

SKRIPSI

**SINTESIS SENYAWA
ASAM 2-(3',4'-DIKLOROBENZOILOKSI)BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK PADA MENCIT (*Mus
musculus*)**



NOR AZRENE ELENA

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2016**

ambar Pengesahan

**SINTESIS SENYAWA
ASAM 2-(3',4'-DIKLOOROBENZOILOKSI)BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK PADA
MENCIT (*Mus musculus*)**

SKRIPSI

buat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

2016

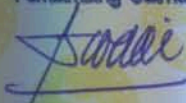
Oleh :

NOR AZRENE ELENA

NIM : 051111197

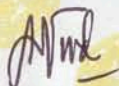
Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Bambang Tji Purwanto, MS., Apt.
NIP. 19571006 198503 1 003

Pembimbing Serta



Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si., Apt.
NIP. 19661228 199203 2 002

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi / karya ilmiah saya, dengan judul:

**SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(3',4' -
DIKLOOROBENZOILOKSI)BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK PADA MENCIT
(*Mus musculus*)**

Untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya

Surabaya, 5 Februari 2016

Nor Azrene Elena
051111197

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Nor Azrene Elena

Nim : 051111197

Fakultas : Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul:

**SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(3',4'-DIKLOOROBENZOIL
OKSI)BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari di ketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 5 Februari 2016

Nor Azrene Elena

05111119

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang merupakan salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Skripsi yang berjudul **“SINTESIS SENYAWA ASAM 2-(3',4'-DIKLOOROBENZOILOKSI)BENZOAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIK PADA MENCIT (*Mus musculus*)”** ini dapat diselesaikan atas bantuan serta dukungan banyak pihak, maka oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Bambang Tri Purwanto, M.S., Apt selaku pembimbing utama yang telah banyak memberikan bimbingan dan pengarahan dalam menyelesaikan skripsi.
2. Dra. Nuzul Wahyuning Diah, M.Si Apt. selaku pembimbing serta atas perhatiannya selama penelitian untuk memberikan bimbingan, dan saran dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Drs. A. Toto Poernomo, Apt. M.Si selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis dalam perbaikan skripsi ini.
4. Melanny Ika S. S.Farm. M.Sc. selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis dalam perbaikan skripsi ini.

5. Seluruh dosen di departemen Kimia Farmasi dan Kimia Medisinal atas segala bantuan, saran dan dorongan sehingga terselesaikan skripsi ini.
6. Bapak Tukidjo dan Bapak Tanto, Laboran Ruang Praktikum Kimia Medisinal, yang selalu membantu dalam menyiapkan alat dan bahan selama penelitian.
7. Ana Yuda, S.Si, Apt selaku dosen wali yang telah memberikan motivasi serta dorongan selama perkuliahan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
8. Para dosen yang telah mendidik dan membimbing selama perkuliahan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
9. Terima kasih kepada kedua orang tua (Bapa Zahardi dan Ibu Che Sharifah), kakak (Nadia Zuleikha), dan Adik-adik (Muhammad Haqiem, Nur Aleeya, Muhammad Faris Irham, Muhammad Harith Aizuddeen) yang banyak memberikan doa dan dorongan sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan jayanya.
10. Teman-teman Skripsi Ivon Loreta, Aleaya Ashah, Asyraf Solahuddin dan semua teman-teman seperjuangan penelitian skripsi di Kimia Medisinal. Terima kasih atas kerja samanya.
11. Terima Kasih juga kepada Kakak Angkatan Noor Azira, Virginia S. E Daniel, Uttayasujilattha dan Irma Hermia yang banyak membantu dan memberi saran dalam penulisan skripsi.

12. Terima kasih kepada teman-teman dan pihak-pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, karena telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
- 13.

Pihak-pihak lain yang belum disebutkan, terima kasih semuanya, Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam menyusun skripsi ini, untuk itu segala kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan demi perbaikan pada nantinya. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam pengembangan obat.

Surabaya, 5 Februari 2016

Penulis

RINGKASAN
SINTESIS SENYAWA ASAM
2-(3',4'-DIKLOBENZOILOKSI) BENZOAT
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA MENCIT
(*Mus musculus*)

Nor Azrene Elena

Sintesis turunan asam salisilat adalah bertujuan untuk mendapatkan senyawa analgesik turunannya yang memiliki aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibanding asetosal. Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat senyawa turunan asetosal telah disintesis dan diuji aktivitas analgesiknya pada mencit (*Mus musculus*).

Sintesis senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dilakukan berdasarkan metode esterifikasi dengan mereaksikan asam salisilat dengan 3,4-diklorobenzoil klorida dalam pelarut tetrahidrofur dan katalisator piridin sebagai basa yang berfungsi juga sebagai penangkap HCl. Reaksi substitusi nukleofilik terjadi pada gugus -OH asam salisilat dan atom H pada gugus tersebut akan disubstitusi oleh 3,4-diklorobenzoil klorida. Hasil sintesis yang diperoleh sebesar 68,14%, berupa kristal putih.

Senyawa hasil sintesis diuji kemurnian dengan uji jarak lebur dan kromatografi lapis tipis, hasil uji jarak lebur senyawa hasil sintesis berbeda dengan senyawa asetosal, begitu juga dengan uji KLT dengan menggunakan 3 eluen yang berbeda,

yaitu *n*-heksan : kloroform (4:6), kloroform : aseton (6:4), dan *n*-heksan : aseton (7:3), sedangkan untuk konfirmasi struktur dilakukan dengan metode spektrofotometri ultraviolet, spektrofotometri inframerah dan spektrometri magnet inti (¹H-NMR). Hasil spektrum UV menunjukkan bahwa ada perbedaan λ_{maks} antara senyawa hasil sintesis dan asetosal, hasil spektrum IR menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis telah memiliki gugus fungsi yang berbeda dari asetosal, dan hasil spektrum (¹H-NMR) menunjukkan bahwa ada perbedaan jumlah H pada senyawa hasil sintesis dan asetosal. Uji aktivitas analgesik dilakukan dengan memberikan senyawa uji dan senyawa penginduksi nyeri pada mencit secara intraperitoneal dengan metode *Writhing test*. Senyawa uji asam 2-(3,4-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan dosis 100, 50, dan 25 mg/kg BB diberikan 20 menit sebelum induksi nyeri oleh larutan asam asetat 0,6 % volume 0,02 ml/g BB. Respon nyeri diamati 5 menit setelah pemberian induksi nyeri dalam 30 menit. Aktivitas analgesik dihitung dari frekuensi geliat berdasarkan persentase hambatan nyeri.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 30,3%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 58,9%, dan pada dosis 100 mg/kg BB sebesar 71,1%. Senyawa pembanding asetosal pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 22,9%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 53,5%, dan pada dosis 100 mg/kg BB sebesar 70,8%. Berdasarkan hasil ini dapat

disimpulkan bahwa senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibanding asetosal.

Sebagai saran adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dan diharapkan senyawa ini dapat dikembangkan dan dijadikan obat baru yang lebih poten.



ABSTRACT

**Synthesis of 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate Acid and
Analgesic test in mice (*Mus musculus*)**

Nor Azrene Elena

The derivative of salicylic acid was designed and synthesized. The objective of this research is to synthesize 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate acid, derived from salicylic acid and to measure its analgesic activity in mice (*Mus Musculus*). The compound was synthesized by reacting salicylic acid and 3,4-dichlorobenzoyl chloride in the presence of pyridine. This reaction was synthesized using esterification method and pyridine was used as catalyst and tetrahydrofuran (THF) as solvent. The synthesized product was recrystallized by using methanol and its purity was tested by using thin layer chromatography and melting point test. Then, it was analyzed using UV-Vis spectroscopy, infrared spectroscopy, and ¹H-NMR spectroscopy method. The percentage of the synthesized product using these reagent and preparation method are 68,14%. Its analgesic activity was tested with writhing test method. The pain-inhibition percentage of 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate acid for 25mg/kg body-weight was 30,3%. In the dose 50 mg/kg body-weight was 58,9% and for 100 mg/kg body-weight was 71,1%. However, the standard compound acetosal in the dose 25mg/kg, the pain-inhibition was 22,9%, 50 mg/kg body-weight was 53,5% and 100 mg/kg body-weight was 70,8%. ED₅₀ value of 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate acid is

44,52 mg/kg and lower than salicylic acid 51,34 mg/kg. In conclusion, 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate acid has higher analgesic activity than acetosal.

Keywords: synthesis, 2-(3',4'-dichlorobenzoyloxy)benzoate acid, analgesic activity, ED_{50}



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN BUKAN HASIL PLAGIARISME.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
RINGKASAN.....	viii
ABSTRACT.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Tinjauan Tentang Analgesik.....	9
2.1.1 Tinjauan tentang Definisi Analgesik.....	9
2.1.2 Klasifikasi Analgesik.....	9
2.2 Tinjauan Tentang Turunan Asam Salisilat.....	12
2.3 Tinjauan Tentang Asetosal.....	13
2.4 Tinjauan Tentang Reaksi Asilasi.....	16
2.5 Tinjauan Tentang sintesis Asam	
2-(3',4'diklorobenzoiloksi) benzoat.....	16

2.6	Tinjauan tentang Bahan reagen Untuk Sintesis.....	17
2.6.1	Tinjauan tentang Asam Salisilat.....	17
2.6.2	Tinjauan tentang 3',4'-diklorobenzoil klorida.....	18
2.6.3	Tinjauan Tentang piridin.....	18
2.6.4	Tinjauan Tentang Tetrahidrofuran.....	18
2.7	Tinjauan Tentang Uji Kemurnian.....	19
2.7.1	Tinjauan Tentang Jarak Lebur.....	19
2.7.2	Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis.....	19
2.8	Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur.....	21
2.8.1	Tinjauan Tentang Spektrofotometer UV-Vis.....	21
2.8.2	Tinjauan Tentang Spektrofotometer Inframerah.....	21
2.8.3	Tinjauan Tentang Spektrometer Resonansi Magnet Inti ($^1\text{H-NMR}$).....	22
2.9	Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik.....	23
2.9.1	Metode Stimulasi Panas.....	23
2.9.2	Metode Stimulasi Listrik.....	24
2.9.3	Metode Stimulasi Mekanik.....	25
2.9.4	Metode Stimulasi Kimiawi.....	25
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL.....		26
3.1	Kerangka Konseptual.....	26
3.2	Skema Kerangka Konseptual.....	28
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		29
4.1	Alat dan Bahan Penelitian.....	29
4.1.1	Bahan.....	29
4.1.2	Hewan Coba.....	29
4.2	Kerangka Operasional.....	30

4.3	Prosedur Sintesis Senyawa Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat.....	31
4.4	Analisis Senyawa Asam 2-(3',4'diklorobenzoiloksi)benzoat.....	32
	4.4.1 Pemeriksaan Organoleptis.....	32
4.5	Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis.....	32
	4.5.1 Uji Titik Lebur.....	32
	4.5.2 Uji Dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	33
4.6	Pemeriksaan Identifikasi Struktur.....	33
	4.6.1 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	33
	4.6.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah..	34
	4.6.3 Identifikasi Senyawa Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti.....	34
4.7	Prosedur Uji Aktivitas Analgesik.....	34
	4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	36
	4.7.2 Bagan Uji Aktivitas Analgesik.....	37
	4.7.3 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6% dan Musilago CMC Na 0,5%.....	36
	4.7.4 Perhitungan Dosis.....	36
	4.7.5 Pembuatan Sediaan suspensi Senyawa Uji.....	38
	4.7.6 Pemberian Senyawa Uji.....	40
	4.7.7 Pelaksanaan Uji Aktivitas.....	40
4.8	Analisis Data.....	41
	4.8.1 Penentuan Persen Hambatan Nyeri.....	41
	4.8.2 Uji Anova.....	41
	4.8.3 Penentuan ED ₅₀	43
BAB 5 ANALISIS DATA.....		44

5.1	Sintesis Senyawa Turunan Asam Salisilat	44
5.2	Analisis Senyawa Hasil Sintesis.....	44
	5.2.1 Hasil Pemeriksaan Organoleptis.....	44
	5.2.2 Hasil Uji Kemurnian dengan Jarak Lebur.....	44
	5.2.3 Hasil Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	45
5.3	Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis.....	46
	5.3.1 Identifikasi Struktur dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis.....	46
	5.3.2 Identifikasi Struktur dengan Metode Spektrofotometri Infra Merah (IR).....	48
	5.3.3 Identifikasi Struktur dengan Metode Spektrometri Resonansi Magnet Inti.....	50
5.4	Uji Aktivitas Analgesik.....	52
	5.4.1 Penentuan Frekuensi Geliat.....	52
	5.4.2 Analisis Data dengan ANOVA.....	54
	5.4.3 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri.....	54
BAB 6 PEMBAHASAN.....		57
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....		64
	7.1 Kesimpulan.....	64
	7.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....		65
LAMPIRAN.....		68

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Konversi Dosis Hewan Coba ke HED berdasarkan BSA.....	37
5.1 Hasil Pemeriksaan Organoleptis	44
5.2 Hasil Pemeriksaan Jarak Lebur.....	45
5.3 Nilai Rf Senyawa Hasil Sintesis Dengan Asetosal.....	45
5.4 Karakteristik Spektra IR Asam Salisilat dan Senyawa Hasil Sintesis dalam Pellet KBr.....	49
5.5 Karakteristik Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Asam Salisilat.....	50
5.6 Karakteristik Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Hasil Sintesis.....	51
5.7 Frekuensi Geliat Pada Kelompok Uji Asam 2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)Benzoat dan Kelompok Kontrol Musilago CMC Na 0,05%.....	53
5.8 Frekuensi Geliat Pada Kelompok Perbandingan asetosal dan Kelompok Kontrol Musilago CMC Na 0,05%.....	53
5.9 Persentase Hambatan Nyeri Kelompok Senyawa Uji Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dan Kelompok Senyawa Perbandingan Asetosal.....	55
6.0 ED ₅₀ Aktivitas Analgesik Senyawa Asam 2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)benzoat dan asetosal.....	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1.1 Struktur Turunan Asam Salisilat.....	4
2.1 Mekanisme Metabolisme Arakidonat.....	14
2.2 Mekanisme Reaksi Substitusi Nukleofilik Pada Gugus Asil.....	15
2.3 Proses Reaksi Sintesis asam salisilat dan 3,4-diklorobenzoil Klorida.....	17
3.1 Skema Kerangka Konseptual.....	28
4.1 Kerangka Operasional Penelitian.....	30
4.3 Reaksi Sintesis Senyawa Asam 2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)benzoat.....	32
4.2 Bagan Uji Aktivitas Analgesik.....	35
5.1 Spektrum UV Senyawa Asam Salisilat Dalam Etanol.....	47
5.2 Spektrum UV Senyawa Hasil Sintesis Dalam Etanol.....	47
5.3 Spektrum Inframerah Senyawa Asam Salisilat Dalam KBr.....	48
5.4 Spektrum Inframerah Senyawa Hasil Sintesis Dalam Pellet KBr.....	48
5.5 Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Asam Salisilat Dalam Pelarut DMSO-D.....	50
5.6 Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Hasil Sintesis Dalam Pelarut DMSO-D.....	51
5.7 Kurva Hubungan Antara log Dosis Dengan % Hambatan Nyeri Untuk Senyawa Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat Dan Senyawa Perbandingan Asetosal.....	55
5.8 Kurva Hubungan Antara log Dosis Dengan % Hambatan Nyeri Untuk Senyawa Perbandingan Asetosal.....	56

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1	Perhitungan Persentase Hasil Sintesis.....	68
Lampiran 2	Perhitungan Persen Hambatan Nyeri.....	69
Lampiran 3	Tabel Statistika.....	71
Lampiran 4	Hasil perhitungan ANOVA dan LSD antara Kelompok Dosis Senyawa Uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan Kelompok Dosis Senyawa Perbandingan Asetosal, serta dengan Kelompok Kontrol CMC-Na 0,5%.....	72
Lampiran 5	Pakan Hewan Coba.....	77
Lampiran 6	Sertifikat Kode Etik.....	78
Lampiran 7	Prediksi ¹ H-NMR berdasarkan <i>Chemdraw Ultra 12.0</i>	78
Lampiran 8	Sebelum dan Sesudah Perlakuan Hewan Coba.....	81
Lampiran 9	Penyuntikan pada Mencit secara Intraperitoneal.....	82

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada awal perkembangan obat, usaha penemuan obat baru pada umumnya bersifat coba-coba (*trial and error*) sehingga biaya pengembangan obat baru sangat mahal. Hal ini dapat dipahami mengingat bahwa dari 8.000 sampai 10.000 senyawa baru yang disintesis atau yang didapat dari sumber alam, setelah melalui berbagai uji dan kemungkinan hanya satu senyawa yang secara klinik dapat digunakan sebagai obat. Waktu yang dibutuhkan, mulai dari proses sintesis atau ekstraksi, penapisan farmakologi, sampai evaluasi klinik dan persetujuan pendaftaran, memakan waktu lebih kurang 10 tahun. Hal tersebut juga disebabkan oleh ketatnya peraturan-peraturan tentang obat baru untuk diizinkan dapat dipasarkan. Ini berarti bahwa agar perkembangan obat baru tahap awal secara ekonomis, perlu terobosan pemikiran yang mendasar bagaimana melakukan penelitian dengan jumlah kecil senyawa yang terpilih, dan bagaimana merancang senyawa yang lebih baik (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat. Tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik, aman, efek samping minimal dan efek analgesik yang lebih tinggi. Antara macam obat analgesik yang ada di pasaran adalah aspirin, parasetamol dan lain-lain. Obat analgesik sering diberikan apabila timbulnya gejala nyeri.

Pada umumnya nyeri merupakan salah satu aspek yang penting dalam bidang medis, dan menjadi penyebab tersering yang mendorong seseorang untuk mencari pengobatan (Hartwig dan Wilson, 2006). Rasa nyeri seringkali timbul apabila suatu jaringan mengalami gangguan atau kerusakan. Persepsi nyeri ini merupakan suatu sinyal yang berfungsi untuk mempertahankan tubuh agar pencetus nyeri ini segera diatasi (Guyton dan Hall, 1997). Pada umumnya penderita nyeri ringan hingga sedang diobati dengan obat-obat anti nyeri yaitu analgesik (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

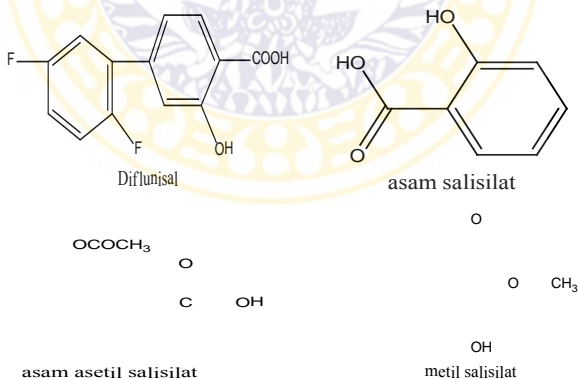
Secara umum analgetika bekerja secara sentral untuk meningkatkan kemampuan menahan nyeri. Analgesia yaitu keadaan setelah pemberian analgetika, berakibatkan perubahan perilaku pada respons nyeri dan kemampuan yang berkurang untuk menerima impuls nyeri tanpa kehilangan kesadaran. Sebaliknya, banyak obat meringankan nyeri dengan mempengaruhi patologi yang mendasarinya. Umpamanya, nyeri yang disebabkan oleh infeksi bakteri pada kerongkongan dapat dihilangkan setelah diberikan suatu antibiotika. Zat ini memusnahkan atau membatasi pertumbuhan bakteri yang bersama-sama dengan sel tularum yang rusak, dibersihkan oleh sistem peredaran dan sistem kekebalan. Penyembuhan dipercepat serta peradangan, pembengkakan, dan nyeri berkurang. Beberapa obat menghilangkan nyeri dengan efek langsung pada nyeri dan jalur bersangkutan tetapi tidak mempengaruhi patologi yang mendasarinya dan seperti halnya analgetika dapat menutupinya (Hite, 1995). Pemberian analgesik

harus di mulai da ri s enyawa y ang pa ling ef ektif d engan ef ek samping y ang pa ling s edikit (Dipiro, 20 09). Berdasarkan mekanisme kerja, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotika da n analgetika non-narkotika. Analgetika narkotika digunakan untuk mengurangi rasa nyeri yang moderat ataupun be rat dan analgetika non-narkotika unt uk menghilangkan r asa nyeri r ingan s ampai s edang (Siswandono dan Soekardjo, 200 8). C ontoh analgetika non-narkotik a dalah asam asetilsalisilat (aspirin), parasetamol dan c ontoh analgetika narkotik adalah morfin, kodein (Hite, 1995).

Semakin bervariasinya penyakit, maka permintaan obat baru semakin meningkat dalam bidang kefarmasian. Selain itu, telah banyak obat yang resisten dan adanya efek samping yang dapat di timbulkan oleh kelompok analgesik-antipiretik. Hal tersebut mendorong penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan turunan salisilat yang baru dengan efek analgesik yang lebih tinggi. Dalam usaha untuk mendapatkan senyawa baru dengan aktivitas yang optimal maka perlu dilakukan modifikasi struktur. Modifikasi struktur obat baru tersebut bertujuan untuk mendapatkan bentuk sediaan yang lebih baik, meningkatkan absorpsi obat, waktu kerja obat, dan menghindari efek samping obat yang mungkin terjadi (Ganellin dan Robert, 1999).

Turunan asam salisilat mempunyai aktivitas analgesik-antipiretik dan antirematik, (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Asam asetilsalisilat yang merupakan turunan asam salisilat yang lebih dikenal sebagai asetosal atau aspirin, adalah analgesik,

antipiretik dan inflamasi yang sangat luas digunakan dan digolongkan sebagai obat bebas (Gunawan, 2007). Turunan asam salisilat ini digunakan untuk mengurangi rasa sakit pada nyeri kepala, sakit otot, sakit yang berhubungan dengan rematik tetapi kurang efektif untuk mengurangi sakit karena kram dan migrain. Asetosal adalah turunan asam salisilat dengan substitusi pada gugus hidroksil dimana atom hidrogen pada asam salisilat digantikan dengan gugus asetil (Willette, 1991). Asetosal dapat menimbulkan efek samping iritasi lambung. Iritasi lambung akibat kemungkinan berhubungan dengan gugus karboksil yang bersifat asam, sedangkan iritasi kronik kemungkinan disebabkan oleh penghambatan pembentukan prostaglandin E_1 dan E_2 yaitu suatu senyawa yang dapat meningkatkan vasodilator mukosa lambung dan vasokonstriksi mukosa lambung (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Struktur beberapa turunan asam salisilat dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1.1 Struktur turunan Asam Salisilat

Dalam bidang kimia medisinal, pengembangan senyawa dimulai dengan kajian hubungan struktur-aktivitas (Siswandono dan Susilowati, 2008). Dalam usaha untuk mendapatkan senyawa bioaktif dengan aktivitas lebih baik dan efek samping yang minimal. Untuk meningkatkan aktivitas analgesik-antipiretik dan menurunkan efek samping, ada beberapa pendekatan untuk melakukan modifikasi struktur, di antaranya adalah mengacu pada struktur molekul obat yang sudah ada melalui empat cara yaitu: mengubah gugus karboksil melalui pembentukan garam, ester atau amida, substitusi pada gugus hidroksil, modifikasi pada gugus karboksil dan hidroksil, atau memasukkan gugus hidroksil atau gugus lain pada cincin aromatik atau mengubah gugus fungsional (Siswandono dan Susilowati, 2008).

Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis turunan salisilat yang lain yaitu asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat untuk meningkatkan efek analgesik dari turunan asam salisilat. Pada penelitian sebelumnya telah disintesis *O*-(4-metoksibenzoil)salisilat, analog benzoil aspirin, yang menunjukkan aktivitas analgesik yang lebih besar dari asetosal (Diyah dkk, 2002).

Logaritma koefisien partisi ($\log P$) merupakan salah satu parameter lipofilik yang sering digunakan dalam Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA). Pada perhitungan sifat kimia fisika secara teoritis menggunakan *Chemdraw Ultra 8.0*, Asetosal mempunyai nilai $\log P = 1,2$. Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai nilai $\log P = 3,49$. Harga

log P berarti obat tersebut semakin lipofil sehingga akan meningkatkan permeabilitas senyawa ke dalam membran biologis.

Harga refraksi molar (MR) merupakan parameter sterik yang digunakan dalam Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA). Asetosal mempunyai nilai $CMR = 4,4576$ dan asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai nilai $CMR = 7,3991$. Perubahan MR akan memberi perubahan efek sterik dan diharapkan nilai CMR asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat yang lebih besar dari asetosal akan meningkatkan keserasian interaksi senyawa dengan reseptor dalam sel sehingga aktivitas biologis akan meningkat juga (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Rancangan sintesis senyawa dalam penelitian ini dilakukan dengan mereaksikan 3,4-diklorobenzoil klorida dengan asam salisilat dengan reaksi esterifikasi. Pada sintesis ini digunakan basa piridin yang berfungsi sebagai katalisator yang menangkap HCl yang terhasil dari proses reaksi asilasi tersebut.

Untuk menguji kemurnian senyawa dilakukan uji kualitatif yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan beberapa lenda untuk penentuan jarak elusi. Untuk identifikasi struktur senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri inframerah (IR) dan spektrometri Resonansi magnet inti (NMR- 1H) (Silverstein dkk, 2005).

Efektifitas dari suatu bahan aktif dapat diketahui dengan menggunakan beberapa metode seperti metode stimulasi

panas dengan *hot plate test*, *tail immersion test* pada mencit, stimulasi listrik pada ekor mencit, stimulasi mekanikal pada bagian peritoneal mencit, dan stimulasi kimiawi yang dilakukan pada mencit atau tikus dengan diberi senyawa penginduksi nyeri (*Writhing test*). Metode untuk menguji aktivitas analgesik senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat yang dipilih adalah *Writhing test*. Senyawa yang dapat dipakai sebagai penginduksi nyeri adalah fenilkuinon, asetilkolin, radikinin, prostaglandin E₁, larutan NaCl 4 %, larutan asam asetat atau histamin. Dalam penelitian ini sebagai penginduksi nyeri digunakan asam asetat glasial 0,6 % karena mudah didapat dan merupakan penginduksi nyeri yang sering digunakan dalam uji analgesik dengan *Writhing test* (Turner, 1963). Uji aktivitas analgesik dinyatakan dalam persentase hambatan nyeri, yang ditentukan dengan mengamati respon geliat oleh kaki mencit dengan adanya senyawa uji dan kemudian ditentukan ED₅₀.

Untuk hasil penelitian diharapkan memperoleh senyawa baru turunan asam salisilat yaitu asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibandingkan setosal dalam usaha mengembangkan obat baru yang lebih poten.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas, permasalahan yang timbul adalah :

1. Apakah senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dapat disintesis melalui reaksi antara asam salisilat dengan 3,4-diklorobenzoil klorida?
2. Apakah senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar dari asetosal dengan menggunakan metode *Writhing test* pada mencit (*Mus musculus*)

1.3 Tujuan Penelitian

1. Melakukan sintesis senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dari bahan awal 3,4-diklorobenzoil klorida dan asam salisilat untuk mendapatkan senyawa baru.
2. Mendapatkan senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan aktivitas yang lebih besar di bandingkan dengan asetosal menggunakan metode *Writing test* pada mencit (*Mus Musculus*)

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mendapat senyawa baru yaitu asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat yang mempunyai aktivitas analgesiknya yang lebih baik sehingga dapat dimanfaatkan dan dikembangkan lebih lanjut dalam rangka memperoleh senyawa dengan aktivitas penekan nyeri yang lebih besar setelah melalui uji pre-klinis dan klinik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Analgesik

2.1.1 Tinjauan Tentang Definisi Analgesik

Analgesik adalah senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat (SSP) secara selektif. Analgesik dapat digunakan untuk mengurangi rasa sakit tanpa mempengaruhi kesadaran. Analgesik bekerja dengan meningkatkan nilai ambang persepsi rasa sakit. Aktivitas analgesik narkotika jauh lebih besar dibandingkan dengan golongan analgesik-antipiretik. Golongan narkotika ini pada umumnya menimbulkan euforia sehingga banyak disalahgunakan. Pemberian analgesik dalam jangka masa panjang dapat menimbulkan ketergantungan (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

2.1.2 Klasifikasi Analgesik

Analgetika atau obat penghalang nyeri adalah zat-zat yang mengurangi atau hilangkan rasa nyeri tanpa menghilangkan rasa kesadaran. Analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgesik narkotika dan analgesik non-narkotika. Analgesik narkotika digunakan untuk mengurangi rasa nyeri yang moderat ataupun berat dan analgesik non-narkotika untuk menghilangkan rasa nyeri ringan sampai sedang (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Namun kebanyakan analgesik yang digunakan adalah analgesik non-narkotik untuk mengurangi nyeri ringan sampai sedang.

Kebanyakan obat analgesik memiliki efek antipiretik. Oleh itu, obat ini tidak hanya digunakan sebagai obat analgesik, tapi juga pada gangguan demam (pada kasus infeksi virus atau kuman, pilek) dan peradangan. Daya antipiretisnya berdasarkan rangsangan terhadap pusat pengatur kalor di *hypothalamus*, yang mengakibatkan vasodilatasi perifer (dikulit) dengan bertambahnya pengeluaran kalor yang disertai keluarnya keringat. Kombinasi dari dua atau lebih analgetika sering kali digunakan, karena terjadi efek potensiasi.

Golongan obat yang biasa digunakan sebagai obat analgesik dan obat antipiretik adalah golongan salisilat, analog anilin dan aminofenol, piroksolon dan derivat quinolin (Kar, 2006). Obat analgesik-antipiretik digunakan untuk pengobatan simptomatik, yaitu meringankan gejala penyakit, tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Berdasarkan kerja farmakologinya, analgetika dibagi dalam dua kelompok besar, yakni:

- a) Analgetika perifer (non-narkotik), yang terdiri dari obat-obat yang tidak bersifat narkotik dan tidak bekerja sentral.
- b) Analgetika narkotik khusus digunakan untuk menghilangkan rasa nyeri hebat, seperti pada *fracture* dan kanker.

Secara kimiawi, analgetika perifer dapat dibagi dalam beberapa kelompok, yakni:

- a) Parasetamol

- b) Salisilat: asetosal, salisilamida dan benorilat
- c) Penghambat prostaglandin (NSAIDs): ibuprofen dan lain-lain
- d) Derivat-antranilat: mefenaminat, glafenin
- e) Derivat-pirazolinon: pirofenazon, ipropilaminofenazon dan metamizol
- f) Lainnya: benzidamin (Tantum)

Obat-obat ini mampu meringankan atau menghilangkan rasa nyeri tanpa mempengaruhi sistem saraf pusat (SSP) atau menurunkan kesadaran, juga tidak menimbulkan kecanduan. Kebanyakan zat ini juga berdaya antipiretis dan/atau antiradang. Obat-obat ini banyak diberikan untuk nyeri ringan sampai sedang, yang penyebabnya bermacam-macam, misalnya nyeri kepala, gigi, perut, otot atau sendi, nyeri haid (*dysmenorrhea*), nyeri akibat benturan atau kecelakaan (trauma). Untuk kedua nyeri terakhir, anti-inflamasi non steroid (NSAID) lebih merekomendasikan.

Analgetika non-ototik, kini disebut juga opioid adalah obat-obat yang daya kerjanya meniru opioid endogen dengan memperpanjang aktivasi dari reseptor-reseptor opioid. Zat-zat ini bekerja terhadap reseptor opioid khas di SSP, sehingga persepsi nyeri dan respons emosional terhadap nyeri berubah. Berdasarkan mekanisme kerja, obat-obat ini dapat dibagi dalam 3 kelompok, yakni:

- a) Agonis opioid (morfin, kodein, heroin, nikomorfina, metadon, petidin, tramadol)

- b) Antagonis opioidat (nalokson, nalorfin, pentazosin, buprenorfin)
- c) Campuran (nalorfin, nalbufin) (Tjandjaja dan R. Ahardja, 2007).

2.2. Tinjauan Tentang Turunan Asam Salisilat

Turunan asam salisilat ini digunakan untuk mengurangi rasa sakit pada nyeri kepala, sakit otot, sakit yang berhubungan dengan reumatik tetapi kurang efektif untuk mengurangi sakit karena kram dan migrain. Asetosal dapat digunakan sebagai peroral dengan adanya substitusi pada gugus hidroksil dimana atom hidrogen pada asam salisilat digantikan dengan gugus asetil (Willette, 1991). Antara contoh turunan asam salisilat adalah aspirin, salisilamid dan diflusal.

- a) Aspirin (asam asetilsalisilat, asetosal, aspirin, aspironal), digunakan sebagai analgesik-antipiretik dan antireumatik. Pemberian aspirin dalam dosis rendah dan dalam waktu yang lama dapat digunakan untuk mencegah serangan jantung. Aspirin juga digunakan sebagai pengobatan trombotika karena mempunyai efek antiplatelet. Absorpsi aspirin dalam saluran cerna cepat, terutama pada usus kecil dan lambung, dan segera terhidrolisa menjadi asam salisilat yang aktif. Asam salisilat terikat pada protein plasma \pm 90%, kadar plasma tertinggi aspirin dicapai dalam waktu 14 menit, sedang asam salisilat \pm 0,5-1 jam.
- b) Salisimida (*o*-hidroksibenzamid), mempunyai aktivitas analgesik anti-antipiretik hampir sama dengan aspirin, tetapi

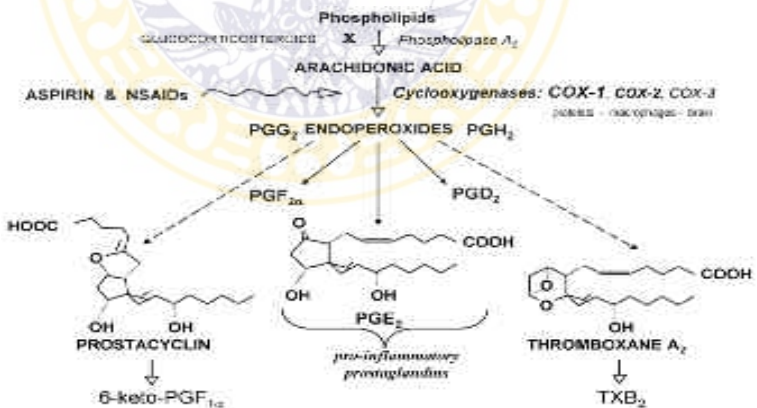
tidak menunjukkan efek antiradang dan antirematik. Karena salisimida tidak terhidrolisa menjadi asam salisilat maka yang bertanggungjawab terhadap aktivitas analgesik adalah seluruh molekul. Dibanding aspirin, salisimida mempunyai awal kerja yang lebih cepat, lebih cepat diekskresikan (masa kerja pendek) dan menimbulkan toksisitas relatif pendek. Pada sediaan sering dikombinasikan dengan obat lain seperti asetamonifen. Absorpsi obat dalam saluran cerna cepat dan kadar plasma tertinggi dicapai dalam waktu 0,3-2 jam.

- c) Diflunisal (diflonid), mempunyai aktivitas analgesik, antiradang dan antipiretik yang lebih besar dibanding aspirin. Absorpsi obat dalam saluran cerna cepat dan sempurna, awal kerja obat ± 1 jam sesudah pemberian. Kadar plasma tertinggi dicapai setelah ± 2 jam, dengan masa kerja ± 12 jam. Diflunisal efektif untuk mengurangi rasa nyeri sesudah operasi dan osteoarthritis.

2.3 Tinjauan tentang Asetosal

Pada awal abad ke-20, asetosal menjadi obat yang sangat populer sebagai obat antipiretik, anti-inflamasi dan analgesik. Mekanisme aksi biokimia dari aspirin ditemukan pertamakali oleh Sir John Vane pada tahun 1971. Dia mengamati bahwa asetosal memblokir aktivitas enzimatis siklooksigenase (COX), yang merupakan enzim kunci yang mengarah ke produksi pro-inflamasi prostaglandin dari asam arakidonat. Penemuan lain di bidang obat antiinflamasi selain asetosal, yaitu fenilbutazon, indometasin, asam mefenamat, ibuprofen dan lain-lain yang banyak digunakan untuk mengobati kondisi reumatik. Semua

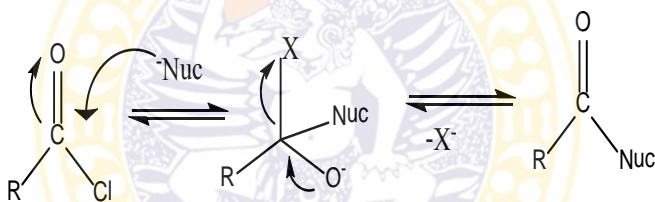
obat-obatan antiinflamasi non steroid (NSAID) menghambat biosintesis prostaglandin. Namun, toksisitas obat-obatan ini tetap menjadi masalah dan mungkin disebabkan oleh intervensi biologis yang sama. Selama dua puluh tahun terakhir, ditemukan penggunaan lain untuk asetosal yaitu sebagai anti-trombolitik. Efektivitas asetosal dalam trombolisis didasarkan pada penghambatan irreversible dari enzim COX trombosit yang mensintesis tromboksan A₂ (TXA₂) yang potensial sebagai pro-aggregatory dan vasostriksi prostaglandin. Asetosal secara permanen menginaktivasi enzim (dengan mengikat kelompok asetil pada bagian aktif), dan demikian membuat platelet tidak mampu mensintesis TXA₂ selama siklus hidupnya (sekitar 10 hari). Dosis rendah asetosal reguler memberi efek kumulatif dan menghambat COX platelet tanpa mempengaruhi sintesis prostacyclin dalam pembuluh darah (yang memberi efek sebagai vasodilator dan anti-platelet). (Szczeklik, 2006).



Gambar 2.1 mekanisme metabolisme asam arakidonat

2.4. Tinjauan Tentang Reaksi Asilasi

Suatu ester asam karboksilat ialah suatu senyawa yang mengandung gugus $-\text{CO}_2\text{R}$. R dapat berbentuk alkil maupun aril. Zat pengasilasi bertindak sebagai elektrophil dan biasanya yang mendapatkan serangan adalah atom karbon pada gugus karbonil. Reaksi substitusi nukleofilik melibatkan substitusi nukleofilik untuk gugus pergil dalam turunan asam karboksilat. Mengidentifikasi gugus pergi yaitu asil (Cl^- di asam klorida) dan nukleofil (alkohol). Mekanisme asilasi terjadi melalui dua tahap yaitu tahap pertama adalah adisi nukleofil pada gugus karbonil dan tahap kedua adalah eliminasi gugus pergil dari turunan karboksilat seperti ion halida yaitu klorida. (McMurry, 2012).



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi substitusi nukleofilik pada gugus asil

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

Tahap kedua adalah penataan kembali elektron-elektron dan diikuti pengusiran gugus pergil (X) yang tergantung pada

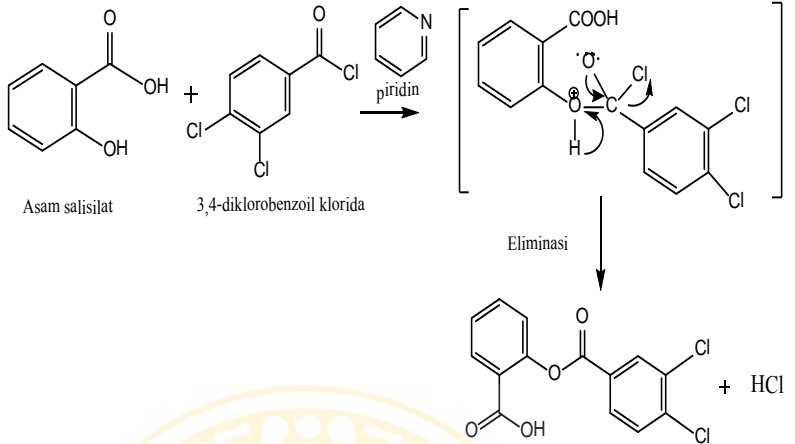
kebasaan gugus pergi yang baik. Urutan kebasaaan gugus pergi adalah



Reaksi asilasi dapat menggunakan asil klorid dan anhidrida. Sintesis ini dilakukan dalam suasana basa. Cara ini dilakukan bila semua bahan pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan. Pelarut yang umum digunakan adalah piridin (basa Organik) yang dapat berfungsi menetralkan HCl (McMurry, 2012).

2.5 Tinjauan tentang sintesis asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

Sintesis senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dilakukan melalui prinsip reaksi metode asilasi. Apabila gugus $-\text{OH}$ dari asam salisilat direaksikan dengan 3,4-diklorobenzoil klorida menggunakan reaksi esterifikasi. Pada sintesis satu senyawa, spontanitas reaksi dipengaruhi oleh besar dan sifat suatu gugus contoh seperti efek halangan ruang dan elektronegativitas. Selain itu, sifat reaktan, suhu, tekanan, pengadukan, dan adanya katalisator juga dapat berpengaruh dalam suatu reaksi sintesis (Fessenden, 1997). Tahap-tahap reaksi sintesis dapat dilihat di gambar



Gambar 2.3: Proses reaksi sintesis senyawa asam salisilat dan 3,4-diklorobenzoil klorida

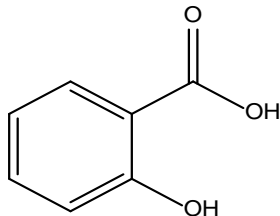
2.6 Tinjauan Tentang bahan reagen untuk sintesis

2.6.1 Tinjauan tentang asam salisilat

Pemerian : bentuk kristal berwarna putih, jarum halus.

Sifat fisika : titik leleh 159°C , mulai menguap pada suhu 76°C , titik didih 211°C , densitas 1,443

Kelarutan : larut dalam air, karbon tetraklorida, benzen, propanol, etanol dan aseton.

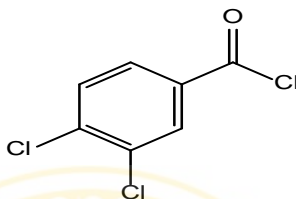


2.6.2 Tinjauan tentang 3,4-diklorobenzoil klorida

Pemerian : bentuk kristal putih, kristal padat

Sifat fisika : titik leleh 30-33 °C, titik didih 242°C,
kimia

Kelarutan : Tidal larut dalam air



2.6.3 Tinjauan tentang Piridin

Pemerian : bentuk cairan bewarna dan bau menusuk

Sifat f isika : t titik l eleh -41,6 °C, titik didih kimia
115,2-115,3°C, densitas 0,98272 ml/g

Kelarutan : Air, alkohol, eter, petroleum eter, minyak
dan beberapa cairan organik.



2.6.4 Tinjauan tentang Tetrahidrofuran

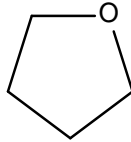
Pemerian : bentuk cairan tidak berwarna, bau tajam, dan
rasa manis.

Sifat f isika : t titik l eleh -94 °C, t titik d idih 56,5°C, dan
mudah menguap

kimia

Kelarutan : larut dalam air, alkohol, dimetilformida, kloroform, eter, dan sebagian minyak.

(Budavari S. et al, 2009).



2.7 Tinjauan Tentang Uji Kemurnian

2.7.1 Tinjauan Tentang Jarak Lebur

Jarak lebur merupakan salah satu tahapan fisika yang dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa. Jarak lebur suatu padatan adalah suatu suhu dimana padatan mulai berubah menjadi cairan pada keadaan dibawah tekanan 1 atmosfer. Jarak lebur dapat mengamati kemurnian suatu senyawa sekitar 1 – 2 °C. Senyawa murni umumnya mempunyai jarak lebur yang tajam yaitu tidak lebih dari 2,0 °C. Ketajaman jarak lebur akan dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu seperti ukuran kristal, kecepatan pemanasan, dan disebabkan adanya pengotor (Pavia, 2009).

2.7.2 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) telah dikembangkan menjadi suatu teknik yang sangat canggih untuk identifikasi senyawa dan untuk menentukan adanya pengotor minor. Alasan keunggulan dikarenakan fleksibilitasnya untuk mendeteksi hampir semua senyawa, bahkan beberapa

senyawa anorganik (Watson, 2007). Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan koefisien partisi atau adsorpsi atau kombinasi antara koefisien partisi dan adsorpsi. Fase diam Kromatografi Lapis Tipis umumnya digunakan bahan padat silika gel dan biasanya memiliki ketebalan 0,24 mm. Pada teknik ini, senyawa berupa larutan ditotolkan pada lempeng kromatografi kemudian diekspansi dengan eluen yang sesuai. Pemilihan bahan untuk fase diam didasarkan atas sifat kepolaran senyawa yang akan dipisahkan dan apakah reaksi antara fase diam dan eluen yang akan digunakan.

KLT dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif dengan membandingkan R_f (*Retardation Factor*) sampel dengan R_f pembanding. Harga R_f diperoleh dari hasil jarak tempuh noda dari titik penotolan dengan jarak yang ditempuh eluen (Vogel, 2002).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh zat uji dari titik penotolan}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Keuntungan KLT sebagai metode pemisahan adalah memerlukan sedikit eluen, dapat mengamati beberapa sampel pada satu lempeng dalam sekali ekspansi, pelaksanaannya yang mudah, dan biaya yang relatif murah (Kar, 2006).

2.8 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur

2.8.1 Tinjauan Tentang Spektrofotometer UltraViolet – Visible (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis adalah teknik analisis spektroskopis yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190 – 300 nm) dan sinar tampak (380 – 780 nm). Spektrofotometer UV-Vis pada umumnya adalah melihat intensitas dan panjang gelombang (λ) maksimum yang tergantung pada struktur elektronik dari gugus-gugus yang terdapat dalam struktur molekul senyawa. Gugus yang dapat menyebabkan terjadinya serapan pada cahaya pada daerah ultraviolet dan sinar tampak adalah gugus kromofor. Contoh gugus kromofor :



Gugus auxokrom adalah gugus jenuh atau heteroatom yang apabila terikat pada gugus kromofor dapat mengubah intensitas serapan dan panjang gelombang maksimum. Auxokrom gugus hidroksil dan amino dipengaruhi oleh pH, yang mengalami pergeseran batokromik (pindah ke panjang gelombang yang lebih tinggi). Contoh gugus auxokrom :



2.8.2 Tinjauan Tentang Spektrofotometer InfraMerah (IR)

Spektrofotometer Inframerah (IR) digunakan untuk mengukur serapan radiasi inframerah pada pelbagai panjang gelombang. Antara daerah yang khusus untuk identifikasi gugus fungsional adalah antara $1400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, yang berada pada bagian kiri spektrum inframerah sedangkan daerah di sebelah

kanan 1400 cm^{-1} biasanya sangat rumit karena terjadi banyak absorpsi oleh getaran ulur maupun torkan. Bagian ini disebut daerah sidik jari (Fessenden dan Fessenden, 1997). Antara faktor yang menentukan intensitas dan tingkat energi absorpsi dalam spektrum inframerah adalah intensitas serapan yang merupakan suatu ikatan yang menyerap radiasi bergantung pada momen dipolnya. Jadi urutan intensitas serapan untuk ikatan C-X berikut ini adalah:



Demikian pula:



Intensitas bergantung pada elektronegativitas relatif pada atom-atom yang terlibat dalam ikatan tersebut (Watson, 2007).

Instrumen inframerah memberikan spektrum senyawa dalam kisaran umum $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Adanya gugus OH, C=O dan C=C akan menunjukkan pita serapan OH pada 3300 cm^{-1} , C=O pada 1711 cm^{-1} , C=C pada 2964 cm^{-1} (Silverstein, 2005).

2.8.3 Tinjauan Tentang Spektrofotometer Resonansi Magnit Inti (NMR-¹H)

Spektrofotometer Resonansi Magnit Inti (NMR-¹H) merupakan metode yang dapat memberikan informasi penting tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus yang berdekatan dengan atom hidrogen dalam molekul. Resonansi magnet ini diakibatkan oleh penyerapan radiasi elektromagnet oleh proton dalam suatu medan magnet (H_0), yang membalik dari keadaan spin paralel ke antiparalel. Suatu medan

magnet m olekul i mbasan da pat m emperisai p roton a tau meniadakan perisai dan mengakibatkan suatu geseran kimia (δ) dari pita absorpsi. Medan imbasan adalah hasil efek anisotropik dan efek induktif suatu p roton y ang t erperisai akan m enyerap diatas medan m endekati TMS rujukan, sedangkan p roton y ang kurang terperisai akan menyerap dibawah medan (Fessenden dan Fessenden, 1997)

Cincin benzen di tunjukkan pada daerah 6-8 ppm, dan pada daerah ± 12 ppm menunjukkan adanya proton OH. Daerah lain yang boleh dilihat adalah CH_3 pada 0,7-1,3 ppm, H dari OH pada 0,5-5 ppm, H cincin aromatik pada 4-7 ppm (Pavia, 2009).

2.9 Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik

Pengujian aktivitas analgesik dilakukan untuk menguji kemampuan zat uji menekan dan menghilangkan nyeri yang diinduksi pada hewan coba (Mencit atau tikus putih). Antara metode pengujian yang dilakukan adalah metode stimulasi panas, metode stimulasi listrik, metode stimulasi mekanikal, dan metode stimulasi kimiawi (Turner, 1963).

2.9.1 Metode Stimulasi Panas

Penentuan ku alitatif ambang nyeri pada manusia terhadap radiasi panas dan evaluasi aktivitas obat analgesik opioid dibuat dengan metode yang telah dikembangkan oleh Schumacher dan Wolff. Mencit diletakkan di dalam kandang, bagian ekornya di biarkan bebas berada di luar kandang. Bagian ekor mencit dipegang, kemudian sinar lampu difokuskan pada bagian ketiga proksimal ekor mencit. Dalam beberapa detik,

mencit akan menjentikkan ekornya atau berusaha untuk melepaskan diri. Metode *Hot Plate Test* dari Wolf dan MacDonald merupakan stimulasi panas yang dapat diberikan secara konduksi. Suhu *hot plate* diatur pada 55 °C hingga 56 °C kemudian mencit diletakkan di atas *hot plate* dan waktu respon panas oleh mencit dicatat. Apabila mencit menjilat kaki, mengangkat kaki atau meloncat merupakan antara respon panas oleh mencit. *Tail Immersion Test* juga dapat digunakan untuk melihat respon mencit terhadap panas. Pada metode ini mencit dimasukkan ke dalam kandang, bagian ekornya dibiarkan bebas diluar kandang. Kemudian ekor mencit dicelupkan ke dalam air panas dengan suhu 55 °C, kemudian diamati respon panas oleh mencit yaitu mengeluarkan ekornya dari air panas tersebut. Waktu yang diambil sehingga respon nyeri terjadi dicatat (Turner, 1963).

2.9.2 Metode Stimulasi Listrik

Metode stimulasi ekor telah ditemukan pada awal tahun 1950 oleh Burn. Metode stimulasi ekor dibuat karena ekor mencit sensitif terhadap stimulus. Stimulus dapat bervariasi sama ada durasi aliran listrik atau peningkatan daya listrik. Pada metode ini, mencit ditempatkan pada kandang, kemudian pada ekor mencit diletakkan klip dan elektrode positif diletakkan pada ujung ekor mencit. Aliran listrik dialirkan pada intensitas daya yang konstan yaitu antara 40 -50 Volt. Waktu respon normal terhadap stimulus adalah 4-5 detik. Selain metode stimulasi ekor, metode stimulasi listrik lainnya adalah *Grid*

Shock Test, Tooth Pulp Stimulation, dan Monkey Shock Titration Test (Turner, 1963).

2.9.3 Metode Stimulasi Mekanik

Model hewan coba (Mencit atau tikus putih) di buat untuk uji efektivitas analgesik terhadap nyeri *visceral* yang bersangkutan dengan induksi nyeri pada intra-peritoneal yang disebabkan oleh bahan kimia seperti asam asetat dan fenilkinon. Komisi etik melarang pengujian yang dilakukan pada satu hewan berulang kali. Untuk mengatasi masalah ini maka dibuat suatu model mekanikal nyeri *visceral* berdasarkan distensi berulang dan reversible duodenum tikus (Turner, 1963).

2.9.4 Metode Stimulasi Kimiawi

Injeksi bahan kimia yang bersifat iritan seperti fenilkinon atau asam asetat ke dalam ruang peritoneal mencit. Mencit akan merespon rasa nyeri dengan aktivitas geliat (*Writhing*). Selain fenilkinon dan asam asetat, beberapa bahan kimia juga dapat digunakan sebagai penginduksi nyeri seperti asetilkolin, bradikinin, prostaglandin E₁, dan a sonitin. Pada metode ini digunakan beberapa kelompok mencit yang terdiri dari 6 ekor mencit per kelompok. Kelompok tersebut dibagi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok uji (Turner, 1963).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Kerangka Konseptual

Analgetika merupakan zat-zat yang memiliki efek mengurangi atau menghilangkan nyeri tanpa menghilangkan kesadaran. Analgetika yang banyak digunakan adalah golongan anti-inflamasi non-steroid (NSAID), yaitu turunan asam salisilat (Hite,1999).

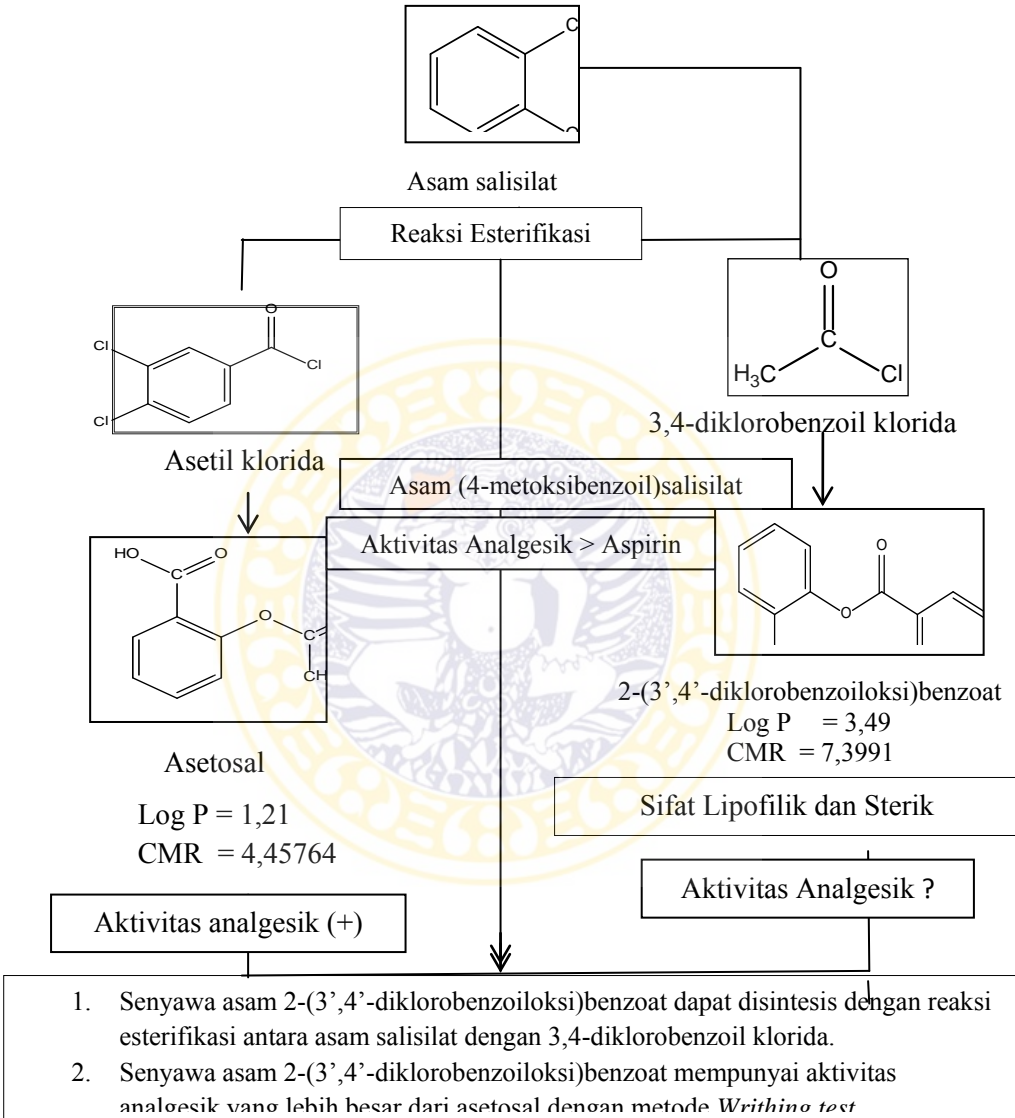
Senyawa asam asetilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik-antipiretik dan antirematik (Siswandono dan Soekardjo, 2008). Asam asetilsalisilat yang merupakan turunan asam salisilat yang lebih dikenal sebagai asetosal atau aspirin adalah analgesik, antipiretik dan anti-inflamasi yang sangat luas digunakan dan digolongkan sebagai obat bebas (Gunawan, 2007). Turunan asam salisilat ini digunakan untuk mengurangi rasa sakit pada nyeri kepala, sakit otot, sakit yang berhubungan dengan reumatik tetapi kurang efektif untuk mengurangi sakit karena kram dan migrain. Asetosal dapat menimbulkan efek samping iritasi lambung. Iritasi lambung akibat kemungkinan berhubungan dengan gugus karboksil yang bersifat asam. Oleh karena itu untuk meningkatkan aktivitas analgesik-antipiretiknya dilakukan modifikasi pada struktur asam salisilat itu sendiri (Siswandono dan Soekardjo, 2008).

Berdasarkan strukturnya asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat memiliki sifat lipofilik yang lebih tinggi dibanding asetosal, sehingga diharapkan senyawa tersebut

lebih mudah menembus membran biologis. Dengan meningkatnya jumlah obat yang dapat menembus membran semakin banyak, maka jumlah obat yang dapat berinteraksi dengan reseptor akan semakin besar dan aktivitasnya akan meningkat.

Pada penelitian ini, dikaji aktivitas analgesik asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dilakukan dengan metode *writhing test*. Perbedaan struktur asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan asetosal adalah pada gugus hidrogen yang terikat pada atom O, diganti dengan gugus 3,4-diklorobenzoil klorida. Penggantian ini akan mempengaruhi sifat kimia fisika senyawa dan terjadi peningkatan sifat lipofilik (Log P) dan sterik (MR). Asetosal mempunyai nilai $\log P = 1,21$. Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai nilai $\log P = 3,49$. Harga $\log P$ berarti obat tersebut semakin lipofil sehingga akan meningkatkan penetrasi senyawa ke dalam membran biologis. Harga MR merupakan parameter sterik yang digunakan dalam hubungan kuantitatif Struktur Aktivitas (HKSA). Asetosal mempunyai nilai $CMR = 4,4576$ dan asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai nilai $CMR = 7,399$. Perubahan MR akan memberi perubahan efek sterik, dan diharapkan nilai CMR asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat yang lebih besar dari asetosal (Siswandono dan Soekardjo, 2008)

3.2 Skema Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

Asam salisilat p.s. (E.Merck), 3,4-diklorobenzoil klorida p.s. (Aldrich), Natrium Bi karbonat p.a. (E .Merck), P iridin p.s. (Aldrich), Tetrahidrofuran p.a. (Aldrich), Metanol p .a. (E. Merck), Etil As etat p .a. (E. M erck), Kloroform p .a. (E . Merck), Lempeng Kromatografi S ilika Ge l 60 GF₂₅₄ (E. Merc), metanol absolut p.a. (E. Merck), Asam asetat glasial p.a. (E .Merck), Etanol 7 0% t eknis (E.Merck), Aqua p ro injeksi.

4.1.1. Alat – alat untuk Sintesis dan analisis struktur :

Hot plate-magnetic stirrer (Labinco L32), Seperangkat alat gelas untuk s intesis (l abu a las b ulat, c orong pi sah, be aker gelas, corong Buchner, c orong pisah, l abu a las b ulat) , Termometer (Fischer), Bejana kromatografi lapis tipis (KLT CAMAG), Lampu U V-254 n m (Topcon), *Electrothermal Melting Point Apparatus (Baush-Lomb)*, Spektrofotometer FT-IR (J ASCO F T/IR-5300), Spektrofotometer r esonansi magnet inti (¹H-NMR) Hitachi FT-NMR R-1900, Spektrofotometer U V-Vis (Lambda EZ-201), Timbangan menci t (A ND H L 1 00), *Stop watch* (Diamond), *Sput Injection disposable syringe 1ml* (Terumo)

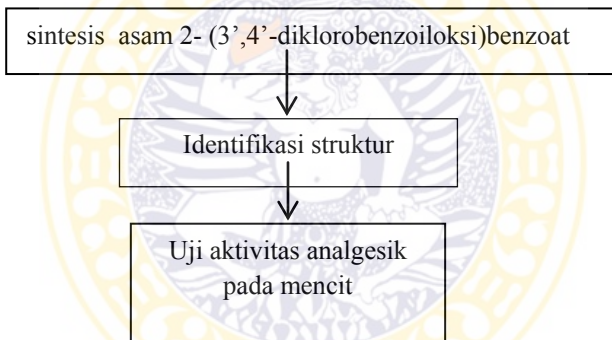
4.1.2 Hewan Coba

Hewan coba m encit putih (*Mus Musculus*) g alur Ba lb “C” diperoleh da ri P usat V eterineria F arma (PUSVETMA), J l. Ahmad Y ani, S urabaya de ngan ka rakteristik y aitu ja nta n

dewasa berumur 2-3 bulan, berat badan 20-30 gram, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya. Sebelum diperlakukan terhadap mencit, dilakukan adaptasi dengan lingkungan selama 1 minggu dan diberikan makanan standar serta minum, kemudian mencit dipuasakan semalaman sebelum diberi perlakuan dan untuk setiap mencit hanya digunakan satu kali saja. Komposisi makanan tercantum pada lampiran 5.

4.2 Kerangka Operasional

Kerangka Operasional Sintesis ini dapat dilihat secara skematis seperti yang terlihat pada gambar 4.1

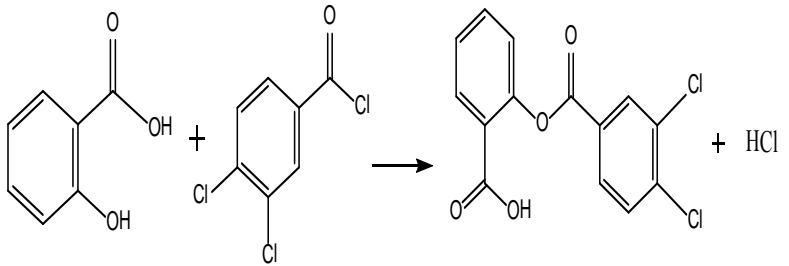


Gambar 4.1 Kerangka Operasional

4.3 Prosedur Sintesis Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat disintesis dengan mereaksikan 3,4-diklorobenzoil klorida dengan asam salisilat dengan prosedur seperti berikut :

0,0125 mol (2,072 gram) asam salisilat ditambah 0,0125 mol (1 ml) piridin dan di larutkan dengan 20 ml tetrahidrofuran, dalam labu alasi. 0,0250 mol (2,618 gram) 3,4-diklorobenzoil klorida di campur dengan 10 ml tetrahidrofuran dalam corong pisah. Larutan 3,4-diklorobenzoil klorida di teteskan ke dalam larutan asam salisilat tetes demi tetes sampai habis, campuran di refluks dan di aduk dengan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* selama 30 menit. Campuran di cek dengan KLT tiap jam, bila tidak ada asam salisilat tidak ada lagi, campuran di dinginkan dan kemudian dituang ke dalam beaker glass yang berisi 50 ml aquadest, hingga terbentuk endapan. Endapan disaring dan dicuci dengan aquadest dengan corong Buchner sampai bebas piridin (dicek dengan KLT). Setelah itu larutan di lakukan rekristalisasi dengan metanol panas 100 ml, hingga tepat larut, lalu didinginkan. Larutan di tambah 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.



0,015 mol
2,072 gram

0,0125 mol
2,618 gram

0,0125 mol
3,8875 gram

..... va
(3',4' diklorobenzoiloksi)benzoat

4.4. Analisis Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

4.4.1. Pemeriksaan untuk Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis termasuk bentuk, warna, bau dan kelarutan.

4.5. P emeriksaan K emurnian S enyawa asam 2 -(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

4.5.1. Uji Jarak Lebur

Dalam p emeriksaan jarak lebur i ni digunakan a lat penentu ja rak lebur *Mel-Temp Electrothermal*. S edikit zat (senyawa hasil preparasi) di gerus s ampai h alus kemudiaan dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya tertutup sampai setinggi $\pm 3 \text{ mm} - 5 \text{ mm}$. Selanjutnya pipa kapiler diletakkan di dalam alat penentu jarak lebur dan alat dinyalakan. K enaikan suhu a lat di amati s ambil mengamati pula zat yang ada dalam pipa kapiler saat zat mulai meleleh sampai za t meleleh semua. Pemeriksaan i ni d ilakukan

replikasi sebanyak tiga kali dengan menurunkan terlebih dahulu suhu alat, baru kemudian dilakukan pengulangan.

4.5.2 Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Analisis kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel 60 GF₂₅₄ dan pipa kapiler 2 µl. Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dalam etanol kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi. Sebelum dilakukan elusi, terlebih dahulu dilakukan penjenjahan dengan 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:

N-heksan: Kloroform = 4 : 6

Kloroform: Aseton = 4 : 6

N-heksan : Aseton = 7 : 3

Setelah di elusi, lempeng dikeringkan kemudian diamati nodanya dengan lampu UV pada panjang gelombang 256 nm.

4.6. Pemeriksaan Konfirmasi Struktur

4.6.1 Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel yang di analisa terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut absolut, kemudian diukur serapannya pada daerah UV pada panjang gelombang 200-400 nm, kemudian diamati serapan pada panjang gelombang maksimumnya (Silverstein, 2005; Pavia, 2009).

4.6.2 Analisis Spektrofotometer Inframerah

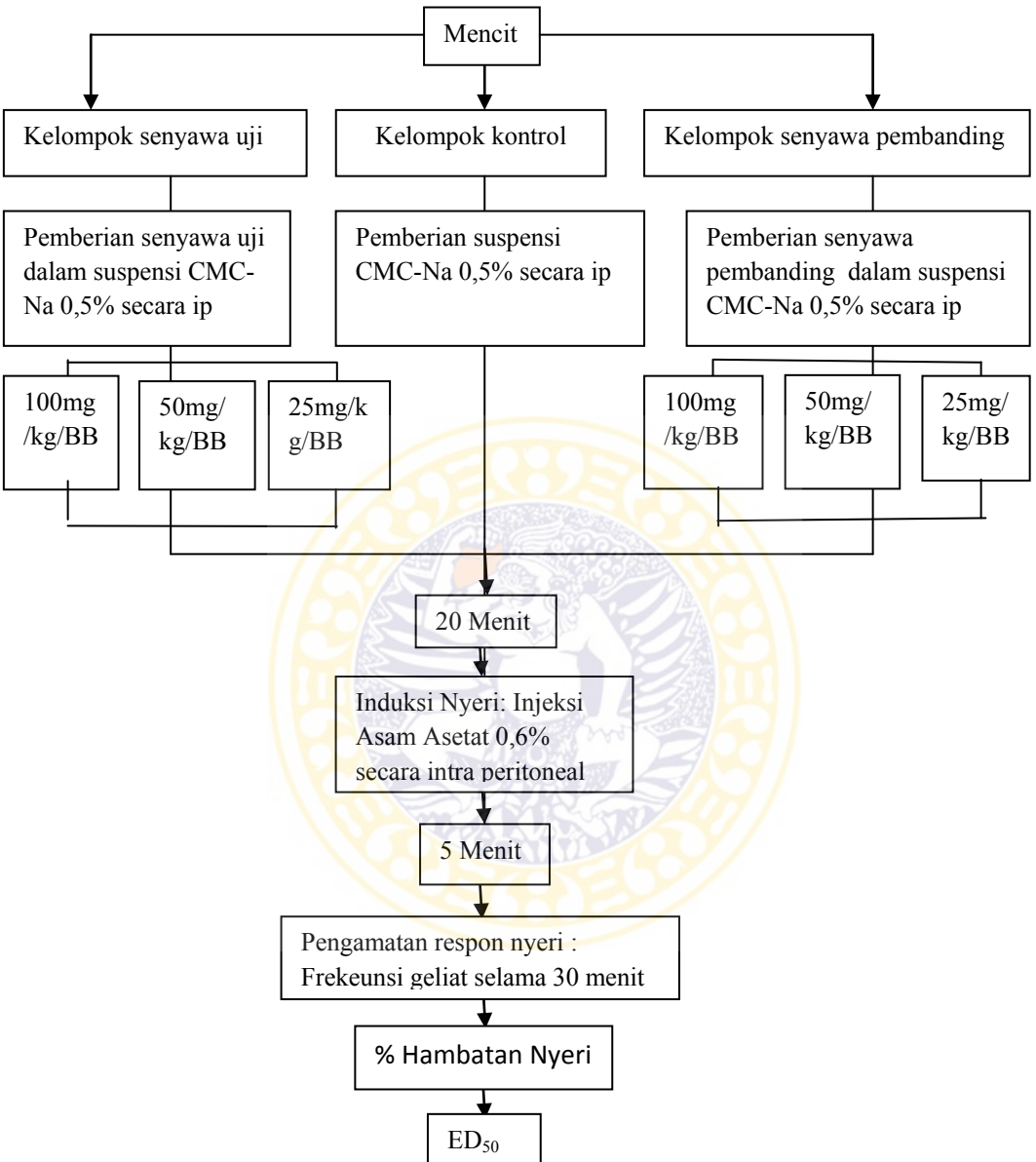
Sampel kurang lebih 1-2 % dicampur dengan serbuk kering ka lium bromida unt uk di buat menjadi pe let. Campuran di masukkan ke dalam alat cetakan p elet dan ditekan dengan ke kuatan sebesar 100 00 - 15000 po n per inci persegi menjadi sebuah cakram bening (pellet). Dibuat spektrum inframerah pada bi langan gelombang (ν) = 500-4000 cm^{-1} dan diidentifikasi pi ta a bsorpsi yang kha s da ri gugus fungsi pada spektrum inframerah (Silverstein, 2005).

4.6.3 Analisis Spektrometer Resonansi Magnet Inti (NMR- ^1H)

Sedikit s ampel di larutkan dalam dim etilsulfoksida *deuterited* (DMSO-D₆) yang s udah m engandung tetrametisilan (TMS). D i buat s pektrum r esonansi proton senyawa pada d aerah g eseran k imia 0 -15. D iidentifikasi intensitas jumlah, posisi pada daerah geseran kimia puncak-puncak p roton ($^1\text{H-NMR}$) pa da s pektrum r esonansi magnet inti yang terjadi (Silverstein, 2005).

4.7 Prosedur Uji Aktivitas Analgesik

Uji a ktivitas a nalgesik i ni di tentukan d engan c ara penghambatan t erhadap nyeri yang d iinduksi s e cara kimiawi melalui test geliat (*Writhing test*). Pada penelitian ini, bahan kimia yang digunakan sebagai penginduksi nyeri ialah larutan asam asetat glasial 0,6 %.



Gambar 4.2 Bagan Uji Aktivitas Analgesik

4.7.1 Persiapan hewan coba

Sejumlah mencit bobot antara 20-30 gram dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu 1 kelompok senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat (100mg/kg BB); (50mg/kg BB); (25mg/kg BB) dan 1 kelompok senyawa pembanding asetosal (100mg/kg BB); (50mg/kg BB); (25mg/kg BB) dan 1 kelompok kontrol, masing-masing terdiri dari 6 ekor. Sebelum percobaan, mencit di puasakan semalam tetapi tetap diberi minum. Mencit pada kelompok uji akan diberi senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat pada dosis 100 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 25 mg/kg BB sedangkan pada kelompok kontrol tidak diberi senyawa uji, hanya diberi suspensi CMC-Na 0,5%. Pelaksanaan tertera pada Gambar 4.2.

4.7.2. Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6 %

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

4.7.3. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,5%

Sebanyak 500 mg CMC-Na ditaburkan di atas aqua pro injeksi panas 30 ml dan di biarkan hingga mengembang selama sekitar 5 menit membentuk busa, kemudian digerus dan diencerkan dengan aqua pro injeksi sehingga diperoleh volume 100 ml.

4.7.4. Perhitungan Dosis

Dosis asetosal dan asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat yang diberikan kepada setiap mencit disesuaikan dengan bobot masing-masing mencit. Pemberian dosis pada

masing-masing mencit dihitung berdasarkan *Body surface Area* (BSA) dan *Human Effective Dose* (HED).

Tabel 4.1 konversi dosis hewan coba ke HED
berdasarkan BSA
(Reagen-Shaw *et al*, 2007)

Species	Berat (kg)	BSA (m ²)	K _m Factor
Manusia	Dewasa 60	1,6	37
	Anak 20	0,8	25
Babon	12	0,6	20
Anjing	10	0,5	20
Monyet	3	0,24	12
Kelinci	1,8	0,15	12
Tikus	0,15	0,025	6
Hamster	0,08	0,02	5
Mencit	0,02	0,007	3

Yang dihitung menggunakan rumus:

$$\text{HED (mg)} = \text{Dosis pada hewan} \times \frac{\text{Km pada hewan coba}}{\text{kg} \quad \text{Km pada manusia}}$$

Dosis asetosal untuk nyeri = 300 – 900 mg setiap 4 – 6 jam, maksimum 4 gram sehari (BNF, 2014).

$$\text{HED asetosal} = \frac{500 \text{ mg}}{60} = 8,3 \text{ mg/kg}$$

Dosis pada mencit:

$$= \text{HED (mg)} \times \frac{\text{Km pada manusia}}{\text{kg} \quad \text{Km pada hewan coba}}$$

$$= 8,3 \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) \times \frac{37}{3} = 102 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \quad \text{BB}$$

Didapatkan hasil 102 mg/kg, maka di bulatkan menjadi 100 mg/kg untuk memudahkan perhitungan dosisnya.

senyawa uji yang digunakan adalah 100 mg/kg BB, 50 mg/kg B B, 25 m g/kg B B. B erat m encit y ang a kan digunakan a dalah 2 0-30 gram. Jika menggunakan b obat m encit 30 gram maka perhitungan dosisnya adalah:

1. 100 mg/kg x 0,03 kg (BB m encit) = 3 mg
2. 50 mg/kg x 0,03 kg (BB m encit) = 1,5 mg
3. 25 mg/kg x 0,03 kg (BB m encit) = 0,75 mg

4.7.5. Pembuatan Suspensi Senyawa Uji

Untuk pe mbuatan sediaan uji yang di gunakan a dalah asam 2 -(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat da n a setosal sebagai s ediaan pe mbanding. P embuatan s uspensi s ediaan harus ba ru di buat sebelum perlakuan di laksanakan ka rena tidak dapat d i s impan pada ja ngka w aktu y ang l ama. Senyawa uji menggunakan 3 dosis y aitu 25 mg/kg BB, 50 mg/kg B B, da n 1 00 m g/30 gr am B B, maka d osis y ang diberikan adalah 0,75 mg/30g BB, 1,5 mg/30g BB, dan 3,0 mg/30g BB.

I. Dosis 25 mg/30g BB

Untuk pembuatan suspensi larutan senyawa uji dengan dosis 25 m g/30g B B, di timbang 50 m g C MC-Na da n dispersikan ke dalam aqua pro injeksi panas \pm 3 mL dan

gerus ad mucilago. Setelah itu timbang senyawa uji sebanyak 25 mg dan suspensikan dalam larutan CMC-Na dan gerus ad homogen. Terakhir ditambahkan aqua pro injeksi ad 10 mL. Kemudian dari sediaan ini diambil 0,3 mL dan diberikan secara injeksi intraperitoneal (i.p) pada mencit (*Mus musculus*).

II. Dosis 50 mg/30g BB

Untuk pembuatan suspensi larutan senyawa uji dengan dosis 50 mg/30g BB, ditimbang 50 mg CMC-Na dan dispersikan ke dalam aqua pro injeksi panas \pm 3 mL dan gerus ad mucilago. Setelah itu timbang senyawa uji sebanyak 50 mg dan suspensikan dalam larutan CMC-Na dan gerus ad homogen. Terakhir ditambahkan aqua pro injeksi ad 10 mL. Kemudian dari sediaan ini diambil 0,3 mL dan diberikan secara injeksi intraperitoneal (i.p) pada mencit (*Mus musculus*).

III. Dosis 100 mg/30g BB

Untuk pembuatan suspensi larutan senyawa uji dengan dosis 100 mg/30g BB, ditimbang 50 mg CMC-Na dan dispersikan ke dalam aqua pro injeksi panas \pm 3 mL dan gerus ad mucilago. Setelah itu timbang senyawa uji sebanyak 100 mg dan suspensikan dalam larutan CMC-Na dan gerus ad homogen. Terakhir ditambahkan aqua pro injeksi ad 10 mL. Kemudian dari sediaan ini diambil 0,3 mL dan diberikan secara injeksi intraperitoneal (i.p) pada mencit (*Mus musculus*).

4.7.6 Pemberian Senyawa Uji

Volume pemberian s enyawa u ji d an s enyawa pembanding yang di berikan ke pada mencit sesuai de ngan dosis y ang di tentukan, da n da pat di hitung menggunakan rumus berikut:

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

Jika berat mencit adalah 30,0 gram

- Untuk dosis 25 mg/kg BB (0,75 mg), volume sediaan yang di injeksikan:

$$\frac{0,75 \text{ mg}}{2,5 \text{ mg/ mL}} = 0,3 \text{ mL}$$

- Untuk dosis 50 mg/kg BB (0,75 mg), volume sediaan yang di injeksikan:

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

- Untuk dosis 100 mg/kg BB (0,75 mg), volume sediaan yang di injeksikan:

$$\frac{3,0 \text{ mg}}{10 \text{ mg/ mL}} = 0,3 \text{ mL}$$

4.7.7 Pelaksanaan Uji Aktivitas

Mencit de ngan b obot t ertentu di beri s ediaan uji d osis 100 mg/kg B B, 50 mg/kg BB , 25 mg/kg BB s e cara intraperitoneal. Setelah 2 0 m enit pemberian sediaan o bat, mencit di suntik de ngan l arutan as am as etat glisial 0,6% volume 0,02 ml/g BB s e cara intraperitoneal, dan diamati 5 menit kemudian respon nyeri dari mencit yang berupa geliat

selama 30 menit, sehingga di peroleh data frekuensi geliat kelompok kontrol, senyawa pembanding, dan senyawa uji. Dari data penelitian kemudian dihitung nilai persentase hambatan nyeri dari tiap-tiap dosis

4.8 Analisis Data

4.8.1 Penentuan Persen Hambatan Nyeri

Persen hambatan nyeri di peroleh dari data frekuensi geliat yang kemudian di lakukan perhitungan melalui perbandingan antara kelompok yang di beri senyawa obat (kelompok senyawa uji dan kelompok senyawa pembanding) terhadap kelompok yang tidak di beri senyawa obat (kelompok kontrol) dengan rumus sebagai berikut (Domer, 1971).

$$\% \text{ hambatan nyeri} = 100 \% - \left(\frac{\sum \text{rata-rata frekuensi geliat kelompok uji}}{\sum \text{rata-rata frekuensi geliat kelompok kontrol}} \times 100 \% \right)$$

Sehingga akan di peroleh aktivitas hambatan nyeri berupa persen dari senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi) benzoat dan senyawa pembanding asetosal.

4.8.2 Uji Anova

Uji anova di lakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol.

Dengan menggunakan uji anova satu arah, pada $\alpha = 0,05$ dengan hipotesis sebagai berikut:

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

H_a = ada perbedaan yang bermakna pada frekuensi geliat antar kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol (Rice, 1995)

Data yang diperoleh dari uji aktivitas dengan tiga dosis berbeda dari senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, senyawa pembanding (asetosal) dan kontrol (CMC-Na 0,5%), kemudian diolah secara statistik dengan bantuan program komputer SPSS 17.0, 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 persentase hambatan nyeri dari tiap-tiap dosis. Persen hambatan nyeri asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

f_k

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

f_k = frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol

4.8.3. Penentuan ED₅₀

Aktivitas analgesik untuk tiap senyawa dinyatakan dalam ED₅₀. ED₅₀ adalah dosis efektif yang menghasilkan hambatan nyeri sebesar 50% pada populasi, kemudian digambarkan dengan kurva hubungan antara dosis dan % hambatan nyeri. Kurva tersebut diperoleh dari analisis regresi dosis sebagai sumbu x yang merupakan variabel bebas yaitu log dosis dan % hambatan nyeri sebagai y yang merupakan variabel tergantung (Lien, 1987).

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

$$y = bx + a$$

ED₅₀ dapat dihitung dengan rumus :

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

$$ED_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Sintesis Senyawa Turunan Asam Salisilat

Hasil reaksi salisilat antara asam salisilat dengan 3,4-diklorobenzoil klorida di peroleh senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat berupa kristal putih yang tidak larut dalam air dan dapat larut dalam aseton dan etanol. Berat senyawa hasil sintesis sebesar 2,6498 gram dengan presentase hasil sebesar 68,14%. Perhitungan persentase hasil dapat dilihat pada lampiran 1.

5.2 Analisis senyawa Hasil Sintesis

5.2.1 Pemeriksaan Organoleptis

Hasil pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan Organoleptis	Hasil Pengamatan
Bentuk	Kristal
Warna	Putih
Bau	Tidak Berbau

5.2.2 Uji Kemurnian dengan Penentuan Jarak Lebur

Hasil pemeriksaan jarak lebur senyawa hasil sintesis dengan menggunakan *Mel-Temp Electrothermal* dan didapatkan hasil seperti yang tercantum pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Pemeriksaan Jarak Lebur

Replikasi	Hasil Pengamatan Jarak Asam salisilat (°C)	Hasil Pengamatan Jarak Lebur Senyawa Hasil Sintesis (°C)
I	157-159	170-172
II	157-159	170-172
III	157-159	175-177

Senyawa hasil sintesis memiliki rentang jarak lebur tidak lebih dari 2,0 °C. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis murni secara jarak lebur.

5.2.3 Uji Kemurnian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil pemeriksaan dengan KLT menggunakan tiga fase gerak yang berbeda ke polarannya berupa nilai R_f, dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Nilai R_f Senyawa Hasil Sintesis dengan Asam Salisilat

Fase gerak	Nilai R _f	
	Senyawa hasil sintesis	Asam salisilat
n-heksan : kloroform (4:6)	0,76	0,75
kloroform : aseton (6:4)	0,65	0,63
n-heksan : aseton (7:3)	0,83	0,74

keterangan :

Nilai Rf = $\frac{\text{Jarak tempuh senyawa uji}}{\text{Jarak tempuh fase gerak}}$

Fase diam : silika gel 60 GF₂₅₄
 Penampak noda : lampu uv 254 nm
 Pelarut : THF

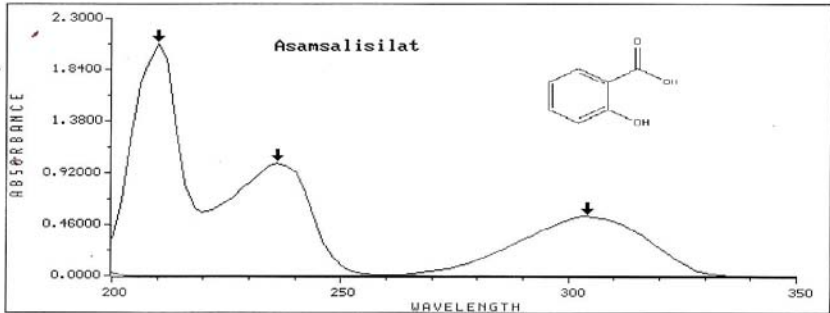
Hasil pemeriksaan dengan KLT menggunakan tiga fase gerak yang berbeda ke polarannya di hasilkan satu noda tunggal pada lembaran KLT. Hal ini menunjukkan senyawa hasil sintesis murni secara KLT.

5.3 Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

5.3.1 Identifikasi Struktur dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS

Spektrum ultraviolet asam salisilat dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada gambar 5.1 dan 5.2.

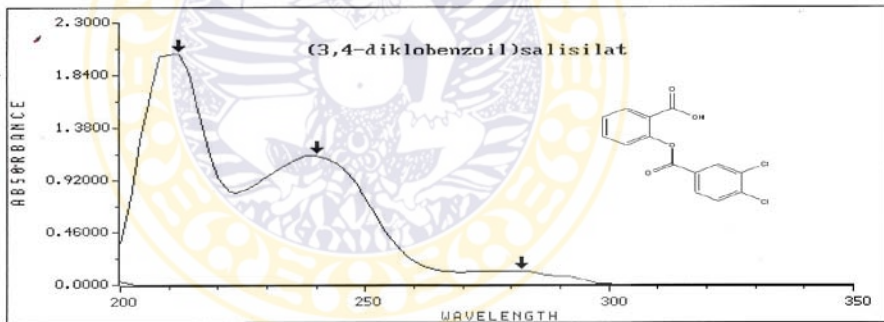
Senyawa hasil sintesis dalam etanol memberikan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 212 nm dan panjang gelombang asam salisilat 210 nm. Dari spektrum asam salisilat dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat adanya pergeseran puncak serapan dari senyawa turunan asam salisilat. Hal ini menunjukkan sudah terjadi perubahan struktur pada senyawa hasil sintesis.



Marked Wavelengths

Reg B: L 210 = 2.0659
 Reg B: L 236 = 1.0027
 Reg B: L 304 = 0.53148

Gambar 5.1 Spektra UV-Vis Asam salisilat dalam pelarut Etanol.



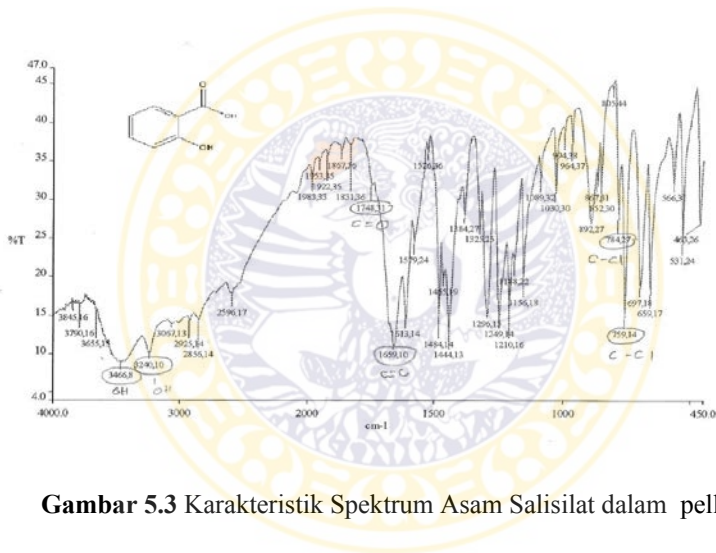
Marked Wavelengths

Reg B: L 212 = 2.0297
 Reg B: L 240 = 1.1416
 Reg B: L 282 = 0.12376

Gambar 5.2 Spektra UV-Vis Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dalam pelarut Etanol.

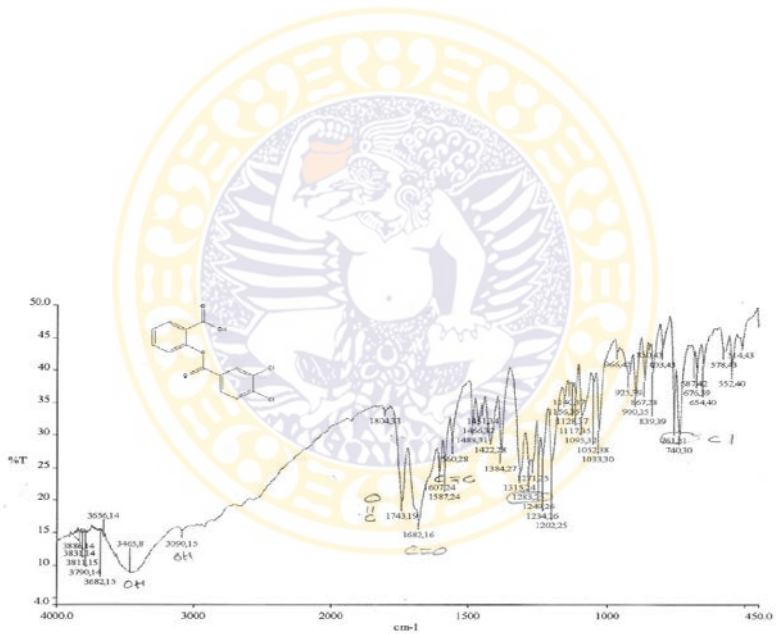
5.3.2 Identifikasi Struktur dengan Metode Spektrofotometri Infra Merah (IR)

Spektrum infra merah asam salisilat dalam pellet KBr dapat dilihat pada gambar 5.3 dan spektrum dari senyawa hasil sintesis dengan KBr dapat dilihat pada gambar 5.4. Karakteristik asam salisilat dan senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada tabel 5.4.



Gambar 5.3 Karakteristik Spektrum Asam Salisilat dalam pellet

Senyawa	Senyawa	Gugus fungsi	Pustaka
Asam salisilat	hasil sintesis		(Pavia, 2009)



Gambar 5.4 Karakteristik Spektrum Senyawa Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dalam pellet KBr

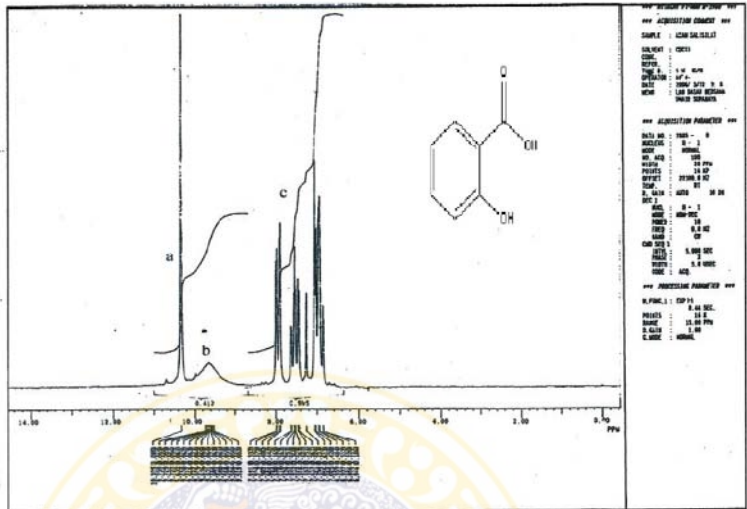
Tabel 5.4 Tabel karakteristik Spektra Inframerah Senyawa asam salisilat dan Senyawa hasil sintesis

3466	-	OH (fenolik)	
2925	3465	OH (karboksilat)	3400-2400
1922	1587	C=C (aromatis)	1450-1600
1943	1743	C=O (karboksilat)	1725-1700
-	1682	C=O (ester)	1750-1730
-	1283	C-O (ester)	1300-1000
-	761	C-Cl (klorida)	785-540

Data di atas menunjukkan bahwa spektra inframerah senyawa hasil sintesis memiliki gugus fungsi yang berbeda dari asam salisilat. Pada senyawa hasil sintesis membuktikan bahwa adanya penambahan gugus ester pada 1283 cm^{-1} dan C=O karbonil ester 1682 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan ada perbedaan karakteristik dari senyawa sintesis dan senyawa pereaksi (asam salisilat). Selain itu, perbedaan pada daerah 3466 cm^{-1} hanya ada dimiliki oleh senyawa pereaksi dan tidak dimiliki oleh senyawa hasil sintesis.

5.3.3 Identifikasi Struktur Metode dengan Spektrometri $^1\text{H-NMR}$

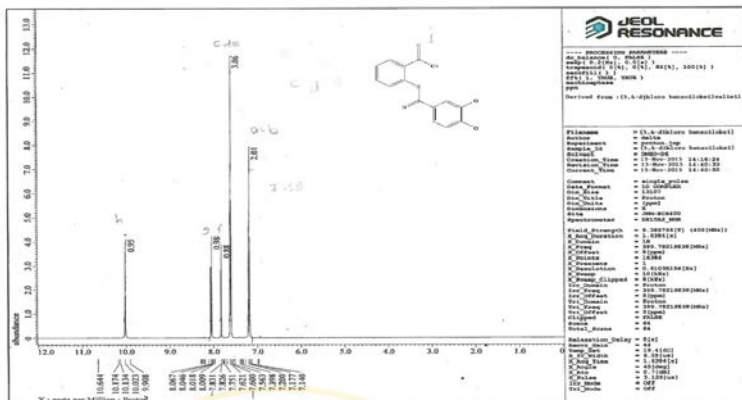
Spektrum resonansi magnetik dari senyawa asam salisilat dan hasil sintesis dapat dilihat pada gambar 5.5 dan 5.6.



Gambar 5.5 Spektrum ¹H-NMR Senyawa Asam Salisilat dalam pelarut DMSO-D₆

Tabel 5. 5 Tabel k arakteristik S pektra ¹H-NMR Senyawa Asam Salisilat

δ (ppm)	Atom H pada	Multiplitas
10,32	COOH	Singlet
9,64	OH (fenolik)	singlet
6,93 – 7,97	C=C (aromatis)	multiplet



Gambar 5 .6 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa H asil Sintesis dalam pelarut DMSO-D_6

Tabel 5.6 Karakteristik Spektra $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Hasil Sintesis

δ (ppm)	Atom H pada	Jumlah atom H	Multiplitas
7,147-7,200	C=H-benzena	2	Multiplet
7,563-7,621	C=H-benzena	3	Multiplet
7,696-7,821	C=H-benzena	1	Multiplet
7,977-8,299	C=H-benzena	1	Doublet
10,02	COOH	1	Singlet

Data $^1\text{H-NMR}$ di atas menunjukkan bahwa ada perbedaan jumlah H pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ asam salisilat dengan senyawa sintesis. Asam salisilat memiliki 4 atom H dan senyawa sintesis memiliki 7 atom H. $^1\text{H-NMR}$ asam salisilat menunjukkan adanya puncak spesifik pada 10.32 yang menunjukkan adanya puncak fenolik (-OH) sedangkan pada senyawa hasil sintesis puncak ini tidak ada. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis mempunyai perbedaan struktur dengan asam salisilat.

5.4 Uji Aktivitas Analgesik

5.4.1 Penentuan Frekuensi Geliat

Hasil pengamatan frekuensi geliat yang terjadi akibat induksi nyeri larutan asam asetat 0,6% dengan dosis 0,02 mg/g BB setelah 20 menit pemberian senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dengan dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB, senyawa pembanding setosal dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB, dan kontrol mucilago CMC-Na 0,5% dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7 Frekuensi Geliat pada Kelompok Uji Asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dan Kelompok Kontrol Mucilago CMC-Na 0,5%

No Me ncit	Frekuensi geliat pada kelompok senyawa uji							
	ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA							
	Dosis senyawa uji (mg/Kg BB)				Kelompok kontrol CMC-Na 0,5%			
	25	50	100	125	25	50	100	125
1	54	42	30	6	74	92	74	92
2	62	33	20	18	102	85	102	85
3	57	31	24	11	82	88	85	88
4	66	36	21	15	92	85	66	85
5	65	33	20	12	85	102	70	102
6	60	37	22	12	88	82	82	82
Rat a - rata	60,6	35,5	22,8	12,3	87,0	86,0	79,0	89

Tabel 5.8 Frekuensi Geliat Pada Kelompok Senyawa
Pembanding asetosal dan Kelompok Kontrol
Musilago CMC-Na 0,5%

No mencit	Frekuensi geliat pada kelompok pembanding asetosal			
	Dosis senyawa pembanding asetosal (mg/kg BB)			Kelompok kontrol CMC- Na 0,5%
	25	50	100	
1	65	35	20	74
2	62	38	19	102
3	59	31	27	85
4	64	33	21	66
5	58	36	24	70
6	61	40	29	82
Rata-rata	61,5	37,1	23,3	79,8

Hasil dari tabel 5.8 frekuensi geliat di atas menunjukkan bahwa frekuensi geliat pada kelompok senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan frekuensi geliat pada kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat memiliki aktivitas analgesik dan dapat dilihat dengan penurunan frekuensi geliat.

5.4.2 Analisis Data dengan Uji ANOVA

Uji ANOVA satu arah (*one way*) dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antara kelompok uji, pembanding, dan kontrol pada $\alpha = 0,05$. Dari hasil perhitungan secara statistik diperoleh nilai F hitung = 223,554 dan nilai P = 0.00 ($P < \alpha$). Nilai $P < \alpha$ (0,05) berarti ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna di antara kelompok uji 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, ke kelompok pembanding (asetosal), dan kelompok kontrol (CMC-Na 0,5%)

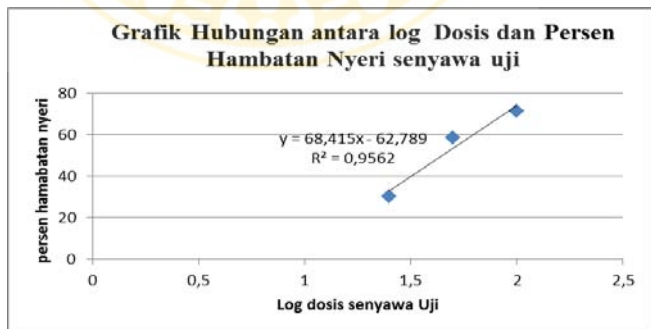
5.4.3 Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri

Berdasarkan data frekuensi geliat ke kelompok uji 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, ke kelompok pembanding asetosal, dapat di hitung persentase hambatan nyeri masing-masing kelompok yang dapat dilihat di lampiran. Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri dapat dilihat pada tabel 5.9.

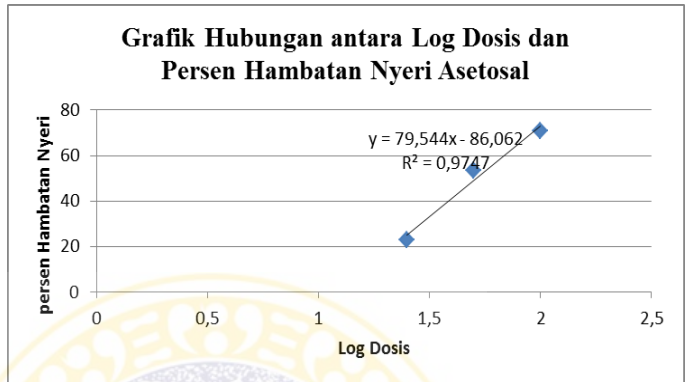
Tabel 5.9 Persentase Hambatan Nyeri Kelompok Senyawa uji 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, dan Kelompok Senyawa Pembanding Asetosal.

Dosis (mg/kg BB)	Rata-rata frekuensi geliat		% Hambatan nyeri	
	2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat	Asetosal	2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat	Asetosal
25	60,6	61,5	31,3	40,7
50	35,3	37,1	58,9	64,5
100	22,8	23,3	71,1	76,1

Berdasarkan data diatas dibuat kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri untuk senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, dan s enyawa p em-banding asetosal, dapat dilihat pada gambar 5.7 dan 5.8.



Gambar 5.7 Grafik Hubungan antara log Dosis dan Persen Hambatan Nyeri Senyawa UJI



Gambar 5.8 Grafik Hubungan antara log Dosis dan Persen Hambatan Nyeri Asetosal

Tabel 6.0 ED₅₀ Aktivitas Analgesik Senyawa Asam 2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)benzoat dan Asetosal

Senyawa	ED ₅₀
Asam 2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)benzoat	44,52
Asetosal	51,35

BAB 6

PEMBAHASAN

Modifikasi s truktur t urunan s alisilat di lakukan untuk mendapatkan s enyawa baru yang memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar yaitu dengan memasukkan gugus-gugus yang memiliki s ifat l ipofilik, e lektronik dan s terik pada posisi tertentu pa da struktur pe nuntun. Untuk m emberikan a ktivitas harus dapat menembus m embran bbi ologis dan m encapai jaringan target da lam jum lah y ang cukup untuk menimbulkan suatu aktivita

Pada p enelitian i ni t elah d ilakukan s intesis s enyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat melalui reaksi asilasi yaitu an tara asam s alisilat d an 3,4-diklorobenzoil kl orida. Modifikasi s truktur bertujuan m enghasilkan s enyawa yang memiliki a ktivitas a nalgesik y ang l ebih t inggi d an t oksisitas yang lebih rendah dari asetosal. Metode yang digunakan dalam sintesis ini adalah metode esterifikasi yang telah dimodifikasi yaitu m enggunakan pelarut t etrahidrofuran da n ba sa piridin sebagai katalisator dan penangkap HCl yang terbentuk dalam proses reaksi yang terjadi. Rekrystalisasi senyawa hasil sintesis dilakukan de ngan menggunakan metanol pa nas unt uk mendapatkan hasil sintesis yang murni. Dari sintesis yang telah dilakukan, diperoleh persentase hasil sintesis senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat sebesar 68,14%. Hasil yang didapatkan lebih besar dari 50%. Hal ini berarti bahwa metode reaksi y ang dipakai m emenuhi pe rsyaratan. Perhitungan

persentase hasil sintesis senyawa dapat dilihat pada lampiran 1.

Sebagai langkah awal dalam penelitian, senyawa yang diperoleh di periksa secara kualitatif dengan pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis berupa kristal berwarna putih, tidak berbau dan tidak larut dalam air, tetapi larut dalam aseton, etanol, dan metanol. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan senyawa asam salisilat secara organoleptis.

Kemurnian senyawa hasil sintesis di uji dengan cara melakukan penentuan uji KLT dan jarak l ebur. Uji KLT dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa pengotor pada senyawa hasil sintesis. Uji kemurnian dengan KLT menggunakan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase geraknya dan digunakan 3 macam komposisi yaitu fase gerak 1 campuran n-heksan : kloroform (4:6), fase gerak 2 campuran kloroform : aseton (6:4) dan fase gerak 3 campuran n-heksan : aseton (7:3), yang berbeda kepolarannya dan noda diamati pada penampakan lampu UV 254 nm. Pada masing-masing lempeng KLT menunjukkan noda yang dihasilkan senyawa hasil sintesis adalah satu noda tunggal. Hasil KLT menunjukkan bahwa Rf senyawa hasil sintesis lebih besar daripada asam salisilat, hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis sudah berbeda dengan senyawa asam salisilat dan lebih lipofil daripada aseton karena adanya penambahan gugus 3,4-diklorobenzoil klorida, sehingga dapat disimpulkan

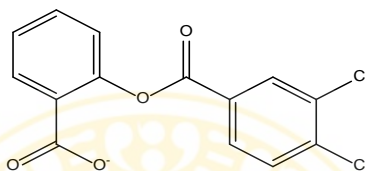
bahwa senyawa hasil sintesis telah murni secara KLT. Penentuan jarak lebur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan *Mel-Temp Electrothermal*. Jarak lebur senyawa hasil sintesis adalah 170-172 °C dengan rentang tidak lebih dari 2,0 °C (Pavia, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis murni secara jarak lebur. Seterusnya dilanjutkan pada tahap identifikasi struktur dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, Inframerah dan metode spektrometri ¹H-NMR.

Identifikasi struktur senyawa menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mengetahui nilai panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dari senyawa. Pada pemeriksaan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dengan pelarut etanol dihasilkan spektrum senyawa hasil sintesis yang memberikan satu puncak pada panjang gelombang 212 nm. Hasil Spektrum UV senyawa hasil sintesis kemudian dibandingkan dengan spektrum UV asam salisilat yang mempunyai puncak pada panjang gelombang 210 nm. Hasil spektrum dari kedua senyawa tersebut dapat dilihat adanya pergeseran puncak serapan, yang berarti telah terjadi perubahan struktur karena adanya penambahan gugus 3,4-diklorobenzoil klorida. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan asam salisilat, sehingga selanjutnya dilakukan konfirmasi senyawa dengan menggunakan metode spektrofotometri inframerah (IR).

Identifikasi struktur senyawa dengan metode spektrofotometri inframerah (IR) dilakukan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi yang dimiliki oleh senyawa uji. Asam salisilat dan senyawa hasil sintesis memiliki gugus fungsi yang spesifik yang akan memberikan serapan pada bilangan gelombang tertentu. Asam salisilat memiliki gugus -OH fenolik yang memberikan serapan pada bilangan gelombang 3466 cm^{-1} , dan $\text{C}=\text{O}$ karbonil yang memberikan serapan pada bilangan gelombang 1743 cm^{-1} dan senyawa hasil sintesis memberikan serapan pada bilangan gelombang 1743 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) karbonil dan 1682 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) karbonil ester, serta 761 cm^{-1} ($\text{C}-\text{Cl}$). Hasil spektra tersebut ditampilkan pada tabel 5.4. Pada senyawa hasil sintesis ada serapan baru pada bilangan gelombang 1283 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$) ester. Hal ini menunjukkan bahwa atom H pada gugus -OH asam salisilat telah disubstitusi oleh gugus 3,4-diklorobenzoil klorida. Dan ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan asam salisilat dan pada senyawa hasil sintesis telah berhasil terbentuk gugus ester.

Identifikasi struktur dengan metode spektrometri Resonansi Magnetik Inti ($^1\text{H-NMR}$) adalah untuk mengetahui berapa jumlah atom H yang terdapat dalam suatu senyawa. Hasil spektrometer $^1\text{H-NMR}$ pada tabel 5.5 dan 5.6 menunjukkan ada puncak spesifik pada $9,64$ yang menunjukkan adanya puncak fenolik (-OH) sedangkan pada senyawa hasil sintesis puncak ini tidak nampak. Hal ini

menunjukkan jumlah atom H yang ada pada senyawa hasil sintesis adalah 7 atom H dan asam salisilat memiliki 4 atom H. Perbedaan atom H tersebut menunjukkan bahwa struktur senyawa hasil sintesis berbeda dengan asam salisilat, maka dapat diketahui senyawa hasil sintesis memiliki struktur seperti pada gambar 6.1 berikut ini:



Gambar 6.1: Struktur senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

Tahap berikutnya dari penelitian ini adalah melakukan uji aktivitas analgesik senyawa hasil sintesis pada mencit (*Mus musculus*) dengan metode *Writhing test* dan seterusnya dibandingkan dengan aktivitas analgesik senyawa pembanding yaitu asetosal. Pada uji aktivitas analgesik, senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat akan diinjeksikan secara intraperitoneal pada 20 menit sebelum induksi nyeri dengan tujuannya agar senyawa dapat diabsorpsi terlebih dahulu, kemudian pengamatan dilakukan selama 30 menit setelah selang 5 menit diberikan asam asetat glasial 0,6%. Aktivitas hambatan nyeri ditentukan dengan cara mengamati penurunan frekuensi geliat dari senyawa uji dan senyawa pembanding dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Uji ANOVA (*one way anova*) dengan program komputer SPSS, dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat, ke kelompok pembanding asetosal dan ke kelompok kontrol CMC-Na 0,5%. Hasil perhitungan ANOVA (lampiran 4) diperoleh harga F hitung = 223,554 dan harga P = 0,000 sehingga $P < \alpha$. Nilai $P < \alpha$ (0,05) berarti adanya perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol. Selanjutnya dapat dihitung persentase hambatan nyeri untuk setiap kelompok dosis.

Berdasarkan hasil penelitian, pada dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB), Senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat menunjukkan frekuensi geliat yang lebih kecil daripada asetosal. Hal ini berarti bahwa senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih besar daripada asetosal. Selanjutnya dilakukan perhitungan persentase hambatan nyeri pada dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 30,3%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 58,9%, dan pada dosis 100 mg/kg BB sebesar 71,5%. Senyawa pembanding asetosal pada dosis 25 mg/kg BB mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 22,9%, pada dosis 50 mg/kg BB sebesar 53,5%, dan pada dosis

100 mg/kg BB sebesar 70,8%. Berdasarkan data tersebut dapat dibuat kurva hubungan antara dosis dengan % hambatan nyeri untuk senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dan senyawa pembanding asetosal. Hasil persentase hambatan nyeri senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat lebih besar dibandingkan dengan asetosal. Penentuan ED_{50} dapat dihitung berdasarkan data dosis dan persentase hambatan nyeri melalui analisis regresi linier antara dosis terhadap persentase hambatan nyeri. Hasil penentuan ED_{50} , senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai ED_{50} sebesar 44,52 mg/kg dan senyawa pembanding asetosal mempunyai ED_{50} sebesar 51,35 mg/kg. Berdasarkan hasil tersebut, maka senyawa uji asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dapat dinyatakan aktif sebagai analgesik dan aktivitas analgesiknya lebih besar dibanding asetosal.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat diambil adalah :

1. Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat dapat disintesis melalui reaksi esterifikasi antara asam salisilat dan 3,4-diklorobenzoil klorida dengan persentase hasil sebesar 68,14%.
2. Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat mempunyai efek analgesik pada mencit (*Mus musculus*) yang lebih besar dibandingkan asetosal.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji toksisitas, stabilitas, dan sifat farmakokinetika asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat.

DAFTAR PUSTAKA

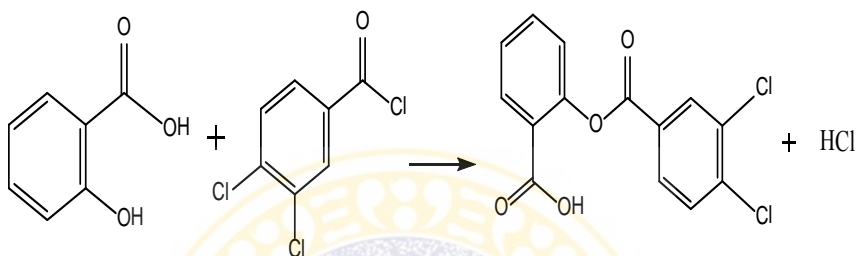
- BNF, 2014. *British National Formulary*, 68th Edition, London: BMJ Group and The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, p.369-370.
- Budavari S. et. al. 1989. *The Merck Index*, Fourteenth Edition. USA: Merck & Co Inc.
- Diyah, N. W., Purwanto, B.T. dan Susilowati, R., 2002. *Uji aktivitas analgesik senyawa asam O-(4-butilbenzoi)salisilat hasil sintesis pada mencit (Mus musculus)*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
- Dipiro, JT. Talbert RL, Hayes PE, and Posey MLm Eds., 2011. *Pharmacotherapy A pathophysiologic Approach*, 8th Edition., Philadelphia, Toronto: J.B. Lippincott Company
- Fessenden, R. J. Dan Fessenden, J.S., 1997. *Dasar-dasar Kimia Organik*. Jilid 2, Edisi ke tiga. Terjemahan S. Maun. Binarupa Aksara, Jakarta: Hal 108-111, 436-440
- Ganellin, R.C, Robert, S.M., 1999. *Medicinal Chemistry The Role of Organic Chemistry in Drug Research* 2nd Edition. London: Academic Press Harcourt Brace Jovanovich Publisher, Hal. 123
- Gunawan. 2007. Hubungan tingkat Pengetahuan Tentang Informed Consent dengan tingkat Kecemasan Pasien Pre-operasi di Instalasi Rawat Inap BP RSUD Kraton perkalongan, 46

- Guyton, A.C, Hall, J.E., 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9, Jakarta: EGC, Hal. 208-212, 219-223, 277-282, 285-287
- Hartwig, Mary, S., Wilson, Loraine, M., 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6, Vol 1, Jakarta: EGC, Hal. 1063-1069
- Hite, Gilbert, J., 1995. Analgetika, dalam prinsip-prinsip Kimia Medisinal, Jilid I, edisi kedua, Yogyakarta: Gajah mada University Press, Hal 483
- Kar, A., 2006. *Pharmaceutical Drug Analysis* 2nd Edition. New Delhi New Age Internasional Publisher, Hal 275
- Lien EJ. SAR., 1987. *Side Effect and Drug Design*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Pavia, L. D., 2009. *Introduction to Spectroscopy A Guide For Student of Organic Chemistry* 4th Edition. Departement of Chemistry Western. Washington University, Bellingham, Washington, Hal 16-86
- Reagen Shaw et al., 2007. Dose Translation from animal yo Human Studies Revisited. Pubmed
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942826>
- Rice, A.J., 1995. *Mathematical Statistic and Data Analysis*. 2nd Ed. California: Internasional Thompson Publishing, Hal. 443
- Szczeklik, Andrew., 2006. *The History of Aspirin: The discoveries that Changed Contemporary Medicine*
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2008. *Kimia Medisinal 1*. Surabaya: Airlangga University Press, Hal 9-13

- Siswandono dan Soekardjo, B., 2008. *Kimia Medisinal 2*.
Surabaya: Airlangga University Press, Hal 283,291,
295-297
- Silverstein R. M., 2005. *Spectroscopy of Organic Compound*
4th Edition. New York: John Wiley and Sons Inc,
Hal 72-108, 127-176
- Tjay, T.H., Rahardja, K., 2007. *Obat-obat Penting*
Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta:
Hal 312-320
- Turner, Robert. A., 1968. *Screening Methods in*
Pharmacology. Chapter 8 Analgesics. Hal 100-117
- Vogel, G.H., 2002. *Drug Discovery and Evaluation* 2nd
Edition. New York: Springer-Verlag Berlin
Heidelberg, Hal 725-751
- Willette, R.E. 1991. *Medicinal and Pharmaceutical*
Chemistry 9th Edition. Philadelphia: Lippincott, Hal
656-662
- Watson, D.G., 2007. *Analisis Farmasi Buku Ajar untuk*
Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi.
Diterjemahkan oleh Winny R. Syarif. Jakarta:
EGC. Hal 183

LAMPIRAN 1

PERHITUNGAN PERSENTASE HASIL SINTESIS



0,015 mol
2,072 gram

0,0125 mol
2,618 gram

0,0125 mol
3,8875

Berat molekul

2-(3',4'- diklorobenzoiloksi)benzoat = 311.0

Berat senyawa secara teoritis (0,0125) = 311.0 x 0,0125 = 3,8875 g

Berat senyawa hasil sintesis = 2,649 g

Persentase hasil = $\frac{2,649}{3,8875} \times 100\% = 68,14\%$

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN % HAMBATAN NYERI

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{fk - fr}{fk} \times 100\%$$

Keterangan :

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

fk = frekuensi geliat rata-rata kelompok kontrol

A. Senyawa asam 2-(3',4'-diklorobenzoiloksi)benzoat

1. Dosis 25 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(87,00 - 60,60)}{87,00} \times 100 \% = 31,3\%$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(86,00 - 35,30)}{86,00} \times 100 \% = 58,9 \%$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(79,00 - 22,8)}{79,00} \times 100 \% = 71,1\%$$

B. Senyawa Asetosal

1. Dosis 25 mg/kg BB

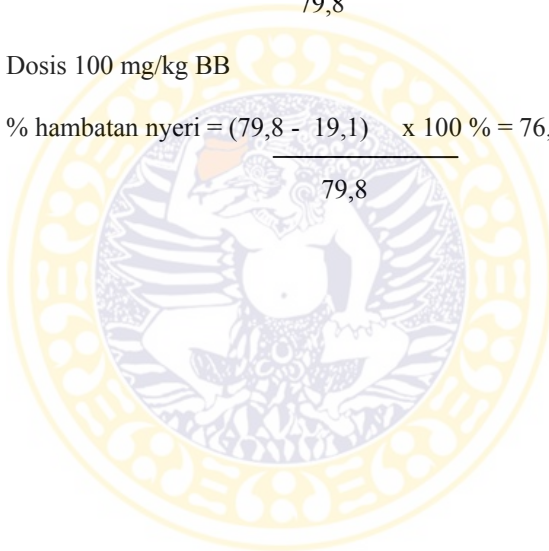
$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(79,8 - 47,3)}{79,8} \times 100 \% = 40,7 \%$$

2. Dosis 50 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(79,8 - 28,3)}{79,8} \times 100 \% = 64,5 \%$$

3. Dosis 100 mg/kg BB

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{(79,8 - 19,1)}{79,8} \times 100 \% = 76,1 \%$$



LAMPIRAN 3

TABEL STATISTIKA

T A B L E 5 (Continued)

Percentiles of the F Distribution: $F_{98}(n_1, n_2)$

n_1 = degrees of freedom for numerator

n_1	n_2																		
n_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

LAMPIRAN 4

Hasil Perhitungan ANOVA danLSD

Antara Kelompok Dosis Senyawa

Uji Asam 2-(3',4'-diklorobenzoil

oksi)benzoat Dengan Kelompok

Dosis Senyawa Pembeding

Asetosal, Serta Dengan Kelompok

Kontrol CMC--Na 0,5%

Descriptives

frek

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimu m	Maximu m
					Lower Bound	Upper Bound		
					Uji 25	6		
Uji 50	6	28.50	2.739	1.118	25.63	31.37	25	32
uji 100	6	19.33	3.266	1.333	15.91	22.76	15	24
asetosal 25	6	61.50	2.739	1.118	58.63	64.37	58	65
asetosal 50	6	35.50	3.271	1.335	32.07	38.93	31	40
asetosal 100	6	23.33	4.033	1.647	19.10	27.57	19	29

kontrol	6	91.17	5.636	2.301	85.25	97.08	85	101
Total	42	45.02	24.468	3.776	37.40	52.65	15	101

ANOVA

frek

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24070.143	6	4011.690	294.462	.000
Within Groups	476.833	35	13.624		
Total	24546.976	41			

Multiple Comparisons

frek

LSD

(I) dosis	(J) dosis	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Uji 25	Uji 50	27.333*	2.131	.000	23.01	31.66
	uji 100	36.500*	2.131	.000	32.17	40.83
	asetosal 25	-5.667*	2.131	.012	-9.99	-1.34
	asetosal 50	20.333*	2.131	.000	16.01	24.66
	asetosal 100	32.500*	2.131	.000	28.17	36.83
	kontrol	-35.333*	2.131	.000	-39.66	-31.01

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Uji 50	Uji 25	-27.333*	2.131	.000	-31.66	-23.01
	uji 100	9.167*	2.131	.000	4.84	13.49
	asetosal 25	-33.000*	2.131	.000	-37.33	-28.67
	asetosal 50	-7.000*	2.131	.002	-11.33	-2.67
	asetosal 100	5.167*	2.131	.021	.84	9.49
	kontrol	-62.667*	2.131	.000	-66.99	-58.34
uji 100	Uji 25	-36.500*	2.131	.000	-40.83	-32.17
	Uji 50	-9.167*	2.131	.000	-13.49	-4.84
	asetosal 25	-42.167*	2.131	.000	-46.49	-37.84
	asetosal 50	-16.167*	2.131	.000	-20.49	-11.84
	asetosal 100	-4.000	2.131	.069	-8.33	.33
	kontrol	-71.833*	2.131	.000	-76.16	-67.51
asetosal 25	Uji 25	5.667*	2.131	.012	1.34	9.99
	Uji 50	33.000*	2.131	.000	28.67	37.33
	uji 100	42.167*	2.131	.000	37.84	46.49

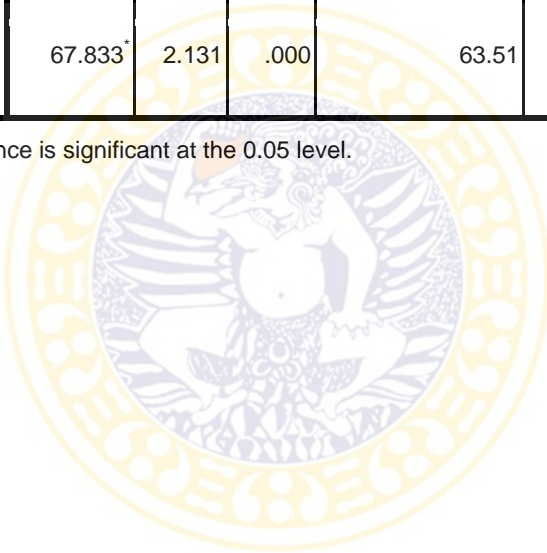
ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

asetosal 50	26.000 [*]	2.131	.000	21.67	30.33
asetosal 100	38.167 [*]	2.131	.000	33.84	42.49
kontrol	-29.667 [*]	2.131	.000	-33.99	-25.34
asetosal Uji 25 50	-20.333 [*]	2.131	.000	-24.66	-16.01
Uji 50	7.000 [*]	2.131	.002	2.67	11.33
uji 100	16.167 [*]	2.131	.000	11.84	20.49
asetosal 25	-26.000 [*]	2.131	.000	-30.33	-21.67
asetosal 100	12.167 [*]	2.131	.000	7.84	16.49
kontrol	-55.667 [*]	2.131	.000	-59.99	-51.34
asetosal Uji 25 100	-32.500 [*]	2.131	.000	-36.83	-28.17
Uji 50	-5.167 [*]	2.131	.021	-9.49	-.84
uji 100	4.000	2.131	.069	-.33	8.33
asetosal 25	-38.167 [*]	2.131	.000	-42.49	-33.84
asetosal 50	-12.167 [*]	2.131	.000	-16.49	-7.84
kontrol	-67.833 [*]	2.131	.000	-72.16	-63.51

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

kontrol	Uji 25	35.333 [*]	2.131	.000	31.01	39.66
	Uji 50	62.667 [*]	2.131	.000	58.34	66.99
	uji 100	71.833 [*]	2.131	.000	67.51	76.16
	asetosal 25	29.667 [*]	2.131	.000	25.34	33.99
	asetosal 50	55.667 [*]	2.131	.000	51.34	59.99
	asetosal 100	67.833 [*]	2.131	.000	63.51	72.16

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



LAMPIRAN 5

PAKAN HEWAN COBA

Jenis makanan berupa pellet yang dibuat berdasarkan pakan tikus standar sesuai dengan standar dari PT. Charoen Pokhamp, Sidoarjo, Indonesia. Makanan diberikan secara ad libitum dengan komposisi sebagai berikut :

1. Kadar air : 13% (maksimal)
2. Protein : 13 – 15%
3. Lemak : 3% (minimal)
4. Serat : 8% (maksimal)
5. Abu : 6% (maksimal)
6. Kalsium : 0,8 (maksimal)
7. Fosfor : 0,6% (maksimal)

Bahan- bahan yang dipakai berasal dari jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum, bungkil kacang tanah, canola, tepung daun, vitamin kalium, fosfat dan trace mineral.

LAMPIRAN 6
SERTIFIKAT KOMISI ETIK
PENELITIAN



KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

No : 482-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL : Sintesis Senyawa Asam 2-(4-Metoksibenzoloksi)-5-
Nitrobenzoat dan Uji Aktivitas Analgesik Terhadap
Mencit (*Mus musculus*)

PENELITI UTAMA : Nor Azrena Elena

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 9 Juli 2015

Mengetahui,
Dekan FKH-Unair,



Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 195312161978062001

Ketua,



Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 196609201992031003

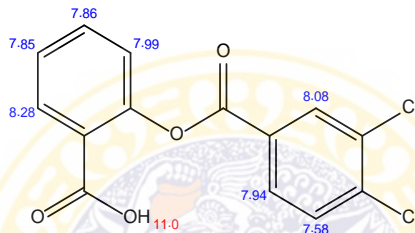
LAMPIRAN 7

PREDIKSI $^1\text{H-NMR}$

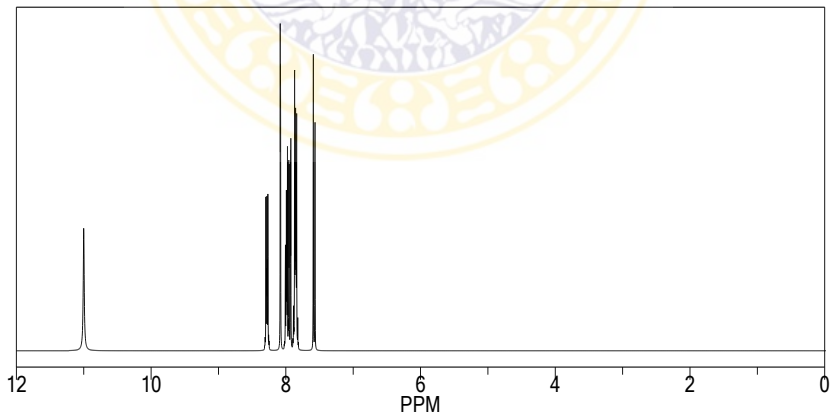
BERDASARKAN *Chemdraw Ultra*

12.0

ChemNMR ^1H Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
OH	11,0	11,00	carboxylic acid
CH	8,08	7,26	1-benzene
		0,01	1 -Cl
		-0,06	1 -Cl
		0,88	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,01	general corrections
CH	7,58	7,26	1-benzene
		-0,06	1 -Cl
		0,01	1 -Cl
		0,15	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,22	general corrections
CH	7,99	7,26	1-benzene
		-0,11	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,21	1 -C(=O)O
		0,63	general corrections
CH	8,28	7,26	1-benzene
		0,07	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,87	1 -C(=O)O
		0,08	general corrections
CH	7,94	7,26	1-benzene
		-0,12	1 -Cl
		-0,06	1 -Cl
		0,88	1 -C(=O)O-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,02	general corrections
CH	7,86	7,26	1-benzene
		0,07	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		-0,34	1 -C(=O)O
		0,19	general corrections
CH	7,85	7,26	1-benzene
		-0,10	1 -OC(=O)-1:C*C*C*C*C*C*1
		0,21	1 -C(=O)O
		0,48	general corrections

¹H NMR Coupling Constant Prediction

shift	atom index	coupling partner.	constant and vector
11,0□	20		
8,08□	13		
□	16□	1,5□□H-C*C*C-H	
7,58□	17		
□	16□	7,5□□H-C*C-C-H	
7,99□	5		
□	6□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	1□	1,5□□H-C*CH*C-H	
8,28□	2		
□	1□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	6□	1,5□□H-C*CH*C-H	
7,94□	16		
□	17□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	13□	1,5□□H-C*C*C-H	
7,86□	6		
□	5□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	1□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	2□	1,5□□H-C*CH*C-H	
7,85□	1		
□	2□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	6□	7,5□□H-C*C-C-H	
□	5□	1,5□□H-C*CH*C-H	

LAMPIRAN 8

SEBELUM DAN SESUDAH PERLAKUAN HEWAN COBA



Gambar 6.2 Gambar mencit sebelum perlakuan



Gambar 6.3 Gambar mencit setelah perlakuan

LAMPIRAN 9

PENYUNTIKAN PADA MENCIT SECARA INTRAPERITONEAL

