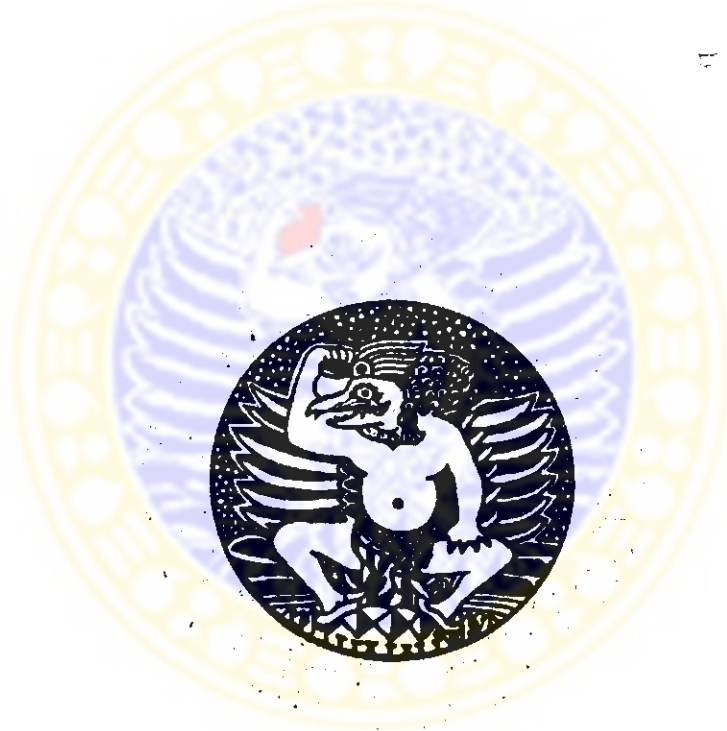


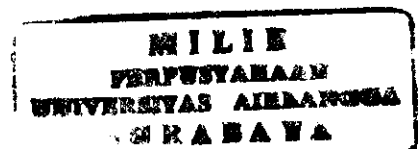
# SKRIPSI

**UMI HIDAYATUN NAFIROH**

**SINTESIS SENYAWA ASAM O-BENZOILSALISILAT  
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA  
PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*)**



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



**Lembar Pengesahan**

**SINTESIS SENYAWA ASAM O-BENZOILSALISILAT  
DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA  
PADA MENCIT (*Mus musculus*)**

**SKRIPSI**

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

**Surabaya**

**2007**

**Oleh :**

**UMI HIDAYATUN NAFIROH**

**NIM : 050110093 E**

**Skripsi ini telah disetujui**

**Tanggal 29 Januari 2007**

**Oleh :**

**Pembimbing Utama**



**Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si.**

**NIP. 132011698**

**Pembimbing Serta**



**Ir. Hj Rully Susilowati, M.S**

**NIP. 131569381**

*Dikeheningan malam....*

*Alunan dzikir panjang membelah sunyi*

*Menembus titian langit,*

*Tengadah dua insan dalam do'a panjangnya*

*Laksanakan hampan permadani nan indah*

*Tercurah kasih sayang tulus untuk amanah-Nya*

*Menumpuk harapan agar bahagia senantiasa*

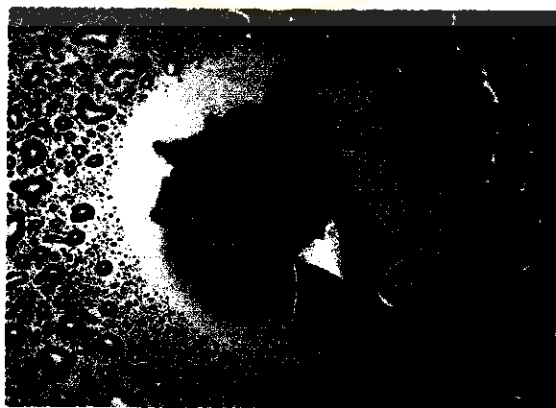
*Bersama mutiara hati.....*

*Kupersembahkan karya ini untuk*

*Dua insan yang t'lah hadirkan-koe kedunia dalam buaian cinta*

*Dan do'a tulus kasih sayangnya*

*#AYAH dan BUNDA #*



## KATA PENGANTAR

**Assalamualaikum Wr. Wb**

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul **“Sintesis senyawa Asam O-benzoilsalisilat dan uji aktivitas analgesiknya pada mencit (*Mus musculus*)”** yang diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

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

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya sehingga saya dapat mengikuti program pendidikan sarjana di Universitas Airlangga Surabaya ini.
2. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah.
3. Ibu Dra. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si., selaku pembimbing utama dan Ibu Ir. Hj. Rully Susilowati, M.S., selaku pembimbing serta yang selalu bersedia memberikan bimbingan, saran dan nasehat yang sangat berguna dalam menyusun skripsi ini.
4. Bapak Prof. Dr. GN. Astika dan Bapak Drs. Soedarto, selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk perbaikan skripsi ini.
5. Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan segenap staf pengajar dan karyawan yang telah memberikan bantuan dan fasilitas yang diperlukan.
6. Ibu Dra. Tutiek Purwanti, M. Si., selaku dosen wali atas bimbingan dan nasehat yang telah diberikan kepada penulis.

7. Kedua orangtua saya, Aba Nasichin dan Ibu Siti Khotimah tercinta, terima kasih atas do'a restu dan segalanya. Serta saudara-saudaraku tersayang adik Risa, adik Dian, dan adik Akhif yang telah memberikan dorongan semangat dan rasa sayangnya padaku.
8. Seluruh dosen pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
9. Pak Tukidjo, Pak Tanto, Pak Bambang, Pak Ramli serta Pak Yanto yang telah membantu lancarnya skripsi ini.
10. Teman-teman satu laboratorium yaitu Mbak Pegi, Ida, Cepi, Atus, Ela, Desy, Nita, Shendy, Atiek dan Mas Randy terima kasih atas kerjasamanya selama ini.
11. Keluarga besar Srikana 32 A ; Any, Imah, Linda, Okta, Astrid dan Cenung yang selalu menemaniku selama ini serta Bapak dan Ibu Djoko yang memberi tempat berteduh untukku di Surabaya.
12. Teman-teman terbaikku, Wiwik, Darlis, wiwin, serta semua teman-teman seperjuangan angkatan 2001.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangannya, untuk itu saya sangat mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak. Namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan tambahan informasi tentang obat analgesik golongan AINS dalam pengembangan obat baru yang mempunyai aktivitas analgesik-antiinflamasi.

**Wassalamualaikum Wr. Wb**

Surabaya, September 2006

Penulis

## RINGKASAN

### SINTESIS SENYAWA ASAM *O*-BENZOILSALISILAT DAN UJI AKTIVITAS ANALGESIKNYA PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Dalam rangka pengembangan calon obat baru dari kelompok obat AINS, dilakukan sintesis asam *O*-benzoilsalisilat yang diharapkan mempunyai aktivitas analgesik karena senyawa tersebut mempunyai ciri – ciri yang mirip dengan senyawa golongan AINS dan senyawa tersebut analog dengan asam asetilsalisilat yang mempunyai efek analgesik dan antiinflamasi. Oleh karena itu, perlu diketahui apakah asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik dan bagaimana potensi analgesiknya jika dibandingkan dengan senyawa pembanding yaitu asam asetilsalisilat.

Tujuan penelitian ini adalah mensintesis asam *O*-benzoilsalisilat melalui reaksi asilasi antara asam salisilat dengan benzoil klorida dan menguji aktivitas analgesik senyawa hasil reaksi tersebut dengan metode *Writhing test* menggunakan mencit sebagai hewan coba. Sebagai pembanding aktivitas analgesik digunakan asam asetilsalisilat.

Asam *O*-benzoilsalisilat disintesis dengan mereaksikan asam salisilat dan benzoil klorida menggunakan pelarut piridin yang berfungsi untuk mengikat HCl sebagai hasil samping reaksi. Hasil sintesis dianalisis dengan uji jarak lebur, Kromatografi Lapis Tipis ( KLT ), spektrofotometer ultraviolet, spektrofotometer inframerah, serta spektrometer resonansi magnet inti ( NMR-<sup>1</sup>H ).

Aktivitas analgesik senyawa ditetapkan dengan metode *writhing test* pada mencit. Senyawa uji dengan dosis 100 mg/kg BB diberikan pada mencit secara intraperitoneal 20 menit sebelum induksi nyeri. Induksi nyeri dilakukan dengan cara memberikan larutan asam asetat 0,6% dosis 0,01 ml/g BB. Respon nyeri yang berupa frekuensi geliat yang tampak 5 menit setelah induksi nyeri diamati selama 30 menit. Aktivitas analgesik senyawa dinyatakan sebagai % hambatan

nyeri, yaitu sebesar 47,76 %. Yang merupakan presentase penurunan frekuensi geliat senyawa uji dibanding kontrol.

Reaksi sintesis tersebut menghasilkan senyawa sebesar 68,12% yang berupa padatan berwarna putih, berbau khas dan berasa tebal di lidah. Senyawa tersebut larut dalam etanol, metanol, kloroform dan aseton, tetapi tidak larut dalam air. Reaksi warna dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$  akan memberikan warna coklat pada senyawa hasil sintesis tersebut. Senyawa hasil sintesis mempunyai jarak lebur  $108-110^\circ\text{C}$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis cukup murni. Pada uji kromatografi lapis tipis ( KLT ) dengan 3 macam eluen yaitu etilasetat : *n*-heksan = 7 : 3 ;  $\text{CHCl}_3$  : aseton = 8 : 2 ; etilasetat : methanol = 8 : 2 dihasilkan satu noda dengan harga  $R_f$  yang berbeda – beda. Hasil  $R_f$  tersebut tidak sama dengan  $R_f$  dari asam salisilat sebagai material awal. Berdasarkan spektra ultraviolet (UV), inframerah (IR), resonansi magnet inti (NMR  $^1\text{H}$ ) dapat diketahui bahwa senyawa yang diperoleh adalah asam *O*-benzoilsalisilat.

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa asam *O*-benzoilsalisilat dapat menurunkan frekuensi geliat pada mencit. Berdasarkan perhitungan ANOVA diketahui bahwa ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok uji dan kontrol, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa Asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik. Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan antara kelompok uji dengan kontrol dan kelompok pembanding dengan kontrol, tetapi tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok uji dengan pembanding. Aktivitas analgesik senyawa uji (asam *O*-benzoilsalisilat) pada dosis 100 mg/ kg BB adalah sebesar 47,76 % sedangkan senyawa pembanding asam asetilsalisilat mempunyai aktivitas hambatan nyeri sebesar 51,94 %.

Jika dibandingkan dengan asam asetilsalisilat persentase hambatan nyeri asam *O*-benzoilsalisilat lebih kecil, diduga karena efek sterik gugus benzoil lebih besar daripada gugus asetil. Dari hasil penelitian disarankan agar dilakukan penelitian tentang toksisitas senyawa asam *O*-benzoilsalisilat berdasarkan penentuan  $\text{LD}_{50}$  dan  $\text{ED}_{50}$  senyawa tersebut. Jika senyawa relatif tidak toksik berdasarkan nilai  $\text{LD}_{50}$  maka senyawa dapat diteliti lebih lanjut untuk dikembangkan sebagai calon obat NSAID.

## ABSTRACT

An effort to develop the new drug of NSAIDs group had been done by synthesizing of the *O*-benzoysalicylic acid. The *O*-benzoysalicylic acid was synthesized by reacting the salicylic acid with benzoyl chloride in piridine. The yield of *O*-benzoysalicylic acid synthesized by modified *Schotten Baumann* method was 68,12 %. The compound had melting point 108-110 °C. The structure of the compound was identified using the spectrometric data of ultraviolet, infrared, and nuclear magnetic resonance.

The analgesic activity of the compound was tested by writhing method in mice using acetylsalicylic acid as reference. The test compound was administered i.p with dose 100 mg / kg body weight. The compound exhibited pain inhibitory activity 47,76 %. The analgesic activity of the *O*-benzoysalicylic acid was lower than acetylsalicylic acid which showed pain inhibition 51,94 % with same dose.

**Key Word** : *O*-benzoysalicylic acid, Synthesis, analgesic activity test.



**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>iii</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>BAB I.PENDAHULUAN</b>	
I.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
I.2 Rumusan Masalah .....	4
I.3 Hipotesis .....	5
I.4 Tujuan Penelitian .....	5
I.5 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Tentang Nyeri .....	6
2.2 Tinjauan Tentang Analgesik Non Narkotik .....	8
2.3 Tinjauan Tentang Mekanisme Kerja Obat Analgesik-Antiinflamasi Nonsteroid .....	9
2.4 Tinjauan Tentang Senyawa Turunan Salisilat .....	11
2.5 Tinjauan Tentang Reaksi Asilasi .....	15
2.6 Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik.....	17
2.6.1 Metode Stimulasi Panas.....	17
2.6.2 Metode Stimulasi Listrik.....	18
2.6.3 Metode Stimulasi Tekanan.....	18
2.6.4 Metode Stimulasi Kimia.....	18
2.7 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur Dengan Spektometri	
2.7.1 Identifikasi Dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	19
2.7.2 Identifikasi Dengan Spektrofotometer Inframerah.....	20

2.7.3 Identifikasi Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti $^1\text{H}$ ( $^1\text{H-NMR}$ ) .....	22
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL</b> .....	24
<b>BAB IV. BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Bahan Penelitian.....	26
4.2 Hewan Coba .....	26
4.3 Alat Yang Dipakai.....	27
4.4 Cara Kerja.....	27
4.4.1 Pembuatan Senyawa Asam <i>O</i> -benzoilsat.....	27
4.5 Analisis Kualitatif	
4.5.1 Pemeriksaan Organoleptis .....	28
4.5.2 Pemeriksaan Dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	28
4.5.3 Pemeriksaan Jarak Lebur.....	28
4.5.4 Analisis Struktur Senyawa Hasil Sintesis	
4.5.4.1 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Visible.....	29
4.5.4.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah.....	29
4.5.4.3 Analisis Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti ( $^1\text{H-NMR}$ ) .....	29
4.6 Uji Aktivitas Analgesik .....	29
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	30
4.6.2 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6% .....	30
4.6.3 Pembuatan Sediaan Uji .....	30
4.6.4 Pemberian Sediaan Uji pada mencit .....	31
4.6.5 Pelaksanaan Uji Aktivitas .....	31
4.6 Analisis Data	
4.7.1 Persen Hasil Sintesis .....	31
4.7.2 Penentuan Aktivitas Analgesik .....	32
<b>BAB V. HASIL PENELITIAN</b>	
5.1 Senyawa Hasil Sintesis.....	34
5.1.1 Persentase Senyawa Hasil Sintesis.....	34
5.2 Analisis Kualitatif.....	34

5.2.1 Pemeriksaan Organoleptis.....	34
5.2.2 Penentuan Reaksi Warna Dan Kelarutan .....	34
5.2.3 Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	35
5.2.4 Pemeriksaan Jarak Lebur.....	36
5.3 Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis.....	36
5.3.1 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	36
5.3.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah.....	39
5.3.3 Analisis Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti ( <sup>1</sup> H-NMR).....	42
5.4 Uji Aktivitas Analgesik .....	45
5.4.1 Frekuensi Geliat Mencit.....	45
5.4.2 Perhitungan % Hambatan Nyeri.....	46
<b>BAB VI. PEMBAHASAN.....</b>	<b>48</b>
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>52</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>		<b>Halaman</b>
<b>2.1</b>	Struktur asam <i>O</i> -(4-butylbenzoyl) salisilat (A) dan Asam asetilsalisilat (B).....	14
<b>2.2</b>	Mekanisme reaksi asilasi substitusi asil nukleofilik dari derivat asam karboksilat .....	15
<b>2.3</b>	Mekanisme reaksi asilasi asam <i>O</i> -benzoilsalisilat .....	16
<b>3.1</b>	Skema Kerangka Konseptual.....	25
<b>4.1</b>	Skema Rancangan Uji Aktivitas Analgesik .....	33
<b>5.1</b>	Spektrum Ultraviolet Senyawa Hasil Sintesis.....	37
<b>5.2</b>	Spektrum Ultraviolet Senyawa asam salisilat.....	38
<b>5.3</b>	Spektrum Inframerah Senyawa Hasil Sintesis.....	39
<b>5.4</b>	Spektrum Inframerah Senyawa asam salisilat.....	40
<b>5.5</b>	Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa Hasil Sintesis.....	42
<b>5.6</b>	Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa asam salisilat.....	43

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
V.1	Hasil pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis.....	34
V.2	Hasil Reaksi Warna Senyawa Hasil Sintesis.....	34
V.3	Hasil Rf senyawa hasil sintesis dan asam salisilat.....	35
V.4	Pemeriksaan jarak lebur senyawa hasil sintesis dan senyawa pembanding asam salisilat.....	36
V.5	Karakteristik spektrum inframerah senyawa hasil sintesis.....	40
V.6	Karakteristik spektrum inframerah senyawa asam salisilat.....	41
V.7	Karakteristik spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa Hasil Sintesis.....	43
V.8	Karakteristik spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa asam salisilat.....	44
V.9	Frekuensi geliat mencit selama 30 menit pada dosis 100 mg/kg BB.....	45
V.10	Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri pada kelompok yang diberi senyawa uji asam O-benzoilsalisilat dan asam asetil salisilat.....	47

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
1	Hasil Perhitungan ANOVA dan LSD.....	57
2	Hasil uji LSD.....	58
3	Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri Senyawa Uji (Asam O-benzoilsalisilat) Dan Senyawa Pembanding (Asam asetilsalisilat).....	59
4	Perhitungan Persentase Hasil Sintesis.....	60
5	Gambar mencit sebelum dan sesudah perlakuan.....	61
6	Gambar penyuntikan mencit secara intraperitoneal.....	62



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Analgetika adalah zat-zat yang bekerja untuk meningkatkan kemampuan menahan dan mengatasi rasa sakit serta memberikan kemampuan untuk mengurangi penerimaan implus nyeri tanpa kehilangan kesadaran (Foye, 1995). Rasa sakit atau nyeri merupakan suatu pertanda atau peringatan yang menyatakan bahwa ada bagian tubuh yang bermasalah. Rasa nyeri tersebut timbul karena adanya rangsangan yang sampai ke reseptor rasa sakit, yang kemudian diteruskan ke pusat nyeri. Timbulnya masalah atau ketidak normalan itu dapat karena adanya rangsangan mekanis atau kimiawi, yang dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan dan melepaskan zat-zat tertentu yang disebut mediator (perantara) nyeri seperti histamin, serotonin, bradikinin dan prostaglandin (Tjay dan Raharja, 2002), atau karena adanya peradangan, infeksi karena kuman, atau kejang otot.

Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik. Analgetika narkotik digunakan untuk mengurangi rasa nyeri atau sakit yang sedang sampai berat dan analgetika non narkotik digunakan untuk menghilangkan rasa sakit atau nyeri yang ringan sampai sedang (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Penggunaan analgetika golongan non narkotik lebih banyak dijumpai karena analgetika golongan ini lebih mudah diperoleh tanpa resep dari dokter dan pada umumnya masyarakat banyak yang mengalami rasa nyeri yang ringan. Analgetika non narkotik sering disebut sebagai Analgetika-Antipiretik dan Antiinflamasi Non Steroid (AINS) yang telah digunakan secara meluas.

Mekanisme kerja obat pereda nyeri antara lain mempengaruhi pusat pengaturan suhu yang berada di hipotalamus. Obat ini dapat menambah pengeluaran panas bagi yang sedang menderita demam, menghambat pertumbuhan prostaglandin, dan meningkatkan ambang rasa sakit. Golongan analgesik non-narkotik, mempunyai khasiat sebagai antipiretik (menurunkan

demam), antiinflamasi, dan juga analgesik (mengatasi rasa nyeri). Kerja utama dari golongan ini adalah menghambat pembentukan enzim siklooksigenase sehingga mencegah sintesis prostaglandin (Korolkovas, 1988).

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

Senyawa obat golongan AINS yang paling dikenal dan banyak digunakan adalah dari turunan salisilat yaitu aspirin (asam asetilsalisilat), analgesik yang paling efektif untuk mengurangi nyeri dengan intensitas ringan sampai sedang. Asam asetilsalisilat merupakan salah satu dari obat-obat yang paling sering dipakai untuk meredakan rasa nyeri (Shearn, 1989).

Asam asetilsalisilat diperoleh dari reaksi anhidrida asam, yaitu mereaksikan asam salisilat dengan anhidrida asetat sehingga menghasilkan asam asetilsalisilat dan asam asetat. Senyawa tersebut juga dapat diperoleh dari reaksi klorida asam yang sangat reaktif, yaitu dengan mereaksikan asam salisilat dengan asetil klorida (Fessenden dan Fessenden, 1984).

Asam asetilsalisilat mempunyai banyak efek yang tidak diinginkan seperti gangguan lambung, pendarahan saluran cerna (gastrointestinal) bagian atas, dan pada dosis lebih tinggi, pasien-pasien mungkin mengalami muntah-muntah, serta pendengaran berkurang (Shearn, 1989). Banyak cara yang dilakukan untuk mendapatkan suatu obat baru yang lebih baik daripada asam asetilsalisilat. Beberapa cara yang telah dilakukan adalah melakukan modifikasi pada gugus fenolat asam salisilat yaitu mengganti gugus atom hidrogen dengan gugus selain asetil seperti pada : asam fenasetilsalisilat dan asam (o-difenilasetoksi)benzoat, asam n-heksil-O-karboksifenil-karbonat, 2-(o-karboksifenoksi)tetrahidropiran, asam O-(4-aminobenzoil)salisilat (Diyah dkk, 2002).



Dalam usaha mendapatkan senyawa obat turunan salisilat lainnya dengan aktivitas analgesik-antiinflamasi yang lebih optimal maka pada penelitian ini dicoba untuk mensintesis asam *O*-benzoilsalisilat. Asam *O*-benzoilsalisilat merupakan hasil modifikasi gugus fenolat asam salisilat, yang atom hidrogen gugus fenolatnya diganti dengan gugus benzoil. Dengan masuknya gugus benzoil maka didapatkan senyawa yang lebih lipofilik dari pada asam asetilsalisilat, dimana asam *O*-benzoilsalisilat ini mempunyai tetapan fragmentasi hidrofobik *Rekker* yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat, yaitu sebesar 2,562. Dengan lebih tingginya tetapan fragmentasi *Rekker* dari asam *O*-benzoilsalisilat maka asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih baik. Penelitian ini juga didasarkan dari penelitian sebelumnya yang telah disintesis asam *O*-(4-butylbenzoil)salisilat yang mempunyai aktivitas antiinflamasi yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat, karena senyawa ini mempunyai sifat lipofilik yang lebih tinggi dengan tetapan fragmentasi hidrofobik *Rekker* = 4,838 yang lebih besar dibanding dengan asam asetilsalisilat yang mempunyai fragmentasi hidrofobik *Rekker* = 1,370 (*Rekker and Mannhold, 1992*).

Asam *O*-benzoilsalisilat adalah ester salisilat asam benzoat, yang akan dibuat dari asam salisilat dan benzoil klorida melalui reaksi asilasi. Pada reaksi ini, gugus OH asam salisilat bertindak sebagai nukleofil yang akan diasilasi oleh gugus  $-C^{=O}$  dari benzoil klorida. Asilasi asam salisilat dengan benzoil klorida dapat dilakukan dengan metode *Schotten-Baumann*, pada metode ini digunakan basa NaOH atau piridin untuk mengikat HCl yang terbentuk (*McMurry, 1984*). Pada sintesis asam *O*-benzoilsalisilat ini, digunakan piridin karena selain dapat mengikat HCl yang ada, piridin juga sekaligus dapat berfungsi sebagai pelarut. Dipilih penggunaan piridin juga karena piridin tidak mengandung air yang mungkin dikhawatirkan dapat mengganggu proses sintesis dari asam *O*-benzoilsalisilat.

Untuk mengetahui apakah asam *O*-benzoilsalisilat memiliki aktivitas analgesik maka dilakukan uji aktivitas analgesik. Metode yang dapat digunakan untuk uji aktivitas analgesik, antara lain : metode stimulasi panas, metode stimulasi listrik, metode stimulasi tekanan, metode stimulasi kimia. Pada penelitian ini digunakan metode yang menggunakan zat kimia sebagai

penginduksi nyeri (metode *writhing test*). Metode ini dapat digunakan untuk menguji aktivitas analgesik senyawa AINS karena nyeri yang ditimbulkan oleh senyawa kimia yang digunakan melibatkan mediator inflamasi. Disamping itu penggunaan metode ini sederhana, mudah pelaksanaan dan pengamatannya. Metode *writhing test* merupakan metode uji aktivitas yang memberikan hubungan bertingkat antara intensitas rangsangan nyeri dan dosis analgetika yang dibutuhkan untuk menahan rangsangan nyeri. Cara ini lebih disukai karena dapat diperoleh perkiraan kuantitas aktivitas analgetika (Turner, 1965).

Senyawa yang dapat digunakan untuk penginduksi rasa nyeri adalah fenilkinon, bradikinin, larutan KCl 2 %, larutan asam asetat dan histamin (Turner, 1965). Diyah dkk (2002), Studiawan (1995), Ekasari (1998) menggunakan larutan asam asetat 0,6% dengan volume 0,01 ml/g BB secara intraperitoneal.

Respon nyeri yang tampak akibat rangsangan kimiawi adalah menggeliatnya mencit setelah pemberian senyawa penginduksi nyeri. Aktivitas analgesik senyawa uji ditentukan berdasarkan kemampuannya menurunkan frekuensi respon nyeri (geliat). Aktivitas analgesik dinyatakan dalam % hambatan nyeri yang ditentukan dengan mengamati penurunan frekuensi geliat pada mencit yang diberi senyawa uji. Asam *O*-benzoilsalisilat dinyatakan mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat apabila pada dosis yang sama mampu menghasilkan % hambatan nyeri yang lebih besar daripada asam asetilsalisilat.

## 1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah asam *O*-benzoilsalisilat dapat disintesis dari asam salisilat dan benzoil klorida melalui reaksi asilasi dengan metode Schotten-Baumann, serta berapa persentase hasilnya ?
2. Apakah Asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat pada mencit berdasarkan metode *writhing test* ?

### 1.3 Hipotesis

Dari yang telah disebutkan dalam rumusan masalah maka dapat ditarik suatu hipotesis bahwa :

1. Asam *O*-benzoilsalisilat dapat diperoleh dari reaksi antara asam salisilat dan benzoil klorida dengan menggunakan metode Schotten-Baumann.
2. Asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat pada mencit.

### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Memperoleh asam *O*-benzoilsalisilat dari reaksi antara asam salisilat dan benzoil klorida melalui reaksi asilasi dengan metode Schotten-Baumann.
2. Memperoleh hasil bahwa asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik yang lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Dengan diperolehnya asam *O*-benzoilsalisilat dan diketahuinya aktivitas analgesik asam *O*-benzoilsalisilat maka diharapkan dapat dikembangkan sebagai calon obat kelompok analgesik-antiinflamasi non steroid.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Tinjauan Tentang Nyeri**

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

Mekanisme kerja obat pereda nyeri antara lain mempengaruhi pusat pengaturan suhu yang berada di hipotalamus. Obat ini dapat menambah pengeluaran panas bagi yang sedang menderita demam, menghambat pertumbuhan prostaglandin, dan meningkatkan ambang rasa sakit. Rasa nyeri timbul karena adanya rangsangan yang sampai ke reseptor rasa sakit, yang kemudian diteruskan ke pusat nyeri, yang melepaskan zat-zat tertentu yang disebut mediator-mediator perantara nyeri. Zat-zat ini lalu merangsang reseptor-reseptor nyeri yang terletak pada ujung-ujung saraf bebas di kulit, selaput lendir dan jaringan-jaringan (organ-organ) lain. Dari tempat ini rangsangan dialirkan melalui saraf-saraf sensoris ke Sistem Saraf Pusat (SSP) : melalui sumsum tulang belakang ke talamus dan kemudian ke pusat nyeri di dalam otak besar, dimana rangsangan dinyatakan sebagai nyeri (Tjay dan Rahardja, 1978).

Mediator-mediator nyeri yang terpenting adalah histamin, serotonin (5-hidroksitriptamin), bradikinin dan prostaglandin, serta ion-ion kalium. Zat-zat ini menyebabkan reaksi radang dan kejang pada jaringan otot, yang selanjutnya mengaktifasi reseptor-reseptor nyeri (Tjay dan Rahardja, 2002). Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian telah membuktikan bahwa prostaglandin menyebabkan sensitisasi reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi. Jadi prostaglandin menimbulkan keadaan hiperalgesia, kemudian mediator kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata (Ganiswarna, 1999).

Berdasarkan proses terjadinya nyeri tersebut di atas, maka nyeri dapat dilawan dengan beberapa cara, yakni dengan : (Tjay dan Rahardja, 1978)

- 1) Menghalangi pembentukan rangsangan dalam reseptor-reseptor nyeri perifer, oleh analgetika perifer.
- 2) Menghalangi penyaluran rangsangan nyeri dalam saraf-saraf sensoris, misalnya dengan anestetika lokal.
- 3) Blokade dari pusat nyeri dalam sistem saraf pusat dengan analgetika sentral (narkotika) atau dengan anestetika umum.

Sedangkan pengobatan pada rasa nyeri dengan penggunaan analgetika tergantung dari jenis nyeri, yaitu :

- 1) Nyeri yang ringan , seperti sakit gigi, sakit kepala, sakit otot-otot pada infeksi virus, nyeri selama haid, keseleo dan sebagainya. Yang digunakan untuk ini adalah analgetika perifer, misalnya asam asetilsalisilat atau parasetamol.
- 2) Nyeri ringan yang menahun, seperti rematik dan artrosis, digunakan analgetika atau zat-zat lain yang berkhasiat anti radang, antara lain asam asetilsalisilat, ibuprofen, indometasin.
- 3) Nyeri yang hebat, seperti nyeri organ-organ dalam (lambung, usus) antara lain akibat kolik (kejang) pada serangan-serangan penyakit batu ginjal dan batu empedu. Dalam hal ini digunakan analgetika sentral (narkotik).

- 4) Nyeri hebat yang menahun, misalnya kangker, atau kadang-kadang rematik dan neuralgia, digunakan obat-obat yang berkasiat kuat seperti analgetika narkotik antara lain fentanil, dekstromoramida atau bezitramida (Tjay dan Rahardja, 1998).

## 2.2 Tinjauan Tentang Analgetika Non Narkotik

Analgetika adalah suatu senyawa yang dapat menekan fungsi sistem saraf pusat secara selektif, yang digunakan untuk menghilangkan rasa sakit tanpa menghilangkan / mempengaruhi kesadaran (Foye, 1995).

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

Analgetika non narkotik sering pula disebut Analgetika-Antipiretik dan Antiinflamasi Non Steroid (AINS). Analgetika non narkotik bekerja pada perifer dan sistem saraf pusat. Obat analgetika-antipiretik mempunyai kemampuan untuk meredakan dan mengurangi rasa sakit atau nyeri yang ringan sampai sedang (analgesik), untuk menurunkan suhu badan pada keadaan panas badan tinggi (antipiretika) dan sebagai anti radang (antiinflamasi) untuk pengobatan rematik. Analgetika-antipiretika digunakan untuk pengobatan simpatomitik, yaitu meringankan gejala penyakit, tidak menyembuhkan atau menghilangkan penyebab penyakit. (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Yang termasuk kelompok ini adalah senyawa turunan anilin seperti : asetanilida, fenasetin, dan asetaminofen (Gringauz, 1997).

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

merupakan prototipe analgetika antiinflamasi. Hingga kini obat-obat AINS masih dinilai dengan membandingkan terhadap asam asetilsalisilat. Asam asetilsalisilat juga merupakan obat yang menjadi pilihan pertama untuk keadaan rematik (Gringauz, 1997).

Analgetika AINS menimbulkan efek analgesik dengan cara menghambat secara langsung dan selektif enzim-enzim pada sistem saraf pusat yang mengkatalisis biosintesis prostaglandin, seperti siklooksigenase, sehingga mencegah sensitisasi reseptor rasa sakit (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Aktivitas analgesik non narkotik jauh lebih lama dibanding golongan analgetika narkotik, tetapi tidak menimbulkan ketagihan dan tidak menimbulkan efek samping sentral yang merugikan (Ganiswarna, 1995).

### **2.3 Tinjauan Tentang Mekanisme Kerja Obat Analgesik-Antiinflamasi Nonsteroid**

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

Semua obat golongan AINS mempunyai kemampuan menghambat siklooksigenase dan mengakibatkan penghambatan sintesis prostaglandin. Sayangnya, hambatan sintesis prostaglandin dalam mukosa lambung seringkali mengakibatkan kerusakan gastrointestinal. Efek samping yang lebih serius meliputi perdarahan gastrointestinal dan perforasi (Neal, 1992). Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan cara yang berbeda. Khusus parasetamol hambatan prostaglandin terjadi bila lingkungannya rendah kadar peroksid seperti di hipotalamus. Lokasi inflamasi biasanya mengandung banyak peroksid yang dihasilkan oleh leukosit. Ini menjelaskan mengapa efek antiinflamasi parasetamol

tidak ada. Asam asetilsalisilat sendiri menghambat dengan mengasetilasi gugus aktif serin dari enzim ini. Trombosit sangat rentan terhadap penghambatan ini karena sel ini tidak mampu mengadakan regenerasi enzimnya sehingga dosis asam asetilsalisilat 40 mg sehari telah cukup untuk menghambat siklooksigenase trombosit manusia selama masih hidup trombosit yaitu 8-11 hari (Ganiswarna, 1999).

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

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

Telah diketahui ada 2 bentuk enzim siklooksigenase (COX), yaitu yang konstitutif (COX-1) dan yang dapat terinduksi (COX-2). Enzim COX-2 kemungkinan berhubungan dengan proses inflamasi, sedangkan COX-1 terdapat dalam banyak jaringan sehat termasuk saluran cerna (Wolff, 1996).



Semua AINS mempunyai kemampuan menghambat siklooksigenase dan mengakibatkan penghambatan sintesis prostaglandin. Sayangnya, hambatan sintesis prostaglandin dalam mukosa lambung seringkali mengakibatkan kerusakan gastrointestinal dan perforasi (Neal, 1992).

Aksi analgesik AINS dapat bersifat perifer dan sentral, tetapi aksi perifer lebih dominan. Aksi analgetik umumnya berhubungan dengan aksi antiinflamasi dan merupakan akibat dari penghambatan sintesis prostaglandin dalam jaringan terinflamasi. Prostaglandin sendiri mengakibatkan sedikit nyeri, tetapi dapat menghasilkan potensiasi nyeri yang disebabkan oleh mediator inflamasi lain yaitu histamin dan bradikinin.

AINS menghambat siklooksigenase dengan berbagai mekanisme. Aspirin berikatan secara kovalen dengan residu serin enzim, menyebabkan hambatan ireversibel. Hal ini mengakibatkan adanya hambatan sterik terhadap pengikatan substrat pada sisi aktif oksigenase. AINS juga menghambat atau mempengaruhi reaksi enzim lainnya dan bereaksi dengan protein non enzim seperti albumin. Ada dua atau lebih tempat ikatan hidrofobik berafinitas tinggi bagi senyawa AINS pada tiap molekul albumin serum. Berdasarkan pengikatan asam flufenamat pada albumin diketahui bahwa bagian aromatik obat masuk ke dalam celah hidrofobik molekul protein, sedangkan gugus karboksilat berinteraksi dengan gugus hidrofilik pada permukaan protein (Diyah dkk, 2002).

#### **2.4 Tinjauan Tentang Senyawa Turunan Salisilat**

Salisilat adalah kelompok pertama yang dikenalkan sebagai analgesik. Laroux, pada tahun 1829 mengisolasi salisin dari unsur aktif pohon willow. Piria pada tahun 1838 membuat asam salisilat dari minyak wintergreen (metil salisilat). Kolbe dan Lautermann pada tahun 1860 secara sintetik membuat dari fenol. Natrium salisilat diperkenalkan pada tahun 1875 oleh Buss, diikuti dengan diperkenalkan fenil salisilat oleh Nencki pada tahun 1886, digunakan pada pengobatan rematik dan sebagai antipiretika pertama kali pada 1985 (Insel, 1992). Aspirin atau asam asetilsalisilat, pertama kali dibuat oleh Gerhardt pada tahun 1853, tetapi tetap terselubung sampai Felix Hofmann menemukan aktivitas farmakologinya pada tahun 1899. Asam asetilsalisilat diuji dan diperkenalkan

dalam pengobatan oleh Dresser, yang memberi nama aspirin dengan mengambil "a" dari asetil dan menambah "spirin", nama kuno dari salisilat atau asam spirat, diturunkan dari sumber alami tanaman spirea. (Willette, 1991).

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

Struktur dasar salisilat terdiri dari satu cincin benzena yang mengemban satu gugus karboksil dan satu gugus hidroksil yang terletak pada posisi orto satu dengan yang lain. Asam salisilat adalah asam 2-hidroksibenzoat. Asam benzoat mempunyai aksi mirip asam salisilat, tetapi lebih lemah (Shearn, 1989). Asam 3-hidroksi dan 4-hidroksi benzoat tidak mempunyai aktivitas antiinflamasi (Diyah, 1998).

Asam salisilat tidak lagi digunakan secara oral karena toksik sehingga banyak dilakukan modifikasi molekul dengan tujuan mengurangi efek sampingnya dan juga untuk meningkatkan aktivitasnya. Modifikasi molekul asam salisilat dapat dilakukan melalui 4 cara, yaitu (Korolkovas, 1988) :

- a) Modifikasi gugus karboksil melalui pembentukan garam, ester, atau amida.
- b) Substitusi pada gugus hidroksil (fenolat).
- c) Modifikasi gugus karboksil dan hidroksil.
- d) Substitusi gugus hidroksil atau gugus yang lain pada cincin aromatik atau mengubah gugus-gugus fungsional.

Tujuan utama dilakukan modifikasi gugus karboksil atau fenolat adalah memperkecil kontak bentuk aktif obat dengan lambung. Turunan asam salisilat yang dimodifikasi dari gugus karbonil melalui pembentukan garam, ester, atau amida dihidrolisis terutama di usus, sedangkan turunan asam salisilat yang dimodifikasi dengan cara substitusi pada gugus hidroksil (fenolat) dapat diabsorpsi secara utuh ke dalam sirkulasi (Willette, 1991).

Aspirin (asam *O*-asetilsalisilat) merupakan turunan asam salisilat hasil modifikasi pada gugus fenolat, yaitu melalui substitusi gugus asetil. Senyawa lainnya adalah asam fenasetilsalisilat yang disintesis oleh Lespagnol dan Thieblot, asam (*o*-difenilasetoksi)benzoat oleh Weaver dan kawan-kawan, asam *n*-heksil-*O*-karboksifenilkarbonat oleh Misher dan kawan-kawan, 2-(*o*karboksifenoksi)tetrahidropiran oleh Cross dan kawan-kawan, asam *O*-(4-aminobenzoil)salisilat oleh Diamond dan Martin, serta beberapa turunan asam *O*-benzoilsalisilat lainnya (Diyah, 1998).

Efek farmakologi turunan salisilat tergantung pada kadar obat yang mencapai tempat aksi. Efek hambatan oleh asam asetilsalisilat tergantung pada obat yang mencapai enzim siklooksigenase sehingga distribusi dan sifat farmakokinetik obat bertanggung jawab atas aktivitasnya (Insel, 1992). Para pakar sependapat bahwa asam asetilsalisilat lebih poten sebagai antiinflamasi daripada asam salisilat, dan aktivitas analgesiknya hampir seluruhnya dari asam asetilsalisilat utuh. Cranston pada 1971 menyatakan bahwa hubungan struktur dan aktivitas antipiretik asam asetilsalisilat dengan isomer orto natrium hidroksi benzoat bersifat spesifik. Asam asetilsalisilat lebih kuat 50 % daripada natrium salisilat tetapi natrium salisilat kurang mengiritasi lambung (Diyah dkk, 2002).

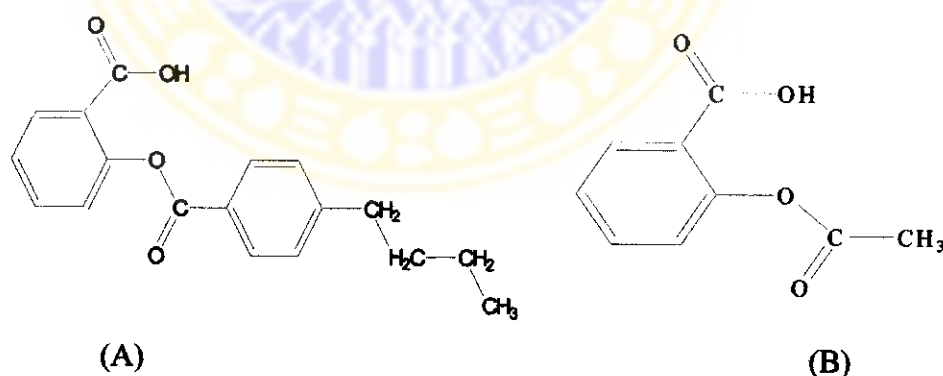
Farmakologi salisilat dan senyawa turunannya, secara umum menunjukkan aksi antipiretik pada pasien demam dengan menaikkan eliminasi panas badan melalui mobilisasi air dan berakibat pengenceran darah. Ini menghasilkan perspirasi, menyebabkan dilatasi kulit. Hal ini tidak terjadi pada suhu normal, aksi antipiretik dan analgesik diyakini terjadi di daerah hipotalamik otak. Beberapa orang memperkirakan bahwa salisilat menunjukkan aktivitas analgesik dengan efek pada keseimbangan air, menurunkan udem yang umumnya bersama-sama artralgia. Dalam keadaan ini aspirin sangat efektif (Neal, 1992).

Pada penelitian sebelumnya, telah dibuat beberapa turunan asam *O*-asil salisilat antara lain : asam *O*-(4-aminobenzoil)salisilat, asam *O*-(4-bromobenzoil)salisilat dan asam *O*-(4-butylbenzoil)salisilat (Diyah, 1998), serta asam *O*-(3-trifluorometilbenzoil)salisilat (Diyah dkk., 2001).

Salah satu dari turunan asam *O*-asil salisilat adalah senyawa asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat, yang dibuat berdasarkan metode Schotten-Baumann dengan modifikasi pelarut, dengan cara mereaksikan benzoil klorida tersubstitusi dengan asam salisilat dalam pelarut tetrahidrofuran. Reaksi tersebut adalah substitusi nukleofilik, asam salisilat bertindak sebagai nukleofil, sedangkan benzoil klorida digunakan sebagai turunan karboksilat yang aktif (Diyah, 1998)

Asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat,  $C_{18}H_{18}O_4$ , mempunyai bobot molekul 298. Senyawa ini tidak larut dalam air tetapi larut dalam metanol, etanol, kloroform, dan aseton; larutan dalam metanol menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 239 nm (Diyah dkk, 2002).

Berdasarkan uji aktivitas analgesik senyawa yang ditentukan dengan metode hambatan nyeri terinduksi asam asetat didapatkan bahwa senyawa asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat mempunyai aktivitas analgesik lebih tinggi daripada asam asetilsalisilat.  $ED_{50}$  asam asetilsalisilat adalah 101 mg/kg (0,57 mmol/kg), sedangkan  $ED_{50}$  asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat adalah 154 mg/kg (0.51 mmol/kg). Keadaan ini diduga karena senyawa bersifat lebih lipofilik daripada asam asetilsalisilat. Lipofilisitas tinggi tersebut adalah akibat adanya tambahan satu cincin fenil dari gugus benzoil (Diyah dkk, 2002).



**Gambar 2.1.** Struktur asam *O*-(4-butilbenzoil)salisilat (A) dan asam asetilsalisilat (B)

## 2.5 Tinjauan Tentang Reaksi Asilasi

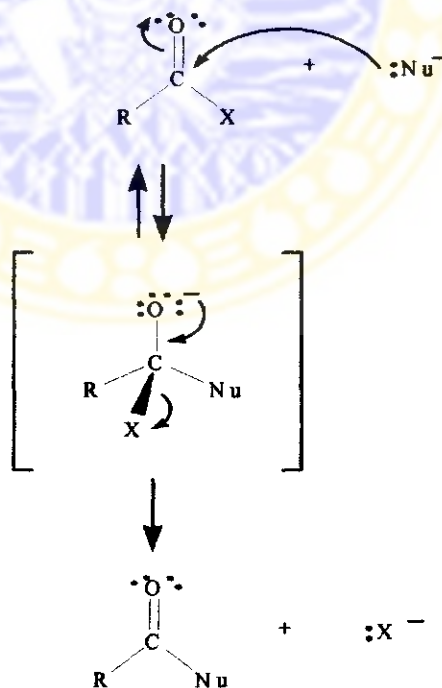
Reaksi asilasi merupakan proses yang menunjukkan pemindahan gugus asil (RCO-) dari satu gugus molekul ke gugus molekul yang lain. Contoh gugus asil antara lain adalah gugus asetil dan gugus benzoil.

Pada reaksi substitusi asil nukleofilik, penambahan nukleofil pada ikatan C=O polar merupakan suatu keunggulan umum pada reaksi kelompok karbonil. Reaksi yang biasanya terjadi pada kelompok karbonil dengan nukleofil adalah :

- (a) Reaksi penambahan nukleofil, biasanya terjadi pada keton dan aldehyd.
- (b) Reaksi substitusi asil nukleofilik, biasanya terjadi pada asam karboksilat dan derivat asamnya.

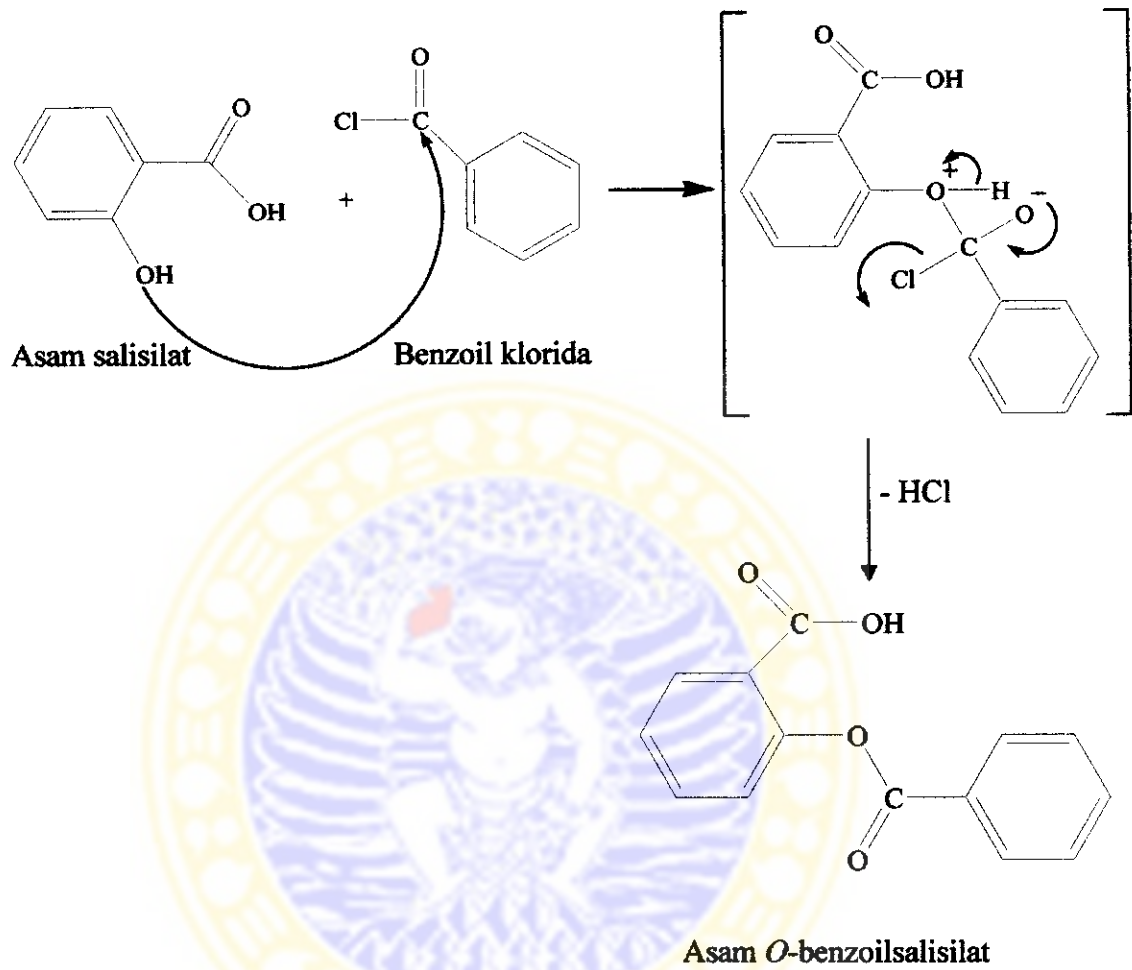
Hasil dari penambahan nukleofil pada derivat asam karboksilat adalah dengan terbentuknya reaksi substitusi asil nukleofilik, yang terjadi karena derivat asam karboksilat mempunyai ikatan fungsi asil yang dapat melepaskan diri dari ikatannya (dapat melepas sebagai anion), dan nilai negatif pada oksigen dapat dilepaskan keluar (McMurry, 1984).

Mekanisme yang terjadi pada substitusi asil nukleofilik dari derivat asam karboksilat dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



**Gambar 2.2.** Mekanisme reaksi substitusi asil nukleofilik dari derivat asam karboksilat

Mekanisme asilasi terjadi melalui dua tahap.



Gambar 2.3 Mekanisme reaksi asilasi asam *O*-benzoilsalisilat

Reaksi asilasi ini dapat dilakukan dengan metode Schotten-Baumann, dimana senyawa asam salisilat dilarutkan dalam pelarut yang sesuai untuk mengikat HCl yang terbentuk yaitu dapat diikat dengan basa NaOH maupun basa organik, seperti piridin.

## 2.6 Tinjauan Tentang Metode Pengujian Aktivitas Analgesik

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

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

### 2.6.1 Metode Stimulasi Panas

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

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

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

### 2.6.2 Metode Stimulasi Listrik

Stimulasi listrik dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain :

1. Melalui jaringan listrik pada lantai
2. Dengan elektrode yang ditempelkan pada kulit
3. Dengan elektrode yang ditanam pada ganglia sensoris atau pada tempat susunan saraf pusat

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

### 2.6.3 Metode Stimulasi Tekanan

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

### 2.6.4 Metode Stimulasi Kimia

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



menggunakan larutan asetat 0,6 % sebanyak 10 ml/kg BB yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Bahan kimia lain yang digunakan sebagai bahan penginduksi nyeri yaitu bradikinin, larutan KCl 2 % dalam histamin (Turner, 1965).

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

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

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

## 2.7 Tinjauan Tentang Identifikasi Struktur Dengan Spektrometri

### 2.7.1 Identifikasi Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi struktur dengan spektrofotometer ultra-violet pada umumnya adalah melihat intensitas dan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum senyawa dari spektrum yang terbentuk. Panjang gelombang ultraviolet jauh lebih pendek dari panjang gelombang inframerah. Satuan yang akan digunakan untuk memeriksa panjang gelombang ini adalah *nanometer*. Panjang gelombang  $\lambda$  (dari) absorpsi berbanding terbalik terhadap energi yang diperlukan. Spektrum ultraviolet adalah

suatu alur dari absorbans  $A$  atau absorptivitas molar  $\epsilon$  terhadap  $\lambda$ , di mana  $\epsilon=A/cl$ . Posisi absorpsi maksimum dilaporkan sebagai  $\lambda_{\max}$  (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Absorpsi cahaya ultraviolet (200-400 nm) mengakibatkan transisi elektronik, yakni promosi elektron dari orbital keadaan dasar ke orbital dengan energi lebih tinggi. Daerah yang paling berguna dari spektrum UV adalah daerah dengan panjang gelombang di atas 200 nm. Transisi berikut menimbulkan absorpsi dalam daerah 100-200 nm yang tak berguna:  $\pi \rightarrow \pi^*$  untuk ikatan rangkap menyendiri dan  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  untuk ikatan karbon-karbon biasa. Transisi yang berguna (200-400 nm) adalah  $\pi \rightarrow \pi^*$  untuk senyawa dengan ikatan rangkap berkonjugasi serta beberapa transisi  $n \rightarrow \sigma^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$  (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Benzena dan senyawa aromatik lain memperagakan spektra yang lebih kompleks daripada yang dapat diterangkan oleh transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Kompleksitas itu disebabkan oleh adanya beberapa keadaan eksitasi rendah. Benzena menyerap dengan kuat pada 184 nm ( $\epsilon= 47.000$ ) dan pada 202 nm ( $\epsilon= 7.000$ ) dan mempunyai sederet pita absorpsi antara 230-270 nm. Sering panjang gelombang 260 nm dilaporkan sebagai  $\lambda_{\max}$  untuk benzena karena itulah posisi absorpsi terkuat pada panjang gelombang di atas 200 nm. Pelarut dan substituen pada cincin mengubah spektra UV senyawa benzena (Fessenden dan Fessenden, 1982)..

Absorpsi radiasi UV oleh senyawa aromatik yang terdiri dari cincin benzena terpadu bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang dengan bertambah banyaknya cincin itu, karena bertambahnya konjugasi dan membesarnya stabilisasi-resonansi dari keadaan eksitasi (Fessenden dan Fessenden, 1982).

### 2.7.2. Identifikasi Dengan Spektrofotometer Inframerah.

Spektroskopi inframerah merupakan metode yang penting dalam identifikasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang gugus-gugus yang terdapat dalam suatu molekul. Identifikasi struktur dengan spektrofotometer inframerah pada umumnya adalah mengukur serapan radiasi inframerah pada

berbagai panjang gelombang. Dalam spektroskop inframerah, frekuensi dinyatakan dalam bilangan gelombang (*wavenumbers*): banyaknya daur per sentimeter. Satuan yang digunakan untuk panjang gelombang dalam spektroskopi inframerah adalah *mikrometer*,  $\mu\text{m}$  (atau mikron,  $\mu$ ), dengan  $1,0 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$  atau  $10^{-4} \text{ cm}$ . Absorpsi dalam daerah inframerah mengakibatkan eksitasi vibrasi dari ikatan-ikatan. Anekaragam ikatan membutuhkan energi untuk eksitasi vibrasi dalam kuantitas yang berbeda-beda (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Para ahli kimia telah mempelajari ribuan spektra inframerah dan menentukan panjang gelombang absorpsi masing-masing gugus fungsi. Peta korelasi (*correlation chart*) memaparkan ringkasan informasi ini. Dari peta tersebut dapat terbaca bahwa pita uluran OH dan NH terdapat antara  $3000\text{-}3700 \text{ cm}^{-1}$  ( $2,7 - 3,3 \mu\text{m}$ ). Daerah antara  $1400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  ( $2,5$  sampai kira-kira  $7,1 \mu\text{m}$ ), bagian kiri spektrum inframerah, merupakan daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus-gugus fungsional. Daerah ini menunjukkan absorpsi yang disebabkan oleh modus uluran. Daerah di kanan  $1400 \text{ cm}^{-1}$  seringkali sangat rumit karena modus uluran maupun modus tekukan mengakibatkan absorpsi disitu. Dalam daerah ini biasanya korelasi antara suatu pita dan suatu gugus fungsional spesifik tak dapat ditarik dengan cermat; namun, tiap senyawa organik mempunyai resapannya yang unik di sini. Oleh karena itu bagian spektrum ini disebut daerah sidikjari (*fingerprint region*) (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Pada ikatan hidrogen, resapan OH muncul sebagai pita lebar pada kira-kira  $3330 \text{ cm}^{-1}$  ( $3,0 \mu\text{m}$ ). Bila ikatan hidrogen kurang ekstensif, akan nampak *peak* OH yang lebih runcing dan kurang intensif (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Salah satu pita dalam spektrum inframerah yang paling terbedakan ialah pita yang disebabkan oleh modus uluran karbonil. Pita ini merupakan *peak* yang kuat yang dijumpai dalam daerah  $1640 - 1820 \text{ cm}^{-1}$  ( $5,5 - 6,1 \mu\text{m}$ ). Ester menunjukkan keduanya, suatu pita karbonil yang khas dan suatu pita C-O. Pita C-O itu, seperti pita dalam eter, dijumpai dalam daerah sidikjari,  $1110\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$  ( $7,7\text{-}9,1 \mu\text{m}$ ) dan kadang-kadang sukar untuk ditandai. Namun pita C-O ini kuat dan, dalam beberapa hal, dapat digunakan untuk membedakan antara ester dan keton (Fessenden dan Fessenden, 1982).

### 2.7.3 Identifikasi Dengan Spektrometer Resonansi Magnet Inti $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ NMR)

Resonansi magnet inti adalah metode spektroskopi yang sering lebih penting dibanding spektroskopi inframerah untuk identifikasi struktur senyawa organik. Dari banyak unsur yang dipelajari dalam resonansi magnet inti, yang lebih banyak digunakan adalah inti hidrogen ( $^1\text{H}$ ) dan karbon ( $^{13}\text{C}$ ) (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Spektroskopi  $^1\text{H}$ -resonansi magnet inti merupakan metode yang penting dalam elucidasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen dalam molekul (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Posisi serapan oleh sebuah proton bergantung pada kuat netto medan magnet lokal yang mengitarinya. Medan lokal ini merupakan hasil medan terapan  $H_0$  dan medan molekul terimbas yang mengitari proton itu dan berlawanan dengan medan terapan. Jika medan imbasan sekitar sebuah proton itu relatif kuat maka medan itu melawan  $H_0$  dengan lebih kuat dan diperluas medan terapan yang lebih besar untuk membawa proton itu agar beresonansi. Dalam hal ini, proton itu dikatakan terperisai (*shielded*) dan absorpsinya terletak di atas medan dalam spektrum itu. Atau sebaliknya jika medan imbasan di sekitar sebuah proton itu relatif lemah, maka medan yang dipakai juga lemah dan membawa proton ini ke dalam resonansi. Proton ini dikatakan tak-terperisai (*deshielded*) dan absorpsinya muncul di atas medan (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Luas area di bawah *peak-peak* dalam spektrum nmr diukur, akan dijumpai bahwa luas-luas itu proporsional menurut banyaknya proton yang menimbulkan *peak-peak* itu. Pemisahan spin-spin (*spin-spin splitting*) disebabkan oleh adanya proton bertetangga (proton-proton pada atom karbon di dekatnya) yang tidak ekuivalen dengan proton yang memiliki spek itu (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Untuk memperoleh pengukuran yang kuantitatif diperlukan suatu titik rujukan (referensi). Senyawa yang dipilih untuk titik rujukan adalah tetrametilsilana (TMS). Absorpsi kebanyakan proton lain dijumpai di bawah medan absorpsi TMS. Dalam praktek, TMS ditambahkan langsung pada contoh,

dan *peak* TMS bersama dengan *peak-peak* absorpsi dari senyawa contoh diperoleh dalam spektrum. Selisih antara posisi absorpsi TMS dan posisi absorpsi suatu proton tertentu disebut geseran kimia (*chemical shift*). Nilai geseran kimia dilaporkan dalam nilai  $\delta$ , yang dinyatakan sebagai bagian tiap juta (ppm) dari radiofrekuensi yang digunakan (Fessenden dan Fessenden, 1982).



### BAB III

#### KERANGKA KONSEPTUAL

Analgetika adalah zat-zat yang bekerja untuk meningkatkan kemampuan menahan dan mengatasi rasa sakit serta memberikan kemampuan untuk mengurangi penerimaan implus nyeri tanpa kehilangan kesadaran. Berdasarkan mekanisme kerja pada tingkat molekul, analgetika dibagi menjadi dua golongan yaitu analgetika narkotik dan analgetika non narkotik. Analgetika narkotik digunakan untuk mengurangi rasa nyeri atau sakit yang sedang sampai berat dan analgetika non narkotik digunakan untuk menghilangkan rasa nyeri atau sakit yang ringan sampai sedang (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

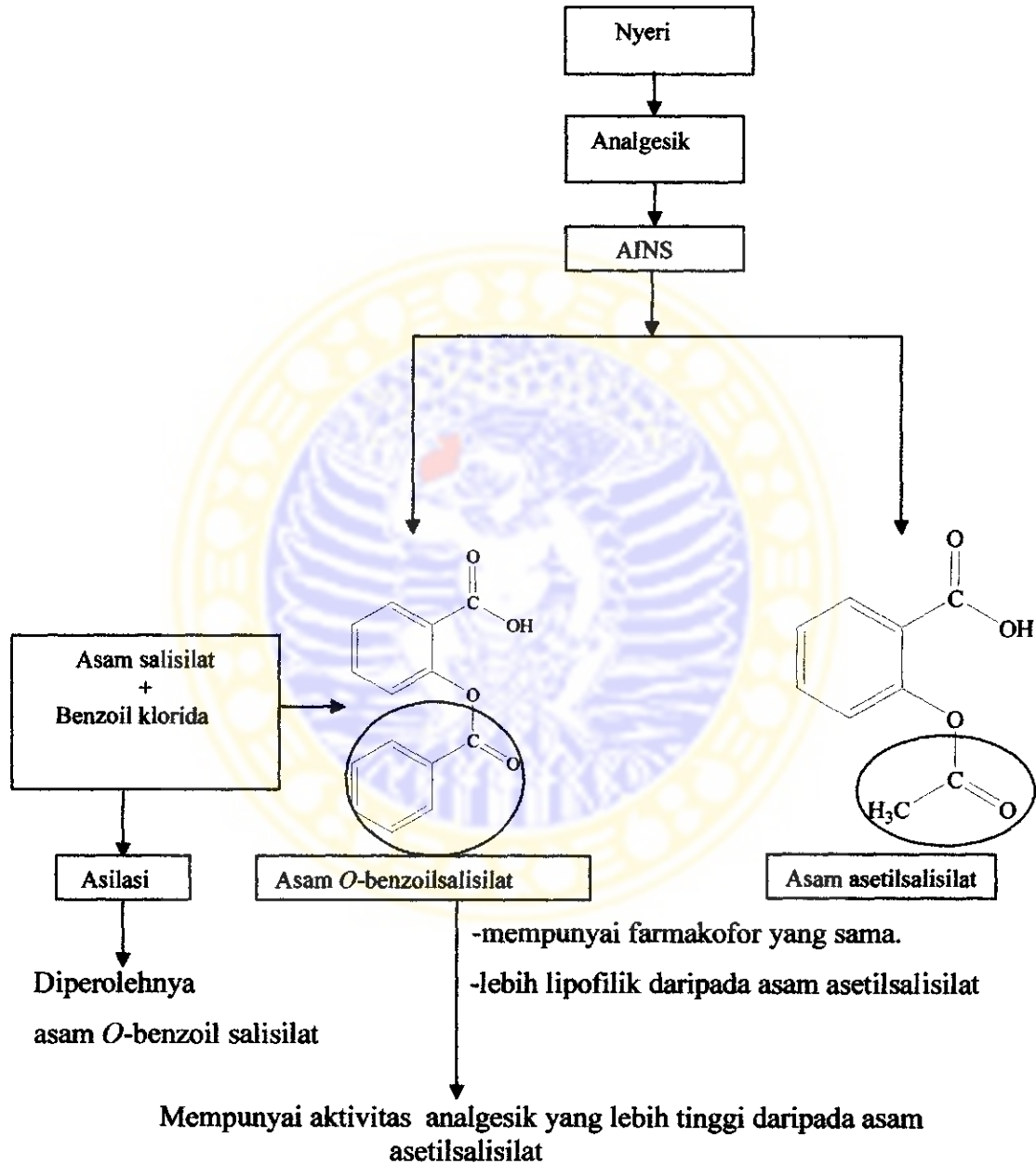
Struktur kimia obat-obat golongan AINS yang sangat beragam mempunyai ciri-ciri umum, yaitu : mempunyai dua cincin yang berhubungan langsung atau melalui “jembatan” atom/gugus pendek. Salah satu cincin bertindak sebagai pengemban bagian hidrofobik molekul, pada umumnya berupa cincin aromatik atau sikloalkana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

Dalam usaha mendapatkan senyawa obat turunan salisilat lainnya dengan aktivitas analgesik-antiinflamasi yang lebih optimal, maka pada penelitian ini dicoba untuk mensintesis asam *O*-benzoilsalisilat. Asam *O*-benzoil salisilat merupakan hasil modifikasi gugus fenolat asam salisilat, yang atom hidrogen gugus fenolatnya diganti dengan gugus benzoil. Dengan masuknya gugus benzoil maka senyawa ini lebih lipofilik dari pada aspirin (asam asetilsalisilat), sehingga diharapkan mempunyai aktivitas analgesik yang lebih baik.

Asam *O*-benzoilsalisilat adalah ester salisilat asam benzoat, yang akan dibuat dari asam salisilat dan benzoil klorida melalui reaksi asilasi. Pada reaksi ini gugus OH asam salisilat bertindak sebagai nukleofil yang akan diasilasi oleh gugus  $\text{C}=\text{O}$  dari benzoil klorida. Asilasi asam salisilat dengan benzoil klorida dilakukan dengan metode Schotten-Baumann, pada penelitian ini digunakan piridin untuk mengikat HCl yang terbentuk. Pada sintesis asam *O*-benzoilsalisilat ini, digunakan piridin karena selain dapat mengikat HCl yang ada, piridin juga

sekaligus dapat berfungsi sebagai pelarut. Dipilih penggunaan piridin juga karena piridin tidak mengandung air yang mungkin dikhawatirkan dapat mengganggu proses sintesis dari asam *O*-benzoilsalisilat.

Berdasarkan kerangka konseptual di atas dapat digambarkan dengan skema sebagai berikut :



**Gambar 3.1.** Skema kerangka konseptual

## **BAB IV**

### **BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Bahan Penelitian**

- Asam salisilat p.a. (E. Merck)
- Benzoil klorida p.a. (Sigma)
- Asam asetilsalisilat p.a. (sigma)
- Piridin p.a. (E. Merck)
- Metanol p.a. (E. Merck)
- Aseton p.a. (Riedel-de Haen)
- Kieselgel GF<sub>254</sub> (E. Merck)
- Etil asetat p.a. (E. Merck)
- Kloroform p.a. (E. Merck)
- *n*-Heksana p.a. (E. Merck)
- Asam asetat glasial p.a. (E. Merck)
- Natrium karboksimetilselulosa / CMC Na (sigma)
- Aqua pro injeksi
- Alkohol 70 %
- Kapas steril

#### **4.2. Hewan Coba**

Mencit *Mus musculus* galur BLAB "C", jantan, dewasa berumur 2-3 bulan, sehat dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh, dengan berat antara 20-30 g (Pusvetma, Surabaya).



### 4.3. Alat Yang Dipakai

- Seperangkat alat gelas
- Corong Buchner
- Corning *hot plate – magnetic stirrer*
- Bejana kromatografi lapisan tipis (KLT)
- Lampu ultraviolet 254 nm Topcon
- Neraca analitik Sartorius 2472
- Timbangan menciit Ohaus
- Stop watch
- Fisher *electrothermal melting point apparatus*
- Spektrofotometer UV-Vis Lambda EZ-201
- Spektrofotometer JASCO FT/IR-5300
- Spektrometer Hitachi FT-NMR R-1900
- *Disposable syringe* dan jarum suntik
- Wadah menciit beserta tutupnya
- Mortir dan stamper

### 4.4. Cara Kerja

#### 4.4.1 Pembuatan Senyawa Asam *O*-benzoilsalisilat

Asam salisilat 0,025 mol (3,4530 gram) dilarutkan dengan piridin 0,025 mol (2,21 ml) dalam labu sintesis di atas *Corning hot plate- magnetic stirrer*. Benzoil klorida 0,0275 mol (3,20 ml) dilarutkan dengan 10 ml aseton dalam corong pisah, kemudian dimasukkan ke dalam labu sintesis dengan cara diteteskan perlahan-lahan sampai habis, sambil dilakukan pengadukan dengan pengaduk magnetik. Campuran diaduk terus menerus selama 3 jam, sambil dipanaskan pada suhu 50 ° C. Hasil sintesis didinginkan, lalu dituang ke dalam beaker glass yang telah diisi dengan ± 50 ml air, sambil dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer*, endapan disaring dengan kertas saring. Zat padat dicuci lagi dengan air sampai bebas piridin (di cek dengan KLT), lalu disaring dengan corong Buchner sampai kertas saring kering. Setelah hasil benar-benar kering, dilakukan rekristalisasi dengan aseton.

#### 4.5. Analisis Kualitatif

##### 4.5.1. Pemeriksaan Organoleptis

- Pemeriksaan meliputi bentuk, bau, dan rasa.
  - Reaksi warna.
    - a. Larutan zat hasil sintesis direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$ .
    - b. Larutan zat hasil sintesis dalam metanol, dipanaskan beberapa saat, lalu didinginkan dan direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$ .
- (Svehla, 1985)

##### 4.5.2. Pemeriksaan Dengan Kromatografi Lapis Tipis

Campuran pelarut yang digunakan sebagai fase gerak adalah :

Etil asetat – *n* heksana = 7 : 3

Kloroform – Aseton = 8 : 2

Etil asetat – Metanol = 8 : 2

Bejana KLT diisi eluen, didiamkan hingga jenuh. Kemudian sejumlah zat dilarutkan dalam aseton kemudian ditotolkan pada lempeng KLT yang telah diberi batas atas 1 cm dan batas bawah 2 cm, lempeng dimasukkan dalam bejana KLT yang telah jenuh dengan pelarut. Eluasi dilakukan sampai pelarut mencapai batas atas pada lempeng KLT.

##### 4.5.3 Pemeriksaan Jarak Lebur

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

Indikator dari kemurnian senyawa hasil sintesis adalah yang jarak leburnya menunjukkan perbedaan yang kecil yaitu  $1 - 2^\circ$  (Adam and Johnson, 1949).

#### 4.5.4 Analisis Struktur Senyawa Hasil Sintesis

##### 4.5.4.1 Analisis Dengan Spektrofotomeer UV-Visible

Analisis dengan spektrofotometer UV dilakukan dengan melarutkan sampel yang akan dianalisis dalam pelarut metanol, kemudian diperiksa serapannya pada daerah UV dengan panjang gelombang 200-400 nm, kemudian diamati panjang gelombang maksimumnya.

##### 4.5.4.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah

Ditimbang sejumlah zat kemudian dicampur dengan kalium bromida yang telah dikeringkan. Campuran zat tersebut digerus halus dalam mortir, kemudian dimasukkan dalam alat pembuat pelet KBr dan ditekan dengan penekan hidrolis sehingga diperoleh pelet yang transparan. Pelet KBr yang dihasilkan diletakkan pada *sample holder* dari alat spektrofotometer inframerah. Kemudian dilakukan identifikasi terhadap pita absorpsi dari gugus-gugus fungsi pada senyawa yang dianalisis.

##### 4.5.4.3 Analisis Dengan Resonansi Magnet Inti ( $^1\text{H-NMR}$ )

Sedikit sampel dilarutkan dalam aseton yang sudah mengandung tetrametil silin (TMS). Dibuat spektrum resonansi proton senyawa pada daerah geseran kimia 0-14  $\delta$ . Kemudian dilakukan identifikasi terhadap spektra hasil analisis meliputi intensitas, jumlah, dan posisi pada geseran kimia pada puncak-puncak proton yang terjadi (Silverstein, 1981)

#### 4.6. Uji Aktivitas Analgesik

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

#### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Digunakan mencit putih *Mus musculus* jantan dewasa berumur 2-3 bulan, dengan bobot 20-30 gram, sehat tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuhnya.

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

1. Kelompok senyawa uji asam *O*-benzoilsalisilat dosis 100 mg/kg BB (kelompok A), dilakukan pada 10 ekor mencit.
2. Kelompok pembanding / asam asetilsalisilat dosis 100 mg/kg BB (kelompok B), dilakukan pada 10 ekor mencit.
3. Kelompok kontrol (tanpa obat) hanya diberi larutan CMC Na 0,5 %, sebanyak 10 ekor

Sebelum diberi perlakuan mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama satu minggu dan diberi pakan standar dan minum. Sebelum percobaan, mencit dipuaskan semalam tetapi tetap diberi minum.

#### 4.6.2 Pembuatan Larutan Asam Asetat 0,6 %

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

#### 4.6.3 Pembuatan Sediaan Uji

Sediaan uji yang dibuat meliputi suspensi asam asetilsalisilat (sebagai pembanding) dan asam *O*-benzoilsalisilat. Suspensi senyawa uji dibuat segera sebelum uji aktivitas dilakukan dan tidak dapat disimpan untuk digunakan di waktu yang lain.

- a) Sebanyak 250 mg CMC Na ditaburkan di atas air suling panas 10 ml dan dibiarkan mengembang selama sekitar 5 menit, kemudian digerus hingga homogen.

- b) Untuk dosis 100 mg/kg BB, ditimbang 300 mg senyawa, digerus dan dicampur merata dengan mucilago CMC Na sampai homogen, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur, dan ditambah air suling hingga diperoleh volume 50 ml. Sediaan uji mengandung senyawa 6 mg/ml.

#### 4.6.4 Pemberian Sediaan Uji Pada Mencit

Mencit pada kelompok dosis 100 mg/kg BB akan diberi sejumlah suspensi, dengan rumus :

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

Jika bobot mencit 30 g, maka volume sediaan yang diberikan adalah

$$\frac{30 \text{ g} \times 0,1 \text{ mg/g}}{6 \text{ mg/ml}} = 0,5 \text{ ml}$$

#### 4.6.5 Pelaksanaan Uji Aktivitas

1. Mencit untuk kelompok uji (kelompok A) diberi larutan sediaan uji asam O-benzoilsalisilat dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok B sebagai pembanding diberi larutan asam asetilsalisilat dengan dosis 100 mg/kg BB dan kelompok kontrol (kelompok C) hanya diberi larutan CMC Na 0,5% (plasebo) secara intraperitoneal (i.p).
2. 20 menit setelah pemberian obat / plasebo, mencit disuntik dengan larutan asam asetat 0,6 % sebanyak 10 ml/kg BB secara intraperitoneal (i.p).
3. 5 menit setelah penyuntikan dengan larutan asam asetat (penginduksi nyeri), respon geliat pada mencit mulai diamati selama 30 menit dan dicatat frekuensi geliatnya.

### 4.7. Analisis Data

#### 4.7.1 Persen Hasil Sintesis

$$\% \text{ Hasil} = \frac{\text{berat hasil}}{\text{berat teoritis}} \times 100 \%$$

#### 4.7.2 Penentuan Aktivitas Analgesik

Dari hasil pengamatan frekuensi geliat kelompok uji dan kontrol dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan frekuensi geliat yang bermakna antara kelompok dosis senyawa uji (asam *O*-benzoilsalisilat) dengan kelompok dosis senyawa pembanding (asam asetilsalisilat) dan kontrol.

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

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

$H_a$  = ada perbedaan yang bermakna pada frekuensi geliat antara kelompok senyawa uji, pembanding, dan kontrol.

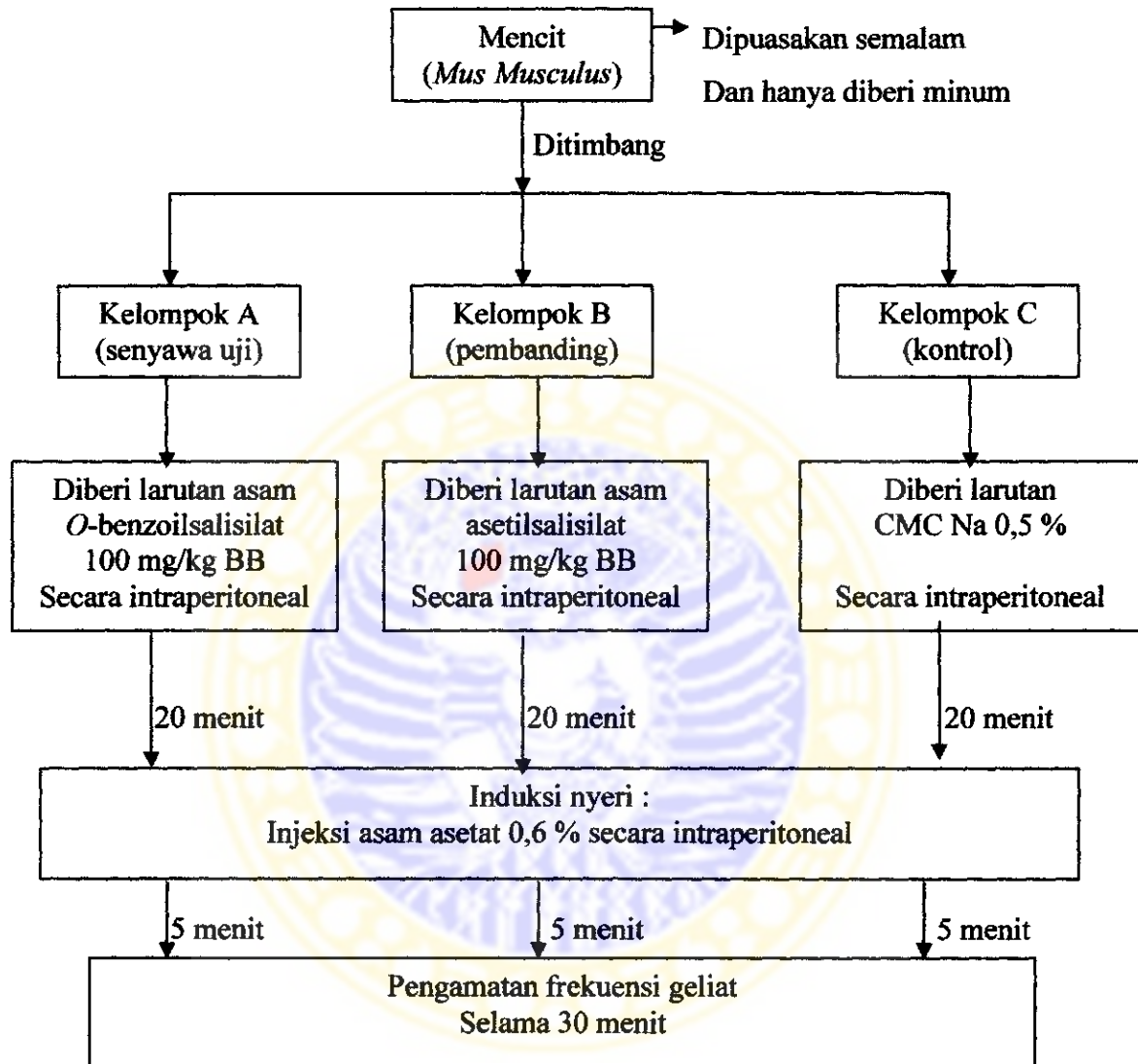
Apabila terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok uji dengan kontrol maupun pembanding dengan kontrol, maka dapat dinyatakan bahwa senyawa uji mempunyai aktivitas analgesik, yaitu apabila frekuensi geliat kelompok uji lebih kecil daripada frekuensi geliat kelompok kontrol. Untuk menentukan besarnya aktivitas analgesik senyawa uji dan pembanding maka dihitung presentase hambatan nyeri dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{hambatan} = \left( 1 - \frac{f_T}{f_K} \right) \times 100$$

Keterangan :  $f_T$  = rata-rata frekuensi geliat pada kelompok dosis senyawa uji (asam *O*-benzoilsalisilat) dan pembanding (asam asetilsalisilat)

$f_K$  = rata-rata frekuensi geliat pada kelompok kontrol

### Rancangan Percobaan Uji Aktivitas Analgesik



**Gambar 4.1** Skema Rancangan Uji Aktivitas Analgesik

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Senyawa Hasil Sintesis

##### 5.1.1 Persentase Senyawa Hasil Sintesis

Senyawa hasil sintesis diperoleh dari reaksi antara asam salisilat dan Benzoil klorida berdasarkan cara seperti bab IV, didapatkan serbuk kristal berwarna putih, berbau khas dan berasa tebal di lidah, sebanyak 4,121 g atau sebesar 68,12% (Lampiran 1).

#### 5.2 Analisis Kualitatif

##### 5.2.1 Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau, rasa dari senyawa hasil sintesis. Hasil pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis dapat di lihat pada tabel V.1

**Tabel V.1 Hasil pemeriksaan organoleptis senyawa hasil sintesis**

Pemeriksaan	Hasil pengamatan
Bentuk	Serbuk kristal
Warna	Putih
Bau	Berbau khas
Rasa	Berasa tebal di lidah

##### 5.2.2 Pemeriksaan Reaksi Warna Dan Kelarutan

Hasil pemeriksaan reaksi warna senyawa hasil sintesis dapat di lihat pada tabel V.2

**Tabel V.2 Hasil Reaksi Warna Senyawa Hasil Sintesis**

Reaksi	Senyawa hasil sintesis	Asam salisilat
Zat + $\text{FeCl}_3$	Kuning kecoklatan	Ungu
Zat + Metanol + $\text{FeCl}_3$	ungu	Ungu



Kelarutan Senyawa hasil sintesis : tidak larut dalam air dan *n*-heksana, tetapi larut dalam metanol, etanol, kloroform, dan aseton.

### 5.2.3 Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi kromatografi lapis tipis yang telah dilakukan adalah dengan menggunakan tiga macam fase gerak dan dengan membandingkan nilai  $R_f$  dari senyawa awal reaksi (asam salisilat), untuk mengetahui bahwa noda yang dihasilkan berbeda dengan senyawa awal atau pereaksi. Hasil perhitungan nilai  $R_f$  dari kromatografi lapis tipis senyawa hasil sintesis dan senyawa awal reaksi dengan tiga macam fase gerak dapat dilihat pada tabel V.3.

**Tabel V.3 Harga  $R_f$  senyawa hasil sintesis dan asam salisilat**

Fase Gerak	Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)	Jarak noda (cm)		Rf	
		Senyawa hasil sintesis	Asam salisilat	Senyawa hasil sintesis	Asam salisilat
1	8	6,1	6,0	0,76	0,75
2	8	4,8	5,2	0,60	0,65
3	8	6,6	5,9	0,83	0,74

Keterangan :

Fase gerak 1 = etil asetat : *n*-heksana ( 7 : 3 )

Fase gerak 2 = kloroform : aseton ( 8 : 2 )

Fase gerak 3 = etil asetat : methanol ( 8 : 2 )

Dari data hasil kromatografi lapis tipis pada Tabel V.3, terlihat bahwa dengan tiga fase gerak yang digunakan, hanya terdapat satu noda dengan nilai  $R_f$  yang berbeda-beda tergantung pada polaritas eluen. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis tersebut murni secara KLT. Dengan menggunakan 3 fase gerak yang berbeda polaritas tersebut, diperoleh nilai  $R_f$  dari fase gerak 1 dan fase gerak 3 pada senyawa hasil sintesis lebih tinggi dibanding nilai  $R_f$  asam salisilat . Sedangkan pada fase gerak 2, senyawa hasil sintesis memiliki nilai  $R_f$  yang lebih rendah dibanding nilai  $R_f$  asam salisilat. Berdasarkan hasil tersebut senyawa hasil sintesis lebih non polar daripada asam asetilsalisilat.

### 5.2.4 Pemeriksaan Jarak Lebur

Pemeriksaan jarak lebur diperlukan untuk melihat kemurnian dari senyawa hasil sintesis. Hasil pemeriksaan jarak lebur dapat dilihat pada tabel V.4

**Tabel V.4 Pemeriksaan jarak lebur senyawa hasil sintesis dan senyawa pembanding asam salisilat**

Replikasi	Jarak lebur senyawa hasil sintesis (°C)	Jarak lebur asam salisilat (°C) (Budavari, 2001)
1	108-110	158-162
2	108-110	
3	108-110	
Rata-rata	108-110	

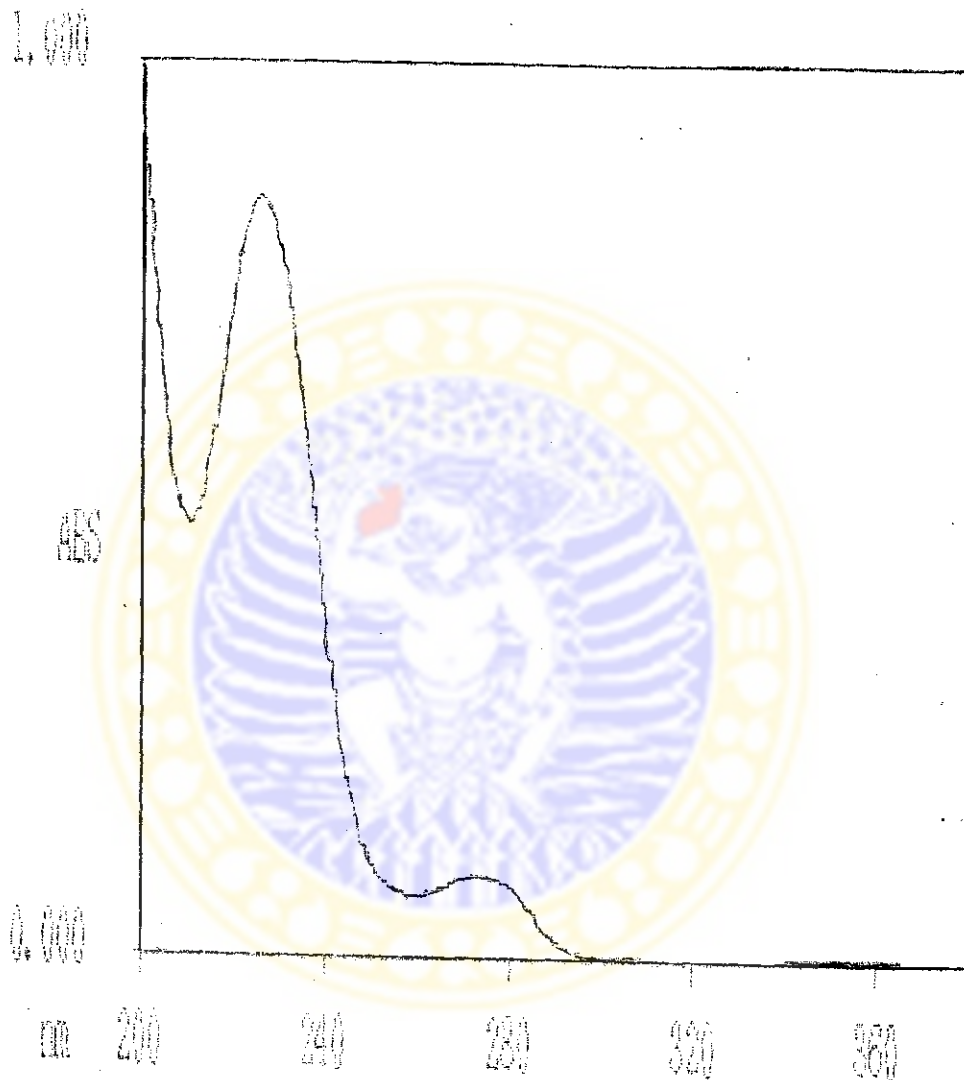
Dari data pemeriksaan jarak lebur pada Tabel V.4, diperoleh hasil jarak lebur sebesar 108-110 °C, sedangkan asam salisilat sebesar 158-162 °C (Budavari, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa telah dihasilkan senyawa baru yang tidak sama dengan senyawa awal. Jarak lebur yang dihasilkan dengan melakukan replikasi tiga kali menunjukkan hasil yang mempunyai perbedaan yang kecil, sehingga dapat diartikan bahwa zat tersebut murni. Indikator kemurnian dari suatu zat berdasarkan jarak lebur adalah mempunyai jarak lebur yang menunjukkan perbedaan yang kecil, yaitu 1-2° (Adam and Johnson, 1949).

## 5.3 Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

### 5.3.1 Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada umumnya digunakan untuk melihat intensitas dan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum senyawa dari spektrum yang terbentuk.

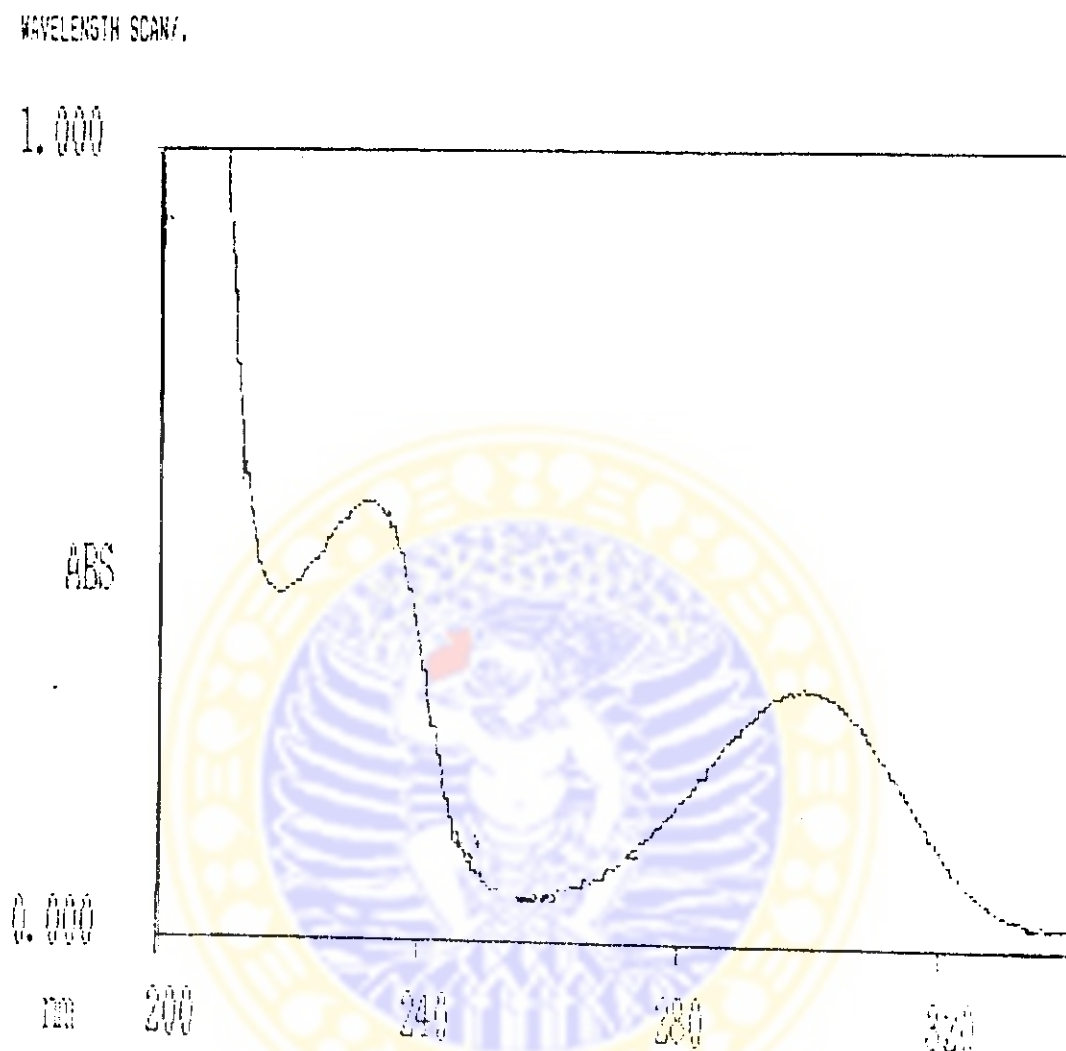
Hasil analisis dengan spektrofotometer UV terhadap senyawa hasil sintesis (Asam *O*-benzoilsalisilat) dalam pelarut metanol dapat dilihat pada Gambar 5.1



absorpsi pada  $\lambda$  227,0 nm

**Gambar 5.1 Spektrum Ultraviolet senyawa hasil sintesis**

Dan gambar hasil analisis dengan spektrofotometer UV terhadap senyawa asam salisilat dalam pelarut metanol dapat dilihat pada Gambar 5.2

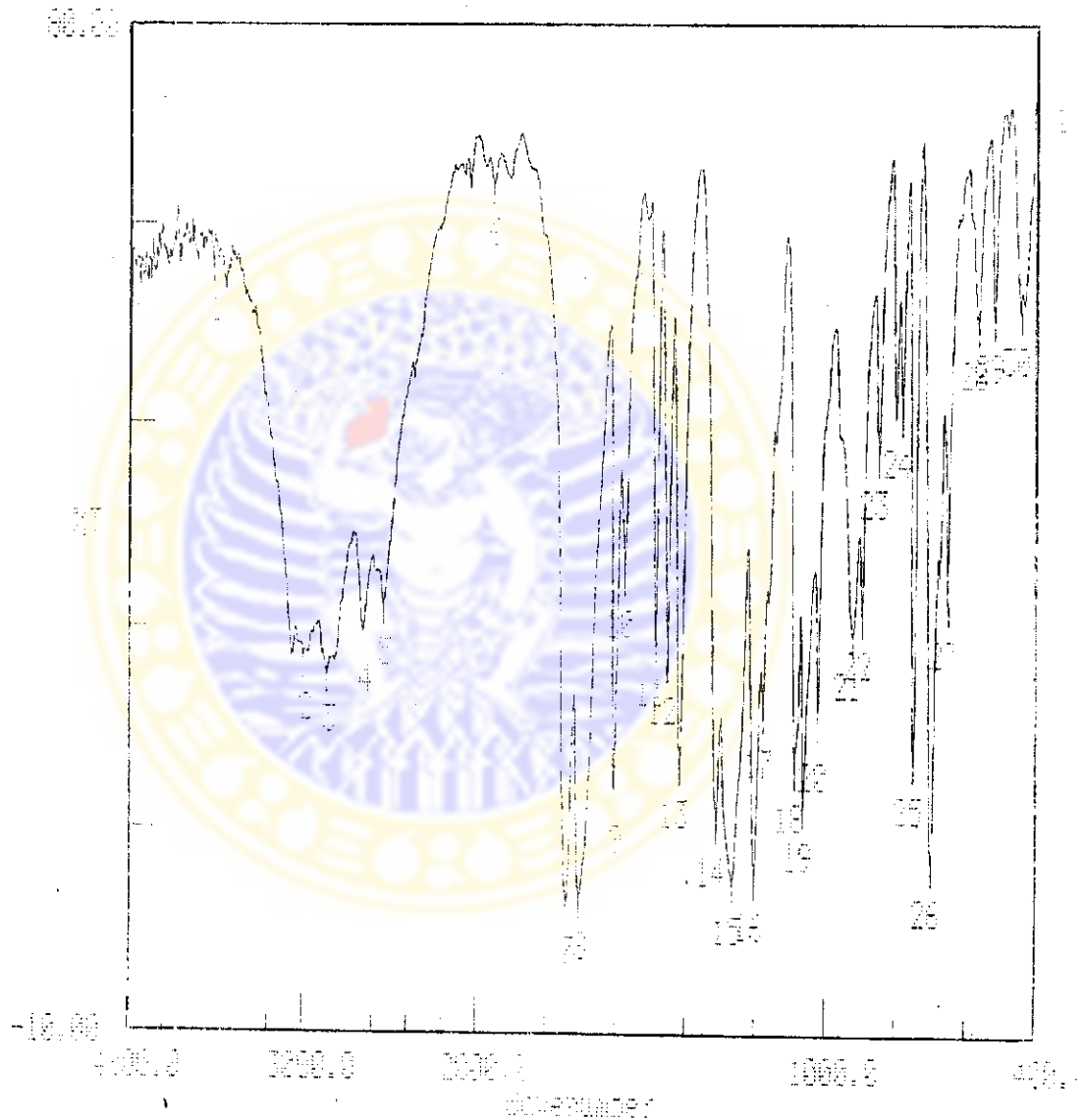


**Gambar 5.2 Spektrum Ultraviolet senyawa asam salisilat**

Pada Gambar 5.1 dapat dilihat bahwa senyawa hasil sintesis menunjukkan puncak serapan pada  $\lambda$  227,0 nm. Hal ini menunjukkan perbedaan dengan puncak serapan senyawa awal reaksi (asam salisilat) pada gambar 5.2, yaitu yang menunjukkan puncak serapan pada  $\lambda$  231,8 nm dan pada  $\lambda$  299,0. Dari hasil yang diperoleh dapat diduga bahwa terjadi perubahan gugus yang terikat pada cincin benzena senyawa awal.

### 5.3.2 Analisis Dengan Spektrofotometer Inframerah

Analisis dengan spektrofotometer inframerah digunakan untuk memberikan informasi tentang gugus-gugus yang terdapat dalam suatu senyawa. Spektrum inframerah senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Gambar 5.3.



**Gambar 5.3 Spektrum Inframerah senyawa hasil sintesis**

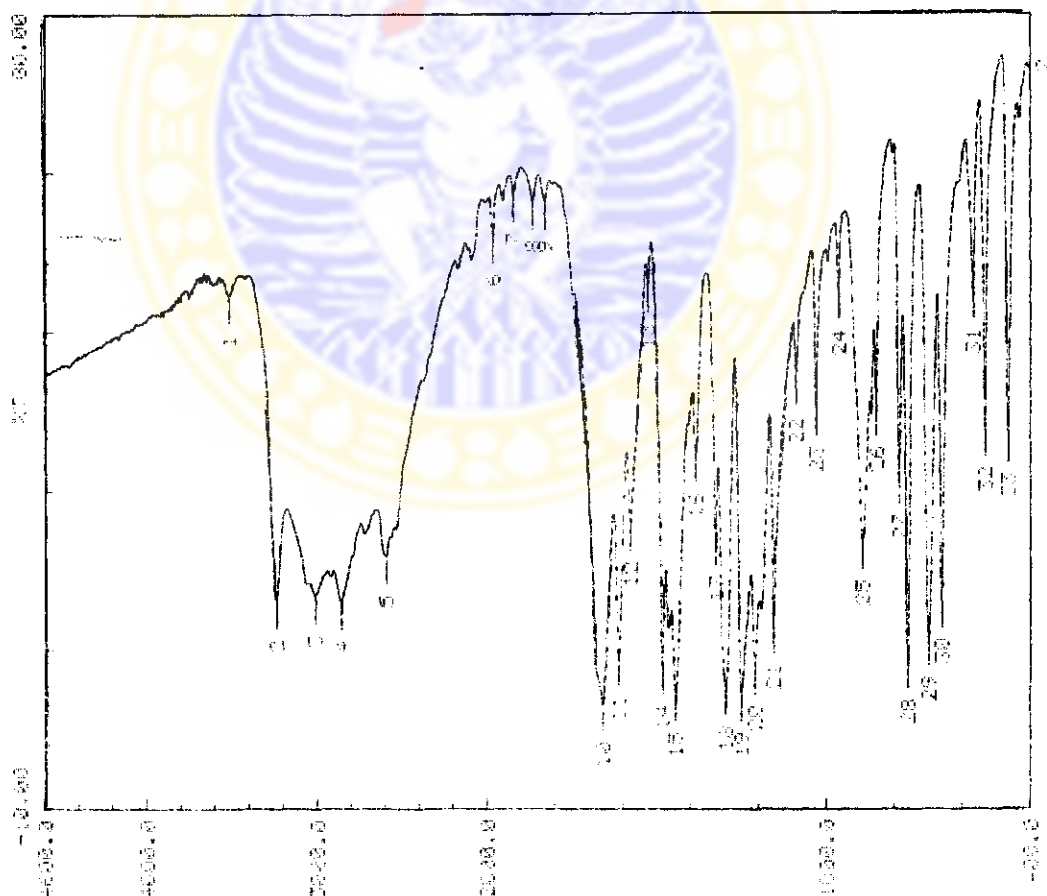
Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dan gugus-gugus yang terdapat pada spektrum senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel V.5.

**Tabel V.5 karakteristik spektrum Inframerah senyawa hasil sintesis**

Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Gugus Fungsi	Pustaka (Silverstein, 1991)
3007 (2)	O-H, Asam Karboksilat	2500-3300
2870 (3)	C-H, Aromatis	2600-2900
1703 (8)	C=O, Asam Karboksilat	1706-1720
1740 (7)	C=O, Ester	1735-1750
1312 (14) ; 1265 (15)	C-O, Ester	1110-1300
1605 (9) ; 1576 (10)	C=C, Aromatis	1500-1990

Spektrum inframerah senyawa Asam salisilat dapat dilihat pada Gambar

5.4.



**Gambar 5.4 Spektrum Inframerah senyawa Asam salisilat**

Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) dan gugus-gugus yang terdapat pada spektrum senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel V.6.

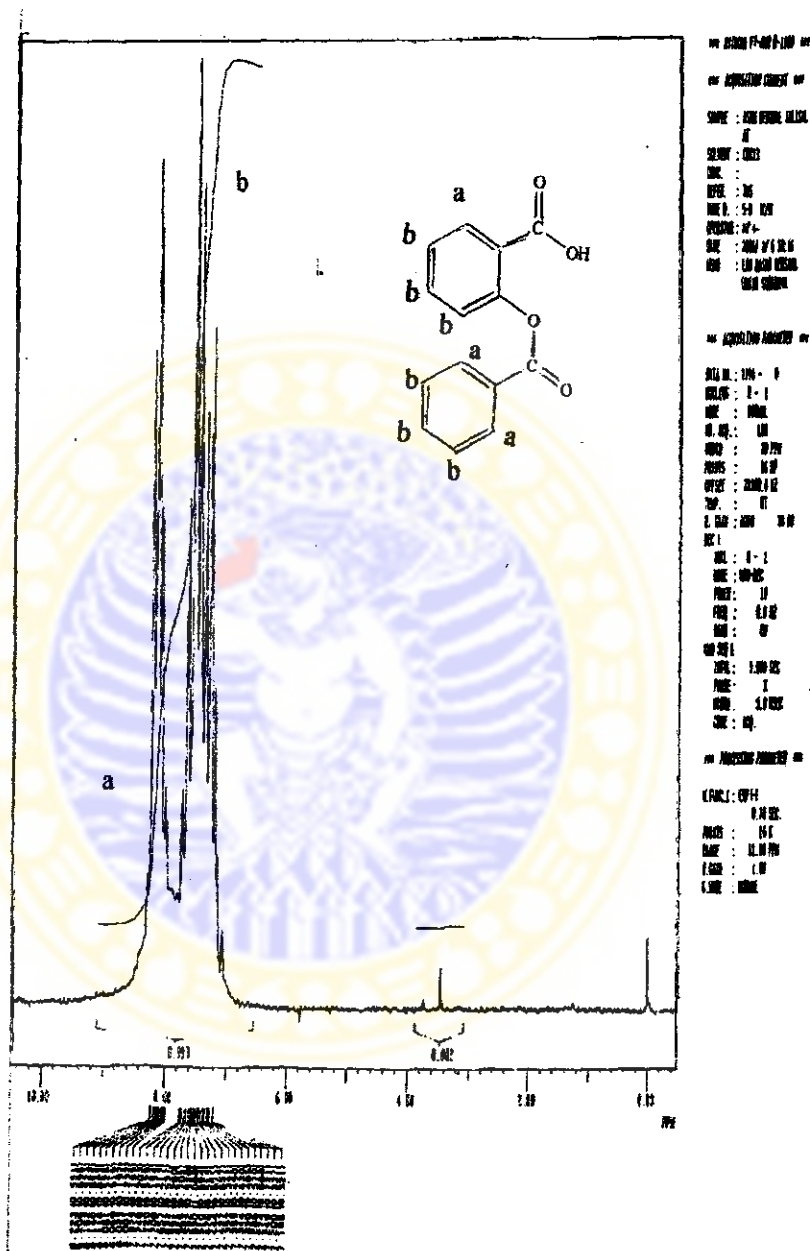
**Tabel V.6 karakteristik spektrum Inframerah senyawa Asam salisilat**

Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Gugus fungsi	Pustaka (Silverstein, 1991)
3524 (1)	OH, Fenolat	3000-3750
2858 (4)	OH, Asam karboksilat	2500-3300
2594 (5)	C-H, Alifatis	2300-2600
1867 (8)	C=C, Aromatis	1500-1990
1658 (10)	C=O, Asam Karboksilat	1709-1720

Spektrum Inframerah senyawa hasil sintesis menunjukkan adanya gugus karbonil ester pada  $1740 \text{ cm}^{-1}$ . Hal ini menunjukkan perbedaan dengan karakteristik spektrum inframerah pada senyawa awal reaksi (asam salisilat) yang tidak menunjukkan adanya gugus karbonil ester. Perbedaan lain yaitu adanya gugus OH fenolat pada spektrum inframerah asam salisilat pada  $3524 \text{ cm}^{-1}$  yang tidak ditunjukkan pada spektrum inframerah senyawa hasil sintesis. Baik pada asam salisilat dan senyawa hasil sintesis terdapat gugus O-H karboksilat, yaitu pada panjang gelombang antar  $2500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ . Hal ini berarti pada hasil sintesis sudah tidak ada gugus O-H fenolat, sebagai gantinya terdapat gugus ester. Diduga senyawa hasil sintesis adalah suatu ester yang mengandung gugus karboksilat (COOH).

### 5.3.3 Analisis Dengan Resonansi Magnet Inti ( $^1\text{H-NMR}$ )

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dalam pelarut  $\text{CDCl}_3$  dari senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada gambar 5.5.



Gambar 5.5 Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa hasil sintesis

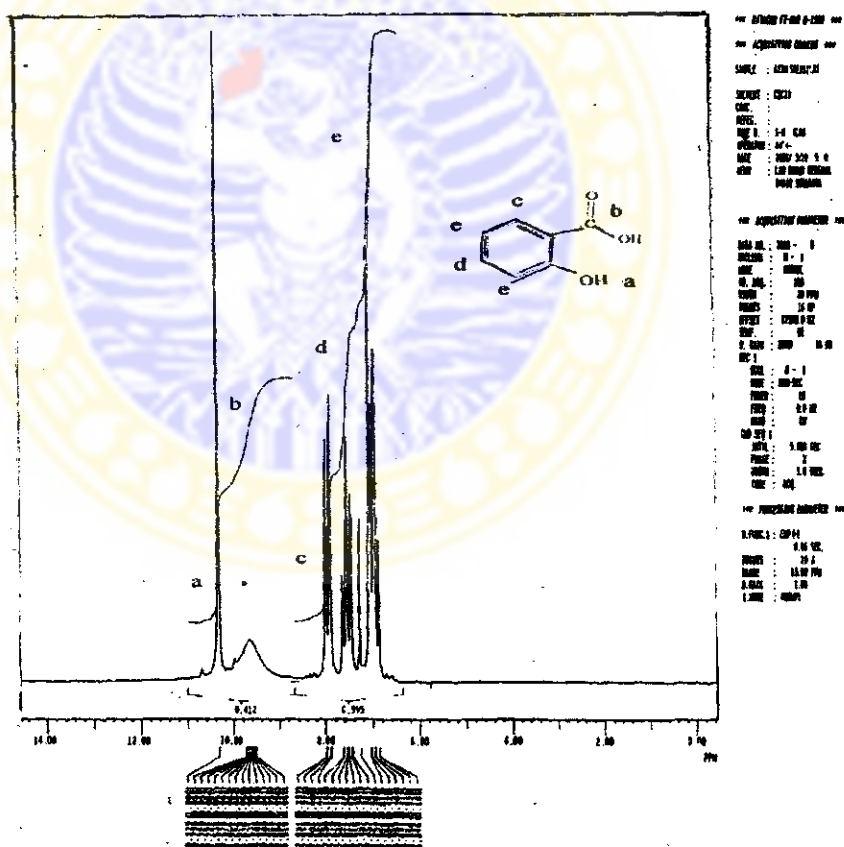


Dari spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dapat diamati puncak-puncak dengan geseran kimia ( $\delta$ ) yang menunjukkan jumlah atom H beserta letak atom H pada gugus-gugus senyawa hasil sintesis pada Tabel V.7

**Tabel V.7 Karakteristik Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa hasil sintesis**

$\delta$ (ppm)	Atom H dari gugus	Jumlah H
8,00-8,21	=CH benzena (a)	3H
7,25-7,98	=CH benzena (b)	6H

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dalam pelarut  $\text{CDCl}_3$  dari senyawa Asam salisilat dapat dilihat pada gambar 5.7.



**Gambar 5.6 Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa Asam salisilat**

Dari spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dapat diamati puncak-puncak dengan geseran kimia ( $\delta$ ) yang menunjukkan jumlah atom H beserta letak atom H pada gugus-gugus senyawa hasil sintesis pada Tabel V.8

**Tabel V.8 Karakteristik Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa Asam salisilat**

$\delta$ (ppm)	Atom H dari gugus	Jumlah H
10,329	-OH Fenolat (a)	1 H
9,539 -9,739	-COOH (b)	1 H
7,884 – 7,991	=CH Benzena (c)	1 H
7,457 – 7,630	=CH Benzena (d)	1H
6,846 – 7, 254	=CH Benzena (e)	2H

Data karakteristik spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa hasil sintesis pada tabel V.7 menunjukkan perbedaan dengan spektrum  $^1\text{H-NMR}$  asam salisilat sebagai senyawa awal reaksi. Perbedaan yang terjadi antara lain bahwa pada asam salisilat atom H dari gugus OH fenolat pada geseran kimia ( $\delta$ ) 10-12 ppm, sedangkan pada senyawa hasil sintesis tidak terdapat puncak pada geseran kimia tersebut. Perbedaan lain, yaitu pada geseran kimia ( $\delta$ ) 7-8 ppm, asam salisilat menunjukkan jumlah atom H dari gugus =CH Benzena sebanyak 4 H, sedangkan pada senyawa hasil sintesis menunjukkan jumlah atom H dari gugus =CH Benzena sebanyak 9 H.

Dari analisis kualitatif dan identifikasi baik secara kualitatif maupun pada identifikasi struktur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer Inframerah dan spektrometer Resonansi Magnet Inti ( $^1\text{H-NMR}$ ), dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah asam *O*-Benzoilsalisilat.

#### 5.4 Uji Aktivitas Analgesik

Aktivitas analgesik ditentukan dengan cara menilai kemampuannya dalam menekan atau menghilangkan rasa nyeri yang dapat diinduksi secara kimia, yaitu dengan cara mengamati penurunan respon nyeri (frekuensi geliat) yang ditunjukkan oleh mencit pada kelompok uji (dengan pemberian senyawa asam *O*-benzoilsalisilat) dibandingkan dengan frekuensi geliat pada mencit pada kelompok yang tidak diberi obat (kontrol). Aktivitas dapat dihitung sebagai prosentase hambatan nyeri.

##### 5.4.1 Frekuensi Geliat Mencit

Frekuensi geliat terjadi akibat induksi larutan asam asetat 30 menit setelah pemberian senyawa uji (asam *O*-benzoilsalisilat) dan senyawa pembanding (asam asetilsalisilat) dengan dosis masing-masing 100 mg/kgBB, serta kelompok kontrol yaitu pemberian CMC Na 0,5%. Hasil pengamatan respon nyeri tersebut dapat dilihat pada Tabel V.9.

**Tabel V.9 Frekuensi geliat mencit selama 30 menit pada dosis 100 mg/kg BB**

No. Mencit	Frekuensi geliat selama 30 menit		
	Kelompok uji	Kelompok pembanding	Kelompok kontrol
1	10	12	24
2	15	13	25
3	15	13	27
4	15	14	28
5	17	15	31
6	19	16	34
7	20	17	36
8	20	17	41
9	22	20	43
10	22	24	46
Rata-rata SD	17,5 3,61	16,1 3,66	33,5 7,82

Keterangan :

- Kelompok uji : kelompok yang diberi senyawa uji asam *O*-benzoilsalisilat.
- Kelompok pembanding : kelompok yang diberi senyawa pembanding asam asetilsalisilat.
- Kelompok kontrol : kelompok yang hanya diberi CMC Na 0,5 %.

Tabel V.9 tersebut, menunjukkan frekuensi geliat pada mencit kelompok uji dan pembanding lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan adanya penurunan frekuensi geliat.

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna pada frekuensi geliat antara kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol, maka dilakukan perhitungan ANOVA (lampiran 1) dan dilanjutkan dengan uji LSD (Lampiran 2). Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan harga  $P= 0,000$  , harga  $P < 0,05$  pada  $\alpha= 0,05$ , berarti ada perbedaan bermakna antar kelompok. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat beda antara kelompok uji dengan kontrol dan kelompok pembanding dengan kontrol, tetapi tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok uji dengan pembanding, sehingga dapat diartikan bahwa senyawa uji mempunyai aktivitas analgesik dan aktivitasnya sebanding dengan asam asetilsalisilat. Untuk menentukan aktivitas analgesik senyawa maka dihitung prosentase hambatan nyeri dengan menggunakan data frekuensi geliat tersebut.

#### 5.4.2 Perhitungan % Hambatan Nyeri

Berdasarkan data frekuensi geliat kelompok uji, kelompok pembanding, dan kelompok kontrol, dapat dihitung persentase hambatan nyeri (Lampiran 3). Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri dapat dilihat pada Tabel V.10.

**Tabel V.10 Hasil perhitungan persentase hambatan nyeri pada kelompok yang diberi senyawa uji asam *O*-benzoilsalisilat dan asam asetilsalisilat**

Senyawa	% Hambatan nyeri
Asam <i>O</i> -benzoilsalisilat	47,76%
Asam asetilsalisilat	51,94 %

Data Tabel V.10 menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis asam *O*-benzoilsalisilat menghasilkan hambatan nyeri yang hampir sama dengan asam asetilsalisilat.



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, senyawa yang diuji aktivitas analgesiknya adalah senyawa turunan asam salisilat yaitu asam asetilsalisilat dan senyawa hasil sintesis yaitu asam *O*-benzoilsalisilat. Asam *O*-benzoilsalisilat adalah ester salisilat asam benzoat, yang dapat dibuat dari asam salisilat dan benzoil klorida melalui reaksi asilasi. Pada reaksi ini gugus OH asam salisilat bertindak sebagai nukleofil yang akan diasilasi oleh gugus  $-C=O$  dari benzoil klorida. Asilasi asam salisilat dengan benzoil klorida dapat dilakukan dengan metode Schotten-Baumann, pada penelitian ini digunakan piridin untuk mengikat HCl yang terbentuk. Pada sintesis asam *O*-benzoilsalisilat ini, digunakan piridin karena selain dapat mengikat HCl yang merupakan hasil samping reaksi, piridin juga sekaligus dapat berfungsi sebagai pelarut. Dipilih penggunaan piridin juga karena piridin tidak mengandung air yang dikhawatirkan dapat mengganggu proses sintesis dari asam *O*-benzoilsalisilat.

Setelah terbentuk hasil reaksi maka dilakukan uji kualitatif yang meliputi pengamatan organoleptis, kelarutan dan reaksi warna. Dari pemeriksaan organoleptis diperoleh suatu senyawa yang mempunyai bentuk berupa serbuk kristal berwarna putih, berbau khas dan berasa tebal dilidah. Senyawa hasil sintesis tidak larut dalam air dan *n*-heksana, tetapi larut dalam metanol, etanol, kloroform, dan aseton. Prosentase hasil yang diperoleh adalah sebanyak 68,12 %. Dengan reaksi warna pada penambahan  $FeCl_3$  menghasilkan warna kuning kecoklatan, sedangkan pada zat yang dilarutkan dengan metanol lalu ditambahkan  $FeCl_3$  akan menghasilkan warna ungu. Reaksi dengan  $FeCl_3$  ini bertujuan untuk mengetahui adanya gugus OH fenolat ( OH pada inti benzena ) yang berasal dari asam salisilat. Apabila zat yang langsung ditambahkan  $FeCl_3$  tidak memberikan warna ungu, maka zat tersebut tidak mengandung gugus OH fenolat pada inti benzenanya. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada senyawa hasil sintesis tidak terdapat gugus OH fenolat karena warna yang dihasilkan adalah kuning kecoklatan.

Untuk menentukan kemurniannya dilakukan penentuan jarak lebur yang menghasilkan jarak lebur antara 108-110°C. Jarak lebur yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan dengan jarak lebur dari zat awal. Penentuan jarak lebur ini dilakukan dengan menggunakan alat *Fisher electrothermal melting point apparatus*, dan dilakukan tiga kali replikasi. Dan jarak lebur yang dihasilkan dengan melakukan replikasi tiga kali menunjukkan hasil yang mempunyai perbedaan yang kecil, dimana indikator dari kemurnian dari suatu zat adalah yang mempunyai perbedaan jarak lebur yang kecil yaitu 1-2° (Adam and Johnson, 1949). Dengan demikian dapat diartikan bahwa zat tersebut murni.

Pada pemeriksaan dengan KLT menggunakan 3 eluen yang berbeda menghasilkan  $R_f = 0,76$  yaitu dengan eluen etil asetat – *n* heksan (7:3),  $R_f = 0,83$  yaitu dengan eluen etil asetat-methanol (8:3),  $R_f = 0,6$  yaitu dengan eluen kloroform-aseton (8:2). Zat hasil sintesis bersifat lebih non polar, diduga zat hasil sintesis adalah gabungan struktur asam salisilat dengan benzoil klorida membentuk senyawa yang bersifat lebih non polar daripada asam salisilat.

Pada pemeriksaan dengan spektrofotometri UV-Vis, terdapat satu puncak serapan yaitu pada  $\lambda$  227,0 nm, berbeda dengan struktur salisilat yang mempunyai puncak serapan pada  $\lambda$  231,8 nm dan pada  $\lambda$  299,0 nm. Tidak adanya puncak serapan pada  $\lambda$  299,0 nm, kemungkinan disebabkan oleh hilangnya gugus –OH, dengan masuknya gugus benzoil.

Pemeriksaan dengan spektrofotometri FT-IR, menunjukkan bahwa senyawa mengandung gugus C=O ester dan gugus COOH. Berarti senyawa hasil sintesis adalah ester yang terbentuk dari asam salisilat yang atom H gugus fenolnya disubstitusi oleh gugus benzoil.

Pada pemeriksaan dengan spektrometer <sup>1</sup>H-NMR, pada  $\delta = 7,25-8,21$  ppm terdapat puncak yang merupakan H dari cincin benzena dengan jumlah 9 H, yang bila dilihat dari strukturnya merupakan jumlah H dari cincin benzena pada asam salisilat dan cincin benzena gugus benzoil. Dengan demikian hasil sintesis adalah senyawa asam *O*-Benzoilsalisilat.

Pada metode uji aktivitas analgesik ini digunakan dosis 100 mg/kg bb. Penentuan dosis ini dilakukan berdasarkan nilai ED<sub>50</sub> senyawa pembanding, yaitu senyawa asam asetilsalisilat, sebesar 101 mg/kg bb (Diyah dkk, 2002). Aktivitas

hambatan nyeri ditentukan dengan cara menentukan penurunan frekuensi geliat dengan adanya pemberian senyawa analgesik (pada kelompok uji dan kelompok pembanding) dibandingkan dengan frekuensi geliat tanpa adanya senyawa tersebut (kelompok kontrol). Frekuensi geliat pada masing-masing kelompok (uji, pembanding dan kontrol) dihitung setelah lima menit dari induksi asam asetat. Waktu lima menit ini menunjukkan mula kerja asam asetat dalam menimbulkan nyeri. Obat diberikan 20 menit sebelum induksi asam asetat untuk memberikan kesempatan agar pada saat diuji senyawa sudah terabsorpsi dan bekerja pada tempat kerjanya. Pengamatan tersebut dilakukan selama 30 menit karena lama nyeri akibat induksi asam asetat itu adalah 30 menit.

Untuk mengetahui apakah hasil frekuensi geliat senyawa uji (asam *O*-Benzoilsalisilat) dan asam asetilsalisilat lebih kecil daripada kontrol maka dilakukan uji ANOVA (lampiran 1). Hasil perhitungan ANOVA menunjukkan harga  $P = 0,000$ , harga  $P < 0,05$  pada  $\alpha = 0,05$ , berarti ada perbedaan bermakna antar kelompok. Setelah dilakukan perhitungan ANOVA maka dilakukan uji LSD (Lampiran 2), hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat beda antara kelompok uji dengan kontrol dan kelompok pembanding dengan kontrol, tetapi tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok uji dengan pembanding, sehingga dapat diartikan bahwa senyawa uji dapat menurunkan frekuensi geliat sehingga senyawa uji dinyatakan mempunyai aktivitas analgesik. Untuk menentukan aktivitas analgesik senyawa maka dihitung prosentase hambatan nyeri dengan menggunakan data frekuensi geliat tersebut. Presentase hambatan nyeri senyawa *O*-benzoilsalisilat adalah sebesar 47,76 % sedangkan persentase hambatan nyeri senyawa asam asetilsalisilat adalah sebesar 51,94 %. Meskipun persentase hambatan nyeri senyawa asam *O*-benzoilsalisilat lebih rendah daripada asam asetilsalisilat, tetapi penurunan frekuensi geliat kedua senyawa tidak berbeda secara bermakna.

Senyawa asam *O*-benzoilsalisilat merupakan hasil modifikasi gugus fenolat asam salisilat, yang atom hidrogen gugus fenolatnya diganti dengan gugus benzoil. Dengan masuknya gugus benzoil maka didapatkan senyawa yang lebih lipofilik dari pada asam asetilsalisilat. Asam *O*-benzoilsalisilat ini mempunyai tetapan fragmentasi hidrofobik *Rekker* yang lebih tinggi daripada asam



asetisalisilat, yaitu sebesar 2,562, sedangkan asam asetilsalisilat mempunyai fragmentasi hidrofobik Rekker = 1,370. Pada penelitian ini diketahui bahwa asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik. Sifat lipofilik dan struktur senyawa memenuhi ciri-ciri umum senyawa AINS sehingga dapat menghasilkan efek, tetapi jika dibandingkan dengan asam asetilsalisilat aktivitasnya tidak lebih besar. Hal ini karena disamping sifat lipofilik, aktivitas analgesik juga dipengaruhi oleh sifat sterik. Efek sterik gugus benzoil lebih besar daripada gugus asetil. Disamping itu diketahui bahwa aktivitas asam asetilsalisilat yang tinggi disebabkan oleh adanya gugus asetil yang mampu mengasetilasi enzim siklooksigenase secara irreversibel (Wolff, 1981). Oleh karena itu masih perlu diketahui apakah senyawa bekerja dengan mekanisme yang sama.

Hasil uji aktivitas biologis yang dilakukan dapat digunakan sebagai dasar untuk mengembangkan senyawa asam *O*-benzoilsalisilat sebagai calon obat kelompok AINS. Namun demikian, perlu diketahui lebih dahulu toksisitas dari senyawa asam *O*-benzoilsalisilat berdasarkan LD<sub>50</sub> nya.

## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **KESIMPULAN**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Senyawa asam *O*-benzoilsalisilat dapat diperoleh dari reaksi antara asam salisilat dan benzoil klorida dalam pelarut piridin, dengan hasil sebesar 68,12 %.
2. Asam *O*-benzoilsalisilat mempunyai aktivitas analgesik yang ditunjukkan dengan persentase hambatan nyeri sebesar 47,76 % pada dosis 100 mg/kg BB. Aktivitas analgesik tersebut tidak berbeda bermakna dengan asam asetilsalisilat yang mempunyai persentase hambatan nyeri sebesar 51,94 % pada dosis yang sama.

#### **SARAN**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka disarankan agar ditentukan LD<sub>50</sub> dan ED<sub>50</sub> asam *O*-benzoilsalisilat. Berdasarkan data LD<sub>50</sub> yang didapat, jika senyawa relatif tidak toksik maka senyawa dapat diteliti lebih lanjut untuk dikembangkan sebagai calon obat NSAID.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R., and Johnson, J.R., 1949. **Laboratory Experiment In Organic Chemistry**, 4<sup>th</sup> edition, The Macmillan Company, Toronto, p.55.
- Budavari, S., O'neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P. E., and Kinneary, J.F., 2001. **The Merck Index**, 13<sup>th</sup> edition, New Jersey : Merck & Co.Inc., p.67, 8060.
- Dipalma, J.R., 1971. **Drill's Pharmacology in Medicine**, 4<sup>th</sup> edition. Mc. Graw Hill Book Com, Ablakiston, pp. 272-276.
- Diyah, N.W., Purwanto, B.T., Susilowati, R., 2002. Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Asam *O*-(4-Butilbenzoil)salisilat Hasil Sintesis Pada Mencit, **laporan penelitian**. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Diyah, N.W. 1998. Hubungan Struktur dan Aktivitas Antiinflamasi turunan Asam salisilat. **Tesis**. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Domer, F.R., 1971. **Animal Experimental in Pharmacological analysis**, Charles Thomas Publisher, Louisiana, pp. 275-317.
- Ekasari, W., Prajogo, B., Widyawaruyanti, A., Rahman, A., Sukardiman., 1998. Uji Analgetika Daun Pronojiwo (*Pachystachys recceinea*) Dengan Metode *Writing Test*, **Laporan penelitian**. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 1-4.
- Foye, W.O., 1981. **Principle of Medicinal Chemistry**. Ed. 2. Henry Kimpton, Boston, pp. 483-484.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S., 1982. **Kimia Organik**. Diterjemahkan oleh A.H. Pudjaatmaka. Edisi ke-2. Erlangga, Jakarta.
- Gringauz, A., 1997. **Introduction to Medicinal Chemistry How Drugs Act and Why**. Willey. VCH, New York, pp. 141-167.
- Ganiswarna, S., 1995. **Farmakologi dan Terapi**, edisi keempat, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta

- Insel, P. A., 1992. Analgesics-Antipyretics and Antiinflammatory Agents; Drug Employed in The Treatment of Rheumatoid Acthritis and Gout. Dalam A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, dan P. Taylor (eds). **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8<sup>th</sup> Ed. Vol. 1. Mc Graw-Hill Inc., New York. pp. 87-90.
- Korolkovas, A., 1988. **Essentials of Medicinal Chemistry**. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley and Sons, New York, pp. 252-253.
- Murry, J.Mc., 1984. **Organic Chemistry**. Cornell University, Monterey, pp.770-771, 783.
- Neal, M.J., 1992. **Medical Pharmacology at Glance**. 2 nd ed. Blackwell Scientific Publications, pp. 66-67.
- Silverstein, A.M., Bassler, G.C., and Mortil, T.C., 1991. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, Fifth edition, New York : John Willey & Sons. Inc.
- Studiawan, H., 1995. Studi Khasiat Analgesik Rimpang Beberapa Tanaman Suku Zingiberaceae Dengan Metode Geliat Dan Profil Kandungannya Secara Densitometri, **Laporan Penelitian**, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya, pp. 44-49.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal 2**, Airlangga University Press, Surabaya, hal 283-307.
- Shearn, M.A., 1989. Obat Antiinflamasi NonSteroid; Analgesik Nonopiat; obat yang Digunakan pada Gout. Dalam B.G. Katzung (ed.). **Farmakologi Dasar dan Klinik**. Diterjemahkan oleh P. Adrianto. Edisi ke-2. EGC, Jakarta, hal 474-479.
- Tjay T. H., Rahardja K., 2002. **Obat-obat penting**, edisi ketiga, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, hal 295-297.
- Turner, R.A., 1965. **Screening Method in Pharmacology**. Vol. 1. Academic Press. New York, pp. 100-117.
- Willette, R.E. 1991. Analgesic Agents. Dalam J.N. Delgano dan W.A. Remers (eds.). **Wilson and Gisvold's Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. 9<sup>th</sup> Ed. J.B. Lippincott, Philadelphia, pp. 656-662.

Wolff, M.E., 1981. **Burger's Medicinal Chemistry**. Ed 4. John Wiley and Sons, San Francisco, p.1215.

Svehla, G., 1985. **Vogel Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro**, diterjemahkan oleh L. Setiono., A.H.Pudjaatmaka. edisi ke-5. Kalman media pustaka, Jakarta. pp 402-403.

Hardwood, L.M., M oddy, C.J., 1989. **Experimental Organik Chemistry Principal and Practice**, Publication Oxford, London. Pp. 557-558.

Rekker, R.F., Mannhold, R., 1992. **Calculation Of Drug Lipophilicity**, VCH, New york. pp. 24-34.



**Lampiran 1**

Hasil Perhitungan uji ANOVA fekuensi geliat antar kelompok senyawa asam *O*-benzoilsalisilat, kelompok senyawa asam asetilsalisilat, dan kelompok kontrol

<b>Mencit</b>	<b>Geliat</b>
1	10
1	15
1	15
1	15
1	17
1	19
1	20
1	20
1	22
1	22
2	12
2	13
2	13
2	14
2	15
2	16
2	17
2	17
2	20
2	24
3	24
3	25
3	27
3	28
3	31
3	34
3	36
3	41
3	43
3	46

**Oneway****ANOVA**

geliat					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1869.067	2	934.533	31.466	.000
Within Groups	801.900	27	29.700		
Total	2670.967	29			

## Lampiran 2

Hasil Uji LSD antara kelompok senyawa asam O-benzoilsalisilat, kelompok senyawa asam asetilsalisilat, dan kelompok kontrol

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: geliat

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	1.40000	2.43721	.570	-3.6007	6.4007
	3.00	-16.00000*	2.43721	.000	-21.0007	-10.9993
2.00	1.00	-1.40000	2.43721	.570	-6.4007	3.6007
	3.00	-17.40000*	2.43721	.000	-22.4007	-12.3993
3.00	1.00	16.00000*	2.43721	.000	10.9993	21.0007
	2.00	17.40000*	2.43721	.000	12.3993	22.4007

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

$$\begin{aligned}
 \text{LSD} &= t_{\alpha/2; N-k} \sqrt{\frac{2MSE}{n}} \\
 &= t_{0,025; 27} \sqrt{\frac{2 \times 29,700}{10}} \\
 &= 2,05 \times 2,44 \\
 &= 5,00
 \end{aligned}$$

**Lampiran 3**

**Perhitungan Persentase Hambatan Senyawa Uji (asam *O*-benzoilsalisilat) dan senyawa asam asetilsalisilat**

$$\% \text{ Hambatan} = \left( 1 - \frac{f_T}{f_K} \right) \times 100 \%$$

**Keterangan :**

$f_T$  : Frekuensi geliat mencit kelompok uji (senyawa uji asam *O*-benzoilsalisilat) atau kelompok pembanding (senyawa asam asetilsalisilat)

$f_K$  : Frekuensi geliat mencit kelompok kontrol

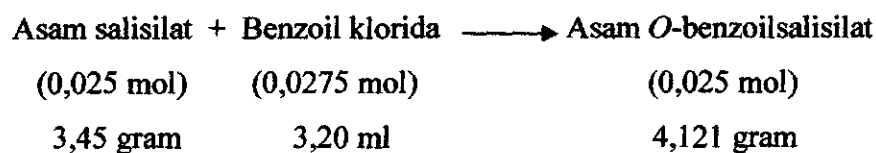
- % Hambatan senyawa uji (asam *O*-benzoilsalisilat) :

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= \left( 1 - \frac{17,5}{33,5} \right) \times 100\% \\ &= 47,76\% \end{aligned}$$

- % Hambatan senyawa pembanding (asam asetilsalisilat) :

$$\begin{aligned} \% \text{ Hambatan} &= \left( 1 - \frac{16,1}{33,5} \right) \times 100\% \\ &= 51,94\% \end{aligned}$$



**Lampiran 4****Perhitungan persentase hasil sintesis**

- Asam salisilat (  $C_7H_6O_3$  )  
BM = 138,12
- Benzoil klorida (  $C_7H_5OCl$  )  
BM = 140,57
- Asam *O*-benzoilsalisilat (  $C_{14}H_{10}O_4$  )  
BM = 242

Hasil senyawa Asam *O*-benzoilsalisilat secara teoritis adalah :

$$\begin{aligned}
 &= 0,025 \times \text{BM} \\
 &= 0,025 \times 242 \\
 &= 6,05 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

Hasil senyawa Asam *O*-benzoilsalisilat yang diperoleh sebenarnya adalah :

$$= 4,121 \text{ gram}$$

Jadi persentase hasil senyawa Asam *O*-benzoilsalisilat yang diperoleh adalah sebesar :

$$\begin{aligned}
 \text{Persentase hasil} &= \frac{4,121 \text{ gram}}{6,05 \text{ gram}} \times 100 \% \\
 &= 68,12 \%
 \end{aligned}$$

**Lampiran 5**



**Gambar mencit sebelum perlakuan**



**Gambar mencit setelah perlakuan**

**Lampiran 6**



**Gambar penyuntikan mencit secara intraperitoneal**