



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN SENYAWA 4-(E)-2-{4-
OKSO-3-(4-METILFENIL)-KUIAZOLIN-2-
IL}VINIL}BENZENSULFONAMIDA TERHADAP
SIKLOOKSIGENASE-2**

SKRIPSI

**RIONALDO SARANO
0806398644**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN SENYAWA
4-(E)-2-{4-OKSO-3-(4-METILFENIL)-KUINAZOLIN-2-
IL}VINIL}BENZENSULFONAMIDA TERHADAP
SIKLOOKSIGENASE -2**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**RIONALDO SARANO
0806398644**

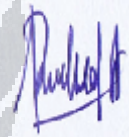
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012




Ronaldo Sarano

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ronaldo Sarano

NPM : 0806398644

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Rionaldo Sarano
NPM : 0806398644
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-{4-Okso-3-(4-Metilfenil)-Kuiazolin-2-il}Vinil]Benzensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2

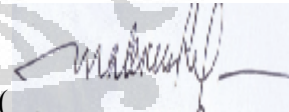
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Drs. Hayun, M.Si.

()

Penguji I : Prof. Dr. Maksun Radji, M. Biomed

()

Penguji II : Dr. Arry Yanuar M.Si.

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah *Subhana wa Ta'ala*, yang atas ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada program studi Sarjana Farmasi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulisan skripsi ini tidaklah mudah. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, maka skripsi ini tidak akan selesai. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

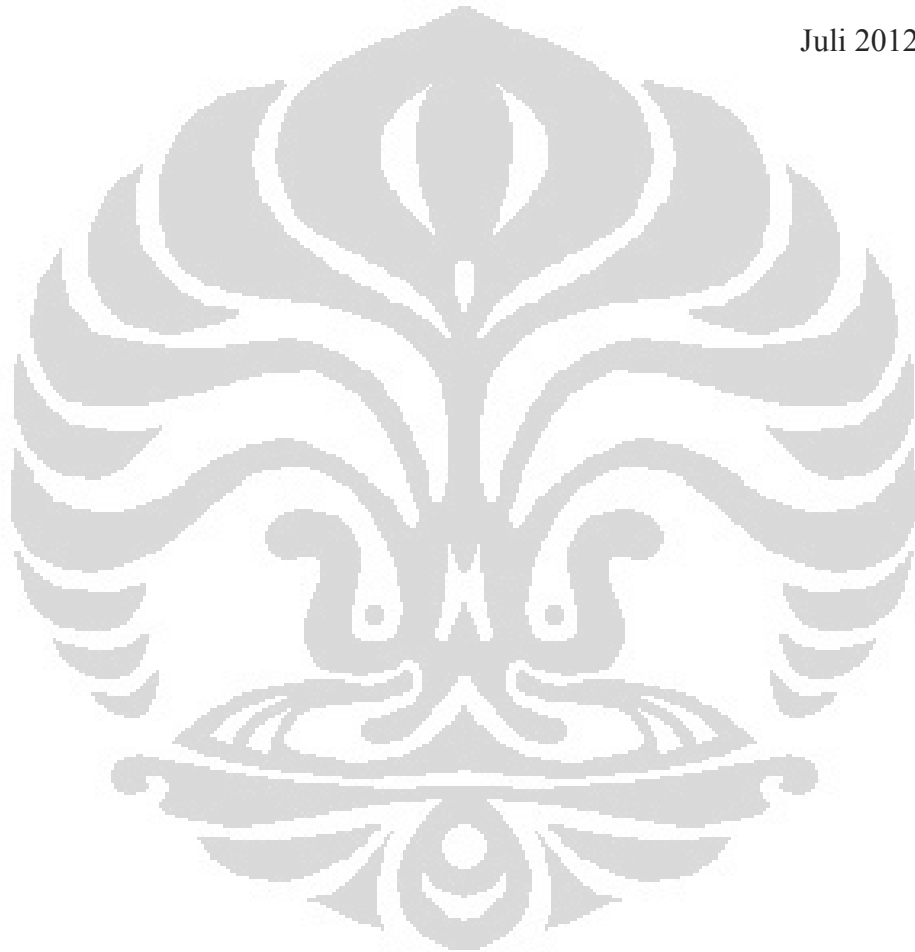
- 1) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi UI;
- 2) Bapak Drs. Hayun, M.Si., Apt selaku dosen pembimbing skripsi dan Kepala Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
- 3) Ibu Dr. Dra. Berna Elya Apt., M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan nasehat dan bimbingan kepada penulis sejak awal belajar di farmasi;
- 4) Bapak Dr. Arry Yanuar yang telah memberikan pinjaman peralatan untuk penelitian ini;
- 5) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di farmasi;
- 6) Kedua orang tua, Papa Yusrianto dan Mama Sri Arni yang selama ini telah memberikan kasih sayangnya;
- 7) Sahabat, Nurul, Citra, dan Wenny atas bantuan dan mau berbagi selama masa penelitian dan saat kuliah;
- 8) Teman-teman penelitian kimia terutama Yogo, Epin, Cyntiani dan Ajid;
- 9) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis sadar tak mampu dapat membalas kebaikan mereka, hanya ucapan terima kasih dan berdoa semoga Allah membalas segala kebaikan mereka dengan sesuatu yang lebih baik lagi. Penulis menyadari bahwa penelitian dan

penyusunan skripsi ini masih belum sempurna. Penulis menerima semua kritik dan saran yang membangun bagi penelitian dan penyusunan skripsi ini. Besar harapan semoga penulisan skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan khususnya untuk ilmu farmasi sehingga dapat bermanfaat untuk masyarakat luas.

Penulis

Juli 2012



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rionaldo Sarano
NPM : 0806398644
Program Studi : Sarjana
Fakultas : Farmasi
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-{4-Oksa-3-(4-Metilfenil)-Kuinazolin-2-il}Vinil]Benzensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2

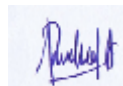
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 9 Juli 2012

Yang menyatakan



(Rionaldo Sarano)

ABSTRAK

Nama : Rionaldo Sarano
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-{4-Okso-3-(4-Metilfenil)-Kuinaolin-2-il} Vinil] Benzensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2

4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinaolin-2-il} vinil]bensensulfonamida merupakan suatu senyawa baru hasil sintesis turunan 4(3H) kuinaolin. Berdasarkan struktur kimianya senyawa ini dapat dimasukkan dalam golongan diarilheterosiklik tersubstitusi gugus sulfonamida. Kebanyakan senyawa golongan tersebut mempunyai aktivitas sebagai inhibisi COX-2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui besarnya potensi aktivitas senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinaolin-2-il} vinil]bensensulfonamida untuk menghambat COX-2. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan kit *enzyme immunoassay* dengan selekoksib dan asetosal sebagai pembanding. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa ini menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap COX-2 dengan IC_{50} 16,94 μ M. Potensi aktivitas penghambatan senyawa ini lebih kecil daripada selekoksib (IC_{50} 0,40 μ M) namun lebih besar daripada asetosal (IC_{50} 24,07 μ M).

Kata Kunci : penghambat, siklooksigenase-2, 4-[(E)-2-{4- okso-3-(4-metilfenil)-kuinaolin-2-il} vinil] bensensulfonamida
xv + 68 halaman : 8 tabel, 20 gambar, 13 lampiran
Daftar Acuan : 34 (1983-2012)

ABSTRACT

Name : Rionaldo Sarano
Program study : Pharmacy
Title : Inhibition Activity Assay of Compound 4-[(E)-2-{4-Oxo-3-(4-Metylphenyl)-Quinazolin-2-yl} Vinyl]Benzensulfonamide of Cyclooxygenase-2

4 - [(E)-2-{4-oxo-3-(4-metylphenyl)-quinazolin-2-yl} vinyl] benzensulfonamide is a new synthetic compound derivative of 4(3H) kuinazolin. Based on the chemical structure of these compounds can be included in the class diarilheterosiklik substituted sulfonamide group. Most of these classes of compounds inhibit COX-2. This study aims to determine the strength of the potential activity of the 4 - [(E) -2 - {4-oxo-3-(4-metylphenyl)-quinazolin-2-yl} vinyl] benzensulfonamide towards inhibition of COX-2. The activity assay was performed using an enzyme immunoassay kit with selekoksib and aspirin as a comparator. The results showed that these compounds owns inhibitory activity towards COX-2 with IC_{50} 16,94 μ M. Potential activity inhibition of this compound is smaller than selekoksib (IC_{50} 0,40 μ M) but was greater than aspirin (IC_{50} 24,07 μ M).

Key Words :inhibition, cyclooxygenase-2, 4-[(E)-2-{4-oxo-3-(4-metylphenyl)-quinazolin-2-yl} vinyl] benzensulfonamida
xv + 68 pages :8 table, 20 picture, 13 appendices
Bibliography :34(1983-2012)

DAFTAR ISI

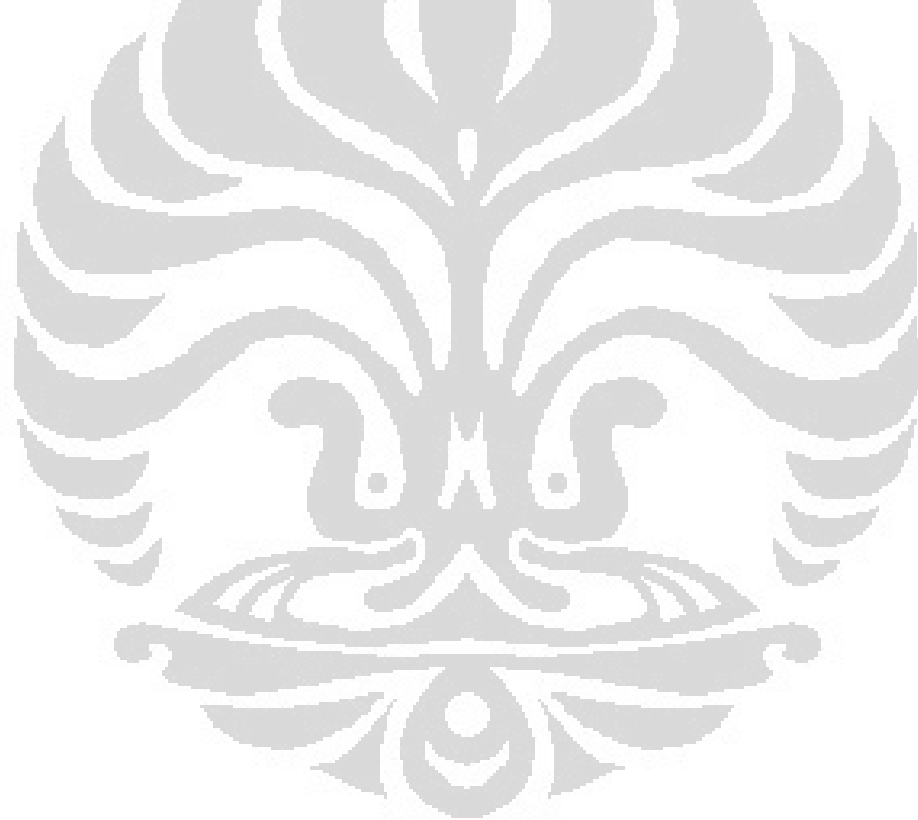
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il} vinil]bensensulfonamida	4
2.2 Asetosal	6
2.3 Selekoksisib	7
2.4 Prostaglandin	8
2.4.1 Sintesis Prostaglandin	8
2.4.2 Peranan prostaglandin	9
2.5 Enzim	10
2.5.1 Faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim.....	11
2.5.2 Enzim Siklooksigenase	12
2.5.3 Penghambatan Aktivitas Enzim	14
2.6 Uji Aktivitas Inhibisi pada Enzim Siklooksigenase.....	15
2.6.1 Menggunakan Enzim Immunoessesi(EIA)	15
2.6.2 Mengukur Intensitas Flouresensi Produk Samping MDA.....	17
2.6.3 Mengukur Perubahan Kromogen TMPD	17
2.6.4 Menggunakan Darah Manusia Keseluruhan.....	18
2.7 Pembacaan <i>Mikroplat</i>	18
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1. Lokasi dan Waktu	20
3.2. Alat	20
3.3. Bahan	20
3.3.1 Penyiapan Bahan	20
3.3.1 Pembuatan Larutan Inhibitor.....	22
3.4. Cara Kerja	23

3.4.1	Pembuatan Kurva Standar Skrining Prostaglandin	23
3.4.2	Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Siklooksigenase-2	24
3.4.3	Pelaksanaan EIA	25
3.5.	Analisis/Perhitungan	28
3.5.1	Penyiapan Data	28
3.5.2	Plot Kurva Standar	28
3.5.3	Penentuan Konsentrasi Sampel	29
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1.	Kurva Standar Skrining Prostaglandin	30
4.2.	Uji Aktivitas Penghambatan Siklooksigenase-2	31
4.3.	Pelaksanaan EIA	33
4.4.	Menentukan Nilai IC ₅₀	35
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
5.1.	Kesimpulan.....	37
5.2.	Saran	37
DAFTAR ACUAN		38



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Karakteristika siklooksigenase-1 dan 2.....	13
Tabel 4.1	Data kurva standar skrining prostaglandin.....	42
Tabel 4.2	Data serapan, konsentrasi prostaglandin, % B/Bo, standar deviasi dan % KV.....	42
Tabel 4.3	Data uji aktivitas penghambatan oleh selekoksib.....	44
Tabel 4.4	Data uji aktivitas penghambatan oleh asetosal.....	44
Tabel 4.5	Data uji aktivitas penghambatan oleh senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4_metilfenil)-kuinazolin-2-il vinil] benzensulfonamida.....	45
Tabel 4.6	Serapan pada sumuran Blanko, NSB, Bo dan TA.....	45
Tabel 4.7	Data IC ₅₀ asetosal dan selekoksib berdasarkan literatur.....	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Kimia Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida.....	4
Gambar 2.2	Asetosal.....	6
Gambar 2.3	Selekoksib.....	7
Gambar 2.4	Biokonversi asam arakidonat menjadi prekursor PGs (PGG ₂ dan PGH ₂).....	8
Gambar 2.5	Skema diagram perubahan asam arakidonat menjadi PGs.....	9
Gambar 2.6	Reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis	16
Gambar 2.7	<i>Microplate</i>	19
Gambar 2.8	Jalur sampel dalam sumuran <i>Microplate</i> dan kuvet.....	19
Gambar 3.1	Skema penyiapan standar prostaglandin.....	23
Gambar 3.2	Format lempeng sumur uji sampel.....	26
Gambar 4.1	Kurva standar skrining prostaglandin.....	46
Gambar 4.2	Pipet mikro.....	47
Gambar 4.3	Histogram perbandingan % inhibisi COX-2 pada konsentrasi 10 μ M.....	47
Gambar 4.4	Hasil pereaksian siklooksigenase.....	48
Gambar 4.5	Reaksi yang terjadi setelah penambahan reagen Ellman's... <i>Mikroplat reader</i>	48 49
Gambar 4.7	Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada selekoksib.....	49
Gambar 4.8	Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada asetosal.....	50
Gambar 4.9	Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada senyawa uji.....	50
Gambar 4.10	Histogram perbandingan IC ₅₀ pada sampel inhibitor.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema isolasi selekoksib dari Celebrex™.....	52
Lampiran 2	Hasil uji kemurnian selekoksib.....	53
Lampiran 3	Perhitungan penimbangan sampel.....	57
Lampiran 4	Pembuatan larutan inhibitor.....	59
Lampiran 5	Bagan pelaksanaan reaksi COX-2.....	60
Lampiran 6	Bagan pengenceran reaksi COX-2	61
Lampiran 7	Cara perhitungan % B/Bo.....	62
Lampiran 8	Cara menentukan persamaan garis kurva standar prostaglandin.....	63
Lampiran 9	Menghitung jumlah prostaglandin berdasarkan persamaan kurva standar.....	64
Lampiran 10	Menghitung koefisien variasi, standar deviasi dan persen inhibisi.....	65
Lampiran 11	Kit <i>enzyme immunoassay</i> (EIA) No katalog 560101.....	66
Lampiran 12	Sertifikat analisis asetosal.....	67
Lampiran 13	Sertifikat kit <i>enzyme immunoassay</i> (EIA).....	68

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obat anti-inflamsi non steroid (AINS) merupakan obat yang paling banyak digunakan masyarakat untuk pengobatan inflamasi, namun penggunaan obat-obat tersebut dapat memberikan efek samping yang berat. Obat AINS klasik (inhibitor siklooksigenase non selektif) mempunyai efek samping yaitu pendarahan lambung dan kerusakan ginjal sedangkan obat AINS golongan inhibitor COX-2 selektif memperlihatkan toksisitas yang rendah terhadap lambung dan ginjal. Oleh sebab itu, setiap obat baru yang dihasilkan farmasis harus memiliki aksi selektif untuk mengurangi efek samping yang tidak diinginkan yang menimbulkan komplikasi dalam tubuh pasien. Pada penanganan beberapa penyakit seperti pencegahan pembentukan thrombus intravaskular oleh platelet pada penyakit kardiovaskular, selektivitas penghambatan terhadap Siklooksigenase (COX-1) yang akan mencegah pembentukan TXA₂ (tromboxan A₂) menjadi penting (Panara, 1999; Scheimer, 2003). Sedang selektivitas penghambatan terhadap COX-2 akan mencegah pembentukan PGE₂ yang merupakan mediator penting pada proses timbulnya rasa nyeri dengan tingkat keamanan yang lebih baik pada gastrointestinal (Smyth dan Fitz, 2007).

COX atau Prostaglandin H sintase (PGHS) berfungsi sebagai katalis pada tahap pertama proses biosintesis prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin. Ada dua bentuk isoform dari enzim siklooksigenase, yaitu COX-1 (PGHS-1; PHS-1, Prostaglandin endoperoksid sinthase-1) dan COX-2 (PGHS- 2, PHS-2, Prostaglandin endoperoksidsinthase-2). COX-1 adalah bentuk enzim utama yang ditemukan dibanyak jaringan dan bertanggung jawab dalam menjaga fungsi normal tubuh termasuk keutuhan mukosa lambung dan pengaturan aliran darah ginjal. Sebaliknya, COX-2 tidak ditemukan di jaringan pada kondisi normal, tetapi diinduksi oleh berbagai stimulus, seperti endotoksin, sitokin, mitogen dan dihubungkan dengan produksi prostaglandin selama proses inflamasi, nyeri, dan respon piretik (Zhang *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2002).

Senyawa-senyawa yang mengandung sistem cincin 4(3H)-kuinazolin dilaporkan mempunyai berbagai macam aktivitas biologis tergantung gugus-

gugus fungsi pada sistem cincin tersebut. Beberapa turunan 4(3H)-kuinazolin telah disintesis dan diuji aktivitasnya dan dilaporkan menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan atau inhibisi enzim COX. Pada senyawa inhibitor COX-2 kelas diarilheterosiklik, gugus SO_2NH_2 atau SO_2Me atau SO_2N_3 pada posisi para dari salah satu cincin arilnya dibutuhkan untuk menghasilkan potensi dan selektivitas optimum (Kurumbail, *et al.*,1996;Uddin, *et al.*,2003). Inhibitor COX-2 selektif ini efektif secara klinik sebagai anti-inflamasi dengan toksisitas gastrointestinal dan renal lebih rendah, namun sekarang ada bukti yang meyakinkan bahwa inhibitor COX-2 selektif dapat menyebabkan peningkatan kejadian akibat trombotik kardiovaskuler seperti infark miokard (Zarghi, Rao, & Knaus, 2007).

4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida merupakan senyawa baru turunan 4(3H)-kuinazolin. Berdasarkan studi in siliko, senyawa hasil sintesis tersebut diperkirakan berpotensi sebagai inhibisi COX-2 (Hayun, Yanuar, Hanafi dan Hudiono, 2011).

4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida merupakan senyawa hasil reaksi yang dilakukan dengan mengkondensasi senyawa 2-metil-3-(4-metilfenil) 4(3H)-kuinazolin dengan senyawa 4-formilbenzensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial dan katalis natrium asetat anhidrat tanpa penambahan *dehydrating agent* anhidrida asetat atau anhidrida yang lain yang dapat mensubstitusi gugus NH_2 sulfonamida (Hayun dan Hudiono, 2011).

Beberapa cara untuk melakukan uji aktivitas penghambatan senyawa uji terhadap enzim siklooksigenase, antara lain menggunakan *Enzyme Immunoassay* (EIA), malondialdehid (MDA), darah manusia keseluruhan (Whole Human Blood Assay), dan N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD). Dari beberapa cara uji aktivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase tersebut, peneliti menggunakan *Enzyme Immunoassay* karena pengukurannya yang lebih sederhana, sensitif dan selektivitasnya terhadap siklooksigenase-1 dan siklooksigenase-2 (Fernandez de Arriba *et al.*, 1999; Hassanein, Khalifa, El-Samaloty, El-Rahim, Tha, & Ismail, 2008; COX Ovine,2010).

Enzyme Immunoassay (EIA) adalah immunoassay yang paling sensitif yang dipakai untuk perhitungan secara kuantitatif dengan konsentrasi sangat

rendah. Prinsip dari EIA adalah reaksi antigen-antibodi yang dapat dideteksi dengan penambahan konjugat dilabel enzim aktif yang bereaksi dengan substrat menghasilkan warna spesifik yang dapat dibaca dengan *mikroplat reader* pada panjang gelombang 415 nm (COX ovine, 2010).

Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian terhadap uji aktivitas penghambatan senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida terhadap enzim COX-2 dengan menggunakan kit *enzyme immunoassay* nomor katalog 560101 dari Cayman Chemical Company.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan:

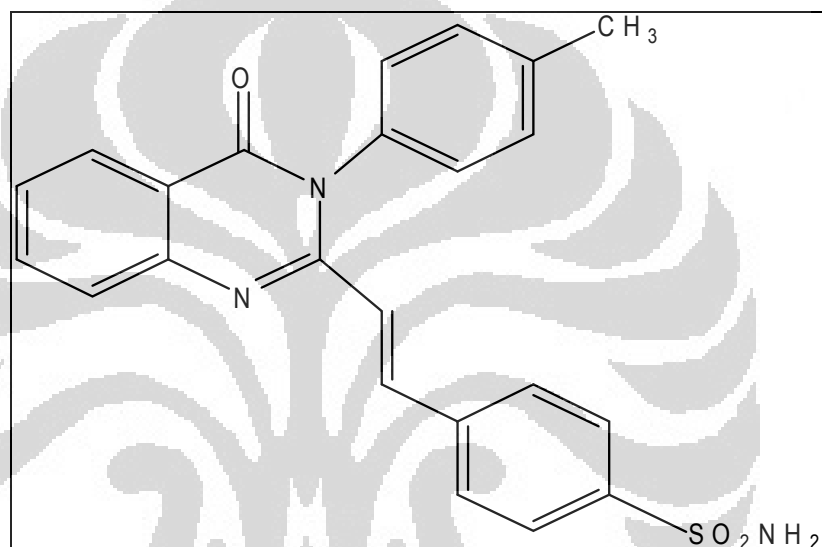
- a. Memperoleh potensi aktivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 dari senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida
- b. Memperoleh nilai IC_{50} Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida

BAB 2

TINJUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida (Hudiyono dan Hayun, 2011)

Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida pada Gambar 2.1 merupakan suatu senyawa turunan 4(3H)-kuinazolin yang merupakan suatu senyawa baru hasil sintesis.



[Sumber : Hudiono dan Hayun, 2011]

Gambar 2.1. Struktur kimia 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida

Rumus molekul	: $C_{23}H_{19}N_3SO_3$
Berat molekul	: 417,48
Organoleptis	: serbuk kuning pucat,tidak berbau
Kelarutan	: mudah larut dalam Dimetilsulfoksida, larut dalam Tetrahidrofuran, sukar larut dalam asetonitril, sangat sukar larut dalam asetonitril, sangat sukar larut dalam etanol, praktis tidak larut dalam air dan eter
Titik lebur	: 244-245°C

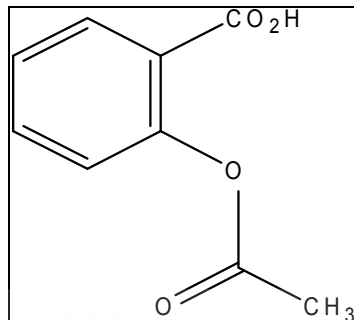
Sintesis senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida dilakukan melalui empat tahap. Tahap-tahap sintesis dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Sintesis 2-metil-3,1-benzoksazin-4-on dari asam antranilat
- b. Sintesis 2-metil-3-(4-metilfenil)-4(3H)-kuinazolin dari senyawa 2-metil-3,1-benzoksazin dan anilin/analognya
- c. Sintesis 4-formilbenzensulfonamida dari 4-sianobenzenesulfonamida
- d. Sintesis 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida dari senyawa 2-metil-3-(4-metilfenil)-4(3H)-kuinazolin dan senyawa 4-formilbenzensulfonamida

Sintesis 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida dengan mengkondensasi senyawa 2-metil-3-(4-metilfenil)-4(3H)-kuinazolin dengan senyawa 4-formilbenzensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial dan katalis natrium asetat anhidrat tanpa penambahan *dehydrating agent* anhidrida asetat atau anhidrida yang lain yang dapat mensubstitusi gugus NH₂ sulfonamida. Struktur senyawa telah dikonfirmasi menggunakan data spektra FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan spektrometri massa.

Pada sejumlah senyawa diaril 4(3H)-kuinazolon tersubstitusi gugus SO₂NH₂ pada salah satu cincin arilnya dilakukan skrining virtual untuk memprediksi aktivitas senyawa tersebut. Beberapa senyawa diaril-4(3H)-kuinazolon tersubstitusi gugus SO₂NH₂ pada salah satu cincin arilnya diprediksi akan mempunyai aktivitas inhibitor COX-2 yang baik. Sebelumnya senyawa asal yaitu 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)vinil]benzenesulfonamida telah diuji aktivitasnya secara *in silico* menggunakan perangkat lunak (*software*) PLANTS (*Protein-Ligand ANT System*) berdasarkan metode penambahan molekul. Hasil skrining menunjukkan senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif terhadap enzim COX-2.

2.2 Asetosal (Farmakope Indonesia, 1979)



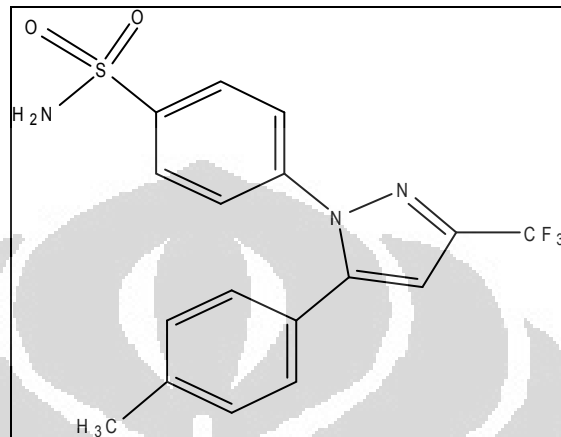
Gambar 2.2. Rumus struktur Asetosal

Rumus molekul	: $C_9H_8O_4$
Berat molekul	: 180,16
Pemerian	: Hablur putih, umumnya seperti jarum atau serbuk hablur putih; tidak berbau atau berbau lemah. Stabil di udara kering; di udara lembab secara bertahap terhidrolisis menjadi asam salisilat dan asetat.
Kelarutan	: Sukar larut dalam air; mudah larut dalam etanol; larut dalam kloroform dan dalam eter.
Suhu lebur	: 141-144°C

Pada tahun 1899 asam asetil salisilat sebagai obat anti radang bukan steroid sintetik dengan kerja antiradang yang kuat untuk pertama kalinya digunakan dalam pengobatan simptomatis penyakit-penyakit rematik (Dannhardt dan Laufer, 2000). Di samping sebagai obat antiradang, asam asetil salisilat memiliki peranan lain dalam terapi obat yang tidak kalah pentingnya, yaitu sebagai zat penghambat agregasi trombosit (Crofford, 2000). Telah diketahui, bahwa agregasi trombosit diregulasi oleh kesetimbangan produksi prostasiklin (PGI_2) dan tromboksan A_2 (TXA_2). Prostrasiklin diproduksi di dalam dan dibebaskan dari sel-sel endotel dinding pembuluh darah, sedangkan tromboksan dibentuk di dalam trombosit. Prostrasiklin merupakan vasodilator dan penghambat

agregasi trombosit, sebaliknya tromboksan mendorong terjadinya agregasi trombosit.

2.3 Selekoksisib



Gambar 2.3. Struktur Selekoksisib

Rumus molekul	: C ₁₇ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₂ S
Berat molekul	: 381,4
Pemerian	: Serbuk berwarna putih, serbuk kristal putih amorf; tidak berbau
Titik lebur	: 160-164°C
Kelarutan	: Praktis tidak larut air

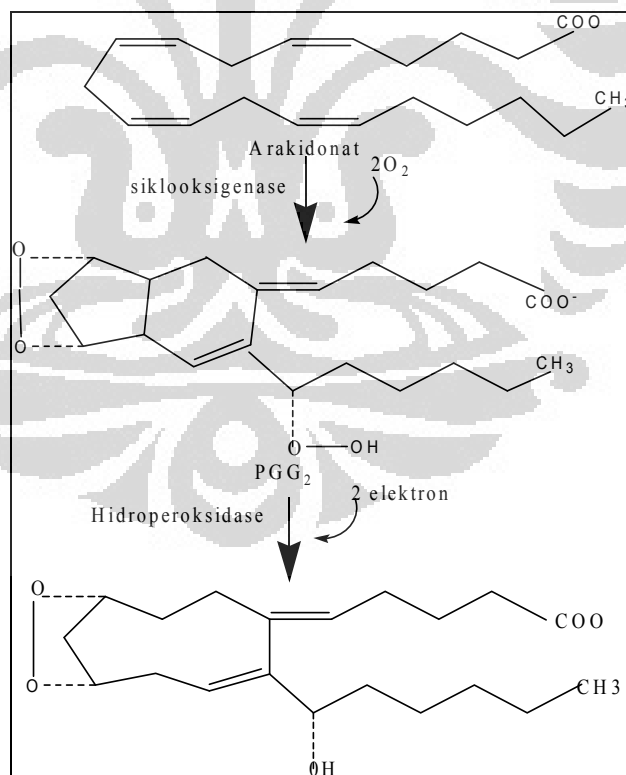
Pada penanganan pasien-pasien osteo- dan rheumatoid arthritis, inhibitor selektif COX-2 menunjukkan kerja antiradang yang setara dengan obat antiradang bukan steroid klasik tetapi dengan toksisitas lebih ringan pada saluran gastrointestinal (Crofford, 2000). Namun demikian, dilaporkan pula adanya kecenderungan peningkatan tekanan darah sebagai efek samping inhibitor selektif COX-2 (Catella, *et al.*, 1999).

2.4 Prostaglandin

2.4.1 Sintesis Prostaglandin

Prostaglandin merupakan kelompok senyawa turunan asam lemak prostanoat (C_{20}) yang rantai atom karbonnya pada nomor 8-12 membentuk cincin siklopentan. Saat ini dikenal prostaglandin A sampai I yang dibedakan oleh substituen yang terikat pada cincin siklopentan. Pada manusia, asam arakidonat (asam 5, 8, 11, 14-Eikosatetraenoat) merupakan prazat terpenting untuk mensintesis prostaglandin.

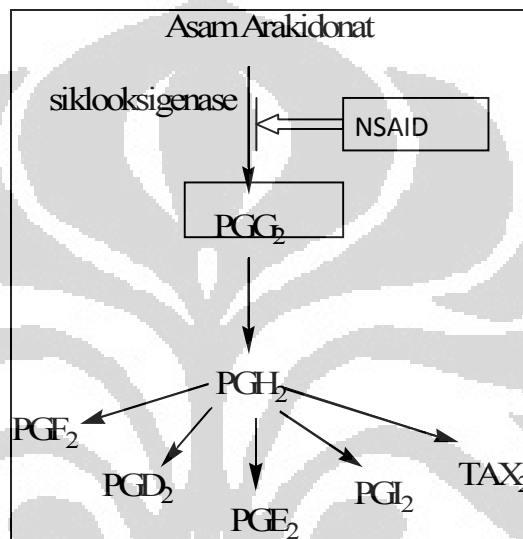
Asam arakidonat akan dikonversi menjadi prostaglandin oleh prostaglandin sintase. Prostaglandin sintase terdiri dari dua komponen yaitu enzim siklooksigenase dan enzim hidroperoksidase. Enzim siklooksigenase mengintroduksi empat atom oksigen pada asam arakidonat menjadi prostaglandin G_2 (PGG_2). Tahapan ini diikuti dengan reduksi dua elektron oleh enzim hidroperoksidase menjadi PGH_2 (Gambar 2.4).



[Sumber: kartasasmita, 2010]

Gambar 2.4. Biokonversi asam arakidonat menjadi prekursor PGs (PGG_2 dan PGH_2).

PGH_2 kemudian dikonversi menjadi bermacam-macam prostaglandin antara lain PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, prostasiklin (PGI_2) dan tromboksan A_2 (TXA_2). PG yang dihasilkan bergantung enzim pengkonversi berikutnya yang terdapat pada sel-sel tertentu. Sebagai contoh sel-sel endothelial terutama menghasilkan PGI_2 , sedangkan sel-sel platelet terutama menghasilkan TXA_2 (Gambar 2.5) (Gringauz, 1997; Dubois *et al*, 1998).



Gambar 2.5. Skema diagram perubahan asam arakidonat menjadi PGs

2.4.2 Peranan Prostaglandin

Prostaglandin mempunyai fungsi utama mengatur serta mediator nyeri dan inflamasi. Prostaglandin G₂ (PGG_2) merupakan yang pertama dibentuk dari asam arakidonat dan sangat tidak stabil. Selanjutnya PGG_2 ini akan direduksi oleh enzim siklooksigenase (COX) menjadi prostaglandin H₂ (PGH_2), dan pada akhirnya akan dikonversi lagi menjadi prostaglandin D₂ (PGD_2), prostaglandin I₂ (PGI_2), prostaglandin E₂ (PGE_2), prostaglandin F₂ (PGF_2) dan tromboksan A₂ (TxA_2) oleh enzim isomerase. Jenis prostaglandin yang akan dibentuk tergantung pada jenis jaringan, karena setiap jaringan mempunyai isomerase yang berbeda. Misalnya pada platelet akan membentuk tromboksan A₂, sedangkan PGI_2

dibentuk oleh sel endotel pembuluh darah (Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, K, & Setiati, 2006).

Inhibisi sintesis PGs menghasilkan efek yang bermanfaat untuk pengobatan, tetapi bersamaan dengan itu dapat menghasilkan efek-efek yang tidak diinginkan a.l. :

- a. Pada loka inflamasi, PGE₂ yang diproduksi dapat mengsensitisasi ujung-ujung saraf nyeri dan meningkatkan aliran darah, yang meningkatkan perasaan sakit dan menyebabkan pembengkakan dan kemerahan jaringan. Oleh karena itu, inhibisi pembentukan PGE₂ melalui inhibisi COX lokal dapat menerangkan efek antiinflamasi obat-obat AINS.
- b. PGI₂ dan PGE₂ berperan dalam proteksi lambung dan inhibisi pembentukan mereka dapat menerangkan toksisitas gastrointestinal yang berhubungan dengan penggunaan dosis tinggi dan jangka panjang obat AINS.
- c. PGI₂ berperan sebagai vasodilator dan anti-agregator, sebaliknya TXA₂ berperan menginduksi agregasi platelet. Inhibisi COX pada platelet dapat menerangkan kemampuan aspirin mengurangi pembekuan darah. Pengurangan PGI₂ dan kenaikan TXA₂ dapat meningkatkan viskositas darah dan penyempitan vaskular.

Perbedaan efek PGs disebabkan oleh perbedaan struktur kimia, keanekaragaman reseptor dan pengaturan sintesis PG oleh pengaruh-pengaruh lokal. (Warner and Mitchell, 2002; Dubois *et al*, 1998; Goodsell, 2000, Gringauz, 1997).

2.5 Enzim

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator untuk reaksi-reaksi kimia didalam sistem biologi. Katalisator mempercepat reaksi kimia. Walaupun katalisator ikut dalam reaksi, namun kembali ke keadaan semula bila reaksi telah selesai (McGilvery & Goldstein, 1996).

Enzim yang mengkatalis perubahan satu atau lebih senyawa (substrat) menjadi satu atau lebih senyawa lain (produk) meningkatkan laju reaksi setidaknya 10⁶ kali dibandingkan jika tidak dikatalis. Seperti semua katalis lain, enzim tidak berubah secara permanen atau dikonsumsi sebagai keikutsertaannya

dalam reaksi yang bersangkutan. Selain sangat efisien, enzim merupakan katalis yang sangat selektif. Tidak seperti kebanyakan katalis yang digunakan dalam bidang kimia sintetik, enzim bersifat spesifik baik bagi tipe reaksi yang dikatalis maupun substrat atau substrat-substrat yang berhubungan dengan erat (Murray, Granner, & Rodwell, 2009).

Klasifikasi Enzim berdasarkan IEC (*Internasional Enzyme Commission*):

- a. *Oksireduktase*, enzim-enzim yang mengkatalis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi
- b. *Transferase*, yang mengkatalis reaksi pemindahan berbagai gugus seperti amino, karboksil, karbonil, metil, asil, glikosil atau fosforil.
- c. *Hidrolase*, yang mengkatalis pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain sambil mengikat molekul air.
- d. *Liase*, yang mengkatalis pemecahan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan belerang serta beberapa jenis ikatan antara karbon dengan nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida).
- e. *Isomerase*, yang mengkatalis perubahan geometrik atau struktural di dalam satu molekul.
- f. *Ligase*, mengkatalis penyatuan dua molekul yang dikaitkan dengan hidrolisis ATP.

2.5.1 Faktor yang Mempengaruhi Laju Reaksi Enzim (McGilvery & Goldstein, 1996)

a. Pengaruh Suhu

Laju reaksi yang dikatalis oleh enzim seperti halnya reaksi biasa akan meningkat dengan penambahan suhu. Ini berlaku sampai suhu tertentu tercapai. Di luar rentang kritis, yaitu pada suhu transisi, aktivitas enzim menurun dengan tajam. Di atas suhu tertentu tidak hanya enzim saja, bahkan hampir semua protein akan mudah rusak konformasinya. Bila energi termal menjadi cukup besar untuk mengakibatkan pemutusan beberapa ikatan, maka ikatan-ikatan di sekitarnya akan melemah, dan seluruh molekul akan membuka. Kerusakan yang luas pada konformasi ini dikenal sebagai denaturasi protein.

b. Pengaruh pH

Enzim biasanya melakukan katalis paling efektif pada kadar H^+ tertentu, tidak hanya karena katalis tergantung pada perbandingan yang tepat antara gugus-gugus asam dan basa yang ada tetapi juga karena konformasi protein tergantung pula pada muatan gugus-gugus yang membentuk ikatan. Perubahan yang besar pada pH menyebabkan penurunan yang berarti pada suhu transisi bagi kerusakan konformasi.

c. Substrat

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi hingga tercapai laju maksimal. Jika peningkatan lebih lanjut konsentrasi substrat tidak meningkatkan laju reaksi, maka enzim dikatakan “jenuh” oleh substrat.

2.5.2 Enzim Siklooksigenase

Enzim siklooksigenase mempunyai dua bentuk isoenzim yang dikenal dengan istilah COX-1 dan COX-2 dengan struktur dan fungsi yang berbeda. Penemuan ini sangat penting untuk menjelaskan cara kerja obat AINS serta pengembangan obat baru dengan toksisitas yang lebih rendah. Enzim COX-1 merupakan bentuk konstitutif dan terutama banyak diekspresikan pada sebagian besar jaringan, platelet, ginjal dan mukosa lambung, bertanggung jawab untuk proteksi mukosa lambung, regulasi aliran darah di ginjal serta agregasi platelet. Sementara enzim COX-2 terutama diekspresikan pada jaringan yang mengalami inflamasi dan berperan terhadap rangsangan yang terjadi akibat proses inflamasi seperti sitokin proinflamasi, faktor pertumbuhan dan lipopolisakarida bakteri. Di samping itu COX-2 juga diekspresikan pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah, sel podosit intraglomerular, pada ovarium dan uterus serta pada tulang, yang mengatur peran fisiologis organ tersebut (Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, K, & Setiati, 2006).

Enzim COX-1 aktivitasnya relatif konstan dalam menjaga homeostatis tubuh, sebaliknya enzim COX-2 aktivitasnya dapat meningkat menjadi 10-80 kali lipat selama proses inflamasi dan proses patologis lainnya. Perbedaan lainnya adalah, enzim COX-1 banyak terdapat pada retikulum endoplasma, sedangkan

enzim COX-2 sebanyak 80-90% terdapat pada membran nukleus (Sudoyo, Setiyohadi, Alwi, K, & Setiati, 2006).

Dengan ditemukannya isozim COX dan peranannya dalam mengkatalis pembentukan berbagai prostaglandin, maka dikembangkanlah penelitian untuk menemukan obat yang selektif bekerja menghambat COX-2, dan hanya sedikit mempengaruhi kerja enzim COX-1. Diharapkan obat baru tersebut mempunyai efek samping yang lebih ringan, tanpa mempengaruhi fungsi konstitutifnya. Dengan demikian ada obat yang bekerja menghambat kedua enzim tersebut (non selektif) terhadap COX dan ada yang hanya selektif terhadap COX-2

Tabel 2.1: Karakteristika siklooksigenase-1 dan -2 (Dannhardt dan Laufer, 2000)

Parameter	Siklooksigenase-1	Siklooksigenase-2
Ukuran gen	22 kb	8,3 kb
Ekson	11	10
Kromosom	9q32 – q33,3	1q25,2 – q25,3
Mrna	2,8 kb	4,1 kb
Regulasi mRNA	Konstitusi	Indusibel
Induktor	-	Sitokin, LPS
Jumlah asam amino	599	604
Lokasi	Membran inti	Membran inti
Kofaktor	1 mol Heme	1 mol Heme
Tempat pengikatan asam asetil salisilat	Serin-529	Serin-516
Spesifisitas substrat	Asam arakidonoat, asam linoleat	Asam arakidonoat, asam linoleat, asam eikosapentenoat
Aktivitas	23 mmol asam arakidonoat/mg/menit	11 mmol asam arakidonoat/mg/menit

2.5.3 Penghambatan Aktivitas Enzim (Poedjiadi, 1994)

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila ada hambatan pada penggabungan substrat atau pada penghasilan produk. Senyawa yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor.

Penghambatan yang dilakukan oleh inhibitor tersebut dapat berupa penghambatan *irreversible* atau penghambatan *reversible*. Penghambatan *irreversible* pada umumnya disebabkan oleh terjadinya proses destruksi atau modifikasi sebuah gugus fungsi atau lebih dari molekul enzim, contohnya terbentuknya ikatan kovalen antara enzim dengan inhibitor. Penghambatan *reversible* masih memungkinkan enzim yang diinhibisi kembali dapat bekerja sebagai katalisator setelah tidak adanya inhibitor. Penghambatan jenis ini dapat berupa penghambatan kompetitif dan penghambatan non kompetitif.

Penghambatan kompetitif terjadi ketika inhibitor yang memiliki struktur menyerupai substrat berikatan dengan bagian aktif enzim membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI). Sehingga terjadi persaingan antara inhibitor dengan substrat untuk berikatan dengan bagian aktif enzim melalui reaksi sebagai berikut:



Penghambatan kompetitif menghalangi substrat berikatan dengan enzim dengan membentuk kompleks ikatan EI sehingga tidak terbentuk kompleks ES. Berbeda dengan kompleks ES, kompleks EI ini tidak dapat membentuk produk/hasil reaksi (P).

Penghambatan non kompetitif terjadi ketika inhibitor berikatan dengan bagian enzim di luar sisi aktif. Penggabungan antara inhibitor dengan enzim dapat terjadi pada enzim bebas (E) maupun pada enzim yang telah mengikat substrat/kompleks enzim-substrat (ES).



Penggabungan inhibitor dengan enzim bebas menghasilkan kompleks EI, sedangkan penggabungan dengan kompleks ES menghasilkan kompleks ESI.

Baik kompleks EI maupun ESI ini bersifat inaktif, dan berarti bahwa kedua kompleks tersebut tidak dapat menghasilkan hasil reaksi yang diharapkan.

2.6 Uji Aktivitas Inhibisi pada Enzim Siklooksigenase (COX)

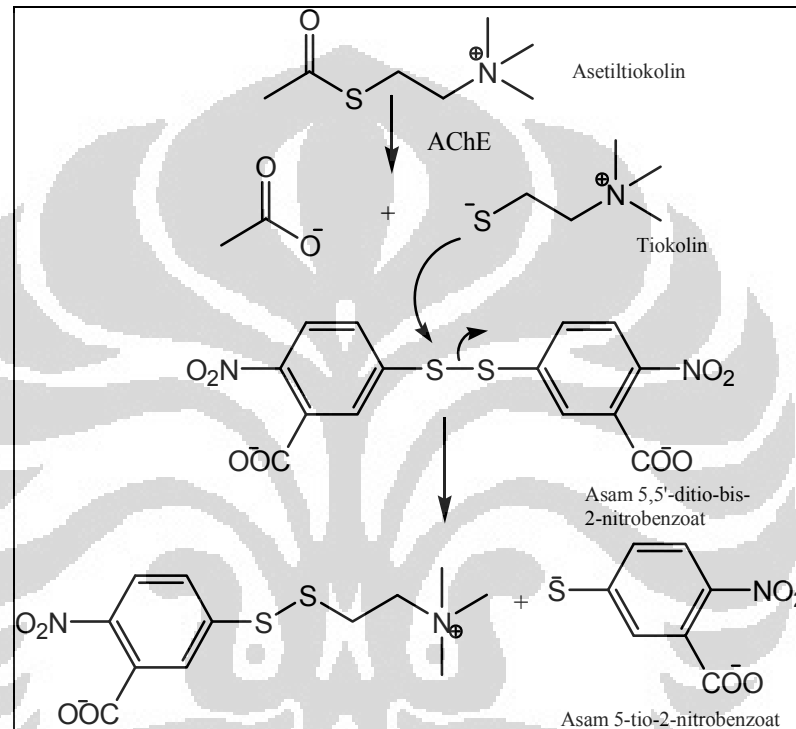
Ada beberapa cara untuk melakukan uji aktivitas penghambatan senyawa uji terhadap enzim COX, antara lain :

2.6.1 Menggunakan Enzim Imunoesei (*Enzyme Immunoassay*, EIA)

Siklooksigenase (COX) mengkatalisis langkah pertama biosintesis asam arakidonat menjadi PGH_2 . Penentuan skrining inhibitor COX (ovine) dilakukan secara langsung dengan mengukur $\text{PGF}_{2\alpha}$, dengan cara mereduksi PGH_2 asal COX yang dihasilkan dalam reaksi COX menggunakan stano klorida (SnCl_2). Produk prostanooid ini diukur melalui enzim imunoesei (EIA), menggunakan antiserum yang luas kespesifikannya yang berikatan dengan kebanyakan senyawa-senyawa PG (COX ovine, 2010).

Pengukuran ini didasarkan pada kompetisi antara PG dan suatu konjugat PG-asetilkolinesterase (AChE) (*PG tracer*) untuk berikatan dengan PG antiserum yang jumlahnya dibatasi. Karena konsentrasi *PG tracer* dibuat tetap, sedangkan PG bervariasi, maka jumlah *PG tracer* yang dapat diikat oleh PG antiserum adalah berbanding terbalik dengan konsentrasi PG di dalam sumur uji. Kompleks antiserum kelinci-PG ini kemudian berikatan dengan antibodi anti-kelinci monoklonal mencit (*mouse monoclonal anti-rabbit antibody*) yang telah dimasukkan sebelumnya pada sumur uji. Sumur uji dicuci untuk menghilangkan reagen yang tidak berikatan dan kemudian reagen Ellman's [berisi asetiltiokolin (substrat untuk AChE) dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat)] ditambahkan ke sumur uji. Asetilkolin akan dihidrolisis oleh asetilkolinesterase pada *PG tracer* yang berikatan pada sumur uji, menghasilkan tiokolin dan asam asetat. Tiokolin kemudian bereaksi dengan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) menghasilkan asam 5-tio-2-nitrobenzoat yang berwarna kuning yang terang, yang menyerap cahaya sinar tampak dengan kuat pada λ 415 nm ($\epsilon = 13.600$). Intensitas warna (besarnya serapan) diukur secara spektrofotometri. Besarnya serapan ini sebanding dengan jumlah *PG tracer* yang berikatan pada sumur uji, dan berbanding terbalik dengan jumlah PG yang ada dalam sumur reaksi selama inkubasi.

Sehingga semakin besar aktivitas inhibitor COX, semakin kecil PG yang diproduksi, maka semakin banyak *PG tracer* yang diikat pada sumur uji, dan semakin besar intensitas warnanya (COX ovine, 2010; Rao, Uddin, & Knaus, 2005). Skema reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis AChE dapat dilihat pada Gambar 2.6



[Sumber : COX ovine, 2010]

Gambar 2.6. Reaksi hidrolisis asetiltiokolin terkatalisis AChE.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan kit uji skrining inhibitor COX (ovine), nomor katalog 560101 dari Cayman Chemical Company (*Cayman's COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kits, catalog No. 560101*). Uji ini mencakup baik enzim COX-1 maupun COX-2, sehingga dapat digunakan untuk melakukan skrining inhibitor-inhibitor isozim spesifik (COX ovine, 2010).

2.6.2 Mengukur intensitas fluoresensi produk samping malondialdehid (MDA)

Konversi asam arakidonat menjadi PG oleh enzim siklooksigenase menghasilkan produk samping malondialdehid (MDA) yang dapat diukur intensitas fluoresensinya. Siklooksigenase diperoleh dari keping darah segar manusia. Plasma kaya keping darah ditambah senyawa uji, diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, lalu ditambah natrium arakidonat, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit, dan reaksi dihentikan dengan pereaksi asam tiobarbiturat dan diinkubasi pada 80°C selama 15 menit. Setelah didinginkan campuran disentrifugasi pada 4°C, 3000 rpm selama 15 menit, dan supernatan diukur. intensitas fluoresensinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang eksitasi 534 nm dan emisi 554 nm (Nurrochmad, Supardjan, & Sardjiman, 1998). Cara uji ini menentukan aktivitas inhibisi senyawa uji pada COX-1 dan COX-2 total.

2.6.3 Mengukur perubahan kromogen N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD)

Aktivitas siklooksigenase ditentukan dengan mengukur perubahan kromogen N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) selama reduksi PGG₂ menjadi PGH₂ secara spektrofotometri. Siklooksigenase (COX-2) diperoleh dari plasenta biri-biri (Cayman Chemical Co.). Campuran reaksi yang berisi hematin dan fenol dalam dapar Tris-HCl (100 µM, pH 8,1) (sebagai kofaktor) ditambah enzim yang telah diinkubasi dengan pembawa atau dengan larutan senyawa uji dalam dimetilsulfoksid pada suhu 37°C selama 1-10 menit, kemudian ditambahkan larutan segar asam arakidonat dan TMPD dan diukur perubahan serapan pada 611 nm selama 30 detik. Kecepatan reaksi awal (linier selama 1.k. 15 detik) diukur, dan kecepatan oksidasi nonspesifik pada saat enzim tidak ada dikurangkan sebelum perhitungan persentase hambatan (Fernandez de Arriba et al., 1999). Cara uji ini menentukan aktivitas penghambatan senyawa uji spesifik pada COX-2.

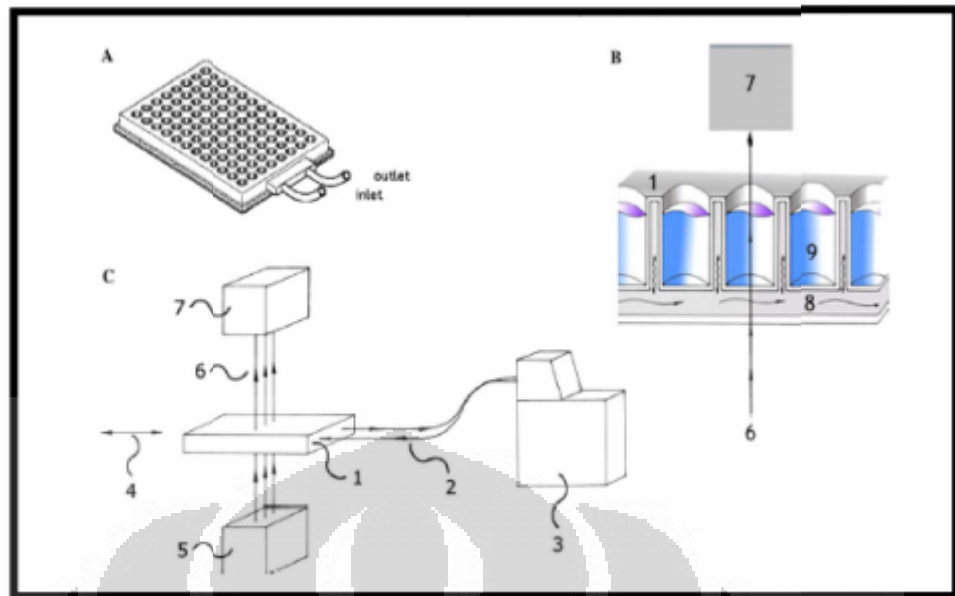
2.6.4 Menggunakan Darah Manusia Keseluruhan (Whole Human Blood Assay)

Inhibisi COX-2 yang mengkatalisis produksi PGE₂ ditentukan dengan cara sebagai berikut. Sampel-sampel darah manusia segar dari sukarelawan-sukarelawan yang tidak meminum obat AINS selama 14 hari sebelum pengambilan darah, dikumpulkan dalam tabung-tabung berisi heparin (20 U/mL). Untuk menentukan aktivitas COX-2, sebanyak 500 μ L darah terheparinasi diinkubasi bersama 5 μ L larutan senyawa uji dengan berbagai konsentrasi (misalnya, 5 sampai 20 μ M) atau pelarut senyawa uji (misalnya, DMSO) atau larutan baku pembanding (misalnya, celecoxib 10 μ M), dengan ditambahkan atau tidak ditambahkan lipopolisakarida (LPS) (berasal dari E-coli 026:B6) (10 μ g/mL) pada suhu 37°C selama 24 jam dengan penggojokan yang lembut untuk menginduksi ekspresi COX-2. Reaksi dihentikan dengan merendam tabung-tabung uji dalam air dingin. Plasma dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C, 13000 rpm selama 10 menit. Sampel-sampel disimpan pada suhu -20°C sampai kadar PGE₂ diukur menggunakan kit ELISA spesifik (Fernandez de Arriba et al., 1999; Hassanein, Khalifa, El-Samaloty, El-Rahim, Tha, & Ismail, 2008). Cara uji ini menentukan aktivitas penghambatan senyawa uji spesifik pada COX-2.

2.7 Pembacaan *Mikroplat* (Zakhartsev, Portner, & Blusta, 2003)

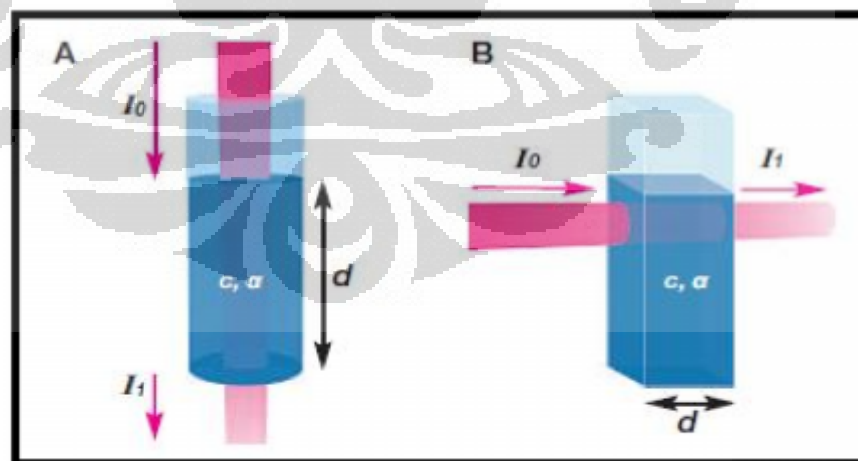
Microplate (Gambar 2.7) biasanya terbuat dari polistirene, terdiri dari sumuran-sumuran. Sisi bawah dari *microplate* transparan dan merupakan lempeng kaca dengan kualitas spektrofotometri (ketebalan 1 mm). Total volume dalam tiap sumuran dapat mencapai 300 μ L. *Microplate* didesain untuk pengukuran pada panjang gelombang 300 hingga 900 nm.

Perbedaan dengan spektrofotometri yaitu pada spektrofotometri hanya terbatas satu hingga enam kuvet selain itu dibutuhkan volume reagen yang besar (1-3 mL). Panjang jalur sampel pengukuran transmisi pada standar kuvet adalah 1 cm karena hampir semua kuvet memiliki tebal standar 1 cm. Berbeda dengan pengukuran densitas optik pada *microplate*, panjang jalur ditentukan berdasarkan jumlah dan ketinggian cairan sampel yang terisi dalam sumuran (Gambar 2.8)



[Sumber: Zakhartsev, Portner, & Blusta, 2003]

Gambar 2.7 (A) Bentuk tiga dimensi dari *mikroplate* (B) Bentuk tiga dimensi *mikroplate* saat pengoperasian (C) Prinsip kerja utama *mikroplate*. 1, *mikroplate*; 2, *insulated flexible tubes*; 3, pengatur suhu eksternal; 4, arah pergerakan *mikroplate* di *mikroplate reader*; 5, sumber cahaya; 6, light beams; 7, detektor; 8, aliran udara panas; 9, sumuran



keterangan: I_0 = intensitas sinar datang, I_1 = intensitas sinar yang direfleksikan, d pada gambar A = tinggi cairan ($300 \mu\text{L}$), d pada gambar B = tebal kuvet (1 cm)

Gambar 2.8 Jalur Sampel dalam Sumuran *Microplate* (A) dan Jalur Sampel pada Kuvet (B)

BAB 3 METODELOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas MIPA Universitas Indonesia, dari bulan Februari sampai Mei 2012

3.2 Alat

Microplate reader (Biotek Elx808); Timbangan analitik(AND); Penangas air (Memmert); Pipet mikro (eppendorf); *orbital shaker* (Lab Line); Vorteks (As One); Alat gelas.

3.3 Bahan

Sampel senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metoksi-3-sulfonamidafenil)-kuinazolin-2-il}etiril]bensensulfonamida (hasil sintesis Hayun dkk); Asetosal (shandong); selekoksib (hasil isolasi celebrex™); Kit EIA (no katalog 560101, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA); DMSO(Merck); airt “Ultrapure”.

3.3.1 Penyiapan Bahan

3.3.1.1 Dapar Reaksi

Encerkan 5 mL ‘Dapar Reaksi’ pekat dengan 45 mL aquadest “UltraPure”. Dapar Reaksi akhir ini (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, mengandung 5 mM EDTA dan 2 mM fenol) digunakan dalam reaksi COX-2 dan untuk pengenceran Heme.

3.3.1.2 COX-2 (*ovine*)

Vial ini berisi larutan ovine COX-2. Untuk menghindari pembekuan dan pencairan berulang, COX-2 dibagi menjadi beberapa vial dan disimpan pada suhu -80°C.

3.3.1.3 Heme

Vial ini berisi larutan heme dalam DMSO. Encerkan 100 μL heme dengan 400 μL dapar reaksi sebelum digunakan. Enceran heme stabil selama 12 jam pada suhu kamar.

3.3.1.4 Asam Arakidonat (Substrat)

Vial ini berisi larutan asam arakhidonat dalam etanol. Pindahkan 50 μL substrat persediaan ini ke vial lain, tambahkan 50 μL KOH, vortex, dan encerkan dengan 400 μL air "UltraPure" sehingga dicapai konsentrasi akhir 10mM. Gunakan larutan asam arakhidonat yang disiapkan ini dalam satu jam. Penambahan 10 μL substrat yang telah disiapkan, akan menghasilkan konsentrasi akhir 10 μM dalam reaksi.

3.3.1.5 Kalium Hidroksida

Vial ini berisi 0,1 M KOH. Reagen ini siap digunakan sebagaimana persediaannya.

3.3.1.6 Asam Hidroklorida

Vial ini berisi HCl 1 M. Encerkan 500 μL dengan 4,5 mL aquadest "UltraPure" untuk menghasilkan konsentrasi 0,1 M. Enceran HCl ini digunakan untuk menyiapkan larutan stano klorida SnCl_2 jenuh. Kedua larutan HCl ini stabil selama sedikitnya 1 bulan pada suhu kamar.

3.3.1.7 Stano Klorida

Vial ini berisi kristal stano klorida. Tambahkan 5 mL HCl 0,1 M dan vortex untuk menghasilkan larutan stano klorida jenuh. (Larutan stano klorida ini keruh). Larutan ini stabil selama 8 jam pada temperatur kamar.

3.3.1.8 Dapar EIA

Encerkan isi satu vial konsentrat dapar EIA dengan 90 ml air "UltraPure". Bilas vial untuk membersihkan garam yang mengendap. Simpan semua dapar pada suhu 4°C. Dapar stabil selama lebih kurang dua bulan.

3.3.1.9 Dapar Cuci

Encerkan isi konsentrat dapar cuci sehingga menjadi 2 liter dengan air “UltraPure” dan tambahkan 1 mL Tween 20. Dapar cuci volume yang lebih kecil dapat dibuat dengan mengencerkan konsentrat dapar cuci 1:400 dan menambahkan Tween 20 (0,5 mL/L dapar cuci). Enceran dapar cuci stabil selama 2 bulan pada 4°C.

3.3.1.10 *Tracer AChE* Skrining Prostaglandin

Rekonstitusi PG Tracer Skrining untuk dengan 6 mL dapar EIA. Simpan pada 4°C (tidak dibekukan) dan gunakan dalam waktu seminggu. Kelebihan 20% PG Screening Tracer telah termasuk memperhitungkan kejadian kehilangan.

3.3.1.11 Antiserum Skrining Prostaglandin

Rekonstitusi PG Skrining Antiserum dengan 6 mL dapar EIA.

3.3.2 Pembuatan Larutan Inhibitor

a. Larutan asetosal

Timbang seksama 4,51 mg asetosal, masukkan ke labu 5 ml, larutkan dan cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 ml, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 µM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 50; 25; 10 dan 1 µM menggunakan pelarut campuran (1:1) DMSO dan dapar reaksi.

b. Larutan Selekoksisib

Timbang seksama 9,54 mg, masukkan ke labu 5 ml, larutkan dan cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 mL, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 µM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 10; 1; 0,1 dan 0,01 µM menggunakan pelarut campuran(1:1) DMSO dan dapar reaksi.

c. Larutan senyawa uji

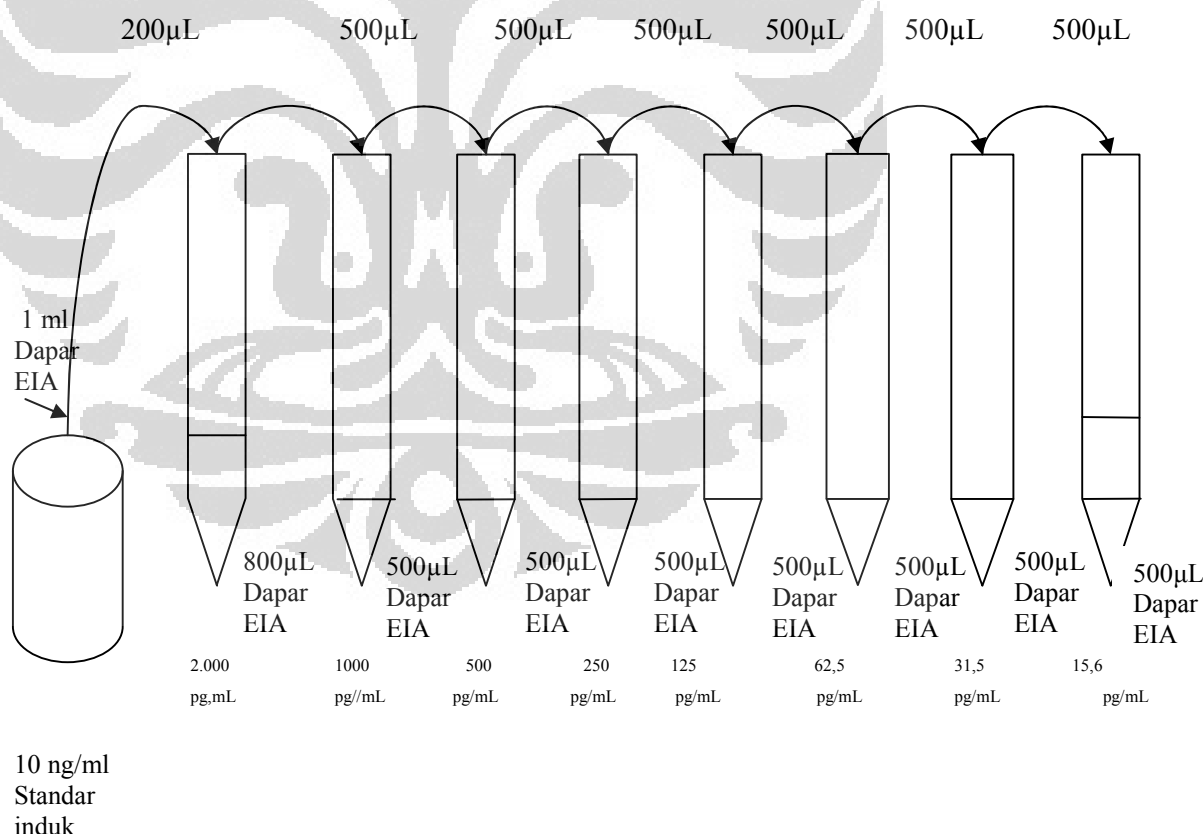
Timbang seksama 10,44 mg senyawa uji larutkan dalam DMSO, masuk ke labu 5 ml, larutkan dan cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 ml, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 µM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 20; 10; 5 dan 1 µM dengan pelarut campuran (1:1) DMSO dan dapar reaksi.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Kurva Standar Skrining Prostaglandin

Larutkan Standar PG terliofilasi dalam 1 mL dapar EIA. Konsentrasi larutan ini adalah 10 µg/mL (standar induk). Simpan larutan ini pada 4°C. Larutan ini stabil selama 6 minggu.

Untuk membuat standar untuk digunakan dalam EIA : Siapkan 8 tabung uji bersih dan beri nama S1 hingga S8. Isikan 800 µL dapar EIA pada tabung uji S1 dan 500 µL dapar EIA pada tabung uji S2-8. Pindahkan 200 µL standar induk pada tabung uji S1 dan aduk sebaik mungkin. Secara serial encerkan standar ini dengan mengambil 500 µL dari tabung uji S1 dan memasukkannya ke tabung uji S2, campur sebaik mungkin. Kemudian ambil 500 µL dari tabung uji S2 dan memasukkannya ke tabung uji S3, campur sebaik mungkin. Ulangi proses ini untuk tabung uji S4-8. Enceran standar tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam. Skema penyiapan standar PG dapat dilihat pada Gambar 3.1



[Sumber : COX Ovine, 2010]

Gambar 3.1. Skema penyiapan standar prostaglandin (PG)

3.4.2 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Siklooksigenase-2

3.4.2.1 Pereaksian COX

Volume akhir reaksi adalah 1,15 mL dalam semua tabung. Gunakan dapar reaksi dalam reaksi dan pre-penyetimbangan ke suhu 37°C. Set penangas air ke suhu 37°C sebelum memulai reaksi. Masukkan reagen-reagen pada tabung uji yang telah berada dalam penangas air.

- a. **Tabung-tabung *background*** – COX-2 inaktif dengan memindahkan 20 µL tiap enzim ke 500 µL tabung mikro dan tempatkan tabung itu dalam air mendidih selama tiga menit. Enzim-enzim inaktif ini akan digunakan untuk menghasilkan nilai *background*. Tambahkan reagen berikut ke dalam dua tabung uji : 970 µL dapar reaksi, 10 µL heme, dan 10 µL COX-2 inaktif.
- b. **Tabung Aktivitas Inisial COX-2 100%** - Tambahkan 950 µL dapar reaksi, 10 µL heme, dan 10 µL COX-2 pada dua tabung uji
- c. **Tabung COX-2 inhibitor** – Tambahkan 950 µL dapar reaksi, 10 µL heme dan 10 µL COX-2 pada 8 tabung uji.
- d. Tambahkan 20 µL inhibitor pada tabung-tabung COX-2 dan 20 µL dapar reaksi atau pelarut pada tabung-tabung aktivitas inisial 100%. Inhibitor dilarutkan dalam DMSO, dan diencerkan dengan dapar reaksi sebelum ditambahkan pada tabung uji. Bila tidak larut dengan penambahan dapar, dapat ditambahkan dalam pelarutnya. Volume inhibitor tidak boleh lebih dari 20 µL.
- e. Inkubasikan selama 5 menit pada 37°C. Catatan : inkubasi enzim dengan inhibitor dapat antara 5-20 menit tanpa mempengaruhi stabilitas enzim, tetapi waktu inkubasi harus sama untuk semua sampel dalam percobaan individu.
- f. Inisiasi reaksi dengan menambah 10 µL asam arakidonat pada semua tabung uji. Vortex dan inkubasi selama 2 menit yang lain pada suhu 37°C.
- g. Tambahkan 50 µL HCl 1 M pada setiap tabung uji untuk menghentikan katalisis. Angkat tabung-tabung uji dari penangas air, tambahkan 100 larutan stano klorida jenuh pada tiap tabung uji dan vortex. Inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Campuran reaksi akan menjadi keruh.
- h. Sentrifugasi tabung selama 10-20 menit pada kecepatan 4000 rpm hingga diperoleh cairan supernatan.

- i. Ulangi langkah ke 2-8 bila melakukan reaksi lagi.
- j. Prostaglandin yang dihasilkan diukur secara kuantitatif dengan EIA. Ikuti cara kerja EIA. Reaksi stabil selama 1 minggu pada 0-4°C bila tutup rapat.

3.4.2.2 Pengenceran Sampel

a. *Sampel-sampel Background*

Siapkan tabung uji bersih dan beri label BC2. Isikan 990 μL dapar EIA pada masing-masing tabung uji. Tambahkan 10 μL background COX-2 pada tabung uji berlabel BC2, dan campur sebaik mungkin. Tiap-tiap tabung uji berisi 1 : 100 pengenceran dari sampel asli.

b. *Sampel-sampel Aktivitas Inisial COX-2 100%*

Siapkan dua tabung uji bersih per sampel dan beri nomor IA1 sampai IA2. Isikan 990 μL dapar IEA pada tabung uji IA1, tambahkan 10 μL sampel aktivitas inisial COX-2 100%, dan campur sebaik mungkin. Isikan 950 μL dapar EIA pada tabung uji IA2, tambahkan 50 μL dari tabung IA1 ke IA2, dan campur sebaik mungkin. Tabung IA2 berisi 1 : 2000 pengenceran dari sampel asli. Tabung IA2 akan diikutkan dalam EIA. Jangan menggunakan tabung uji IA1 dalam EIA itu, tabung uji ini terlalu pekat.

c. *Sampel-sampel Inhibitor COX-2*

Siapkan dua tabung uji per sampel dan beri nomor C1 hingga C2. Isikan 990 μL dapar EIA pada tabung C1, dan 10 μL sampel, dan campur sebaik mungkin. Isikan 950 μL dapar EIA pada tabung C2, tambahkan 50 μL dari tabung C1 ke tabung C2, dan campung sebaik mungkin. Tabung C2 mengandung 1: 2000 pengenceran dari sampel asli. Tabung C2 akan diikutkan dalam EIA. Jangan gunakan tabung C1 dalam EIA, tabung ini terlalu pekat.

3.4.3 Pelaksanaan EIA

3.4.3.1 Penambahan Reagen-reagen

- a. *Dapar EIA* : Tambahkan 100 μL dapar EIA pada sumur pengikatan non spesifik (NSB). Tambahkan 50 μL dapar EIA untuk sumur Pengikatan maksimum (Bo).

- b. **Standar Skrining PG** : Tambahkan 50 μ L dari tabung S8 pada sumur standar paling bawah (S8). Tambahkan 50 μ L dari S7 pada masing-masing dua sumur standar berikutnya (S7). Teruskan prosedur ini hingga semua standar terisi. Ujung pipet yang sama digunakan untuk mengisi semua standar. Sebelum memipet masing-masing standar, setimbangkan ujung pipet ini dalam standar tersebut.
- c. **Sampel-sampel background (tabung uji BC2)** : Tambahkan 50 μ L sampel per sumur. Masing-masing sampel diuji dua kali.
- d. **Sampel-sampel aktivitas inisial COX 100% (tabung uji IA2)** : Tambahkan 50 μ L sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada tabung pengenceran(1:200) dengan diuji dua kali.
- e. **Sampel-sampel COX Inhibitor (tabung uji C2)** : Tambahkan 50 μ L sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada tabung pengenceran (1:2000) dengan diuji dua kali.
- f. **Tracer AChE Skrining PG** : Tambahkan 50 μ L tracer skrining PG pada masing-masing sumur kecuali sumur-sumur Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).
- g. **Antiserum Skrining PG** : Tambahkan 50 μ L Antiserum skrining PG pada masing-masing sumur kecuali Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).

Format lempeng sumur uji sampel dapat dilihat pada Gambar 3.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bk	S1	S1	BC1	BC1	H	H	H	H	H	H	H
B	Bk	S2	S2	BC2	BC2	H	H	H	H	H	H	H
C	NSB	S3	S3	†	†	H	H	H	H	H	H	H
D	NSB	S4	S4	†	†	H	H	H	H	H	H	H
E	D ₀	S5	S5	†	†	H	H	H	H	H	H	H
F	D ₀	S6	S6	†	†	H	H	H	H	H	H	H
G	D ₀	S7	S7	II	II	II	II	II	II	II	II	II
H	TA	S8	S8	II	II	II	II	II	II	II	II	II

[Sumber : COX Ovine, 2010]

Gambar 3.2. Format lempeng sumur uji sampel

Keterangan :

Blk	= Blanko
TA	= Total Aktivitas
NSB	= <i>Non-Specific Binding</i>
Bo	= <i>Maximum Binding</i>
S1 – S8	= Standar 1 – 8
BC-2	= <i>Background COX-2</i>
‡	= Aktivitas inisial 100% COX-2 (IA2)
H	= Sampel inhibitor COX-2 (C2)

3.4.3.2 Inkubasi Lempeng

Tutup setiap lempeng dengan film plastik dan inkubasi selama 18 jam pada temperatur kamar di atas *orbital shaker*.

3.4.3.3 Pengembangan Lempeng

- Bila sudah siap mengembangkan lempeng, rekonstitusi satu vial Reagen Ellman's dengan 20 mL air "Ultra Pure". Reagen ini cukup untuk 100 penentuan/pengembangan sumur uji pada lempeng. Reagen Ellman's yang telah direkonstitusi ini tidak stabil, sehingga harus digunakan pada hari yang sama dengan hari preparasi. Lindungi dari cahaya bila tidak digunakan.
- Kosongkan sumur-sumur dan cuci limakali dengan dapar cuci.
- Tambahkan 200 μ L reagen Ellman's pada tiap sumur uji
- Tambahkan 5 μ L tracer pada sumur Aktivitas Total (TA).
- Tutup lempeng dengan film plastik. Pengembangan optimum diperoleh dengan menggunakan orbital shaker yang dipasang penutup yang lebar dan datar untuk memungkinkan lempeng (atau lempeng-lempeng) dalam gelap. Pengembangan ini umumnya berlangsung dalam 60 menit, misalnya, sumur $Bo \geq 0,3$ A.U. (blanko pengurang).

3.4.3.4 Pembacaan Lempeng

- Bersihkan bagian dasar lempeng dengan tissue bersih untuk menghilangkan sidik jari, debu, dan lain-lain.

- b. Buka penutup lempeng dengan hati-hati jangan sampai reagen Ellman's memercik pada penutup.
- c. Baca lempeng pada panjang gelombang antara 415 nm. Serapan dicek secara berkala sampai sumur Bo mencapai minimum 0,3 A.U. (blanko pengurang). Lempeng dibaca bila serapan sumur Bo pada rentang 0,3 – 1,0 A.U. (blanko pengurang). Bila serapan dari sumur-sumur melebihi 1,5, cuci lempeng, dan tambahkan reagen Ellman's yang segar dan biarkan mengembang lagi.

3.5 Analisis/Perhitungan

3.5.1 Penyiapan Data

Untuk analisis secara grafik dilaksanakan dengan prosedur berikut :

- a. Buat rerata pembacaan serapan sumur NSB
- b. Buat rerata pembacaan serapan sumur Bo
- c. Kurangkan rerata NSB dengan rerata Bo. Ini adalah Bo terkoreksi atau pengikatan maksimum terkoreksi.
- d. Hitung %B/Bo (% Sampel atau Pengikatan Standar/Pengikatan Maksimum) untuk sumur-sumur yang tersisa. Untuk mengerjakan ini, kurangi rerata serapan NSB dari serapan S1 dan dibagi dengan Bo terkoreksi (dari langkah ke 3). Kalikan dengan 100 untuk memperoleh %B/Bo. Ulangi untuk S2-S8 dan semua sumur-sumur sampel.

3.5.2 Plot Kurva Standar

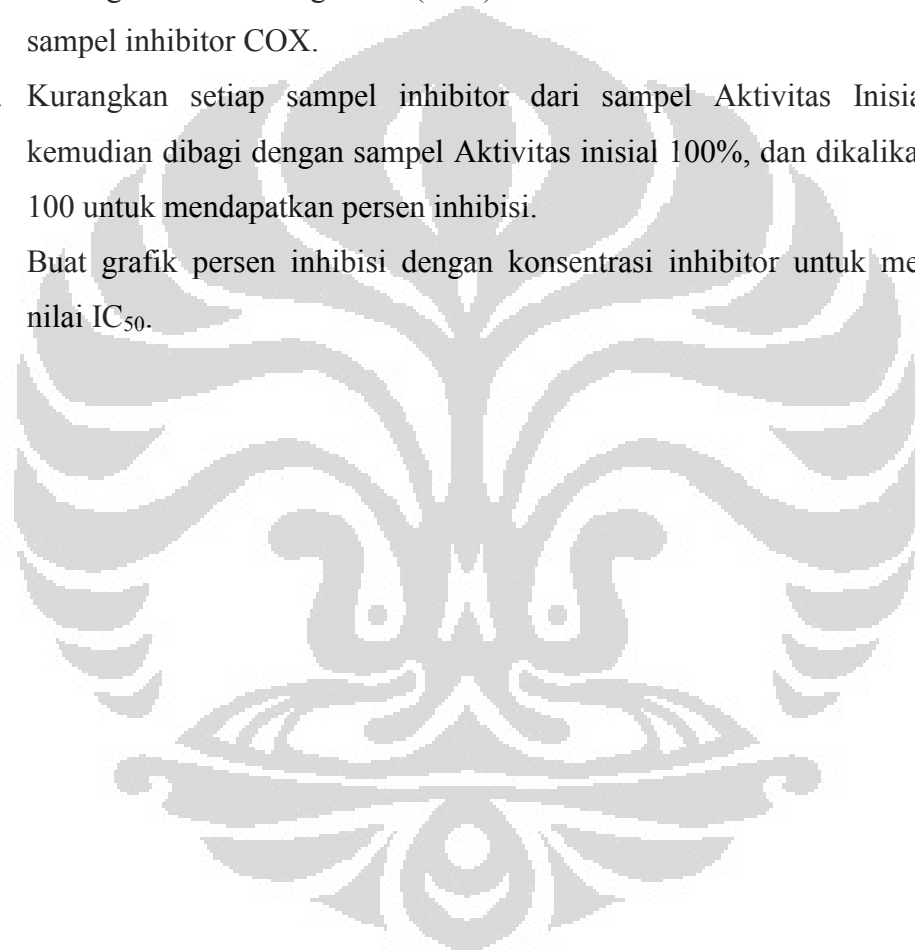
Plot %B/Bo untuk standar S1-S8 *versus* konsentrasi PG, menggunakan linier (y) dan log (x). Plot alternatif – data dapat juga dilinierisasi menggunakan transformasi logit. Persamaan untuk konversi ini sebagai berikut :

$$\text{Logit (B/Bo)} = \ln [B/Bo/(1-B/Bo)]$$

Plot data sebagai logit (B/Bo) *versus* log konsentrasi dan lakukan pencocokan regresi linier.

3.5.3 Penentuan Konsentrasi Sampel

- a. Hitung nilai %B/Bo untuk setiap sampel
- b. Tentukan konsentrasi untuk setiap sampel dengan mengidentifikasi %B/Bo pada kurva standar dan baca nilai yang bersesuaian pada aksis-x. Nilai %B/Bo yang lebih besar dari 80% dan kurang dari 20% harus diuji ulang, karena berada diluar rentang linier dari kurva standar. Kalikan sampel-sampel COX dengan faktor pengenceran yang sesuai ($BC_2 = 100$; IA_2 dan $C_2 = 2000$).
- c. Kurangkan nilai background (BC_2) dari Aktivitas Inisial 100% dan sampel-sampel inhibitor COX.
- d. Kurangkan setiap sampel inhibitor dari sampel Aktivitas Inisial 100%, kemudian dibagi dengan sampel Aktivitas inisial 100%, dan dikalikan dengan 100 untuk mendapatkan persen inhibisi.
- e. Buat grafik persen inhibisi dengan konsentrasi inhibitor untuk menentukan nilai IC_{50} .



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kurva Standar Skrining Prostaglandin

Kurva standar skrining prostaglandin dibuat dalam delapan konsentrasi prostaglandin yaitu 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; 15,6 pg/ml lalu diukur serapan dan dihitung %B/Bo. Dari data tersebut diperoleh persamaan regresi linear kurva standar yaitu $y = -0,63\ln(x) + 2,905$ dimana y adalah logit (B/Bo) dan x adalah jumlah prostaglandin dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0,9959. Data kurva kalibrasi skrining prostaglandin dapat dilihat pada Tabel 4.1. Pada tabel terlihat bahwa %B/Bo berada dalam rentang 12,9 sampai 73,4. Dari data Tabel 4.1 terlihat dua data yang berada diluar rentang 20-80 % B/Bo yaitu pada konsentrasi prostaglandin 2000 dan 1000 pg/ml dengan %B/Bo 12,9 dan 17,4. Rentang 20-80% B/Bo merupakan rentang linear untuk dapat menghitung konsentrasi prostaglandin. Pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak linear, hal ini mungkin disebabkan karena pengenceran skrining prostaglandin yang kurang cermat atau kesalahan pada saat merekonstitusi serbuk skring prostaglandin. Kurva standar skring prostaglandin dapat dilihat pada Gambar 4.1. Kurva standar ini akan digunakan untuk menentukan jumlah prostaglandin dengan memasukan nilai logit (B/Bo) untuk sampel inhibitor yaitu senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida, asetosal, dan selekoksib.

Nilai koefisien korelasi (r) = 0,9959 menunjukkan bahwa kurva standar tidak memenuhi linearitas dalam pengujian aktivitas penghambatan enzim siklooksigenase-2 yang dilakukan secara in vitro. Dalam hal ini linearitas yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis yang diberikan kurang memberikan respon yang proposional terhadap konsentrasi prostaglandin dalam sampel. Linearitas ditandai dalam rentang % B/Bo 20%-80% (COX Ovine, 2010)

Linearitas adalah kemampuan metoda analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya

hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2006).

4.2 Uji Aktivitas Penghambatan Siklooksigenase-2

Pereaksian untuk uji aktivitas enzim siklooksigenase, dimulai dengan mereaksikan sebelas tabung terlebih dahulu yaitu satu tabung *background*, satu tabung aktivitas inisial COX-2, delapan tabung sampel inhibitor pembanding yaitu asetosal dan selekoksib dengan masing-masing empat konsentrasi yang berbeda dan satu tabung sampel inhibitor senyawa uji yaitu 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida konsentrasi 10 μM . Pada semua tabung ditambahkan heme, asam klorida, dan stano klorida. Heme merupakan koenzim, diperlukan oleh enzim siklooksigenase-2 agar dapat aktif (Harmita, Hayun, & Harahap, 2006). Koenzim berfungsi sebagai pengangkut atau pemindah gugus dan memindahkan banyak substrat dari tempat pembentukannya ke tempat pemakaiannya (Murray, Granner & Rodwell, 2009). Asam klorida diperlukan untuk menghentikan reaksi, sehingga pembentukan asam arakidonat menjadi prostaglandin dapat berhenti sedangkan stano klorida diperlukan untuk mengubah PGH_2 yang dihasilkan pada reaksi COX menjadi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan cara mereduksi (COX Ovine, 2010).

Tabung *background* direaksikan dengan cara meng-inaktifkan enzim siklooksigenase 2, dengan cara mengambil enzim dengan jumlah 500 μL ke dalam tabung mikro lalu ditempatkan dalam air mendidih selama tiga menit. Pada dasarnya enzim merupakan suatu protein, dengan adanya pemanasan maka enzim akan terdenaturasi (Murray, Granner & Rodwell, 2009). Jumlah prostaglandin pada tabung ini adalah sangat minimal dibandingkan tabung yang lain karena enzim siklooksigenase tidak dapat merubah substrat menjadi prostaglandin. Jumlah prostaglandin pada tabung background akan digunakan sebagai koreksi terhadap jumlah prostaglandin pada tabung aktivitas inisial 100% COX-2 dan tabung sampel inhibitor.

Tabung aktivitas inisial 100% COX-2 adalah tabung tanpa adanya penambahan inhibitor, dimana enzim siklooksigenase-2 aktif. Pada tabung ini akan diperoleh jumlah prostaglandin yang maksimal karena semua substrat yang ditambahkan akan berubah menjadi prostaglandin.

Tabung sampel inhibitor adalah tabung dengan penambahan inhibitor sebanyak 10 μL menggunakan pipet mikro seperti pada Gambar 4.2, diharapkan sampel inhibitor tersebut dapat menghambat enzim siklooksigenase-2 sehingga jumlah prostaglandin menjadi lebih kecil dibanding jumlah prostaglandin pada tabung aktivitas inisial 100% COX-2. Tabung sampel inhibitor dibagi menjadi dua yaitu tabung sampel inhibitor pembanding yaitu asetosal dan selekoksib serta tabung sampel inhibitor senyawa uji. Pada tabung sampel inhibitor senyawa uji digunakan konsentrasi awal 10 μM . Konsentrasi ini akan menjadi acuan dalam langkah kerja selanjutnya. Jika didapatkan persen inhibisi kurang dari 50% maka konsentrasi dinaikan menjadi 20 μM . Konsentrasi tertinggi yang digunakan untuk sampel uji yaitu 20 μM karena konsentrasi yang lebih tinggi lagi membuat sampel uji tidak larut dalam pelarut yaitu campuran DMSO dan dapar reaksi (1:1). Histogram persen inhibisi COX-2 sampel inhibitor senyawa uji, selekoksib, dan asetosal pada konsentrasi 10 μM dapat dilihat pada Gambar 4.3. Pada gambar terlihat bahwa persen inhibisi selekoksib mencapai 81,82% sehingga konsentrasi selekoksib harus dikurangi menjadi 0,1 μM sedangkan untuk asetosal dan sampel senyawa uji harus dinaikan menjadi 20 μM karena belum mencapai persen inhibisi 50%. Hasil pereaksian siklooksigenase pada semua tabung uji dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Pada semua tabung dilakukan pengenceran. Untuk tabung *background* dibuat pengenceran 1:100 dan untuk tabung aktivitas inisial 100% dan sampel inhibitor dibuat pengenceran 1:2000. Hal ini dilakukan agar jumlah prostaglandin yang dihasilkan pada tabung tidak terlalu pekat sehingga serapan yang dihasilkan tidak terlalu rendah.

4.3 Pelaksanaan EIA

Pada pelaksanaan EIA ditambahkan konjugat Prostaglandin-asetilkolinesterase (AChE) (*PG tracer*) dan prostaglandin antiserum yang jumlahnya dibatasi, kemudian diinkubasi selama 18 jam. Karena jumlah *PG tracer* dibuat tetap, sedangkan prostaglandin yang dihasilkan pada saat pereaksian oleh masing-masing tabung sampel inhibitor, aktivitas inisial 100% COX-2, tabung *background* bervariasi maka jumlah PG tracer yang dapat diikat oleh prostaglandin antiserum adalah berbanding terbalik dengan jumlah prostaglandin didalam sumur uji untuk tiap sampel sehingga reaksi yang terjadi merupakan kompetisi antara *PG tracer* dengan prostaglandin untuk dapat berikatan dengan Ig-G yang telah sebelumnya dimasukan pada sumur uji (COX Ovine, 2010).

Setelah diinkubasi selama 18 jam, kemudian sumuran dicuci dengan dapar cuci untuk menghilangkan ikatan yang tidak spesifik. Pencucian yang berlebihan akan mengakibatkan penurunan sensitivitas pada saat pengujian yang disebabkan oleh elusi antibodi atau antigen dari sumur. Selanjutnya ditambahkan reagen Ellman's [(berisi asetiltiokolin dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat)] sehingga asetiltiokolin akan terhidrolisis menjadi tiokolin oleh asetilkolinesterase yang terdapat pada *PG tracer*. Tiokolin kemudian akan bereaksi dengan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) menjadi asam 5-tio-2-nitrobenzoat yang berwarna kuning terang seperti pada Gambar 4.5, sehingga dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 415 nm menggunakan *mikroplat reader* yang dilakukan secara duplo. *Mikroplat reader* dapat dilihat pada Gambar 4.6. Besarnya serapan akan sebanding dengan jumlah PG tracer dan berbanding terbalik dengan jumlah PG yang ada dalam sumur reaksi selama proses inkubasi. Besarnya serapan, konsentrasi rata-rata prostaglandin yang dihasilkan, % B/Bo, standar deviasi, persen koefisien variasi yang dihasilkan pada sumuran background, aktivitas inisial 100% COX-2, dan sampel inhibitor dapat dilihat pada Tabel 4.2. Pada tabel terlihat bahwa jumlah prostaglandin yang dihasilkan oleh sumuran aktivitas inisial 100% COX-2 adalah paling banyak yaitu 1.458.845,496 pg/mL dan mempunyai nilai serapan yang paling rendah dibandingkan sumuran yang lain yaitu 0,296 dan 0,286. Pada sumuran *background* menghasilkan prostaglandin yang paling sedikit

yaitu 59,7 pg/mL dengan nilai serapan yang paling tinggi 1,260 dan 1,238. Pada sampel inhibitor selekoksib, asetosal, dan sampel senyawa uji memiliki serapan dan jumlah prostaglandin yang berada diatas serapan dan jumlah prostaglandin background dan berada dibawah serapan dan jumlah prostaglandin aktivitas inisial 100%. Hal ini menunjukkan bahwa semua sampel inhibitor pembanding dan sampel uji memiliki persen inhibisi penghambatan terhadap aktivitas siklooksigenase-2. Pada selekoksib dengan konsentrasi 10; 1; 0,1 dan 0,01 μM memiliki persen inhibisi berturut-turut yaitu 81,82; 52,79; 39,45; 17,17%. Data uji aktivitas penghambatan oleh selekoksib dapat dilihat pada Tabel 4.3. Pada asetosal dengan konsentrasi 50; 25; 10; dan 1 μM memiliki persen inhibisi berturut-turut 56,13; 51,15; 43,82; 3,45 %. Data uji aktivitas penghambatan oleh asetosal dapat dilihat pada Tabel 4.4. dan pada sampel senyawa uji dengan konsentrasi 20; 10; 5 dan 1 μM memiliki persen inhibisi berturut-turut yaitu 51,71; 44,81; 31,09 dan 10,81%. Data aktivitas penghambatan oleh sampel senyawa uji dapat dilihat pada Tabel 4.5. Setelah didapatkan data persen inhibisi maka dibuat grafik \ln konsentrasi terhadap persen inhibisi untuk mendapatkan persamaan garis sehingga dapat ditentukan nilai IC_{50} .

Pada pelaksanaan EIA juga dilakukan pengukuran serapan terhadap sumur blanko, sumur NSB, sumur Bo, dan sumur total aktivitas. Besarnya serapan yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4.6. Blanko yang digunakan adalah reagen Ellman's, nilai serapan pada blanko akan digunakan untuk mengurangi serapan pada semua sumuran yang ada. Sumur NSB merupakan sumur yang sebelum inkubasi ditambahkan dapar EIA dan *PG tracer* tanpa adanya penambahan antiserum, sehingga pada sumur ini tidak akan terjadi reaksi enzimatik. Serapan yang dihasilkan pada sumur NSB ini bisa ada atau tidak. Sumur Bo merupakan sumur yang sebelum inkubasi ditambahkan dapar EIA, *PG tracer* dan antiserum prostaglandin. Pada sumur ini akan terjadi reaksi yang maksimum pada *PG tracer* yang ditandai dengan serapan yang maksimal pada sumur ini. Pada sumur ini hanya terdapat *PG tracer* tanpa adanya kompetisi dengan prostaglandin, sehingga asetilkolin pada *PG tracer* semuanya akan dihidrolisis oleh asetilkolinesterase menjadi tiokolin. Sumur total aktivitas merupakan sumuran yang berisi *PG tracer* dan reagen Ellman's yang ditambahkan sebelum pengukuran. Pada sumur ini juga

dihasilkan reaksi yang maksimal untuk PG tracer yang ditandai dengan serapan yang tinggi.

4.4 Menentukan IC_{50}

IC_{50} adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim. IC_{50} ditentukan dengan cara membuat grafik ln konsentrasi terhadap persen inhibisi. Pada penelitian ini didapatkan nilai IC_{50} selekoksib 0,40 μM . Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 untuk selekoksib dapat dilihat pada Gambar 4.7. Persamaan garis yang didapat yaitu $y = 9,002x + 58,17$ dimana y adalah % inhibisi dan x adalah konsentrasi untuk menghambat dengan koefisien korelasi (r) = 0,9905 dan untuk asetosal didapatkan nilai IC_{50} 24,07 μM dengan persamaan garis $y = 13,83x + 6,010$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9828. Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 untuk asetosal dapat dilihat Gambar 4.8. Senyawa uji 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil] benzensulfonamida memiliki nilai IC_{50} 16,94 μM dengan persamaan garis $y = 13,98x + 10,44$ dengan koefisien korelasi 0,9955 seperti yang terlihat pada Gambar 4.9.

Berdasarkan penelitian sebelumnya menggunakan metode yang sama diperoleh IC_{50} seperti yang terlihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7. Data IC_{50} asetosal dan selekoksib berdasarkan literatur

Senyawa	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	Referensi
	Hasil Uji	Literatur	
Selekoksib	0,40	0,07	(Anana, Rao, Chen, & Knaus, 2006)
		0,036	(Chintakunta, <i>et al.</i> , 2002)
		0,06	(Zarghi, Tahghighi, Soleimani, Daraie, Dadrass, & Hedayati, 2008)
		0,079	(Biava, <i>et al.</i> , 2005)
Asetosal	24,07	2,4	(Zarghi, Rao, & Knaus, 2007)
		2,4	(Anana, Rao, Chen & Knaus, 2006)
Senyawa Uji	16,94		

Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa IC_{50} yang didapatkan memiliki perbedaan yaitu sepuluh hingga duapuluh kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan literatur pada metode yang sama. Perbedaan nilai IC_{50} tersebut dimungkinkan karena penurunan aktivitas enzim sehingga terjadi perubahan konformasi suatu enzim pada pengikatan substrat. Enzim memiliki sifat khusus, yaitu memiliki bagian tempat pengikatan (*binding site*) untuk mengikat senyawa tertentu karena gugusan asam amino pada tempat pengikatan hanya cocok untuk beberapa senyawa, bahkan untuk satu senyawa saja. Sehingga dapat dinyatakan bahwa suatu enzim dapat menunjukkan kekhususan yang tinggi terhadap substrat. Perubahan dalam aktivitas enzim dapat mempengaruhi perubahan substrat menjadi produk (McGilvery & Goldstein, 1996).

Perbandingan nilai IC_{50} untuk ketiga senyawa uji diatas jika dibandingkan, seperti yang terlihat pada Gambar 4.10 menunjukkan bahwa selekoksib paling berpotensi terhadap siklooksigenase-2 lalu diikuti oleh senyawa uji 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensulfonamida dan terakhir asetosal. Menunjukkan bahwa senyawa uji memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 walaupun tidak sebesar selekoksib namun senyawa ini memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan asetosal.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan uji aktivitas penghambatan senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida terhadap enzim siklooksigenase-2, diperoleh hasil nilai IC_{50} yaitu 16,94 μM dan untuk senyawa pembanding yaitu selekoksib dan asetosal diperoleh nilai IC_{50} yaitu 0,40 μM dan 24,07 μM . Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 walaupun tidak sebesar selekoksib namun senyawa ini memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan asetosal.

5.2. Saran

Untuk mendukung data penelitian ini, hendaknya dilakukan optimasi uji aktivitas dengan metode *enzyme immunoassay* (EIA) terhadap senyawa uji 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil] bensensulfonamida. Selain itu dapat dilakukan juga pengujian terhadap enzim siklooksigenase-1 agar mengetahui selektivitas senyawa uji tersebut.

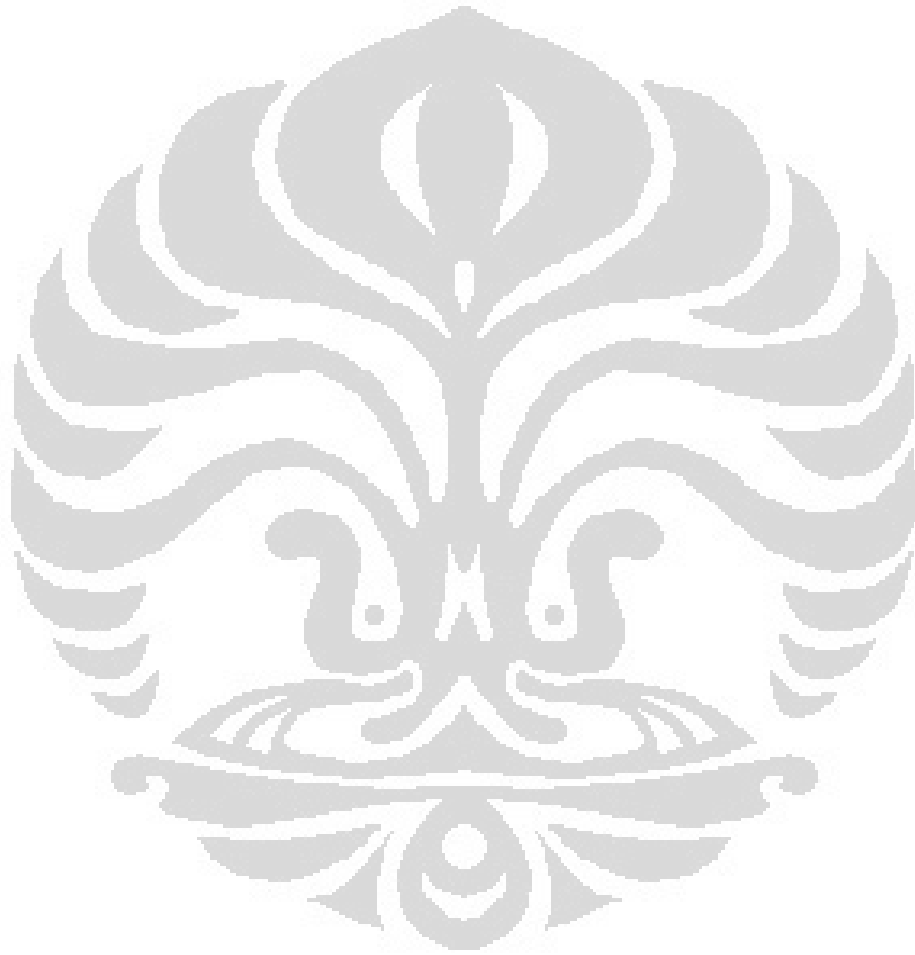
DAFTAR ACUAN

- Arjatmo, T., & Setiawan, B. (1983). *Prostaglandin dan inflamasi pada rheumatoid arthritis*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Anana, R., Rao, P. P., Chen, Q. H., & Knaus, E. E. (2006). Synthesis biological evaluation of linier phenylethynylbenzensulfonamide regioisomers as cyclooxygenase-1/-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14, 5259-5265.
- Biava, M., *et al.* (2005). 1,5-Diarylpyrrole-3-acetic Acids an Ester as Novel classes of Potent and Highly Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition. *J. Med. Chem.*, 3428-3432.
- Calvello, R., *et al.* (2012). Novel selective COX-1 inhibitors supress neuroinflammatory mediators in. *Pharmacological Research* 65, 137-146.
- Catella, *et al.* (1999). Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289(2), 735-741.
- Chintakunta, V. K., *et al.* (2002). 3-O-Substituted benzylpyridazinone derivatives as cox inhibitor. *Eur. J. Med.* 37, 339-347.
- COX (Ovine) Inhibitor Screening Assay kit Catalog No. 550101*.(2010). Ann Arbor, MI: Cayman Chemical Company, USA.
- Crofford, L. J. (2000). Clinical Experience with Specific COX-2 Inhibitors in Arththritis, *Curr. Pharm.*, 6 (17), 1725-1736.
- Dannhardt, G. dan S. Laufer. (2000). Structural Approach to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore?, *Current Medicinal Chemistry*, 7, 1101-1112.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia III*. Jakarta: Depkes, 43.
- Dubois, N. R., *et al.* (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, 12, 1063-1073.

- Fang, S., Ping, B.A., Zong-ru, G., dan Gui-fang, C. (2002). Inhibitory Effect of 3,4-diaryl-3-pyrrolin-2-One Derivates on Cyclooxygenase 1 and 2 in Murine Peritoneal Macrophages, *Acta Pharmacologica* Cyclooxygenase in biology and disease, *The FASEB Journal, Sinica, Chinese Pharmacological Society*. 23 (8), 762-768.
- Fernandez de Arriba *et al.*, (1999). Effect of 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate on nuclear factor κ B-dependent transcription in human astrocytoma cells. *Mol. Pharmacol.*, 55, 753-761.
- Hassanein, H., Khalifa, El-Samaloty, El-Rahim, Tha, & Ismail, (2008). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Imidazolone Derivatives as Potential COX-2 Inhibitors. *Arch Pharm Res* ; 31(5), 562-568.
- Goodsell, D. S. (2000). The Molecular Perspective : Cyclooxygenase-2, *The Oncologist*, 5, 169-171 (<http://www.TheOncologist.com>)
- Gringauz, A. (1997). *Introduction to Medicinal Chemistry, How Drugs Act and Why*, 150 -161, Wiley-VHC Inc., New York
- Harmita, Hayun, & Harahap, Y. (2006). *Kimia medisinal*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia
- Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyono, S. (2011). Virtual Screening of 2,3-disubstitued-4(3H)-quinazolinones Possessing Benzenesulfonamide Moiety for COX-2 Inhibitor. *Bioinformasi*, 7(5), 246-250.
- Hudiyono, S. dan Hayun. (2011). *Sintesis 4-[(E)-2-{4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida dan Analognya*. Depok : Laporan Akhir Hibah Riset Pasca Sarjana UI.
- Kurumbail, R.G., *et al.* (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents, *Nature*, 384, 644-648.
- Kartasmita, R. E. (2002). Perkembangan obat antiradang bukan steroid. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, XXVII(4):75-91.
- Lelo, A. (2007). Pertimbangan Farmakologi dalam Pemilihan Obat Antiinflamasi Nonsteroid Penghambat COX-2. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 51 (2), 63-64.

- Mc Gilvery, R.W., & Goldstein, G. W. (1996). Biokimia suatu pendekatan fungsional. Surabaya: airlangga university press
- Murray R. K., D. K. Granner dan V. W. Rodwell. (2009). *Biokimia Harper Edisi 27*. Jakarta: EGC.
- Panara, M, R. (1999). Dose Dependent Inhibition of Platelet COX-1 and Monocyte COX-2 by Meloxicam in Healthy Subject. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 290 (3) No.1, 276-280.
- Penning, T., Talley, J., & Bertenshaw, S. e. (2005). Design and synthesis, and anti-inflammatory evaluation of a series of novel amino acid-binding 1,5-diaryl pyrazole derivatives. *Acta Pharmacologica Sinica*, 865-872
- Poedjiadi, Anna. (1994). *Dasar-dasar ilmu biokimia*. Jakarta: UI Press
- Sudoyo, A. W., Setiyohadi, B., Alwi, I., K, M. S., & Setiati, S. (2006). *Ilmu penyakit dalam*. Jakarta: Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Smyth, E. & FitzGerald, G. (2007). The Eicosanoid: Prostaglandins, Tromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds. *In: Basic & Clinical Pharmacology Edited by: Bertram G. Katzung*, Mc Graw Hill, San Fransisco, USA.
- Uddin, Md. J., Rao, P.N.P., dan Knaus, E. E. (2003). Design and Synthesis, Novel Celecoxibs Analogues as Selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors : Replacement of Sulfonamido Pharmacophore by a Sulfonylazide Bioisostere. *Bioorg. Med. Chem.*, 11 , 5273 – 5280.
- Zakhartsev, M. V., Portner, H.O., & Blusta, R. (2003). Enviromentally low-temperature kinetic and thermodynamic study of lactate dehydrogenase from Atlantic cod (*G. morhua*) using 96-well microplate technique. *Elsevier*, 10-20.
- Zarghi, A., Praveen Rao, P. N., & Knaus, E. E. (2007). Design and synthesis new rofecoxib analog as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Replacement of the methanesulfonyl pharmacophore by an N-acetylsulfonamida. *J Pharm Pharmacol Sci* 10 (2), 159-167.
- Zarghi, A., Tahghighi, A., Soleimani, Z., Daraire, B., Dadrass, O.G., & Hedayati, M. (2008). Design and Synthesis of Some 5-Substituted-2-(4-(azido or methylsulfonylphenyl)-1H-indole Derivatives as Selective Cyclooxygenase (COX-2) Inhibitors. *Sci Pharm* 76, 361-376.

Zhang, WY., Yang, X., Jin, D., dan Zhu, X. (2004). Expression and Enzyme Activity Determination of Human COX-1 and-2 inBaculovirus-Insect Cell System, *Acta Pharmacologica Sinica, ChinesePharmacological Society*. 25 (8), 1000- 1006.



Tabel 4.1. Data kurva standar skrining prostaglandin

Konsentrasi Prostaglandin (pg/ml)	Rata-rata Serapan	% B/Bo	Logit (B/Bo)
2000	0,282	12,9	-1,91139
1000	0,341	17,4	-1,55519
500	0,455	26,2	-1,03616
250	0,567	34,8	-0,62487
125	0,714	46,2	-0,152
62,5	0,912	61,5	0,467581
31,25	1,066	67,9	0,750205
15,63	0,953	73,4	1,013004

Tabel 4.2. Data serapan, konsentrasi prostaglandin, %B/Bo, standar deviasi dan % KV

Nama	Konsentrasi (μ M)	Serapan	Konsentrasi rata-rata PG (pg/ml)	% B/Bo	% KV	Standar deviasi
Selekoksib	10	0,598	265200,719	45,6	3,49	9299,63
		0,588				
	1	0,410	688651,587	31,5	0,40	2767,52
		0,411				
	0,1	0,383	883345,369	28,2	12,79	113723,48
		0,384				
0,01	0,297	1208355,192	24,4	20,06	245954,12	
	0,340					
Asetosal	50	0,443	639996,932	32,5	15,34	99048,49
		0,404				
	25	0,422	712636,647	31,0	14,11	101380,34
		0,387				

	10	0,388				
		0,373	819614,185	29,2	6,28	51601,55
	1	0,286				
		0,306	1408451,176	22,7	9,86	139473,62
Sampel Uji	20	0,407				
		0,406	704528,717	31,2	0,40	2846,39
	10	0,404				
		0,363	805191,044	29,4	17,02	138531,89
	5	0,347				
		0,347	1005362,149	26,6	0,00	0,00
	1	0,308				
		0,307	1301085,880	23,6	0,48	6259,73
<i>Background</i>	-	1,260	59,7	96,2	50,55	620,79
		1,238				
Aktivitas	-	0,296	1458845,496		5,00	73008,65
Inisial		0,286				
100%				22,3		

Tabel 4.3. Data uji aktivitas penghambatan oleh Selekoksisib

Konsentrasi Selekoksisib (μM)	Serapan	Konsentrasi PG (pg/mL)	% Inhibisi
10	0,598	259904,701	
	0,588	273056,359	81,82
1	0,410	691806,097	
	0,411	687892,233	52,79
0,1	0,383	808766,744	
	0,384	969596,032	39,45
0,01	0,297	1399848,36	
	0,340	1052016,71	17,17

Tabel 4.4. Data uji aktivitas penghambatan oleh Asetosal

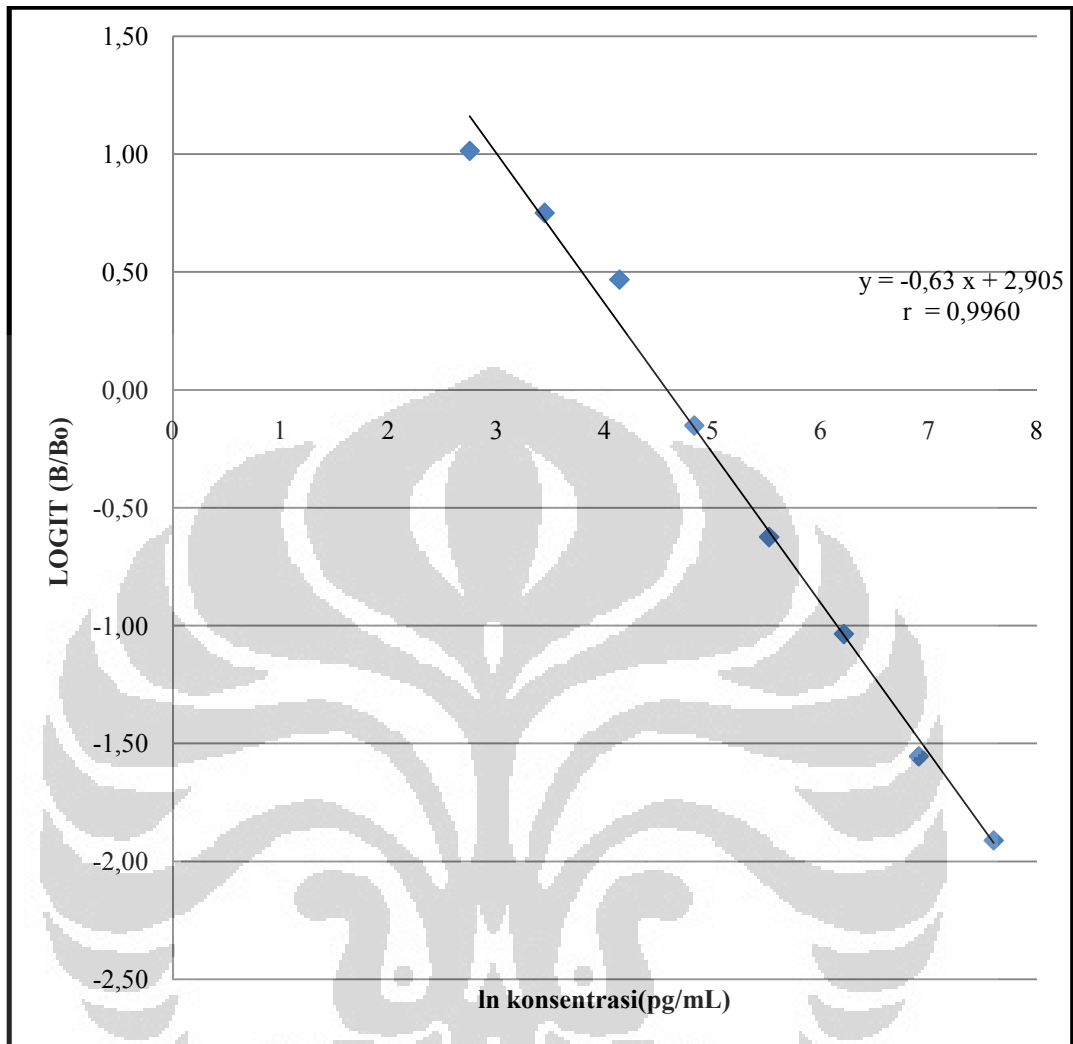
Konsentrasi Asetosal (μM)	Serapan	Konsentrasi PG (pg/mL)	% Inhibisi
50	0,443	575800,061	
	0,404	715875,781	56,13
25	0,422	646585,625	
	0,387	789959,075	51,15
10	0,388	785343,288	
	0,373	858318,897	43,82
1	0,286	1512895,16	
	0,306	1315649,67	3,45

Tabel 4.5. Data uji aktivitas penghambatan oleh Senyawa 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]benzensulfonamida

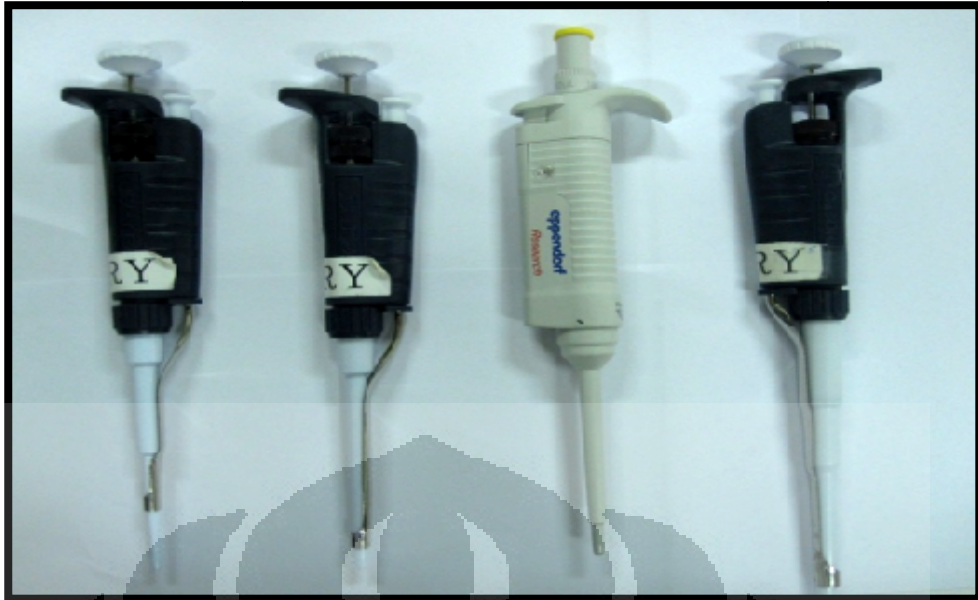
Konsentrasi Senyawa Uji (μM)	Serapan	Konsentrasi PG (pg/mL)	% Inhibisi
20	0,407	703713,722	
	0,406	707739,124	51,71
10	0,404	715875,781	
	0,363	911789,459	44,81
5	0,347	1006556,3	
	0,347	1006556,3	31,09
1	0,308	1297863,77	
	0,307	1306716,36	10,81

Tabel 4.6. Serapan pada sumuran Blanko, NSB, Bo dan TA

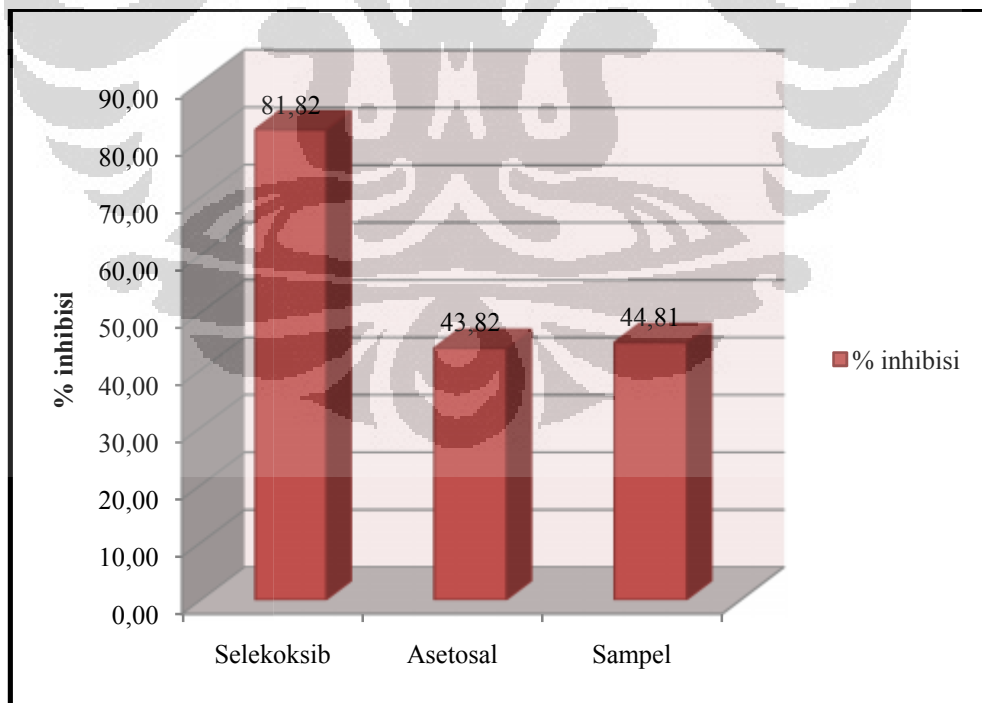
Sumuran	Serapan	Rata-rata Serapan
Blanko	0,116	0,113
	0,110	
NSB	0,003	0,002
	0,001	
Bo	1,317	1,2983
	1,262	
	1,316	
TA	0,987	



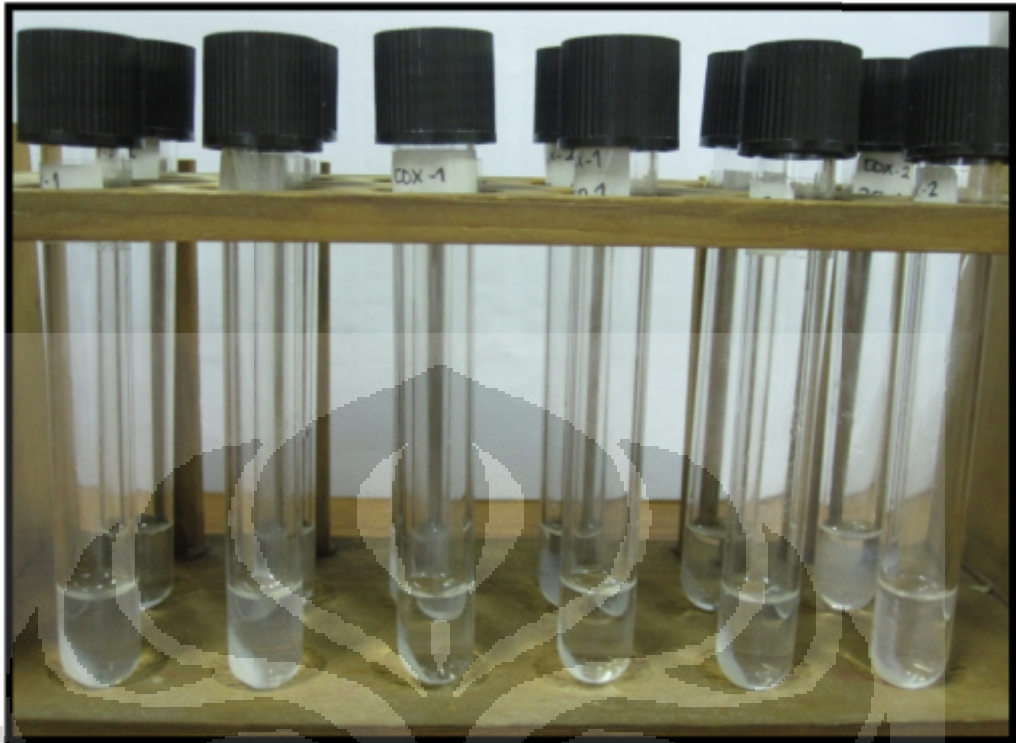
Gambar 4.1. Kurva standar skrining prostaglandin



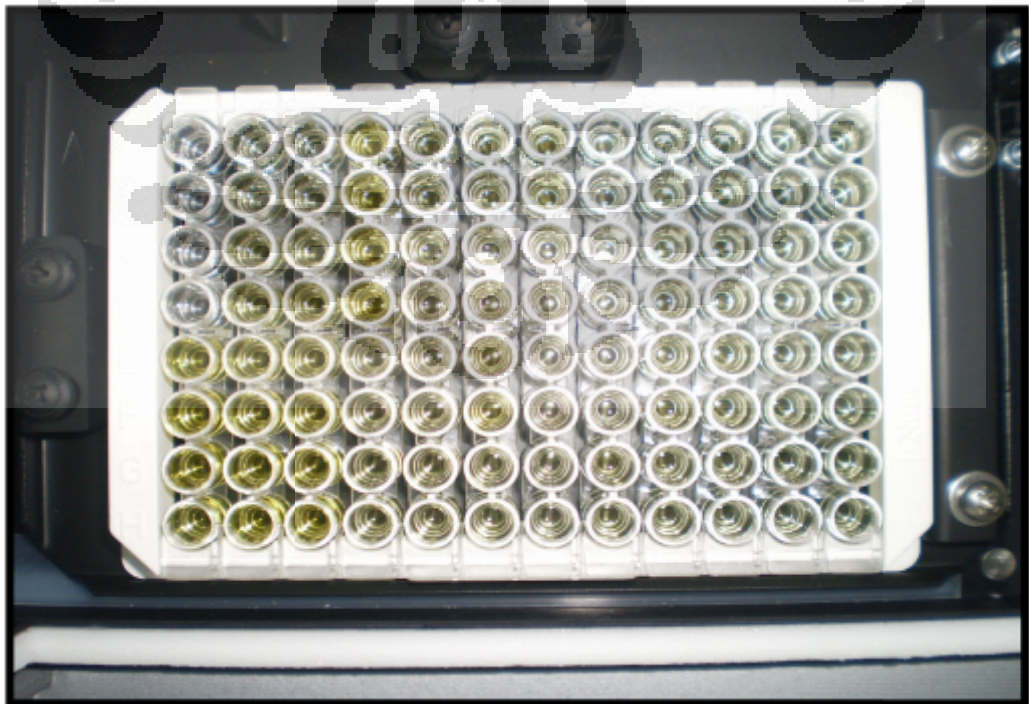
Gambar 4.2. Pipet mikro



Gambar 4.3. Histogram perbandingan % inhibisi COX-2 pada konsentrasi 10 μM



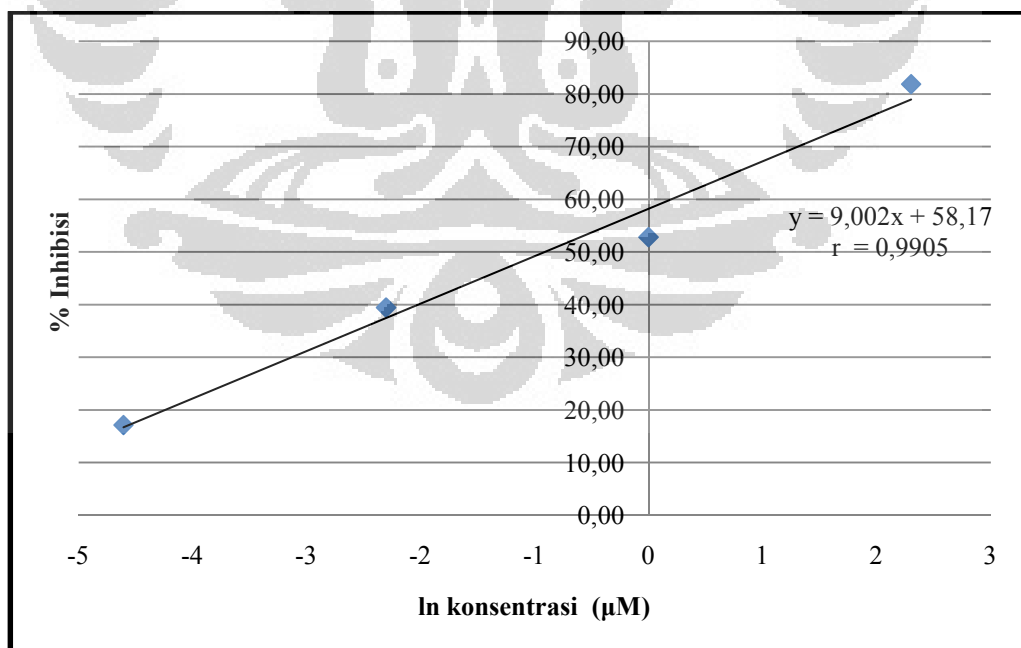
Gambar 4.4. Hasil pereaksian siklooksigenase



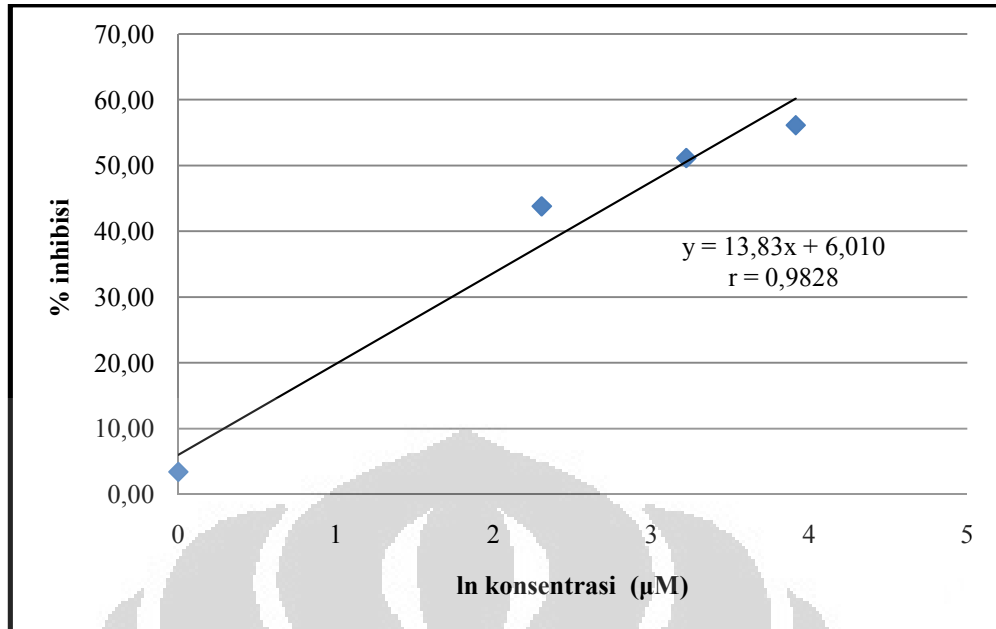
Gambar 4.5. Reaksi yang terjadi setelah penambahan reagen Ellman's



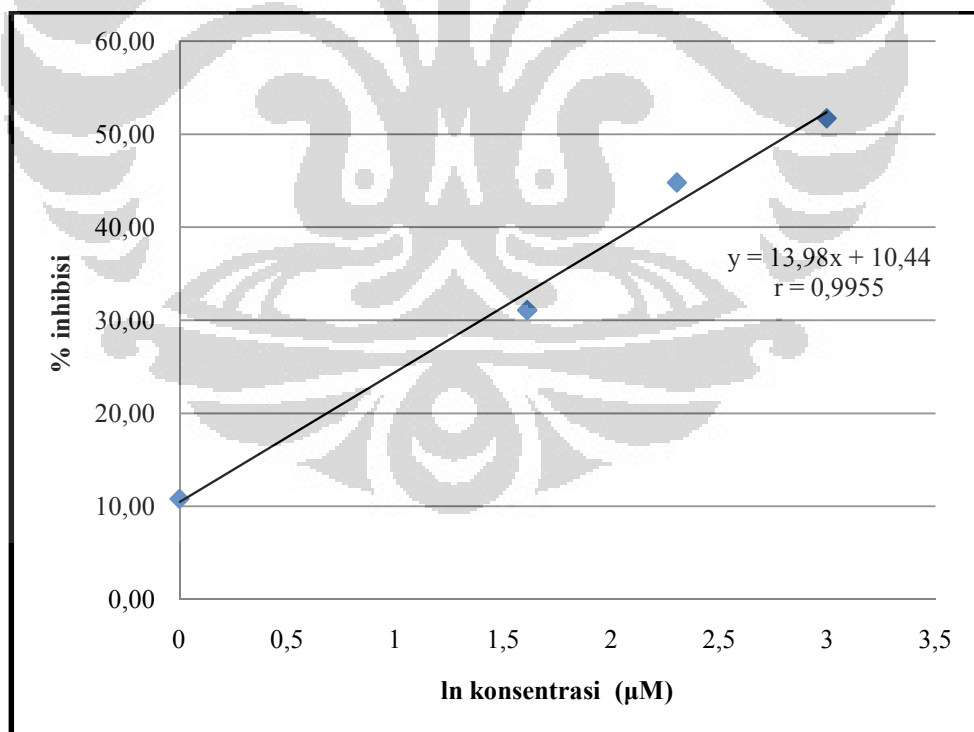
Gambar 4.6. Mikroplat reader (Elx808)



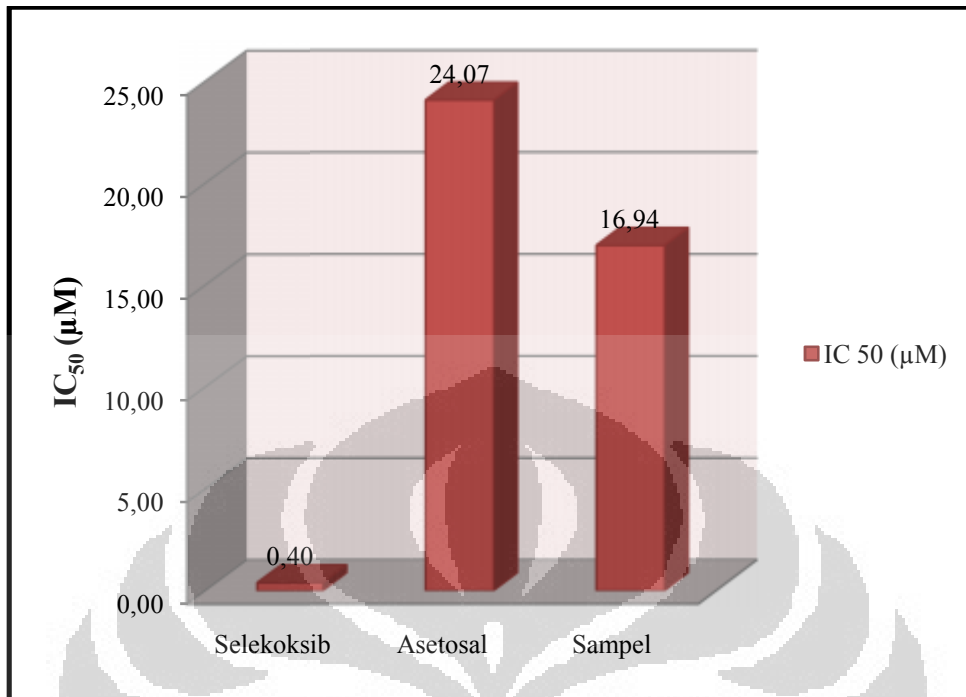
Gambar 4.7. Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada selekoksib



Gambar 4.8. Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada asetosal

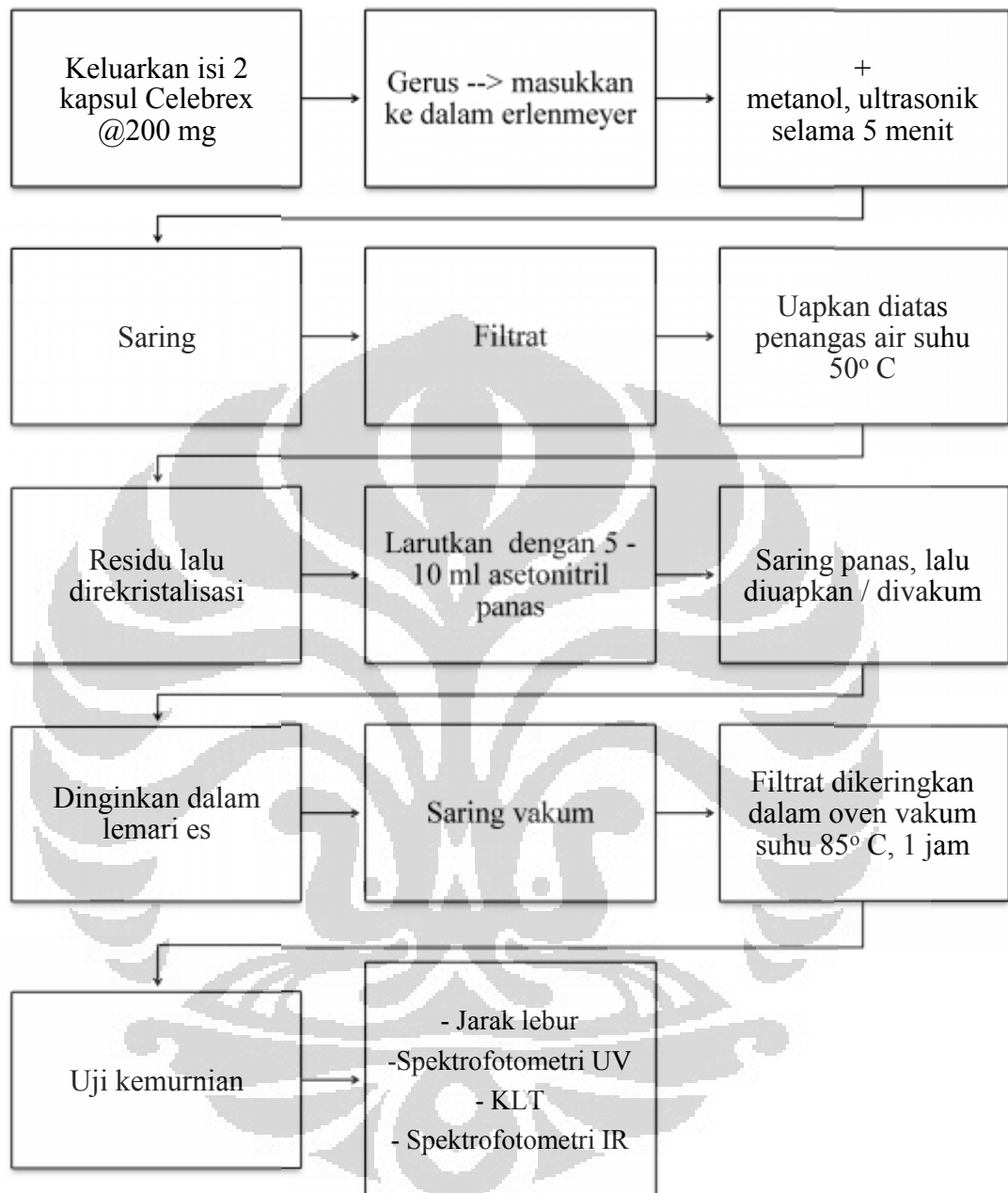


Gambar 4.9. Grafik ln konsentrasi terhadap % inhibisi COX-2 pada senyawa uji



Gambar 4.10. Histogram perbandingan IC₅₀ pada semua sampel inhibitor

Lampiran 1. Skema isolasi selekoksib dari Celebrex™



Lampiran 2. Hasil uji kemurnian selekoksib

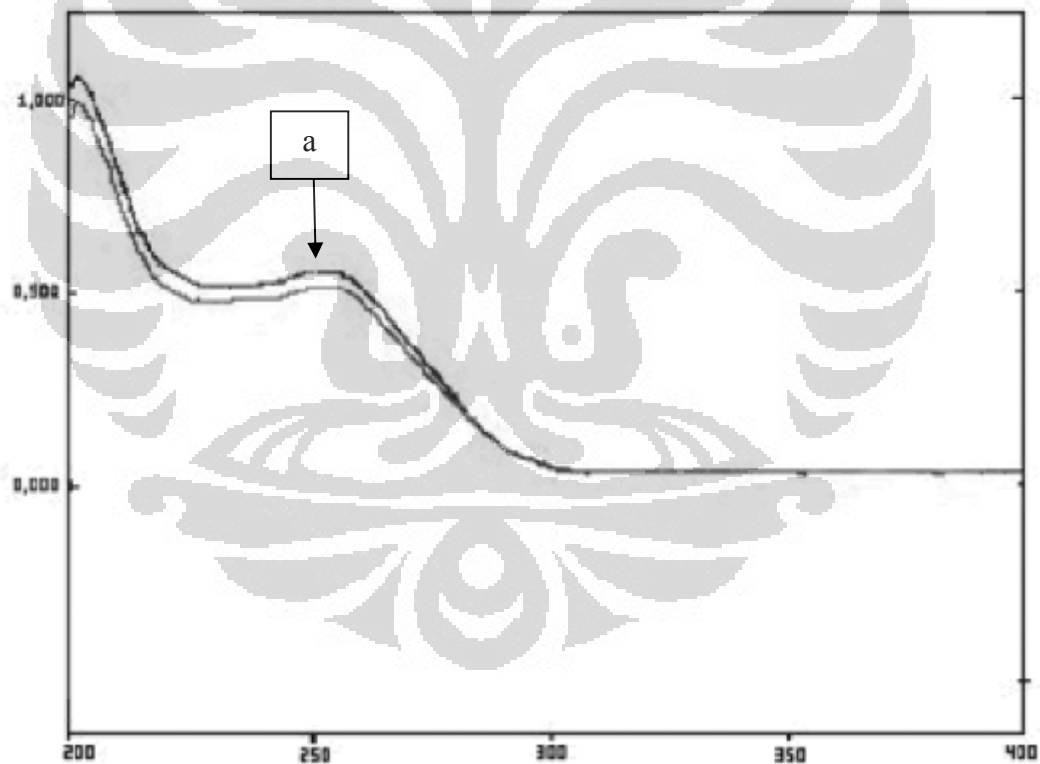
Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fabian Teixeira Primo dan Pedro E. Froehlich (2005).

a. Jarak lebur

Pembanding	Hasil isolasi
161,3-162,2°C	154-155°C dengan faktor koreksi alat +7°C

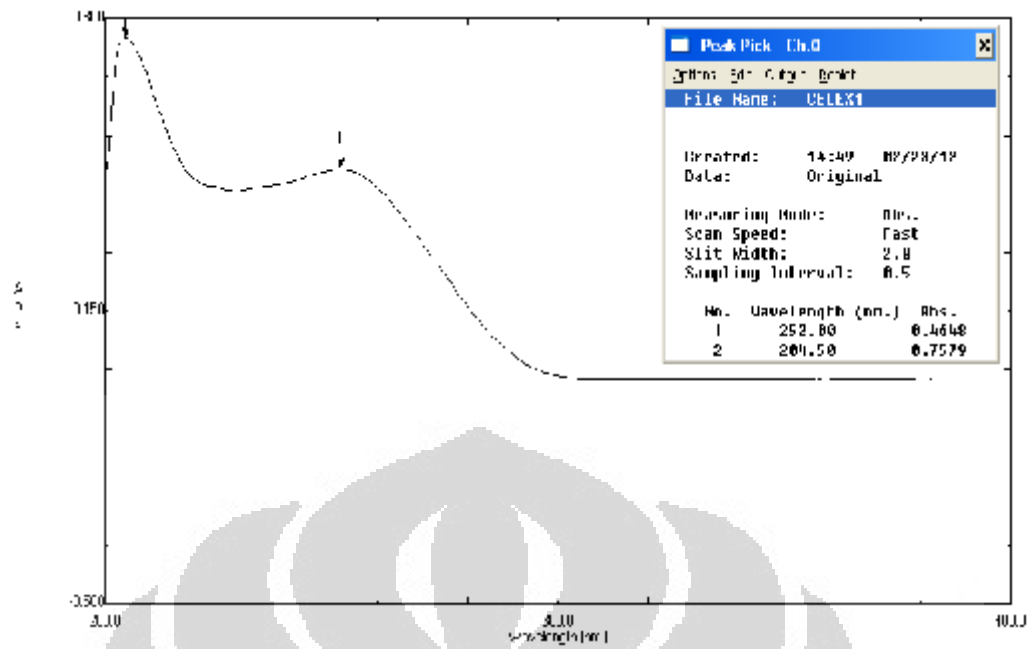
Keterangan: Isolasi celexocib dari kapsul Celebrax™ dari empat kali pengukuran yaitu memiliki jarak lebur 154-155°C

b. Spektrofotometri UV



Keterangan : a = serapan maksimum pada panjang gelombang maksimum.
Spektrum selekoksib dalam pelarut metanol memberikan panjang gelombang maksimum pada 252 nm.

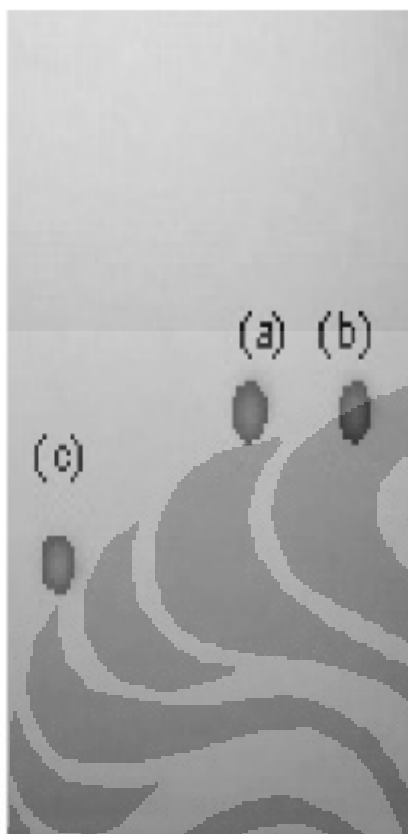
Gambar 1. Kurva serapan selekoksib pembanding



Keterangan: Larutan Selekoksib dengan konsentrasi 10 ppm dalam pelarut metanol memberikan panjang gelombang maksimum pada 252 nm dengan serapan maksimum yaitu 0,4648.

Gambar 2. Kurva serapan hasil isolasi selekoksib

c. Kromatografi Lapis Tipis



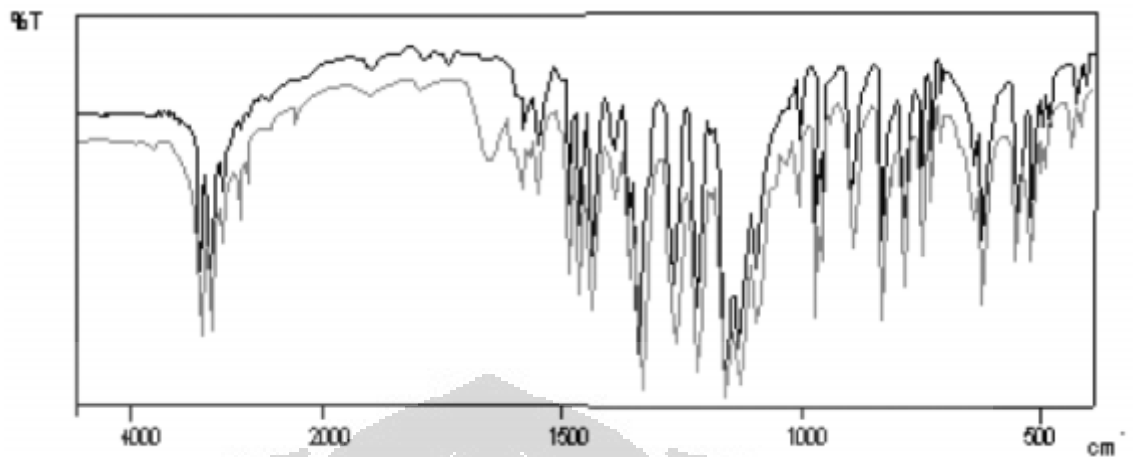
Gambar 3. Bercak KLT pembanding



Gambar 4. Bercak KLT hasil isolasi
selekoksib

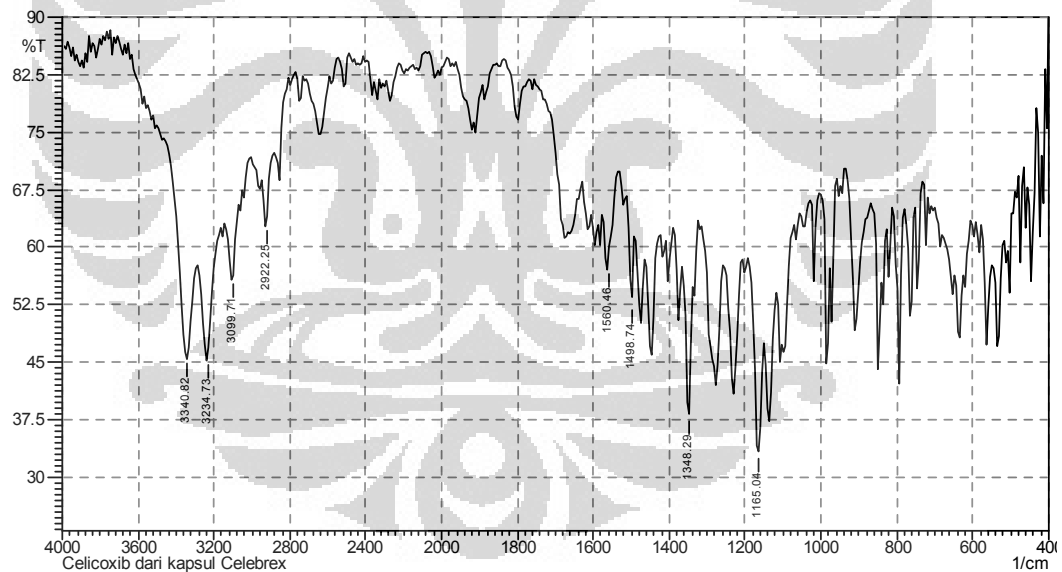
Keterangan: Gambar 3 [a = sampel isolasi celebrexTM, b = standar selekoksib, c = rofecoxib]
 Gambar 4 [kiri dan kanan = isolasi selekoksib dari CelebrexTM]
 kondisi: lempeng silika gel 60 dengan ketebalan 0,25 mm menggunakan fase gerak kloroform :etil asetat: eter (10:5:1,v/v/v). Dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 365 nm.Didapatkan satu bercak,dengan Rf 0,69 seperti yang terlihat pada Gambar 4.

d. Spektrofotometri IR



Keterangan : bilangan gelombang 1150-130 cm^{-1} menunjukkan gugus S=O, 1550-1600 menunjukkan gugus N-H dan 3300-3500 menunjukkan gugus NH_2 .

Gambar 5. Spektrum IR pembeding



Keterangan: Peak pada daerah bilangan gelombang 1165 dan 1348 cm^{-1} mengandung gugus S=O. Peak juga ditemukan pada daerah 1560 cm^{-1} mengandung gugus N-H, dan pada daerah 3234 dan 3340 cm^{-1} terdapat gugus NH_2 .

Gambar 6. Spektrum IR hasil isolasi selekoksib

Lampiran 3. Perhitungan penimbangan sampel**Selekoksib**

BM : 381,4

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

Konsentrasi pengenceran : 10 μM ; 1 μM ; 0,1 μM ; 0,01 μM

Konsentrasi : 100 μM

Perhitungan :

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$20 \mu\text{L} \cdot x = 1000 \mu\text{L} \cdot 100 \mu\text{M}$$

$$x = 5000 \mu\text{M} \cdot \text{BM}$$

$$x = 5000 \mu\text{M} \cdot 381,4$$

$$x = 5 \text{ mmol/L} \cdot 381,4$$

$$x = 1907 \text{ mg/L}$$

$$x = 1,907 \text{ mg/ml}$$

$$x = 9,79 \text{ mg/5ml}$$

Asetosal

BM : 180,2

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

Konsentrasi pengenceran : 50 μM ; 25 μM ; 10 μM ; 1 μM

Konsentrasi : 100 μM

Perhitungan :

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$20 \mu\text{L} \cdot x = 1000 \mu\text{L} \cdot 100 \mu\text{M}$$

$$x = 5000 \mu\text{M} \cdot \text{BM}$$

Lampiran 3. Lanjutan

$$x = 5000 \mu\text{M} \cdot 180,2$$

$$x = 5 \text{ mmol/L} \cdot 180,2$$

$$x = 901 \text{ mg/L}$$

$$x = 0,901 \text{ mg/ml} = 4,51 \text{ mg/5 ml}$$

Senyawa uji 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida

BM senyawa uji = 417,48

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

Konsentrasi pengenceran : 20 μM ; 15 μM ; 10 μM ; 5 μM

Konsentrasi : 100 μM

Perhitungan :

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$20 \mu\text{L} \cdot x = 1000 \mu\text{L} \cdot 100 \mu\text{M}$$

$$x = 5000 \mu\text{M} \times \text{BM}$$

$$x = 5 \text{ mmol/L} \times 417,48$$

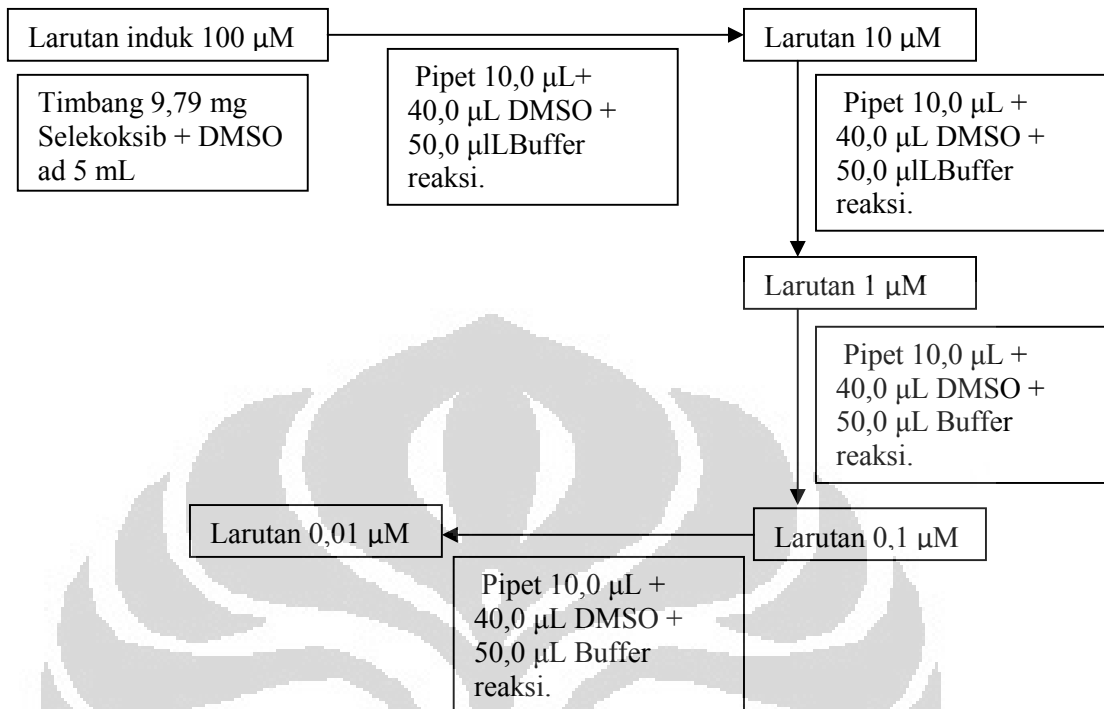
$$x = 2087,4 \text{ mg/L}$$

$$x = 2,0874 \text{ mg/mL}$$

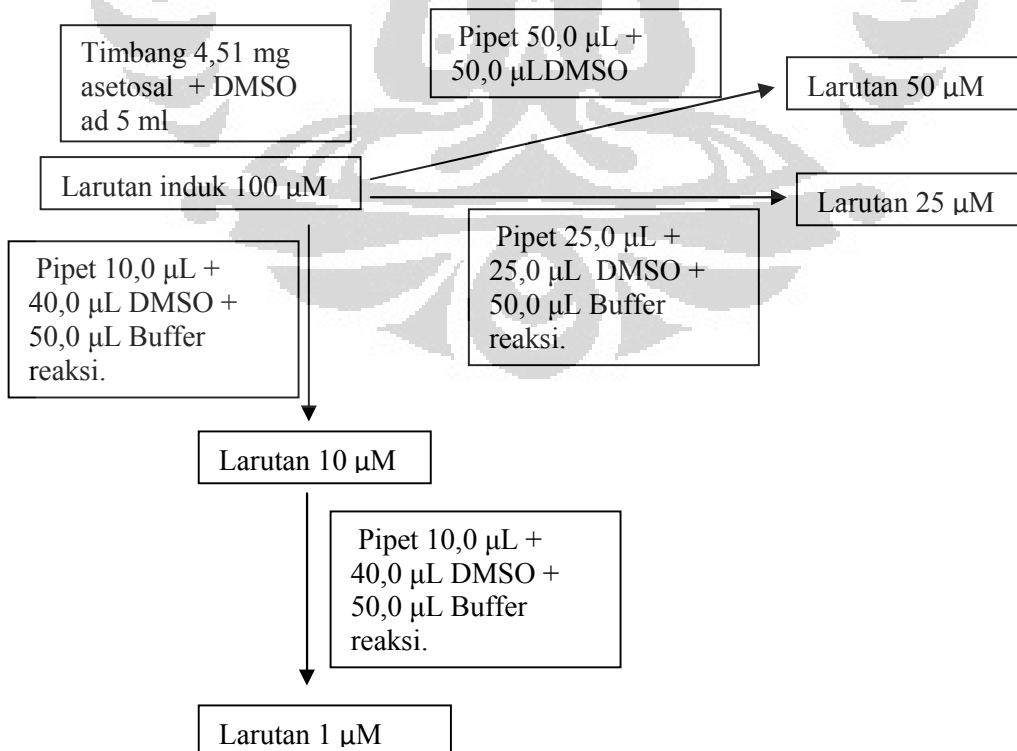
$$x = 10,44 \text{ mg/5 mL}$$

Lampiran 4. Pembuatan larutan inhibitor

Selekoksib

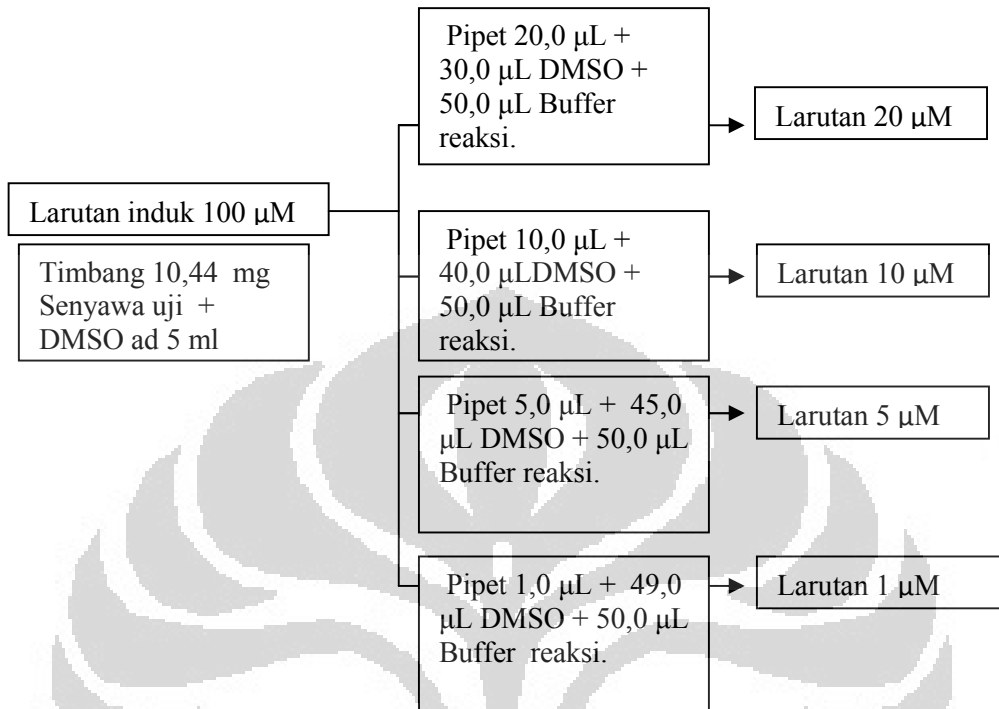


Asetosal

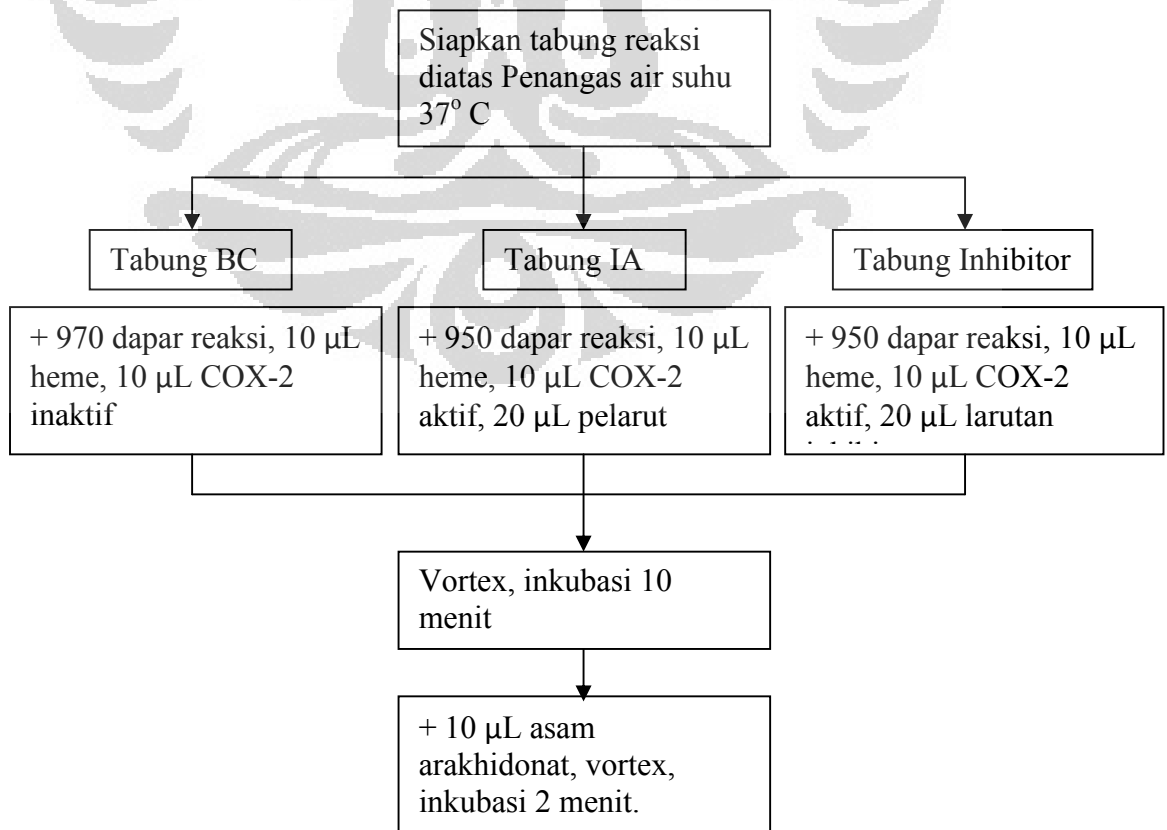


Lampiran 4. Lanjutan

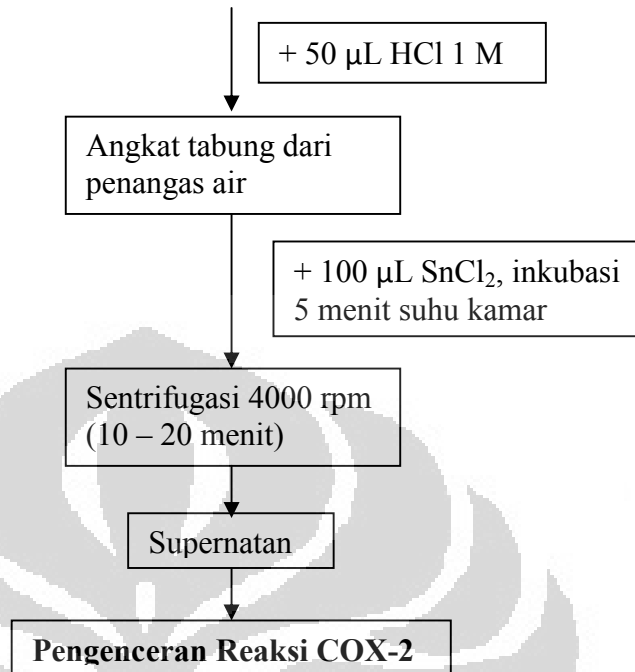
Senyawa uji 4-[(E)-2-{4-okso-3-(4-metilfenil)-kuinazolin-2-il}vinil]bensensulfonamida



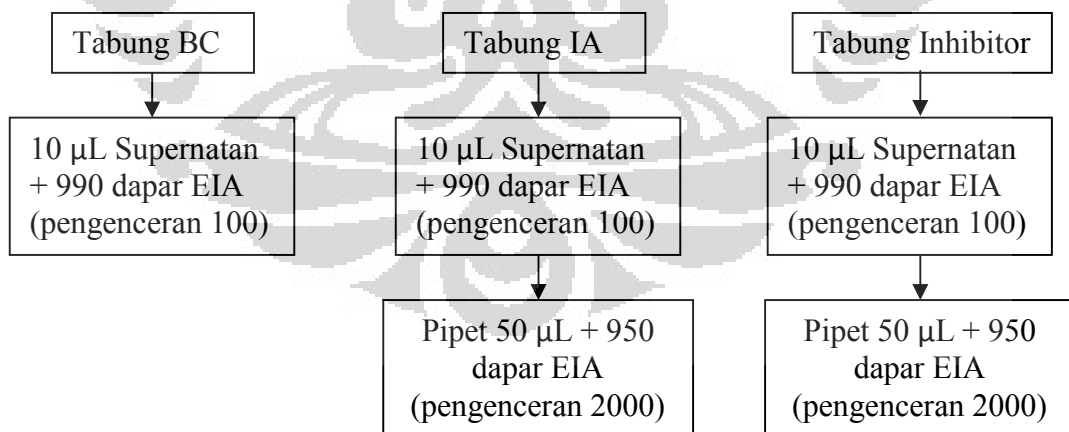
Lampiran 5. Bagan pelaksanaan reaksi COX-2



Lampiran 5. Lanjutan



Lampiran 6. Bagan pengenceran reaksi COX-2



Lampiran 7. Cara perhitungan B/Bo

$$Bo \text{ terkoreksi} = \overline{Bo} - \overline{NSB}$$

$$\%B/Bo \text{ Sn} = \frac{S_n - \overline{NSB}}{Bo \text{ terkoreksi}} \times 100$$

S= serapan

Sumuran	Data Mentah	Rata-rata	Setelah koreksi
Total Aktivitas	0,978		
NSB	0,003 0,001	0,002	
Bo	1,317 1,262 1,316	1,298	1,296

Konsentrasi Prostaglandin (pg/ml)	Data Mentah		Setelah dikoreksi		B/Bo		Rata-rata B/Bo
	Serapan	Serapan	Serapan	Serapan	Serapan	Serapan	
	1	2	1	2	1	2	
2000	0,173	0,165	0,171	0,163	0,132	0,126	0,129
1000	0,227	0,229	0,225	0,227	0,174	0,175	0,1745
500	0,313	0,370	0,311	0,368	0,240	0,284	0,2615
250	0,435	0,473	0,433	0,471	0,334	0,363	0,3485
125	0,609	0,593	0,607	0,591	0,468	0,456	0,462
62,5	0,801	0,797	0,799	0,795	0,617	0,613	0,615
31,5	0,877	0,888	0,875	0,886	0,675	0,683	0,679
16,5	0,953	0,953	0,951	0,951	0,734	0,734	0,734

Lampiran 8. Cara menentukan persamaan garis kurva standar prostaglandin

$$\text{Logit } B/B_0 = \ln \left[\frac{B/B_0}{1-B/B_0} \right]$$

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Konsentrasi prostaglandin (pg/ml)	B/B ₀	Logit B/B ₀ (Sb Y)	Ln Konsentrasi (Sb X)	Persamaan garis
2000	0,129	-1,911	7,601	Y = -0,63 ln(x) + 2,905 r = 0,9960
1000	0,1745	-1,555	6,908	
500	0,2615	-1,036	6,215	
250	0,3485	-0,625	5,521	
125	0,462	-0,152	4,828	
62,5	0,615	0,468	4,135	
31,25	0,679	0,750	3,442	
15,63	0,734	1,013	2,749	

Lampiran 9. Menghitung konsentrasi prostaglandin berdasarkan persamaan kurva standar prostaglandin (COX Ovine, 2010)

Senyawa uji konsentrasi 20 μM mempunyai nilai logit B/Bo adalah 0,312 seperti pada tabel 4.2

$$\text{Logit B/Bo} = \ln \left[\frac{0,312}{1-0,312} \right] = -0,791$$

Maka $y = -0,63 \ln(x) + 2,905$

$$-0,791 = -0,63 \ln(x) + 2,905$$

$$-3,696 = -0,63 \ln(x)$$

$$\ln(x) = 5,865$$

$$x = \text{shift ln } 5,865$$

$$x = 352,3 \text{ dikali dengan faktor pengenceran}$$

$$x = 352,3 \times 2000$$

$$x = 704528,717 \text{ pg/ml}$$

Lampiran 10. Menghitung koefisien variasi, standar deviasi, dan persen inhibisi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum X}{n}$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \left(\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{konsentrasi prostaglandin IA} - \text{prostaglandin sampel}}{\text{Konsentrasi prostaglandin IA}} \times 100$$

Lampiran 11. Kit enzim immunoassay (EIA) nomor katalog 560101

Macam	Jumlah	Penyimpanan
PG screening EIA Antiserum	1 vial	-20°C
PG screening EIA AChE	1 vial	-20°C
tracer		
PG screening EIA standar	1 vial	-20°C
Dapar EIA	2 vial	Suhu ruangan
Dapar Cuci	1 vial	Suhu ruangan
Tween 20	1 vial	Suhu ruangan
IG G yang dilapisi pada plate	1 plate	4°C
96 sumuran plate	1 buah	Suhu ruangan
Reagen Ellman's	3 vial	-20°C
Dapar reaksi	1 vial	-20°C
COX-2	1 vial	-80°C
Heme	1 vial	-20°C
Asam arakidonat(substrat)	1 vial	-20°C
Kalium Hidroksida(KOH)	1 vial	-20°C
Asam klorida(HCl)	1 vial	-20°C
Stano Klorida	1 vial	-20°C

Lampiran 12. Sertifikat analisis asetosal

山东新华制药股份有限公司
Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd.
14 Dongyi Road, Zhang Dian District, Zibo, Shandong, P.R. China

Certificate of Analysis 41082

产品名称: 阿司匹林颗粒 Name of Product: ACETYLSALICYLIC ACID DC100	取样日期: 2010-04-16 Sampling Date	报告日期: 2010-04-19 Report Date
批号: 100401 Batch No	生产日期: 2010-04-08 Date of Manufacturing	失效期: 2011-04 Expiry Date
批量: 0.3 kg Quantity	检验记录号: 3012015 Record No	报告编号: 3012015 Report No
标准依据: BP2007/USP32/EP6.0 Reference Standard		

检验项目 Items	检验标准 Specifications	检验结果 Results
外观 Appearance	白色颗粒 White granular	白色颗粒 White granule
鉴别: (BP/EP) A. 红外 Identification(BP/EP) A. IR-spectrum	应符合规定 Complies	符合规定 Complies
B. 水杨酸熔点(°C) B. melting point of salicylic acid(°C)	156-161	158.1
(USP) A. 三价铁反应试验 (USP) A. Ferric Acid reaction test	应符合规定 Complies	符合规定 Complies
B. 红外 B. IR-spectrum	应符合规定 Complies	符合规定 Complies
碳酸钠溶液不混浊 Substances insoluble in Sodium Carbonate-TS	应澄清 Clear	澄清 Clear
游离水杨酸(%) Limit of free Salicylic Acid(%)	≤0.1	≤0.03
重金属(%) Heavy metals(%)	≤0.001	≤0.0010
干燥失重(%) Loss on drying(%)	≤0.5	0.03
易炭化物 Readily carbonization substances	≤对照液Q ≤Matching Fluid Q	≤对照液Q ≤Matching Fluid Q
硫酸盐(%) Sulfates(%)	≤0.04	≤0.02
氯化物(%) Chloride(%)	≤0.014	≤0.011
灼烧残渣(%) Residue on ignition(%)	≤0.05	0.04
含量(以干燥品计)(%) Assay (on dried basis)(%)	99.5-100.5	100.1
澄清液的颜色和色度 Clarity and Color of alcohol solution	澄清, 无色 Clear and colourless	澄清, 无色 Clear and colourless
有关物质(HPLC) - 单个最大杂质(%) Related Substances(HPLC) Largest Single impurity(%)	≤0.1	0.03
总杂质(%) Total impurities(%)	≤0.25	0.061
粒度: 14-60目(%) Particle Size: 14-60 mesh(%)	≥70	94.1
通过80目筛(%) Pass through 80 mesh(%)	≤10	1.9
残留溶剂(%) Residual solvents(%)	LOD≤0.5	0.03

结论: 本品按 BP2007/USP32/EP6.0 检验, 上述项目符合规定
Conclusion: The product is tested in accordance with BP2007/USP32/EP6.0. The above items meet the requirement.

QA放行人: 张祥祥 放行日期: 2010.4.19 质检负责人: 袁家 复核者: 袁家 报告者: 袁家
Released by QA: 张祥祥 Release Date: 2010.4.19 QC Manager: 袁家 Rechecked by: 袁家 Reported by: 袁家

Lampiran 13. Sertifikat kit *enzyme immunoassay* (EIA)