

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 404/Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal

EXECUTIVE SUMMARY

PENELITIAN DOSEN PEMULA



***DRUG DEVELOPMENT* TURUNAN ASAM MEFENAMAT SEBAGAI
ANALGESIK DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER**

PENGUSUL

Ayik Rosita P, S.Farm., M.Farm., Apt (0001028102)

UNIVERSITAS JEMBER

DESEMBER, 2014

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DOSEN PEMULA

Judul Penelitian : *Drug Development* Turunan Asam Mefenamat
Sebagai Analgesik Dengan Pendekatan Molekuler
Kode>Nama Rumpun Ilmu : 404/ Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal
Ketua Peneliti :
a. Nama Lengkap : Ayik Rosita P, S.Farm., M.Farm., Apt
b. NIDN : 0001028102
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi : Farmasi
e. Nomor HP : 08123473390
f. Alamat surel (e-mail) : aixrose_pee@yahoo.co.id
Anggota Peneliti (1) : -
a. Nama Lengkap :-
b. NIDN :-
c. Perguruan Tinggi :-
Lama Penelitian Keseluruhan :6 bulan
Penelitian Tahun Ke : 1
Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp. 9.170.000,00
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 9.170.000,00

Jember, 22 Desember 2014

Mengetahui,
Peneliti Pembina
Fakultas Farmasi

Ketua Peneliti,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt
NIP. 197604142002122001

Ayik Rosita P.S.Farm.,M.Farm.,Apt
NIP. 198102012006042001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Jember

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Jember

Prof. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D
NIP. 196905171992011001

LestyoWulandari,S.Si.,M.Farm.,Apt
NIP. 197604142002122001

DRUG DEVELOPMENT TURUNAN ASAM MEFENAMAT SEBAGAI ANALGESIK DENGAN PENDEKATAN MOLEKULER

Puspaningtyas, A.R.

Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember

Corresponding author. Email : aixrose_pee@yahoo.co.id, Tel/Fax : 08123473390/0331-324736

ABSTRACT

A new compound of Mefenamic Acid derivate, 4-nitrobenzoyl-mefenamic acid has been synthesized with benzoylation reaction between mefenamic acid and 4-nitrobenzoyl chloride after prediction by in silico study. A derivative of mefenamic acid (4-NO₂-benzoyl-mefenamic acid) has been synthesis for increase its activity and reduce side effect as candidate of drug to inhibitor COX (Cyclooxygenase). This compound has been purified by Column Chromatography and analyzed using KLT-Densitometri after purified. The TLC plate has been scraped on the spots had the same R_f and each of them has been analyzed using KLT-Densitometri to determine purity, and the spots with R_f value 0,8 have good purity. The spots with good purity has been analyzed to identification this structure using H-NMR 400 MHz and FTIR-KBr, and this result is true the spectra of this compound is 4-nitrobenzoyl-mefenamic acid. This compound give white yellow color with melting point 198-199 °C. Based on analgetic activity study show that 4-nitrobenzoyl-mefenamic acid has been higher acvity than mefenamic acid.

Keyword : mefenamic acid, 4-nitrobenzoyl-mefenamic acid, inhibitor COX, benzoylation.

Ringkasan

Pengembangan obat (*Drug development*) untuk mendapatkan senyawa baru yang lebih besar aktivitasnya terhadap COX untuk digunakan sebagai analgetik setelah melalui serangkaian sintesis dengan reaksi benzoilasi. Modifikasi struktur asam mefenamat ini dilakukan untuk meningkatkan sifat hidrofobik, elektronik dan sterik senyawa induk berdasarkan pendekatan Topliss. Untuk mengetahui aktivitas turunan asam mefenamat sebelum disintesis maka dilakukan docking eksperimental secara molekuler dengan *Molegro virtual Docker (MVD)*. Dari hasil docking didapatkan bahwa 4-NO₂-benzoil asam mefenamat memiliki nilai *Moldock score* paling rendah yaitu -131.7728 ± 4.7304 yang menunjukkan kestabilan dalam pengikatannya. Selanjutnya dilakukan sintesis senyawa 4-NO₂-benzoil asam mefenamat melalui reaksi benzoilasi yang diawali dengan optimasi waktu reaksi. Waktu reaksi yang optimal yaitu 4 jam dengan *purity test* bagus yang artinya senyawa baru (4-NO₂-benzoil asam mefenamat) berbeda dengan bahan awal (asam mefenamat). Setelah disintesis selanjutnya dilakukan kromatografi kolom, titik lebur, dan identifikasi struktur dengan FTIR dan H NMR. Berdasarkan hasil kromatografi kolom dan telah diidentifikasi struktur dengan FTIR dan H NMR menunjukkan bahwa senyawa yang disintesis sesuai dengan 4-NO₂-benzoil asam mefenamat dengan titik lebur 198-199 °C. Pada akhir penelitian dilakukan uji aktivitas analgetik dengan metode *hot plate* dimana 4-NO₂-benzoil asam mefenamat lebih baik aktivitasnya dibandingkan asam mefenamat sendiri.

Keyword : *Drug Development, Asam mefenamat, Analgetik, Docking*

PENDAHULUAN

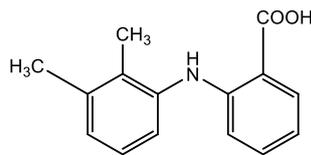
Nyeri merupakan suatu pengalaman sensoris yang multidimensional (Woolf, 2004). *International Association for the Study of Pain (IASP)* mendefinisikan nyeri sebagai pengalaman sensoris dan emosional tidak menyenangkan yang berhubungan dengan terjadinya kerusakan jaringan baik secara aktual maupun potensial (IASP, 2011; Xie, 2011). Nyeri kronik menjadi suatu masalah yang serius sehubungan dengan tingginya angka prevalensi. Nyeri kronik merupakan satu dari gejala yang paling sering dilaporkan terjadi pada satu dari enam orang dalam populasi dan diestimasikan terjadi pada 2-40% populasi dewasa (Mallen, *et al.*, 2005; Xie, 2011). Beberapa penelitian mengestimasikan bahwa prevalensi terjadinya nyeri kronik di Eropa mencapai hingga 55,2% (Picavet and Schouten, 2003; Harstall and Ospina, 2003). Di Indonesia sendiri, pada penduduk dengan usia lanjut, dilaporkan bahwa 25-50% diantaranya mengalami nyeri (Kartini, 2007). Kondisi nyeri kronik berdampak pada peningkatan biaya kesehatan (Mallen, *et al.*, 2005). Penelitian di Amerika Serikat menyatakan bahwa biaya tahunan untuk nyeri kronik diperkirakan mencapai 100 miliar dolar (Zhuo, *et al.*, 2011).

Asam mefenamat merupakan obat di pasaran sebagai NSAID (*Non Steroid AntiInflammatory Drugs*) yang telah lama digunakan sebagai analgetik-antiinflamasi penghambat COX dan banyak dimanfaatkan didunia untuk pengobatan penyakit-penyakit untuk menghilangkan rasa sakit/nyeri dan radang.

Dalam upaya merancang dan mengembangkan obat baru, langkah awal yang dapat dilakukan antara lain dengan mengembangkan obat yang telah ada dimana telah diketahui struktur molekul dan aktivitas biologisnya, untuk dijadikan senyawa penuntun atas dasar penalaran yang sistematis dan rasional dengan mengurangi faktor coba-coba seminimal mungkin. Selanjutnya dari senyawa penuntun tersebut dikembangkan modifikasi struktur molekulnya kemudian senyawa baru atau turunan tersebut diuji aktivitas biologisnya (Siswandono, 2000).

Asam mefenamat adalah obat yang umum digunakan sebagian besar sebagai analgetik-antiinflamasi yang penggunaannya sangat luas untuk penyakit-penyakit yang bisa menimbulkan rasa nyeri dan radang seperti artritis rematoid, sakit gigi, asam urat serta untuk pengobatan nyeri otot perifer. Oleh karena penggunaannya yang luas maka salah satu upaya yang dilakukan untuk mengembangkan obat baru adalah pencarian dan penemuan senyawa bioaktif yang sudah terbukti dalam aktivitasnya sebagai *lead*

compounds kemudian dibuat turunannya. Berdasarkan penelitian sebelumnya tentang penelitian turunan asam mefenamat yang disubstitusi benzensulfonat, bromo antranilat, parasetamol, fenoksibenzoat, disiklokarboimida dengan reaksi kopling, disiklourea, ester dan amida, hidrazin dan hidramin dapat meningkatkan efek analgesik antiinflamasi serta menurunkan efek sampingnya yaitu ulcer (Mahdi, M. F., 2008; Tiwari D *et al*, 2011; Razzak N. A. A. 2011; Suryaawanshi S. B *et al*, 2013; Shah K *et al*, 2013; Velingkar V. S *et al*, 2011; Al Masirad A *et al*, 2006; Uludağ M.O *et al*, 2011; Koopaeia M. N *et al*, 2013). Dalam penelitian ini dilakukan substitusi turunan benzoil sesuai dengan pendekatan topliss yang diprediksi terlebih dahulu dengan pendekatan molekuler. Penggunaan substitusi dengan benzoil didasarkan pada penelitian Jayaselli *et al* dan Susilowati melalui reaksi benzoilasi pada NSAID piroksikan dan parasetamol yang dibuat turunannya ternyata memberikan aktivitas biologis yang lebih besar daripada senyawa induknya (Jayaselli *et al*, 2008; Susilowati dan Handayani, 2006).

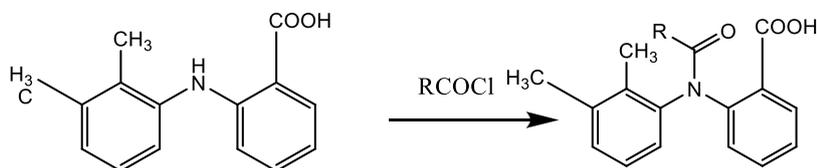


Gambar 1. Senyawa Asam mefenamat

Dari uraian di atas maka timbul pemikiran untuk mensintesis turunan asam mefenamat dengan memodifikasi strukturnya dengan substituen derivat benzoil. Pada penelitian ini digunakan beberapa substituen turunan benzoil didasarkan pada pendekatan Topliss dengan memperhitungkan peningkatan parameter lipofilik, elektronik, dan sterik sebagai substituen yang akan disubstitusikan pada struktur asam mefenamat. Peningkatan sifat lipofilik diharapkan dapat meningkatkan penembusan senyawa ke dalam membran biologis. Sedangkan peningkatan sifat elektronik diharapkan dapat berperan pada proses interaksi obat dengan reseptor karena mempengaruhi ionisasi dan polarisasi senyawa obat sehingga meningkatkan efektifitas biologis secara keseluruhan. Di samping parameter lipofilik dan elektronik, faktor lain yang juga berpengaruh adalah faktor sterik karena berhubungan dengan keserasian interaksi molekul senyawa dengan reseptor dalam sel. Dengan adanya efek sterik maka akan membantu orientasi obat secara benar untuk berikatan maksimum dan meningkatkan aktivitas. (Siswandono, 2000).

Peningkatan sifat lipofilik dapat dilakukan dengan memasukkan gugus-gugus non polar seperti cincin aromatik, sedangkan peningkatan sifat elektronik dapat dilakukan dengan memasukkan substituen yang bersifat elektronegatif seperti halogen. Sifat sterik dilakukan dengan membuat struktur yang lebih meruah yang berfungsi seperti perisai dan mendorong terjadinya interaksi ideal antara obat dan sisi aktif reseptor. Dengan pemasukan gugus dengan pertimbangan peningkatan parameter lipofilik, elektronik, dan sterik diharapkan akhirnya dapat berpengaruh pula terhadap aktivitas biologis dan dapat memberikan efektifitas yang lebih baik secara absorpsi, metabolisme, dan farmakokinetiknya (Siswandono and Soekardjo, 1998).

Pada reaksi sintesis turunan asam mefenamat diubah menjadi derivat benzoil-asam mefenamat melalui reaksi adisi nukleofilik.



Gambar 2. Reaksi sintesis turunan asam mefenamat

Untuk mengetahui aktivitas turunan asam mefenamat sebelum disintesis maka dilakukan docking eksperimental secara molekuler dengan *Molegro virtual Docker* (MVD). Tujuan docking eksperimental untuk memperkirakan interaksi antara turunan asam mefenamat sebagai ligan dengan COX sebagai reseptor yang berperan sebagai enzim dalam timbulnya nyeri-inflamasi. Kemudian dari hasil docking molekuler akan didapatkan senyawa yang secara prediksi paling poten yang selanjutnya akan disintesis. Senyawa hasil sintesis yang diperoleh kemudian diuji kemurniannya melalui penentuan titik lebur dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan beberapa fase gerak. Sedangkan untuk identifikasi struktur senyawa dilakukan dengan Spektrometri Infra Merah (FTIR), dan Spektrometri Resonansi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$) serta diuji aktivitas analgesiknya dengan metode *hot plate*

METODE PENELITIAN

Alat

Beaker glass (50 mL, dan 250 mL) Iwaki Pyrex, Erlenmeyer 100 mL (Schott-Duran), bola pipet, pipet volume, batang pengaduk, pipet tetes, gelas ukur, corong gelas, mikropipet (Blaubrand® IntraEnd), chamber, *magnetic stirrer*, oven, neraca analitik

Sartorius, lampu Ultraviolet (UV), pengering/*hair dryer*, *Electrothermal melting point apparatus*, ¹H-NMR 400 MHz *Jeol Resonance*, FTIR-KBr *Perkin Elmer-Spectrum One*, KLT-Densitometer (Camag), kamera digital, ChemBioOffice 2008 versi *trial*, *Molegro Virtual Docker* versi *trial*..

Bahan

Asam mefenamat (Teknis), 4-nitrobenzoi klorida (Sigma), aseton (Sigma), Aquadest, Silika gel 60 F 254, heksana p.a (Merck), toluen (Merck), etil asetat (Merck), methanol (Merck), aseton (Merck), asam benzoat (LIPI), KBr p.a (Merck), metanol-d4 pro NMR, tetrametilsalisilan (TMS) pro NMR, mencit.

1) Molekular docking

Pemodelan molekular

Dilakukan pemodelan molekular dan analisis pemasukan menggunakan komputer. Struktur asam mefenamat dan turunannya sebagai ligan digambar dengan program Chemoffice 2008 sedangkan struktur tiga dimensi siklooksigenase (COX) sebagai reseptor diambil dari website Protein Data Bank (PDB). Selanjutnya dilakukan analisis pemasukan (*docking*) ligan-protein menggunakan program *Molegro Virtual Docker 2008* (Cooper, G.M dan Hausman, R.E., 2004; Thomsen R, and Christensen M.H., 2006).

Preparasi Ligan dan Reseptor

Struktur dari semua senyawa turunan asam mefenamat sesuai aturan Toplis (4-OCH₃, 4-Cl, 4-Br, 4-F, 4-NO₂, 3-NO₂, 4-CF₃, 3-Cl, 2Cl, H, 3,4-Cl benzoi) digambar dengan menggunakan ChemBio Draw Ultra 11.0 2008 versi *trial*. Selanjutnya dioptimalkan dengan menggunakan ChemBio 3D Ultra 11.0 2008 dan minimalisasi energi ligan yang paling stabil dengan MM2 dalam pencarian konformasi untuk menghasilkan ligan *pose* yang konsisten dengan bentuk sisi aktif dari protein (siklooksigenase). Calon *pose* yang diminimalkan energinya dalam sisi aktif menggunakan metode berbasis grid untuk mengevaluasi interaksi energi protein-ligan yang disimpan dalam Mol2. Sebelum dilakukan docking reseptor di preparasi dengan menghilangkan air dan mencari *active site* melalui *Detect Cavity*. Simulasi ikatan dilakukan dengan *native ligand* tanpa molekul air untuk menjelaskan peran protein siklooksigenase untuk pengikatan ligan terhadap turunan asam mefenamat (Naeem S, et al, 2013; Thomsen R, and Christensen M.H., 2006).

Validasi Docking

Tahap validasi dilakukan untuk mengkalibrasi metode docking pada piranti lunak yang digunakan pada proses validasi ini dibandingkan antara posisi *native ligand* terhadap reseptor yang telah diuji secara eksperimental pada *binding site pocket* ligan. Dasar yang digunakan untuk memberikan penilaian kevalidan adalah harga RMSD. Metode yang digunakan dikatakan valid jika harga RMSD kurang dari 2 artinya posisi ligan *copy* setelah *superimpose* semakin dekat posisinya menduduki *native ligand* sehingga metode yang digunakan akan lebih tepat. Nilai RMSD dipengaruhi juga oleh resolusi protein reseptor dan metode pemodelan reseptor yang digunakan. Validasi dilakukan pada *binding site pocket ligand* dengan 10 kali replikasi untuk tiap-tiap reseptor (Nadendla, Rama Rao. 2004).

Docking turunan asam mefenamat dengan reseptor sikloksigenase

Docking dilakukan dengan piranti lunak HP pavilion dengan prosesor intel (R) 2,2 GHz, RAM 2,00 GB, dan 64 bit *operating system*. Docking dilakukan dengan pengaturan standar non Ligand pada *Molegro Virtual Docker 2008* dengan *Detectcavity* namun yang digunakan *cavity* tempat *native ligand* dicatat volumenya untuk reseptor sikloksigenase menggunakan ligan (turunan asam mefenamat) dengan grid resolusi 0.30 dengan parameter iterasi maksimal 1500 dan ukuran populasi maksimal 50 serta dengan *pose generation* dengan energi 100.00. Selain itu evolusi simpleks yang digunakan pada *max step* 300 dan *distance faktor* 1.00. Hasil scanning proses docking menunjukkan kekuatan interaksi ligan-reseptor dan menjadi parameter potensi senyawa berdasarkan nilai *MolDock Score*, *Rerank Score*, *RMSD* (*Root Mean Standard Deviation*) dan *H Bond*. Nilai *MolDockScore* dari ligan turunan asam mefenamat yang memiliki energi yang lebih rendah sehingga lebih stabil dalam pengikatannya terhadap reseptor akan digunakan selanjutnya untuk disintesis (Thomsen R, and Christensen M.H., 2006).

2) Sintesis turunan asam mefenamat

Tahap pertama dilakukan dengan mereaksikan asam mefenamat (2 mmol, 0,4825 g) dilarutkan dalam aseton 30 ml kemudian ditambahkan NaHCO₃ 0,19 g (2,2 mmol) dan turunan benzoil klorida yang optimum sesuai dengan prediksi hasil pendekatan molekuler docking untuk reaksi substitusi nukleofilik yaitu 4-NO₂-benzoil klorida 0.4082 g (2,2 mmol) dalam 5 ml aseton dari corong pisah ke dalam labu setetes demi setetes selama 30 menit hingga habis sambil diaduk dalam bak es. Setelah pereaksi

selesai ditambahkan, campuran dipanaskan pada suhu 40°C selama 4 jam sambil diaduk. Ketika reaksi telah sempurna, hasil reaksi diuapkan dengan evaporator sampai pelarutnya habis kemudian endapan ditambahi dengan air (10 ml) dan etil asetat (30 ml) sehingga terjadi 2 fase yaitu fase minyak dan fase air. Selanjutnya kedua fase tersebut dicuci dengan HCl pH 3-4 (10 ml) dan dipisahkan dengan corong pisah dimana yang dikumpulkan adalah fase etil asetat. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya fase etil asetat dicuci dengan NaHCO₃ pH 7-8 (10 ml) dan dipisahkan dengan corong pisah dimana yang dikumpulkan adalah fase etil asetat. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat. Fase etil asetat diuapkan dengan evaporator sampai habis. Residu yang tersisa dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan eluen metanol : toluen (2:8). Kristal dikumpulkan dan dikeringkan di dalam eksikator dan ditimbang (Manon and Sharma, 2009).

3) Uji kemurnian dan Identifikasi struktur turunan asam mefenamat hasil sintesis

Uji Kemurnian Senyawa Hasil Sintesis

a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Dalam melakukan pemurnian menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) perlu ditetapkan fase gerak atau pelarut yang dapat memisahkan campuran dengan baik pada fase diamnya. Sampel pereaksi dan produk sintesis masing-masing dilarutkan dalam pelarut. Fase gerak atau eluen dimasukkan ke dalam bejana (*chamber*) kromatografi yang di dalamnya diletakkan kertas saring, ditutup dan dibiarkan hingga *chamber* jenuh dengan uap eluen. Lempeng silika gel yang digunakan untuk plat KLT diberi garis awal dan garis akhir. Larutan sampel ditotolkan pada garis awal plat KLT menggunakan pipa kapiler dengan jarak antar sampel kira-kira 1 cm. Plat KLT dimasukkan dalam *chamber* dengan hati-hati kemudian *chamber* ditutup. Sampel dieluasi di dalam *chamber* hingga mencapai garis akhir. Setelah eluasi selesai, plat diambil dan dikeringkan kemudian noda yang tampak diamati dengan lampu UV 254 nm. Noda yang tampak pada hasil elusi produk dilihat dan ditandai. Eluen yang dipakai metanol: toluen (2:8).

4) Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Sintesis

a. Spektrofotometri Infra Merah

Sejumlah serbuk sampel dicampur homogen dengan KBr dan dibuat bentuk pellet dengan menekan hidrolik lalu spektrumnya diamati pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} dengan FTIR

b. Spektrofotometri $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$

Sejumlah sampel dipreparasi dengan dilarutkan dalam kloroform- d_1 (CDCl_3), dengan standar internal tetrametilsilan (TMS) kemudian diletakkan di tempat sampel di antara dua kutub dan disinari dengan gelombang radio. Spektrum NMR ialah grafik dari banyaknya energi yang diserap (I atau Intensitas) terhadap kuat medan magnet.

c. Uji Kemurnian dengan Penentuan Titik Leleh

Sedikit sampel dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya telah ditutup kemudian dimasukkan ke dalam alat penentu titik leleh dan dipanaskan. Selanjutnya dari kaca pembesar diamati saat sampel mulai melebur dan diamati suhu pada saat zat meleleh sempurna. Menurut Scall (2000) mengatakan, kristal dikatakan murni apabila mempunyai rentang suhu lebur yang sangat kecil, yaitu $\leq 2^\circ\text{C}$.

5.) Perlakuan pada Hewan Coba

Mencit dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing terdiri dari 4 ekor. Kelompok I adalah kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan yang diberi CMC Na 1% dan akuades. Kelompok II adalah kelompok kontrol positif yang diberi perlakuan asam mefenamat. Kelompok III-VI adalah kelompok perlakuan yang diberikan turunan asam mefenamat hasil sintesis dengan 4 peringkat dosis. Pemberian senyawa uji dilakukan satu hari sekali pada hari ke-7 sampai hari ke-14.

a) Metode Analgetik Hot Plate.

Rangsang nyeri yang digunakan berupa lantai kandang yang panas ($55-56^\circ\text{C}$). Rasa nyeri panas pada kaki mencit menyebabkan respon mengangkat kaki depan dan dijilat. Rata-rata hewan mencit akan memberikan respon dengan metode ini dalam waktu 3-6 detik. Prosedurnya dengan mencit ditimbang (25-35 g) dan dicatat bobotnya serta diberi tanda. Sebelum pemberian turunan asam mefenamat catat dengan menggunakan stopwatch waktu yang diperlukan mencit untuk mengangkat dan menjilat kaki depannya sebagai waktu respon. 30 menit kemudian mencit diletakkan pada *hot plate* yang telah di atur suhunya pada $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Amati waktu antara mencit mulai

diletakkan di *hot plate* hingga timbulnya tanda nyeri secara visual seperti menjilat kaki depan, mengangkat kaki depan, melompat atau meliukkan badan, mendekatkan kedua tungkai kaki ke depan, menjilat tungkai kaki ke depan, berusaha melompat keluar area *warm plate*, dan menghentakkan tungkai belakang. Waktu ini dinamakan waktu laten. Sebelum penelitian, waktu laten basal dari masing-masing mencit diamati terlebih dahulu. Mencit dengan waktu laten lebih besar dari 15 detik di eliminasi dari penelitian. Waktu pemaparan paling lama 60 detik. Pengamatan dilakukan pada menit ke 0, 30, 60, 90, 120, 150 setelah pemberian obat. Pengamatan dilakukan dua kali dan hasil pengamatan dirata-ratakan sebagai respon normal. Diberikan senyawa turunan asam mefenamat yang telah di basis dengan CMC Na secara oral ke mencit yang telah dikonversikan terlebih dahulu ke dosis mencit. Dibuat tabel hasil pengamatan dan dibuat kurva hubungan antara dosis yang diberikan terhadap respon mencit untuk stimulus nyeri (Manon and Sharma, 2009).

Hewan	Jenis kelamin	Metode	BB (kg)	VAO (ml)
Mencit	Jantan	Hot plate	0,028	0,028x 5 mg/kg/5mg/ml = 0,028 ml

b) Analisis Data

Waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas Data ditampilkan dalam bentuk kurva dan dianalisis menggunakan *independent t-test* dan *one way anova* dengan derajat kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1). Pemodelan Molekuler

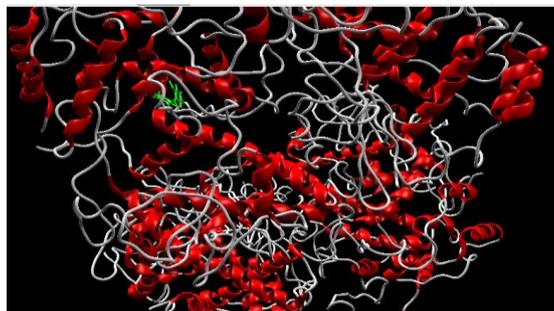
Interaksi antara senyawa asam mefenamat dan derivatnya sebagai ligan dengan COX-2 dengan kode Protein Data Bank (1PXX) pada protein A pada cavity 78.336 dapat diprediksi menggunakan komputer program *Molegro Virtual Docker* (MVD). Pada saat pemasukan atau penempatan (*docking*) molekul 4-NO₂-benzoil-asam mefenamat ke dalam COX-2 di dapat data energi minimum yang ditunjukkan dengan *MoldockScore* adalah sebesar -131.7728 ± 4.7304 . Ketika turunan asam mefenamat (4-NO₂-benzoil asam mefenamat) diganti dengan asam mefenamat yang diketahui energinya semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa sesungguhnya turunan asam mefenamat tersebut lebih stabil dalam berikatan dengan COX-2 dibanding asam mefenamat. Hal ini didukung dengan data RMSD yang menunjukkan bahwa nilai derivat asam mefenamat

lebih rendah daripada asam mefenamat yang artinya jarak antara molekul dengan ikatan semakin kecil sehingga ikatan kompleks antara ligan (turunan asam mefenamat) dan reseptor lebih stabil daripada senyawa induknya yaitu asam mefenamat. Hasil perhitungan komputer dengan program *Molegro Virtual Docker* ada pada Tabel 1.

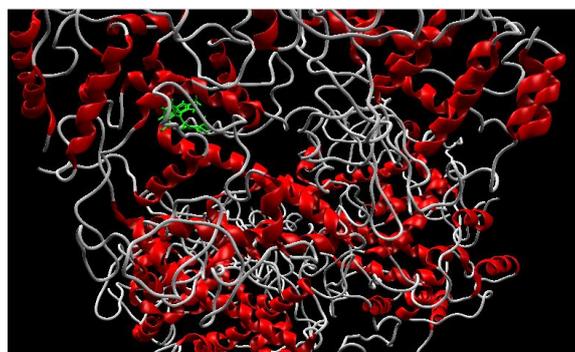
Tabel 1. Data Hasil Skoring pemasukan molekul (*docking*) Asam Mefenamat dan turunannya ke dalam reseptor siklooksigenase (COX-2)

No	Nama Senyawa	Moldockscore	rerank score	RMSD	H Bond
1	Native ligan	-105.321	-84.4739	0.822142	0.35223
2	Asam mefenamat	-107.7271	-87.27073	4.653694	-3.406527
3	4Cl-benzoil Asam mefenamat	-119.3606	-53.30389	3.119501	-5.826691
4	4Br-benzoil Asam mefenamat	-108.14942	-3.870076	4.080552	-0.3546422
5	4F-benzoil Asam mefenamat	-118.41	-49.06499	3.218392	-5.691136
6	4CF3-benzoil Asam mefenamat	-124.8416	-55.21401	3.733331	-5.601465
7	4NO2-benzoil Asam mefenamat	-131.7728	-19.617856	3.013529	-5.2265942
8	2Cl-benzoil Asam mefenamat	-109.707	64.167485	4.423048	2.7628988
9	4OCH3-benzoil Asam mefenamat	-123.5064	-54.77227	3.061372	-5.698905
10	3Cl-benzoil Asam mefenamat	-112.0296	-21.040703	2.862561	0.2114293
11	3NO2-benzoil Asam mefenamat	-127.2584	-78.79086	3.738665	-5.04409
12	Benzoil Asam mefenamat	-113.3884	-41.10053	3.058158	-4.8811931
13	3,4Cl-benzoil Asam mefenamat	-128.4548	-54.73877	3.245705	-6.471567

Pemodelan molekular untuk melihat interaksi senyawa asam mefenamat dan turunannya disajikan dalam gambar-gambar berikut ini.



Gambar 3. Pemodelan molekular *pita sekunder* senyawa asam mefenamat dalam target reseptor COX-2



Gambar 4. Pemodelan molekular *pita sekunder* senyawa 4-NO₂-benzoil asam mefenamat dalam target reseptor COX-2

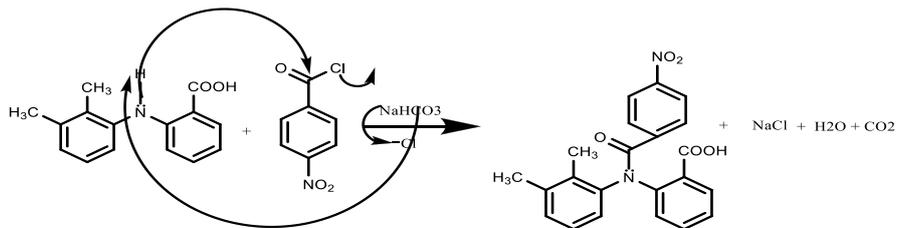
Dari gambar dan table hasil pemodelan molekuler menunjukkan bahwa turunan 5-Fluorourasil yaitu 3-NO₂-benzoil 5-Fluorourasil memiliki afinitas ikatan lebih baik dibandingkan 5-Fluorourasil, maupun turunan 5-Fluorourasil lainnya yang didukung dengan hasil *MolDockScore* yaitu -107.037 dan *pose organized* yaitu visualisasi 3 dimensi yang sesuai dengan *active site/cavity* dari reseptor timidilat sintetase. Selain *MolDockScore* nilai kestabilan ikatan antara ligan dan reseptor juga didukung dengan data *RerankScore*, *H.Bond*, dan *RMSD* dimana semakin kecil nilainya maka ikatannya semakin stabil.

2) Sintesis Turunan Asam mefenamat

Modifikasi senyawa asam mefenamat dilakukan dengan menambahkan asam mefenamat pada *N aril* dan selanjutnya direaksikan dengan 4-nitrobenzoil klorida dimana setelah dilakukan docking untuk prediksi ikatan ligan dengan reseptor substituent 4-NO₂-benzoil memberikan hasil ikatan yang paling stabil. 4-Nitrobenzoil klorida direaksikan dengan asam mefenamat untuk membentuk amida 4-NO₂-benzoil asam mefenamat melalui reaksi substitusi nukleofilik. Mekanisme reaksi pembentukan amida 4-NO₂-benzoil asam mefenamat melalui reaksi substitusi nukleofilik pada karbon karbonil dari 4-NO₂-benzoil klorida yang bermuatan positif parsial. Ketika 4-NO₂-benzoil klorida dibutuhkan sebagai bentuk pereaksi untuk asam nukleofil diserang oleh asam mefenamat yang memiliki elektron bebas dari atom N. Dalam reaksi ini, 1 ekivalen asam mefenamat bereaksi dengan 1,1 ekivalen 4-NO₂-benzoil klorida dan turunannya dan 30 ml aseton menghasilkan 1 ekivalen amida 4-NO₂-benzoil asam mefenamat. Mekanisme reaksi benzoilasi dengan 4-NO₂-benzoil klorida ini berlangsung melalui adisi nukleofilik dan eliminasi ion klorida (Clayden *et.al*, 2001). Digunakan aseton sebagai pelarut polar aprotik yang tidak akan mengganggu proses reaksi yang melepaskan HCl.

4-NO₂-Benzoil klorida adalah turunan benzoil klorida dimana merupakan pereaksi yang sangat reaktif sehingga tidak perlu ditambahkan katalisator untuk mempercepat reaksi. Pereaksi 4-NO₂-benzoil klorida dilarutkan dalam aseton dan diteteskan perlahan-lahan ke dalam asam mefenamat yang dilarutkan ke dalam aseton dan dimaksudkan agar reaksi berlangsung sempurna. Pada reaksi benzoilasi ini akan dibebaskan Cl yang dapat mengganggu jalannya reaksi namun ditambahkan NaHCO₃ untuk membentuk garam sehingga Cl yang dilepaskan terikat Na dari NaHCO₃ yang

digunakan untuk menangkap Cl menjadi garam NaCl, H₂O, dan CO₂ yang akan hilang jika dicuci dengan air. Setelah larutan pereaksi habis diteteskan, campuran tetap diaduk selama beberapa lama agar reaksi berlangsung lebih sempurna. Hasil yang diperoleh kemudian dicuci dengan air dan tahap terakhir dilakukan pemurnian dengan rekristalisasi. Reaksi kimia yang terjadi antara asam mefenamat dan 4-NO₂-benzoil klorida melalui reaksi benzoilasi dapat dilihat pada gambar 5.

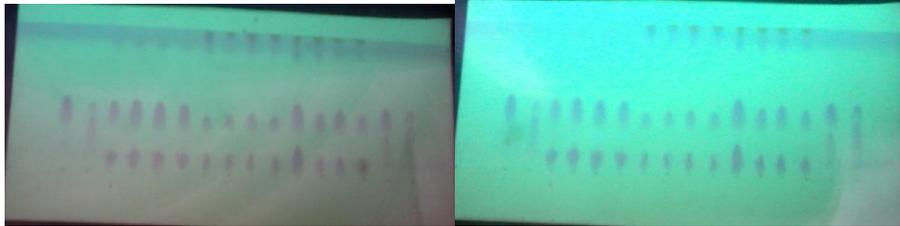


Gambar 5. Reaksi benzoilasi asam mefenamat dan 4-NO₂-benzoil klorida untuk membentuk 4-NO₂-benzoil asam mefenamat

Dari sintesis yang dilakukan diperoleh persentase hasil 88 % untuk 4-nitro benzoil asam mefenamat dengan organoleptis senyawa hasil sintesis bentuk serbuk warna kekuningan. Hasil reaksi tersebut menunjukkan bahwa adanya gugus penarik electron nitro yang elektronegatifitasnya cukup besar membantu polarisasi atom C sehingga bersifat elektropositif dengan demikian lebih mudah bereaksi dengan atom N pada senyawa asam mefenamat. Persentase hasil sintesis cukup banyak sesuai hasil yang diharapkan. Sedangkan untuk penggunaan hasil persentase tidak digunakan angka bermakna di belakang koma dikarenakan persentase hasil sintesis merupakan bentuk analisis kualitatif karena mengalami pemurnian dengan demikian ada sebagian senyawa hasil sintesis yang terbuang (Doyle, M.P and Mungall, W.S.,1980).

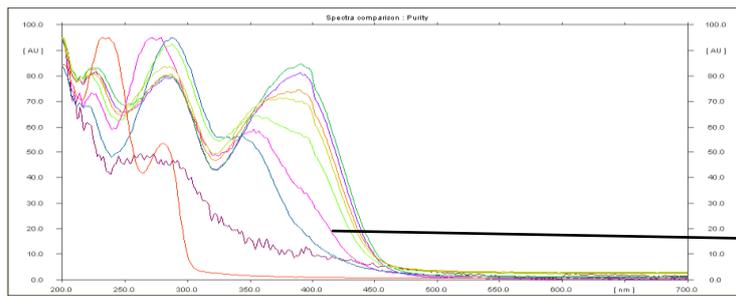
Pada uji kemurnian senyawa hasil sintesis dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis-densitometri (KLT) dengan *purity* dan penentuan titik leleh. Uji kemurnian dengan titik leleh masih belum dilakukan. Pada metode KLT sampel hasil sintesis dieluasi dengan komposisi pelarut yang berbeda polaritasnya dibandingkan dengan bahan awalnya yaitu toluene : metanol (8:2). Digunakan eluen tersebut sesuai dengan pengembangan metode KLT dari asam mefenamat (Kontham N.R, Potawale S. E, Gabhe S. Y, and Mahadik K.R., 2013). Adanya satu noda yang berbeda R_f dengan bahan awal pada lempeng KLT setelah disinari lampu UV 254 nm menunjukkan bahwa hasil tersebut merupakan senyawa tunggal yang berbeda dengan bahan awal sekaligus juga optimasi penggunaan penetral (triethylamin, NaHCO₃, dan tanpa pemberian

penetral) (dapat dilihat gambar 4.4.). Hasil beberapa optimasi eluen dan yang terbaik adalah eluen toluene : methanol (8:2) dimana Rf antara 0,2-0,8 dapat dilihat pada gambar 6. Uji kemurnian dengan KLT dengan purity test menunjukkan senyawa adalah murni (ok) dengan $r = 0.999643$ yang dapat dilihat pada gambar 7 .



Gambar 6. Optimasi penggunaan penetral (trietilamin, NaHCO₃, dan tanpa pemberian penetral)

Purity



Hasil sintesis

Spektrum list

Track	Rf	Assigned Substance	Max. Signal	Display	r(s,m)	r(m,e)	Purity
1	0.17	AutoGenerated3	260 AU @ 200 nm		0.997091	0.998213	failed
1	0.39	AutoGenerated2	913 AU @ 224 nm		0.995120	0.996318	failed
1	0.57	AutoGenerated8	112 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.997792	0.998502	failed
1	0.69	AutoGenerated6	147 AU @ 200 nm		0.996280	0.999309	failed
2	0.12	Substance 1	618 AU @ 279 nm		0.991232	0.999959	failed
2	0.18	AutoGenerated3	591 AU @ 280 nm		0.974987	0.998047	failed
2	0.36	AutoGenerated2	753 AU @ 220 nm		0.997527	0.998806	failed
2	0.67	AutoGenerated6	275 AU @ 271 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.967000	0.953052	failed
3	0.13	Substance 1	634 AU @ 278 nm		0.993098	0.999950	failed
3	0.18	AutoGenerated3	579 AU @ 282 nm		0.969022	0.996138	failed
3	0.36	AutoGenerated2	734 AU @ 200 nm		0.997868	0.998094	failed
3	0.70	AutoGenerated6	515 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.946213	0.938631	failed
4	0.09	Substance 1	549 AU @ 282 nm		0.997848	0.999900	failed
4	0.14	Substance 1	606 AU @ 282 nm		0.992271	0.999346	failed
4	0.17	AutoGenerated3	577 AU @ 281 nm		0.992350	0.998346	failed
4	0.35	AutoGenerated2	861 AU @ 200 nm		0.997864	0.999173	failed
4	0.68	AutoGenerated6	440 AU @ 288 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.996867	0.998389	failed
5	0.14	Substance 1	680 AU @ 281 nm		0.991373	0.993903	failed
5	0.36	AutoGenerated2	754 AU @ 221 nm		0.997795	0.998617	failed
5	0.70	AutoGenerated6	594 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.962470	0.969230	failed
5	0.89	AutoGenerated7	310 AU @ 201 nm		0.999462	0.999643	ok
6	0.13	Substance 1	702 AU @ 281 nm		0.989136	0.989864	failed
6	0.17	AutoGenerated3	700 AU @ 283 nm		0.983115	0.998855	failed
6	0.37	AutoGenerated2	810 AU @ 201 nm		0.997046	0.997257	failed
6	0.69	AutoGenerated6	472 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.984650	0.995290	failed
7	0.14	Substance 1	656 AU @ 282 nm		0.988679	0.999961	failed
7	0.18	AutoGenerated3	620 AU @ 280 nm		0.982946	0.994428	failed
7	0.36	AutoGenerated2	772 AU @ 200 nm		0.998112	0.998950	failed
7	0.69	AutoGenerated6	471 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.982337	0.983273	failed
8	0.15	AutoGenerated3	670 AU @ 281 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.997371	0.990700	failed
8	0.36	AutoGenerated2	761 AU @ 200 nm		0.998252	0.999096	failed
8	0.68	AutoGenerated6	529 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.948938	0.997174	failed
9	0.18	AutoGenerated3	926 AU @ 201 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.998902	0.999971	failed
9	0.36	AutoGenerated2	969 AU @ 233 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.989545	0.997794	failed
9	0.64	AutoGenerated6	273 AU @ 200 nm	<input checked="" type="checkbox"/>	0.997791	0.997697	failed

Gambar 7. Uji purity dengan KLT 4-NO₂-benzoil asam mefenamat

Setelah dilakukan uji purity dimana senyawa hasil sintesis murni berbeda dengan bahan awal maka selanjutnya dilakukan optimasi waktu reaksi pada sintesis 4-NO₂-benzoil asam mefenamat dimana berdasarkan hasil penelitian waktu reaksi yang optimal adalah 4 jam ditunjukkan dengan area kromatogram paling tinggi (dapat dilihat pada Tabel 2)

Tabel 2. Optimasi waktu reaksi sintesis 4-NO₂-benzoil asam mefenamat

No	Waktu Reaksi	Area kromatogram
1	1	9420.2
2	2	16580.8
3	3	9654.9
4	4	19750.5
5	5	13934.2
6	6	15080.5
7	7	16447

Setelah dilakukan sintesis dan uji kemurnian maka selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometer infra merah, dan resonansi magnetik inti proton. Preparasi sampel dalam spektroskopi infra merah menggunakan pellet KBr yang dapat digunakan pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹.

3) FTIR dan H NMR Asam mefenamat (Bahan Awal)

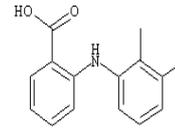
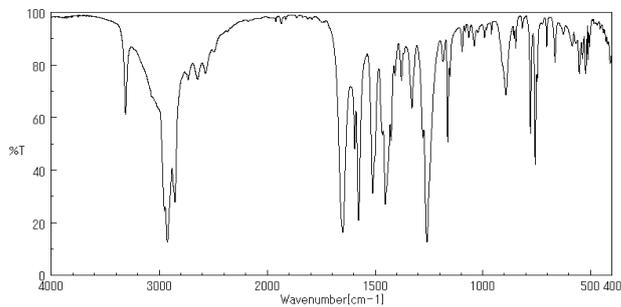
Pada spektrum IR asam mefenamat sesuai pustaka SDDBS (Anonim, 2014) terdapat puncak pada daerah bilangan gelombang 1511-1651 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus karbonil karboksilat dalam bentuk garam (COOH). Selain itu pada spektrum muncul pita absorpsi pada menunjukkan amin sekunder *stretching* pada bilangan gelombang 3311 cm⁻¹ dan adanya ikatan rangkap C=C aromatis ditunjukkan adanya pita serapan di daerah sekitar 2924 cm⁻¹. Spektrum IR untuk ikatan aromatis o-substitusi ada pada bilangan gelombang 893 cm⁻¹. Spektrum FTIR dan H NMR asam mefenamat (bahan awal) dapat dilihat pada gambar 8 dan 9.

SDBS-IR
mefenamic acid
 Molecular Formula: C₁₅H₁₅NO₂
 CAS Registry No: 61-68-7

SDBS No.: 51771
 Spectral Code: IR2008-87009TK
 IR: Nujol

Wave number (cm⁻¹) and Transmittance (T%)

3311	61	1651	16	1426	51	1095	85	702	87	511	82
2924	13	1595	48	1378	74	1039	87	663	81		
2854	28	1577	21	1329	63	893	69	551	77		
2645	74	1511	31	1259	13	778	54	535	82		
2571	77	1453	27	1163	51	756	42	521	77		



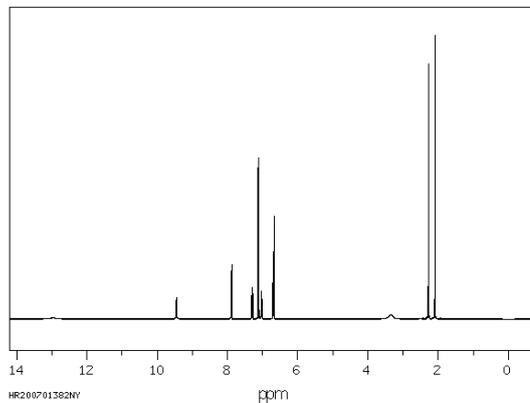
Gambar 8. Spektrum IR asam mefenamat dalam pellet KBr (Anonim, 2014)

Tabel 3. Karakteristik Spektrum infra merah senyawa asam mefenamat

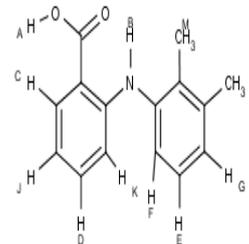
Bilangan gelombang (cm-1)	Gugus fungsi
3311	N-H
1511-1651	C=O garam karboksil
2924	C=C aromatis
893	m-substitusi

SDBS-¹H NMR
 C₁₅H₁₅NO₂
 mefenamic acid

399.65 MHz
 0.022 g : 0.5 ml DMSO-d₆



Assign.	Shift (ppm)
A	13.0
B	9.5
C	7.893
D	7.302
E	7.13
F	7.12
G	7.027
J	6.70
K	6.68
L	2.288
M	2.104

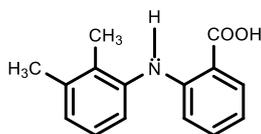


Gambar 9. Spektrum proton NMR asam mefenamat (bahan awal) (Anonim, 2014)

Tabel 4. Karakteristik Spektrum proton NMR asam mefenamat

Pergeseran kimia (ppm)	Perbandingan integrasi	Multiplisitas	Proton dari gugus
13	1	singlet	COOH
9.5	1	singlet	NH
6,68-7,893	7	multiplet	H aromatis
2.288	1	Singlet	CH ₃
2.104	1	Singlet	CH ₃

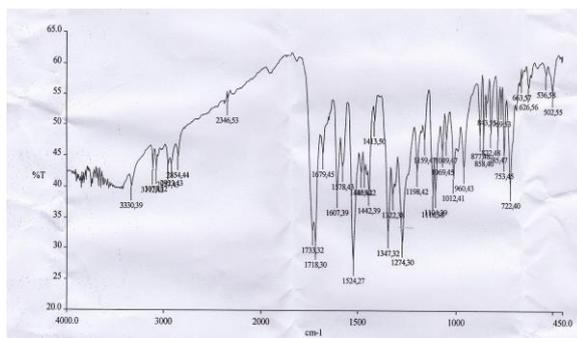
Dengan demikian dapat disimpulkan senyawa adalah asam mefenamat dengan struktur molekul sebagai berikut :



Gambar 10 Struktur asam mefenamat

4) FTIR dan H NMR Asam mefenamat

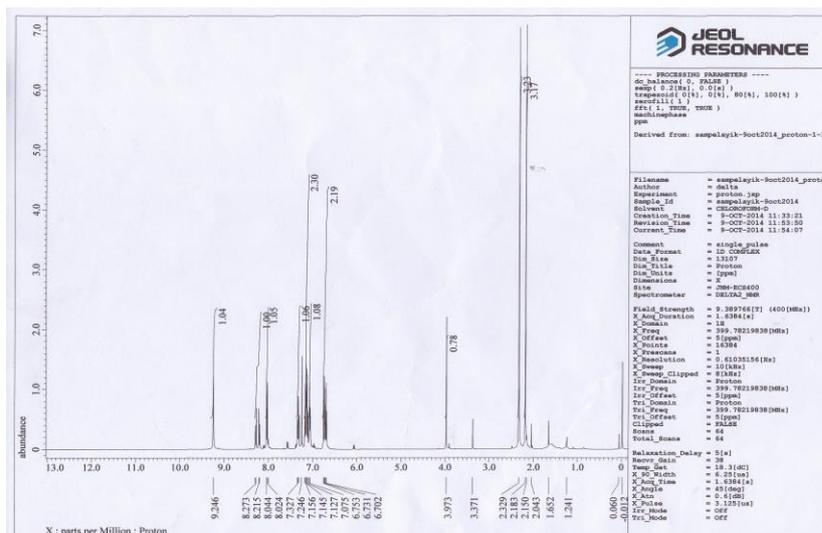
Pada spektrum IR turunan asam mefenamat (4-NO₂-benzoil-asam mefenamat) sesuai hasil penelitian terdapat puncak pada daerah bilangan gelombang 1718 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus karbonil karboksilat (COOH) dan OH karboksilat di 3078-3112 cm⁻¹. Selain itu pada spektrum muncul pita absorpsi pada menunjukkan amin tersier *stretching* pada bilangan gelombang 3330 cm⁻¹ dan adanya ikatan rangkap C=C aromatis ditunjukkan adanya pita serapan di daerah sekitar 2923 cm⁻¹ dan 1442 cm⁻¹. Spektrum IR untuk ikatan aromatis o-substitusi ada pada bilangan gelombang 858 cm⁻¹ dan juga ikatan karbonil amida (N-C=O) pada bilangan gelombang 1679 cm⁻¹. Spektrum pada bilangan gelombang 877 cm⁻¹ menunjukkan ikatan para pada benzen dan nitro ditunjukkan dengan bilangan gelombang 1347 cm⁻¹ (Pavia, *et al.*, 2001). Spektrum FTIR dan H NMR 4-NO₂-asam mefenamat dapat dilihat pada gambar 11 dan 12.



Gambar 11. Spektra FTIR senyawa hasil sintesis (4-nitrobenzoil asam mefenamat)

Tabel 5. Karakteristik Spektrum FTIR hasil sintesis (4-nitrobenzoil asam mefenamat)

Tipe Vibrasi	Frekuensi (cm ⁻¹) dari Literatur	Frekuensi (cm ⁻¹) dari percobaan
N tersier	3500-3100	3330
O-H karboksilat	3400-2400	3078-3112
C=C aromatis	1600-1475	1442
Para-substitusi benzen (Cl)	850-800	877
orto-substitusi benzen (Cl)	800-700	858
C=O Amida	1680-1630	1679
C=O karboksilat	1725-1700	1718



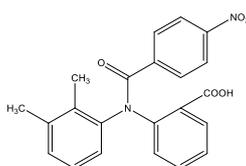
Gambar 12. Spektra H-NMR senyawa hasil sintesis(4-nitrobenzoil asam mefenamat)

Tabel 6. Karakteristik Spektrum proton NMR 4-NO₂-benzoil-asam mefenamat

Pergeseran kimia (ppm)	Perbandingan integrasi	Multiplisitas	Proton dari gugus
9.2	1	singlet	H aromatis
8.2	1	doublet	H aromatis
8.0	1	doublet	H aromatis
7.3	1	Multiplet	H aromatis
7.2	2.3	Multiplet	H aromatis
6.7	2	Multiplet	H aromatis
4	1	Singlet	CH
2.3	3.23	Singlet	CH ₃
2.1	3.1	Singlet	CH ₃
Total			16

Dengan demikian dapat disimpulkan senyawa adalah 4-NO₂-asam mefenamat dengan

struktur molekul sebagai berikut :



Gambar 13 Struktur 4-NO₂-benzoil-asam mefenamat

1.2.3. Titik Lebur/Jarak Lebur

Tabel 7. Hasil uji jarak lebur senyawa hasil sintesis (4-nitrobenzoil asam mefenamat) (3

kali replikasi)

No	Jarak lebur (°C)
1.	198-199 °C
2.	198-199 °C
3.	198-199 °C
Rata-rata	198-199 °C

1.2.4. Hasil uji aktivitas senyawa hasil sintesis (4-nitrobenzoil asam mefenamat)

Tabel 8. Hasil uji aktivitas senyawa hasil sintesis (4-nitrobenzoil asam mefenamat) dibandingkan asam mefenamat (bahan awal)

Waktu pengamatan (menit)	Waktu respon mencit										
	Kontrol	Dosis 4-nitrobenzoil asam mefenamat (mg/kgBB)					Dosis asam mefenamat (mg/kgBB)				
	CMC Na	25	50	100	250	500	25	50	100	250	500
	0	9.1	7.9	7.1	3.8	4.8	4.8	7.7	5.7	5.3	7.1
30	6.7	3.9	4.6	4.6	5.7	7.1	7.9	4.9	6.1	5.7	4.6
60	8.3	4.6	4.7	4.6	6.7	6.4	11.3	5.7	7.7	5.4	8.5
90	8.2	6.2	6.8	8.2	10.3	8.5	11.5	5.0	5.6	9.1	9.0
120	7.3	5.5	4.6	6.0	10.9	6.8	9.3	4.3	8.2	9.0	7.4
150	6.0	4.4	5.3	3.1	10.4	5.8	9.7	3.2	3.8	6.5	5.2
Total	45.5	32.5	33.1	32.3	48.7	39.4	57.4	28.8	36.8	42.7	39.4

Pembahasan

Pengembangan obat dengan memodifikasi struktur obat yang sudah ada memiliki keuntungan dimana lebih efisien dalam hal skrining obat-obat baru. Tingkat nyeri yang semakin beragam memberikan peluang penelitian dalam bidang pengembangan obat-obat nyeri/analgesik yang sangat luas. Modifikasi obat, khususnya NSAID, sudah pernah dilakukan namun belum sebanyak obat-obat golongan lain.

Asam mefenamat merupakan salah satu obat analgesik yang sudah banyak digunakan dipasaran. Obat ini selektif menghambat enzim siklooksigenase (COX) 1 & 2. Kami mencoba melakukan penelitian dengan memodifikasi struktur asam mefenamat untuk mendapatkan aktivitas yang lebih besar melalui pendekatan molekuler dan didapatkan turunan 4-nitrobenzoil-asam mefenamat untuk selanjutnya disintesis dan diuji aktivitas analgesiknya dengan metode *hot plate*. Sehingga diharapkan kedepan pengembangan obat khususnya NSAID akan lebih berkembang seiring terus meningkatnya prevalensi nyeri.

Modifikasi dilakukan dengan melakukan sintesis turunan asam mefenamat yaitu 4-nitrobenzoil asam mefenamat sesuai uji *in silico*, yaitu dengan mereaksikan asam mefenamat dengan 4-nitrobenzoil klorida (gambar struktur senyawa turunan asam mefenamat pada Gambar 5). Dari sintesis yang dilakukan didapatkan rendemen sebanyak 4 gram. Selanjutnya dilakukan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni, hasil kromatografi kolom yang di analisis menggunakan KLT-Densitometri (Gambar 5) didapatkan fraksi 22-26 dari 33 fraksi yang memiliki

kemurnian tinggi (1 noda) dan didapatkan rendemen murni 0,026 gram. Selanjutnya fraksi 22-26 tersebut dianalisis kebenaran senyawa yang disintesis melalui identifikasi struktur menggunakan FTIR dan H-NMR, serta ditentukan titik leburnya sebelum di uji aktivitasnya untuk meyakinkan bahwa senyawa yang disintesis merupakan senyawa yang diinginkan (4-nitrobenzoil asam mefenamat).

Identifikasi struktur senyawa dilakukan dengan menggunakan FTIR dapat menunjukkan gugus fungsi dalam suatu senyawa karena setiap gugus fungsi menunjukkan bilangan gelombang yang spesifik. Identifikasi gugus fungsi menggunakan alat *Perkin Elmer- Spectrum One FT-IR Spectrometer* yaitu FTIR KBr yang menghasilkan spektrum senyawa produk sintesis. Pada spektrum IR turunan asam mefenamat (4-NO₂-benzoil-asam mefenamat) sesuai hasil penelitian terdapat puncak pada daerah bilangan gelombang 1718 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus karbonil karboksilat (COOH) dan OH karboksilat di 3078-3112 cm⁻¹. Selain itu pada spektrum muncul pita absorpsi pada menunjukkan amin tersier *stretching* pada bilangan gelombang 3330 cm⁻¹ dan adanya ikatan rangkap C=C aromatis ditunjukkan adanya pita serapan di daerah sekitar 2923 cm⁻¹ dan 1442 cm⁻¹. Spektrum IR untuk ikatan aromatis o-substitusi ada pada bilangan gelombang 858 cm⁻¹ dan juga ikatan karbonil amida (N-C=O) pada bilangan gelombang 1679 cm⁻¹. Spektrum pada bilangan gelombang 877 cm⁻¹ menunjukkan ikatan para pada benzen dan nitro ditunjukkan dengan bilangan gelombang 1347 cm⁻¹ (Pavia, *et al.*, 2001)

Identifikasi struktur yang pertama dilakukan ialah dengan ¹H-NMR 400 MHz. Hal ini dikarenakan senyawa produk yang dihasilkan sangat sedikit sehingga dilakukan identifikasi dengan ¹H-NMR terlebih dahulu yang tidak merusak sampel selanjutnya senyawa dapat diperoleh kembali dengan penguapan pelarut untuk dapat dianalisis secara FTIR. Identifikasi struktur menggunakan pelarut Kloroform-d₁ dengan standar internal TMS (tetrametilsilina). Senyawa 4-NO₂-benzoil-asam mefenamat memiliki atom hidrogen sebanyak 18 buah. Berdasarkan hasil ¹H-NMR percobaan, didapatkan atom hidrogen sebanyak 17 buah, 1 atom hidrogen tidak muncul yaitu pada gugus COOH karena bersifat lemah (Pavia *et al.*, 2001). Perbandingan integrasi yang terlihat berdasarkan hasil percobaan ada pada Tabel 6. Perbandingan tersebut menunjukkan jumlah atom hidrogen dalam senyawa yang diuji yang berjumlah 17 (Pavia *et al.*, 2001).

Dari hasil analisis menggunakan FTIR dan H-NMR dapat dipastikan senyawa yang disintesis merupakan senyawa yang diinginkan, karena spektra FITR yang dihasilkan memiliki kesesuaian dengan literatur (Gambar 8 dan 11) sedangkan untuk spektra H-NMR juga sesuai dengan yang diharapkan (Gambar 9 dan 12). Untuk jarak lebur senyawa yaitu 198-199 °C (Tabel 4.8), dimana syarat jarak lebur senyawa murni adalah $\leq 2^{\circ}\text{C}$ (Jayaselli *et al.*, 200).

Senyawa yang disintesis lalu diuji aktivitas analgesiknya dibandingkan dengan bahan awal (asam mefenamat). Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, senyawa hasil sintesis (4-NO₂-benzoil-asam mefenamat) memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan bahan awal/asam mefenamat pada semua dosis dengan aktivitas yang pada semua dosis hampir sama dibandingkan asam mefenamat. Peningkatan aktivitas yang lebih besar tersebut kemungkinan karena perubahan/modifikasi struktur turunan asam mefenamat menjadi 4-Nitrobenzoil asam mefenamat yang memiliki lipofilitas, elektronegatif, dan sifat sterik yang lebih besar, karena ketiga parameter tersebut merupakan salah satu parameter-parameter yang mempengaruhi aktivitas biologis suatu obat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa senyawa 4-nitrobenzoil asam mefenamat dapat disintesis dengan mereaksikan asam mefenamat dengan 4-nitrobenzoil klorida, dapat dibuktikan dengan identifikasi struktur yang telah dilakukan. Senyawa turunan asam mefenamat (4-nitrobenzoil asam mefenamat) memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan dengan bahan awal (asam mefenamat).Sebaiknya perlu dilakukan optimasi sintesis yang lebih baik, agar mendapatkan rendemen yang lebih banyak dan perlu penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas senyawa hasil sintesis sehingga dapat diketahui tingkat keamanan dari senyawa hasil sintesis sebagai senyawa analgesik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Universitas Jember melalui BOPTN Tahun Anggaran 2014 yang telah mendanai Program Penelitian Dosen Pemula ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Al Masirad A, Hosseini R, Jalalizadeh H, Rahimi-Moghaddam Z, Abaeian N, Janafrooz M, Abbaspour M, Ziaee V, Dalvandi A, and Shafiee A. 2006. Synthesis

and Analgesic Activity of 2-Phenoxybenzoic Acid and N-Phenylanthranilic Acid Hydrazides. *Biol. Pharm. Bull.* 29(6), pp 1180—1185

2. Anonim, 2014, http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, diakses tanggal 6 Agustus 2014
3. Cooper, G.M dan Hausman, R.E., 2004. *A Molecular Approach*, Third edition. Washington DC, Massachusetts ASM Press, pp.579-86, 631-66
4. Harstall, C., and Ospina, M., 2003. How Prevalent is Chronic Pain?, *Clinical Updates (IASP)*, 11(2) : 1-4.
5. International Association for the Study of Pain (IASP), 2011. IASP Taxonomy, <http://www.iasp-pain.org> [diakses tanggal 15 Oktober 2011]
6. Jayaselli, Chemala, Rani, dan Serbani. 2008. Derivatization of Enolic OH of Piroxicam: a Comparative Study on Esters and Sulfonates. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (3): 509-515.
7. Kartini, 2007. Hubungan Nyeri dengan Gangguan Aktivitas Interpersonal pada Individu Usia 50 Tahun Keatas di Kabupaten Purworejo. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
8. Kontham N.R, Potawale S. E, Gabhe S. Y, and Mahadik K.R., 2013, HPTLC double development and validation of mefenamic acid and tranexamic acid in combined tablet dosage form, *Der Pharmacia Sinica*, 4(6):16-21
9. Mahdi, M. F., 2008. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of Aminobenzensulfonamides 7 Derivatives of Mefenamic Acid as a Potential Anti-inflammatory Agents, *Iraqi J.Pharm.Sci.*, Vol.17 (1), pp 7-15
10. Koopaeia M. N, Assarzadeha M. J, Almasirada A, Ghasemi-Nirib S. F, Aminic M, Kebriaeezadehb A, Koopaeib N. N, Tabeia M. G. A. 2013. Synthesis and Analgesic Activity of Novel Hydrazide and Hydrazine Derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (4): 721-727
11. Mallen, C., Peat, G., Thomas, E., and Croft, P., 2005. Severely Disabling Chronic Pain in Young Adults : Prevalence from a Population-based Postal Survey in North Staffordshire, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 42(6) : 1-9.
12. Manon B and Sharma P.D. 2009. Design, Synthesis, and Evaluation of Diclofenac-Antioxidant Mutual Prodrugs As Safer NSAIDs. *Indian Journal of Chemistry Vol 48 B*, September 2009, pp. 1279-1287

13. Nadendla, Rama Rao. 2004. Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug and Molecular Docking. India: *General article*, diakses tanggal 29 september 2012
14. Naeem S, Hylands P, and Barlow D,. 2013. Docking Studies of Chlorogenic Acid against Aldose Reductase by using Molegro Virtual Docker Software, *Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 3 (01)*, pp.013-020
15. Pavia, Lampman, Kriz, dan Vyvyan. 2009. *Introduction to Spectroscopy Fourth Edition*. USA: Cengage Learning Inc.
16. Picavet, H.S.J., and Schouten, J.S.A.G., 2003. Musculoskeletal Pain in the Netherlands ; Prevalences, Consequences and Risk Groups, the DMC3-study, *Pain*, 102 : 167-178.
17. Razzak N. A. A. 2011. Design and Synthesis of New Mefenamic Acid Derivatives as Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Al-Nahrain University Vol.14 (4)*, December, pp.38-44
18. Shah K, Shrivastava S.K and Mishra P., 2013. Synthesis, Kinetics And Pharmacological Evaluation Of Mefenamic Acid Mutual Prodrug. *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, Vol. 70 No. 5 pp. 905-911
19. Siswandono, Soekardjo, B, 2000. *Prinsip-Prinsip Rancangan Obat*. Surabaya: Airlangga University Press., pp.1-5
20. Suryaawanshi S. B., Osman H.A and Nazeruddin G.M. 2013. Computer Aided Drug Designing and Development of New Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Considering Mefenamic Acid/Diclofenac As A Lead Compound Followed by Their Synthesis and Evaluation. *Int J Pharm Bio Sci*, July; 4(3), pp 436 – 443
21. Susilowati, S. S dan Handayani, S.N. 2006. Sintesis dan Uji Aktivitas Analgetika-Antiinflamasi Senyawa N-(4t-Butilbenzoi)-P-Aminofenol. *Molekul*. 1 (1): 36-40
22. Tiwari D, Haque S, Misra S, Chandra R. 2011. Synthesis And Pharmacological Screening Of N-Substituted Anthranilic Acid Derivatives. *International Journal of Drug Development & Research*. April-June 2011, 3 (2): 265-271
23. Thomsen R, and Christensen M.H,. 2006. MolDock: A new technique for high-accuracy docking. *J Med Chem*, 49:3315-3321.
24. Velingkar V. S., Desai D. M and Vandana. S. 2011. Synthesis, Characterisation, Computational ADME studies, Pharmacological screening and In-vitro Hydrolysis studies of potential novel mutual prodrugs of N-(2,3-xyllyl anthranilic acid). *Panda*

International Journal of Drug Design and Discovery, Volume 2 Issue 3 July – September, pp 548-558

25. Uludağ M.O, Alis B. C, Ün K. E, Alkan D, Ercan N. U, Özkan G. U. G, Glu E.B., 2011. Stable Ester And Amide Conjugates Of Some Nsaids As Analgesic And Antiinflammatory Compounds With Improved Biological Activity. *Turk J Chem* 35 , pp 427 – 439
26. Xie, W., 2011. Assessment of Pain in Animals *In* Ma, C., and Zhang, J.M. (Eds). *Animal Models of Pain*, New York : Humana Press, p. 23-76.
27. Zhuo, M., Wu, G., and Wu, L.J., 2011. Neuronal and Microglial Mechanism of Neurophatic Pain (Review), *Molecular Brain*, 31(4) : 1-12