

## Uji Aktivitas Analgesik Asam 2-(3-(Klorometil)Benzoiloksi) Benzoat dan Asam 2-(4-(Klorometil) Benzoiloksi)Benzoat pada Tikus Wistar Jantan dengan Metode *Plantar Test*

*Analgesic Activity Test 2- (3- (chloromethyl) Benzoiloksi) Benzoate And 2- (4- (chloromethyl) Benzoiloksi) Benzoate On Male Wistar rats with Plantar Test Method*

Wahyu Dewi Tamayanti<sup>\*)</sup>, Ratna Megawati Widharna, Catherine Caroline, Bambang Soekarjo  
Jurusan Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya

<sup>\*)</sup>Email: dewffua@gmail.com

### ABSTRACT

The new compounds of salicylic acid derivatives, 2- (3- (chloromethyl) benzoiloksi) benzoic acid and 2-(4-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoate was synthesized to produce a greater analgesic activity and lower stomach irritation from salicylic acid. 2-(4-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoic acid and 2-(3-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoate was synthesized by Schotten-Baumann acylation reaction. In this study, the analgesic test activity with plantar test method. The compound was given to test animals in doses of 12.5; 25; 50; 100; and 200 mg.kg<sup>-1</sup>. Analgesic activity was determined by the response time of mice to pain infra-red heat. The percentage is calculated by the mean pain barrier time response to pain. The results showed percentation of pain barrier: 74.28%; 105.58%; 110.58%; 115.29%; and 175.87% after administration of the compound 2-(4-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoate at doses of 12.5; 25; 50; 100; and 200 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. The results of calculations percent pain barrier 2-(3-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoate, obtained 85.30%; 92.48%; 124.96%; 180.36%; and 208.01% consecutive for the doses compound of 12.5; 25; 50; 100; and 200 mg.kg<sup>-1</sup>. Five doses of acetyl salicylic acid ranging from 12.5 mg. kg<sup>-1</sup> to 200 mg.kg<sup>-1</sup> resulted in percent pain barrier as follows: 26%; 34.34%; 45.68%; 60.38% and 114.12%. This study indicates that 2-(3-(chloromethyl) benzoiloksi) benzoic acid and 2-(4-(chloromethyl)benzoiloksi) benzoate are capable of producing higher analgesic activity than acetyl salicylic acid. Keywords: Aktivitas analgesik, *plantar test*, 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoate, asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate.

**Keywords:** analgesic, benzoate, plantar test method

### PENDAHULUAN

Asam asetil salisilat bekerja sebagai analgesik antipiretik dengan menghambat prostaglandin yang dibentuk dari metabolisme asam arakidonat dengan katalisator enzim siklooksigenase (Furst dan Munster, 2002). Asam asetil salisilat memiliki efek samping, diantaranya terhadap pernafasan dan saluran cerna yang dapat menyebabkan perdarahan lambung berat (Gunawan, 2009). Alternatif untuk meningkatkan aktivitas analgesik-antipiretik asam asetil salisilat serta menurunkan efek samping terus diupayakan. Modifikasi struktur dari senyawa turunan asam salisilat dilakukan dengan mengubah gugus karboksil melalui pembentukan garam, ester, atau amida; modifikasi pada gugus karboksil dan hidroksil; substitusi pada gugus hidroksil; memasukkan gugus hidroksil atau gugus yang

lain pada cincin aromatik atau dengan mengubah gugus fungsional (Purwanto & Susilowati, 2000).

Pratiwi (2009) telah melakukan modifikasi struktur dengan penambahan gugus 3-klorometil benzoil klorida, menghasilkan senyawa asam 3-klorometil benzoil salisilat atau disebut juga asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat yang aktivitas analgesiknya telah diujikan pada mencit. Hasil uji aktivitas analgesik asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat menunjukkan harga *Effective Dose*<sub>50</sub> (ED)<sub>50</sub> sebesar 14,05 mg/kgBB dimana hasil tersebut lebih kecil dibandingkan dengan ED<sub>50</sub> dari asam asetil salisilat yaitu sebesar 20,83 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat lebih aktif dan potensial sebagai analgesik dibandingkan asam asetil salisilat.

Modifikasi lain dilakukan pada asam salisilat dengan mereaksikan dengan asam 4-klorometil benzoil klorida melalui reaksi asilasi Schotten-Baumann menghasilkan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate. Penelitian mengenai karakter senyawa tersebut telah dilakukan, antara lain: asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat memiliki log P sebesar 3,73, lebih tinggi dari log P asam asetil salisilat yaitu 1,2. Hal ini mengindikasikan bahwa asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat mempunyai sifat lipofilik lebih besar dibandingkan asam asetil salisilat (Martak dkk,2009).Raniya dkk (2009) melakukan uji aktivitas analgesik asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat terhadap mencit dan menunjukkan bahwa nilai ED<sub>50</sub> asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat sebesar 11,31 mg/kg BB.

Natalia *et al.*, 2013 memodelkan beberapa turunan senyawa asam asetilsalisilat yang berinteraksi dengan reseptor siklooksigenase-2 menggunakan program *Glide* (lisensi *Schrodinger*). Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan nilai *Glide Score* (*GScore*) senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat sebesar -9,48 dan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat sebesar -7,39. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan dengan senyawa analgesik paten lain yang sudah beredar seperti asam asetilsalisilat (*GScore* -5,88) dan celecoxib (*GScore* -9,47). Nilai *GScore* merupakan sistem penilaian empiris yang mendekati energi bebas pengikatan ligan dan digunakan untuk menentukan peringkat pose ligan yang berbeda. Semakin kecil nilai *GScore* maka semakin stabil ikatan obat dan reseptor yang terbentuk (Natalia dkk, 2013). Stabilitasnya obat dengan reseptor tersebut akan menghasilkan efek farmakologi yang lebih baik.

Tingkat keamanan asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi) benzoatedan 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate diteliti dengan dilakukannya uji toksisitas akut untuk mengetahui efek samping penggunaan senyawa asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat pada mencit. Dari uji toksisitas akut, kedua senyawa menunjukkan nilai *Lethal Dose*<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>) sebesar 2000 mg/kg BB. Penelitian mengenai aktivitas analgesik kedua senyawa sintesis masih terus dilakukan sebagai upaya untuk melengkapi data aktivitas dan keamanannya. Pada penelitian ini dilakukan

penelitian uji aktivitas analgesik pada tikus Wistar jantan untuk membuktikan reproduibilitas aktivitas senyawa pada rodensia.

## METODE

### Hewan Coba

Pada penelitian ini tikus Wistar jantan sehat dan belum pernah digunakan untuk percobaan lain, tidak ada kelainan pada bagian tubuh, dengan usia 2 - 3 bulan, bobot 150 - 250 g. Sebelumnya tikus diaklimatisasi selama tujuh hari. Sebelum digunakan untuk penelitian hewan coba dipuasakan 18 jam tetapi tetap diberi minum.

### Sintesis Senyawa Turunan Asam Salisilat

Asam salisilat dilarutkan pada aseton dan ditambahkan piridin. Senyawa 3-klorometil benzoil klorida dilarutkan dalam aseton. Larutan asam salisilat dicampurkan larutan 3-klorometil benzoil klorida tetes demi tetes lalu direfluks pada ±56°C. Dilakukan uji KLT asam salisilat dan 3-klorometil benzoil klorida sebagai pembanding tiap 1 jam sampai noda senyawa tersebut hilang. Campuran didinginkan dan air suling ditambahkan perlahan-lahan sampai terbentuk endapan. Asam salisilat dilarutkan dalam aseton dan ditambah piridin.

Senyawa 4-klorometilbenzoil klorida dilarutkan ke dalam aseton dan direfluks selama ±4 jam pada 60°C. Setelah refluks, cairan dituang ke gelas beker lalu ditambah akuades hingga terbentuk endapan. Endapan disaring dan direkristalisasi dengan alkohol 60% kemudian dikeringkan.

### Karakterisasi Senyawa Turunan

Senyawa turunan diuji kualitatif organoleptis (bentuk, bau, dan warna), uji kemurnian struktur (uji titik leleh dan uji KLT), dan uji identifikasi struktur dengan spektrofotometer inframerah. Pada pemeriksaan titik leleh dilakukan dengan tiga kali replikasi dengan menggunakan *Electrothermal Melting Point Apparatus*. Pada pemeriksaan kromatografi lapis tipis dilakukan dengan menggunakan tiga macam fase gerak dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu etil asetat : etanol (1:2), aseton : etanol (8:2) dan n-heksan : etanol (2:8).

### Uji Aktivitas Analgesik Senyawa Turunan

Aktivitas analgesik diuji dengan metode *plantar test*, dengan menggunakan alat *basile plantar test* yang dapat menghantarkan panas pada kisaran 55-56°C. Uji aktivitas analgesik dilakukan secara oral pada dosis 12,5; 25; 50;100; 200mg/kgBB. Aktivitas analgesik ditentukan dengan cara mengamati waktu respon yang ditunjukkan oleh tikus berupa mengangkat atau menjilat kaki terhadap adanya stimulus panas yang diberikan sebagai penyebab nyeri(Mishra dkk, 2011). Stimulus panas diberikan pada interval waktu setiap 10 menit selama 1 jam

dengan menggunakan radiasi inframerah sebagai sumber panas. Waktu dicatat sebelum dan sesudah pemberian analgesik (Vogel, 2008). Hasil kumulatif dari waktu respon tikus terhadap panas tersebut kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol dan selanjutnya dianalisis dengan *one way ANOVA*. Rerata waktu bertahan terhadap nyeri dicatat dan dihitung persentase hambatan nyeri, menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ hambatan nyeri} = \frac{f_K - f_T}{f_K} \times 100 \%$$

keterangan:

$f_T$  = waktu rata-rata kemampuan untuk menahan nyeri pada kelompok uji atau kelompok pembanding

$f_K$  = waktu rata-rata kemampuan untuk menahan nyeri pada kelompok kontrol

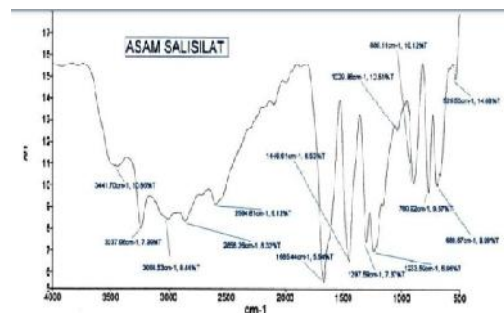
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1a. Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Hasil Sintesis dan Harga *Rf* asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoate

Fase Gerak	Harga <i>Rf</i>		
	Asam Salisilat	3-klorometil benzoil klorida	Asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat
Etilasetat : etanol (1:1, v/v)	0,74	0,79	0,82
n-heksana : Etanol (2:8, v/v)	0,70	0,78	0,88
Aseton : Etanol (8:2, v/v)	0,71	0,76	0,78

Tabel 1b. Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Hasil Sintesis dan Harga *Rf* Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate

Fase Gerak	Harga <i>Rf</i>		
	Asam Salisilat	4-klorometil benzoil klorida	Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat
n-heksana : Etanol (1:2)	0,45	0,56	0,75
Aseton : Etanol (9:1)	0,56	0,70	0,92
Etilasetat : Etanol (1:5)	0,65	0,68	0,90

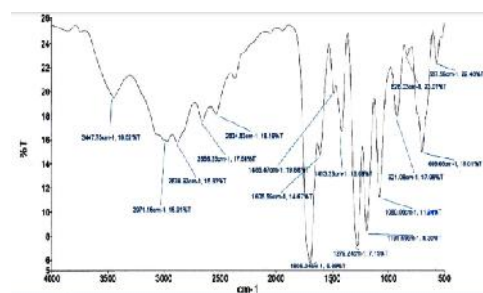


Gambar 1 Spektrum inframerah asam salisilat

Tabel 2a. Karakteristik spektrum inframerah asam salisilat

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	
	Asam Salisilat	Pustaka*
O-H alkohol	3441,70	3400-3650
O-H Fenol	3237,96	3200-3550
C=O asam	1665,44	1600-1850
C=C aromatis	1446,61	1300-1600
C-O asam	1297,59	1100-1300

\* (Robert and David, 2005; Mcmurry and Simanek, 2007)

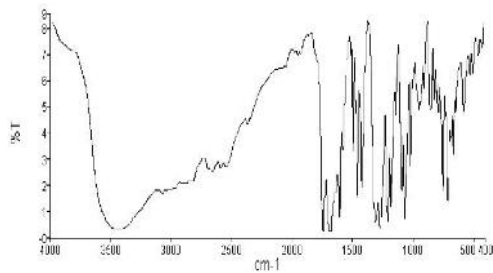


Gambar 2. Spektrum inframerah senyawa asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat

Tabel 2b. Karakteristik spektrum inframerah senyawa asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi) benzoate

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )		
	2-(3-(klorometil) benzoiloksi)	Hasil Sintesis terdahulu	Pustaka*
O-H alkohol	3447,75	3444,2	3400-3650
C=O ester	1695,94	1694,7	1680-1760
C=C aromatis	1486,47-1605,59	1488,2-1605,6	1475-1600
C-O ester	1279,24	1280,3	1210-1320

\* (Robert and David, 2005; McMurphy and Simanek, 2007)



Gambar 3. Spektrum Inframerah (IR) dari asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate

Tabel 2c. Karakteristik Spektrum Inframerah Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate

Ikatan Kimia	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	
	2-(4-(klorometil) benzoiloksi)	Pustaka (Fessenden, 1997)
O-H	3444,13	3100-3650
C=O ester	1739,39	1730-1750
C=O asam	1679	1650-1800
C=C aromatis	1488	1475-1600
C=O ester	1018	1000-1300

Tabel 3a. Hasil Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri pada Kelompok Asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat

Dosis Mg/kgBB	Rata-rata waktu respon nyeri		% Hambatan nyeri	
	Asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi)-benzoat	Asam asetilsalisilat	Asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi)-benzoat	Asam asetilsalisilat
12,5	44,62	30,34	85,30	26,00
25	46,35	32,35	92,48	34,34
50	54,17	35,08	124,96	45,68
100	67,51	38,62	180,36	60,38
200	74,17	51,56	208,01	114,12
Kontrol negatif		24,08		

Tabel 3b. Hasil Perhitungan Persentase Hambatan Nyeri pada Kelompok Asam 2-(4-(Klorometil) Benzoiloksi) Benzoat

Dosis Mg/kgBB	Rata-rata waktu respon nyeri		% Hambatan nyeri	
	Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)-benzoat	Asam asetilsalisilat	Asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi)-benzoat	Asam asetilsalisilat
12,5	41,9625	30,34	74,28	26,00
25	49,5	32,35	105,58	34,34
50	50,65	35,075	110,36	45,66
100	51,8375	38,62	115,29	60,39
200	66,425	51,56	175,87	114,13
Kontrol negatif	24,08		0	

Pada uji kromatografi lapis tipis diperoleh harga  $R_f$  asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat dan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat berbeda dengan harga  $R_f$  asam salisilat, 3-klorometilbenzoil klorida, dan 4-klorometilbenzoil klorida. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua senyawa turunan tidak mengalami peruraian selama proses penyimpanan (Tabel 1a dan 1b).

Spektrum inframerah senyawa asam salisilat ditunjukkan pada gambar 1 menggambarkan karakteristik spektrum asam salisilat pada Tabel 2a. Spektrum inframerah dari senyawa asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat pada Gambar 2, karakteristik spektrum inframerah pada tabel 2b, dan spektrum inframerah serta karakteristik asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoate pada gambar 3 dan tabel 2c. Hasil identifikasi struktur pada beberapa daerah bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) menunjukkan adanya perbedaan karakteristik dari gugus-gugus fungsi asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi) benzoat dan asam salisilat. Pada asam 2-(3-(klorometil)benzoiloksi)benzoat terlihat gugus O-H fenolat pada panjang gelombang sekitar  $3200 \text{ cm}^{-1}$  telah hilang jika dibandingkan dengan asam salisilat. Hal ini dapat diperkuat dengan adanya gugus C=O ester pada panjang gelombang  $1695.94 \text{ cm}^{-1}$ . Pada spektrum asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat tidak terlihat spektrum OH fenolat pada panjang gelombang sekitar  $3200 \text{ cm}^{-1}$ . Hal ini diperkuat dengan adanya gugus C=O ester pada panjang gelombang  $1297,59 \text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan pada senyawa asam salisilat terdapat spektrum gugus C=O asam, berdasarkan hal tersebut dapat diduga bahwa senyawa baru yang dihasilkan adalah suatu ester yang masih mempunyai gugus asam dan telah berbeda dengan senyawa asalnya.

Pada Tabel 3a dan 3b tersaji hasil uji aktivitas analgesik yang menampilkan rerata waktu respon nyeri kedua senyawa dan persentase hambatan nyeri yang dihasilkan. Kedua senyawa menunjukkan aktivitas analgesik yang lebih baik dari asam asetilsalisilat. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan pada mencit (Pratiwi, 2009). Tingginya aktivitas analgesik dibanding asam asetilsalisilat diduga karena sifat lipofil pada kedua senyawa turunan lebih tinggi, sehingga penembusan membran semakin optimal, dan berujung pada pertemuan peningkatan jumlah senyawa dengan reseptornya.

## KESIMPULAN

Penelitian ini melaporkan bahwa asam 2-(3-(klorometil) benzoiloksi) benzoat dan asam 2-(4-(klorometil) benzoiloksi) benzoat menghasilkan aktivitas analgesik lebih tinggi dibandingkan asam asetil salisilat.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih ditujukan kepada pemerintah Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing. Pula kepada Umi Hanik Sekarwati dan Hanna Yosefa Lolo yang mendukung proses penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Furst, D.E., dan Munster, T. (2000). Obat-obat Antiinflamasi Nonsteroid, Obat-obat Antireumatik Pemodifikasi-penyakit, Analgesik Nonopiod dan Obat-obat Untuk Piri, In : Katzung B.G. (Ed.), Farmakologi Dasar dan Klinik: Basic dan Clinical Pharmacologi, 8th ed. Jakarta: Salemba Medika, pp. 455, 459-461.
- Gunawan, S.G. (2009). Farmakologi dan Terapi, Edisi 5, Jakarta: Bagian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, pp. 231-233, 235.
- Martak R., Soekardjo, B., Surdijat, S., Caroline and Setybudi, I. (2009). Synthesis of 4-Chloromethylbenzoyl Salicylic Acid and Its Analgesic Activity on Mice (*Mus musculus*), Poster Presentation in Bandung International Conference on Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Bandung.
- McMurry, J., and Simanek, E. (2007). Fundamentals of Organic Chemistry 6th ed., Examview and Examview pro are Registered Trademarks of FsCreations, Inc., America, p.413-417.
- Mishra (2011). Analgesic and Inflammatory Activity of Methanol Extract of Scindapsus officinalis Root in Experimental Animals, India: Odisha.
- Natalia, O. (2013). Pemodelan Interaksi Turunan Potensial Asam Benzoil Salisilat dengan Reseptor Enzim Siklooksigenase-2, Skripsi Sarjana Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.
- Pratiwi, D.V. (2009). Sintesis Asam 3-klorometilbenzoil Salisilat dan Uji Aktivitas Analgesik pada Mencit (*Mus musculus*), Skripsi Sarjana Farmasi, Universitas Widya Mandala Surabaya.

- Purwanto dan Susilowati, R. (2000). Hubungan struktur-aktivitas obat analgetika, In: Siswandono dan Soekardjo, B., (Eds.), *Kimia Medisinal 2*, Airlangga University Press, Surabaya, pp. 283, 291-292, 295.
- Robert, M.S., Francis, X.W., and David, J.K. (2005). *Spectrofotometric Identification of Organic Compounds 7th ed.*, John Wiley and Sond, Inc., America, pp. 72-101.
- Vogel, H.G. (2008). *Drugh Discovery and Evaluation Pharmacological Assay*, 3rd ed., Springer-verlag, Berlin, pp. 1010-1014.