja, memperbesar tingkat kenyamanan dan meningkatkan selektivitas obat. Merancang suatu obat dapat dilakukan dengan menggunakan pendekatan struktur kimia, sifat-sifat kimia fisik dan aktivitas biologis (*Structure Activity Relationship*) (Craig, 1984). Dalam usaha untuk mendapatkan senyawa bioaktif dengan aktivitas yang optimal sebagai analgesik maka perlu dilakukan modifikasi struktur.

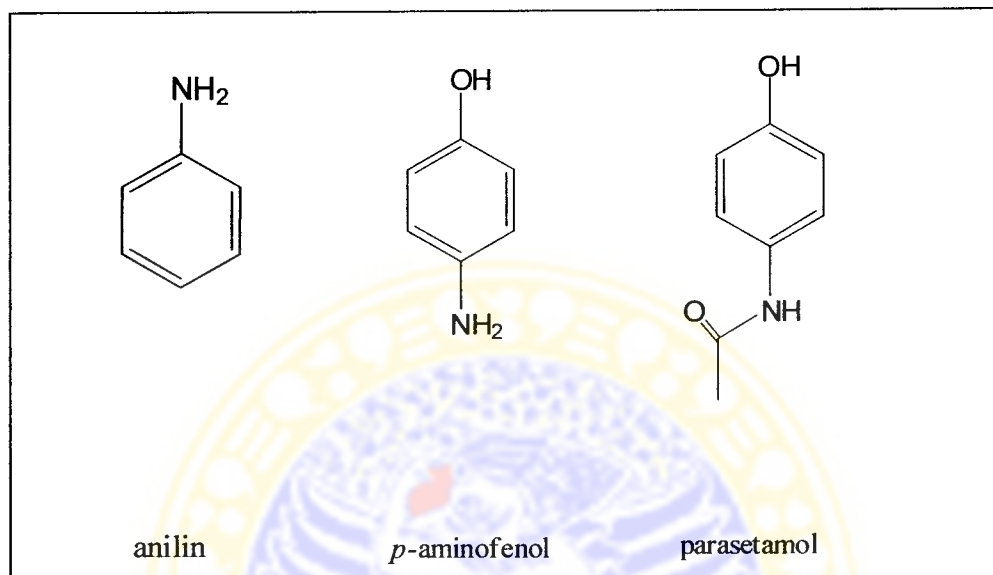
Struktur kimia obat dapat menjelaskan sifat-sifat obat dan terlihat bahwa unit-unit struktur atau gugus-gugus molekul obat berkaitan dengan aktivitas biologisnya. Untuk mencari hubungan antara struktur kimia dan aktivitas biologis dapat dilakukan dengan mengaitkan gugus fungsional tertentu dengan respons biologis yang tertentu pula (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Aktivitas biologis suatu senyawa dipengaruhi oleh sifat-sifat kimia fisika, yang dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu sifat lipofilik, elektronik dan sterik. Sifat lipofilik terutama mempengaruhi kemampuan senyawa dalam menembus membran biologis, sifat elektronik mempengaruhi penembusan membran biologis dan ikatan obat-reseptor, sedang sifat sterik terutama menentukan keserasian interaksi molekul senyawa dengan reseptor dalam sel. (Purcell *et al*, 1972; Korolkovas, 1988)

Potensi *p*-aminofenol sebagai bahan dasar pembuatan obat belum dikembangkan secara optimal. Dalam penelitian ini ingin dilakukan modifikasi struktur *p*-aminofenol dalam usaha mendapatkan senyawa-senyawa baru dengan aktivitas penghilang rasa sakit (analgesik) optimal dan toksisitas yang rendah.

p-aminofenol toksisitasnya lebih rendah dibanding anilin, orto aminofenol dan meta aminofenol, tetapi masih terlalu toksik untuk langsung digunakan

sebagai obat sehingga perlu dilakukan modifikasi struktur untuk mengurangi toksisitasnya (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Salah satu contoh turunan anilin dan *p*-aminofenol dapat dilihat pada gambar 1.1.



Gambar 1.1 Turunan anilin dan *p*-aminofenol

Modifikasi struktur *p*-aminofenol yang sudah dilakukan, adalah dengan penambahan gugus asetil, menghasilkan parasetamol yang menunjukkan aktivitas penghilang rasa sakit (analgesik) yang cukup efektif dan sudah banyak digunakan di Indonesia. Parasetamol tidak dianjurkan untuk pengobatan jangka panjang karena pada *in vivo* akan dimetabolisme menjadi bentuk ion imidokuinon yang reaktif dan dapat mengikat jaringan hati sehingga menyebabkan terjadinya hepatotoksik (Korolkovas, 1988; Siswandono dan Soekardjo, 1995).

Obat-obat penghilang rasa sakit (analgesik) pada umumnya termasuk senyawa yang berstruktur spesifik, di mana sifat kimia fisik sangat berperan terhadap aktivitas biologisnya dan yang paling besar perannya adalah sifat lipofilik dan sterik. Obat-obat penghilang rasa sakit (analgesik) mempunyai nilai log P optimal = 2,54. Pada perhitungan Log P teoritis menggunakan program komputer Chem office 2006 parasetamol mempunyai nilai log P = 0,89, dan MR = 40,83 (cm³/mol), sedang pada *N*-(4 hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai nilai log P = 3,07, MR = 68,63 (cm³/mol) dan $\sigma_p = 0,23$. Hal ini

berarti bahwa lipofilitas *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida lebih besar dibanding parasetamol. Logaritma koefisien partisi ($\log P$) merupakan salah satu parameter hidrofilik (lipofilik) yang sering digunakan dalam HKSA (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Peningkatan lipofilitas, akan meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis, dan diharapkan jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor meningkat, sehingga aktivitas akan meningkat juga.

Rancangan sintesis dalam penelitian ini adalah melakukan asilasi gugus NH_2 dari *p*-aminofenol dengan 4-bromobenzoil klorida menggunakan metode *Schotten-Baumann*. Pada struktur *p*-aminofenol, gugus OH dan NH_2 dapat bereaksi dengan 4-bromobenzoil klorida, tetapi karena gugus NH_2 mempunyai sifat nukleofil yang lebih besar dibandingkan gugus OH maka reaksi asilasi akan terjadi pada gugus tersebut. Dalam metode *Schotten-Baumann* digunakan basa NaOH maupun basa organik (piridin), sebagai pelarut, katalis dan penangkap HCl dari hasil reaksi. Senyawa hasil sintesis diuji kemurniannya dengan penentuan jarak lebur dan kromatografi lapis tipis, identifikasi struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV dan inframerah (IR) serta spektrometer resonansi magnet inti ($^1\text{H-NMR}$) (Silverstein *et al*, 1981, Creswell *et al*, 1982, Pavia *et al*, 1996).

Untuk mengetahui efek analgesik dari suatu senyawa, dapat digunakan beberapa metode antara lain metode stimulasi panas dengan pemanasan *hot plate* pada mencit, stimulasi listrik atau tekanan pada ekor mencit dan stimulasi kimiawi yang dilakukan pada mencit atau tikus dengan diberi senyawa penginduksi nyeri (*writhing test*). Senyawa yang digunakan sebagai penginduksi nyeri adalah fenilkuinon, bradikinin, larutan KCl 2 %, larutan NaCl 4 %, larutan asam asetat atau histamin, Dalam penelitian ini dengan penginduksi nyeri digunakan asam asetat 0,6 % karena mudah di dapat dan merupakan penginduksi nyeri yang sering digunakan dalam uji analgesik dengan *writhing test*. (Domer, 1971).

Uji aktivitas ini sangat bermanfaat untuk menilai secara cepat potensi sekelompok senyawa yang aktivitas senyawa induknya telah diketahui. Selain itu, metode ini dapat memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis analgesik yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri sehingga dapat diperoleh perkiraan kuantitas aktivitas analgesik (Turner, 1965).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas, dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dapat disintesis dari reaksi asilasi antara senyawa *p*-aminofenol dan 4-bromobenzoil klorida dan berapa prosentase hasilnya ?
2. Apakah senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai aktivitas analgesik pada mencit (*Mus musculus*) dan bagaimana aktivitasnya dibanding parasetamol ?

1.3 Hipotesis

1. Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dapat disintesis dengan cara reaksi asilasi antara *p*-aminofenol dan 4-bromobenzoil klorida.
2. Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai aktivitas analgesik pada mencit (*Mus musculus*) yang lebih besar dibanding parasetamol.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan senyawa baru turunan *p*-aminofenol yaitu *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida yang disintesis dari senyawa *p*-aminofenol dengan 4-bromobenzoil klorida.
2. Mengetahui aktivitas analgesik senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan membandingkan dengan aktivitas parasetamol.

1.5 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan akan diperoleh:

N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida yang mempunyai aktivitas analgesik yang diharapkan lebih besar daripada senyawa parasetamol, sehingga dapat digunakan sebagai calon alternatif obat analgesik baru setelah melalui uji-uji pre klinis dan klinis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Nyeri

Nyeri adalah perasaan sensoris dan emosional yang tidak enak dan yang berkaitan dengan (ancaman) kerusakan jaringan. Keadaan psikis sangat mempengaruhi nyeri, misalnya emosi dapat menimbulkan sakit (kepala) atau memperhebatnya, tapi dapat pula menghindarkan sensasi rangsangan nyeri. Nyeri merupakan suatu perasaan pribadi dan ambang toleransi nyeri berbeda – beda bagi setiap orang. Batas nyeri untuk suhu tubuh adalah konstan, yakni pada 44-45°C (Tjay dan Rahardja, 2002)

Rasa nyeri dalam kebanyakan hal hanya merupakan suatu gejala, yang berfungsi melindungi tubuh. Nyeri harus dianggap sebagai isyarat bahaya tentang adanya gangguan di jaringan, seperti peradangan (rematik, encok), infeksi jasad renik, atau kejang otot. Nyeri yang disebabkan oleh rangsangan mekanik, kimiawi atau fisis (kalor, listrik), dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan. Rangsangan tersebut dapat memicu pelepasan zat-zat tertentu yang disebut mediator nyeri.

Mediator nyeri antara lain dapat mengakibatkan reaksi radang dan kejang-kejang yang mengaktivasi reseptor nyeri di ujung saraf bebas di kulit, mukosa dan jaringan lain. *Nociceptor* ini terdapat diseluruh jaringan dan organ tubuh, kecuali di SSP. Dari sini rangsangan disalurkan ke otak melalui jaringan lebat dari tajuk-tajuk neuron dengan banyak sinaps via sum-sum tulang belakang, sum-sum lanjutan, dan otak tengah. Dari *thalamus (opticus)* impuls kemudian diteruskan ke pusat nyeri di otak besar, dimana impuls sebagai nyeri.

Mediator nyeri kini juga disebut autocoida dan terdiri dari antara lain histamin, serotinin, bradykinin, leukotrien, dan prostaglandin. Bradykinin adalah polipeptida (rangkaian asam amino) yang dibentuk dari protein plasma. Prostaglandin mirip strukturnya dengan asam lemak dan terbentuk dari *asam arachidonat*, prostaglandin dapat bekerja menurunkan nilai ambang tanggapan terhadap zat penyebab rasa nyeri dan memperkuat pengaruh faktor penyebab rasa lain. Zat kimia lain yang dilepaskan oleh rangsangan saraf atau cedera sel, misalnya asetilkolin atau ion potasium, dapat juga menimbulkan rasa nyeri

(Spector, 1995). Menurut perkiraan, zat-zat ini meningkatkan kepekaan ujung-saraf sensoris bagi rangsangan nyeri yang diakibatkan oleh mediator lainnya. Zat-zat ini dan juga bradikinin, berkhasiat vasodiatasi kuat dan memperbesar permeabilitas kapiler yang mengakibatkan radang dan edema. Berhubungan kerjanya dan inaktivasinya pesat dan bersifat lokal, maka juga dinamakan hormon lokal. Mungkin sekali zat-zat ini bekerja juga sebagai mediator demam.

Ambang nyeri didefinisikan sebagai tingkat (level) di mana nyeri dirasakan untuk pertama kali. Jadi, intensitas rangsangan yang terendah saat seseorang merasakan nyeri. Untuk setiap orang, ambang nyerinya adalah konstan

Penanganan rasa nyeri berdasarkan proses terjadinya, rasa nyeri dapat dilawan dengan beberapa cara, yakni:

- a. merintanginya terbentuknya rangsangan pada reseptor nyeri perifer dengan analgetika perifer.
- b. merintanginya penyaluran rangsangan di saraf-saraf sensoris, misalnya dengan analgetika lokal.
- c. Blokade pusat nyeri di SSP dengan analgetika sentral (narkotika) atau dengan analgetika umum (Tjay dan Rahardja, 2002).

2.2 Tinjauan Tentang Analgesik

2.2.1 Definisi Analgesik

Analgetik atau obat penghalang nyeri adalah zat-zat yang mengurangi atau menghalau rasa nyeri tanpa menghilangkan kesadaran (Tjay dan Rahardja, 2002). Analgesik bekerja dengan meningkatkan nilai ambang persepsi rasa sakit. Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekuler (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

2.2.2 Klasifikasi Analgesik

Analgesik telah dibagi menjadi 3 tipe berdasarkan jenisnya :

1. Antipiretik Perifer, seperti asam salisilat untuk analgesik normal dan jaringan inflamasi, menekan temperatur dan menghilangkan edema

2. Antipiretik hipotalamus, seperti aminopirine, untuk analgesik normal dan jaringan inflamasi, menekan temperatur dan menghilangkan edema
3. Analgesik Narkotik, untuk analgesik normal dan jaringan inflamasi, memiliki pengaruh yang poten dalam pembatalan nyeri dalam temperatur dan edema

Tapi lebih cenderung membagi menjadi jenis yang lain. Sesuai dengan pertimbangan, analgesik dibagi menjadi dua tipe, yaitu analgesik narkotik dan analgesik non narkotik (Turner, 1965).

Analgesik narkotik bekerja terhadap reseptor opioid yang khas di SSP, sehingga persepsi nyeri berubah atau berkurang. Opioid ini berguna untuk mengatasi rasa nyeri pada tingkatan sedang (*moderat pain*) sampai pada tingkat nyeri yang parah (*chronic pain*), namun dalam penggunaan opioid ini harus dalam pengawasan karena opioid memiliki efek samping yang berbahaya seperti ketergantungan obat. Sedangkan Analgesik non narkotik digunakan untuk mengurangi rasa nyeri ringan sampai sedang tanpa mempengaruhi SSP atau menurunkan kesadaran, juga tidak menimbulkan ketagihan.

Kebanyakan analgesik juga berdaya antipiretis dan antiinflamasi. Oleh karena itu, obat ini tidak hanya digunakan sebagai obat nyeri, melainkan juga pada gangguan demam (infeksi virus atau kuman, salesma, pilek) dan peradangan. Kombinasi dari dua atau lebih analgetika sering kali digunakan, karena terjadi efek potensiasi (Tjay dan Rahardja, 2002). Semua obat mirip-aspirin bersifat antipiretik, analgesik, dan anti-inflamasi. Ada perbedaan aktivitas di antara obat-obat tersebut, misalnya: parasetamol (asetaminofen) bersifat antipiretik dan analgesik tetapi anti inflamasinya rendah sekali (Ganiswarna, 1995).

Rasa nyeri dalam kebanyakan hal hanya merupakan suatu gejala, yang berfungsi melindungi tubuh. Nyeri didefinisikan sebagai isyarat bahaya adanya gangguan di jaringan, seperti peradangan (rematik, encok), infeksi jasad renik, atau kejang otot. Nyeri yang disebabkan oleh rangsangan mekanik, kimiawi atau fisis (kalor, listrik), dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan. Rangsangan tersebut dapat memicu pelepasan zat-zat tertentu yang disebut mediator nyeri.

Mediator nyeri kini juga disebut autacoida dan terdiri dari antara lain histamin, serotonin, bradikinin, leukotrien, dan prostaglandin (Tjay dan Rahardja, 2002).

Prostaglandin hanya berperan pada nyeri dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian telah membuktikan bahwa prostaglandin menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Jadi prostaglandin menimbulkan keadaan hiperalgesia, kemudian mediator kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata (Ganiswarna, 1995).

2.2.3 Tinjauan Tentang Analgesik-antipiretik

Analgesik-antipiretik mempunyai efek untuk menurunkan demam. Demam didefinisikan temperatur tubuh diatas batas normal, dapat disebabkan oleh kelainan didalam otak sendiri atau oleh bahan-bahan toksik yang mempengaruhi pusat pengaturan – temperatur (Guyton and Hall, 1997). Suhu badan diatur oleh keseimbangan antara produksi dan hilangnya panas. Alat pengatur suhu tubuh berada di hipotalamus. Pada keadaan demam keseimbangan ini terganggu tetapi dapat dikembalikan ke normal. Ada bukti bahwa peningkatan suhu tubuh pada keadaan patologik diawali pelepasan suatu zat pirogen endogen atau sitokin seperti interleukin-1 (IL-1) yang memicu pelepasan prostaglandin yang berlebihan didaerah preoptik hipotalamus. Selain itu PGE₂ terbukti menimbulkan demam setelah diinfuskan ke thalamus. Obat mirip-aspirin menekan efek zat pirogen endogen dengan menghambat sintesis prostaglandin. Tetapi demam yang timbul akibat pemberian prostaglandin tidak mempengaruhi, demikian pula peningkatan suhu oleh sebab lain seperti latihan fisik (Ganiswarna S.G., 1995).

2.3 Tinjauan Tentang Senyawa Turunan Anilin dan *p*-Aminofenol

Derivat para amino fenol yaitu fenasetin dan asetaminofen dapat dilihat strukturnya pada (gambar 1.1)

Asetaminofen (parasetamol; *N*-asetil-*p*-amino fenol; Tylenol) merupakan metabolit aktif dari fenasetin, disebut juga pelangkin analgesik. Asetaminofen

adalah alternatif yang efektif selain aspirin sebagai agent analgesik antipiretik. Bagaimanapun juga tidak seperti aspirin, asetaminofen aktivitas antiinflamasi rendah. Asetaminofen di Indonesia lebih dikenal dengan nama parasetamol dan obat ini tersedia tanpa melalui resep dokter (Hardman dan Limbird, 2001).

Parasetamol merupakan analgesik yang pada dosis normal relatif aman dan tidak toksik, tetapi pada dosis tinggi dapat menimbulkan nekrosis hati. Hal ini disebabkan parasetamol mengalami *N*-hidroksilasi membentuk *N*-hidroksiasetaminofen dan secara spontan mengalami dehidrasi pada gugus *N*-hidroksilamid, menghasilkan *N*-asetilimidokuinon yang sangat reaktif. *N*-asetilimidokuinon inilah yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan makromolekul hati sehingga terjadi nekrosis (Siswandono and Soekardjo, 2000).

Asetanilid adalah induk dari kelompok obat-obatan ini. Sejarahnya pertama kali dikenalkan pada tahun 1886 dengan nama antifebrin oleh Cahn dan Hepp, yang tidak sengaja menemukan aksi antipiretiknya. Bagaimanapun juga asetanilid telah terbukti memiliki efek yang melebihi racun. Dalam penelitian untuk mengurangi kadar racun yang lebih rendah, *p*-aminofenol dicoba tubuh mengoksidasi asetanilid pada komponen-komponennya. Toksisitas tidak dapat dikurangi, banyak turunan *p*-aminofenol telah diteliti. Salah satu yang memuaskan adalah hasil test dari fenasetin (asetofenetidin). Hal ini dikenalkan pada terapi pada tahun 1887 dan secara mengejutkan digunakan untuk campuran analgesik. Sampai dengan hal ini menyebabkan implikasi pada penyalahgunaan analgesik nefropati.

Parasetamol pertama kali digunakan sebagai obat oleh Von Mering pada 1893. populer sejak tahun 1949. Setelah hal ini dikenal sebagai metabolit aktif yang besar oleh asetanilid dan fenasetin

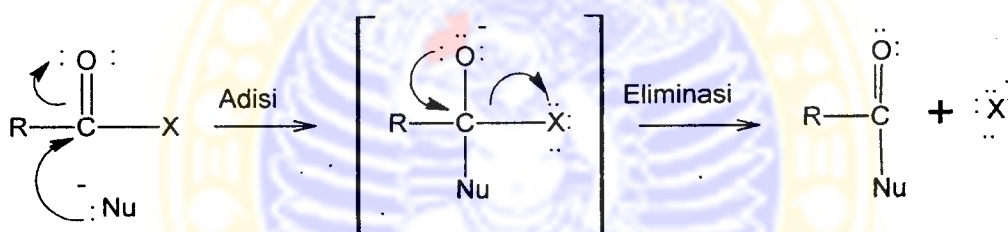
Parasetamol memiliki efek analgesik dan antipiretik yang secara signifikan tidak dapat dibedakan dari aspirin. Tetapi parasetamol memiliki satu kelemahan yaitu tingkat inflamasi yang rendah. Kegagalan parasetamol untuk aktivitas antiinflamasi melingkupi fakta bahwa parasetamol hanya penghalang yang lemah dari *cyclooxygenase* pada keberadaan konsentrasi yang tinggi dari peroxides yang

ditemukan dalam *inflammatory lesion*. Sebaliknya efek antipiretiknya dapat dijelaskan oleh kemampuannya untuk menghalangi *cyclooxygenase* pada otak, dan *peroxidasenya* rendah. Lebih jauh lagi, parasetamol bukan merupakan penghalang dari aktivitas neutropil sebagai NSAID lain (Hardman dan Limbird, 2001).

2.4 Tinjauan Tentang Reaksi Asilasi

Reaksi asilasi merupakan proses perpindahan gugus asil dari suatu atom (gugus) ke atom (gugus) lain.

Zat pengasilasi bertindak sebagai elektrofil dan biasanya yang mendapat serangan adalah atom karbon pada gugus karbonil



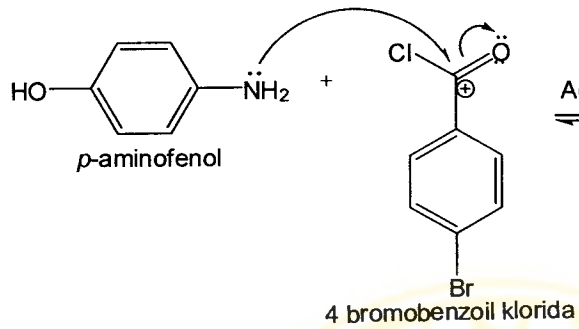
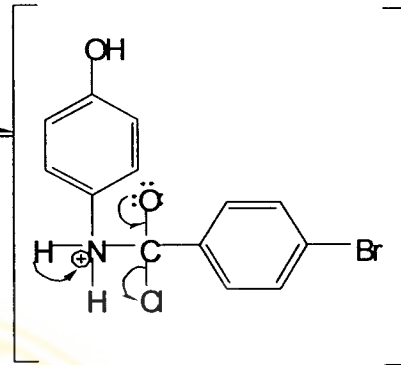
Gambar 2.1. Mekanisme reaksi asilasi secara umum

Mekanisme reaksi asilasi terjadi melalui dua tahap, tahap pertama adalah adisi nukleofil pada gugus karbonil dan tahap kedua adalah eliminasi ion halida.

Tahap pertama terjadi penyerangan pada gugus karbonil dan pembentukan hasil antara tetrahedral yang didukung oleh halangan sterik relatif dari karbonil dan kemampuan atom oksigen untuk menampung sepasang elektron tambahan sehingga mempermudah penyerangan pada karbon.

Tahap kedua adalah penataan kembali elektron-elektron dan diikuti pengusiran gugus pergi (X) yang tergantung pada kebiasaan gugus pergi yang baik. Adapun urutan kebiasaan gugus pergi adalah



Reaksi asilasi terjadi dalam dua tahapReaksi tahap 1Reaksi tahap 2

N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Gambar 2.2.Mekanisme reaksi asilasi *p*-aminofenol dengan 4-bromobenzoil klorida

Reaksi asilasi dapat menggunakan asil klorida dan anhidrida. Asilasi dengan asil klorida adalah dengan metode *Schotten-Baumann*. Sintesis dilakukan dalam suasana basa. Cara ini dilakukan bila semua bahan pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan (Mc Murry, 1984). Selain itu ditambahkan larutan NaOH yang berfungsi menetralkan HCl yang dibebaskan selama reaksi, membentuk natrium klorida yang larut air. Pelarut yang umum digunakan adalah piridin (basa organik) yang dapat berfungsi menetralkan HCl membentuk piridinium klorida yang larut air (Fessenden, 1989).

2.5 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur

2.5.1 Tinjauan Tentang Jarak Lebur

Jarak lebur suatu padatan adalah suhu dimana padatan mulai berubah menjadi cairan pada keadaan di bawah tekanan 1 atmosfer. Jarak lebur merupakan salah satu tetapan fisika yang dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa dalam bentuk padat.

Umumnya senyawa murni mempunyai jarak lebur yang tajam dengan rentang lebur tidak lebih dari $2,0^{\circ}\text{C}$. Ketajaman jarak lebur dipengaruhi oleh beberapa hal antara lain ukuran kristal, kecepatan pemanasan dan adanya pengotor lain. Adanya pengotor akan menyebabkan jarak lebur turun dan memperlebar rentang lebarnya (Vogel, 1968)

2.5.2 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi. Fase diam KLT berupa lapis tipis yang memiliki ketebalan 0,1-2,0 mm terdiri dari bahan padat yang umum digunakan adalah silika gel. Ukuran partikel pada rentang kehalusan tertentu yaitu 1-25 μ . Keadaan uniform fase diam ini untuk tujuan didapatkannya pemisahan yang baik, laju aliran eluen yang cepat dan merata. Pada teknik ini, sampel berupa larutan ditotolkan pada plat atau lempeng kromatografi kemudian dieluasi dengan eluen yang sesuai.

KLT dapat digunakan untuk analisis kualitatif dideteksi dengan membandingkan R_f (*Retardation factor*) sampel dengan R_f pembanding. Harga R_f diperoleh dari hasil bagi jarak tempuh noda dari titik penotolan dengan jarak yang ditempuh eluen (Stahl, 1969).

$$R_f = \frac{S_o}{S}$$

Keterangan : S_o = jarak tempuh noda dari titik penotolan

S = jarak yang ditempuh eluen

Keuntungan KLT sebagai metode pemisahan antara lain memerlukan sedikit eluen, pelaksanaannya yang mudah, dapat untuk mengamati beberapa sampel pada satu lempeng dalam sekali elusi dan biaya yang relatif murah.

2.5.3 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometer

Ultraviolet

Identifikasi struktur dengan spektrofotometri UV pada umumnya adalah melihat intensitas dan panjang gelombang (λ) maksimum tersebut tergantung pada struktur elektronik dari gugus-gugus yang terdapat dalam struktur molekul senyawa. Gugus yang dapat menyebabkan terjadinya serapan pada cahaya pada daerah ultra-violet dan sinar tampak disebut gugus kromofor. Contoh gugus kromofor : C-O-, -C-N-, -C-S-, -C=O, -C=C-.

Sedang gugus auksokrom adalah gugus jenuh atau heteroatom yang apabila terikat pada gugus kromofor dapat mengubah intensitas serapan dan panjang gelombang maksimum. Contoh gugus auksokrom : -CH₃, -Cl, -OH, -NH₂ (Silverstein *et al*, 1981; Creswell *et al*, 1982; Pavia *et al*, 1996).

2.5.4 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometer

Inframerah

Spektrofotometer IR digunakan untuk identifikasi gugus-gugus fungsional dari suatu senyawa. Daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus

Spektrofotometer IR digunakan untuk identifikasi gugus-gugus fungsional dari suatu senyawa. Daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus fungsional adalah daerah antara $1400-4000\text{ cm}^{-1}$, yang berada pada bagian kiri spektrum inframerah (Fessenden and Fessenden, 1986).

Absorpsi yang disebabkan karena uluran C=C aromatis nampak pada kira-kira $1400-1500\text{ cm}^{-1}$. Amina menunjukkan absorpsi uluran NH yang jelas pada $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ dikiri absorpsi CH. Bila terdapat dua hidrogen pada suatu nitrogen amida ($-\text{NH}_2$), absorpsi NH nampak sebagai peak kembar. Gugus karbonil akan memberikan absorpsi pada daerah $1600-1725\text{ cm}^{-1}$ (Pavia, 1996).

2.5.5 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$)

Spektroskopi ^1H -Resonansi magnet inti merupakan metode yang penting dalam identifikasi struktur karena dapat memberikan informasi penting tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen dalam molekul. Resonansi magnet inti diakibatkan oleh penyerapan radiasi elektromagnet oleh proton-proton dalam suatu medan magnet (H_0), yang membalik dari keadaan spin paralel ke antiparalel. Suatu medan magnet molekul imbasan dapat memperisai proton atau meniadakan perisai dan mengakibatkan suatu geseran kimia (δ) dari pita absorpsi. Medan imbasan adalah hasil efek anisotropik dan efek induktif suatu proton yang terperisai akan menyerap diatas medan mendekati TMS rujukan, sedangkan proton yang kurang terperisai akan menyerap dibawah medan. Adanya cincin benzena akan ditunjukkan pada daerah 6-8 ppm, pada daerah 9-10 ppm akan menunjukkan adanya gugus NH (Fessenden dan Fessenden, 1992).

2.6 Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktifitas Analgesik

Metode-metode pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menilai kemampuan zat uji untuk menekan atau menghilangkan rasa nyeri yang diinduksi

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 inchi dibawah lampu.

Jenis uji lain yang mirip dengan prinsip diatas adalah metode yang digunakan oleh Bass dan Var Der brook dengan perbedaan yaitu lampu yang digunakan 100 watt, lama penyinaran direkam secara otomatis pada pencatat waktu. Metode ini memudahkan pengamatan respon hewan dengan stopwatch dibandingkan dengan panas radiasi pada *tail flick* dari D'amour-Smith yang sangat melelahkan mata.

Stimulus panas dapat diberikan secara konduksi, dikenal sebagai metode *Hot Plate Test* dari wolf dan Mc.Donald. Hewan percobaan (mencit) diamati waktu reaksinya setelah diatas *Hot Plate*. Pada temperatu 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 ditujukan antara lain: menjilat kaki, mengangkat kaki atau meloncat keluar dari silinder. Mencit akan menunjukkan reaksi-reaksi tersebut jika dikenakan pada kondisi-kondisi yang tidak menyenangkan (Domer, 1997).

2.6.2 Metode Stimulasi Listrik

Simulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain:

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 malata*. Elektroda aliran listrik dipasang di *ganglion gaseri* atau telinga. Kemudian kera dilatih dengan memberikan arus tertentu. Apabila kera merasakan kesakitan dan

dapat menyentuh level tertentu yang tersedia maka arus akan turun satu tingkat secara otomatis. Dengan demikian dapat diukur ambang rasa sakitnya. Kemudian setelah perlakuan, percobaan diulang kembali. Bila ambang sakit meningkat setelah perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa obat tersebut memiliki efek analgesik. Metode ini memerlukan perlengkapan khusus yang rumit. Metode yang lain adalah metode pulpa gigi, tetapi hal ini sulit dilakukan karena memerlukan keterampilan yang tinggi (Domer, 1997).

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 cedera akibat penekanan sehingga mempengaruhi percobaan selanjutnya (Domer, 1997).

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.

Sebagai catatan efektifitas analgesik 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 efektifitas 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 diberikan 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 *et al.*, 2002).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Turunan *p*-aminofenol yang sering digunakan sebagai analgesik adalah parasetamol. Dalam penelitian ini, ingin dikembangkan turunan *p*-aminofenol lain yaitu *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida. Perbedaan struktur dengan parasetamol adalah pada gugus asil yang terikat pada atom N, dimana gugus asetil pada gugus struktur parasetamol diganti dengan gugus 4-bromobenzoil. Pergantian ini akan mempengaruhi sifat fisika kimia senyawa, yaitu peningkatan sifat lipofilik ($\log P$) dan sterik (MR). Parasetamol mempunyai nilai $\log P = 0,89$ dan $MR = 40,83 \text{ (cm}^3/\text{mol)}$, sedang *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai nilai $\log P = 3,07$, $MR = 68,63 \text{ (cm}^3/\text{mol)}$ dan $\sigma_p = 0,23$. Sifat lipofilik terutama mempengaruhi kemampuan senyawa dalam menembus membran biologis, sifat elektronik mempengaruhi penembusan membran biologis dan ikatan obat-reseptor, sedang sifat sterik terutama menentukan keserasian interaksi molekul senyawa dengan reseptor dalam sel (Purcell *et al*, 1972; Korolkovas, 1988). Peningkatan sifat kimia fisika di atas diharapkan dapat meningkatkan aktivitas senyawa, sehingga diharapkan pula *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar dibanding parasetamol.

Rancangan sintesis dalam penelitian ini adalah melakukan reaksi asilasi gugus $-\text{NH}_2$ dari *p*-aminofenol dengan 4-bromobenzoil klorida menggunakan metode *Schotten-Baumann*. Pada struktur *p*-aminofenol, gugus $-\text{OH}$ dan $-\text{NH}_2$ dapat bereaksi dengan 4-bromobenzoil klorida, tetapi karena gugus $-\text{NH}_2$ mempunyai sifat nukleofil yang lebih besar dibanding gugus $-\text{OH}$ maka reaksi asilasi akan terjadi pada gugus $-\text{NH}_2$. Reaksi tersebut adalah substitusi nukleofilik dan gugus $-\text{OH}$ pada *p*-aminofenol bertindak sebagai nukleofil. Sintesis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

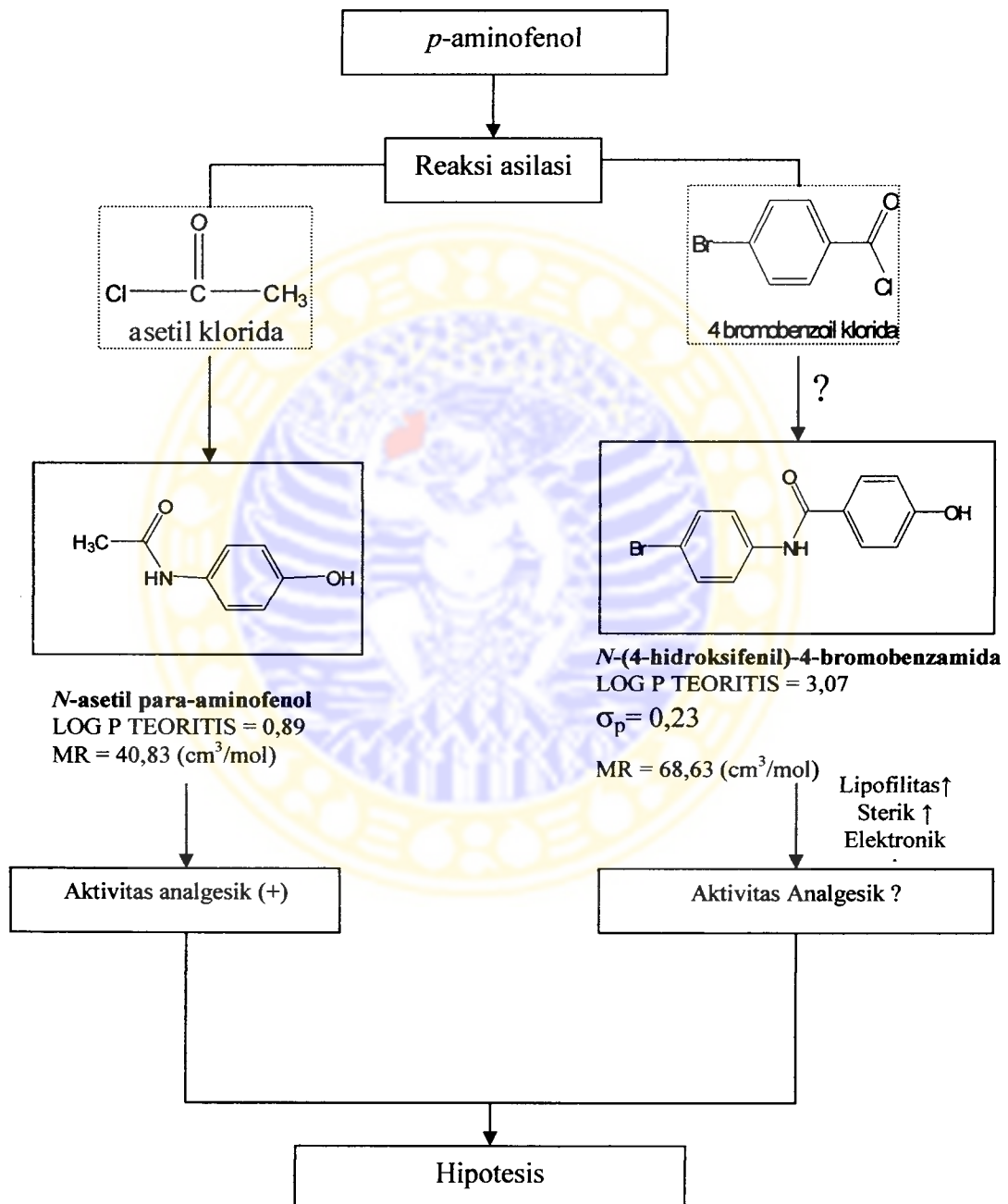
berdasarkan metode *Schotten-Baumann* yang dimodifikasi, dengan menggunakan basa organik (piridin) yang berfungsi sebagai pelarut, katalis dan penangkap HCl dari hasil reaksi.

Pada penelitian ini, uji aktivitas analgesik *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dilakukan dengan metode *writhing test*, dengan hewan coba mencit (*Mus musculus*) galur Blab-C. Pada uji ini ditentukan ED₅₀, yaitu dosis yang diperlukan untuk menimbulkan aktivitas sebesar 50%.



3.2 Skema kerangka Konseptual

Berdasarkan kerangka konseptual maka dapat digambarkan alur pemikiran untuk tujuan penelitian seperti yang terlihat pada gambar 3.1



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan kimia

1. *p*-aminofenol p.s. (Sigma)
2. Parasetamol ph.g. (Sigma)
3. 4-bromobenzoil klorida p.s. (Aldrich)
4. Piridin p.a. (Aldrich)
5. Aseton p.a. (E.Merck)
6. Metanol p.a. (E.Merck)
7. Etil asetat p.a. (E.Merck)
8. Kloroform p.a. (E.Merck)
9. Natrium karboksimetil selulosa ph.g. (Interbat)
10. Asam asetat glasial p.a. (E.Merck)
11. Lempeng kromatografi silica gel 60 GF₂₅₄ (E.Merck)
12. Kapas steril
13. Etanol 70% teknis (E.Merck)
14. Etanol absolut p.a (E.Merck)
15. Aquadest
16. Air suling steril (Aqua pro injeksi)

4.1.2 Hewan Coba

Digunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) galur Balb^c, jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 20-30 gram, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh (Pusvetma, Surabaya). Sebelum diberi perlakuan terhadap mencit, dilakukan adaptasi dengan lingkungan selama 1 minggu dan diberi pakan standart serta minum, kemudian mencit dipuasakan semalaman sebelum diberi perlakuan dan untuk tiap mencit hanya digunakan untuk sekali perlakuan saja.

Untuk suatu senyawa digunakan minimal 30 ekor. Mencit dibagi menjadi tiga kelompok yaitu:

- a. Kelompok uji senyawa baru (100mg/kg), 6 ekor
- b. Kelompok uji senyawa baru (50 mg/kg), 6 ekor
- c. Kelompok uji senyawa baru (25 mg/kg), 6 ekor
- d. Kelompok pembanding parasetamol (100mg/kg), 6 ekor
- e. Kelompok pembanding parasetamol (50 mg/kg), 6 ekor
- f. Kelompok pembanding parasetamol (25 mg/kg), 6 ekor
- g. Kelompok kontrol (tanpa obat), 6 ekor

4.2 Alat

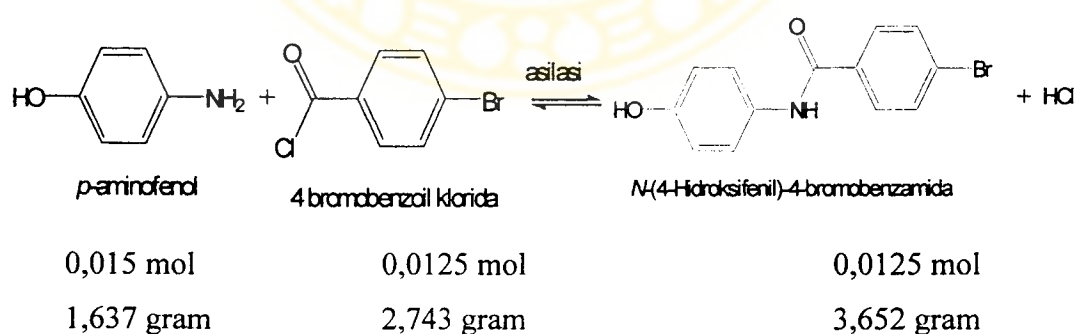
1. Seperangkat alat sintesis
2. Neraca analitik (Ohaus)
3. Timbangan mencit AND HL 100
4. *Hot plate-magnetic stirrer* (Labinco L 32)
5. Bejana kromatografi lapis tipis (KLT)
6. Lampu UV-254 nm (Topcon)
7. *Electerothermal Melting Point Apparatus Bausch-Lomb*
8. *injection disposable syringe* (Terumo)
9. Bejana kromatografi lapis tipis (KLT)
10. Spektrofotometer UV-Vis lambda EZ 201
11. Spektrofotometer FT-IR Jasco FT-IR-5300
12. Spektrometer resonansi magnet inti ($^1\text{H-NMR}$) Hitachi FT-NMR R-1900
13. *Stop watch*
14. Termometer
15. Seperangkat alat-alat gelas

4.3 Prosedur Sintesis Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4- bromobenzamida

Senyawa *N*-(4hidroksifenil)-4-bromobenzamida disintesis dengan mereaksikan 4-bromobenzoil klorida dengan *p*-aminofenol dengan menggunakan modifikasi metode *Schotten-Baumann*.

Prosedur:

0,015 mol (1,637 gram) *p*-aminofenol ditambah 0,0125 mol (1 ml) piridin dan dilarutkan dengan 20 ml aseton, dalam labu alas bulat. 0,0125 mol (2,743 gram) 4-bromobenzoil klorida dicampur dengan 10 ml aseton dalam corong pisah. Larutan 4-bromobenzoil klorida diteteskan ke larutan *p*-aminofenol tetes demi tetes sampai habis, campuran direfluks selama ± 2 jam pada suhu 56°C dan diaduk dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate*. Setelah reaksi sempurna, dicek dengan KLT tiap jam, lalu didinginkan. Selanjutnya campuran dituang ke dalam beker glass yang berisi 50 ml aquadest, hingga terbentuk endapan. Lalu tambahkan larutan NaHCO_3 jenuh secukupnya sampai buih hilang. Endapan disaring dan dicuci dengan aquadest dengan corong buchner sampai bebas piridin (dicek dengan KLT). Setelah itu larutan dilakukan rekristalisasi dengan etanol panas 100 ml, hingga tepat larut, lalu didinginkan. Larutan ditambah aquadest 100 ml, lalu didiamkan sampai terbentuk kristal. Kristal disaring dan dicuci dengan corong buchner. Kristal yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 1 jam, lalu ditimbang dan dihitung persentase hasilnya.



Gambar 4.1 Reaksi sintesis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

4.4 Analisis Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

4.4.1 Pemeriksaan Organoleptis dan reaksi warna

Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, bau dan kelarutan.

4.2 Pemeriksaan Kemurniaan Senyawa

Dalam pemeriksaan titik lebur ini digunakan alat penentu jarak lebur *Mel-Temp Electrothermal*. Sedikit zat (senyawa hasil preparasi) digerus sampai halus kemudian dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya tertutup sampai setinggi ± 3 mm – 5 mm. Selanjutnya pipa kapiler diletakkan di dalam alat penentu titik lebur dan alat dinyalakan. Kenaikan suhu alat diamati sambil mengamati pula zat yang ada di dalam pipa kapiler saat zat mulai meleleh sampai zat meleleh semua. Pemeriksaan ini dilakukan replikasi sebanyak tiga kali dengan menurunkan terlebih dahulu suhu alat, baru kemudian dilakukan pengulangan. Jarak leburnya ialah suhu saat zat mulai meleleh sampai dengan zat meleleh seluruhnya.

4.4.3 Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis

Analisis kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan fase diam lempeng silica gel 60 GF-254 dan pipa kapiler 2 μ l. Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dalam etanol kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi. Sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu dilakukan penjenjuran bejana kromatografi dengan sistem fase gerak. Selanjutnya lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi dan lakukan elusi dengan berbagai sistem fase gerak. Fase gerak yang digunakan adalah:

Etil asetat : metanol = 9 : 1

Etil asetat : etanol = 9 : 1

Etil asetat : kloroform = 7 : 3

Setelah dieluasi, lempeng dikeringkan kemudian diamati nodanya dengan lampu UV pada panjang gelombang 256 nm (Siswandono dkk, 1999).

4.4.4 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel yang akan dianalisa terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut etanol absolut, kemudian diukur serapannya pada daerah UV dengan panjang gelombang 200-400 nm, kemudian diamati panjang gelombang maksimumnya (Silversten et al, 1981; Creswell et al, 1982; Pavia et al, 1996).

4.4.5 Analisis Dengan Spektrofotometer FT-IR

Sampel kurang lebih 1-2 % dicampur dengan serbuk kering kalium bromida untuk dibuat menjadi pellet. Campuran dimasukkan kedalam alat cetakan pellet dan ditekan sebesar 10000-15000 pound per inci persegi menjadi sebuah cakram bening (pellet). Dibuat spektrum IR pada bilangan gelombang (ν) = 500-4000 cm^{-1} dan diidentifikasi pita absorpsi yang khas dari gugus fungsi pada spektrum infra merah (Silverstein et al, 1982; Pavia et al, 1996).

4.4.6 Analisis Spektrometer Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$)

Sedikit sampel dilarutkan dalam dimetilsulfoksida *deuterated* (DMSO- D_6) yang sudah mengandung tetrametisilan (TMS). Dibuat spektrum resonansi proton senyawa pada daerah geseran kimia 0-108. Diidentifikasi intensitas jumlah, posisi pada daerah geseran kimia puncak-puncak proton ($^1\text{H-NMR}$) pada spektrum resonansi magnet inti yang terjadi (Silverstein et al, 1981).

4.5 Prosedur Uji Aktivitas Analgesik

Uji aktivitas analgesik ini ditentukan dengan cara penghambatan terhadap nyeri yang diinduksi secara kimiawi melalui tes geliat (*writhing test*). Pada penelitian ini, bahan kimia yang digunakan sebagai penginduksi nyeri ialah larutan asam asetat 0,6%.

4.5.1 Persiapan hewan coba

Sejumlah mencit berbobot 20-30 g dibagi tiga kelompok, yaitu 1 kelompok uji asam *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida (100 mg/kg); (50mg/kg); (25mg/kg), 1 kelompok pembanding parasetamol (100 mg/kg); (50 mg/kg) ;(25 mg/kg) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 6 ekor. Sebelum percobaan, mencit dipuasakan semalam tetapi tetap diberi minum. Mencit pada kelompok uji akan diberi senyawa uji asam *N*-(4-hidroksifenil)-4-

bromobenzamida pada dosis 100 mg/kg, 50mg/kg, 25mg/kg sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi senyawa uji, hanya diberi larutan CMC Na 0,5%

4.5.2 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6% dan CMC Na 0,5%

Sejumlah 0,6 ml asam asetat glasial diencerkan dengan aqua pro injeksi hingga diperoleh volume 100 ml. Sebanyak 500 mg CMC Na 0,5% (Thompson, 1990), ditaburkan diatas aqua pro injeksi panas 30 ml dan dibiarkan hingga mengembang selama sekitar 5 menit, kemudian digerus dan diencerkan dengan aqua pro injeksi hingga diperoleh volume 100 ml.

4.5.3 Perhitungan Dosis

Dosis senyawa uji yang digunakan adalah 100 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 25 mg/kg BB. Berat mencit yang akan digunakan adalah 20-30 gram. Jika menggunakan bobot mencit 30 gram maka perhitungan dosisnya adalah:

1. $100 \text{ mg/kg} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 3 \text{ mg}$
2. $50 \text{ mg/kg} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 1,5 \text{ mg}$
3. $25 \text{ mg/kg} \times 0,03 \text{ kg (BB mencit)} = 0,75 \text{ mg}$

4.5.4 Pembuatan Sediaan Senyawa Uji

Sediaan uji yang dibuat adalah *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan sediaan pembanding adalah parasetamol. Sediaan yang dibuat adalah untuk dosis 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg. Sehingga untuk mencit 30 g dosis yang diberikan adalah 3 mg, 1,5 mg, 0,75 mg.

Ditimbang 50 mg senyawa digerus dan dicampur merata dengan mucilago CMC Na sampai homogen, kemudian dipindahkan kedalam labu ukur dan ditambahkan larutan CMC Na hingga diperoleh volume 10 ml.

$$\text{Perhitungan : } 50 \text{ mg}/10 \text{ ml} = 5 \text{ mg/ml}$$

4.5.5 Perhitungan Dosis Senyawa Uji

Perhitungan :

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

Jika bobot mencit 30 g dengan dosis 100 mg/kg/BB maka volume sediaan yang diberikan adalah:

$$\frac{3mg}{5mg/ml} = 0,6ml$$

Jika bobot mencit 30 g dengan dosis 50 mg/kg/BB maka volume sediaan yang diberikan adalah:

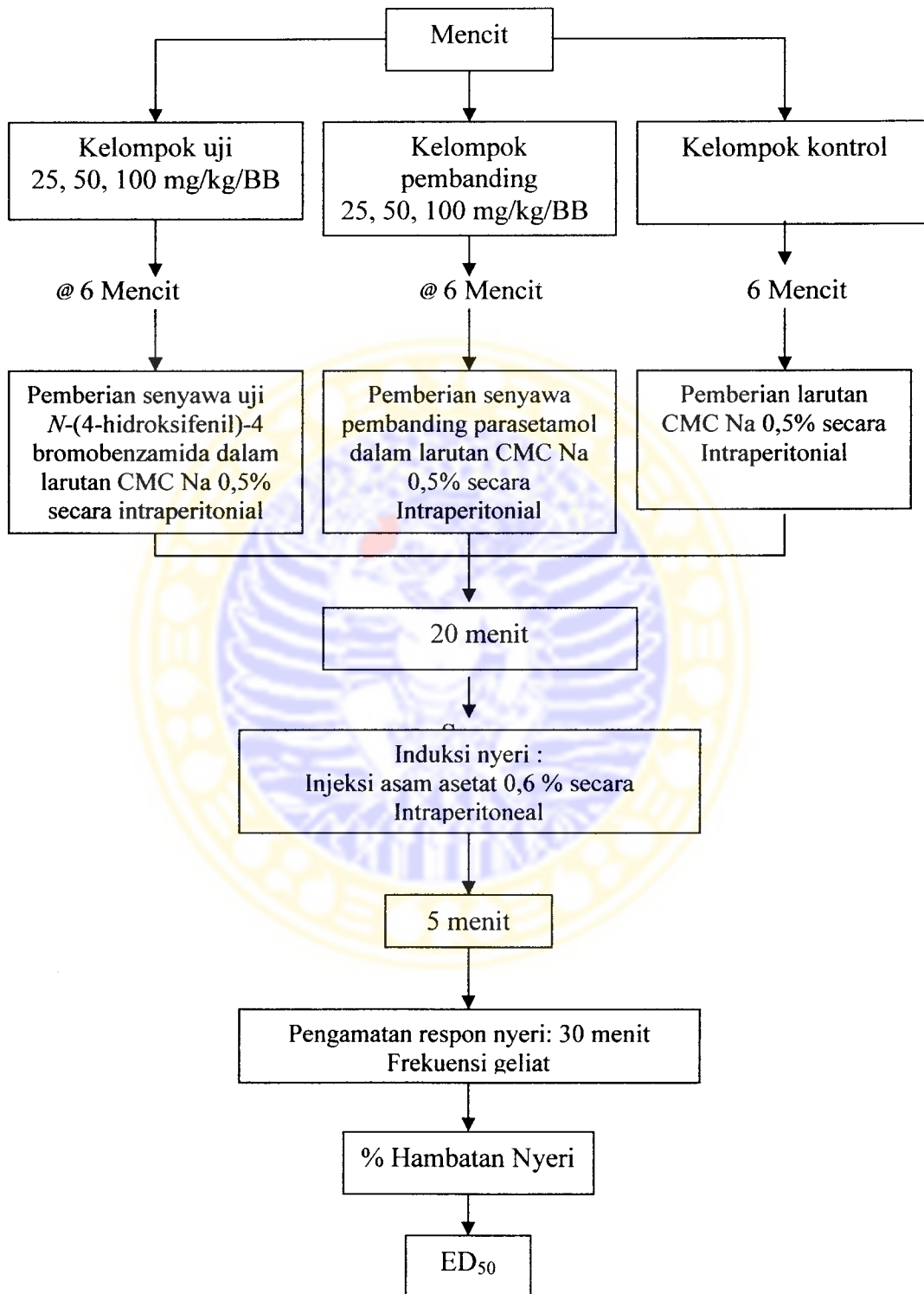
$$\frac{1,5mg}{5mg/ml} = 0,3ml$$

Jika bobot mencit 30 g dengan dosis 25 mg/kg/BB maka volume sediaan yang diberikan adalah:

$$\frac{0,75mg}{5mg/ml} = 0,15ml$$

4.5.6 Pelaksanaan Uji Aktivitas

Mencit dengan bobot tertentu diberi sediaan uji dosis 100 mg/kg; 50 mg/kg; 25 mg/kg secara intraperitoneal (i.p). 20 menit setelah pemberian sediaan obat, mencit disuntik dengan larutan asam asetat 0,6 % volume 0,01 ml/g berat badan secara i.p 5 menit kemudian diamati respon nyeri dari mencit yang berupa geliat selama 30 menit, sehingga diperoleh data frekuensi geliat kelompok kontrol, pembanding, dan uji. Dari data penelitian kemudian dihitung nilai % hambatan nyeri dari tiap-tiap dosis

Bagan Uji Aktivitas**Gambar 4.2** Bagan Uji Aktivitas

4.6 Analisis Data

4.6.1 Anova

Anova (*Analysis of Variance*) Mengendalikan 1 atau lebih variabel independen disebut dgn *faktor* (*variabel treatment*) tiap faktor mengandung 2 atau lebih *level* (kategori / klasifikasi), mengamati efek pada variabel dependen, merespon level pada variabel independen. Perencanaan Eksperimen dengan menggunakan uji hipotesis. Analisis varian satu arah (*one way*) dilakukan karena perbedaan diantara 3 atau lebih *mean* populasi yaitu (dosis, replikasi, dan aktivitas) maka digunakan analisis varian satu arah (*one way*) dan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna data frekuensi geliat pada mencit antar kelompok kontrol, dengan antar kelompok pembanding, serta dengan antar kelompok uji (dengan tiga dosis yang berbeda), maka dilakukan uji F yaitu analisis varians satu arah (*oneway anova*) pada $\alpha = 0,05$, dengan hipotesis sebagai berikut:

H_0 = Tidak ada perbedaan yang bermakna frekuensi geliat antar kelompok uji, kelompok pembanding dan kelompok kontrol.

H_a = Ada perbedaan yang bermakna frekuensi geliat antar kelompok uji, kelompok pembanding dan kelompok kontrol.

Data yang diperoleh dari uji aktivitas dengan tiga dosis berbeda dari senyawa uji (*N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida), senyawa pembanding (parasetamol), dan kontrol (CMC-Na 0,5%), kemudian diolah secara statistik dengan bantuan komputer program SPSS 15.0, untuk menguji perbedaan kemaknaan dari kelompok-kelompok di atas. Selanjutnya untuk melihat adanya perbedaan antar perlakuan dilakukan uji Tukey HSD.

Dari data penelitian kemudian dihitung nilai % hambatan nyeri dari tiap-tiap dosis. Persentase hambatan nyeri(*N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida) dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{f_k - f_r}{f_k} \times 100$$

Keterangan:

f_T = frekuensi geliat rata-rata kelompok uji atau kelompok pembanding

f_K = frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol

Dibuat kurva antara % hambatan nyeri dan dosis. Dari kurva dapat ditentukan persamaan regresi linier, dan dari persamaan yang didapat dihitung nilai ED_{50} (hambatan nyeri=50%).



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Sintesis Senyawa

Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida merupakan hasil sintesis melalui reaksi asilasi antara senyawa *p*-aminofenol dengan 4-bromo benzoilklorida. Berat senyawa hasil sintesis sebesar 1,776 gram, kemudian dihitung persentase hasilnya dibandingkan dengan berat secara teoritis (3,652 gram). Didapatkan persentase hasil sintesis sebesar 49%. Cara perhitungan persentase hasil sintesis dapat dilihat pada lampiran 1.

5.2 Analisis Kualitatif Senyawa Hasil Sintesis

5.2.1 Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan cara mengamati bentuk, warna, bau, dan kelarutan dari senyawa hasil sintesis.

Hasil pemeriksaan secara organoleptis dari senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada tabel V.1.

Tabel V.1. Hasil Pemeriksaan Organoleptis Senyawa Dan Kelarutan

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
Bentuk	Padat, lempeng, mengkilap
Warna	ungu muda
Bau	Tidak berbau
Kelarutan	Larut dalam aseton, etanol, metanol, kloroform, n-heksana Tidak larut dalam air

5.2.2 Hasil Penentuan Jarak Lebur Senyawa Hasil Sintesis

Hasil pemeriksaan kemurnian senyawa hasil sintesis melalui penentuan jarak lebur dengan menggunakan *Mel-Temp Electrothermal* dapat dilihat pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil Penentuan Jarak Lebur Hasil Sintesis Senyawa

Replikasi	Hasil Pengamatan ($^{\circ}\text{C}$)	Rentang jarak lebur ($^{\circ}\text{C}$)
1.	240-241	240-242
2.	240-242	
3.	240-242	

Hasil penentuan jarak lebur hasil sintesis (Tabel V.2) menunjukkan bahwa senyawa mempunyai rentang jarak lebur 240-242 $^{\circ}\text{C}$. Hal ini berarti bahwa senyawa hasil sintesis murni secara jarak lebur.

5.2.3 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Hasil Sintesis

Pemeriksaan ada tidaknya pengotor dari hasil samping reaksi sintesis dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis menggunakan tiga macam fase gerak.

Hasil perhitungan nilai Rf dari kromatografi lapis tipis senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada tabel V.3.

Tabel V.3 Nilai Rf senyawa hasil sintesis dan senyawa *p*-aminofenol dalam 3 macam eluen dengan replikasi satu kali.

Fase Gerak	Nilai Rf senyawa hasil sintesis	Nilai Rf <i>p</i> -aminofenol
1	0,61	0,50
2	0,63	0,58
3	0,72	0,61

Keterangan:

- Fase diam : Silika Gel 60 GF₂₅₄
- Penampak noda : Lampu UV 254 nm
- Pelarut : Aseton
- Fase gerak 1 : Etil asetat : metanol = 9 : 1
- Fase gerak 2 : Etil asetat : etanol = 9 : 1
- Fase gerak 3 : Etil asetat : kloroform = 7 : 3

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh zat (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh oleh eluen (cm)}}$$

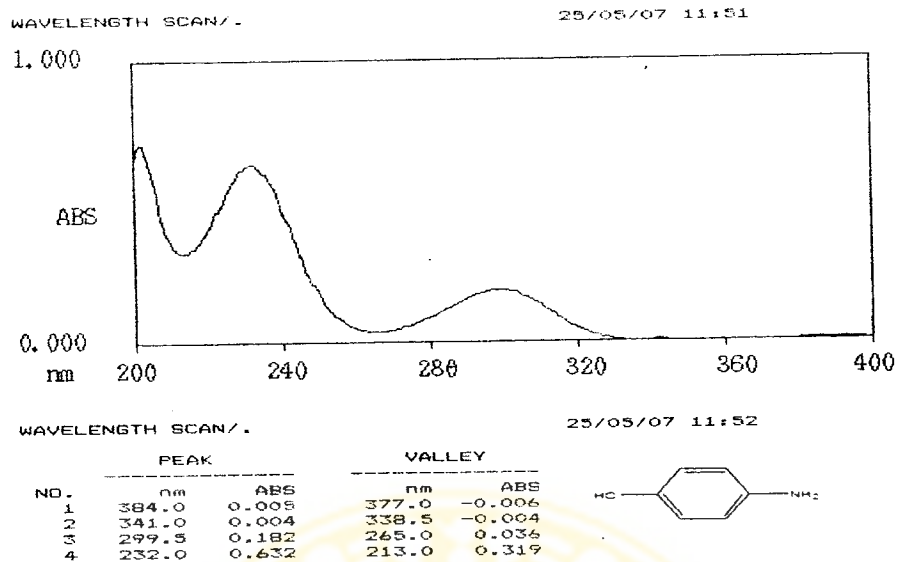
Dari hasil kromatografi lapis tipis dengan menggunakan tiga macam fase gerak terlihat bahwa senyawa menunjukkan noda tunggal yang berwarna ungu, sehingga dapat disimpulkan senyawa hasil sintesis murni secara KLT.

5.3 Identifikasi Struktur Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer inframerah, dan spektrometer ¹H-NMR.

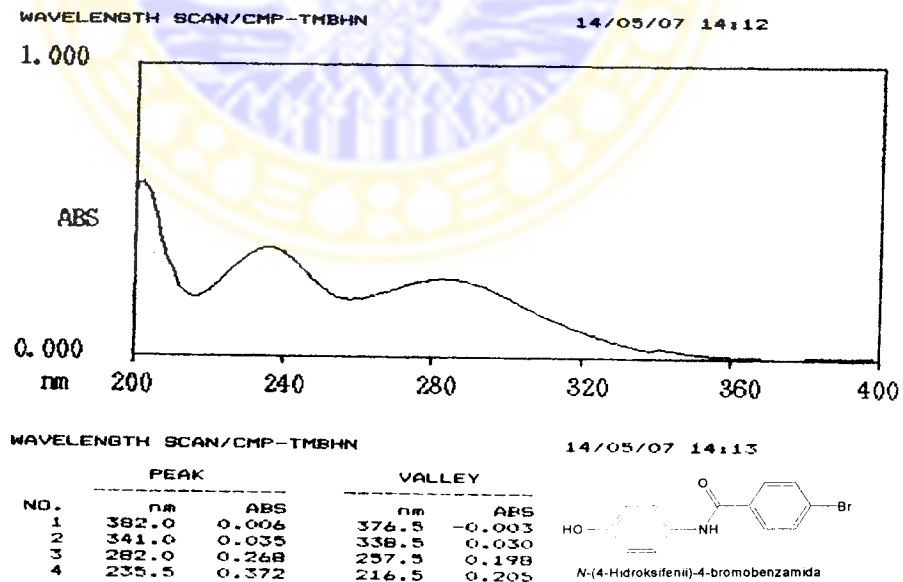
5.3.1 Identifikasi Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi struktur senyawa secara spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengetahui adanya pergeseran puncak serapan pada λ_{max} dan pola spektra senyawa. Spektra ultraviolet *p*-aminofenol dan *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dapat dilihat pada gambar 5.1 dan 5.2.



Gambar 5.1 Spektra ultraviolet senyawa *p*-aminofenol dalam pelarut metanol

Senyawa *p*-aminofenol pada gambar 5.1 memberikan dua puncak serapan maksimum, yaitu pada panjang gelombang 232,0 nm dan panjang gelombang 299,5 nm.

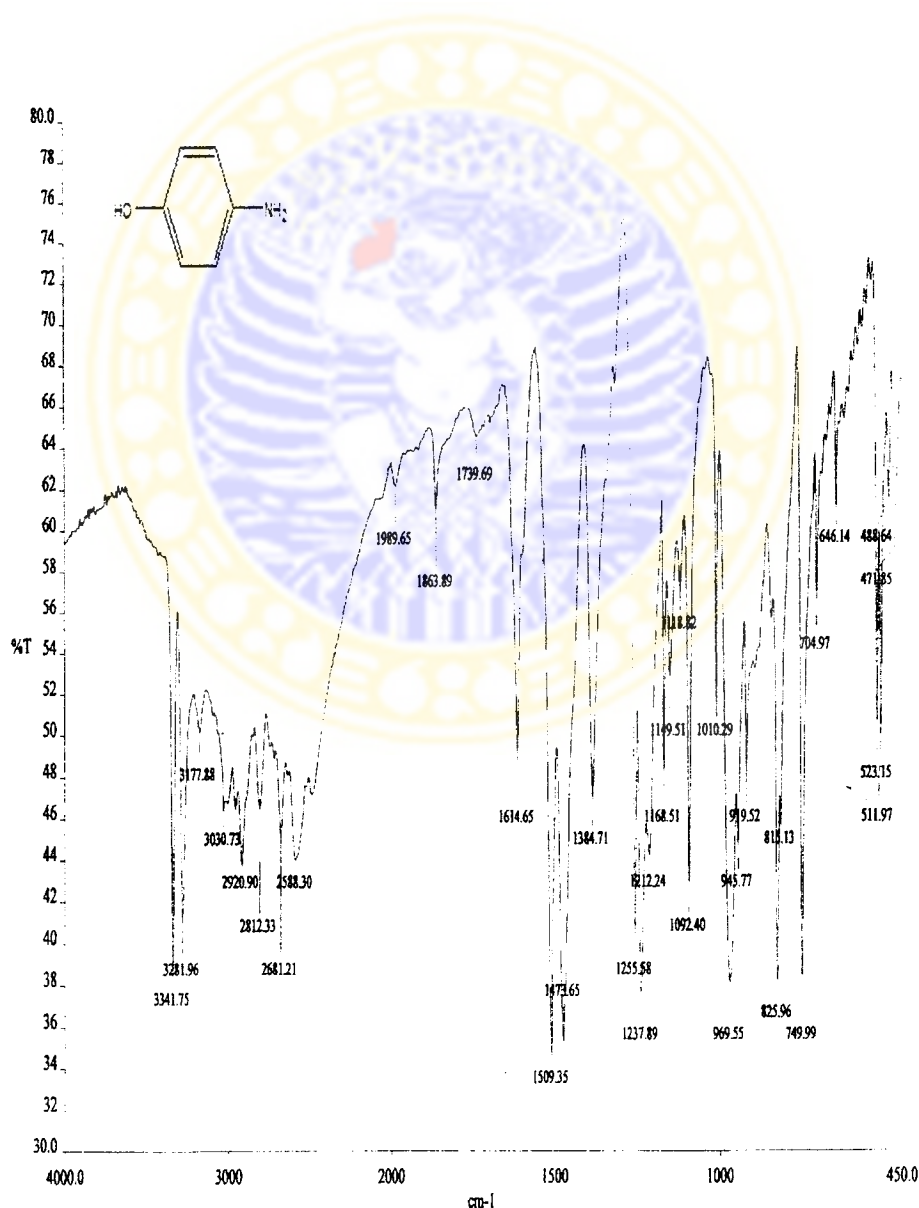


Gambar 5.2 Spektra ultraviolet senyawa hasil sintesis dalam pelarut metanol

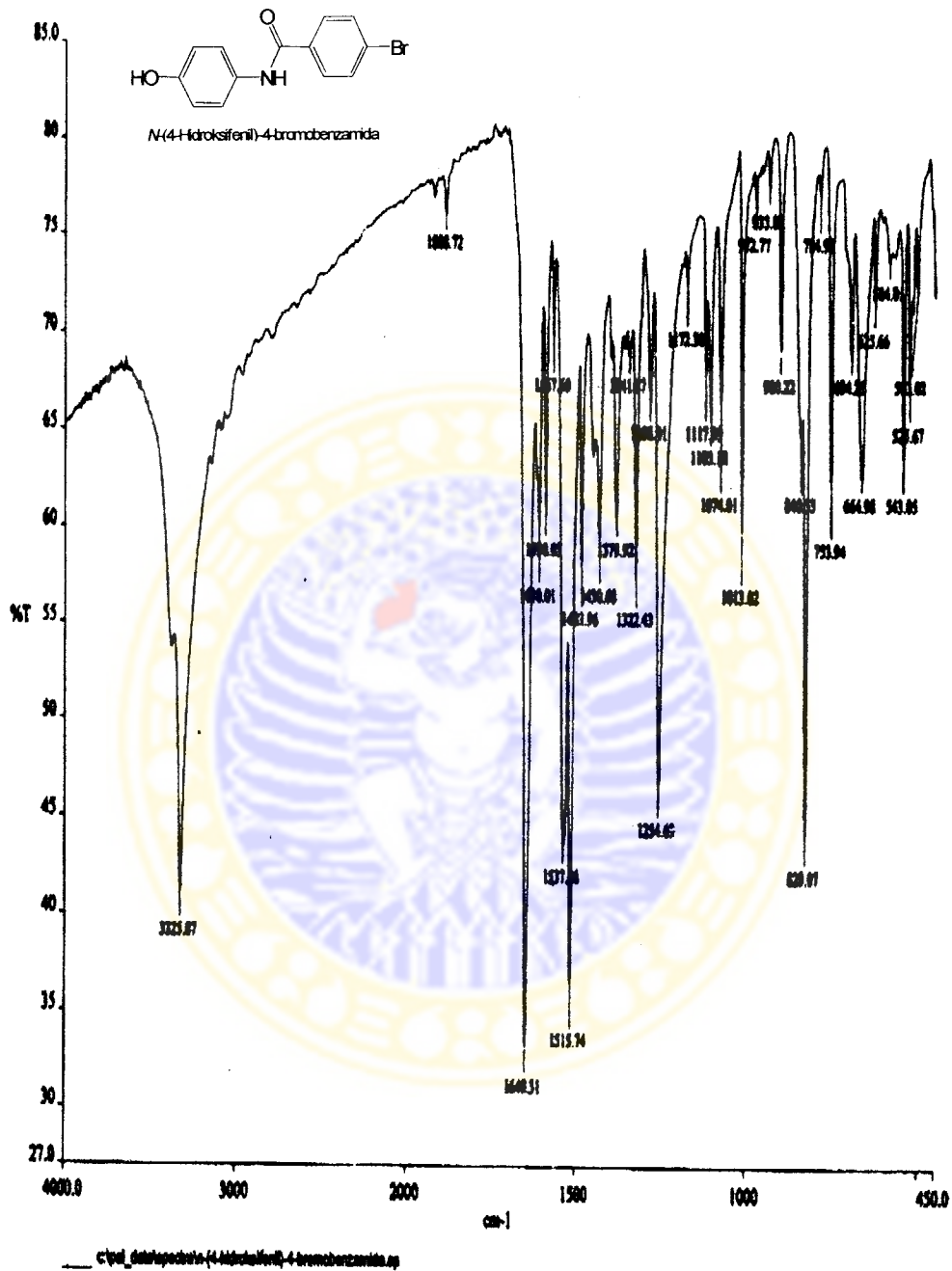
Senyawa hasil sintesis pada gambar 5.2 memberikan dua puncak serapan maksimum, yaitu pada panjang gelombang 235,5 nm dan panjang gelombang 282,0 nm.

5.3.2 Identifikasi Senyawa dengan Spektrofotometer Inframerah

Identifikasi struktur senyawa secara spektrofotometer inframerah berguna untuk mengetahui adanya gugus-gugus fungsi yang terdapat pada senyawa hasil sintesis. Spektra *p*-aminofenol dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada gambar 5.3 dan gambar 5.4.



Gambar 5.3 Spektra Inframerah senyawa *p*-aminofenol dalam pellet KBr



Gambar 5.4 Spektra Inframerah senyawa hasil sintesis dalam pellet KBr

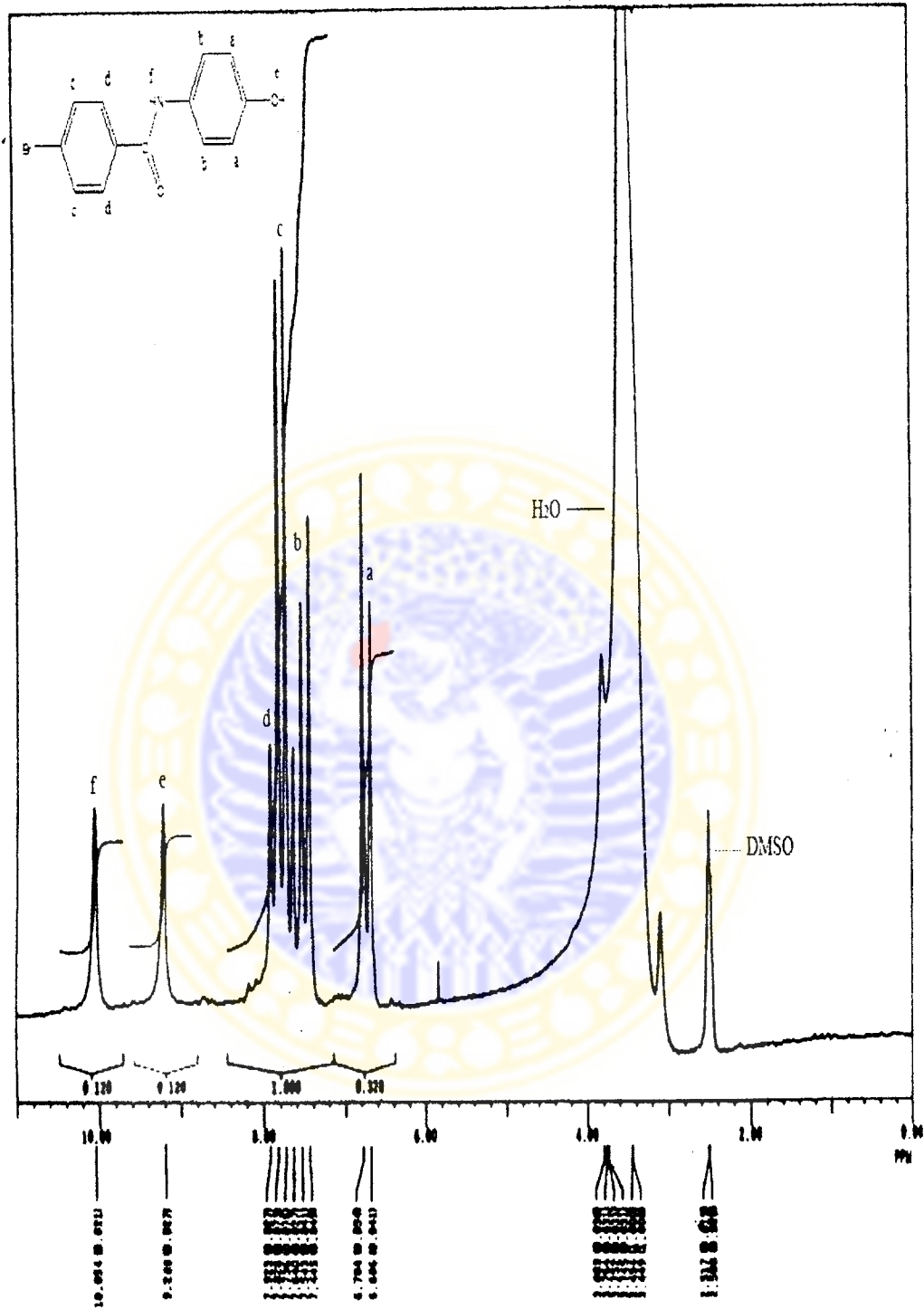
Karakteristik spektra inframerah dari senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada tabel V.4.

Tabel V.4 Karakteristik Spektra Inframerah Senyawa Hasil Sintesis dan *p*-aminofenol

<i>p</i> -aminofenol		Senyawa hasil sintesis		Pustaka (Pavia, 1996)
ν (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	ν (cm ⁻¹)	Gugus fungsi	Rentang ν (cm ⁻¹)
3342	Ar-OH	3326	Ar-OH	3000-3700
3178 & 3282	Ar-NH ₂	-	-	3250-3400
-	-	1649	C=O	1600-1750
1509	-C=C- aromatis	1516	-C=C- aromatis	1450-1600
-	-	1255	Ar-Br	1200-1300

5.3.3 Identifikasi Senyawa Hasil Sintesis Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti (¹H-NMR)

Identifikasi struktur senyawa secara spektrometer resonansi magnet inti bertujuan untuk mengetahui intensitas, jumlah dan posisi puncak proton (atom H) yang terdapat pada senyawa hasil sintesis. Spektra identifikasi senyawa *p*-aminofenol dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada gambar 5.5 dan gambar 5.6.



Gambar 5.6 Spektra $^1\text{H-NMR}$ senyawa Hasil Sintesis dalam pelarut DMSO-D_6

melihat adanya perbedaan antar dua kelompok atau lebih tanpa dapat diketahui perbedaannya berada pada kombinasi yang mana.

Hasil perhitungan ANOVA selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 2 dijelaskan sebagai berikut :

1. Pada dosis 25 mm/g BB diperoleh F hitung sebesar 3,709 ($p=0,049$) lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, berarti terdapat perbedaan frekuensi geliat antara senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol. Dari hasil uji HSD antara dua kombinasi ternyata tidak ada perbedaan, terlihat dari hasil probabilitas eror semuanya lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.
2. Pada dosis 50 mm/g BB diperoleh F hitung sebesar 17,585 ($p=0,000$) lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, berarti terdapat perbedaan frekuensi geliat antara senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol. Dari hasil uji HSD antara dua kombinasi ternyata ada perbedaan antara control dengan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol, terlihat dari hasil probabilitas eror semuanya lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.
3. Pada dosis 100 mm/g BB diperoleh F hitung sebesar 40,458 ($p=0,000$) lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, berarti terdapat perbedaan frekuensi geliat antara senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol. Dari hasil uji HSD antara dua kombinasi ternyata ada perbedaan antara control dengan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol, terlihat dari hasil probabilitas eror semuanya lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$.

Jika dilihat dari hasil F hitung ternyata semakin tinggi dosis semakin tinggi nilai F hitungnya. Artinya makin tinggi dosis maka perbedaan frekuensi geliat pemberian senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan parasetamol semakin tinggi dibandingkan dengan kontrolnya

Tabel V.6 Anova One Way

Dosis	F hitung			Perbedaan Rata-rata
25	3,709* (p=0,049)	Control	parasetamol	10,166 (p=0,107)
			(N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida)	11,666 (p=,060)
50	17,585* (p=000)	Control	parasetamol	21,33 (p=000) *
			(N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida)	23,00 (p=000)*
100	40,458* (p=0,00)	Control	parasetamol	36,5 (p=000)*
			(N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida)	34,83 (p=000)*

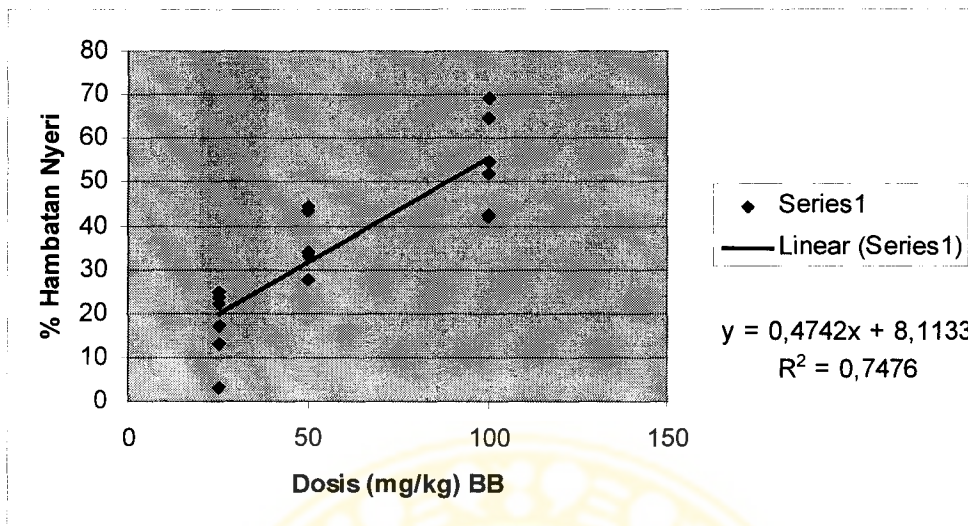
5.4.2 Penentuan Persentase Hambatan Nyeri

Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri dapat dilihat pada tabel V.7. Cara perhitungan persentase hambatan nyeri masing-masing kelompok senyawa uji N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan senyawa pembanding parasetamol dapat dilihat pada lampiran 5.

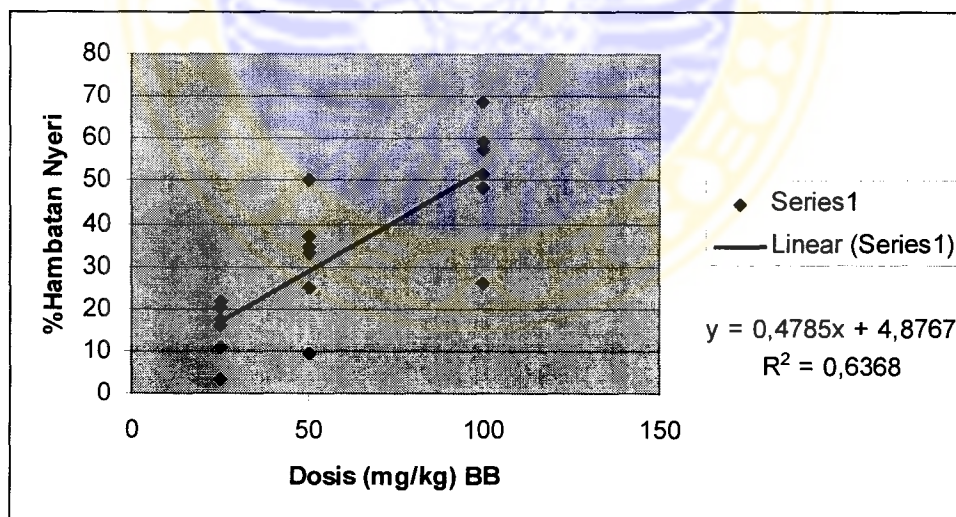
Tabel V.7 Persentase hambatan nyeri kelompok senyawa uji N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan senyawa pembanding parasetamol

Percobaan ke	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida (% hambatan nyeri)			Parasetamol (% hambatan nyeri)		
	25	50	100	25	50	100
1	25,00	32,81	54,69	3,13	50,00	68,75
2	22,22	34,57	69,14	16,05	33,33	48,15
3	23,53	33,82	42,65	20,59	25,00	57,35
4	12,96	27,78	51,85	11,11	9,26	25,93
5	2,94	44,12	64,71	17,65	36,76	51,47
6	17,19	32,81	42,19	21,88	34,38	59,38

Dari tabel V.7 diperoleh kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri



Gambar 5.7 Kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida



Gambar 5.8 Kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri senyawa parasetamol

5.5 Penentuan ED₅₀

Berdasarkan data dosis dan persentase hambatan nyeri pada tabel V.7, dapat ditentukan persamaan dengan analisis statistik regresi (lampiran 3 dan lampiran 4) dan diperoleh hasil sebagai berikut:

1. Hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri dari senyawa uji *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

$$Y = 0,4742 X + 8,1133$$

$$(n = 18 ; r = 0,8646)$$

2. Hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri dari senyawa pembanding parasetamol :

$$Y = 0,4785 X + 4,8767$$

$$(n = 18 ; r = 0,7980)$$

Persamaan-persamaan tersebut mempunyai *r* hitung lebih besar dari *r* tabel (0,468), sehingga dapat disimpulkan ada hubungan linier antara dosis dengan % hambatan nyeri. Selanjutnya persamaan tersebut digunakan untuk menghitung ED₅₀ aktivitas analgesik.

Hasil penentuan ED₅₀ aktivitas analgesik dengan metode *writhing test* dapat dilihat pada tabel V.8. Cara perhitungan ED₅₀ masing-masing kelompok senyawa uji *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan senyawa pembanding parasetamol dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel V.8 ED₅₀ Aktivitas Analgesik *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan Parasetamol

Senyawa	ED ₅₀
<i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida	88 mg/kg
Parasetamol	94 mg/kg

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida melalui reaksi asilasi antara *p*-aminofenol dan 4-bromobenzoil klorida. Metode yang digunakan dalam sintesis senyawa tersebut adalah modifikasi metode *Schotten-Baumann* menggunakan basa organik piridin yang berfungsi untuk mengikat HCl yang terbentuk selama reaksi dan sebagai katalis. Rekristalisasi senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dilakukan dengan menggunakan etanol panas bertujuan untuk mendapatkan hasil sintesis yang murni. Persentase hasil senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida yang diperoleh sebanyak 49 % karena adanya efek mesomeri gugus bromo pada posisi para- sehingga menurunkan muatan positif parsial atom C karbonil. Pada posisi para-, efek -I (penarik elektron) gugus bromo yang terikat pada benzamida kurang berpengaruh dibandingkan dengan efek mesomeri.

Sebagai langkah awal dalam penelitian, senyawa yang diperoleh diperiksa secara kualitatif dengan pemeriksaan organoleptis. Organoleptis senyawa hasil sintesis bentuknya padat, lempeng mengkilap, berwarna ungu muda, tidak berbau, tidak larut dalam air tetapi larut dalam aseton, etanol, metanol, kloroform, dan *n*-heksana. Kemudian dilakukan pemeriksaan kemurnian dengan menentukan jarak lebur menggunakan *Electrothermal Melting Point Apparatus Bausch-Lomb*. Pada pemeriksaan tersebut diperoleh rentang jarak lebur senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida hasil sintesis adalah 240-242⁰C. Harga rentang jarak lebur senyawa hasil sintesis ini relatif kecil, berkisar dua derajat Celcius, hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut murni secara jarak lebur.

Dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dapat diketahui ada tidaknya senyawa pengotor yang dapat mengganggu pemeriksaan analisis kualitatif senyawa hasil sintesis, dilakukan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji KLT senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel GF 254 nm dengan tiga macam fase gerak dan noda diamati dengan penampak noda lampu UV 254 nm. Fase gerak pertama campuran etil asetat dan metanol (9 : 1) menghasilkan harga $R_f = 0,61$,

0,50, eluen kedua $R_f = 0,58$, dan eluen ketiga $R_f = 0,61$. Hasil uji dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa pada berbagai fase gerak tersebut dihasilkan satu noda berwarna ungu. Dari nilai R_f dapat dilihat bahwa senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai harga R_f lebih besar dari *p*-aminofenol, hal ini menunjukkan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida lebih bersifat non polar daripada senyawa *p*-aminofenol, karena ada tambahan gugus 4-bromobenzoil.

Berdasarkan hasil uji KLT dan uji jarak lebur, menunjukkan bahwa senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida hasil sintesis merupakan senyawa tunggal dan murni, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji identifikasi struktur. Identifikasi struktur hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, dan inframerah, serta spektrometer resonansi magnet inti ($^1\text{H-NMR}$).

Identifikasi struktur senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut metanol dihasilkan spektra yang memberikan dua puncak serapan maksimum pada panjang gelombang (λ) 235,5 nm dan panjang gelombang 282,0 nm. Senyawa *p*-aminofenol memberikan dua puncak serapan maksimum, yaitu pada panjang gelombang 232,0 nm dan panjang gelombang 299,5 nm. Dari hasil spektra kedua senyawa tersebut dapat dilihat adanya pergeseran puncak serapan pada λ 299,5 nm dari *p*-aminofenol menjadi 282,0 nm pada senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida. Berarti telah terjadi perubahan struktur, yaitu senyawa hasil sintesis mengandung tambahan gugus kromofor lain, yaitu 4-bromobenzoil.

Analisa struktur dilanjutkan dengan identifikasi dengan spektrofotometer inframerah. Spektra inframerah senyawa *p*-aminofenol dan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida terlihat pada beberapa daerah bilangan gelombang ν (cm^{-1}) menunjukkan gugus-gugus yang spesifik. Senyawa *p*-aminofenol yaitu pada bilangan gelombang 3342 (Ar-OH), 3178 dan 3282 (Ar-NH₂, dua peak), dan 1509 (-C=C- aromatis), sedangkan *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida pada bilangan gelombang 3326 (Ar-OH), 1649 (-C=O), 1516 (-C=C- aromatis). Berdasarkan hasil spektra senyawa *p*-aminofenol (gambar 5.3), dan senyawa hasil sintesis *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida (gambar 5.4),

adanya senyawa tersebut. Pengamatan dilakukan selama 30 menit setelah selang lima menit dari induksi senyawa kimiawi, asam asetat 0,6%. Senyawa uji diberikan 20 menit 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 kontrol CMC-Na 0,5% dengan antar kelompok dosis senyawa pembanding parasetamol, dan dengan antar kelompok dosis senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida maka dilakukan uji ANOVA yang dihitung dengan komputer menggunakan program SPSS 15.0. Dari hasil perhitungan uji ANOVA diketahui bahwa harga *F* hitung pada dosis 25 = 3,709 dan harga *P* = 0,049, pada dosis 50 harga *F* hitung = 17,585 dan harga *P* = 0,000 sedangkan pada dosis 100 = 40,458 dan harga *P* = 0,000 (Lampiran 2). Hal ini menunjukkan *F* hitung lebih besar dari *F* tabel dan harga *P* < 0,05 pada $\alpha=0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa hasil uji aktivitas pada penelitian ini menunjukkan ada perbedaan yang bermakna aktivitas analgesik dari kelompok uji (*N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida), kelompok pembanding (parasetamol), dan kelompok kontrol (CMC-Na 0,5%). Kemudian data frekuensi geliat tiap kelompok dosis dari masing-masing senyawa dapat digunakan untuk menghitung persentase hambatan nyeri untuk setiap kelompok dosis. Makin tinggi dosis maka frekuensi geliat akan semakin kecil untuk tiap-tiap senyawa. Hal ini menunjukkan aktivitas analgesik senyawa semakin besar dengan meningkatnya dosis.

Pada tabel V.6 dapat dilihat bahwa untuk dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB, senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida menunjukkan frekuensi geliat (respon nyeri) yang lebih kecil daripada senyawa parasetamol. Hal ini berarti bahwa efek analgesik yang dimiliki oleh senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida lebih besar daripada parasetamol, untuk lebih lanjut diamati hasil perhitungan persentase hambatan nyeri.

Pada tabel V.7 terlihat bahwa pada dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB, senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida memberikan persentase hambatan nyeri lebih besar daripada senyawa parasetamol.

Setelah diketahui persentase hambatan nyeri pada berbagai dosis untuk tiap-tiap senyawa, selanjutnya dilakukan penentuan ED_{50} (*Effective Dose*), yang

Pada tabel V.7 terlihat bahwa pada dosis 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB, senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida memberikan persentase hambatan nyeri lebih besar daripada senyawa parasetamol.

Setelah diketahui persentase hambatan nyeri pada berbagai dosis untuk tiap-tiap senyawa, selanjutnya dilakukan penentuan ED_{50} (*Effective Dose*), yang dihitung berdasarkan data dosis dan persentase hambatan pada (tabel V.7) dengan analisis regresi antara dosis terhadap persentase hambatan nyeri. Berdasarkan hasil penentuan ED_{50} , senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai ED_{50} sebesar 88 mg/kg, dan senyawa parasetamol sebagai pembanding mempunyai ED_{50} sebesar 94 mg/kg. Berdasarkan hasil tersebut, maka senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dapat dinyatakan lebih aktif sebagai senyawa analgesik.

Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida bersifat lebih lipofilik daripada parasetamol, karena adanya penambahan gugus 4-bromobenzoil pada rantai samping. Parameter lipofilik merupakan parameter yang berpengaruh pada proses penembusan membran biologis oleh molekul senyawa organik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Aktivitas biologis turunan *p*-aminofenol dipengaruhi oleh sifat lipofilik, elektronik dan sterik. Pada perhitungan log P secara teoritis menggunakan komputer program ChemOffice 2006 parasetamol mempunyai nilai log P = 0,89 , MR = 40,83 (cm³/mol). Dan *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai nilai log P = 3,07 , MR = 68,63 (cm³/mol) dan Br mempunyai nilai σ_p = 0,23 Berdasarkan hasil tersebut, senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida mempunyai sifat lipofilik, elektronik dan sterik yang lebih besar dibandingkan dengan parasetamol. Pengaruh sifat lipofilik akan meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis, dan diharapkan jumlah senyawa yang berinteraksi dengan reseptor meningkat, sehingga aktivitas akan meningkat juga, sedangkan pengaruh tetapan sterik senyawa terhadap aktivitas terutama yang berhubungan dengan interaksinya dengan reseptor diukur berdasarkan sifat meruah gugus-gugus dan efek gugus pada kontak obat dengan sisi reseptor yang berdekatan. Pengaruh sifat elektronik ada tiga jenis, pertama pengaruh berbagai substituen terhadap reaktivitas bagian molekul yang tidak mengalami perubahan,

Pada penelitian ini, hasil uji aktivitas biologis yang telah dilakukan dapat digunakan sebagai dasar untuk mengembangkan senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida sebagai calon obat analgesik kelompok analgesik-antipiretik. Namun demikian, masih banyak studi yang masih harus dilakukan untuk memperoleh informasi yang lebih lengkap, baik dari aspek farmakologi, farmakokinetika dan farmakodinamika senyawa.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dapat disintesis dengan cara asilasi antara senyawa *p*-aminofenol dan senyawa 4-bromobenzoil klorida, dengan persentase hasil 49%.
2. Bahwa pada hasil uji aktivitas menunjukkan ada perbedaan yang bermakna, antara senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dengan senyawa parasetamol terhadap kelompok kontrol (CMC-Na 0,5%).

7.2 SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka sebagai saran adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas akut senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida dan sifat farmakokinetika senyawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R., and Johnson, J.R., 1949. **Laboratory Experiment In Organic Chemistry**, 4th edition, The Macmillan Company, Toronto, p.55
- Burke, A., Smith, E., Fitzgerald G. A., 2006. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Chapter 26. Analgesic-Antipyretic Agents; Pharmacotherapy of Gout**. 11th Ed. McGraw-Hill Companies, Inc. New York. pp. 1-57.
- Dipalma, J. R., 1971. **Drill's Pharmacology in Medicine**. 4th Ed. McGraw-Hill Book Comp. Ablakiston Publication. pp. 272-276.
- Diyah, N. W., *et. al.* 2002. **Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam O-(4-t-butylbenzoi)salisilat Hasil Sintesis pada Mencit**. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Domer, F. R., 1971. **Animal Experimental in Pharmacological Analysis**. Charles Thomas Publisher, Springfield. pp. 272-276.
- Ebel, S, 1982, Obat Sintetik, **Buku Ajar dan Buku Pegangan Tinjauan Sinesis, Biotransformasi, Terj Dr Mathilda dan Widiyanto**, Yogyakarta ; Gajah Mada University Press.
- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J. S. 1997. **Dasar-dasar Kimia Organik**. Terjemahan S. Maun. Binarupa Aksara, Jakarta. hal. 434-441, 533-559.
- Foye, W. O., 1981. **Principle of Medicinal Chemistry**, 2nd Ed. Lea and Febiger, Philadelphia. pp. 152-173.
- Furniss, B.S., Hanna Ford A.J., Rogers V., Smith P.W.G., and Tatchell A.R. (Revised), 1978, **Vogel textbook of Practical Organic Chemistry :**

Including Qualitytative Analysis, 4th Ed., London: The English Language Book Society and Longman Group Ltd, p.1103

Ganiswara, S., 1995. **Farmakologi dan Terapi**. Edisi keempat, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. hal. 207-210, 214-215.

Gringauz, A. 1997. **Introduction to Medicinal Chemistry How Drugs Act and Why**. Wiley-VCH, Inc., New York. pp. 141-167.

Guyton and Hill, 2000. **Textbook of Medical Physiology** 10th edition. W.B. Saunders company, Philadelphia, pp.552-563

Hardmann, J.G., and Limbird, L.E., 2001. **Goodman and Gilman's the Pharmacology Basis of Therapeutic**. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, pp. 688-705

Korolkovas, A. 1988. **Essentials of Medicinal Chemistry**. 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York. pp. 252-253.

Kreyzig, E., 1970. **Introductory Mathematical Statistics Principles and Methods**, John Wiley and Son, Inc., New York. p. 2647-2649.

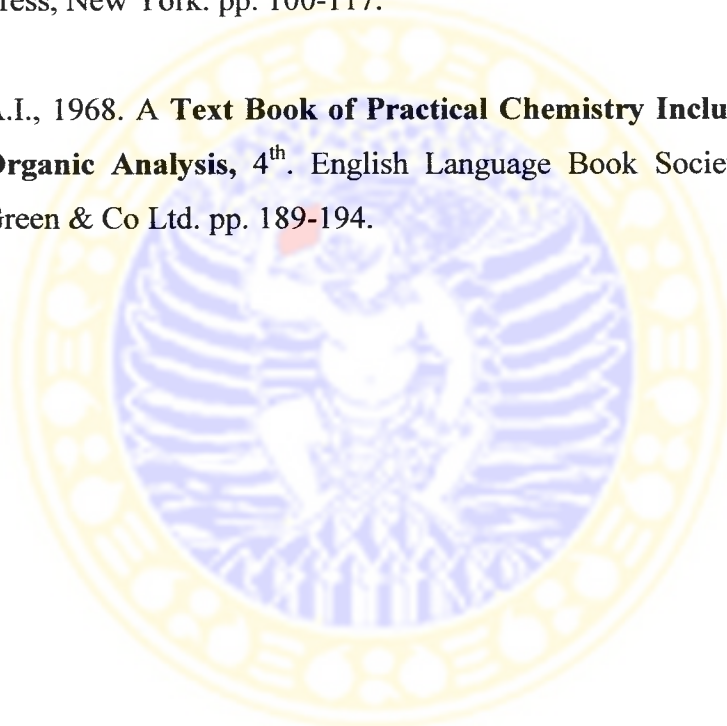
Lien, E. J., 1978. **SAR : Side Effect and Drug Design**. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 451-452.

Lineberry, C. G., 1981. **Laboratory Animal in Pain Research**. Academic Press, Inc., U.S.A., pp. 243-248.

Mahardini, D., 2006. **Sintesis Senyawa Asam O-(4-t-butylbenzoil)salisilat dan Uji Aktivitas Analgesiknya pada Mencit (*Mus musculus*)**. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya. hal. 30.

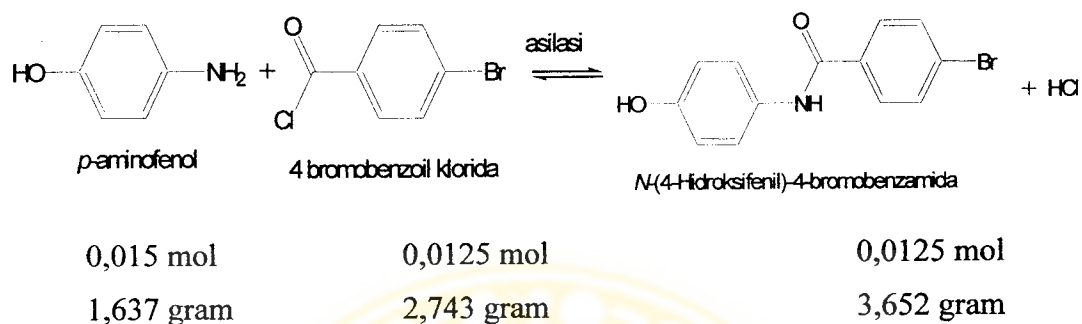
- Mc. Murry, J. 1984. **Organic Chemistry**. Brooks/Cole Publishing Company, California. pp. 782-783.
- Morrison ang Boyd, 1987. **Organic Chemistry**, 5th Ed., New York University, pp. 864-866.
- Mulya, M., Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**. Airlangga University Press, Surabaya. hal. 26-71, 114-136.
- Neal, M.J., 1992. **Medical Pharmacology at Glance**, 2nd Ed. Blackwell Scientific Publications, London. p. 70.
- Pavia L. D., et al., 1996. **Introduction to Spectroscopy, A Guide For Students of Organic Chemictry**, 2nd Ed. Department of Chemistry. Washington: Harcourt Brace College Publishers. pp. 459-464.
- Purcell WP, Bass GE, and Clayton JM, 1973, **Strategy of Drug Design, A Guide to Biological Activity**, New York, London, Sidney, Toronto; John Wiley and Sonc Inc., pp.38-58
- Silverstein R. M., et al., 1981. **Spectroscopy of Organic Compounds**, 4th Ed., John Wiley and Sons Inc, New York. pp. 102-103, 183.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal 1**. Airlangga University Press, Surabaya. hal. 57-59, 88-89, 102-103, 109.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal 2**. Airlangga University Press, Surabaya. hal. 283-294.
- Siswandono dan Soekardjo B., 1998. **Prinsip-Prinsip Rancangan Obat**. Airlangga University Press, Surabaya.

- Thompson, E. B., 1985. **Drug Bioscreening, Fundamental of Drug Evaluation Techniques in Pharmacology**. New York, Graceway Publishing Co. Inc., pp. 3-11.
- Tjay T.H., Rahardja K., 2005. **Obat-Obat Penting**. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. hal. 295-310.
- Turner, R. A., 1965. **Screening Method in Pharmacology**. Vol. I. Academic Press, New York. pp. 100-117.
- Vogel, A.I., 1968. **A Text Book of Practical Chemistry Including Qualitative Organic Analysis**, 4th. English Language Book Society and Longman Green & Co Ltd. pp. 189-194.



Lampiran 1

Perhitungan Persentase Hasil Sintesis



Berat molekul *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida = 292,13

Berat senyawa secara teoritis (0,0125 mol) = 292,13 x 0,0125 = 3,652 gram

Berat senyawa hasil sintesis = 1,776 gram

Persentase hasil = $\frac{1,776}{3,652} \times 100\% = 49\%$

Lampiran 2

Hasil perhitungan ANOVA dan Tukey HSD antar kelompok kontrol CMC-Na 0,5% dengan antar kelompok dosis senyawa pembanding parasetamol, serta dengan antar kelompok dosis senyawa uji *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Dosis_25	Control	66,5000	8,75785	3,57538	57,3092	75,6908	54,00	81,00
	<i>N</i> -(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	54,8333	7,88458	3,21887	46,5590	63,1077	47,00	66,00
	Parasetamol	56,3333	7,52773	3,07318	48,4335	64,2332	48,00	68,00
	Total	59,2222	9,27080	2,18515	54,6120	63,8325	47,00	81,00
Dosis_50	Control	66,5000	8,75785	3,57538	57,3092	75,6908	54,00	81,00
	<i>N</i> -(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	43,5000	5,35724	2,18708	37,8779	49,1221	38,00	53,00
	Parasetamol	45,1667	7,93515	3,23951	36,8392	53,4941	32,00	54,00
	Total	51,7222	12,86951	3,03337	45,3224	58,1221	32,00	81,00
Dosis_100	Control	66,5000	8,75785	3,57538	57,3092	75,6908	54,00	81,00
	<i>N</i> -(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	30,0000	6,44981	2,63312	23,2313	36,7687	24,00	39,00
	Parasetamol	31,6667	8,40635	3,43188	22,8447	40,4886	20,00	42,00
	Total	42,7222	18,85176	4,44340	33,3475	52,0970	20,00	81,00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Dosis_25	Between Groups	483,444	2	241,722	3,709	,049
	Within Groups	977,667	15	65,178		
	Total	1461,111	17			
Dosis_50	Between Groups	1973,778	2	986,889	17,585	,000
	Within Groups	841,833	15	56,122		
	Total	2815,611	17			
Dosis_100	Between Groups	5096,778	2	2548,389	40,458	,000
	Within Groups	944,833	15	62,989		
	Total	6041,611	17			

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kekompok	(J) Kekompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dosis_25	Control	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	11,66667	4,66111	,060	-,4404	23,7738
		Parasetamol	10,16667	4,66111	,107	-1,9404	22,2738
	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	Control	11,66667	4,66111	,060	-23,7738	,4404
		Parasetamol	-1,50000	4,66111	,945	-13,6071	10,6071
	Parasetamol	Control	10,16667	4,66111	,107	-22,2738	1,9404
		N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	1,50000	4,66111	,945	-10,6071	13,6071
Dosis_50	Control	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	23,00000*	4,32521	,000	11,7654	34,2346
		Parasetamol	21,33333*	4,32521	,000	10,0987	32,5679
	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	Control	23,00000*	4,32521	,000	-34,2346	-11,7654
		Parasetamol	-1,66667	4,32521	,922	-12,9013	9,5679
	Parasetamol	Control	21,33333*	4,32521	,000	-32,5679	-10,0987
		N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	1,66667	4,32521	,922	-9,5679	12,9013
Dosis_100	Control	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	36,50000*	4,58217	,000	24,5979	48,4021
		Parasetamol	34,83333*	4,58217	,000	22,9313	46,7354
	N-(4-Hidroksifenil)-4-bromobenzamida	Control	36,50000*	4,58217	,000	-48,4021	-24,5979
		Parasetamol	-1,66667	4,58217	,930	-13,5687	10,2354
	Parasetamol	Control	34,83333*	4,58217	,000	-46,7354	-22,9313
		N-(4-Hidroksifenil)-4-bromoenzamida	1,66667	4,58217	,930	-10,2354	13,5687

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

Lampiran 3

Hasil analisis regresi antara dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) parasetamol

Regression Parasetamol

Regression

Variables Entered/Removed(b)

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dosis(a)	.	Enter

a All requested variables entered.

b Dependent Variable: % hambatan nyeri

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,991(a)	,982	,964	3,49578

a Predictors: (Constant), dosis

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	674,082	1	674,082	55,160	,085(a)
	Residual	12,220	1	12,220		
	Total	686,302	2			

a Predictors: (Constant), dosis

b Dependent Variable: %hambatan nyeri

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5,190	4,281		1,212	,439
	dos	,481	,065	,991	7,427	,085

a Dependent Variable: % hambatan nyeri

Lampiran 4

Hasil analisis regresi antara dosis (x) dengan % hambatan nyeri (y) dari senyawa

N-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Regression *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Variables Entered/Removed(b)

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	dos(a)	.	Enter

a All requested variables entered.

b Dependent Variable: % hambatan nyeri

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,991(a)	,982	,965	3,48776

a Predictors: (Constant), dosis

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	674,162	1	674,162	55,421	,085(a)
	Residual	12,164	1	12,164		
	Total	686,326	2			

a Predictors: (Constant), dosis

b Dependent Variable: %hambatan nyeri

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7,445	4,488		1,659	,345
	Dosis	,484	,068	,990	7,136	,089

a Dependent Variable: % hambatan nyeri

Lampiran 5

Perhitungan % hambatan nyeri

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{f_k - f_t}{f_k} \times 100$$

A) Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

1. Dosis 25 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 54,83}{66,5} \times 100 = 17,59 \%$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 43,50}{66,5} \times 100 = 34,59 \%$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 30,00}{66,5} \times 100 = 54,89 \%$$

B) Senyawa Parasetamol

1. Dosis 25 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 56,33}{66,5} \times 100 = 15,34 \%$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 45,17}{66,5} \times 100 = 32,03 \%$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{66,5 - 31,67}{66,5} \times 100 = 52,33 \%$$

Lampiran 6

Hasil perhitungan ED₅₀ aktivitas analgesik masing-masing kelompok senyawa

A) Senyawa *N*-(4-hidroksifenil)-4-bromobenzamida

Bila % hambatan nyeri = 50

$$Y = 0,4742 X + 8,1133$$

$$50 = 0,4742 (ED_{50}) + 8,1133$$

$$ED_{50} = \frac{50 - 8,1133}{0,4742} = 88 \text{ mg/kg}$$

B) Senyawa Parasetamol

Bila % hambatan nyeri = 50

$$Y = 0,4785 X + 4,8767$$

$$50 = 0,4785 (ED_{50}) + 4,8767$$

$$ED_{50} = \frac{50 - 4,8767}{0,4785} = 94 \text{ mg/kg}$$

Lampiran 7

Tabel F

n	df = 1	df = 2	df = 3	df = 4	df = 5	df = 6	df = 7	df = 8	df = 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	5.03	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	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	3.46	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.31	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	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	2.42	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	2.68	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	2.23	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	2.26	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*, John Wiley and Son, Inc., New York.

Lampiran 8

Tabel r

df galer	F	Produk Bebas				df galer	F	Produk Bebas			
		1	2	3	4			1	2	3	4
1	.05	.897	.989	.999	.999	24	.05	.388	.420	.423	.567
2	.05	1.000	1.000	1.000	1.000	24	.01	.496	.565	.609	1.112
3	.05	.990	.975	.983	.987	25	.05	.381	.402	.414	1.133
4	.05	.984	.978	.983	.987	25	.01	.487	.555	.600	1.133
5	.05	.984	.978	.983	.987	26	.05	.374	.414	.434	1.144
6	.05	.984	.978	.983	.987	26	.01	.478	.546	.590	1.144
7	.05	.984	.978	.983	.987	27	.05	.367	.416	.438	1.155
8	.05	.984	.978	.983	.987	27	.01	.470	.538	.582	1.155
9	.05	.984	.978	.983	.987	28	.05	.364	.413	.430	1.166
10	.05	.984	.978	.983	.987	28	.01	.463	.530	.573	1.166
11	.05	.984	.978	.983	.987	29	.05	.355	.412	.427	1.177
12	.05	.984	.978	.983	.987	29	.01	.456	.522	.565	1.177
13	.05	.984	.978	.983	.987	30	.05	.349	.416	.434	1.188
14	.05	.984	.978	.983	.987	30	.01	.449	.514	.558	1.188
15	.05	.984	.978	.983	.987	31	.05	.343	.416	.434	1.199
16	.05	.984	.978	.983	.987	31	.01	.441	.507	.551	1.199
17	.05	.984	.978	.983	.987	32	.05	.337	.416	.434	1.210
18	.05	.984	.978	.983	.987	32	.01	.434	.507	.551	1.210
19	.05	.984	.978	.983	.987	33	.05	.331	.416	.434	1.221
20	.05	.984	.978	.983	.987	33	.01	.427	.507	.551	1.221
21	.05	.984	.978	.983	.987	34	.05	.325	.416	.434	1.232
22	.05	.984	.978	.983	.987	34	.01	.420	.507	.551	1.232
23	.05	.984	.978	.983	.987	35	.05	.319	.416	.434	1.243
24	.05	.984	.978	.983	.987	35	.01	.413	.507	.551	1.243

Dikutip dari : Kreyzig, E. 1970, *Introductory Mathematical Statistics Principles and Methods*, John Wiley and Son, Inc., New York

Lampiran 9



Penyuntikan mencit secara intraperitoneal

Lampiran 10



Mencit sebelum perlakuan



Mencit setelah perlakuan