

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI SENYAWA 1-ALIL-3-BENZOILTIOUREA SECARA *IN VIVO* TERHADAP TIKUS WISTAR JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DENGAN KARAGENAN

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



**Oleh :
Habsari Yusrindra Siwi
155070500111010**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

SINTESIS DAN UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI SENYAWA 1-ALIL-3-BENZOILTHIOUREA SECARA *IN VIVO* TERHADAP TIKUS WISTAR JANTAN (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DENGAN KARAGENAN

Oleh:

Habsari Yusrindra Siwi

NIM 155070500111010

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 28 Desember 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Ferri Widodo, S.Si., M.Biomed., Apt.

NIP : 2009127503151001

Pembimbing I

Alvan Febrian Shalas, S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP. 2011068502181001

Pembimbing II

Rudy Salam, S.Farm., M.Biomed., Apt.

NIP. 200912506121001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi

Alvan Febrian Shalas, S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP. 2011068502181001

ABSTRAK

Siwi, Habsari Yusrindra.2018. **Sintesis Dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa 1-Alil-3-benzoiltiourea Secara *In Vivo* Terhadap Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Dengan Karagenan.**Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Alvan Febrian Shalas, M.Farm, Apt. (2) Rudy Salam, M.Biomed., Apt.

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera atau kerusakan jaringan. Untuk mengatasi inflamasi salah satunya dengan menggunakan obat AINS (Antiinflamasi Non steroid). Nyeri abdomen, ulcer pada gaster dan duodenal, diare, *pancreatis gastrointestinal hemorrhage*, hepatotoksik, serta gangguan fungsi ginjal merupakan efek samping yang umum terjadi. Sehingga dibutuhkan pencarian dan pengembangan senyawa penuntun baru yang memiliki potensi yang lebih baik dengan efek samping yang rendah. Senyawa benzoiltiourea diketahui memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi. Modifikasi struktur dilakukan dalam pengembangan obat untuk mendapatkan senyawa yang lebih baik. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dan mengetahui potensi antiinflamasi senyawa tersebut. Sintesis dilakukan dengan menggunakan metode Schotten-Baumann dengan reaksi substitusi asil nukleofilik senyawa aliltiourea terhadap senyawa benzoil klorida serta uji aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan pemberian senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea terhadap kelompok perlakuan secara oral dalam suspensi CMC-Na 1% b/v dengan dosis 6,25 mg/kgBB, 12,5 mg/kgBB, dan 25 mg/kgBB pada tikus wistar jantan yang telah diinduksi dengan karagenan 1% secara intraplantar pada telapak kaki. Kelompok kontrol diberikan suspensi CMC-Na 1% b/v dan kelompok pembanding diberikan natrium diklofenak 12,5 mg/kgBB dalam suspensi CMC-Na 1% b/v dengan rute pemberian yang sama. Parameter yang diamati adalah volume edema kaki tikus yang diukur menggunakan pletismometer pada jam ke-1, 2, 3, dan 4. Hasil sintesis didapatkan produk yang murni dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) yang kemudian struktur produk dikonfirmasi menggunakan spektrofotometer IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, dan spektroskopi massa adalah 1-alil-3-benzoiltiourea dengan rumus molekul $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$. Hasil uji antiinflamasi menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dalam semua dosis tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara setiap dosis dengan natrium diklofenak dosis 12,5 mg/kgBB, dengan nilai ED_{50} 2,234 mg/kgBB. Kesimpulan: senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dapat disintesis menggunakan metode Schotten-Baumann melalui reaksi substitusi nukleofilik dan dalam semua dosis tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan natrium diklofenak dosis 12,5 mg/kgBB.

Kata Kunci: sintesis, 1-alil-3-benzoiltiourea, antiinflamasi, benzoil klorida, thiourea

ABSTRACT

Siwi, Habsari Yusrindra.2018. **Synthesis and In Vivo Antiinflammatory Activity Test of 1-allyl-3-benzothiourea Against a Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) Induced By Carrageenan**. Final Assignment, Pharmacy, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Alvan Febrian Shalas, M.Farm, Apt. (2) Rudy Salam, M.Biomed., Apt.

Inflammation is a body response to injury or tissue damage. The most common drug used to treat inflammation is NSAIDs (Non-steroidal anti-inflammatory drugs). Abdominal pain, gastric and duodenal ulcers, diarrhea, *pancreatic gastrointestinal hemorrhage*, hepatotoxicity, and impaired renal function are common side effects caused by NSAIDs. In order to overcome that problem, it takes a new approach and development of a new guiding compounds that have better potential with lower side effects. Benzoylthiourea compounds are known to have analgesic and anti-inflammatory activity. Structural modification is carried out in drug development to obtain a better compounds. This study aims to synthesize 1-allyl-3-benzoylthiourea compounds and determine the anti-inflammatory potential of these compounds. The synthesis was carried out using the Schotten-Baumann method with the acyl nucleophilic substitution reaction of allylthiourea compounds on benzoyl chloride compounds and anti-inflammatory activity tests carried out by administering 1-allyl-3-benzoylthiourea compound to the treatment group orally in CMC-Na 1% b/v suspension with dose of 6.25 mg/kg body weight, 12.5 mg/kg body weight, and 25 mg/kg body weight in male wistar rats which have been induced with 1% carrageenan by intraplantar on the soles of the feet. The control group was given a CMC-Na 1% b/v suspension and the comparison group was given 12.5 mg/kgBB sodium diclofenac in the CMC-Na 1% b/v suspension with the same route of administration. The parameters observed were the volume of leg edema measured by using a pletismometer at 1st, 2nd, 3rd and 4th hours. The pure product were obtained by using thin layer chromatography (TLC), which then the structure confirmed by using IR spectrophotometer, ¹H -NMR, ¹³C-NMR, and mass spectroscopy are 1-allyl-3-benzoylthiourea with the molecular formula C₁₁H₁₂N₂OS. The anti-inflammatory test results showed that the compound 1-allyl-3-benzoylthiourea in all doses showed no significant difference between each dose with diclofenac sodium doses of 12.5 mg/kgBB, with the value ED₅₀ 2,234 mg/kgBB. Conclusion: 1-allyl-3-benzoylthiourea compounds can be synthesized using the Schotten-Baumann method through nucleophilic substitution reactions and in all doses did not show any significant difference with 12.5 mg/kgBB sodium diclofenac.

Keywords: synthesis, 1-allyl-3-benzothiourea, anti-inflammatory, benzoyl chloride, thiourea

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Gambar	xiii
Daftar Tabel.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
Daftar Lampiran.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Inflamasi.....	6
2.2 Obat Anti Inflamasi.....	9
2.3 Reaksi Substitusi Asil Nukleofilik.....	10
2.4 Bahan Baku.....	11

2.4.1 Aliltiourea	11
2.4.2 Benzoi Klorida	11
2.4.3 Natrium Diklofenak	12
2.5 Uji Kemurnian.....	14
2.5.1 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	14
2.6 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis	16
2.6.1 Spektrofotometri IR.....	16
2.6.2 Spektrofotometri ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR	18
2.6.3 Spektrometri Massa.....	19
2.7 Uji Anti Inflamasi dengan Diinduksi Karagenan	20
2.8 Tikus Wistar Jantan.....	20
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	21
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	24
4.2 Subjek Penelitian.....	24
4.3 Variabel Penelitian.....	25
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	26
4.5 Bahan dan Alat.....	26
4.5.1 Bahan.....	26
4.5.2 Alat.....	26
4.6 Prosedur Penelitian	27
4.6.1 Studi Pendahuluan <i>in silico</i>	27
4.6.2 Sintesis Senyawa.....	28

4.6.3 Uji Kemurnian	29
4.6.3.1 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	29
4.6.4 Uji Konfirmasi Struktur.....	29
4.6.4.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR.....	29
4.6.4.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR.....	30
4.6.4.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Massa.....	30
4.6.5 Uji Anti Inflamasi 1-alil-3-benzothiourea.....	31
4.7 Analisis Data.....	32

BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian.....	33
5.1.1 Uji <i>In Silico</i>	33
5.1.2 Sintesis Senyawa BATU-1.....	35
5.1.3 Hasil Uji Kemurnian Senyawa BATU-1 Menggunakan KLT	35
5.1.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-1	36
5.1.4.1 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR	36
5.1.4.2 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR)	37
5.1.4.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-1 dengan Spektroskopi Massa.....	40
5.1.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-benzothiourea.....	42
5.2 Analisis Data.....	44

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian.....	45
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian	53

6.3 Keterbatasan Penelitian.....	53
BAB 7. PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	54
7.2 Saran.....	54
Daftar Pustaka.....	55
Lampiran	59



DAFTAR GAMBAR

2.1 Diagram Perombakan Asam Arachidonat	9
2.2 Mekanisme Sintesis 1-alil-3-benzoiltiourea	11
2.3 Struktur Aliltiourea	11
2.4 Struktur Benzoil Klorida	12
2.5 Struktur Diklofenak.....	13
2.6 Struktur Natrium Diklofenak	14
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
4.1 Prosedur Penelitian.....	27
4.2 Studi Pendahuluan <i>In silico</i>	27
4.3 Sintesis Senyawa	28
4.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	29
4.5 Uji Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometri IR.....	29
4.6 Uji Konfirmasi Struktur Dengan Spektrofotometri ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR	30
4.7 Uji Konfirmasi Struktur Dengan Spektrometri Massa.....	30
4.8 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-benzoilthiourea	31
5.1 <i>Ligand Map</i> Interaksi Senyawa Benzoiltiourea dengan Reseptor 1PXX.....	34
5.2 <i>Ligand Map</i> Interaksi Senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dengan Reseptor 1PXX	34
5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan KLT	36
5.4 Spektra IR Senyawa BATU-1 dalam Pelat KBr	37
5.5 Hasil Spektra ^1H -NMR Senyawa BATU-1	38
5.6 Hasil Spektra ^{13}C -NMR Senyawa BATU-1	39

5.7 Hasil Spektra MS Senyawa BATU-1	41
5.8 Struktur Kimia Senyawa BATU-1	42
6.1 Reaksi Substitusi Nukleofilik	46



DAFTAR TABEL

2.1 Peta Korelasi Serapan Masing-Masing Gugus Fungsi	17
5.1 Hasil Uji Pendahuluan Senyawa 1-alil-3-benzothiourea	33
5.2 Persen Rendemen dari Senyawa Produk BATU-1	35
5.3 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-1	37
5.4 Karakteristik Spektrum ^1H -NMR Senyawa BATU-1	38
5.5 Karakteristik Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa BATU-1	39
5.6 Analisis Fragmen Massa Senyawa BATU-1	41
5.7 Data Hasil Pengukuran Bengkak Kaki	43
5.8 Hasil Analisis <i>Kruskal Wallis</i>	44
5.9 Hasil Probit ED_{50}	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera atau kerusakan jaringan. Ciri-ciri inflamasi ditandai oleh empat karakter yaitu: kemerahan/*rubor*, rasa panas/*kalor*, rasa sakit/*dolor*, pembengkakan/*tumor*. Ciri-ciri tersebut diperantarai oleh mediator yang disebut prostaglandin, yang mempunyai peran penting terhadap perkembangan inflamasi. Biosintesis prostaglandin akan meningkat secara signifikan pada jaringan yang mengalami inflamasi. Enzim siklooksigenase (COX) merupakan enzim yang mempengaruhi produksi prostaglandin (Robbins, 2004).

COX terdiri dari dua isoform, yaitu COX-1 yang berperan sebagai *housekeeping enzyme* dan COX-2 diekspresikan pada sel-sel yang terlibat dalam inflamasi. COX-1 terdapat di banyak jaringan, antara lain di darah, ginjal dan saluran cerna. Zat ini berperan pada pemeliharaan perfusi ginjal, homeostasis vaskuler dan melindungi lambung dengan jalan membentuk bikarbonat dan mukosa, serta menghambat produksi asam. COX-2 dalam keadaan normal tidak terdapat di jaringan, tetapi dibentuk oleh sel-sel radang selama proses inflamasi, yang mana kadarnya dalam sel dapat meningkat hingga 80 kali (Tjay dan Rahardja, 2007). Untuk mengatasi inflamasi salah satunya dengan menggunakan obat AINS (Anti Inflamasi Non Steroid).

Obat AINS (Anti Inflamasi Non Steroid), berdasarkan selektivitas hambatannya dibagi menjadi selektif COX-1 inhibitor (misal: asam asetilsalisilat dosis rendah), non-selektif COX inhibitor (misal: asam asetilsalisilat dosis tinggi, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, piroxicam, indometacin), selektif COX-2 inhibitor (misal: meloxicam, nabumeton) dan sangat selektif COX-2 inhibitor (misal: celecoxib, etorcoxib). Nyeri abdomen, ulcer pada gaster dan duodenal, diare, *pancreatis gastrointestinal hemorrhage*, hepatotoksik, serta gangguan fungsi ginjal merupakan efek samping yang umum terjadi (Sostres *et al.*, 2010). Sehingga dibutuhkan pencarian dan pengembangan senyawa penuntun baru yang memiliki potensi yang lebih baik dengan efek samping yang rendah.

Senyawa turunan tiourea dan urea mempunyai aktivitas biologis yang luas, sebagai antivirus, anti-HIV, antibakteri, maupun aktivitasnya sebagai analgesik dan anti-inflamasi (Kacchadia *et al.*, 2004; Alagarsamy *et al.*, 2004; Kossakowski dan Struga, 2006; Limban *et al.*, 2008; Budiati, 2010). Benzoiltiourea diketahui memiliki aktivitas analgesik lebih baik dibanding natrium diklofenak. Benzoiltiourea (pada dosis 12.5 mg/kgBB, t=30 menit), dengan nilai persen hambatan nyeri sebesar $42.59\% \pm 12.33$ dan nilai persen hambatan nyeri oleh natrium diklofenak sebesar $34.71\% \pm 9.85$ (Budiati, 2010). Aktivitas biologis suatu senyawa dapat ditingkatkan dengan proses homologasi dan substitusi pada cincin aromatis. Menurut Shalas *et al.* (2018), substitusi alil dan kloro pada cincin benzoil dapat meningkatkan aktivitas biologis secara signifikan. Substitusi alil dapat mempengaruhi konformasi suatu senyawa sehingga mempengaruhi fleksibilitas molekul dan mempengaruhi hubungan spasial pada gugus farmakofor. Selanjutnya, penambahan kloro dapat memperkuat ikatan antara senyawa dan reseptor, serta memperpanjang durasi aktivitas senyawa tersebut.

Penelitian pendahuluan *in silico* digunakan untuk mengetahui sifat fisika kimia dari senyawa benzoiltiourea dibandingkan dengan 1-alil-3-benzoiltiourea. Program *Chemdraw Ultra 8.0* dan *Chem3D Ultra 8.0* digunakan untuk mengetahui nilai ClogP (parameter lipofilik), E_{total} (parameter elektronik) dan CMR (parameter sterik). Docking dilakukan antara senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dan benzoiltiourea terhadap reseptor COX-2 dengan kode *Protein Data Bank* (PDB) 1 PXX. Reseptor ini mempunyai ligan diklofenak dalam struktur proteinnya. Hasil studi *in silico* menunjukkan 1-alil-3-benzoiltiourea adalah ClogP sebesar 2,045, nilai E_{total} 10,050 dan nilai CMR sebesar 6,647. Nilai ketiga parameter tersebut lebih baik dibandingkan dengan nilai parameter pada benzoiltiourea yaitu ClogP sebesar 0,566, E_{total} 5,318 dan CMR sebesar 5,281. Berdasarkan hasil uji pendahuluan dapat disimpulkan bahwa 1-alil-3-benzoiltiourea memiliki nilai parameter kimia, fisika dan interaksi dengan COX-2 (PDB) 1 PXX yang lebih baik dibandingkan benzoiltiourea.

Sintesis senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea didapatkan melalui reaksi substitusi asil nukleofilik antara aliltiourea dengan benzoil klorida. Reaksi ini dilakukan melalui reaksi *Schotten-Baumann* termodifikasi yang melalui satu jalur reaksi sehingga efisien. Reaksi ini menggunakan pelarut tetrahidrofur dan basa trietilamin yang berfungsi sebagai penangkap HCl, yang merupakan hasil samping reaksi (Widiandani *et al*, 2013).

Senyawa hasil sintesis, kemudian akan diuji kemurniannya dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan identifikasi nilai R_f menggunakan tiga fase gerak yang polaritasnya berbeda. Langkah selanjutnya, dilakukan uji konfirmasi struktur senyawa hasil sintesis dengan spektrofotometri IR, spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, serta spektrometri Massa.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* pada tikus jenis wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan diinduksi karagenan pada telapak kaki yang diukur volume edemanya secara berkala dengan menggunakan pletismometer yang dibandingkan dengan kontrol positif natrium diklofenak.

Berdasarkan latar belakang di atas, dirancang penelitian untuk mengembangkan senyawa turunan tiourea, yaitu 1-alil-3-benzoiltiourea sebagai antiinflamasi yang dapat memiliki aktivitas yang lebih baik dari OAINS yang sudah beredar.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi asil nukleofilik aliltiourea terhadap benzoil klorida?
2. Apakah senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dibanding natrium diklofenak secara *in vivo* terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karagenan?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian adalah mendapatkan senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea sebagai senyawa penuntun obat anti inflamasi baru

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Memperoleh senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dengan sintesis melalui reaksi substitusi asil nukleofilik terhadap benzoil klorida

2. Membandingkan aktivitas anti inflamasi antara senyawa 1-alil-3-benzoyltiourea dengan Natrium Diklofenak secara *in vivo* terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karagenan

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian ini bermanfaat sebagai dasar bagi penelitian-penelitian selanjutnya untuk mendapatkan senyawa anti inflamasi dari senyawa 1-alil-3-benzoyltiourea

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini bermanfaat sebagai dasar mendapatkan senyawa penuntun obat antiinflamasi yang baru

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflamasi

Inflamasi merupakan respon protektif setempat yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan yang berfungsi untuk menghancurkan, mengurangi atau mengurung (sekuestrasi) jaringan yang cedera itu (Dorland, 2002). Inflamasi (peradangan) merupakan reaksi kompleks pada jaringan ikat yang memiliki vaskularisasi akibat stimulus eksogen maupun endogen. Dalam arti yang paling sederhana, inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas sel serta membuang sel dan jaringan nekrosis yang diakibatkan oleh kerusakan sel (Robbins, 2004).

Penyebab inflamasi antara lain mikroorganisme, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika. Tujuan akhir dari respon inflamasi adalah menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar dapat mengisolasi, menghancurkan atau menginaktifkan agen yang masuk, membersihkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan (Corwin, 2008). Respon inflamasi terjadi dalam 3 fase dan diperantarai mekanisme yang berbeda (Wilmana, 2007) :

1. Fase akut dengan ciri vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler
2. Reaksi lambat, tahap subakut dengan ciri infiltrasi sel leukosit dan fagosit
3. Fase proliferasi kronik, dengan ciri terjadinya degenerasi dan fibrosis

Respon anti inflamasi meliputi kerusakan mikrovaskular, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala proses inflamasi yang sudah dikenal adalah :

1. Kemerahan (Rubor)

Terjadi warna kemerahan ini karena arteri yang mengedarkan darah ke daerah tersebut berdilatasi sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke tempat cidera (Corwin, 2008).

2. Rasa panas (Kalor)

Rasa panas dan warna kemerahan terjadi secara bersamaan. Rasa panas disebabkan karena jumlah darah lebih banyak di tempat radang daripada di daerah lain di sekitar radang. Fenomena panas ini muncul jika terjadi di permukaan kulit. Sedangkan bila terjadi jauh di dalam tubuh tidak dapat dilihat dan dirasakan (Wilmana, 2007).

3. Rasa sakit (Dolor)

Rasa sakit akibat radang dapat disebabkan beberapa hal (Wilmana, 2007):

- a. Adanya peregangan jaringan akibat adanya edema sehingga terjadi peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa nyeri
- b. Adanya pengeluaran zat-zat kimia atau mediator nyeri seperti prostaglandin, histamin, bradikinin yang dapat merangsang saraf-saraf di sekitar radang sehingga dirasakan nyeri

4. Pembengkakan (Tumor)

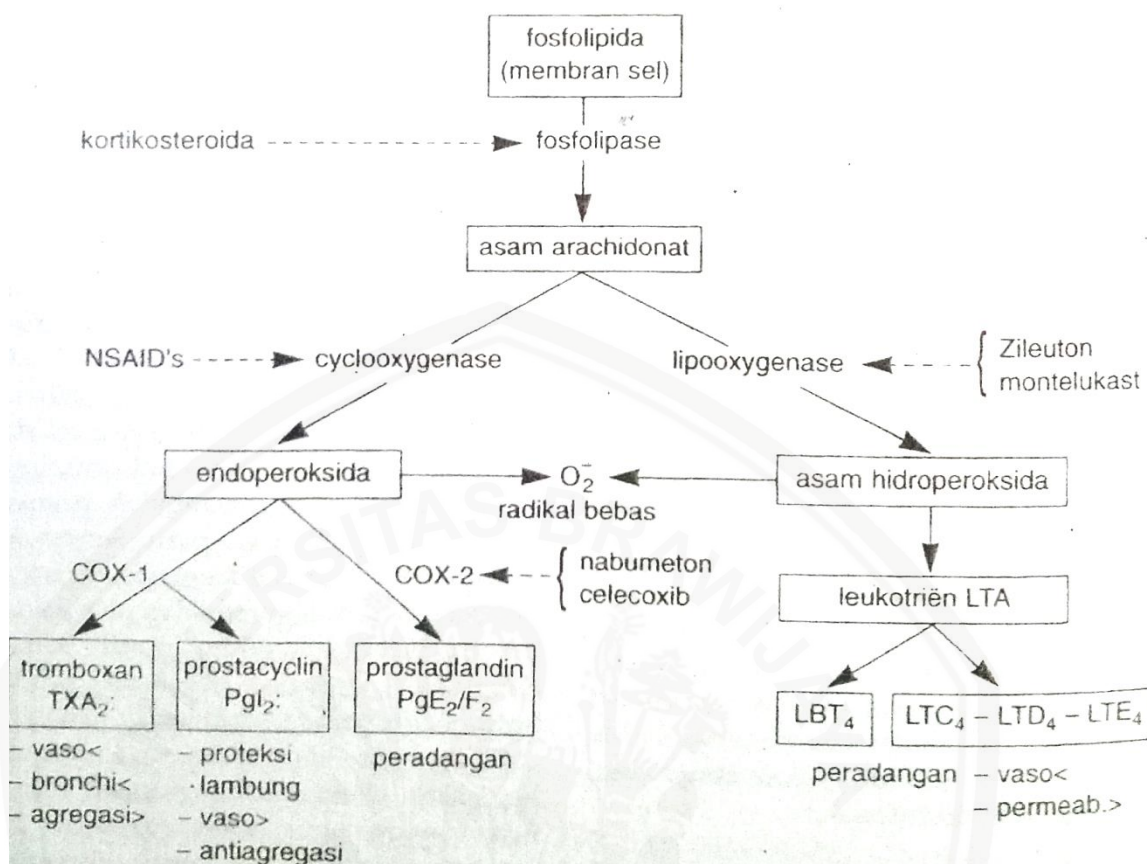
Gejala paling nyata pada peradangan adalah pembengkakan yang disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler, adanya

peningkatan aliran darah dan cairan ke jaringan yang mengalami cedera sehingga protein plasma dapat keluar dari pembuluh darah ke ruang interstitium (Corwin, 2008).

5. *Fungsi laesa*

Fungsi laesa merupakan gangguan fungsi dari jaringan yang terkena inflamasi dan sekitarnya akibat proses inflamasi (Wilmana, 2007).

Mekanisme terjadinya nyeri berhubungan dengan aktivitas enzim *cyclooxygenase* (COX) yang memetabolisme asam arakhidonat menjadi prostaglandin (PG), diantaranya prostaglandin E2 (PGE2) (Sulaiman *et al.*, 2008). COX-1 terdapat di kebanyakan jaringan, antara lain di darah, ginjal dan saluran cerna. Zat ini berperan pada pemeliharaan perfusi ginjal, homeostasis vaskuler dan melindungi lambung dengan jalan membentuk bikarbonat dan mukosa, serta menghambat produksi asam. COX-2 dalam keadaan normal tidak terdapat di jaringan, tetapi dibentuk oleh sel-sel radang selama proses peradangan, kadarnya dalam sel meningkat hingga 80 kali. Penghambatan COX-1 menghindari pembentukan *prostacyclin* (Pgl2) yang berfungsi melindungi mukosa lambung dan ginjal, sehingga melindungi jika terdapat efek samping berupa iritasi lambung-usus serta nefrotoksitasnya. Atas dasar perbedaan ini telah dikembangkan NSAIDs selektif, yang terutama menghambat COX-2 dan kurang atau tidak mempengaruhi COX-1, sehingga Pgl2 tetap dibentuk dan iritasi lambung-usus dapat dihindari (Tjay dan Rahardja, 2007).



Gambar 2.1 Diagram Perombakan Asam Arachidonat (Tjay, 2007).

2.2 Obat Anti Inflamasi

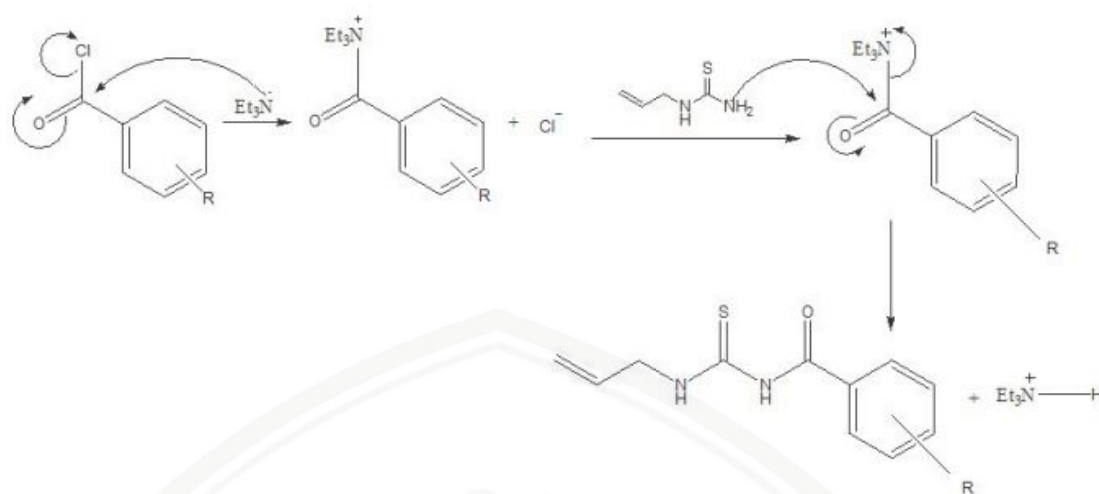
Obat-obat antiinflamasi pada umumnya dibagi menjadi dua kelompok yaitu :

1. Glukokortikoid (golongan steroidal) berdaya menghambat fosfolipase, sehingga pembentukan prostaglandin maupun leukotrien dihalangi. Oleh karena itu efeknya lebih baik daripada NSAIDs. Contohnya golongan prednisolon.
2. *Non Steroidal Antiinflammatory Drugs* (NSAID) yang memiliki sifat anti inflamasi, analgesik dan antipiretik. Efek antipiretiknya baru terlihat pada dosis yang lebih besar daripada efek analgesiknya, dan NSAID relatif

lebih toksik daripada antipiretik klasik, maka obat-obat ini hanya digunakan untuk terapi penyakit inflamasi (Katzung dan Betram, 2004). obat-obat golongan NSAID yang mampu menghambat sintesis nyeri prostaglandin mempunyai struktur kimia yang heterogen dan berbeda di dalam farmakodinamiknya. Oleh karena itu berbagai cara telah diterapkan untuk mengelompokkan NSAID, yaitu menurut 1. Struktur kimia, 2. Tingkat keasaman dan 3. Ketersediaan awalnya (pro-drug atau bukan) dan sekarang berdasarkan selektivitas hambatnya pad COX-1 dan COX-2, apakah selektif COX-1 inhibitor, non- selektif COX inhibitor, *preferentially* selektif COX-2 inhibitor dan sangat selektif COX-2 inhibitor. Khasiat suatu NSAID sangat ditentukan kemampuannya menghambat sintesis prostaglandin melalui hambatan aktivitas COX (Lelo A, 2004).

2.3 Reaksi Substitusi Asil Nukleofilik

Benzoilasi merupakan salah satu reaksi yang penting dalam sintesis senyawa organik. Beberapa pereaksi yang dapat digunakan antara lain benzoil klorida, anhidrida benzoat, benzoil tetrazol dan benzoil sianida. Reaksi benzoilasi (reaksi Schotten-Baumann) adalah metode untuk mensintesis amida dari amina dan asil halida. Reaksi ini pertama kali dilakukan oleh ahli kimia Jerman Schotten pada tahun 1884 kemudian dilanjutkan oleh Baumann pada tahun 1886. Mekanisme reaksi Schotten-Baumann dalam pembentukan amida dari amina dan asil atau alkil halida (dalam suasana basa). Berikut merupakan skema sintesis 1-alil-3-benzoiltiourea.

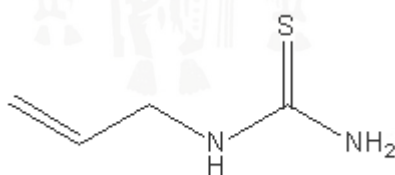


Gambar 2.2 Mekanisme Sintesis 1-allyl-3-benzoylthiourea (Shalas *et al.*, 2018)

2.4 Bahan Baku

2.4.1 Aliltiourea

Aliltiourea mempunyai rumus C₄H₈N₂S yang mempunyai LD₅₀ 200 mg/kg pada tikus. Berbentuk padatan dengan aroma mirip dengan bawang putih dan tidak berasa. Memiliki berat molekul 116,19 gram/mol. Warna aliltiourea adalah putih. Titik lebur 71°C. Struktur aliltiourea dapat dilihat pada gambar 2.3

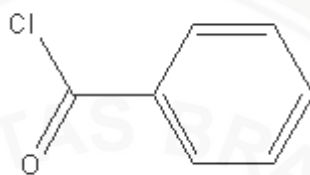


Gambar 2.3 Struktur Aliltiourea (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.4.2 Benzoyl Klorida

Benzoyl klorida merupakan pereaksi yang banyak digunakan karena banyak tersedia dan relatif murah. Namun demikian pereaksi ini dapat

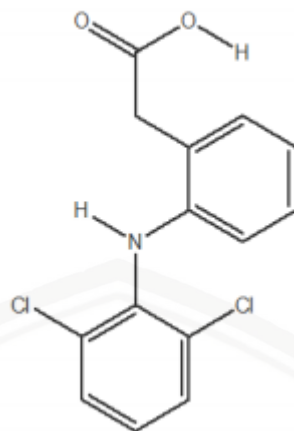
mengganggu kesehatan karena bersifat toksik sehingga harus hati-hati dalam penggunaannya. Benzoil klorida mempunyai rumus kimia C_7H_5OCl . Sifat fisika dan kimia benzoil klorida dengan bentuk zat cair, bau khas tajam dan tidak berwarna. Berat molekul 140,57 g/mol. Titik didih $197,2^{\circ}C$ dan titik leleh $-1^{\circ}C$ (MSDS).



Gambar 2.4 Struktur Benzoil Klorida (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.4.3 Natrium Diklofenak

Diklofenak adalah turunan asam fenilasetat sederhana yang menyerupai florbiprofen maupun meklofenamat. Obat ini adalah penghambat siklooksigenase (COX) yang kuat dengan efek anti inflamasi, analgesik dan anti piretik. Diklofenak cepat diabsorpsi setelah pemberian oral dan mempunyai waktu paruh yang pendek. Seperti flurbiprofen, obat ini berkumpul di cairan sinovial. Potensi diklofenak lebih besar daripada naproksen. Obat ini dianjurkan untuk kondisi peradangan kronis seperti arthritis rematoid dan osteoarthritis serta untuk pengobatan nyeri otot rangka akut (Katzung,2004). Struktur diklofenak dapat dilihat pada gambar 2.5.



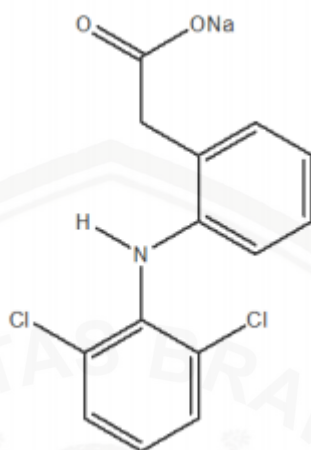
Gambar 2.5 Struktur Diklofenak (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Mekanisme kerja diklofenak yaitu jika membran sel mengalami kerusakan oleh suatu rangsangan kimiawi, fisik atau mekanis, maka enzim *fosfolipase* diaktifkan untuk mengubah fosfolipida menjadi asam arakhidonat. Asam lemak poli-tak jenuh ini kemudian untuk sebagian diubah oleh enzim *cyclo-oksigenase* menjadi endoperoksida dan seterusnya menjadi prostaglandin. Diklofenak merupakan NSAID yang bersifat tidak selektif yang mana kedua jenis COX dihambat. Dengan dihambatnya COX-1, dengan demikian tidak ada lagi yang bertanggung jawab melindungi mukosa lambung-usus dan ginjal sehingga terjadi iritasi dan efek toksik pada ginjal (Tjay dan Rahardja, 2007).

Pada penelitian ini digunakan bentuk garam dari diklofenak yaitu natrium diklofenak (substitusi atom H pada gugus karboksilat diklofenak atau asam 2-(2-(2,6-diklorofenilamino)fenil)asetat dengan atom Na). Struktur natrium diklofenak dapat dilihat pada gambar 2.6.

Natrium diklofenak memiliki rumus $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ dengan berat molekul 318,13. Senyawa ini berbentuk serbuk hablur, berwarna putih, tidak berasa. Kelarutan natrium diklofenak: sedikit larut dalam air, larut dalam alkohol, praktis tidak larut dalam kloroform dan eter, larut bebas dalam metil alkohol. pH larutan

1% dalam air adalah antara 7,0 dan 8,5 (Sweetman, 2009). pKa 4,2 dan Log P 4,5 (Moffat *et al.*, 2004).



Gambar 2.6 Struktur Natrium Diklofenak (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.5 Uji Kemurnian

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Teknik Kromatografi Lapis Tipis (*Thin Layer Chromatography*) dikembangkan oleh Egon Stahl dengan menghamparkan penyerap pada lempeng gelas, sehingga merupakan lapis tipis. KLT merupakan kromatografi serapan, tetapi dapat juga merupakan kromatografi partisi karena bahan penyerap telah dilapisi air dari udara (Sudjadi, 1988 :167). Kromatografi terbentuk apabila terdapat satu fase diam dan satu fase gerak. Fase diam biasanya berupa padatan atau cairan sedangkan fase gerak dengan kekuatan yang spesifik. Masing-masing molekul yang berlainan juga mempunyai keterlarutan yang berbeda dalam fase gerak. Kromatografi digunakan untuk memisahkan campuran dari substansinya menjadi komponen-komponenya. Seluruh bentuk kromatografi bekerja berdasarkan prinsip yang sama (Hardjono, 2005).

Seluruh bentuk kromatografi memiliki fase diam (berupa padatan atau cairan yang didukung pada padatan dan fase gerak (cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen dari campuran bersama-sama. Komponen-komponen yang berbeda akan bergerak pada laju yang berbeda pula. Kromatografi lapis tipis digunakan untuk memisahkan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang. Pada dasarnya KLT sangat mirip dengan kromatografi kertas, terutama pada cara pelaksanaannya. Perbedaan nyata terlihat pada fase diamnya atau media pemisahannya, yakni digunakan lapisan tipis adsorben sebagai pengganti kertas. Bahan adsorben sebagai fase diam dapat digunakan silika gel alumina dan serbuk selulosa. Fase diam untuk kromatografi lapis tipis sering kali mengandung substansi yang dapat berfluoresensi dalam sinar ultra violet. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai (Hardjono, 2005).

Derajat retensi pada kromatografi lapis tipis biasanya dinyatakan sebagai faktor retensi, R_f :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Harga-harga R_f untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standar.

Menurut Hardjono (2005), faktor-faktor yang dapat memengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapis tipis yang juga mempengaruhi harga R_f :

1. Struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan
2. Sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya

3. Tebal dan kerataan dari lapisan penyerap. Ketidakrataan lapisan akan menyebabkan aliran pelarut menjadi tidak rata pula dalam daerah yang kecil dari plat
4. Pelarut (sebagai fase gerak) dan derajat kemurniannya
5. Derajat kejenuhan dari uap dalam bejana pengembangan yang digunakan
6. Teknik percobaan
7. Jumlah cuplikan yang digunakan. Penetesan cuplikan dalam jumlah yang berlebihan memberikan penyebaran noda-noda dengan terbentuknya *tailing* atau ekor dan efek kesetimbangan lainnya yang akan mengakibatkan kesalahan-kesalahan pada harga-harga R_f
8. Suhu. Perubahan suhu dapat mempengaruhi perubahan-perubahan dalam komposisi pelarut
9. Kesetimbangan. Bila atmosfer dalam bejana tidak jenuh dengan uap pelarut, bila yang digunakan adalah pelarut campuran, akan terjadi pengembangan dengan permukaan pelarut yang berbentuk cekung dan fasa bergerak lebih cepat pada bagian tepi-tepi daripada di bagian tengah

2.6 Uji Konfirmasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

2.6.1 Spektrofotometri IR

FTIR (*Fourier Transform Infrared*), yaitu metode spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk analisis hasil spektrumnya. Metode spektroskopi yang digunakan adalah metode absorpsi, yaitu metode spektroskopi yang didasarkan atas perbedaan penyerapan radiasi inframerah. Absorpsi inframerah oleh suatu materi dapat terjadi jika dipenuhi dua syarat,

yaitu kesesuaian antara frekuensi radiasi inframerah dengan frekuensi vibrasional molekul sampel dan perubahan momen dipol selama bervibrasi (Chatwal, G., 1985).

Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum infra merah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui) (Anam *et al.*, 2007).

Tabel 2.1 Peta Korelasi Serapan Masing-masing gugus fungsi (Pavia *et al*, 2009)

	Type Vibrasi	Frekuensi (cm ⁻¹)	Intensitas
C-H	Alkana (<i>stretch</i>)	3000-2850	s
	-CH ₃ (<i>bend</i>)	1450 dan 1375	m
	-CH ₂ - (<i>bend</i>)	1465	m
	Alkena (<i>stretch</i>)	3100-3000	m
	(<i>out-of-plane bend</i>)	1000-650	s
	Aromatik (<i>stretch</i>)	3150-3050	s
	(<i>out-of-plane bend</i>)	900-690	s
	Alkuna (<i>stretch</i>)	ca. 3300	s
	Aldehid	2900-2800	w
		2800-2700	w
C-C	Alkana	<i>Not Intrepretately Useful</i>	
C=C	Alkena	1680-1600	m-w
	Aromatik	1600 dan 1475	m-w
C≡C	Alkuna	2250-2100	m-w
C=O	Aldehid	1740-1720	s
	Keton	1725-1705	s
	As. Karboksilat	1725-1700	s
	Ester	1750-1730	s
	Amida	1680-1630	s
	Anhidrida	1810 dan 1760	s
	As. Klorida	1800	s
	Alkohol, eter, ester, karboksilat, anhidrida	1300-1000	s
O-H	Alkohol, fenol		
	Bebas	3650-3600	m
	Mengikat H	3400-3200	m
N-H	As. Karboksilat	3400-2400	m
	Amina dan Amida Primer dan Sekunder		
	(<i>stretch</i>)	3500-3100	m
C-N	(<i>bend</i>)	1640-1550	m-s
	Amida	1350-1000	m-s
C=N	Imina dan oxime	1690-1640	w-s
C≡N	Nitril	2260-2240	m
X=C=Y	Allena, ketene, isosianat, isotiosianat	2270-1940	m-s
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 dan 1350	s
S-H	Merkaptans	2550	w
S=O	Solfosida	1050	s
	Sulfona, sulfonil klorida, sulfat, sulfonamida	1375-1300 dan 1350-1140	s
C-X	Fluorida	1400-1000	s
	Klorida	785-540	s
	Bromida, Iodida	<667	s

Spektrum yang dihasilkan dari spektroskopi adalah unik, atau spektrum dari senyawa organik dari suatu bahan memiliki bentuk yang berbeda untuk senyawa

organik yang lain. Penggunaan spektroskopi inframerah pada bidang kimia organik menggunakan bilangan gelombang dari 400 cm^{-1} – 4000 cm^{-1} atau pada panjang gelombang $2,5\text{ }\mu\text{m}$ – $15,4\text{ }\mu\text{m}$, dengan metode yang meliputi teknik serapan, teknik emisi, teknik fluoresensi. Untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dari spektroskopi inframerah digunakan spektroskopi inframerah transformasi fourier (*Fourier Transform InfraRed* - FTIR) yang pada dasarnya spektroskopi FTIR adalah sama dengan spektroskopi inframerah, yang membedakan ialah pengembangan pada sistem optiknya. Spektroskopi FTIR memiliki banyak keunggulan dibanding spektroskopi inframerah diantaranya yaitu lebih cepat karena pengukuran dilakukan secara serentak (simultan), serta mekanik optik lebih sederhana dengan sedikit komponen yang bergerak (Supratman, 2010). Interpretasi data atau penafsiran spektra inframerah dapat mengacu pada beberapa pustaka. Untuk menafsirkan suatu spektra inframerah yang diperoleh dari analisis menggunakan instrumen, dapat menggunakan peta korelasi (*correlation chart*) yang menunjukkan daerah serapan masing-masing gugus fungsi. Peta korelasi daerah serapan masing-masing gugus fungsi dapat dilihat pada tabel 2.1.

2.6.2 Spektrofotometri ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR

Identifikasi molekuler menggunakan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) didasarkan pada sifat inti atom. Pada tahun 1924, Pauli mengusulkan bahwa inti atom seharusnya memiliki gerakan memutar (*spin*) dan momen magnetik sehingga ketika berada pada medan magnet, level energi inti tersebut akan terbagi. Kemudian pada tahun 1946, Bloch dan Purcell dapat menunjukkan bahwa inti atom mengabsorpsi radiasi elektromagnetik pada suatu medan

magnet yang kuat sehingga level energinya terbagi karena gaya magnetik. Para peneliti kimia kemudian sadar bahwa efek tersebut dapat dihubungkan dengan struktur molekul (Skoog, 1998).

^1H -NMR merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi atom-atom hidrogen dalam sebuah molekul. Prinsip kerja dari ^1H NMR adalah penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul ini berada dalam medan magnet (Fessenden, 1986). Dari spektra ^1H -NMR yang dihasilkan maka dibandingkan jumlah posisi relatif serapan dalam spektrum ^1H -NMR. Jenis puncak yang terdapat dalam spektra RMI- ^1H yaitu *singlet*, *duplet*, *triplet*, *quartet*, *quintet*, dan *multiplet*. Kombinasi antara data IR dan NMR sering dianggap cukup untuk menentukan struktur molekul yang tidak diketahui (Pavia, *et al.*, 2009).

2.6.3 Spektrometri Massa

Suatu teknik yang berdasarkan pemisahan bekas ion-ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas-berkas ion tersebut. Molekul-molekul sampel ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion positif bertenaga tinggi yang dapat dipecah-pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil. Lepasnya elektron dari molekul akan menghasilkan radikal ion-ion molekular. Ion-ion molekul, ion-ion pecahan dan ion-ion radikal pecahan selanjutnya dipisahkan oleh pembelokan medan magnet yang dapat berubah sesuai dengan masa dan muatannya dan akan menimbulkan arus pada kolektor yang sebanding dengan limpahan relatifnya. Setelah sampel telah terionisasi, sinar dari ion dipercepat oleh medan listrik dan kemudian diteruskan melewati *mass analyzer*, komponen dari spektrometer

massa dimana ion dipisahkan berdasarkan rasio massa-muatan (m/z) (Pavia, et al. 2009).

2.7 Uji Anti Inflamasi dengan diinduksi Karagenan

Karagenan merupakan sulfat yang berasal dari tanaman *Chondrus crispus* (Wattimena dan Widiyanto, 1993). Karagenan merupakan suatu polisakarida sulfat bermolekul besar sebagai indikator inflamasi (Corsini dkk, 2005). Penggunaan karagenan sebagai penginduksi radang memiliki beberapa keuntungan antara lain tidak meninggalkan bekas, tidak menimbulkan kerusakan jaringan dan memberikan respon yang lebih peka terhadap obat antiinflamasi dibanding senyawa iritan lainnya (Siswanto dan Nurlita, 2005).

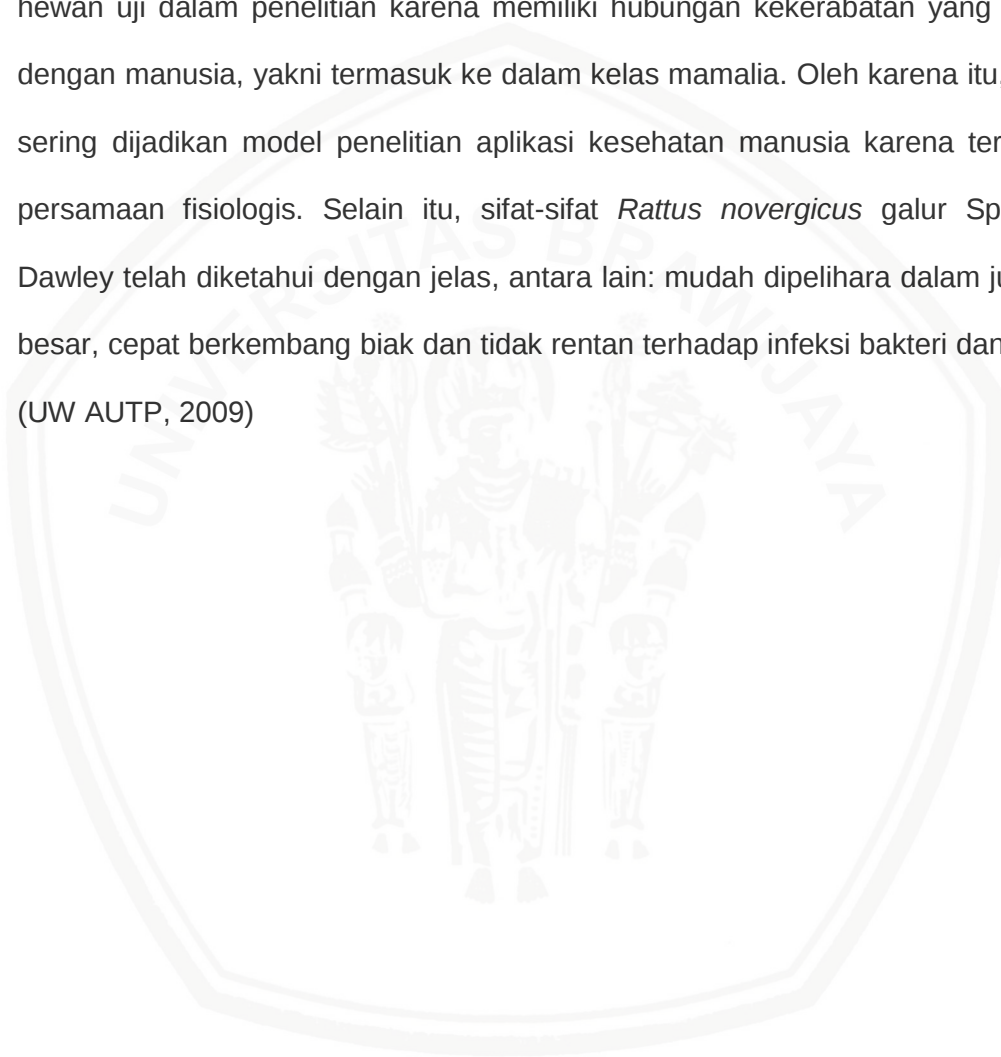
Pada proses pembentukan edema, karagenan akan menginduksi cedera sel dengan dilepaskannya mediator yang mengawali proses inflamasi. Edema yang disebabkan induksi karagenan dapat bertahan selama 6 jam dan berangsur-angsur berkurang dalam waktu 24 jam. Edema yang disebabkan oleh injeksi karagenan diperkuat oleh mediator inflamasi terutama PGE1 dan PGE2 dengan cara menurunkan permeabilitas vaskular. Apabila permeabilitas vaskular turun maka protein-protein plasma dapat menuju ke jaringan yang luka sehingga terjadi edema (Corsini dkk, 2005).

2.8 Tikus Wistar Jantan

Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus. Tikus (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara sempurna, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki

berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (Depkes, 2013).

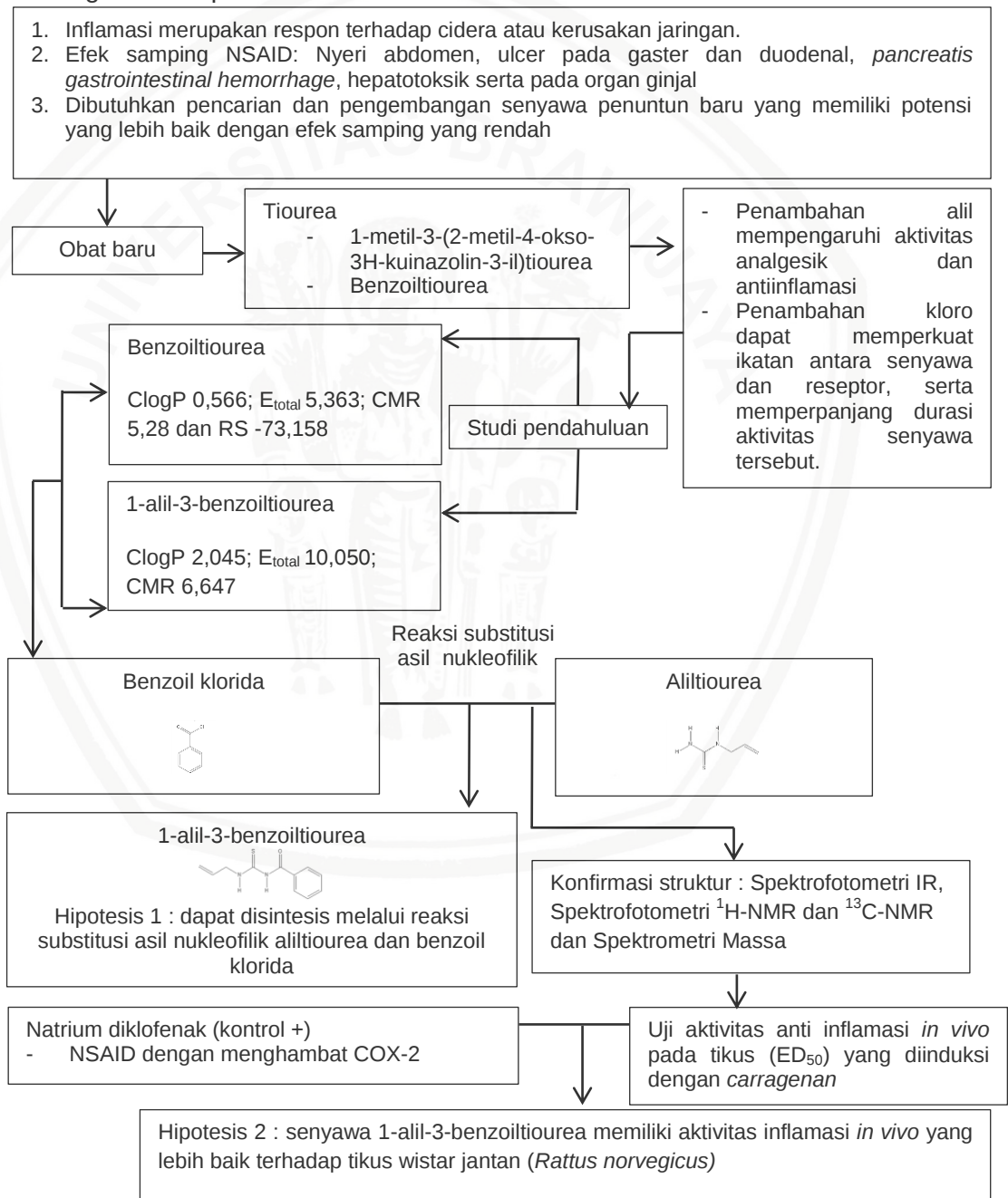
Rattus norvegicus galur Sprague Dawley umumnya digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian karena memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan manusia, yakni termasuk ke dalam kelas mamalia. Oleh karena itu, tikus sering dijadikan model penelitian aplikasi kesehatan manusia karena terdapat persamaan fisiologis. Selain itu, sifat-sifat *Rattus norvegicus* galur Sprague Dawley telah diketahui dengan jelas, antara lain: mudah dipelihara dalam jumlah besar, cepat berkembang biak dan tidak rentan terhadap infeksi bakteri dan virus (UW AUTP, 2009)



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera atau kerusakan jaringan. Efek samping AINS: nyeri abdomen, ulcer pada gaster dan duodenal, *pancreatis gastrointestinal* hemorrhage, hepatotoksik. Dibutuhkan pencarian dan pengembangan senyawa penuntun baru yang memiliki potensi yang lebih baik dengan efek samping yang rendah.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa senyawa tiourea dan turunannya memberikan efek anti inflamasi yang bisa dibandingkan dengan obat anti inflamasi yang sudah ada. Pada penelitian Alagarsamy *et al* tahun 2003 ditemukan bahwa senyawa turunan tiourea yaitu 1-metil-3-(2-metil-4-okso-3H-kuinazolin-3-il)tiourea memiliki aktivitas analgesik dan anti inflamasi. Kemudian Budiati *et al* pada tahun 2010 turunan dari senyawa tiourea yaitu senyawa benzoiltiourea memiliki sifat kimia fisika yang lebih baik daripada obat anti inflamasi yang sudah ada salah satunya yaitu natrium diklofenak (Budiati *et al*, 2010). Aktivitas biologis suatu senyawa dapat ditingkatkan dengan proses homologasi dan substitusi pada cincin aromatis. Menurut Shalas *et al* (2018), substitusi alil dan kloro pada cincin benzoil dapat meningkatkan aktivitas biologis secara signifikan. Substitusi alil dapat mempengaruhi konformasi suatu senyawa sehingga mempengaruhi fleksibilitas molekul dan mempengaruhi hubungan spasial pada gugus farmakofor. Selanjutnya, penambahan kloro dapat memperkuat ikatan antara senyawa dan reseptor, serta memperpanjang durasi aktivitas senyawa tersebut.

Dari penelitian tersebut maka dirancanglah suatu senyawa yang merupakan turunan dari benzoilklorida yaitu senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea yang telah dilakukan uji pendahuluan dan menghasilkan nilai ClogP 2, 045; E_{total} 10,050; CMR 6,647. Nilai ketiga parameter tersebut lebih besar dibanding

senyawa benzoiltiourea, yaitu ClogP 0,566; E_{total} 5,363; dan CMR 5,281, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea memiliki sifat fisika kimia yang lebih baik dari senyawa benzoiltiourea.

Senyawa ini diperoleh dengan mereaksikan aliltiourea dengan benzoil klorida menggunakan prinsip reaksi substitusi asil nukleofilik sehingga menghasilkan senyawa yang diinginkan yang akan dikonfirmasi strukturnya menggunakan spektrofotometri IR, spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan spektrometri Massa.

Setelah dilakukan konfirmasi struktur maka kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji aktivitas inflamasi secara *in vivo* pada tikus jenis wistar dengan induksi karagenan pada telapak kaki yang diukur volume edemanya secara berkala menggunakan pletismometer.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian adalah :

- 3.2.1 Senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi asil nukleofilik
- 3.2.2 Senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea memiliki aktivitas inflamasi *in vivo* yang lebih baik dibanding Natrium Diklofenak terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi senyawa inflamasi karagenan

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) dimana ditentukan variabel bebas yang kemudian diukur efeknya pada variabel terikat. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris dengan melakukan sintesis dan uji aktivitas anti inflamasi senyawa secara *in vivo* pada tikus wistar yang diinduksi dengan karagenan.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah 25 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) berumur 8-12 minggu dengan berat badan 100-200 gram yang akan dibagi 5 kelompok dengan tiap kelompoknya berisi 5 ekor tikus wistar, diperoleh dari perhitungan sampel menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

dengan nilai n sebagai jumlah yang dibutuhkan untuk pengulangan, dan t sebagai jumlah kelompok yang digunakan. Kemudian pada jumlah t dimasukkan 5 kelompok perlakuan :

$$(n-1) \geq 15 / (5-1)$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow n \geq 5$$

sehingga diperoleh sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok sejumlah ≥ 5 ekor tikus dengan pembagian kelompok sebagai berikut :

- Kelompok 1 diberikan 1-alil-3-benzoiltiourea dengan dosis 6,25 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kelompok 2 diberikan 1-alil-3-benzoiltiourea dengan dosis 12,5 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kelompok 3 diberikan 1-alil-3-benzoiltiourea dengan dosis 25 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kelompok kontrol positif diberikan Natrium diklofenak dosis 12,5 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kontrol negatif diberikan CMC-Na 0,5% b/v yang diberikan secara oral

1. Kriteria inklusi

- Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*)
- Tikus berumur 8-12 minggu
- Berat badan tikus 100-200

2. Kriteria eksklusi

- Terdapat edema
- Terdapat luka

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea yang didapatkan dari hasil sintesis.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini terdiri dari tiga bagian yaitu :

- Variabel bebas : dosis senyawa uji
- Variabel terikat : volume edema
- Variabel kontrol : jenis tikus, dosis karagenan, kondisi pemeliharaan tikus selama penelitian

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2017 hingga bulan Januari 2018.

4.5 Bahan dan Alat

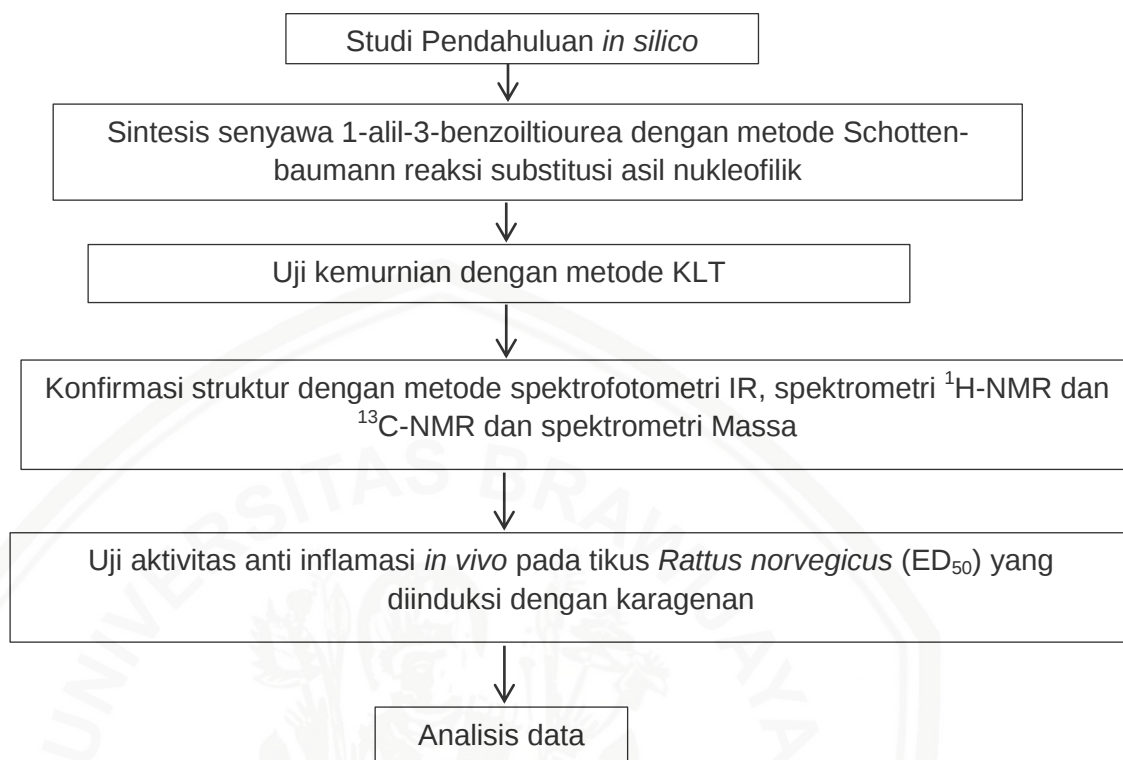
4.5.1 Bahan

Alitiourea p.s (*sigma aldrich*), Benzoin klorida p.s (*sigma aldrich*), tetrahidrofuran p.a (*sigma aldrich*), etil asetat p.a, methanol p.a, n-heksana p.a, trietilamin (*sigma aldrich*), kloroform p.a, karagenan (*sigma aldrich*), natrium diklofenak (Voltaren®), CMC Na.

4.5.2 Alat

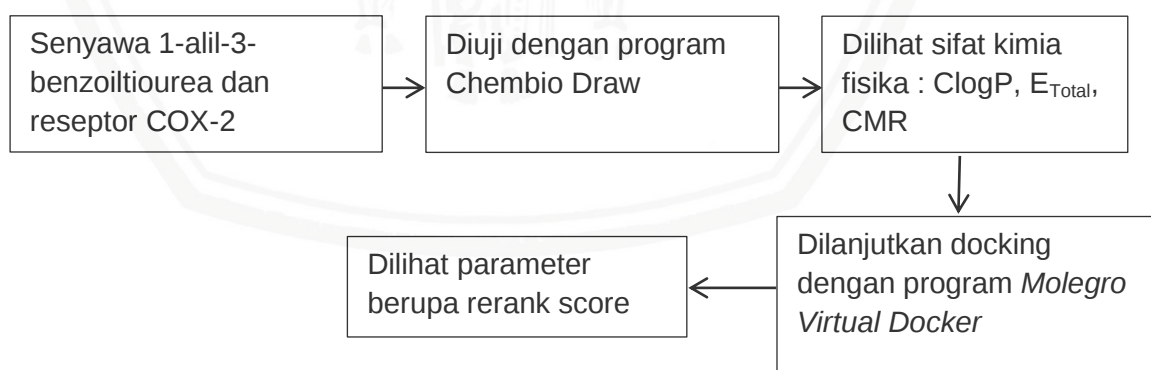
Satu set peralatan *refluks*, neraca analitik (PA224 OHAUS), pengaduk magnetik dengan *hotplate* (IKA C-Mag HS7), seperangkat alat KLT, spektrofotometer FT-IR (8400S/Shimadzu), Spektrofotometer NMR (NMR Jeol ICS 400), Spektrometer Massa (Shimadzu GCMA QP2010 Plus), spuit injeksi 1 ml, alat-alat gelas, pletismometer.

4.6 Prosedur Penelitian



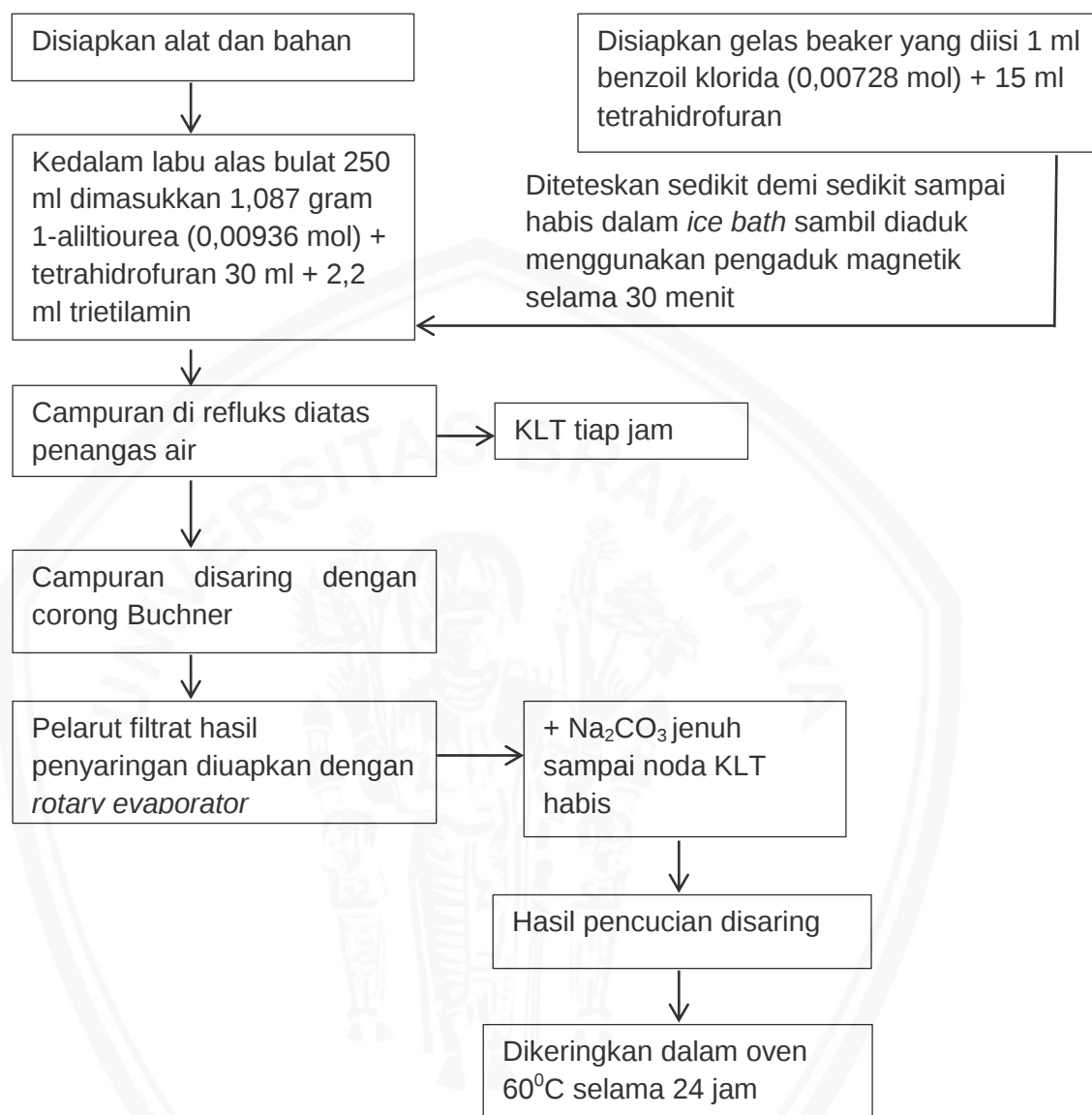
Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.6.1 Studi Pendahuluan *in silico*



Gambar 4.2 Studi Pendahuluan *in silico*

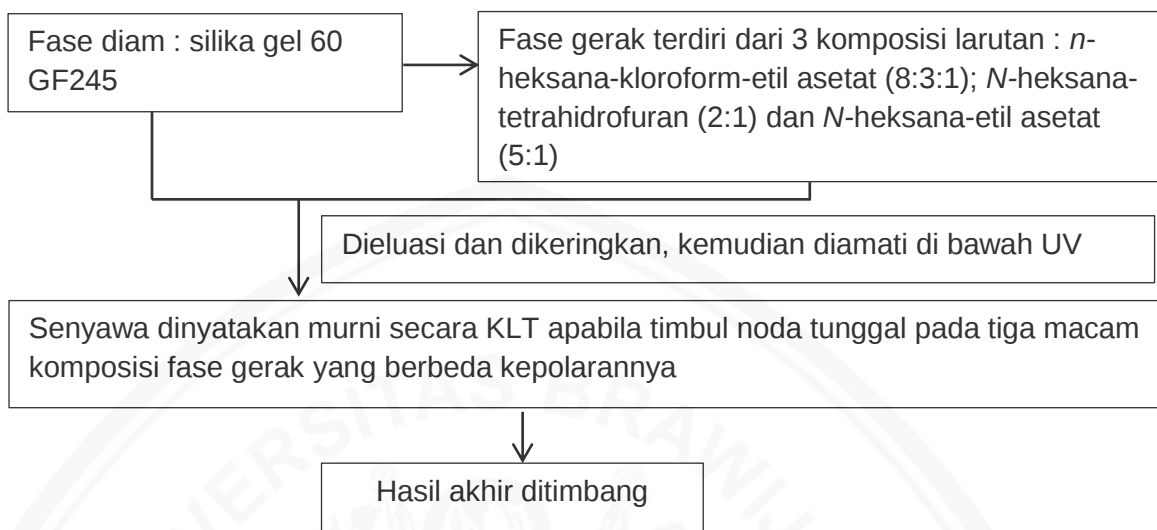
4.6.2 Sintesis Senyawa



Gambar 4.3 Sintesis Senyawa

4.6.3 Uji Kemurnian

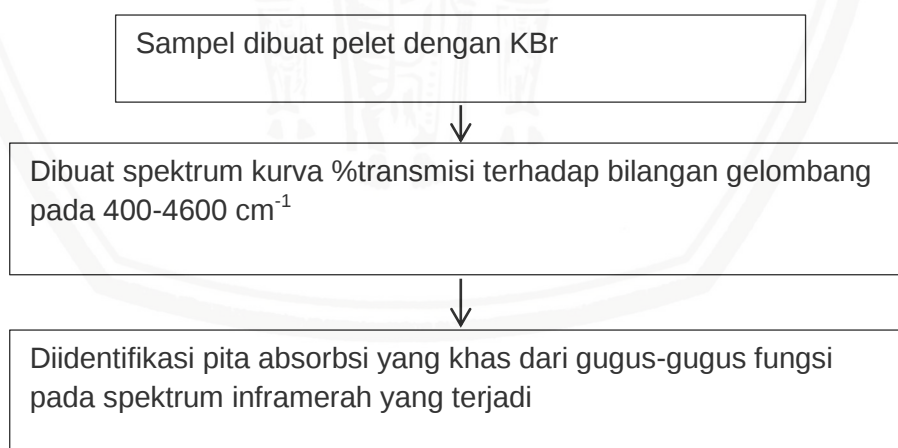
4.6.3.1 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Gambar 4.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

4.6.4 Uji Konfirmasi Struktur

4.6.4.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR



Gambar 4.5 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR

4.6.4.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR

Sampel dilarutkan dalam kloroform *deuterated* (CDCl_3) yang sudah mengandung tetrametilsilan (TMS)



Diidentifikasi intensitas, jumlah, dan posisi puncak pada daerah geseran kimia tertentu dari spektrum resonansi magnet inti yang terbentuk

Gambar 4.6 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR

4.6.4.4 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Massa

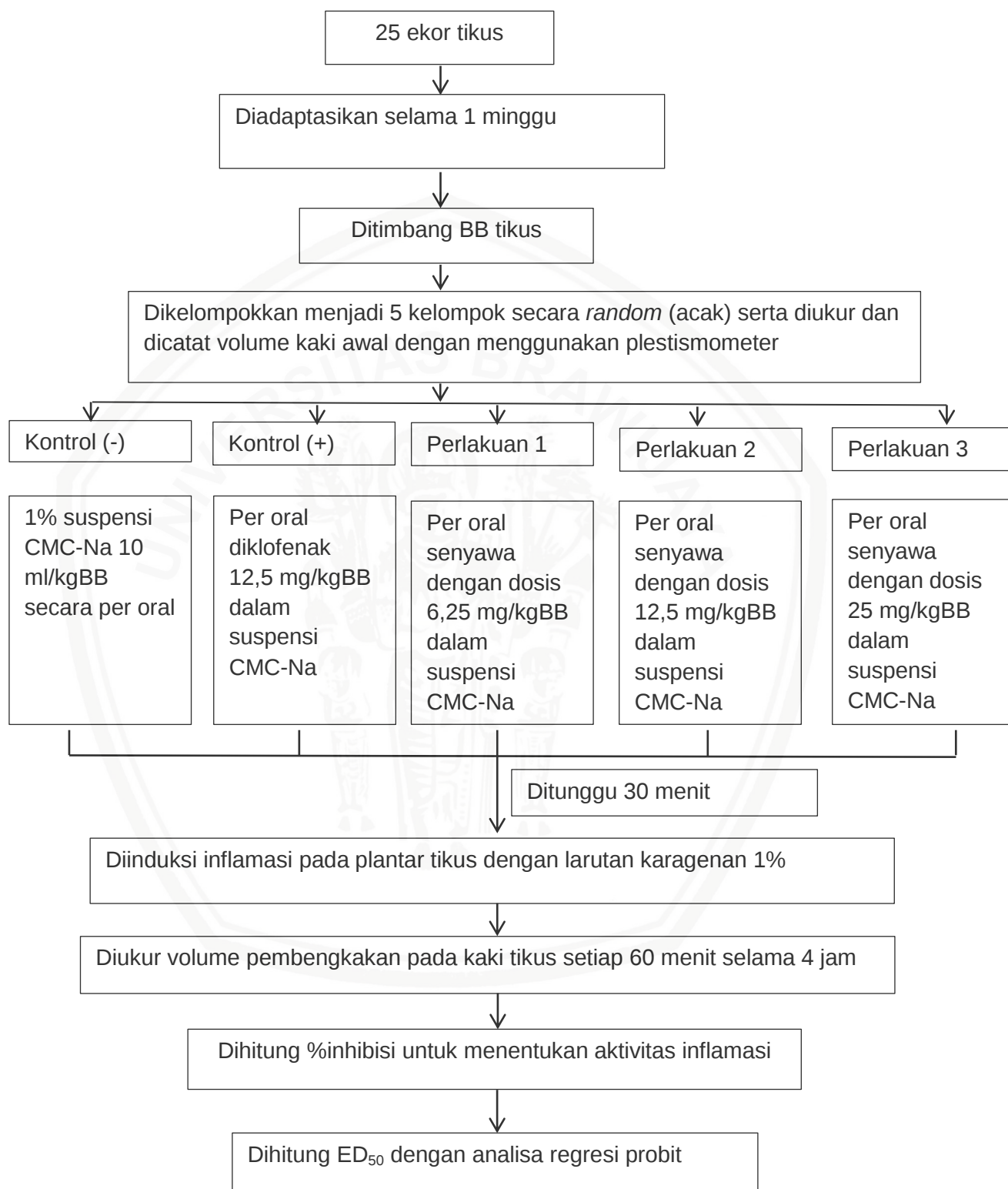
Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai



Diidentifikasi fragmen-fragmen massa, massa relatif dan pola fragmen yang terbentuk dalam spektrum

Gambar 4.7 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Massa

4.6.5 Uji Anti Inflamasi Senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea



Gambar 4.8 Uji Anti Inflamasi Senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea

4.7 Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah uji aktivitas anti inflamasi. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji hipotesis ANOVA, dengan syarat distribusi data normal ($p > 0,05$) dan variasi data harus homogen ($p > 0,05$). Apabila syarat uji ANOVA tidak terpenuhi maka akan dilakukan uji statistik non-parametrik Kruskal Wallis. Kemudian dilakukan uji Post-hoc untuk mengetahui kelompok mana yang bermakna. Analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan *software Statistical Product and Service Solution, IBM SPSS Statistics 20*, dengan nilai probabilitas 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan sebesar 95%. Selanjutnya dilakukan analisa regresi probit untuk menentukan ED_{50} (*effective dose 50*).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Uji *In Silico*

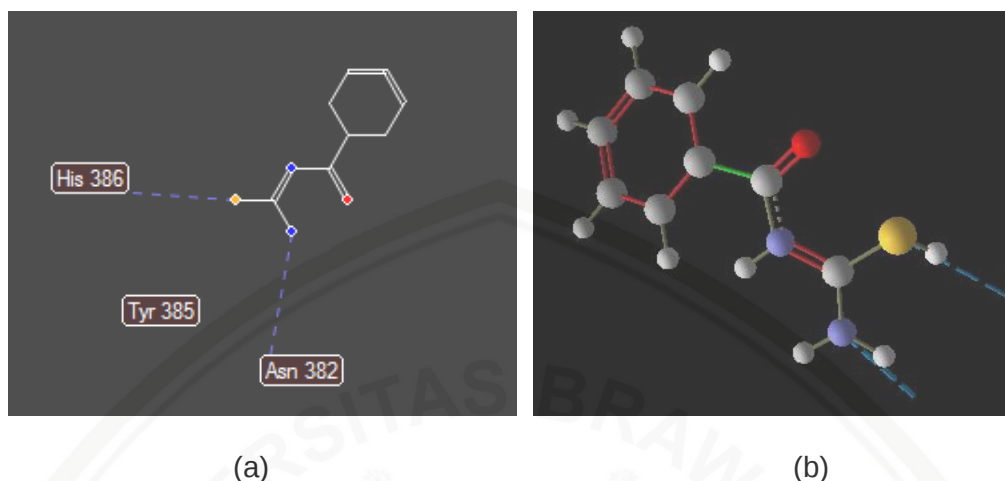
Penelitian dimulai dengan uji *In Silico* senyawa 1-alil-3-benzothiourea dengan menggunakan *Chemdraw Ultra 12.0* dan *Chem3D Pro 12.0* dan dibandingkan dengan senyawa benzothiourea sehingga didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Pendahuluan Senyawa 1-alil-3-benzothiourea

Parameter	1-alil-3-benzothiourea	Benzothiourea
Lipofilitas (ClogP)	2,045	0,566
Elektronik (E_{total})	10.0249 Kcal/mol	5.2939 Kcal/mol
Sterik (CMR)	6,6472	5,2812
RS (Rerank Score)	-99.7583	-82.3084

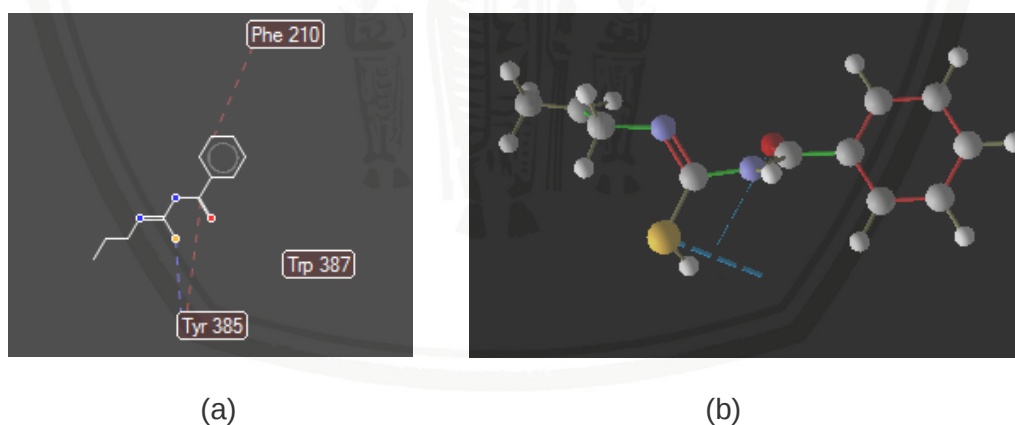
Dari uji pendahuluan didapatkan bahwa nilai parameter senyawa 1-alil-3-benzothiourea lebih baik dibandingkan senyawa benzothiourea. Kemudian dilakukan *docking* senyawa 1-alil-3-benzothiourea dan benzothiourea terhadap reseptor COX-2 dengan kode *Protein Data Bank* 1PXX menggunakan aplikasi *Molegro Virtual Docker 5.0*. Hasil *docking* menunjukkan senyawa benzothiourea memiliki ikatan hidrogen dengan asam amino Histidin (*His* 386) dan Asparagin (*Asn* 382), serta memiliki interaksi sterik dengan asam amino Tirosin (*Tyr* 385) yang dapat dilihat pada Gambar 5.1, sedangkan 1-alil-3-benzothiourea memiliki ikatan hidrogen dengan asam amino Tirosin (*Tyr* 385) dan interaksi sterik dengan

asam amino Fenilalanin (*Phe* 210), Triptofan (*Trp* 387), dan Tirosin (*Tyr* 385) yang dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.1 Ligand Map Interaksi Senyawa Benzoilthiourea dengan Reseptor 1PXX

(a) *Ligand map* interaksi antara benzoilthiourea dengan reseptor 1PXX, dan (b) Ikatan hidrogen antara benzoilthiourea dengan reseptor 1PXX. - - - - : interaksi sterik, - - - - : ikatan hidrogen



Gambar 5.2 Ligand Map Interaksi Senyawa 1-alil-3-benzothiourea dengan Reseptor 1PXX

(a) *Ligand map* interaksi antara 1-alil-3-benzothiourea dengan reseptor 1PXX dan (b) ikatan hidrogen antara 1-alil-3-benzothiourea dengan reseptor 1PXX. - - - - : interaksi sterik, - - - - : ikatan hidrogen.

Dari proses *docking* diketahui senyawa 1-alil-3-benzothiourea memiliki RS (*Rerank Score*) yang lebih baik yaitu sebesar -99.7583 dibandingkan dengan senyawa benzothiourea yang memiliki RS sebesar -82.3084. Dari hasil uji *In Silico* menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-benzothiourea lebih baik dari senyawa benzothiourea dan layak untuk disintesis dengan diberi kode produk BATU-1.

5.1.2 Sintesis Senyawa BATU-1

Rendemen produk senyawa BATU-1 dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Perhitungan rendemen hasil sintesis dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat nyata}}{\text{Berat teoritis}} \times 100\%.$$

Tabel 5.2 Persen Rendemen dari Senyawa Produk BATU-1

Aliltiourea	Benzoil	Mol Produk	MR Produk	Berat Teoritis	Berat Nyata	Rendemen
0,0093 mol	0,0079 mol	0,0079 mol	220,07	2,01 g	0,4143 g	20,611 %

5.1.3 Hasil Uji Kemurnian Senyawa BATU-1 Menggunakan KLT

Kemurnian senyawa hasil sintesis diuji dengan menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis), dengan fase diam Silica gel 60 GF254 dan fase gerak n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1). Hasil optimasi eluen dapat dilihat pada lampiran 5 dan hasil KLT yang menunjukkan noda tunggal dengan R_f sebesar 0,48 yang dapat dilihat pada Gambar 5.3.

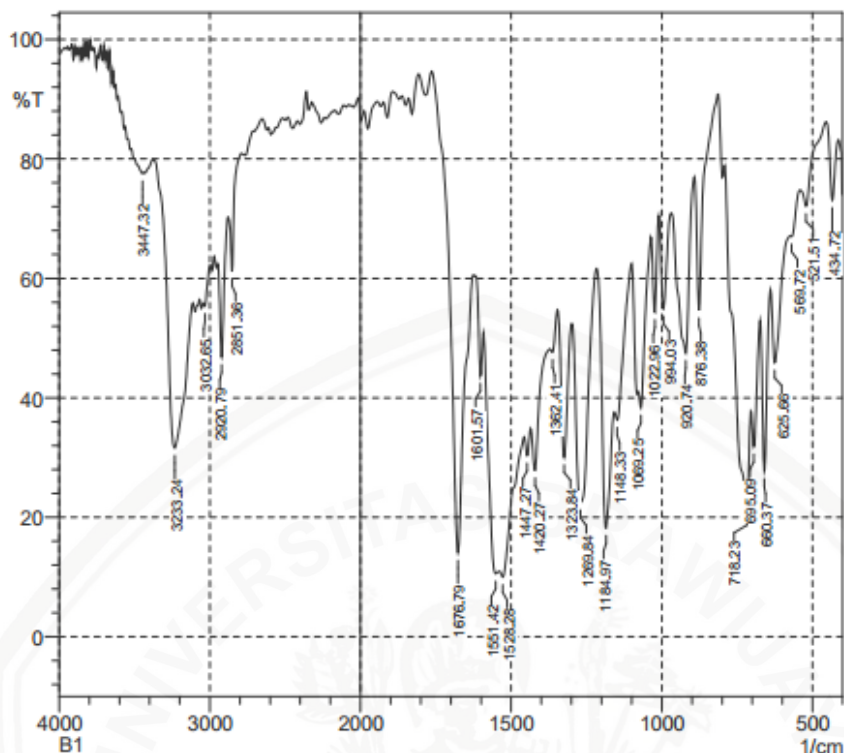


Gambar 5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan KLT

5.1.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-1

5.1.4.1 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR

Spektra senyawa BATU-1 dengan menggunakan spektrofotometri IR menunjukkan keberadaan gugus fungsi berupa -C=O amida pada bilangan gelombang $1676,57 \text{ cm}^{-1}$, -C=C aromatis pada bilangan gelombang $1449\text{-}1596 \text{ cm}^{-1}$, C=S pada bilangan gelombang $1184,97 \text{ cm}^{-1}$ dan N-H ulur pada bilangan gelombang $3233,24$. Spektra spektrofotometri IR senyawa BATU-1 dapat dilihat pada Gambar 5.4 dan hasil interpretasi serapan pada spektra IR dapat dilihat pada Tabel 5.3.



Gambar 5.4 Spektra IR Senyawa BATU-1 dalam Pelat KBr

Tabel 5.3 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-1

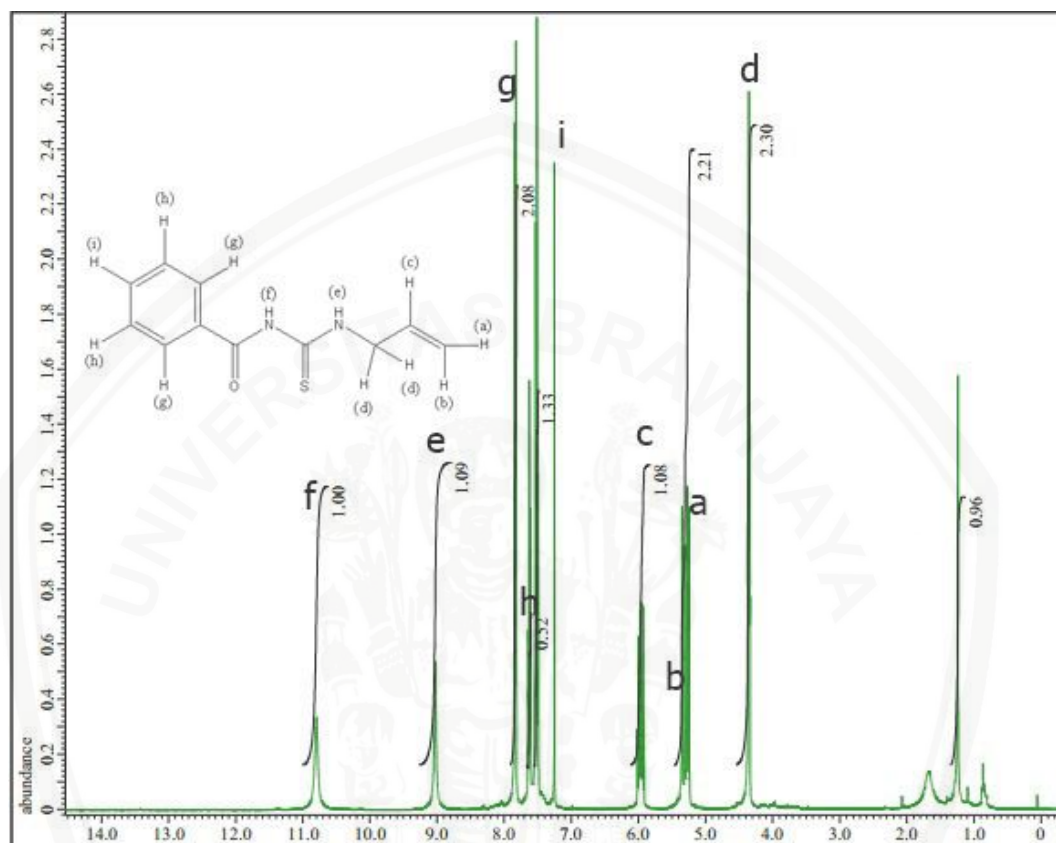
Tipe Vibrasi	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)
-C=O Amida	1676,57
-C=C aromatis	1449-1596
C=S	1184,97
N-H Ulur	3233,24

5.1.4.2 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Resonansi

Magnet Inti (¹H-NMR dan ¹³C-NMR)

Hasil spektra ¹H-NMR menunjukkan jumlah proton sebanyak 12, dan hasil spektra ¹³C-NMR menunjukkan jumlah karbon sebanyak 11. Dari hasil spektra ¹H-NMR dan ¹³C-NMR menunjukkan jumlah proton dan jumlah karbon yang sesuai dengan rumus molekul senyawa 1-alil-3-benzothiourea yaitu C₁₁H₁₂N₂OS. Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri ¹H-NMR dapat

dilihat pada Gambar 5.5, dan interpretasi spektra ^1H -NMR dapat dilihat pada Tabel 5.4. Untuk spektra ^{13}C -NMR dapat dilihat pada Gambar 5.6, dan interpretasi spektra yang ditunjukkan pada Tabel 5.5.

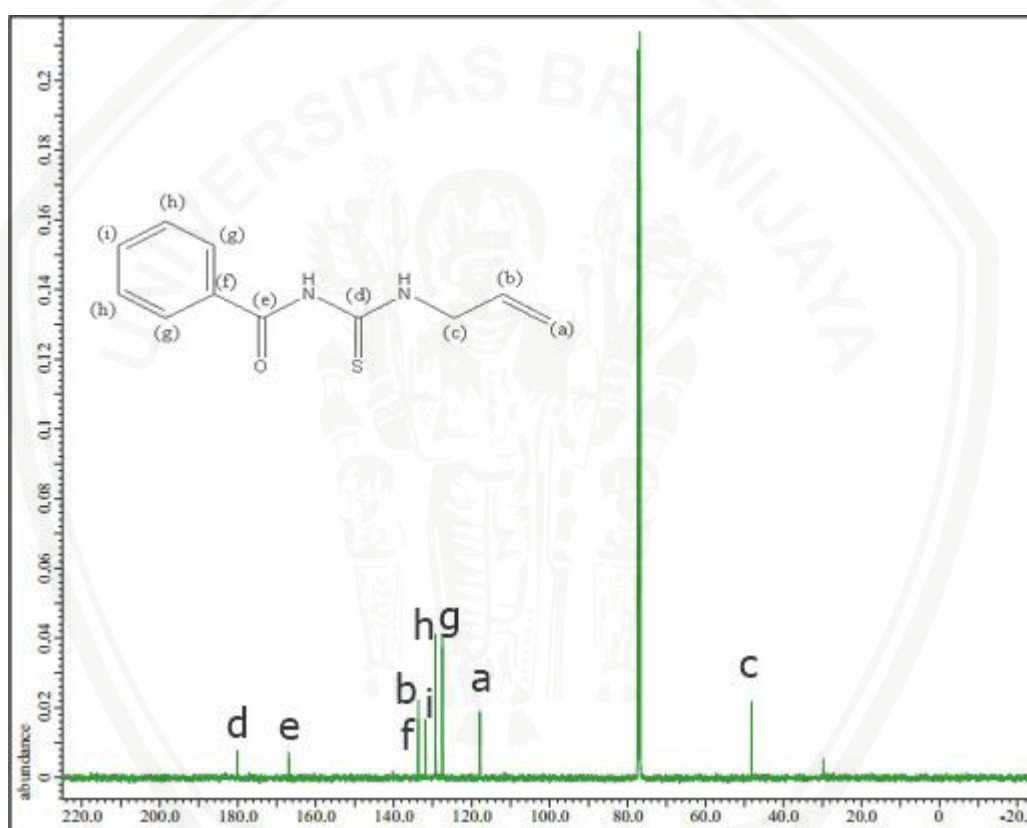


Gambar 5.5 Hasil Spektra ^1H -NMR Senyawa BATU-1

Tabel 5.4 Karakteristik Spektrum ^1H -NMR Senyawa BATU-1

Abjad	Geseran Kimia δ (ppm)	Perbandingan Integrasi	Multiplisitas	Jenis Proton
(a)	5.270	1	Doublet	1 atom H dari alil
(b)	5.273	2	Doublet	1 atom H dari alil
(c)	5.957	1	Doublet	1 atom H dari alil
(d)	4.354	2	Doublet	2 atom H dari alil
(e)	9.142	1	Singlet	1 atom H dari -NH (amina)
(f)	10.798	1	Singlet	1 atom H dari -NH

				(amida)
(g)	7.824	2	Singlet	2 atom H dari benzena
(h)	7.531	1	Doublet	2 atom H dari benzena
(i)	7.511	1	Doublet	1 atom H dari benzena



Gambar 5.6 Hasil Spektra ^{13}C -NMR Senyawa BATU-1

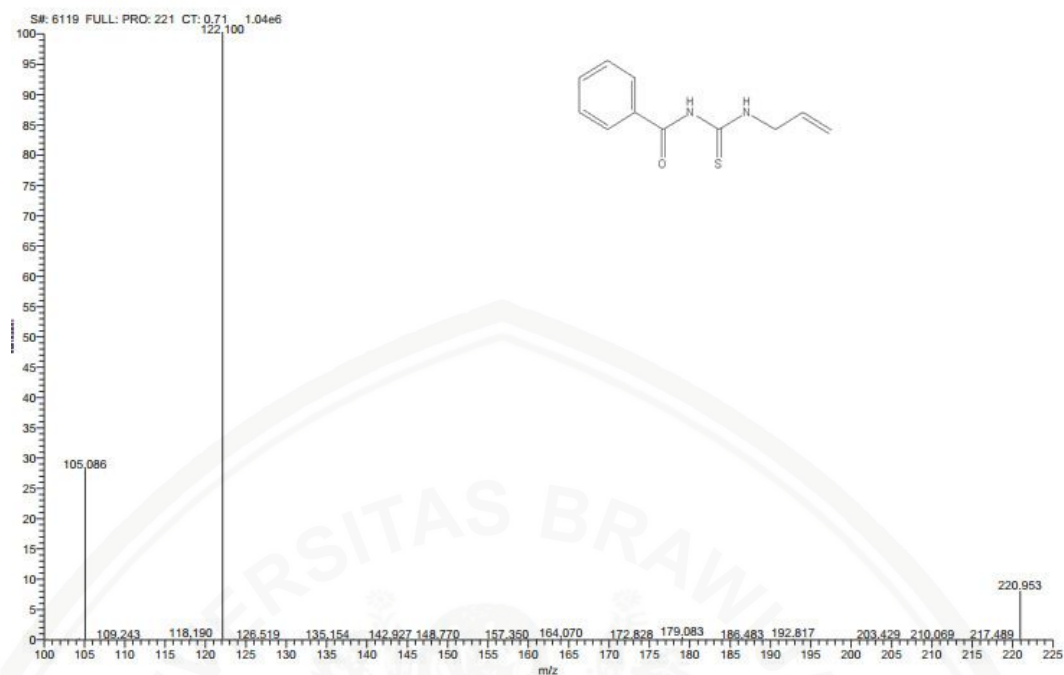
Tabel 5.5 Karakteristik Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa BATU-1

Abjad	Geseran Kimia δ (ppm)	Jenis Karbon
(a)	117,877	1 atom C dari $-\text{C}=\text{C}$
(b)	133,705	1 atom C dari $-\text{C}=\text{C}$
(c)	48,199	1 atom C dari $-\text{C}=\text{C}-\text{C}$

(d)	180,119	1 atom C dari C=S
(e)	166,895	1 atom C dari C=O
(f)	131,893	1 atom C dari benzena (-C-C=O)
(g)	127,507	2 atom C dari benzena
(h)	129,262	2 atom C dari benzena
(i)	131,826	1 atom C dari benzena

5.1.4.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-1 dengan Spektroskopi Massa

Hasil uji spektroskopi massa senyawa BATU-1 adalah terbentuk 3 serapan yang menunjukkan 3 fragmen dengan massa berbeda yaitu pada 105,086 m/z; 122,100 m/z; dan 220,953 m/z. Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektroskopi massa dapat dilihat pada Gambar 5.7, dan analisa fragmen massa dari hasil uji MS dapat dilihat pada Tabel 5.6.

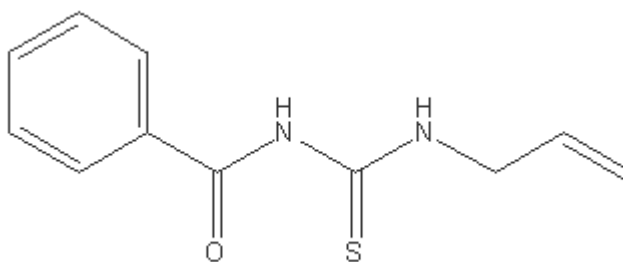


Gambar 5.7 Hasil Spektra MS Senyawa BATU-1

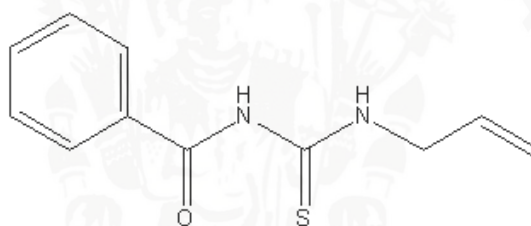
Tabel 5.6 Analisis Fragmen Massa Senyawa BATU-1

Massa (m/z)	Fragmen
105,086	
122,100	

M^+ (220,953)



Hasil dari uji konfirmasi struktur membuktikan bahwa senyawa BATU-1 adalah benar senyawa dengan rumus molekul $C_{11}H_{12}N_2OS$ dan struktur kimia seperti pada Gambar 5.8. Dari hasil uji konfirmasi menjelaskan bahwa penelitian layak untuk dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu uji aktivitas antiinflamasi.



Gambar 5.8 Struktur Kimia Senyawa BATU-1

5.1.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-benzothiourea

Uji antiinflamasi senyawa 1-alil-3-benzothiourea dilakukan pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karagenan dengan hasil yang disajikan pada Tabel 5.7, nilai persen inhibisi dihitung menggunakan rumus (Meshram *et al*, 2016):

$$PI = \frac{(V_t - V_0)_{\text{Kontrol}} - (V_t - V_0)_{\text{perlakuan}}}{(V_t - V_0)_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Keterangan : V_t = Volume udem rata-rata pada waktu tertentu

V0 = Volume udem rata-rata pada waktu ke-0

Tabel 5.7 Data Hasil Pengukuran Bengkak Kaki

Dosis	Waktu	Rata-rata volume edema	Rata-rata persen inhibisi
6.25 mg/kgBB (n=5)	t0	0.011	0
	t1	0.019	19.375 ± 19.37
	t2	0.031	-31.4894 ± -31.48
	t3	0.035	-2.25352 ± -2.25
	t4	0.034	-24.2857 ± -24.58
12.5 mg/kgBB (n=5)	t0	0.009	0
	t1	0.020	-5 ± 7.65
	t2	0.032	-50.6383 ± 9.68
	t3	0.034	-6.47887 ± 18.25
	t4	0.038	-53.75 ± 26.78
25 mg/kgBB (n=5)	t0	0.012	0
	t1	0.020	26.875 ± 10.68
	t2	0.029	-7.23404 ± 23.71
	t3	0.025	42.8169 ± 20.84
	t4	0.030	0.714286 ± 50.91
Kontrol positif (n=3)	t0	0.010	0
	t1	0.021	-2.7237 ± 5.41
	t2	0.024	12.76596 ± 35.15
	t3	0.028	25.35211 ± 9.75
	t4	0.022	37.5 ± 11.15
Kontrol negatif (n=3)	t0	0.005	0
	t1	0.015	0
	t2	0.020	0
	t3	0.028	0
	t4	0.023	0

Keterangan: Kontrol (-) = CMC-Na 1%

Kontrol (+) = Natrium diklofenak 12.5 mg/kgBB

t0 = pengukuran udem kaki pada waktu ke 0

t1 = pengukuran udem kaki setelah 1 jam

t2 = pengukuran udem kaki setelah 2 jam

t3 = pengukuran udem kaki setelah 3 jam

t4 = pengukuran udem kaki setelah 4 jam

Dari nilai rata-rata persen inhibisi yang didapatkan pada pengujian aktivitas antiinflamasi, maka dapat dihitung nilai ED_{50} untuk senyawa 1-alil-3-benzoyltiourea, dengan menggunakan analisa probit program *SPSS 20*. Data hasil analisa probit senyawa 1-alil-3-benzoyltiourea dengan *IBM SPSS Statistic 20* dapat dilihat pada Lampiran 12. Nilai ED_{50} senyawa 1-alil-3-benzoyltiourea adalah 2,234 mg/kgBB.

5.2 Analisis Data

Hasil data pada Tabel 5.6 dianalisis dengan *Kruskal Wallis* pada perangkat lunak *IBM SPSS Statistic 20* dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Analisis *Kruskal Wallis*

Dosis		Signifikansi pada t3	Signifikansi pada t4
6.25 mg/kgBB	12.5 mg/kgBB	0.802	0.345
	25 mg/kgBB	0.070	0.539
	Kontrol positif	0.024	0.024
12.5 mg/kgBB	25 mg/kgBB	0.077	0.237
	Kontrol positif	0.032	0.028
25 mg/kgBB	Kontrol positif	0.507	0.184

Keterangan : Analisis statistik t3 dan t4 menggunakan analisis non parametrik *Mann-Whitney U*
(*) = terdapat perbedaan bermakna dengan nilai $P < 0.05$

Hasil analisa regresi probit ED_{50} dilakukan pada t3 dan t4 antara dosis terhadap persen inhibisi. ED_{50} dapat dilihat pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Hasil Probit ED_{50}

Waktu	ED_{50} % Inhibisi
t3	1.922
t4	2.234

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

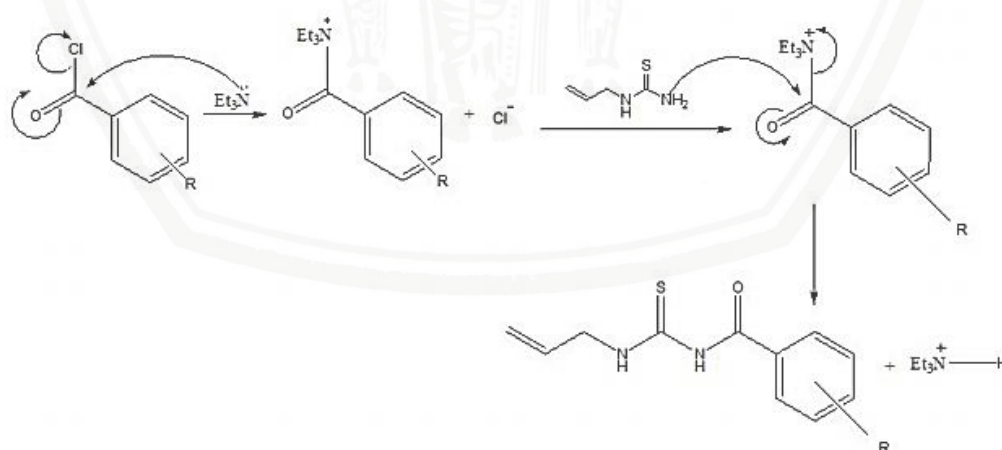
Penelitian ini adalah suatu upaya untuk menemukan dan mengembangkan obat antiinflamasi golongan baru. Penelitian dimulai dengan uji pendahuluan untuk membandingkan parameter kimia fisika senyawa yang akan disintesis yaitu 1-alil-3-benzothiourea dengan senyawa benzothiourea yang telah diketahui memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa nilai parameter kimia fisika senyawa 1-alil-3-benzothiourea adalah ClogP (lipofilisitas) sebesar 2,045, nilai E_{total} (total energi) sebesar 10.0071 Kcal/mol, nilai CMR (parameter sterik) sebesar 6,6472 sedangkan untuk senyawa benzothiourea adalah ClogP sebesar 0,566, E_{total} sebesar 5.2939 Kcal/mol, CMR sebesar 5,2812. Sehingga dapat disimpulkan parameter kimia fisika senyawa yang akan disintesis lebih baik dibandingkan dengan senyawa benzothiourea.

Parameter kimia fisika senyawa 1-alil-3-benzothiourea dengan ClogP sebagai parameter lipofilisitas yang berperan dalam proses penembusan membran bilayer yang lebih baik dibandingkan senyawa benzothiourea. Parameter elektronik (E_{total}) yang lebih baik, dihubungkan dengan interaksi senyawa-reseptor akan lebih baik juga dan parameter sterik (CMR) yang lebih baik menunjukkan keserasian senyawa berikatan dengan reseptor akan lebih baik. Hasil parameter yang lebih baik disebabkan adanya modifikasi struktur yang

dilakukan dengan penambahan alil. Penambahan alil yang bersifat non polar dapat meningkatkan sifat lipofilik suatu senyawa dimana dengan penambahan gugus ini diharapkan mampu meningkatkan kemampuan menembus membran bilayer.

Afinitas senyawa 1-alil-3-benzothiourea dan benzothiourea diuji pada reseptor COX-2 (PDB: 1PXX) menggunakan perangkat lunak *Molegro Virtual Docker 5.0*. Didapatkan nilai RS (*Rerank score*) sebesar -84.8553 yang lebih rendah dari nilai RS senyawa benzothiourea yaitu -71.7552. Nilai RS yang lebih rendah menunjukkan senyawa 1-alil-3-benzothiourea lebih baik berikatan dengan reseptor 1PXX ini. Berdasarkan uji pendahuluan ini, maka disimpulkan bahwa senyawa 1-alil-3-benzothiourea layak untuk disintesis dan diuji aktivitas antiinflamasi.

Sintesis pada penelitian ini menggunakan metode *Schotten-baumann* yang dimodifikasi, mengacu pada penelitian sebelumnya yang menghasilkan produk yang sesuai. Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1 Reaksi Substitusi Nukleofilik

Schotten-baumann merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida secara satu tahap. Reaksi *Schotten-baumann* dilakukan dalam suasana basa. Reaksi

asilasi termodifikasi telah digunakan oleh Siswandono (1999) dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoil klorida sehingga diperoleh senyawa baru turunan benzoiltiourea. Modifikasi reaksi asilasi yang dilakukan pada penelitian ini, dengan penambahan basa trietilamin yang bertujuan untuk menetralkan HCl yang terbentuk dalam hasil samping reaksi dan sebagai katalis untuk memaksimalkan hasil sintesis (Clayden *et al*, 2001). Setelah dilakukan sintesis maka didapatkan hasil berupa serbuk berwarna kekuningan dengan berat 0,4143 gram dengan rendemen sebesar 20,611%. Nilai rendemen terbilang cukup kecil, hal ini dapat disebabkan karena pada proses pencucian banyak produk yang ikut terbuang saat dilakukan dekantasi sehingga berat akhir produk sedikit.

Produk hasil sintesis perlu diuji untuk menentukan kemurnian dan struktur kimianya. Uji kemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 5.3 yang menunjukkan adanya noda tunggal dengan faktor retensi sebesar 0,48 yang juga memenuhi syarat R_f yang baik yaitu antara 0,2-0,8 (Wulandari, 2011). Noda tunggal pada KLT menandakan bahwa produk yang dihasilkan sudah murni. Uji konfirmasi struktur dilakukan untuk membuktikan senyawa produk sesuai dengan perkiraan menggunakan Spektrofotometri IR, Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR), dan Spektroskopi Massa. Uji konfirmasi struktur dimulai dengan spektrofotometri infra merah yang memberikan informasi tentang gugus pada suatu molekul dengan melihat intensitas dan bilangan gelombang pita serapan dari spektrum yang terbentuk (Siswandono, 1999) yang disajikan pada Gambar 5.4. Dari hasil gambar tersebut maka diambil beberapa gugus fungsi seperti $\text{C}=\text{O}$ amida pada bilangan gelombang $1676,57\text{ cm}^{-1}$, yang mana keberadaan

gugus fungsi ini menandakan bahwa senyawa hasil sintesis telah terbentuk. Reaksi substitusi nukleofilik (benzoylasi) antara turunan benzoil klorida dengan alitiourea diharapkan terbentuk ikatan amida antara dua reaktan tersebut. Selain itu terdapat gugus $\text{C}=\text{C}$ aromatis pada bilangan gelombang $1449\text{--}1596\text{ cm}^{-1}$ dan gugus $\text{C}=\text{S}$ muncul pada bilangan gelombang $1184,97\text{ cm}^{-1}$. Gugus fungsi lain yang muncul pada uji konfirmasi menggunakan spektrofotometri infra merah ini adalah gugus N-H ulur pada bilangan gelombang $3233,24\text{ cm}^{-1}$ dimana gugus-gugus ini terdapat pada struktur kimia senyawa hasil sintesis. Sehingga dapat disimpulkan bahwa produk dari sintesis terbentuk dengan adanya puncak spektra yang memasuki rentang bilangan gelombang yang sudah ditentukan. Uji konfirmasi struktur dilanjutkan dengan spektrofotometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ untuk mengetahui jenis, jumlah, serta letak atom hidrogen dan karbon pada senyawa produk. Dari hasil analisa spektra $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dapat dilihat jumlah proton yang terdapat dalam senyawa produk yaitu ada 12 proton dan 11 karbon sesuai dengan rumus molekul senyawa ini yaitu $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$. Uji konfirmasi struktur juga dilakukan dengan spektrometri massa bertujuan untuk melihat bobot molekul yang terbentuk dari hasil sintesis senyawa. Hasil uji spektrometri massa dari sintesis BATU-1 adalah terbentuk 3 serapan yang menunjukkan 3 fragmen dengan massa yang berbeda yaitu $105,086\text{ m/z}$; $122,100\text{ m/z}$; dan $220,953\text{ m/z}$. Kemudian apabila dibandingkan dengan studi pendahuluan yang dilakukan dengan *Chemdraw 8.0* maka berat molekul dari 1-alil-3-benzoyltiourea adalah $220,07\text{ m/z}$. Untuk memperkuat analisis, dilakukan uji pustaka melalui *database* senyawa kimia untuk menentukan senyawa apa saja yang ditunjukkan oleh spektra tersebut dan ditemukan pada massa $105,086\text{ m/z}$ merupakan massa dari benzaldehida, massa $122,100\text{ m/z}$ merupakan senyawa

asam benzimidat yang bisa dimungkinkan sebagai produk sampingan yang terbentuk dari hasil reaksi dan yang terakhir pada massa 220.953 m/z merupakan senyawa produk yang dibutuhkan yaitu 1-alil-3-benzothiourea (Pubchem, 2018).

Hasil dari uji konfirmasi struktur membuktikan bahwa senyawa BATU-1 adalah benar senyawa dengan rumus molekul $C_{11}H_{12}N_2OS$ dengan nama IUPAC 1-alil-3-benzothiourea.

Tahap selanjutnya adalah uji aktivitas antiinflamasi senyawa 1-alil-3-benzothiourea secara *in vivo* terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karagenan pada telapak kakinya. Karagenan dipilih sebagai penginduksi inflamasi pada telapak kaki tikus karena karagenan memberikan hasil yang konsisten dibandingkan kaolin. Penggunaan kaolin hanya menghasilkan edema yang sangat kecil (Winter, 1962). Induksi inflamasi menggunakan karagenan merupakan metode standar untuk menguji aktivitas antiinflamasi dari senyawa kimia. Pemilihan karagenan juga berdasarkan zat ini tidak menimbulkan efek samping sistemik pada tikus (Hussain *et al*, 2015). Mekanisme karagenan dapat menyebabkan inflamasi pada telapak kaki tikus memiliki tiga fase, yaitu fase pertama adalah pelepasan histamin, serotonin, bradikinin yang berlangsung selama 1 jam, fase kedua adalah infiltrasi neutrofil dan pelepasan prostaglandin, fase ketiga adalah terbentuknya radikal bebas turunan neutrofil, nitrit oksida, sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), IL-1 β (*Interleukin 1*) (Mansouri *et al*, 2015).

Pertimbangan pemilihan dosis berdasarkan penelitian diketahui bahwa pada rentang dosis 6,25—25 mg/kgBB merupakan rentang dosis efektif senyawa benzothiourea (Alagarsamy *et al*, 2004; Budiati *et al*, 2010; Shalas *et al*, 2018).

Pengujian analisa regresi probit memerlukan minimal tiga dosis. Penggunaan hewan percobaan untuk penelitian secara *in vivo* biasanya menunjukkan hasil deviasi yang cukup besar apabila dibandingkan dengan penelitian secara *in vitro* karena adanya variasi biologis pada tiap hewan percobaan. Hewan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah secara *in vivo* adalah tikus. Penggunaan tikus (*Rattus norvegicus*) pada penelitian *in vivo* dikarenakan tikus telah diketahui sifat-sifatnya, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang relatif sehat serta cocok untuk berbagai penelitian. Penggunaan tikus dalam penelitian ilmiah ini adalah berkelamin jantan karena tikus betina kondisi hormonal yang sangat berfluktuasi pada saat mulai beranjak dewasa, sehingga dikhawatirkan akan memberikan respon yang berbeda dan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Selain penggunaan tikus dengan *strain* yang sama, usia sama, dan jenis kelamin yang sama, perlu dipelihara pada kondisi yang sama agar meminimalkan variasi biologis (Malole, 1989). Selain itu, alasan penggunaan tikus sebagai hewan uji adalah karena sifat yang lebih ekonomis dibanding hewan uji lainnya.

Metode volume edema dilakukan dengan menginduksi senyawa karagenan pada salah satu telapak kaki tikus. Edema yang diinduksi oleh pemberian senyawa karagenan pada telapak kaki tikus diukur menggunakan alat pletismometer. Pletismometer adalah perangkat pertama dan asli yang dirancang khusus untuk mengukur volume kaki dan perubahannya (pembengkakan) pada hewan pengerat dengan cara memasukkan kaki tikus kedalam wadah yang berisi air raksa. Pletismometer memiliki prinsip pengukuran berdasarkan hukum Archimedes yang menyatakan bahwa apabila benda dimasukkan ke dalam zat cair, maka akan menimbulkan gaya atau tekanan ke atas (Morris, 2003).

Pengukuran edema yang diinduksi oleh karagenan menggunakan alat pletismometer menghasilkan data berupa volume edema pada waktu 0 jam (t_0), 1 jam (t_1), 2 jam (t_2), 3 jam (t_3), dan 4 jam (t_4), setelah pemberian obat dengan masing-masing dosis. Kemudian dilakukan pengolahan data untuk dijadikan data persen inhibisi terhadap inflamasi. Data volume edema pada t_0 sampai t_2 setelah pemberian obat memiliki data bernilai negatif dan variasi yang sangat tinggi yang dimungkinkan karena senyawa dan obat yang diberikan secara oral belum bekerja secara maksimal karena rute pemberian oral memerlukan waktu yang cukup lama pada proses absorpsi. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi absorpsi pada tikus adalah asam lambung, makanan yang terdapat di lambung, waktu pengosongan lambung, dan enzim pencernaan (Hedrich, 2012).

Hasil pengukuran volume edema diperoleh keadaan data yang memiliki variasi tinggi maka dilakukan metode reduksi data yang bertujuan untuk mengurangi tingkat kesalahan analisa. Prosedur reduksi data ini dilakukan pada data mentah yang melibatkan data volume edema tikus. Dari setiap data pada setiap kelompok akan dilakukan reduksi pada data yang tidak memenuhi syarat yaitu pada data yang memiliki nilai perbedaan yang sangat tinggi dengan nilai simpangan baku relatif $>20\%$ (Sasmito, 2008) dan berdasarkan pada hasil analisis outlier. Data yang dapat dianalisis adalah data pada waktu t_3 dan t_4 .

Berdasarkan persen inhibisi uji aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-benzothiourea memiliki aktivitas yang lebih buruk dalam semua dosis dibandingkan kontrol positif natrium diklofenak dengan dosis 12.5 mg/kgBB, berdasarkan uji statistika, hasil data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p < 0,05$ maka syarat uji ANOVA tidak terpenuhi dan dilanjutkan pada uji non parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil *Kruskal-Wallis* tidak

menunjukkan perbedaan aktivitas antiinflamasi yang bermakna antara semua dosis dengan natrium diklofenak 12,5 mg/kgBB pada t3 dan t4. Hal tersebut dapat terjadi karena nilai persen inhibisi setiap dosis yang dianalisis memiliki deviasi yang sangat besar yang menunjukkan bahwa data memiliki varian yang kurang normal.

Uji regresi probit dilakukan antara dosis terhadap persen inhibisi. Hasil uji regresi probit pada t3 ED₅₀ adalah sebesar 1,922 dan t4 ED₅₀ adalah sebesar 2,234. Hasil uji antiinflamasi pada t3 dan t4 diperoleh data yang kurang bagus. Hal ini dapat disebabkan karena nilai persen inhibisi negatif. Nilai persen inhibisi negatif, artinya bahwa senyawa tersebut menyebabkan edema pada tikus. Data yang kurang bagus juga disebabkan oleh nilai RSD yang sangat besar. Sehingga dapat disimpulkan bahwa data tidak *reliable*.

Berdasarkan uji *in silico* menunjukkan bahwa 1-alil-3-benzoiltiourea memiliki nilai afinitas yang baik pada reseptor COX-2. Hasil uji statistika senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea dengan nilai ED₅₀ adalah sebesar 2,234 mg/kgBB. Hasil uji statistika tersebut merupakan hasil yang baik. Karena pada dosis 2,234 mg/kgBB senyawa tersebut telah memberikan efek antiinflamasi. Namun demikian, berdasarkan uji antiinflamasi diperoleh hasil yang kurang baik karena nilai persen inhibisi bernilai negatif. Nilai persen inhbisi yang negatif dapat disebabkan oleh profil farmakokinetik dari senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea. Profil farmakokinetik meliputi proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi. Profil farmakokinetik tersebut yang menjadi penentu dalam aktivitas inhibisinya pada uji antiinflamasi. Jika profil farmakokinetik senyawa 1-alil-3-benzoiltiourea kurang baik, maka aktivitas inhibisi terhadap inflamasi akan lemah. Sehingga dapat disimpulkan bahwa uji *in silico* dan uji antiinflamasi tidak relevan.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Implikasi penelitian terhadap bidang kefarmasian adalah dengan penemuan senyawa penuntun antiinflamasi yang baru, penelitian lanjutan dapat dilakukan untuk membuktikan bahwa senyawa yang baru memiliki efek samping yang lebih minimal dibanding OAINS (Obat Anti Inflamasi Non Steroid).

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini tidak melakukan uji farmakokinetik 1-alil-3-benzoylthiourea untuk mengetahui profil absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi pada rute pemberian oral sehingga belum diketahui faktor-faktor yang berperan penting dalam efek antiinflamasi senyawa tersebut.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Senyawa 1-alil-3-benzothiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik dengan metode *Schotten-baumann*.
2. Aktivitas antiinflamasi senyawa 1-alil-3-benzothiourea dalam semua dosis tidak lebih baik dibandingkan kontrol positif natrium diklofenak dengan dosis 12.5 mg/kgBB berdasarkan rata-rata persen inhibisi. Berdasarkan analisis statistik, aktivitas antiinflamasi tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara setiap dosis dengan natrium diklofenak dosis 12.5 mg/kgBB.

7.2 Saran

1. Saran yang bisa disampaikan berdasarkan penelitian ini adalah rute pemberian senyawa dapat diberikan secara topikal sehingga absorpsi lebih cepat dan efek terapeutik lebih cepat tercapai.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut terkait farmakokinetik senyawa 1-alil-3-benzothiourea.

DAFTAR PUSTAKA

- Alagarsamy V., Muruganathan G., and Venkateshperumal R. Synthesis, analgesic, antiinflammatory and antibacterial activities of some novel 2- methyl-3-substituted quinazolin-4-(3H)-ones. *Bio Pharm Bull*, 2004, 27: 652-656.
- Anam, C., Sirojudin, dan Firdausi, K.S. Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Berkala Fisika*, 2007, 10: 79-85.
- Budiati, Tutuk., Suzana, Sardijati, Siti. Sintesis, Uji Aktivitas Analgesik dan Anti Inflamasi Senyawa Benzoiltiourea Tersubstitusi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2010, 21 (1): 68-76.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., 2001. *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, p. 208.
- Corsini, R.J. Encyclopedia of Psychology. *Journal of Psychology*, 2005, 3: 375-469.
- Corwin, E.J, 2008. *Buku Saku Patofisiologi Corwin* Edisi ke 3, EGC, Jakarta, hal. 279-281.
- Depkes RI, 2013. *Riset Kesehatan Dasar. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI*, Jakarta, hal. 111-112.
- Dorland, W.A., Newman, 2002. *Kamus Kedokteran Dorland edisi 29*, EGC, Jakarta, hal. 1815.
- Gunawan., 2009. *Farmakologi dan Terapan*, Edisi Kelima, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 230.
- Hardjono, Sastrohamidjoyo, 2005. *Kromatografi*, Liberty, Yogyakarta, hal. 87-88.
- Hedrich, Hans J, 2012. *The Laboratory Mouse*, Elsevier Ltd, USA, p. 691.

- Hussain L., Akash S. H. M., Ain N-U., Rehman K. and Ibrahim M. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Tinospora 78 cordifolia*. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 24 (6): 957– 964.
- Kachhadia V.V., Patel M. R., and Joshi H. S. Heterocyclic system containing S/N regioselective nukleophilic competition: facile synthesis, antitubercular and antimicrobial activity of thiohydantoins and iminothiazolidinones containing the benzol(b)thiophene moiety. *J Serb Chem Soc*, 2004, 70 (2): 153-161.
- Katzung, B.G, 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 291-323.
- Kaymakcioglu, Bedia-Kocyigit., Ahmet Ozgur Celen., *et al.* Synthesis and Biological Activity of Substituted Urea and Thiourea Derivatives Containing 1,2,4-Triazole Moieties Molecules, 2013, 18: 3562-3576.
- Kossakowski J., and Struga M. Synthesis of thiourea derivatives of 1H-Isoindol-1,3(2H)-dione as potential antiviral agents. *Ann Univ Mariae Curie-sklodowska Lublin-Polonia*, 2006, 111: 186-191.
- Lelo, A., Hidayati D., Juli S. Penggunaan Anti-Inflamasi Non-Steroid Yang Rasional Pada Penanggulangan Nyeri Rematik. *E-USU Repository Universitas Sumatra Utara*, 2004: 1-9.
- Limban, C., Chifriuc, M.C. B, Missir, A.V, Chirita I. C, and Bleotu C., 2008. Antimicrobial activity of some new thioureides derived from 2-(4-chlorophenoxymethyl)benzoic acids, part 13, (Online), (<http://www.mdpi.org/molecules.com>).
- Malole MBM dan Pramono CSU, 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor, hal. 2-3.
- Mansouri M. T., Hemmati A. A., Naghizadeh B., Mard S. A., Rezaie A. and Ghorbanzadeh B. A study of the mechanisms underlying the antiinflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 2015, 47 (3): 292– 298.

- Morris, Christopher J. Carrageenan Induced Paw Edema in The Rat and Mouse In P.G Winyard and D.A Willoughby (Ed). *Molecular Biology*, 2003, 2 (25): 177-183.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M, Kriz, G.S, 2009. *Introduction to Spectroscopy Fourth Edition*, Cengage Learning Inc, London, p. 46.
- Pubchem, 2018. Database Kimia Senyawa, (Online), (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/240>, diakses Tanggal 19 Desember 2018).
- Robbins, Rebecca, Schmidt, Walter F. Optimized Synthesis of Four Isotopically Labeled (^{13}C -Enriched) Phenolic Acids via a Malonic Acid, *J label Compd Radiopharm*, 2004, 47: 797-806.
- Sasmito, Teguh, 2008. *Pengolahan dan Analisis Data Penelitian*. Direktorat Tenaga Kependidikan Dirjen Peningkatan Mutu Pendidik Dan Tenaga Kependidikan Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta, hal. 29-31.
- Shalas, Alvan F., Siswandono, Rudyanto, Marcellino. Synthesis and Pain Inhibition Activity of The Analogs of 1-Allyl-3-Benzoylthiourea for New Analgesic Lead Compound Discovery. *J Young Pharmacist*, 2018, 10 (1): 12-15.
- Siswandono. 1999. *Modifikasi Struktur dan Hubungan Struktur-Aktivitas Senyawa-Senyawa Baru Turunan Benzoiurea*. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Siswanto, A., Nurlita , N.A. 2005. *Daya Antiinflamasi Infus Daun Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Scheff Boerl) pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Jantan*, Prossiding Seminar Nasional TOI XXVII, 177-181, Batu, 15-16 Maret 2005.
- Skoog, D., 1998. *The Principle of Instrumen Analysis, 5th Edition*, Harcourt Brace and Co., Orlando, p. 210-211.
- Sostres, Carlos., Gargallo, Carla J., Arroyo, Maria T., Lanas, Angel. Adverse Effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs, Aspirin

and Coxibs) on Upper Gastrointestinal Tract. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2010, 24: 121-132.

Sulaiman, M.R., Zakarian., Z.A, Daud, I.A dan Hidayat, M.T. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of The Aq. Extract of *Kaempferia galanga* Leaves in Animal Models. *Journal of Natural Medicine*, 2008, 62: 221-227.

Tjay, Tan Hoan.,Rahardja, Kirana, 2002. *Obat-Obat Penting*.Penerbit PT Elex Media Komputindo, Jakarta, hal. 707.

Tjay, Tan Hoan.,Rahardja, Kirana, 2007. *Obat-Obat Penting*.Penerbit PT Elex Media Komputindo, Jakarta, hal. 328.

Wattimena, J., Sugiarso, N.C, Widiyanto, M.B., Sukandar, E.Y., Soemardji, A.A., Setiadi, A.R, 1993. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hal. 308-313.

Wilmana, P.F dan Gan, S.G, 2007. *Analgesik-Antipiretik Analgesik Anti-Inflamasi Nonsteroid dan Obat Gangguan Sendi Lainnya*, EGC, Jakarta, hal. 2-23.

Winter, C.A, Risley, E.A and Nuss, G.W. Carrageenan-induced oedema in the hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory activity. *Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine*, 1962, 111: 544-547.

Wulandari, Lestyo, 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*, PT. Taman Kampus Presindo, Jember, hal. 26.