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

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

Oleh:
H.M. Annwary Siregar
NIM 145070501111032

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL i

HALAMAN PENGESAHAN ii

KATA PENGANTAR iii

ABSTRAK v

ABSTRACT vi

DAFTAR ISI vii

DAFTAR TABEL xii

DAFTAR GAMBAR xiii

DAFTAR SINGKATAN xv

DAFTAR LAMPIRAN xvii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 8

1.3 Tujuan Penelitian 9

1.3.1 Tujuan Umum 9

1.3.2 Tujuan Khusus 9

1.4 Manfaat Penelitian 9

1.4.1 Manfaat Akademik 9

1.4.2 Manfaat Praktis.....9

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Inflamasi.....10

2.1.1 Pengertian Inflamasi.....10

2.1.2 Mekanisme Inflamasi.....11

2.2 Obat Antiinflamasi.....12

2.2.1 Obat Antiinflamasi Steroid.....13

2.2.2 Obat Antiinflamasi Non Steroid.....14

2.3 Natrium Diklofenak.....15

2.4 Sintesis…... 16

2.5 Tinjauan Mengenai Bahan Sintesis.....18

2.5.1 3-klorobenzoil Klorida.....18

2.5.2 Aliltiourea 18

2.6 Tinjauan Mengenai Konfirmasi Struktur Senyawa.....19

2.6.1 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Inframerah……19

2.6.2 Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometri

Resonansi Magnet Inti……19

2.6.3 Identifikasi Struktur dengan Spektrometri Massa……20

2.7 Karagenan……20

2.8 Hewan Percobaan *Rattus norvegicus*.....21

2.9 Pengujian Efek Antiinflamasi……22

2.9.1 Tes Formalin ……22

2.9.2 λ-karagenan Sebagai Penginduksi Udema Pada Tapak Kaki ……23

2.9.3 Metode Panas ……24
2.9.4. Etil Fenil Propionate Sebagai Penginduksi Edem
Pada Telinga Tikus……24
2.9.5 Putih Telur Sebagai Penginduksi Edema……24

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian 25
3.2 Hipotesis Penelitian 27

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian 28
4.2 Subjek Penelitian 28
4.3 Variabel Penelitian 29
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian 30
4.5 Bahan dan Alat ……30
4.5.1 Bahan……30
4.5.2 Alat……30
4.6 Prosedur Penelitian 31
4.6.1 Studi Pendahuluan *In Silico*……31
4.6.2 Sintesis Senyawa……32
4.6.3 Uji Kemurnian……32
4.6.3.1 Uji KLT……33
4.6.4 Uji Konfirmasi Struktur……33
4.6.4.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR……33
4.6.4.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer

Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR).....33
4.6.4.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Massa.....34
4.6.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.....34
4.7 Analisis Data.....35

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian.....36
5.1.1 Uji In Silico.....36
5.1.2 Sintesis Senyawa BATU-3 38
5.1.3 Hasil Uji Kemurnian Senyawa BATU-3 Menggunakan KLT 38
5.1.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-3 39
5.1.4.1 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR 39
5.1.4.2 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR) 40
5.1.4.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Massa 43
5.1.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.....45
5.2 Analisis Data 47

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian.....48
6.2 Implikasi di Bidang Farmasi.....54
6.3 Keterbatasan Penelitian 54

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan 55
7.2 Saran 55
DAFTAR PUSTAKA 56
LAMPIRAN 59

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.1 Aktivitas Antiinflamasi Turunan Benzoilturea (*carragenan-induced paw oedema*) 5

Tabel 5.1 Hasil Uji Pendahuluan Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 36

Tabel 5.2 Persen Rendemen dari Senyawa Produk BATU-3..... 38

Tabel 5.3 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-3 40

Tabel 5.4 Karakteristik Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa BATU-3 42

Tabel 5.5 Karakteristik Spektrum ^{13}C-NMR Senyawa BATU-3 43

Tabel 5.6 Analisis Fragmen Massa Senyawa BATU-3 44

Tabel 5.7 Data Hasil Pengukuran Bengkak Kaki 46

Tabel 5.8 Hasil Analisis ANOVA..... 47

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1.1 Kemiripan Struktur Kimia Senyawa-Senyawa dengan Gugus Farmakofor Ureida Asiklik 4

Gambar 1.2 Struktur Kimia Senyawa Turunan Tiourea 7

Gambar 2.1 Mekanisme Terjadinya Inflamasi 12

Gambar 2.2 Natrium Diklofenak 15

Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Dua Tahap Pembentukan Benzoiltiourea dengan Ammonium Tiosianat 17

Gambar 2.4 3-klorobenzoil Klorida 18

Gambar 2.5 Aliltiourea 18

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 25

Gambar 4.1 Prosedur Penelitian 31

Gambar 4.2 Prosedur Studi Pendahuluan *In Silico* 31

Gambar 4.3 Prosedur Sintesis Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 32

Gambar 4.4 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT 32

Gambar 4.5 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR 33

Gambar 4.6 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR) 33

Gambar 4.7 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Massa 34

Gambar 4.8 Prosedur Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea……35
Gambar 5.1 *Ligand map* Interaksi Senyawa Benzoiltiourea dengan Reseptor 1PXX……37
Gambar 5.2 *Ligand map* Interaksi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan Reseptor 1PXX……37
Gambar 5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan KLT ..... .39
Gambar 5.4 Spektra IR Senyawa BATU-3 dalam Pelet Kbr ..... .40
Gambar 5.5 Hasil Spektra 1H-NMR Senyawa BATU-3 ..... .41
Gambar 5.6 Hasil Spektra 13C-NMR Senyawa BATU-3 ..... .42
Gambar 5.7 Hasil Spektra MS Senyawa BATU-3 ..... .44
Gambar 5.8 Struktur Kimia Senyawa BATU-3 ..... .45
Gambar 6.1 Usulan Reaksi Substitusi Nukleofilik..... .49

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA = *Analysis of Variance*

C-NMR = *Carbon-Nuclear Magnetic Resonance*

COX = *Cyclooxygenase*

COX-1 = *Cyclooxygenase-1*

COX-2 = *Cyclooxygenase-2*

CMC-Na = *Sodium-Carboxymethyl Cellulose*

ED_{50} = *Effective Dose 50*

GC/MS = *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*

GI = *Gastrointestinal*

H-NMR = *Hidrogen-Nuclear Magnetic Resonance*

IR = *Infrared*

IUPAC = *International Union of Pure Applied Chemistry*

KLT = Kromatografi Lapis Tipis

LPS = Lipopolisakarida

mRNA = *messenger-Ribonucleic Acid*

NMR = *Nuclear Magnetic Resonance*

NSAID = *Non Steroid Anti Inflammatory Drug*

Nu: = Nukleofil

OAINS = Obat Anti Inflamasi Steroid

p.o = Per Oral

Pdb = *Protein Data Bank*

PGHS = *Prostaglandin G/H Sintase*

RS = *Rerank Score*

SPSS = *Statistical Product and Service Solutions*

TNFα = *Tumor Necrosis Factor Alfa*

TMS = Tetrametilsilan

vHTS = *virtual High-Throughput Screening*

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Perhitungan Jumlah Bahan Untuk Sintesis 59

Lampiran 2. Perhitungan hasil sintesis 60

Lampiran 3. Surat Bukti Kelaikan Etik 61

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Saat Penyuntikkan Tikus 62

Lampiran 5. Dokumentasi Hasil Uji KLT Serta Optimasi Eluen 63

Lampiran 6. Spektra Hasil Spektrofotometri IR 65

Lampiran 7. Spektra Hasil Spektrofotometri ^{1}H-NMR 66

Lampiran 8. Spektra Hasil Spektrofotometri ^{13}C-NMR 67

Lampiran 9. Spektra Hasil Dari Spektroskopi Massa 68

Lampiran 10. Data Perhitungan % Inhibisi 69

Lampiran 11. Hasil Uji Statistika 70

Lampiran 12. Hasil Probit ED_{50} 75

Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian 77

HALAMAN PENGESAHAN

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

Oleh:
H. M. Annwary Siregar
145070501111032

Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 24 Juli 2018
dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I

Anisyah Achmad,S.Si, Apt., Sp. FRS
NIP. 197712232006042002

Pembimbing-I/Penguji-II,

Alvan Febrian Shalas, M.Farm, Apt.
NIP. 201106850218100 1

Pembimbing-II/Penguji-III,

Bachtiar Rifa'i P. I, M.Farm, Apt.
NIP. 2012058709291001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si
NIP. 195408231981032001

Scanned by CamScanner

Brawijaya Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Siregar, H.M. Annwary. 2018. **Sintesis Dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Senyawa 1-Alil-3-(3-Klorobenzoil)Tiourea 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) Bachtiar Rifa'i Pratita Ihsan, M.Farm, Apt.

Penggunaan OAINS dalam jangka panjang untuk mengatasi radang telah dilaporkan menyebabkan efek samping yaitu gangguan pencernaan dan kegagalan fungsi ginjal. Oleh sebab itu diperlukan obat antiinflamasi baru yang memiliki efek samping yang lebih minimal. 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-(3-klorobenzoil)tiourea dan mengetahui potensi antiinflamasi senyawa tersebut. Sintesis dilakukan dengan metode Schotten-Baumann dengan reaksi substitusi nukleofilik senyawa aliltiourea terhadap senyawa 3-klorobenzoil klorida serta uji aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan pemberian senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terhadap kelompok perlakuan secara oral dalam suspesi 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 karagenan 1% secara intraplantar pada telapak kaki kiri belakang. 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 murni dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) yang kemudian struktur produk dikonfirmasi menggunakan spektrofotometer IR, ^{1}H-NMR,^{13}C-NMR, dan Spektroskopi Massa adalah 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan rumus kimia $C_{11}H_{11}ClN_2OS$. Hasil uji antiinflamasi menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-(-3-klorobenzoil)tiourea dalam semua dosis lebih baik dalam menghambat peningkatan edema dibandingkan dengan natrium diklofenak dengan nilai ED_{50} 8,049 mg/kgBB, tetapi tidak berbeda signifikan dalam analisis statistik. Kesimpulan : Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis menggunakan metode Scotthen-Baumann melalui reaksi substitusi nukleofilik dan memiliki aktivitas antiinflamasi yang tidak berbeda secara bermakna dengan natrium diklofenak 12,5 mg/kgBB.

Kata Kunci : sintesis, 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea, antiinflamasi, OAINS

Brawijaya Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Siregar, H.M. Annwary. 2018. **Synthesis and in vivo Antiinflammatory Activity Test of 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl) thiourea 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) Bachtiar Rifa'i Pratita Ihsan, M.Farm, Apt.

The purpose of this study are to synthesize 1-alil-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea and to determine whether it had the potency to stop inflammation occurs at wistar rat. Prolonged use of NSAID to treat inflammation are reported to have side effects such as gastrointestinal disurbance and renal failure. New antiinflamatory agents that had minimum side effects are needed. Benzoylthiourea are known to have analgetic and antiinflammatory activity. Structure modification are widely known in drug development to produce better compound. The synthesize was done using Schotten-Baumann method with nucleophilic substitution of aliltiourea to 3-chlorobenzoyl chloride. The antiinflamatory potential are determined by the addition of 1-alil-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea to the treatment group orally using CMC-Na 1%w/v as suspension. The dosage used were 6,,25 mg/kgBW, 12,5 mg/kgBW and 25 mg/kgBB, injected to male wistar rat that has been induced with intraplantar karagenan 1% at the left hind paw. The control group were given CMC-Na 1%b/v and the compare group were given sodium diclofenac 12,5mg/kgBW in CMC-Na 1%w/v suspension using the same route. The parameters observed is hind paw volume measured with plethysmometer at 1,2,3 and 4 hours after induction. The product of the synthesize were pure tested using Thin Layer Cromatograph (TLC), then the product structure was confirmed using IR spectrophotometer, ^{1}H-NMR,^{13}C-NMR, and Mass Spectroschopy with 1-alil-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea as the result and $C_{11}H_{11}ClN_2OS$ as the chemical structure. Antiinflamatory test result shown that the 1-alil-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea compound has antiinflamatory effects and it also inhibit the edema increase. The ED_{50} value were 8,049mg/kgBW, it wasn't stastistically significant. Conclusion: It is possible to synthesize 1-alil-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea using Schoten-Baumann method through nucleophilic substitution and it has no difference significancy antiinflamatory activity compared to sodium diclofenac 12,5mg/kgBB.

Keywords : synthesize, 1-allyl-3-(3-chlorobenzoyl)thiourea, antiinflammatory, NSAID

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peradangan (inflamasi) adalah urutan kejadian yang terjadi sebagai respon terhadap rangsangan, infeksi, trauma, atau luka pada jaringan hidup. Peradangan diawali oleh serangkaian kejadian yaitu aktivasi enzim, pelepasan mediator, ekstravasasi cairan, migrasi sel, kerusakan jaringan, dan proses perbaikan. Peradangan ditandai dengan induksi rasa sakit, kemerahan, dan ruam. Peradangan berkelanjutan dapat menyebabkan efek kesehatan yang tidak diinginkan sebagai konsekuensi interaksi berbagai biomolekul yang dikeluarkan selama proses peradangan. Prostaglandin adalah salah satu biomolekul penting, yang memainkan peran kunci dalam induksi respons inflamasi karena biosintesisnya meningkat secara signifikan selama peradangan (Lalrinzuali *et al.*, 2016).

Kemampuan manusia dalam mengobati peradangan dimulai sekitar 3500 tahun yang lalu dimana seorang dokter Yunani Hippocrates meresepkan ekstrak kulit dan daun dari pohon willow (*Salix babylonica)*. Kemudian di abad ke 17, zat aktif kulit pohon willow salicin diidentifikasi di Eropa. Perusahaan Kolbe di Jerman memulai memproduksi asam salisilat pada tahun 1860. Asam asetil salisilat (aspirin) sebagai turunan dari asam salisilat kemudian dipasarkan oleh Bayer pada tahun 1899. Namun, mekanisme aksi antiinflamasi dan agen analgesik seperti aspirin dan indometasin tetap sulit dipahami sampai awal 1960-an yang kemudian berubah pada

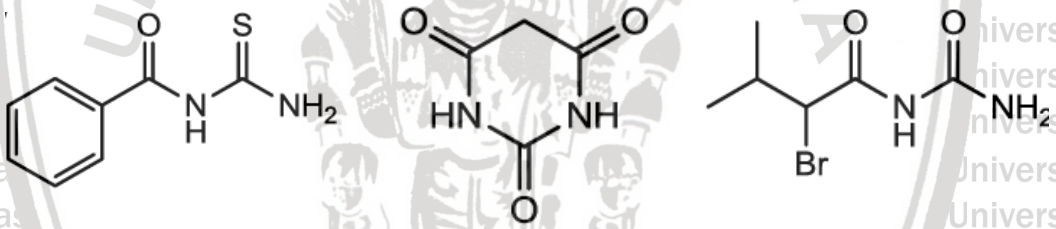
tahun 1970-an dimana John Vane menemukan bahwa mekanisme kerja aspirin (asam asetil salisilat) dan obat antiinflamasi nonsteroid adalah penghambatan dari enzim prostaglandin H sintase (PGHS) atau *Cyclooxygenase* (COX) sebagai target yang sangat sesuai untuk terapi antiinflamasi.

Enzim COX hadir sebagai dua isoform, masing-masing dengan fungsi yang berbeda, COX-1 secara konstitutif diekspresikan dalam perut, ginjal, mukosa usus, dan jaringan lainnya. Ekspresi ini bertujuan untuk melindungi lapisan mukosa perut dan memiliki peran penting dalam vasokonstriksi dan agregasi trombosit. Di sisi lain COX-2 yang dapat diinduksi upregulasi selama masa peradangan menyebabkan vasodilatasi (Ghosh *et al.,* 2015). Produksi prostaglandin bergantung pada enzim siklooksigenase (COX) secara khusus COX 2. Oleh karena itu agen yang mengandung atau memblokir produksi prostaglandin (COX 2) sebagai biomolekul penting dalam respon radang mungkin memainkan peran penting dalam mengobati patologi yang terkait dengan reaksi inflamasi. NSAID (*Non Steroid Antiinflammatory Drug*) mengerahkan efek penghilang rasa sakit terutama dengan cara menghambat jalur siklooksigenase. Jalur ini bertanggung jawab atas konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin dan tromboksan. Toksisitas gastrointestinal (GI) yang terkait dengan penggunaan NSAID secara luas terbukti menjadi kekurangan yang utama penggunaan terapi jangka panjang (Rao dan Knaus, 2008). Sehingga dengan demikian, dibutuhkan pengembangan obat antiinflamasi yang memiliki efek samping yang minimal.

Proses penemuan dan pengembangan obat membutuhkan waktu lama dan biaya yang cukup besar. Proses dimulai dari identifikasi senyawa target, kemudian memvalidasi senyawa target, dan mengidentifikasi calon obat. Sebelum obat baru tersebut dipasarkan, calon obat harus melalui uji preklinis dan klinis yang kemudian mendapatkan persetujuan badan pengawas obat yang berwenang. Karena keterbatasan hasil, akurasi dan biaya, teknik percobaan tidak bisa diterapkan secara luas, oleh karena itu belakangan ini proses penemuan obat telah bergeser ke pendekatan *in-silico* seperti pemodelan homologi, interaksi protein-ligan, analisis *microarrary*, vHTS (*virtual High-Throughput Screening*) dan lain-lain menggunakan sistem komputerisasi. Uji *in silico* menunjukkan hasil yang sangat cepat dan akurat untuk mengidentifikasi dan memprediksi target (Rao *et al.,* 2011).

Salah satu metode *in-silico* yang dapat digunakan adalah *docking.* Metode ini dapat mengidentifikasi kecocokan antara reseptor dengan ligan yang potensial. Docking terdiri dari dua bagian bagian yang berbeda yaitu bagian *"docking"* yang merupakan skema pencarian untuk mengidentifikasi konformasi yang sesuai, dan bagian *"scoring"* yang merupakan ukuran anfinitas konformasi yang sesuai tersebut. *Protein-ligand docking* adalah suatu teknik pemodelan molekuler dengan tujuan memprediksi posisi dan orientasi ligan (molekul kecil) saat terikat dengan protein reseptor (molekul besar) atau enzim. Teknik *docking* digunakan dalam virtual screening yang memiliki senyawa kimia dalam database besar untuk memilih kemungkinan calon obat (Rao *et al.,* 2011).

Tiourea dilaporkan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat (Kaymakcioglu dkk., 2012). Berdasarkan penelitian Alagarsamy (2004), tiourea telah dikenal sangat baik dalam literatur dan memiliki peran penting dalam aktivitas analgesik, antiinflamasi, dan antibakteri. Menurut Suzana dkk. (2004) asilasi benzoilklorida dengan salah satu gugus asam amino dari tiourea yaitu senyawa benzoiltiourea menunjukkan aktivitas penekan sistem saraf pusat. Aktivitas penekanan sistem saraf pusat ini diduga karena benzoiltiourea memiliki struktur ureida asiklik yang mirip dengan struktur bromisoval atau turunan dari senyawa barbiturat (Tjay dan Rahardja, 2007). Kemiripan struktur benzoiltiourea dengan asam barbiturat dan bromisoval dapat dilihat di Gambar 1.1



Benzoiltiourea Asam Barbiturat Bromisoval

Gambar 1.1 Kemiripan Struktur Kimia Senyawa-Senyawa Dengan Gugus Farmakofor Ureida Asiklik

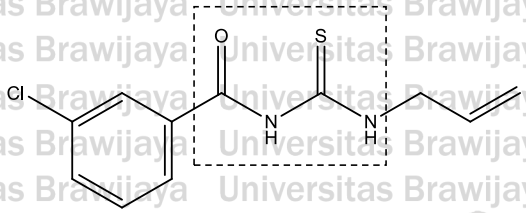
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Budiati dkk. (2010), senyawa benzoiltiourea tersubsitusi menunjukkan efek analgesik dan antiinflamasi. Aktivitas antiinflamasi benzoiltiourea disebabkan hambatan terhadap sintesis enzim COX. Aktivitas antiinlamasi meningkat karena penambahan substituen -Cl dan -NO_2 pada struktur benzoiltiourea, dimana pengaruh substituen -Cl lebih besar daripada substituent -NO_2 dengan nilai persen inhibisi yang dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1 Aktivitas Antiinflamasi Turunan Benzoilturea (*carragenan-induced paw oedema*)

Senyawa uji	Dosis (mg/kg BB)	Inhibisi (PI) (%)			
		1 jam	2 jam	3 jam	4 jam
Na-diklofenak	12,5	-6,67	59.33±5.96	66.29±4.07	59.33±5.96
Benzoiltioureа	12,5	-26.1	18.34±2.35	19.71±5.16	7.33±10.11
	25,0	23.33±2.89	31.67±8.98	46.57±4.80	44.67±10.43
	50,0	34.67±8.16	48.00±8.37	60.10±7.02	56.00±5.48
4-Nitrobenzoiltioureа	12,5	23.33±2.89	35.67±6.62	49.24±6.94	43.00±13.04
	25,0	34.67±8.16	52.00±8.37	63.43±4.55	59.33±5.96
	50,0	59.33±5.53	72.33±8.79	81.43±5.68	76.33±5.82
4-Klorobenzoiltioureа	12,5	33.32±2.79	52.00±8.37	63.43±4.55	59.33±5.96
	25,0	56.67±8.16	74.00±14.49	76.95±7.53	81.33±11.93
	50,0	69.17±7.26	84.67±10.43	88.52±6.68	96.67±7.45

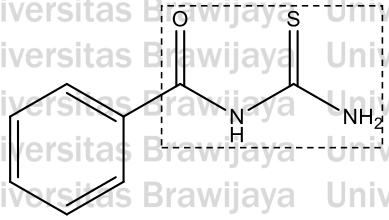
Modifikasi struktur dilakukan dalam pengembangan obat untuk mendapatkan senyawa penuntun yang lebih baik. Parameter yang sangat penting dalam interaksi obat-reseptor yaitu parameter elektronik, lipofilik dan sterik. Penambahan gugus yang bersifat non-polar seperti gugus alkil pada cincin aromatis dapat meningkatkan sifat lipofilik suatu senyawa dimana dengan penambahan gugus ini diharapkan mampu meningkatkan kemampuan senyawa menembus membran bilayer. Untuk meningkatkan sifat elektronik suatu senyawa dapat ditambahkan gugus yang bersifat elektronegatif seperti gugus halogen. Peningkatan sifat elektronik diharapkan mampu memperpanjang interaksi senyawa dengan reseptor dengan jalan memperlambat metabolisme senyawa. Pada senyawa yang akan disintesis dalam penelitian ini ditambahkan gugus Cl (gugus halogen) yang berfungsi untuk memperoleh efek konjugasi dan efek induksi. Penambahan alil (gugus alkil) digunakan untuk memperbaiki sifat kimia fisika, stereo kimia, dan meningkatkan reaktivitas senyawa (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui sifat kimia fisika dari senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan dibandingkan senyawa benzoiltiourea yang telah diketahui memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi. Dalam uji pendahuluan dengan menggunakan *Chemdraw Ultra 12.0* dan *Chem3D Pro 12.0*, diketahui bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki CLogP (koefisien partisi) sebesar 2,959, nilai E_{TOTAL} (total energi) sebesar 16,077 Kcal/Mol, nilai CMR (parameter sterik) sebesar 7,138. Nilai ketiga parameter tersebut lebih baik dibandingkan dengan nilai parameter pada benzoiltiourea yaitu CLogP sebesar 0,566, E_{TOTAL} sebesar 11,417 Kcal/mol, CMR sebesar 5,281. Kemudian dilakukan *docking* senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan benzoiltiourea terhadap reseptor COX-2 dengan kode *Protein Data Bank* 1 PXX dimana reseptor ini memiliki ligan diklofenak dalam struktur proteinnya. Dari proses *docking* diketahui bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki RS (*Rerank Score*) sebesar -81,160 dan benzoiltiourea memiliki RS sebesar -62,278. Dari hasil uji pendahuluan diatas dapat disimpulkan bahwa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki interaksi dengan COX-2 (pdb: 1PXX) yang lebih baik dibandingkan benzoiltiourea dan layak untuk disintesis dan diuji aktivitas antiinflamasi.



1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

(a)



Benzoiltiourea

(b)

Gambar 1.2 Struktur Kimia Senyawa Turunan Tiourea. (a) Senyawa yang akan disintesis; (b) Senyawa dari penelitian terdahulu yang memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi.

Proses sintesis senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea ini dilakukan melalui reaksi nukleofilik (benzoilasi) dengan menggunakan reaksi *Schotten-Baumann* yang dimodifikasi. Metode ini menggunakan jalur sintesis yang efisien karena terdiri dari satu jalur reaksi. Reaksi *Schotten-Baumann* dilakukan dalam suasana basa dan bila semua pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan. Pada umumnya, reaksi Schotten-Baumann menggunakan pelarut piridina yang bersifat basa, untuk membantu menetralkan HCl yang dibebaskan selama reaksi. Piridina dapat diganti dengan tetrahidrofuran, karena piridina mempunyai bau yang sangat menyengat. Reaksi asilasi termodifikasi telah digunakan oleh Siswandono (1999) dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoilklorida sehingga diperoleh senyawa baru turunan benzoilurea. Modifikasi reaksi asilasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan penambahan basa trietilamin yang ditujukan untuk menetralkan HCl yang terbentuk dalam hasil samping reaksi.

Kemurnian senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea diuji menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan tiga fase gerak yang berbeda

polaritasnya. Struktur senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dikonfirmasi menggunakan metode Spektrofotometri IR, Spektrometri Massa, dan Spektrometri ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR. Setelah dilakukan konfirmasi struktur maka kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* pada tikus jenis wistar dengan induksi karagenan pada telapak kaki yang diukur volume edemanya secara berkala menggunakan pletismometer dan dibandingkan dengan kontrol positif natrium diklofenak.

Berdasarkan uraian inilah dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik dan untuk mengetahui apakah senyawa ini memiliki aktivitas atiinflamasi yang lebih baik dibandingkan dengan natrium diklofenak. Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea sebagai antiinflamasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea terhadap 3-klorobenzoil klorida?
2. Apakah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 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 ini adalah untuk mendapatkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan mengetahui potensi aktivitas antiinflamasinya.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Memperoleh senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan sintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea terhadap 3-klorobenzoil klorida.
2. Membandingkan aktivitas antiinflamasi antara senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 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 antiinflamasi dari turunan 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.

1.4.2 Manfaat Praktis

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

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Inflamasi

2.1.1 Pengertian Inflamasi

Inflamasi adalah respon terhadap cedera jaringan dan infeksi. Ketika proses inflamasi berlangsung, terjadi reaksi vaskular dimana cairan, elemen-elemen darah, sel darah putih dan mediator kimia berkumpul pada tempat cedera jaringan atau infeksi. Proses inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralisir dan membasmi agen-agen yang berbahaya pada tempat cedera dan mempersiapkan keadaan untuk perbaikan jaringan (Wilmana, 2007). Ciri khas inflamasi dikenal dengan tanda-tanda utama inflamasi, yaitu:

a. *Eritema* (kemerahan)

Arteri yang mengedarkan darah ke daerah yang terjadi inflamasi berdilatasi sehingga terjadi peningkatan aliran darah (Corwin, 2008).

b. *Edema* (pembengkakan)

Pembengkakan yang terjadi karena adanya 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).

c. *Kolor* (panas)

Rasa panas dan kemerahan yang terjadi bersamaan dimana panas dapat disebabkan karena jumlah darah lebih banyak di tempat radang daripada di daerah lain di sekitar radang (Wilmana, 2007).

d. *Dolor* (nyeri)

Rasa sakit akibat radang dapat disebabkan beberapa hal: (1) adanya peregangan jaringan akibat adanya edema sehingga terjadi peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa nyeri, (2) adanya pengeluaran zat-zat kimia atau mediator nyeri seperti prostaglandin, histamine, bradikinin yang dapat merangsang saraf-saraf perifer disekitar radang sehingga dirasakan nyeri (Wilmana, 2007).

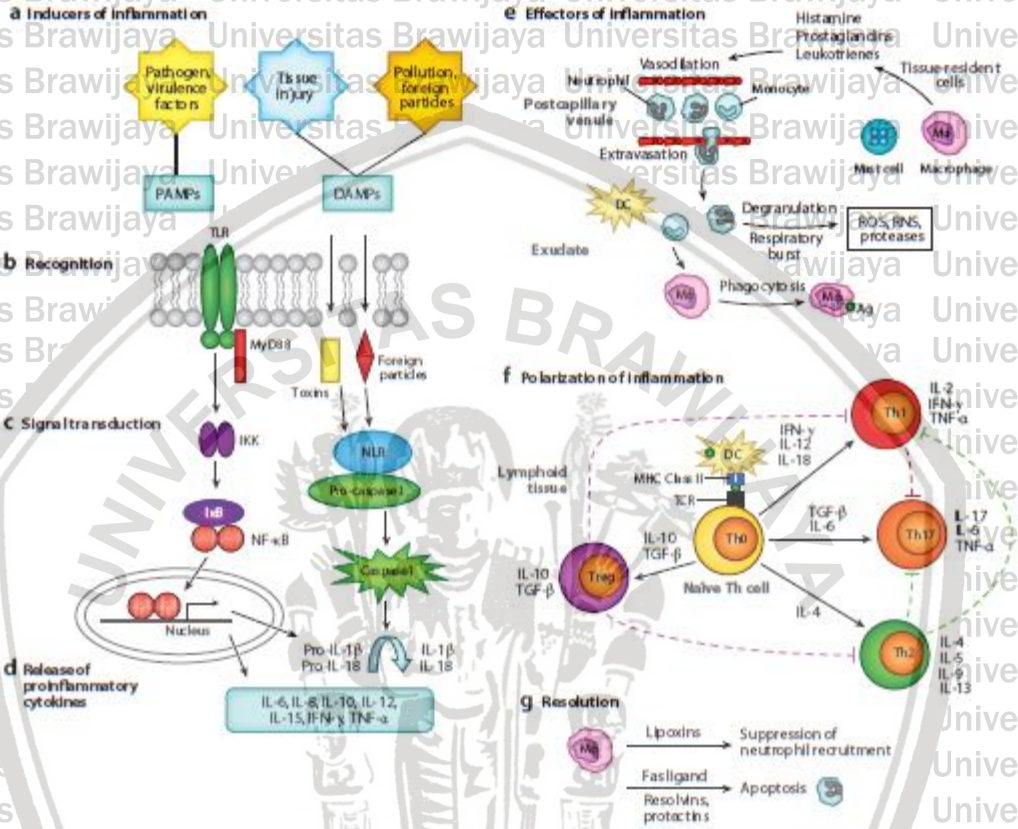
e. *Functiolaesa* (hilangnya fungsi)

Merupakan gangguin fungsi dari jaringan yang terkena inflamasi dan disekitarnya akibat proses inflamasi (Wilmana, 2007).

2.1.2 Mekanisme Inflamasi

Terjadinya inflamasi dimulai dengan adanya stimulus yang merusak jaringan, mengakibatkan sel mast pecah dan terlepasnya mediator-mediator inflamasi. Terjadi vasodilatasi dari seluruh pembuluh darah pada daerah inflamasi sehingga aliran darah meningkat. Terjadinya perubahan volume darah dalam kapiler dan venula yang menyebabkan sel-sel endotel pembuluh darah meregang dan terjadi kenaikan permeabilitas pembuluh darah serta protein plasma keluar dari pembuluh sehingga timbul edema. Infiltrasi leukosit dengan cara melengket pada dinding endothelium

venula kemudian menuju daerah inflamasi dan memfagositosis penyebab inflamasi (Corwin, 2008).



Gambar 2.1 Mekanisme terjadinya inflamasi (Ashley, 2012)

2.2 Obat antiinflamasi

Mekanisme obat antiinflamasi bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase sehingga mengganggu konversi asam arakidonat menjadi PGG2.

Setiap obat menghambat siklooksigenase dengan kekuatan dan selektivitas yang berbeda. Enzim siklooksigenase terdapat dalam 2 isoform disebut COX-1 dan COX-2. Kedua isoform tersebut dikode oleh gen yang berbeda dan ekspresinya bersifat unik. Secara garis besar COX-1 esensial dalam pemeliharann berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit.

Di mukosa lambung, aktivasi COX-1 menghasilkan prostasiklin yang bersifat sitoprotektif. COX-2 semula diduga diinduksi berbagai stimulus inflamator, termasuk sitokin, endotoksin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) ternyata COX-2 juga mempunyai fungsi fisiologis di ginjal, jaringan vascular dan pada proses perbaikan jaringan. Berdasarkan mekanisme kerjanya obat-obat antiinflamasi terbagi kedalam golongan:

2.2.1 Obat Antiinflamasi Steroid

Kortikosteroid adalah obat yang memiliki efek sangat luas sehingga banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Mechanism kerja obat ini adalah dengan menghambat enzim phospholipase A2 sehingga tidak terbentuk asam arakidonat. Asam arakidonat tidak terbentuk sehingga prostaglandin juga tidak akan terbentuk.

Kortikosteroid sendiri digolongkan menjadi dua berdasarkan aktifitiasnya, yaitu glukokortikoid dan mineralokortikoid. Glukokortikoid memiliki peran pada metabolisme glukosa, sedangkan mineralokortikoid memiliki retensi garam. Pada manusia, glukokortikoid alami yang utama adalah kortisol atau hidrokortison, sedangkan mineralokortikoid utama adalah aldosteron.

Kortikosteroid mempunyai efek terapi yang luas, tetapi penggunaannya dalam jangka panjang menimbulkan berbagai efek samping yang dapat merugikan pasien. Efek samping yang muncul akibat pengunaan kortikosteroid diantaranya gangguan keseimbangan cairan elektrolit, ulkus peptikum, infeksi / penurunan system imun, miopati, osteoporosis, osteonekrosis, gangguan pertumbuhan. Hiperglikemia diketahui sebagai salah satu komplikasi dari pemberian kortikosteroid

dan dapat menjadi faktor prognosis negatif pada pasien diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2) (Aziz, 2011).

2.2.2 Obat Antiinflamasi Non Steroid

Mekanisme obat antiinflamasi non-steroid yaitu penghambat enzim siklooksigenase sebagai mekanisme utama sifat analgesic, antipiretik, dan antiinflamasi NSAID. Penghambatan siklooksigenase (COX) dan penghambatan prostaglandin dan sintesis eicosanoid lainnya mengurangi rasa sakit, demam, dan peradangan. Enzim siklooksigenase (COX) yang juga dikenal sebagai prostaglandin endoperoxide H sintase (PGHS) ada dalam dua isoform: PGHS-1 atau COX-1 dan PGHS-2 atau COX-2. Ada perbedaan structural yang signifikan antara keduanya, dengan hanya 60% homologi. Meskipun dikodekan oleh gen yang berbeda, kedua isoform adalah membran-terikat glikoprotein yang mengkatalis pembentukan prostanoid dari asam arakidonat (Osafo, 2017).

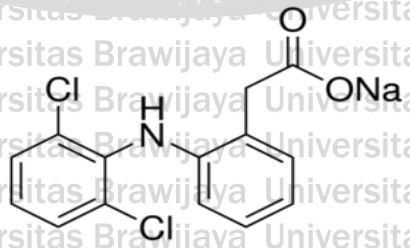
COX-1 diekspresikan secara konstitutif di sebagian besar sel mamalia dan jaringan seperti seminal vesikel, trombosit, dan endothelium. Prostaglandin diproduksi oleh aktivasi COX-1 dimana berfungsi untuk melindungi gastro dan renal, diferensiasi makrofag, trombosit agregasi, dan produksi lender. Dalam kondisi peradangan, studi molekuler telah menunjukkan bahwa COX-1 mRNA dan ekspresi protein tidak berubah mengkonfirmasi peran mereka yang terbatas dalam proses inflamasi (Osafo, 2017).

COX-2 adalah enzim yang diinduksi apabila yerjadi cidera jaringan dan rangsangan lain seperti lipopolisakarida (LPS), interleukin-1, dan tumor nekrosis faktor alfa (TNFα). COX-2 aktif pada daerah yang cidera dan dalam berbagai

jaringan seperti endothelium vascular, dan sel mediasi inflamasi sinovial endothelial rematoid, nyeri, demam, dan respon karsinogenik (Osafo, 2017). OAINS dibagi menjadi beberapa golongan, yaitu:

1. Golongan salisilat (diantaranya aspirin/asam asetil salisilat, metil salisilat, magnesium salisilat, salisil salisilat, dan salisilamid).
2. Golongan asam arilalkanoat (diantaranya diklofenak, indometasin, proglumetasin, dan oksametasin).
3. Golongan profen/asam 2-arilpropionat (diantaranya ibuprofen, alminoprofen, fenbufen, indoprofen, naproxen, dan ketorolac).
4. Golongan asam fenamat/asam N-arilantranilat (diantaranya asam mefenamat, asam flufenamat, dan asam tolfenamat).
5. Golongan turunan pirazolidin (diantaranya fenilbutazon, ampiron, metamizol, dan fenazon).
6. Golongan oksikam (diantaranya piroksikam, dan meloksikam)
7. Golongan penghambat COX-2 (celecoxib, lumiracoxib).
8. Golongan sulfonanilida (nimesulide).
9. Golongan lain (licofelone dan asam lemak omega 3).

2.3. Natrium Diklofenak



Gambar 2.2 Natrium Diklofenak

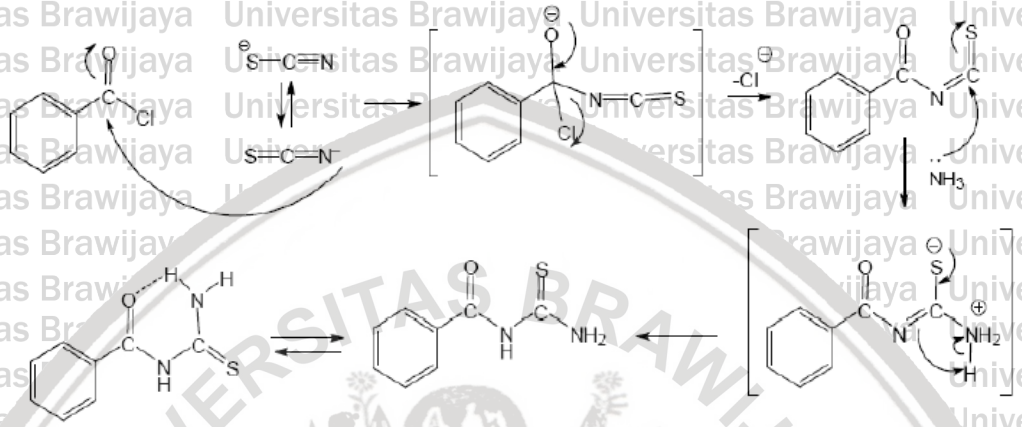
Natrium diklofenak memiliki efek sebagai antiinflamasi, analgetik dan antipiretik. Efek sampingnya adalah gangguan saluran cerna, perdarahan saluran cerna dan tukak lambung. Obat ini adalah penghambat siklooksigenase yang relatif nonselektif dan kuat, juga mengurangi bioavailabilitas asam arakidonat. Obat ini terikat 99% pada protein plasma dan mengalami efek lintas awal (*first-pass*) sebesar 40-50%. Waktu paruh natrium diklofenak singkat yakni 1-3 jam (Wilmana, 2007). Penggunaan natrium diklofenak sebagai kontrol dalam penelitian ini adalah karena reseptor yang digunakan dalam uji *in silico* antara 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan benzoiltiourea memiliki ligan diklofenak. Berdasarkan penelitian sebelumnya, dosis natrium diklofenak yang digunakan adalah 6,25 mg/kgBB, 12,5 mg/kgBB, dan 25 mg/kgBB (Shalas, 2018).

2.4 Sintesis

Sintesis kimia adalah kegiatan melakukan reaksi kimia untuk memperoleh suatu produk kimia, ataupun beberapa produk. Hal ini terjadi berdasarkan peristiwa fisik dan kimia yang melibatkan suatu reaksi atau lebih. Sintesis kimia adalah suatu proses yang dapat direproduksi selama kondisi yang diperlukan terpenuhi.

Pada tahun 2010, Budiati *et al* telah mensintesis senyawa turunan benzoil tiourea melalui jalur tiosianat dengan bahan awal ammonium tiosianat, benzoil klorida dan ammonia. Reaksi sintesis tersebut berjalan dalam dua tahap, yaitu tahap pertama pembentukan turunan benzoilisotiosianat sebagai hasil dari reaksi ammonium tiosianat dan benzoil klorida yang berlangsung melalui mekanisme reaksi substitusi asil nukleofilik. Kemudian dilanjutkan tahap kedua yaitu

penyerangan NH_4OH terhadap benzoil isotiosianat sehingga membentuk benzoiltiourea yang berlangsung melalui mekanisme reaksi adisi nukleofilik.

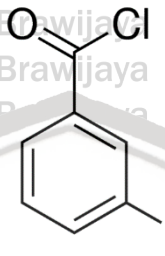


Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Dua Tahap Pembentukan Benzoiltiourea dengan Ammonium Tiosianat

Mekanisme reaksi substitusi asil nukleofilik meliputi adisi nukleofil (Nu:) pada gugus karbonil, diikuti dengan eliminasi halogen (-X). Untuk membuat turunan urea diperlukan metode terpilih yaitu reaksi *Schotten-Baumann* yang merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida secara satu tahap. Reaksi *Schotten-Baumann* dilakukan dalam suasana basa dan bila semua pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan. Pada umumnya reaksi ini menggunakan pelarut piridina, tetapi karena bau pelarut piridina sangat menyengat sehingga dapat diganti dengan pelarut tetrahidrofuran. Reaksi asilasi termodifikasi telah digunakan oleh Siswandono (1999) dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoilklorida sehingga diperoleh senyawa baru turunan benzoilurea. Modifikasi reaksi asilasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan penambahan basa trietilamin yang ditujukan untuk menetralkan HCl yang terbentuk dalam hasil samping reaksi.

2.5 Tinjauan Mengenai Bahan Sintesis

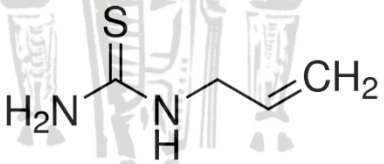
2.5.1 3-klorobenzoil Klorida



Gambar 2.4 3-klorobenzoil Klorida

3-klorobenzoil klorida dengan rumus kimia ClC_6H_4COCl dan struktur kimia seperti pada gambar 2.3, memiliki berat molekul sebesar 175,01 gram/mol, dan titik didih 225ºC. 3-klorobenzoil klorida berbentuk Kristal, bubuk kristalin (Pubchem, 2017).

2.5.2 Aliltiourea



Gambar 2.5 Aliltiourea

Aliltiourea dengan rumus kimia $C_4H_8N_2S$ dan struktur kimia seperti pada gambar 2.4, memiliki berat molekul sebesar 116,182 gram/mol. Aliltiourea berbentuk padatan Kristal putih denagn sedikit bau bawang putih (Pubchem, 2017).

2.6 Tinjauan Mengenai Konfirmasi Struktur Senyawa

2.6.1 Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Inframerah

Identifikasi gugus-gugus fungsi dapat dilakukan pada daerah khusus yakni daerah antara 1400-4000 cm^{-1} yang berada pada bagian kiri spektrum inframerah. Bagian spektrum yang biasa digunakan untuk identifikasi gugus-gugus fungsi ini dapat disebut daerah sidik jari karena setiap gugus fungsi memiliki serapan yang unik pada daerah ini.

Setiap gugus memiliki karakteristik absorbsi tertentu, sebagai contoh senyawa aromatis menunjukkan adanya getaran ulur C-H pada bilangan gelombang 3030 cm^{-1}, getaran ulur C=C pada bilangan gelombang 1600-1500 cm^{-1} dan getaran ulur C-C pada bilangan gelombang 1500-1450 cm^{-1}. Adanya pita yang tampak kuat pada daerah sekitar 1650 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil. Pada gugus hidroksil fenol adanya O-H ditandai dengan adanya serapan yang kuat di daerah 3650-3548 cm^{-1} (Pavia *et al,* 2009).

2.6.2 Identifikasi Struktur dengan Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti

Spektroskopi ^{1}H-Resonansi Magnet Inti (^{1}H-NMR) adalah metode yang penting dalam identifikasi struktur suatu senyawa, karena dapat memberikan informasi tentang lingkungan kimia dari atom hydrogen, jumlah atom hydrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus berdekatan dengan setiap atom hydrogen dalam suatu molekul. Pada puncak spektra ^{1}H-NMR terdapat integrasi, sehingga dapat dilihat intensitas dan jumlah atom hidrogen. Jenis puncak yang terdapat dalam ^{1}H-NMR yaitu *singlet, duplet, triplet, quarted, quinted,* dan *multiplet.*

Kombinasi antara IR dan NMR sering dianggap cukup untuk menentukan struktur molekul yang tidak diketahui (Pavia *et al,* 2009).

2.6.3 Identifikasi Struktur dengan Spektrometri Massa

Spektrometri massa merupakan teknik analisa yang berdasarkan pada pemisahan ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion tersebut. Spektrometri massa merupakan metode yang penting dalam konfirmasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang fragmentasi gugus fungsi dan massa ion senyawa (Siswandono, 1999). Ada beberapa metode ionisaasiyang digunaan dalam metode spektrometri massa, yaitu *electron ionization, chemical ionization, desorption ionization, electrospray ionization.* 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 rasiomassa-muatan (*m/z*) (Pavia *et al,* 2009).

2.7 Karagenan

Karagenan adalah karbohidrat alami (polisakarida) yang diperoleh dari rumput laut merah yang dapat dimakan. Karagenan berasal dari spesies rumput laut *Chondurs crispus* yang dikenal sebagai *carrageen moss* atau *Irlandia moss* di Inggris, dan *carraigin* di Irlandia. Karagenan telah digunakan di Irlandia sejak 400 M sebagai gelatin dan sebagai obat rumah untuk menyembuhkan batuk dan pilek. Tumbuh di sepanjang pantai Amerika Utara dan Eropa. Karagenan digunakan dalam berbagai aplikasi komersial seperti pembentuk gel, penebalan, dan zat penstabil, terutama dalam makanan produk dan saus. Selain dari fungsi-fungsi tersebut,

karagenan digunakan dalam pengobatan eksperimental, farmasi formulasi, kosmetik, dan aplikasi industri (Necas, 2013).

2.8 Hewan Percobaan *Rattus norvegicus*

Hewan percobaan adalah hewan yang sengaja dikembangbiakkan dan dipelihara untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik. Berbagai jenis hewan yang umum digunakan sebagai hewan percobaan, yaitu mencit, tikus, marmut, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba, sapi, kerbau, kuda, dan simpanse (Malole dan Pramono, 1989).

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 (*Rattus norvegicus*). *Rattus norvegicus* mempunyai 3 galur, yaitu *Sprague Dawley, Wistar,* dan *Long Evans.* Galur *Sprague Dawley* memiliki tubuh yang ramping, kepala kecil, telinga tebal dan pendek dengan rambut halus, serta ukuran ekor lebih panjang daripada badannya. Galur *Wistar* memiliki kepala yang besar dan ekor yang pendek, sedangkan galur *Long Evans* memiliki ukuran tubuh yang lebih kecil 17 serta bulu pada kepala dan bagian tubuh depan berwarna hitam (Malole dan Pramono, 1989). Penggunaan tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* pada penelitian *in vivo* ini adalah berdasarkan penelitian sebelumnya (Budiati, 2010) dan dikarenakan tikus telah diketahui sifat-sifatnya secara sempurna, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian.

Penggunaan tikus dalam penelitian ilmiah adalah yang memiliki kelamin 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 dan Pramono, 1989).

2.9 Pengujian Efek Antiinflamasi

2.9.1 Tes Formalin

Mencit galur ICR jantan (18-25 gr) dikelompokkan secara acak kedalam 4 grup (n=8). Termasuk kedalamnya kelompok normal dan positif control dan kelompok sample uji. Kelompok kontrol hanya diberi pembawa, positf contro, indometasin (10mg/kg ip) dilarutkan dalam tween 80 plus 0.9% (w/v) larutan salin dan diberikan ecara IP pada volume 0.1ml/10 g. Satu jama sebelum pengujian, hewan ditempatkan pada kandang standar (ukuran 30x12x13 cm) yang digunakan sebagai tempat observasi. Sampel diberikan secara peroral 60 menit sebelum injeksi formalin. Indometasin diadministrasikan 30 menit sebelum injeksi formalin. 20 µl formalin 1% dinjeksikan pada permukaan dorsal dari tapak kaki kanan. Dan waktu tapak kaki meregang dicatat. 5 menit setelah injeksi formalin disebut fase awal, dan waktu 15-40 menit disebut fase akhir. Waktu yang dibutuhkan untuk meregangkan tapak kaki dihitung dengan stopwatch. Aktivitas diukur dlam interval waktu 5 menit (ESCOP, 2003).

2.9.2. λ-karagenan Sebagai Penginduksi Edema Pada Tapak Kaki

Mencit jantan galur ICR (18-25 gr) dipuasakan 24 jam sebelum masa percobaan dengan tetap diberi minum. 50 µl suspensi 1% karagenan dilarutkan dalam larutan salin diinjeksikan pada tapak kaki kanan mencit. Sampel dan indometasin dilarukan dalam tween 80 plus 0.9% (w/v) larutan salin. Konsentrasi final dari tween 80 tidak boleh lebih dari 5% dan tidak menyebabkan inflamasi yang berarti. 2 jam sebelum diinduksi, diberikan sampel dengan 2 tingkatan dosis secara oral. Indometasin (10 mg/kg ip) diinjeksikan 90 menit sebelum induksi. Edema pada tapak kaki segera dihitung setlah injeksi karagenan (interval waktu 1,2,3,4,5,6 jam) dengan menggunakan pletismometer. Derajat edema dievaluasi dengan rasio volume tapak kaki kanan setelah induksi karagenan per volume tapak kaki kanan sebelum induksi karagenan (ESCOP, 2003):

Peradangan yang diinduksi karagenan berhubungan dengan neutrofil dan produksi radikal bebas yang berasal dari neutrofil, serta pelepasan mediator yang berasal dari neutrofil lainnya. Perkembangan edema induksi karagenan terdiri dari dua sistem fase; fase pertama terjadi dalam satu jam peradangan karagenan dan dikaitkan dengan pelepasan enzim sitoplasma serotonin dari sel mast. Fase kedua dimediasi oleh peningkatan pelepasan prostaglandin di area inflamasi dan berlanjut di antara dua fase yang diakibatkan oleh kinins. Metode ini merupakan metode standar yang digunakan untuk model eksperimen inflamasi akut yang digunakan untuk uji aktivitas antiinflamasi karena tidak bersifat antigenik dan tidak memiliki efek sintemik yang nyata (Vetriselvan *et a,* 2013).

2.9.3. Metode Panas

- *Tes Hot plate*

Metode ini dengan menggunakan hot plate yang suhunya 55 ± 1°C. Waktu terjadi reaksi basal hewan terhadap panas dicatat. Hewan yang menunjukkan respon melompat dalam waktu 6-8 detik dimasukkan kedalam kelompok percobaan. 60 menit setelah administrasi senyawa uji dan positif kontrol, hewan dikelompokkan kedalam 6 grup dimana masing-masingnya ditaruh pada hot plate. Waktu sampai terjadi lompat hewan coba disebut waktu reaksi(ESCOP, 2003).

2.9.4. Etil Fenil Propionate sebagai Penginduksi Edema pada Telinga Tikus

Tikus jantan (100-150 gr) digunakan sebgai hewan coba. Edema telinga dinduksi mengoleskan secara topical EEp dengan dosis 1mg/20 µl pertelinga pada bagian permukaan dan dalam kedua telinga dengan mengunakan pipet otomatis. Sampel uji juga dioleskan pada telinga denga volum yang sama seperti EEP. Waktu sebelum, 30 menit, 1 jam dan 2 jam merupakan waktu pengamatan setelah induksi. Ketebalan telinga diukur jangka sorong (ESCOP, 2003).

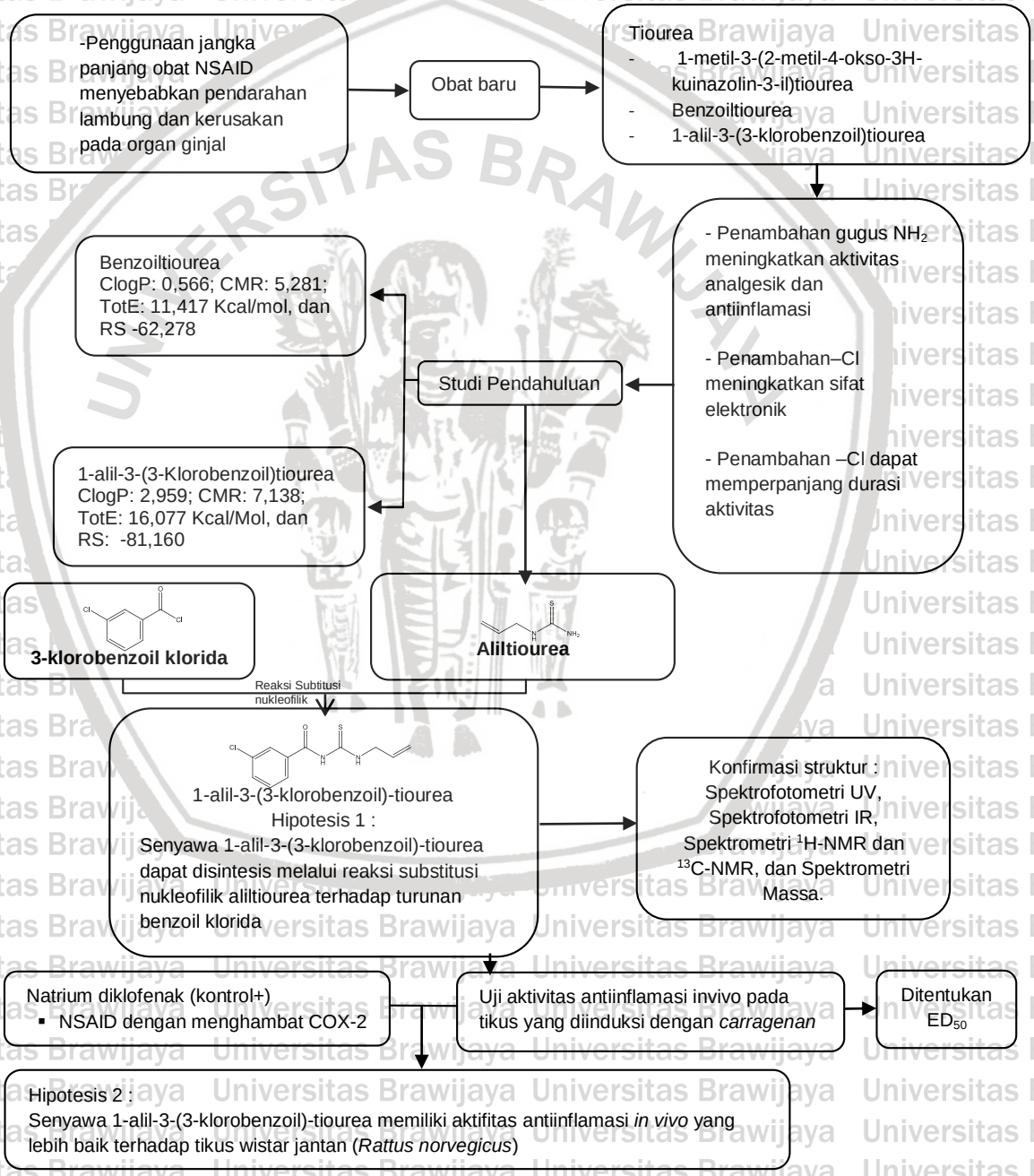
2.9.5. Putih Telur sebagai Penginduksi Edema

Empat grup tikus wistar jantan dan betina diberikan : grup 1, 10% propilenglikol, grup 2 dan 3 sampel uji, dan grup 4 diberikan natrium diklofenak sebagai kontrol positif (100 mg/kg po). Setelah 30 menit, masing-masing kelompok disuntikkan dengan putih telur sebanyak 0.5 ml pada tapak kaki kiri. Digunakan pletismometer digital untuk mengukur volume kaki yang mengalami edema dalam periode 120 menit. Dengan interval 30, 60, 90, dan 120 menit (ESCOP, 2003).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Dari berbagai obat antiinflamasi yang sudah banyak banyak dilaporkan kejadian efek samping serta efek jangka panjang yang merugikan seperti perdarahan lambung dan efek toksik pada ginjal. Oleh karena itu dibutuhkan obat antiinflamasi baru yang dimungkinkan bisa untuk menurunkan angka kejadian efek samping dari obat yang sudah ada dengan mekanisme selektif hanya menghambat pembentukkan mediator inflamasi pada COX2.

Penelitian terdahulu menemukan bahwa senyawa tiourea dan turunannya memberikan efek antiinflamasi yang bisa disandingkan dengan obat antiinflamasi 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 antiinflamasi. Kemudian pada tahun 2010 turunan dari senyawa tiourea yaitu senyawa benzoiltiourea memiliki sifat kimia fisika yang lebih baik daripada obat antiinflamasi yang sudah ada salah satunya yaitu natrium diklofenak (Budiati *et al*, 2010).

Dari penelitian tersebut maka dirancanglah suatu senyawa yang merupakan turunan dari benzoilklorida yaitu senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang telah dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan *Chemdraw Ultra 12.0* dan *Chem3D Pro 12.0* dan menghasilkan nilai CLogP sebesar 2,959, nilai E_{total} sebesar 16,077 Kcal/Mol, dan nilai CMR sebesar 7,138. Nilai ketiga parameter tersebut lebih besar dengan yang dimiliki oleh senyawa benzoiltiourea, yaitu CLogP sebesar 0,566, E_{total} sebesar 5,363 Kcal/mol, dan CMR sebesar 5,281, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki sifat kimia fisika yang lebih baik dari senyawa benzoilklorida.

Senyawa ini diperoleh dengan mereaksikan aliltiourea dengan turunan benzoilklorida yaitu 3-klorobenzoil klorida melalui mekanisme reaksi subtitusi nukleofilik yang telah dimodifikasi sehingga menghasilkan senyawa yang diinginkan yang akan dikonfirmasi strukturnya menggunakan Spektrofotometri IR, Spektrometri ^{1}H-NMR dan ^{13}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 udemnya secara berkala menggunakan pletismometer.

3.2 Hipotesis penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah :

3.2.1 Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)-tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik aliltiourea terhadap 3-klorobenzoil klorida

3.2.2 Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)-tiourea memiliki aktivitas antiinflamasi *in vivo* yang lebih baik dibanding natrium diklofenak terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi karagenan

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design)* dimana ditentukkan variabel bebas yang kemudian diukur efeknya pada variabel terikat. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris dengan melakukan sintesis, dan uji aktivitas antiinflamasi 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 novergicus strain Wistar*) berumur 2-3 bulan dengan berat badan 100-200 gram yang akan dibagi 5 kelompok dengan tiap kelompoknya berisi 5 ekor tikus wistar berdasarkan perhitungan 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-(3-klorobenzoil)tiourea dengan dosis 6,25 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kelompok 2 diberikan 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan dosis 12,5 mg/kgBB yang diberikan secara oral
- Kelompok 3 diberikan 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 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

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yang didapatkan dari hasil sintesis.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada sintesis senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea terdiri dari tiga bagian yaitu :

- Variabel bebas : jumlah mol masing-masing reaktan
- Variabel terikat : produk sintesis
- Variabel kontrol : suhu dalam refluks, lama refluks, suhu pencampuran reaktan

Sedangkan variabel pada uji aktivitas antiinflamasi 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, Laboratorium Kimia Analisa Politeknik Negeri Malang, Laboratorium Kimia Analisa Universitas Airlangga. Waktu penelitian dilaksanakaan pada bulan Agustus 2017 hingga bulan Januari 2018.

4.5 Bahan dan Alat

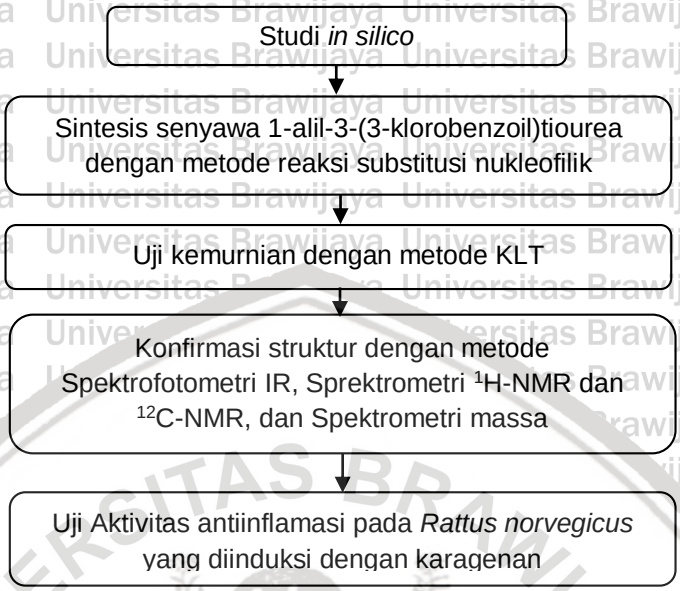
4.5.1 Bahan

Aliltiourea (*sigma aldrich*), 3-klorobenzoil klorida (*sigma aldrich*), tetrahidrofuran (*sigma aldrich*), etil asetat p.a, metanol teknis, *n*-heksana p.a, trietilamin (*sigma aldrich*), kloroform teknis, karagenan (*sigma aldrich*), natrium diklofenak (Voltaren ®), CMC Na.

4.5.2 Alat

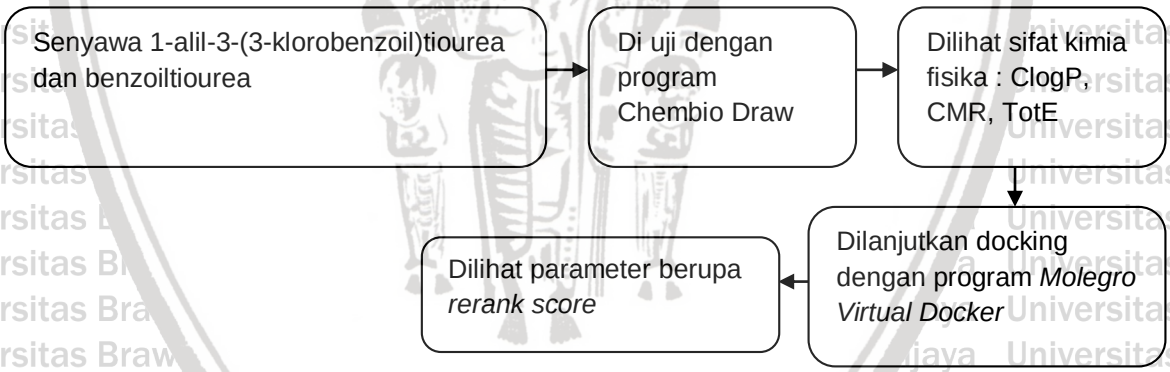
Satu set peralatan *refluks*, timbangan analitik (PA224 OHAUS), pengaduk magnetik dengan *Hotplate* (IKA C-Mag HS7), seperangkat alat KLT; Spektrofotometer *FTIR (8400S/Shimadzu)*; Spektrofotometer *NMR (NMR Jeol ICS 400 MHz*); Spektrometer *GC/MS (Shimadzu GCMA QP2010 Plus*), Spuit injeksi 1 ml, alat-alat gelas, pletismometer.

4.6 Prosedur Penelitian



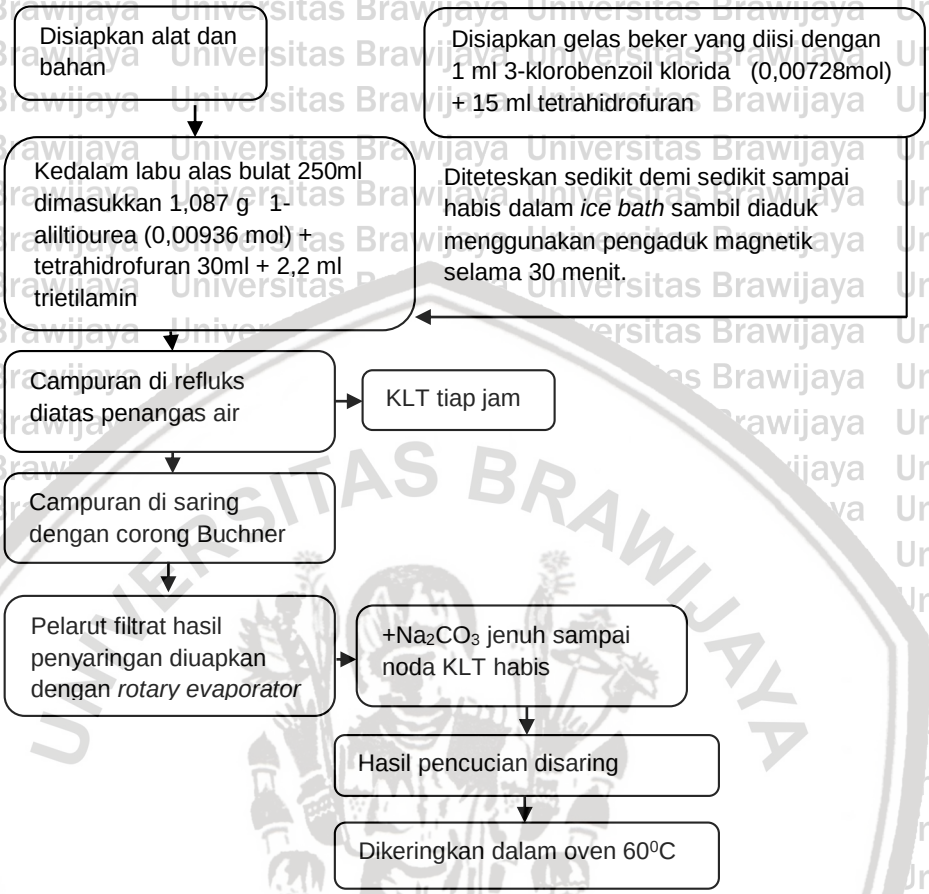
Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.6.1 Studi Pendahuluan *In Silico*



Gambar 4.2 Prosedur Studi Pendahuluan *In Silico*

4.6.2 Sintesis Senyawa



Gambar 4.3 Prosedur Sintesis Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

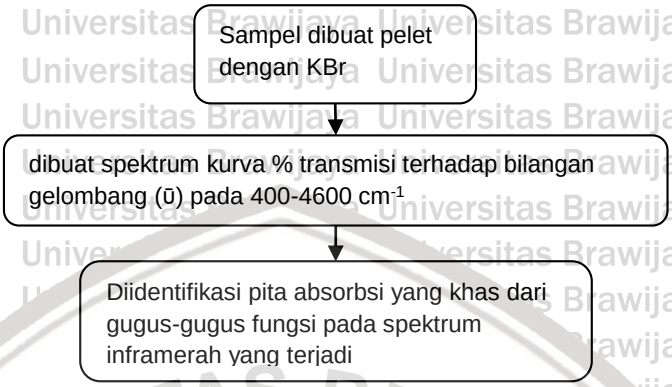
4.6.3 Uji Kemurnian

4.6.3.1 Uji KLT

Gambar 4.4 Prosedur Uji Kemurnian dengan KLT

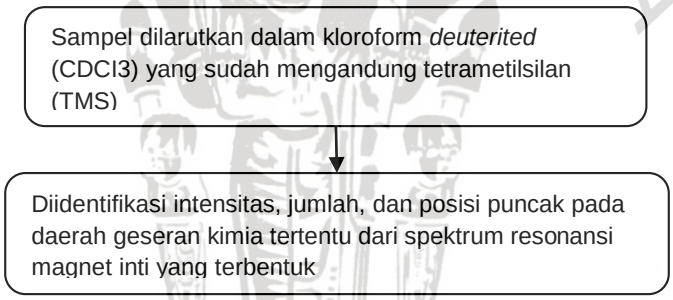
4.6.4 Uji Konfirmasi Struktur

4.6.4.1 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR



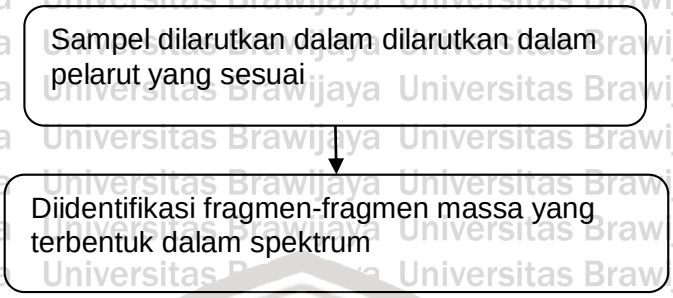
Gambar 4.5 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer IR

4.6.4.2 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR)



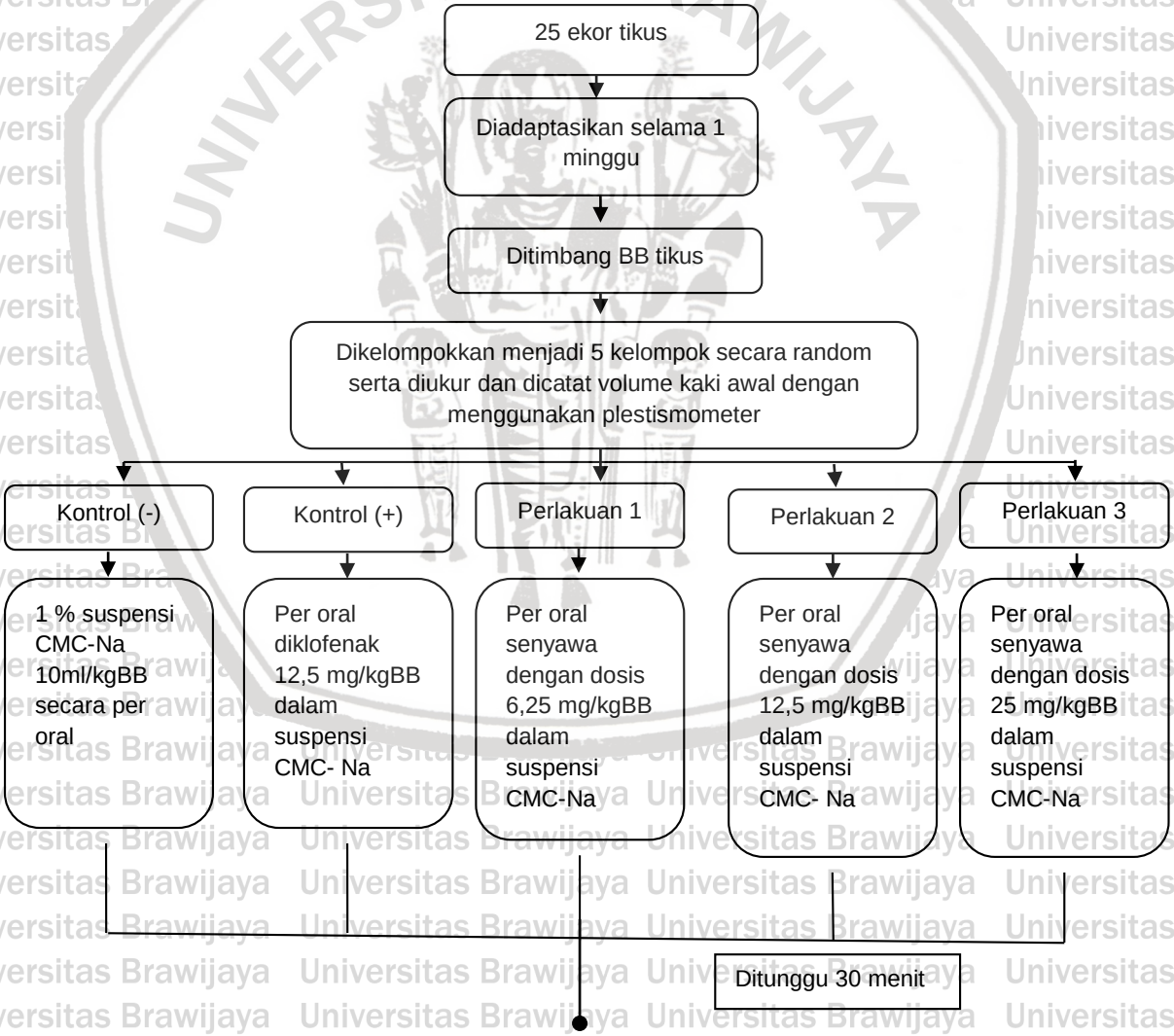
Gambar 4.6 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrometer Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR)

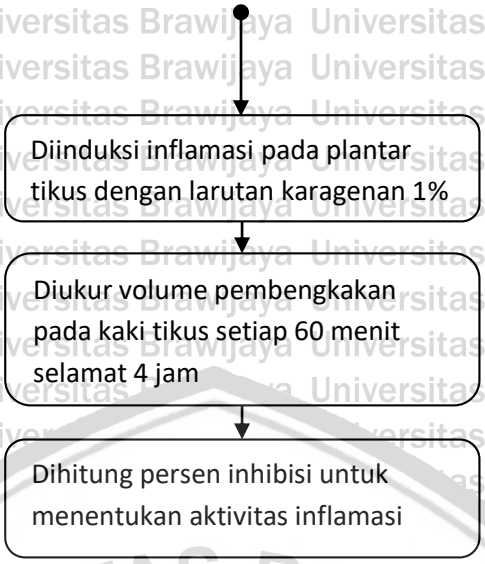
4.6.4.3 Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Massa



Gambar 4.7 Prosedur Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometer Massa

4.6.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea





Gambar 4.8 Prosedur Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

4.7 Analisis Data

Pengambilan data dilakukan setelah uji aktivitas antiinflamasi. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji beda nyata *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA), dengan syarat distribusi data normal (p>0,05) dan varians data harus homogen (p>0,05). Apabila syarat uji ANOVA tidak terpenuhi maka akan dilakukan uji statistika non-parametrik *Kruskal Wallis*. Kemudian dilakukan uji *Post-hoc* untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara bermakna. Analisis data tersebut dilakukan dengan menggunakan *software Statistical Product and Service Solution*, *IBM SPSS Statistic 20*, dengan nilai probabilitas 0,05 (p=0,05) dan taraf kepercayaan sebesar 95%.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Uji *In Silico*

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

Tabel 5.1 Hasil Uji Pendahuluan Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

Parameter	1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea	Benzoiltiourea
Lipofilitas (ClogP)	2,959	0,566
Elektronik (E_{total})	16,077 Kcal/mol	5,363 Kcal/mol
Sterik (CMR)	7,138	5,281

Dari uji pendahuluan didapatkan bahwa nilai parameter senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea lebih baik dibandingkan senyawa benzoiltiourea. Kemudian dilakukan *docking* senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan benzoiltiourea terhadap reseptor COX-2 dengan kode *Protein Data Bank* 1 PXX menggunakan aplikasi *Molegro Virtual Docker 6.0*. Hasil *docking* menunjukkan senyawa benzoiltiourea memiliki ikatan hydrogen dengan asam amino Sglisin (*Gly 526*) dan interaksi sterik dengan asam amino serin (*Ser 530*), dan fenilalanin (*Phe 518*) yang dapat dilihat pada Gambar 5.1, sedangkan 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki

ikatan hidrogen dengan asam amino valin (*Val 523)* dan interaksi sterik dengan asam amino fenilalanin (*Phe 318*), tirosin (*Tyr 385*), serin (*Ser 530*), dan triptofan (*Trp 387*) yang dapat dilihat pada Gambar 5.2.

(a) (b)

Gambar 5.1 *Ligand map* Interaksi Senyawa Benzoiltiourea dengan Reseptor 1PXX. (a) *Ligand map* interaksi antara benzoiltiourea dengan reseptor 1PXX, dan (b) Ikatan hidrogen antara benzoiltiourea dengan reseptor 1PXX. - - - - - : interaksi sterik, - - - - - : ikatan hidrogen

(a) (b)

Gambar 5.2 *Ligand map* Interaksi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan Reseptor 1PXX. (a) *Ligand map* interaksi antara 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan reseptor 1PXX, dan (b) Ikatan hidrogen antara 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan reseptor 1PXX. - - - - - : interaksi sterik, - - - - - : ikatan hidrogen

Dari proses *docking* diketahui senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki RS(*Rerank Score*) yang lebih baik yaitu sebesar -81,160 dibandingkan dengan senyawa benzoiltiourea yang memiliki RS sebesar -62,278. Dari hasil uji *in silico*

menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea lebih baik dari senyawa benzoiltiourea dan layak untuk disintesis dengan diberi kode produk BATU-3.

5.1.2 Sintesis Senyawa BATU-3

Rendemen produk senyawa BATU-3 dapat dilihat pada Tabel 5.2. Perhitungan rendemen hasil sintesis dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = {}^{Berat\ nyata}/_{Berat\ teoritis} \times 100\%.$$

Tabel 5.2 Persen Rendemen dari Senyawa Produk BATU-3

Aliltiourea	3-Cl	Mol Produk	MR Produk	Berat Teoritis	Berat Nyata	Rendemen
0,0093 mol	0,0079 mol	0,0079 mol	254,74	2,01 g	0,476 g	23,68%

5.1.3 Hasil Uji Kemurnian Senyawa BATU-3 Menggunakan KLT

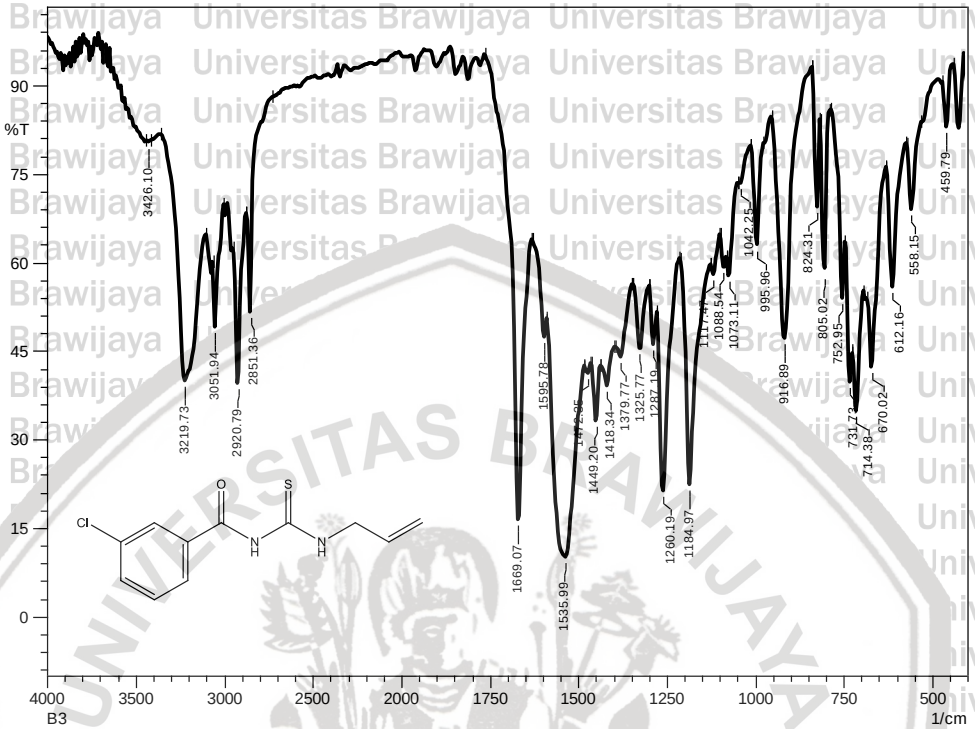
Kemurnian senyawa hasil sintesis diuji dengan metode KLT, menggunakan fase diam Silica Gel 60 GF254 dan fase gerak n-heksana : kloroform : etil asetat (8:3:1). Hasil optimasi eluen dapat dilihat pada Lampiran 5 dan hasil KLT yang menunjukkan noda tunggal dengan nilai Rf sebesar 0,5 yang dapat dilihat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

Gambar 5.3 Hasil Uji Kemurnian dengan KLT

5.1.4 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-3

5.1.4.1 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri IR

Spektra senyawa BATU-3 dengan menggunakan spektrofotometri IR menunjukkan keberadaan gugus fungsi berupa -C=O amida pada bilangan gelombang 1536 cm^{-1}, -C=C aromatis pada billangan gelombang 1449-1596, -C=C vinil pada billangan gelombang 1669, dan N-H ulur pada billangan gelombang 3426. Spektra spektrofotometri IR senyawa BATU-3 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-3 dalam Pelet KBr

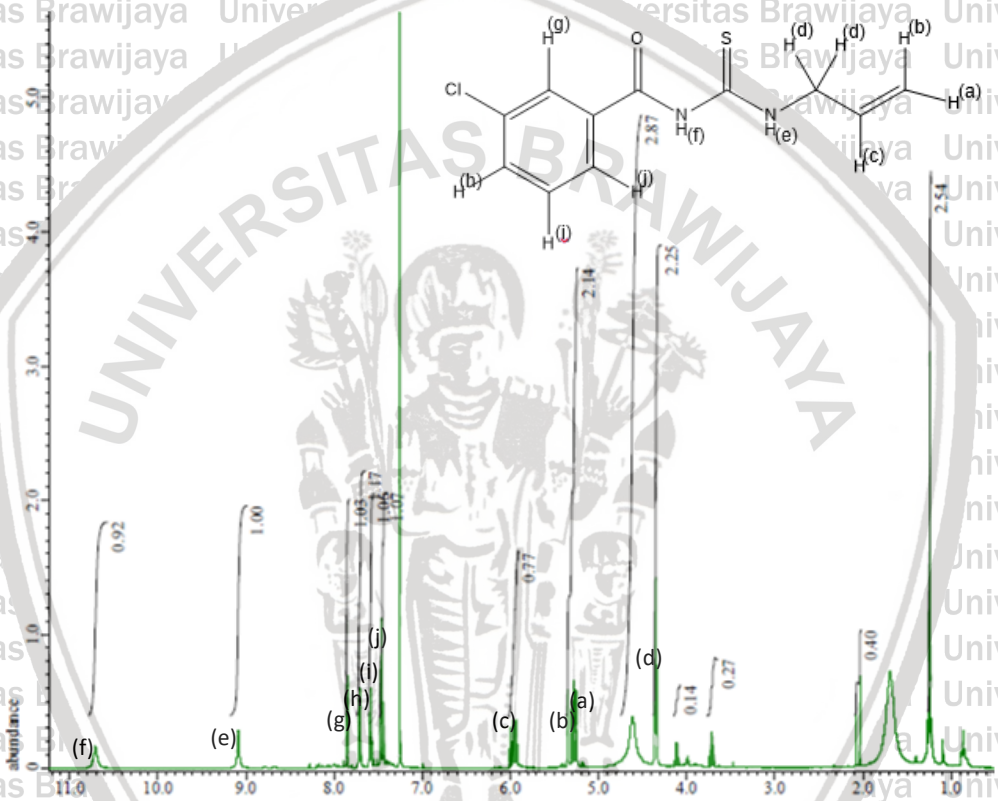
Tabel 5.3 Interpretasi Spektra Inframerah Senyawa BATU-3

Tipe Vibrasi	Bilangan gelombang (cm^{-1})
-C=O Amida	1536
-C=C aromatis	1449-1596
-C=C vinil	1669
N-H Ulur	3426

5.1.4.2 Hasil Uji Konfirmasi Struktur dengan Spektrofotometri Resonansi Magnit Inti (^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR)

Hasil spektra ^{1}H-NMR menunjukkan jumlah proton sebanyak 11, dan hasil spektra ^{13}C-NMR menunjukkan jumlah karbon sebanyak 11. Dari hasil spektra ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR menunjukkan jumlah proton dan jumlah karbon yang sesuai dengan rumus molekul senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea yaitu $C_{11}H_{11}ClN_2OS$.

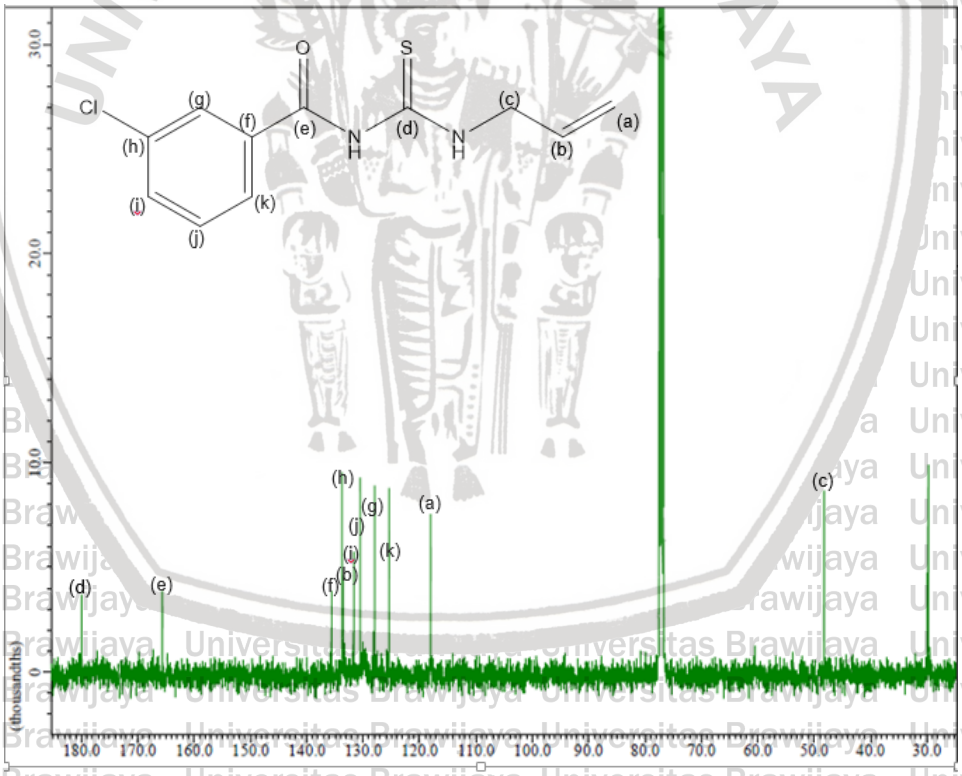
Hasil uji konfirmasi struktur dengan spektrofotometri ^{1}H-NMR dapat dilihat pada Gambar 5.5, dan interpretasi spektra ^{1}H-NMR dapat dilihat pada Tabel 5.4. Untuk spektra ^{13}C-NMR dapat dilihat pada Gambar 5.6, dan interpretasi spektra yang ditunjukkan pada Tabel 5.5.



Gambar 5.5 Hasil Spektra ^{1}H-NMR Senyawa BATU-3

Tabel 5.4 Karakteristik Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa BATU-3

Abjad	Geseran Kimia δ (ppm)	Perbandingan Integrasi	Multiplisitas	Jenis Proton
(a)	5.253	1	Doublet	1 atom H dari alil
(b)	5.279	1	dd	1 atom H dari alil
(c)	5.927	1	*ddt*	1 atom H dari alil
(d)	4.348	2	Doublet	2 atom H dari alil
(e)	9.087	1	Singlet	1 atom H dari –NH (amina)
(f)	10.705	1	Singlet	1 atom H dari –NH (amida)
(g)	7.852	1	Singlet	1 atom H dari benzena
(h)	7.473	1	Doublet	1 atom H dari benzena
(i)	7.453	1	Triplet	1 atom H dari benzena
(j)	7.699	1	Doublet	1 atom H dari benzena



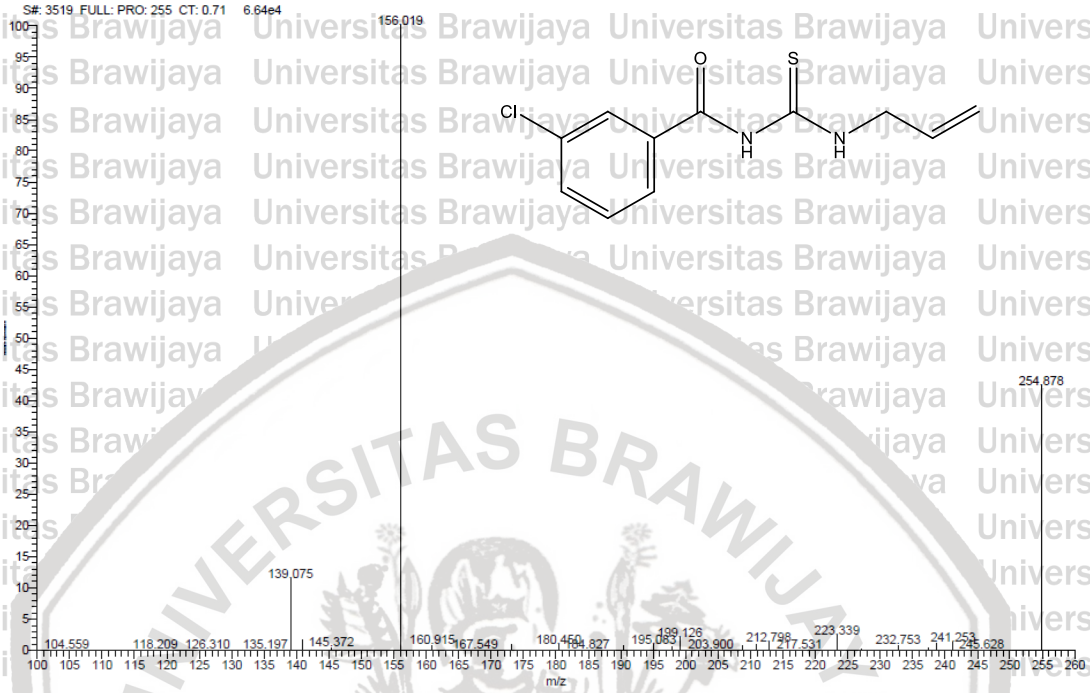
Gambar 5.6 Hasil Spektra ^{13}C-NMR Senyawa BATU-3

Tabel 5.5 Karakteristik Spektrum ^{13}C-NMR Senyawa BATU-3

Abjad	Geseran Kimia δ (ppm)	Jenis Karbon
(a)	117.982	1 atom C dari -**C**=C
(b)	133.695	1 atom C dari -C=C
(c)	48.227	1 atom C dari –C=C-**C**
(d)	179.852	1 atom C dari **C**=S
(e)	165.588	1 atom C dari **C**=O
(f)	135.640	1 atom C dari benzena (-**C-**C=O)
(g)	128.013	1 atom C dari benzena
(h)	133.609	1 atom C dari benzena (-**C**-Cl)
(i)	130.520	1 atom C dari benzena
(j)	128.117	1 atom C dari benzena
(k)	125.381	1 atom C dari benzena

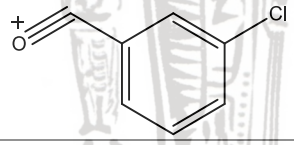
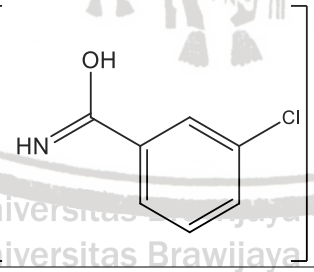
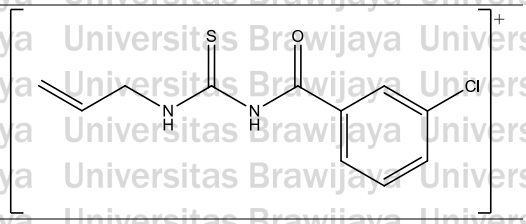
5.1.4.3 Hasil Uji Konfirmasi Struktur Senyawa BATU-3 dengan Spektroskopi Massa

Hasil uji spektroskopi massa senyawa BATU-3 adalah terbentuk 3 serapan yang menunjukkan 3 fragmen dengan massa berbeda yaitu pada 139.075 m/z; 156.019 m/z; dan 254.878m/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.

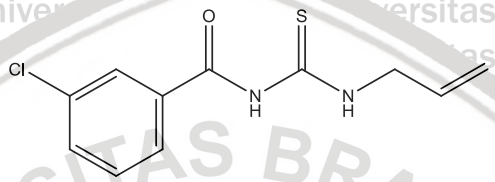


Gambar 5.7 Hasil Spektra MS Senyawa BATU-3

Tabel 5.6 Analisis Fragmen Massa Senyawa BATU-3

Massa (m/z)	Fragmen
139.075	
156.019	
***M*⁺ (254.878)**	

Hasil dari uji konfirmasi struktur membuktikan bahwa senyawa BATU-3 adalah benar senyawa dengan rumus molekul $C_{11}H_{11}ClN_2OS$ 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.



1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

Gambar 5.8 Struktur Kimia Senyawa BATU-3

5.1.5 Uji Antiinflamasi Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea

Uji antiinflamasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea 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:

$$PI = \frac{(Vt - V0)Kontrol - (Vt - V0)perlakuan}{(Vt - V0)kontrol} \; x\, 100$$

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

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

(Meshram *et al,* 2016)

Tabel 5.7 Data Hasil Pengukuran Bengkak Kaki

Dosis	Waktu	Rata-rata volume udem	Rata-rata persen inhibisi
6,25 mg/kgBB (n=5)	t0	0.017	0
	t1	0.027	-22.40 ± 29.88
	t2	0.036	-28.37 ± 39.96
	t3	0.029	55.90 ± 18.32
	t4	0.032	38.31 ± 26.15
12,5 mg/kgBB (n=5)	t0	0.016	0
	t1	0.025	-15.20 ± 94.72
	t2	0.033	-24.19 ± 41.39
	t3	0.028	55.90 ± 20.83
	t4	0.028	46.76 ± 22.48
25 mg/kgBB (n=5)	t0	0.017	0
	t1	0.025	1.60 ± 71.20
	t2	0.031	2.33 ± 105.46
	t3	0.030	53.73 ± 49.12
	t4	0.027	60.28 ± 48.05
Kontrol positif (n=3)	t0	0,007	0
	t1	0,018	-28,00 ± 38,57
	t2	0,022	-2,33 ± 39,67
	t3	0,034	1,20 ± 47,77
	t4	0,026	21,13 ± 24,57
Kontrol negatif (n=3)	t0	0,006	0
	t1	0,014	0
	t2	0,020	0
	t3	0,034	0
	t4	0,029	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-(3-klorobenzoil)tiourea, dengan menggunakan analisa probit program *SPSS 20*. Data hasil analisa probit senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan *IBM SPSS*

Statistic 20 dapat dilihat pada Lampiran 12. Nilai ED_{50} senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea adalah 8,049 mg/kgBB.

5.2 Analisis Data

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

Tabel 5.8 Hasil Analisis ANOVA

Dosis		Signifikansi pada t3	Signifikansi pada t4
6,25 mg/kgBB	12,5 mg/kgBB	0,597	0,695
	25 mg/kgBB	0,459	0,315
	Kontrol positif	0,051	0,492
12,5 mg/kgBB	25 mg/kgBB	0,599	0,532
	Kontrol positif	0,101	0,310
25 mg/kgBB	Kontrol positif	0,180	0,130

Keterangan : Analisis statistik t3 menggunakan analisis non parametrik *Mann-Whitney U*
(*) = terdapat perbedaan bermakna dengan nilai P <0,05

Berdasarkan hasil dari uji statistika ANOVA, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara setiap dosis maupun dengan kontrol.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

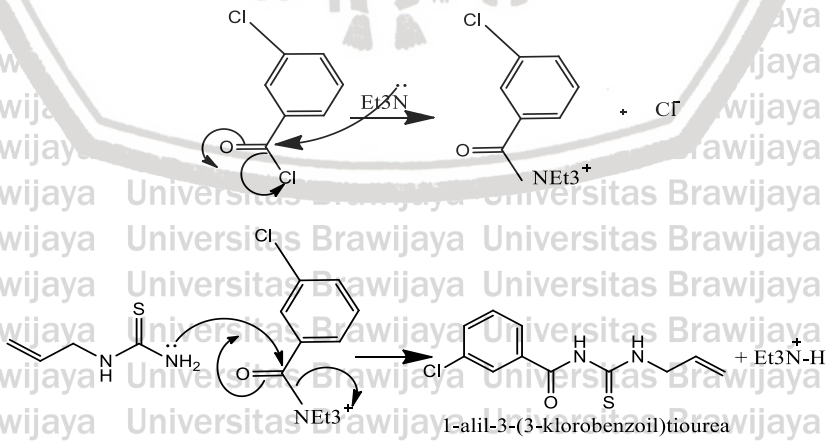
Penelitian ini merupakan suatu upaya untuk menemukan dan mengembangkan obat antiinflamasi baru. Penelitian dimulai dengan uji pendahuluan untuk membandingkan parameter kimia fisika senyawa yang akan disintesis yaitu 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan senyawa benzoiltiourea yang telah diketahui memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi. Uji pendahuluan menunjukkan nilai parameter kimia fisika senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea adalah CLogP (koefisien partisi) sebesar 2,959, nilai E_{TOTAL} (total energi) sebesar 16,077 Kcal/Mol, nilai CMR (parameter sterik) sebesar 7,138 sedangkan untuk senyawa benzoiltiourea adalah CLogP sebesar 0,566, E_{TOTAL} sebesar 11,417 Kcal/mol, CMR sebesar 5,281 dan dapat disimpulkan parameter kimia fisika senyawa yang akan disintesis lebih baik dibandingkan dengan senyawa benzoiltiurea.

Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dengan ClogP sebagai parameter lipofilitas dan berkolerasi dengan penembusan membran bilayer yang lebih baik dibandingkan senyawa benzoiltiurea. 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. Parameter yang lebih baik disebabkan modifikasi struktur yang dilakukan dengan penambahan substituen kloro (Cl) pada posisi meta- dan penambahan alil. Substituen kloro yang bersifat

elektronegatif yang dapat meningkatkan sifat elektronik dan diharapkan mampu memperpanjang interaksi senyawa dengan reseptor dengan jalan memperlambat metabolisme senyawa. Penambahan alil yang bersifat non polar dapat meningkatkan sifat lipofilik suatu senyawa dimana dengan penambahan gugus ini diharapkan mampu meningkatkan kemampuan senyawa menembus membran bilayer.

Afinitas senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dan benzoiltiurea diuji pada reseptor 1PXX menggunakan perangkat lunak *Molegro Virtual Docker 6.0* dan didapatkan nilai RS sebesar -81,160 yang lebih rendah dari nilai RS senyawa benzoiltiourea yaitu -62,278. Nilai RS yang lebih rendah menunjukkan senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea lebih baik berikatan dengan reseptor 1PXX ini. Dari uji pendahuluan ini maka disimpulkan bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea layak untuk disintesis, dan diuji aktivitas antiinflamasinya.

Pada penelitian ini digunakan metode sintesis *Schotten-baumann* yang dimodifikasi mengacu pada penelitian sebelumnya yang menghasilkan produk yang sesuai. Perkiraan mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1 Usulan Reaksi Substitusi Nukleofilik

Schotten-Baumann merupakan reaksi pembentukan senyawa karbamida secara satu tahap. Reaksi *Schotten-Baumann* dilakukan dalam suasana basa dan bila semua pereaksi terlarut dalam pelarut yang digunakan. Reaksi asilasi termodifikasi telah digunakan oleh Siswandono (1999) dalam mereaksikan senyawa urea dengan senyawa turunan benzoilklorida sehingga diperoleh senyawa baru turunan benzoilurea. Modifikasi reaksi asilasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan penambahan basa trietilamin yang ditujukan untuk menetralkan HCl yang terbentuk dalam hasil samping reaksi. Setelah dilakukan sintesis maka didapatkan hasil berupa serbuk berwarna kekuningan dengan berat 0,476 gram dengan rendemen sebesar 23,68%. Nilai rendemen terbilang cukup kecil, hal ini dapat disebabkan karena pada saat pencucian banyak produk yang ikut terbuang saat dilakukan dekantasi sehingga menyebabkan berat akhir produk sedikit.

Produk sintesis perlu diuji untuk menentukan kemurnian dan struktur kimia. Uji kemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil KLT dapat dilihat pada gambar 5.1 yang menunjukkan adanya noda tunggal dengan faktor retensi sebesar 0,5. 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 Magnit Inti (^{1}H-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 (υ) pita serapan dari spektrum yang terbentuk (Siswandono, 1999) yang disajikan pada gambar 5.2. Dari hasil gambar tersebut maka diambil beberapa gugus

fungsi seperti -C=O amida pada bilangan gelombang 1536 cm^{-1}, dimana keberadaan gugus fungsi ini menandakan bahwa senyawa hasil sintesis telah terbentuk. Reaksi substitusi nukleofilik (benzoilasi) antara turunan benzoil klorida dengan aliltiourea diharapkan terbentuk ikatan amida antara dua reaktan tersebut. Selain itu terdapat gugus C-Cl aromatik yang muncul pada puncak 1449-1596 cm^{-1} hal ini membuktikan bahwa gugus C-Cl aromatik tersebut ada dalam senyawa produk yang juga ada pada senyawa pereaksinya yaitu 3-klorobenzoil klorida. Gugus fungsi lain yang muncul pada uji konfirmasi menggunakan spektrofotometri infra merah ini adalah gugus N-H ulur pada bilangan gelombang 3426 cm^{-1} dan gugus -C=C vinil pada bilangan gelombang 1669 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 uji spektrofotometri ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR untuk mengetahui jenis, jumlah, serta letak atom hidrogen dan karbon pada senyawa produk. Dari hasil analisa spektra ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR dapat dilihat jumlah proton yang terdapat dalam senyawa produk yaitu ada 11 proton dan 11 karbon sesuai dengan rumus molekul senyawa ini yaitu $C_{11}H_{11}ClN_2OS$. 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-3 adalah terbentuk 3 serapan yang menunjukkan 3 fragmen dengan massa berbeda yaitu 139.075 m/z; 156.019 m/z; dan 254.878 m/z. Kemudian apabila dibandingkan dengan studi pendahuluan yang dilakukan dengan *Chemdraw 8.0* maka berat molekul dari 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea adalah 254,74 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 139.075 m/z merupakan massa dari 3-klorobenzoil klorida, massa 156.019 m/z merupakan senyawa 3-klorobenzamide yang bisa dimungkinkan sebagai produk sampingan yang terbentuk dari hasil reaksi, dan yang terakhir pada massa 254.878 m/z merupakan senyawa produk yang dibutuhkan yaitu 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea (Pubchem, 2017).

Hasil dari uji konfirmasi struktur membuktikan bahwa senyawa BATU-3 adalah benar senyawa dengan rumus molekul $C_{11}H_{11}ClN_2OS$ dengan rumus *IUPAC* 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.

Tahap selanjutnya adalah uji aktivitas antiinflamasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea secara *in vivo* terhadap tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karagenan pada telapak kakinya. 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 dan 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 dan Pramono, 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.

Pengukuran edema yang diinduksi oleh karagenan menggunakan alat pletismometer menghasilkan data berupa volume edema pada waktu 0 jam (t0), 1 jam (t1), 2 jam (t2), 3 jam (t3), dan 4 jam (t4) setelah pemberian obat dengan masing-masing dosis. Kemudian dilakukan pengolahan data untuk dijadikan data persen inhibisi terhadap inflamasi. Data volume edema pada t0 sampai t2 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 sehingga tidak dapat diamati dan dilakukan analisis. Data yang dapat dianalisis adalah data yang menunjukkan nilai positif yang ditunjukkan pada waktu t3 dan t4 karena pada waktu ini senyawa dan obat sudah menunjukkan aktivitas antiinflamasi.

Berdasarkan persen inhibisi uji aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea memiliki aktivitas yang lebih baik dalam semua dosis dibandingkan kontrol positif natrium diklofenak dengan dosis 12,5 mg/kgBB, tetapi berdasarkan uji statistika

menggunakan metode *One way ANOVA* tidak menunjukkan perbedaan aktivitas antiinflamasi yang bermakna antara semua dosis dengan natrium diklofenak 12,5 mg/kgBB. 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.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Implikasi penelitian terhadap bidang kefarmasian adalah dengan penemuan senyawa penuntun antiinflamasi yang baru, maka dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan bahwa senyawa yang baru memiliki efek samping yang lebih minimal dibanding OAINS .

6.3 Keterbatasan Penelitian

1. Keterbatasan penelitian terletak pada ketersediaan alat ukur edema yang kurang sensitif dan melibatkan visual peneliti sehingga memperbesar kemungkinan kesalahan pembacaan data.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dapat disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik dengan metode Schotten-Baumann.
2. Aktivitas antiinflamasi senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea dalam semua dosis lebih baik dibandingkan kontrol positif natirum 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 alat untuk pengukuran inflamasi bisa digunakan alat yang lebih sensitif seperti pletismometer digital.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut terkait farmakologi dan farmakokinetik untuk mengetahui efek samping senyawa 1-alil-3-(3-klorobenzoil)tiourea.

DAFTAR PUSTAKA

Alagarsamy V, Murugananthan G., and Venkateshperumal R. Synthesis, analgesic, antiinflamatory and antibacterial activities of some novel 2- methyl-3-substituted quinazolin-4-(3H)-ones. *Bio Pharm Bull,* 2003, 26(12): 1711-1714

Ashley, Noah.T., Weil, Zachary.M., Nelson, Rendy.J. Inflammation : Mechanism, Cost, and Natural Variations. The *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2012, 43 : 385-406

Budiati T, Suzana,dan Siti S. Sintesis, uji aktivitas analgesik dan antiinflamasi senyawa benzoiltiourea tersubstitusi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2010, 21(1): 68 – 76

Corwin E.J, 2008. *Buku Saku Patofisiologi Corwin* Edisi ke 3, EGC, Jakarta.

ESCOP Monographs, 2003. *The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products*, Thieme, United Kingdom.

Fehrenbacher, Jill C., Michael R. Vasko, dan Djane B Duarte., Curr Protoc Pharmacol, 2012. *Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat*, (Online), (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4683998/, diakses 25 Mei 2017)

Firdayani dkk, 2012. Pengembangan Kandidat Senyawa Obat Turunan Naftokuinon Sebagai Inhibitor Virus Hepatitis B in Firdayani (Ed), *Prosiding InSINas,* Bandung, p. 35-39.

Ghosh, Rajeshwary , Azra Alajbegovic, and Aldrin V. Gomes, Curr Protoc Pharmacol , 2015. *NSAIDs and Cardiovascular Diseases: Role of Reactive Oxygen Species*, (Online), (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592725/, diakses 25 Mei 2017**)**

Kaymakcioglu, Bedia-Kocyigit., Ahmet Ozgur Celen., *et al*. 2012. Synthesis and Biological Activity of Substituted Urea and Thiourea Derivatives Containing 1,2,4-Triazole Moietis. *Molecules*, 2013, 18(3): 3562-3576

Lalan, Bhavesh K. , R. S. Hiray, and B. B. Ghongane. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Extract of *Holoptelea Integrifolia* and *Argyreia Speciosa* in Animal Models. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2015, 9(7): 1–4.

Lalrinzuali, K. , M. Vabeiryureilai, and Ganesh Chandra Jagetia, 2016. *Investigation of the Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of Ethanol Extract of Stem Bark of Sonapatha Oroxylum indicum In Vivo.* (Online), (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746378/, diakses 25 Mei 2017)

Malole MBM dan Pramono CSU, 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*, Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB, Bogor.

Meshram, G.G, *et al*. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of Albizzia lebbeck in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine,* 2016, 6 : 172-175

Pavia D.L.,Lampman G.M., Kriz G.S.,dan Vyvyan J.R, 2009. *Introduction to Spectroscopy,* Fourth Edition, Belmont, USA.

Pubchem. 2017. Database Kimia senyawa. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/69111#section=Top . diakses tanggal 6 April 2018

Rao, P. dan Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci,* 2008, 11(2): 81-110.

Rao, VS and K. Shrinivas. Modern Drug Discovery Process: An In Silico Process. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, 2011, 2(5) : 89-94.

Rouzer, Carol A. and Lawrence J. Marnett. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research,* 2009, 50:29-34.

Santoso, S, 2008. *Panduan Lengkap Menguasai SPSS 16*, PT. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.

Shalas, Alvan F., Siswandono, Marcellino Rudyanto. Synthesis and Pain Inhibition Activity of the Analogs of 1-Allyl-3-Benzoylthiourea for New Analgesic Lead Compound Discovery. *Journal of Young Pharmacists*, 2018, 10(1): 12-15.

Silverstein, Bassler dan Morril, 1986. *Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik Edisi Empat*, Erlangga, Jakarta.

Siswandono, dan Bambang Soekardjo, 2000. *Kimia Medisinal,* Erlangga University Press, Surabaya.

Suhud, Farida. Uji Aktivitas In-silico Senyawa Baru 1-Benzil-3-benzoilurea Induk dan Tersubstitusi sebagai Agen Antiproliferatif. *Jurnal Farmasi Indonesia,* 2015, 7: 242 – 251.

Vetriselvan, Subasini, Velmurugan, Muthuramu, Shankar Jothi, Revathy. Antiinflammatory activity of Cucumis sativus seed in carragenan and xylene induced edema model using albino wistar rats. *International Journal of Biopharmaceutical*. 2013, 4(1): 34-37.

Wilmana, P. F., 2007. Analgesik-Antipiretik, Analgesik Anti-Inflamasi Non Steroid Dan Obat Gangguan Sendi Lainnya in Gunawan, S. G., (Ed.), *Farmakologi dan Terapi*, 5th ed., Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia Jakarta, p.237-239.

Young, David C, 2009. *Computational Drug Design,* A John Wiley and Sons, Inc., Publication, United States of America.