

UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN SENYAWA ETIL 4-{4-OKSO-2-[(E)-2-
{4-SULFAMOILFENILETENIL}-3,4-DIHIDROKUINAZOLIN-
3-IL]}BENZOAT TERHADAP AKTIVITAS
SIKLOOKSIGENASE-2**

SKRIPSI

**TITIK NURDAYANI
0906601670**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI PENGHAMBATAN SENYAWA ETIL 4-{4-OKSO-2-[(E)-2-
{4-SULFAMOILFENILETENIL}-3,4-DIHIDROKUINAZOLIN-
3-IL]}BENZOAT TERHADAP AKTIVITAS
SIKLOOKSIGENASE-2**

SKRIPSI

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

**TITIK NURDAYANI
0906601670**

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

SURAT 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, Juli 2012



Titik Nurdayani

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Titik Nurdayani

NPM : 0906601670

Tanda Tangan : 

Tanggal : 13 Juli 2012


HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Titik Nurdayani
NPM : 0906601670
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul Proposal : Uji Penghambatan Senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat terhadap Aktivitas 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 ()
Pembimbing II : Dr. Arry Yanuar, M.Si ()
Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt ()
Penguji II : Prof. Dr. Atiek Soemiati M.S. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 13 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulisan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, penulis tidak akan mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Drs. Hayun, M.Si selaku pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Arry Yanuar, M.Si selaku pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Endang Hanani Apt., MS selaku pembimbing akademis yang telah membimbing penulis selama mengikuti perkuliahan di farmasi.
4. Prof. Dr. Yahdiana Harahap selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membimbing dan membantu selama mengikuti perkuliahan di farmasi.
5. Dra. Azizahwati, M.S., Apt selaku ketua program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas pengarahan yang diberikan dalam penyusunan skripsi ini.
6. Seluruh staff pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan bimbingannya selama mengikuti perkuliahan.
7. Kedua orang tua (alm), kakak-kakak serta seluruh keluarga yang sangat penulis cintai, yang tidak pernah berhenti mendoakan, memberikan kasih sayang, semangat dan dukungan material yang tidak terhitung nilainya.
8. Sahabat-sahabat didalam dan diluar kampus yang telah membantu, memberi semangat dan dukunganya serta teman-teman seperjuangan di Kimia Kuantitatif yang telah bekerja sama selama penelitian.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Tentunya dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Penulis

Juli 2012



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

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

Nama : Titik Nurdayani
NPM : 0906601670
Program Studi : Ekstensi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
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 Penghambatan Senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat terhadap Aktivitas Siklooksigenase-2”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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 : 13 Juli 2012

Yang menyatakan



(Titik Nurdayani)

ABSTRAK

Nama : Titik Nurdayani
Program Studi : Farmasi Ekstensi
Judul : Uji Penghambatan Senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat terhadap Aktivitas Siklooksigenase-2

Senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat merupakan senyawa baru yang mempunyai kemiripan struktur dengan senyawa diarilheterosiklik, sedangkan sebagian besar inhibitor selektif siklooksigenase-2 merupakan senyawa diarilheterosiklik, sehingga senyawa tersebut diprediksi mempunyai aktivitas menghambat konversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin melalui jalur siklooksigenase. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek penghambatan siklooksigenase-2 (COX-2) oleh senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat. Uji aktivitas penghambatan COX-2 dilakukan dengan menggunakan kit *COX (ovine) inhibitor screening assay*. Prostaglandin yang terbentuk ditentukan menggunakan metoda *Enzyme Immunoassay* dan intensitas warna yang dihasilkan diukur serapannya menggunakan *plate reader* pada panjang gelombang 415 nm. Dari hasil uji didapatkan nilai IC_{50} senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat adalah 16,91 μM . Sebagai pembanding, pengujian juga dilakukan terhadap asetosal dan selekoksib. Hasil yang diperoleh untuk nilai IC_{50} asetosal dan selekoksib berturut-turut yaitu 24,97 μM dan 0,43 μM . Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat mempunyai potensi inhibisi lebih kuat dibandingkan asetosal tetapi masih lebih rendah dibandingkan selekoksib.

Kata kunci : Siklooksigenase-2 (COX-2), inhibitor COX-2, *Enzyme Immunoassay* (EIA), Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat.

xiv + 68 halaman : 25 gambar, 10 tabel, 9 lampiran

Daftar referensi : 33 (1990 – 2012)

ABSTRACT

Name : Titik Nurdayani
Program study : Pharmacy Extention
Title : Inhibition Test of Ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate Compound for Cyclooxygenase-2 Activity.

Ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate compound is a new drug that has structural similarities with diaryl heterocyclic compound, while some of cyclooxygenase-2 selective inhibitor is a diaryl heterocyclic compound, so that the compound is predicted to have activity inhibits the conversion of arachidonic acid into prostaglandins through the cyclooxygenase. The aim of this study is to the test inhibitory effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) by the ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate compound. Study of COX-2 inhibitory activity carried out by using a kit COX (ovine) inhibitor screening assay. Prostaglandins which were formed was determined using the method of Enzyme Immunoassay and the resulting color intensity was measured using a plate reader absorbance at a wavelength of 415 nm. From the test results obtained IC_{50} value of ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate compound was 16.91 μ M. For comparison, the tests were also done on acetosal and celecoxib. The results obtained for acetosal and celecoxib IC_{50} values were 24.97 μ M and 0.43 μ M, respectively. The results showed that the ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate compound has stronger inhibitory potency compared to acetosal but still lower than celecoxib.

Key Words : Cyclooxygenase-2 (COX-2), COX-2 inhibitor, Enzyme Immunoassay (EIA), ethyl 4-{4-oxo-2-[(E)-2-{4-sulfamoylphenyletenyl}-3,4-dihydroquinazolin-3-yl]}benzoate.
xiv + 68 pages : 25 pictures, 10 tables, 9 appendixes
Bibliography : 33 (1990 – 2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Enzim	4
2.2. Prostaglandin	6
2.3. Siklooksigenase	7
2.4. Inhibitor Selektif Siklooksigenase-2	8
2.5. Antigen	9
2.6. Antibodi	11
2.7. <i>Immunoassay</i>	14
2.8. Uji Aktivitas Penghambatan Siklooksigenase	15
2.9. <i>EIA Plate Reader</i>	18
2.10. Asetosal	21
2.11. Selekoksisb	22
2.12. Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin -3-il]}benzoat.....	23
BAB III. METODE PENELITIAN	25
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	25
3.2. Alat	25
3.3. Bahan	25
3.4. Cara Kerja	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1. Uji Aktivitas Penghambatan COX-2	32
4.2. Analisis Data	36
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1. Kesimpulan	39
5.2. Saran	39
DAFTAR ACUAN	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Rumus struktur asam prostanoat dan asam arakhidonat	6
2.2. Bagan pembentukan prostaglandin	7
2.3. Struktur dasar Immunoglobulin (Ig)	13
2.4. Skema proses EIA	16
2.5. Skema sistem optik EIA <i>plate reader</i>	20
2.6. Struktur kimia Asetosal	21
2.7. Struktur kimia Selekoksisb	22
2.8. Struktur kimia Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat	23
3.1. <i>Plate reader</i> Biotek Elx808	43
3.2. <i>Plate reader</i> dan perangkat komputer	43
3.3. <i>Plate</i> 96 sumuran	44
3.4. Bahan-bahan reaksi inhibisi COX (ovine)	44
3.5. Tabung-tabung pelaksanaan reaksi inhibisi COX	45
3.6. Pelaksanaan reaksi diatas penangas air suhu 37° C	45
4.1. Reaksi katalisis oleh asetilkolinesterase	33
4.2. Kurva standar Prostaglandin	46
4.3. Kurva inhibisi Selekoksisb	46
4.4. Kurva inhibisi Asetosal	47
4.5. Kurva inhibisi Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat	47
4.6. Diagram perbandingan IC ₅₀ antara Selekoksisb, Asetosal dan sampel senyawa uji	48
4.7. Kurva Spektrofotometri UV Selekoksisb	65
4.8. Bercak KLT pembanding Selekoksisb	66
4.9. Hasil KLT Selekoksisb dari Celebrex	66
4.10. Kurva Spektrofotometri IR dari Pembanding Selekoksisb	67
4.11. Kurva Spektrometri IR Selekoksisb hasil isolasi dari Celebrex	67

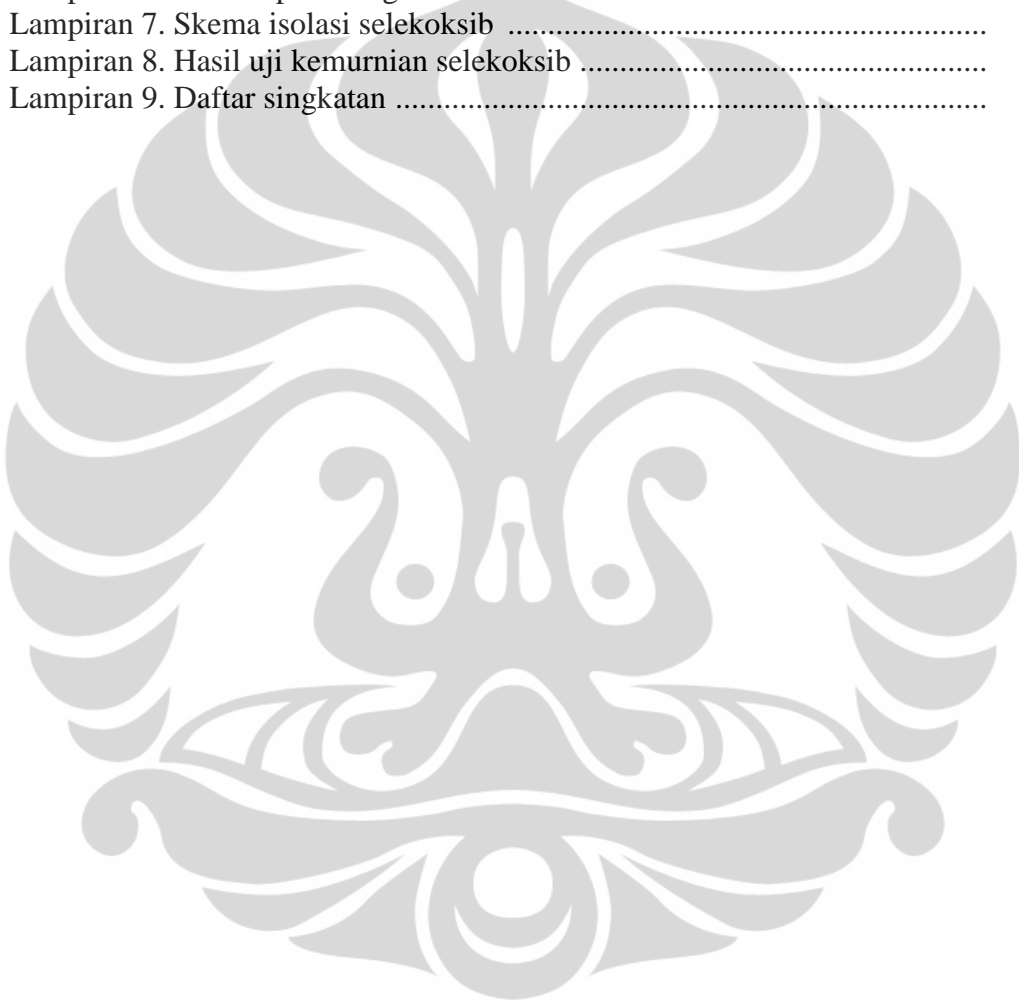
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Karakteristik Siklooksigenase-1 dan Siklooksigenase-2	8
3.1. Kondisi penyimpanan bahan-bahan pereaksi	49
4.1. Perbandingan data IC ₅₀ hasil pengujian dengan penelitian sebelumnya ..	37
4.2. Data Kurva kalibrasi standar prostaglandin	49
4.3. Data serapan Blanko, NSB, Bo, IA 100% dan BC	50
4.4. Data uji aktivitas penghambatan oleh Selekoksisib	50
4.5. Data uji aktivitas penghambatan oleh Asetosal	51
4.6. Data uji aktivitas penghambatan oleh etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat	51
4.7. Data ringkasan hasil perhitungan	52
4.8. Hasil jarak lebur Selekoksisib	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar <i>quality control</i> kit EIA	54
Lampiran 2. Sertifikat analisis asetosal	55
Lampiran 3. Perhitungan penimbangan sampel	56
Lampiran 4. Cara kerja	57
Lampiran 5. Format lempeng sumur uji sampel	61
Lampiran 6. Contoh perhitungan manual	62
Lampiran 7. Skema isolasi selekoksib	64
Lampiran 8. Hasil uji kemurnian selekoksib	65
Lampiran 9. Daftar singkatan	68



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Obat antiinflamasi non steroid telah digunakan dalam pengobatan sejak lebih dari satu abad yang lalu. Pada tahun 1899 asam asetil salisilat sebagai obat antiinflamasi non steroid sintetis dengan kerja antiinflamasi yang kuat untuk pertama kalinya digunakan dalam pengobatan simptomatis penyakit rematik. Pada tahun berikutnya mulai digunakan obat-obat lain untuk tujuan pengobatan yang sama, antara lain fenilbutazon (1949), indometasin (1963), dan ibuprofen (1969). Penemuan mekanisme kerja golongan obat ini, yaitu penghambatan siklooksigenase yang terdapat dalam dua isoform - siklooksigenase-1 dan -2, telah mempercepat upaya pengembangan obat ini terutama penghambat selektif siklooksigenase-2 (Kartasmita, 2002).

COX atau Prostaglandin H sintase (PGHS) berfungsi sebagai katalis pada tahap pertama proses biosintesis prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin. Ada dua bentuk isoform dari siklooksigenase, yaitu COX-1 (PGHS-1; PHS-1, Prostaglandin endoperoksid sintase-1) dan COX-2 (PGHS-2, PHS-2, Prostaglandin endoperoksid sintase-2). COX-1 adalah bentuk enzim utama yang ditemukan di banyak 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, W.Y., Yang, X., Jin, D., & Zhu, X., 2004).

Senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat merupakan senyawa baru hasil sintesis Hayun dkk (Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyono, S., 2011). Struktur senyawa tersebut mempunyai kemiripan dengan senyawa diarilheterosiklik. Kebanyakan inhibitor selektif siklooksigenase-2 merupakan senyawa diarilheterosiklik (Dannhardt, G. & S. Laufer, 2000), sehingga diduga senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat tersebut

memiliki aktivitas sebagai inhibitor siklooksigenase-2 (Hudiyono, S., & Hayun, 2011). Penemuan obat inhibitor selektif COX-2 diharapkan menunjukkan kerja antiinflamasi yang setara dengan obat antiinflamasi non steroid klasik tetapi dengan toksisitas lebih ringan pada saluran gastrointestinal dan risiko kardiovaskular.

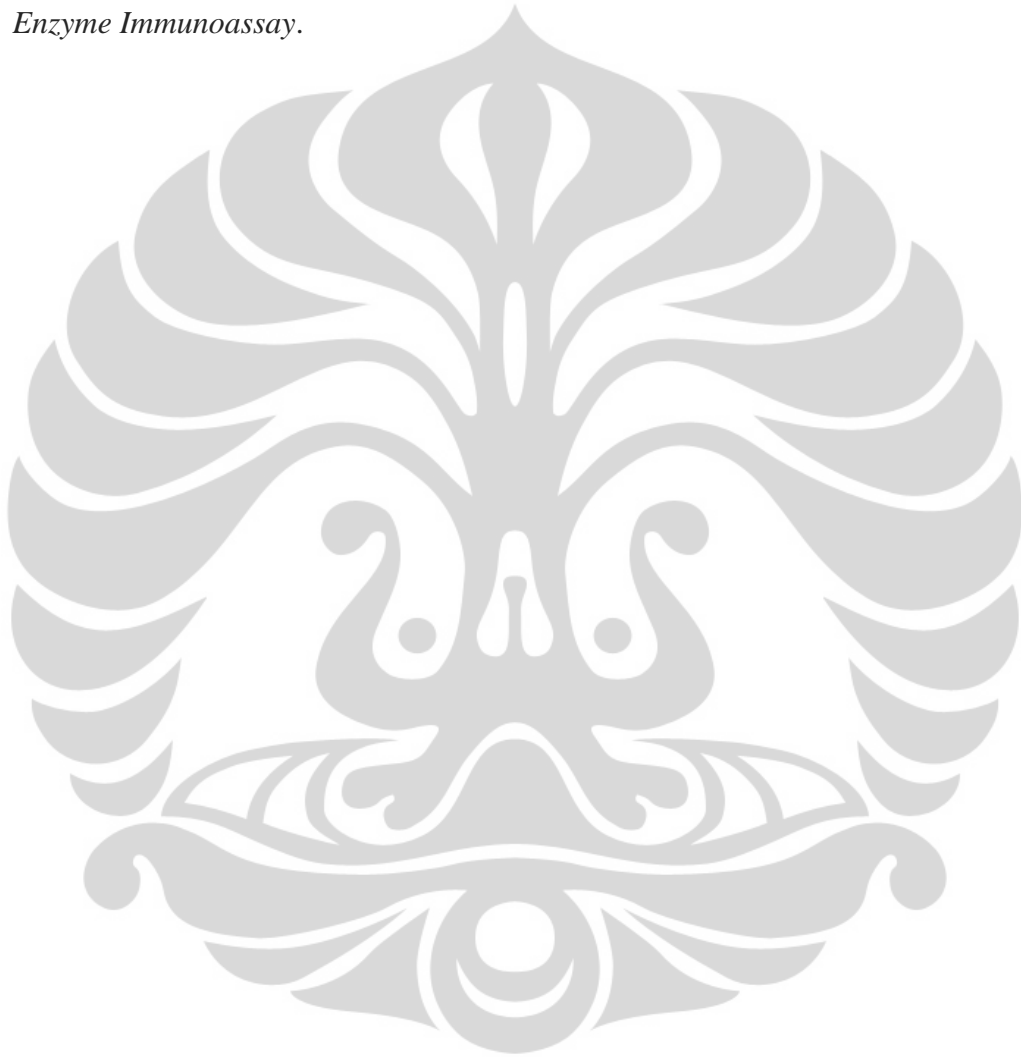
Beberapa metode yang sering digunakan untuk menguji aktivitas penghambatan siklooksigenase-1 dan siklooksigenase-2 yaitu menggunakan *Enzyme Immunoassay* (EIA), pengukuran Malondialdehid (MDA), pengukuran N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) dan pengukuran darah manusia lengkap. Dari beberapa cara pengukuran tersebut peneliti menggunakan *Enzyme Immunoassay* karena cara pengukurannya yang lebih sederhana, sensitif dan selektivitasnya terhadap siklooksigenase-1 dan siklooksigenase-2.

Enzyme immunoassay (EIA) adalah *Immunoassay* yang paling sensitif yang dapat dipakai untuk penghitungan secara kuantitatif dengan konsentrasi sangat rendah (misalnya, hormon, vitamin, obat terapeutik). Keunggulan EIA yaitu mudah diotomatisasi dan diinstrumentasi serta merupakan pemeriksaan deteksi antibodi biasanya merupakan pemeriksaan tidak langsung yang bergantung pada pemakaian konjugat enzim-antibodi anti IgG atau IgM manusia. (Sacher, Ronald A, & McPherson Richard A, 2002).

Atas dasar perkembangan diatas maka peneliti melakukan uji penghambatan dari senyawa Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat terhadap aktivitas siklooksigenase-2 menggunakan metode *Enzyme Immunoassay* (EIA). Aktivitas penghambatan siklooksigenase-2 menggunakan metode ini ditentukan berdasarkan prostaglandin yang terbentuk dari hasil reaksi menggunakan *kit COX (ovine) inhibitor screening assay* yang selanjutnya intensitas warna yang dihasilkan diukur serapanya menggunakan EIA *plate reader*. Dimana dari hasil pengukuran tersebut akan didapatkan grafik persen inhibisi dengan konsentrasi inhibitor untuk menentukan nilai IC₅₀.

1.2. Tujuan Penelitian

Menentukan aktifitas penghambatan terhadap siklooksigenase-2 dari senyawa etil 4-{4-okso 2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}3,4 dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat dan menentukan nilai IC50 senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat menggunakan metode *Enzyme Immunoassay*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim adalah suatu kelompok protein yang menjalankan dan mengatur perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Sel-sel dalam tubuh setingkat demi setingkat dapat membentuk enzim yang berlainan, dimana enzim tersebut merupakan suatu protein yang pembentukannya identik dengan pembentukan protein yang mekanismenya sangat kompleks. Sehingga dapat diartikan enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi biologis atau biokatalis. Enzim merupakan biomolekul yang sangat spesifik dan mempunyai daya katalitik besar. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi yang terjadi dalam sel hidup tanpa mengalami perubahan. Reaktan yang dikatalisnya disebut substrat. Setiap enzim bersifat spesifik terhadap substrat untuk menghasilkan produk tertentu (Marks, D.B., Marks, A.D., & Smith, C., 2000).

2.1.1 Reaksi Enzimatis

Reaksi enzimatis dapat digambarkan sebagai berikut:

Reaksi:



E = Enzim

S = Substrat

ES = Kompleks Enzim-Substrat

P = Produk atau hasil akhir

Mekanisme reaksi enzim-substrat ini dapat digambarkan dengan menggunakan :

1. Model Fischer (model kaku)

Model ini hanya mengumpamakan pasangan enzim-substrat berupa gembok dengan anak kuncinya. Berarti tidak sembarangan anak kunci dipergunakan untuk membuka atau menutup gembok tadi. Model Fischer sering dinamakan model kaku (model rigit).

2. Model Koschland (model konformasi, model fleksibel)

Berbeda dengan model Fischer, model Koschland menggambarkan bentuk molekul enzim yang lentur (fleksibel). Sifat lentur tersebut karena di tempat-tempat tertentu molekul enzim terdapat unsur-unsur pengatur kelenturan molekul (Marks, D.B., Marks, A.D., & Smith, C., 2000).

2.1.2. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dapat ditentukan secara kualitatif maupun kuantitatif. Aktivitas kualitatif enzim ditentukan berdasarkan reaksi kimia yang terjadi dengan cara menentukan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut. Sedangkan aktivitas kuantitatif enzim ditentukan dengan mengukur laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Aktivitas kuantitatif enzim berhubungan dengan jumlah (unit) enzim yang mengkatalisis reaksi tersebut.

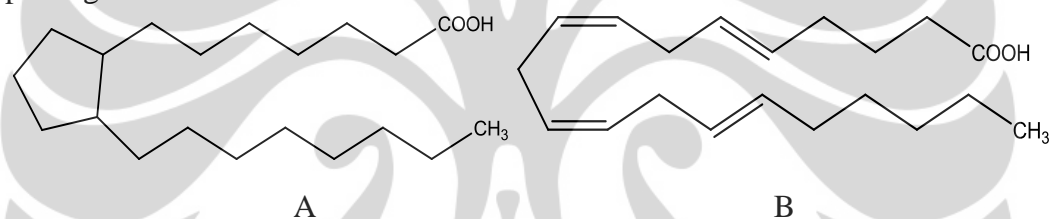
Satu unit enzim adalah jumlah enzim yang mampu mengkatalisis μmol substrat per menit pada kondisi tertentu (optimal). Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai berapa unit enzim yang terdapat dalam satu mg protein. Berdasarkan definisi tersebut maka aktivitas spesifik enzim menunjukkan kemurnian suatu enzim, dengan demikian semakin besar aktivitas spesifiknya menunjukkan bahwa kemurnian enzim tersebut semakin tinggi (Murray, R.K., Daryl, K.G., Peter, A.M., & Victor W.R., 2003).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain temperatur, pH, kofaktor, inhibitor, dan substrat. Peningkatan temperatur akan meningkatkan laju reaksi, tetapi ada batas temperatur yang memungkinkan struktur enzim tetap terjaga yaitu temperatur optimum. Di atas temperatur optimum maka struktur enzim akan terganggu dan bahkan bisa rusak (denaturasi) dengan demikian aktivitasnya akan menurun. Demikian pula dengan perubahan pH, pada umumnya setiap enzim mempunyai aktivitas maksimum pada pH tertentu. Diatas dan dibawah pH tersebut aktivitas akan menurun. Jenis dan jumlah substrat dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik berupa peningkatan aktivitas (induksi enzim) maupun penurunan aktivitas enzim (inhibisi enzim). Induksi enzim terjadi akibat peningkatan produksi enzim sedangkan inhibisi enzim terjadi akibat pengikatan molekul lain baik secara kompetitif maupun non kompetitif. Inhibitor kompetitif

memiliki situs aktif yang sama dengan substrat dan peningkatan konsentrasi substrat akan mengurangi pengaruh inhibisi sedangkan inhibitor non kompetitif memiliki situs aktif yang berbeda dengan substrat dan peningkatan konsentrasi substrat tidak akan berpengaruh pada proses inhibisi (Champe, Pamela C., Richard A. H., & Denise R. F., 2005).

2.2. 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 arakhidonat (asam 5,8,11,14-Eikosatetraenoat) merupakan prazat terpenting untuk mensintesis prostaglandin.

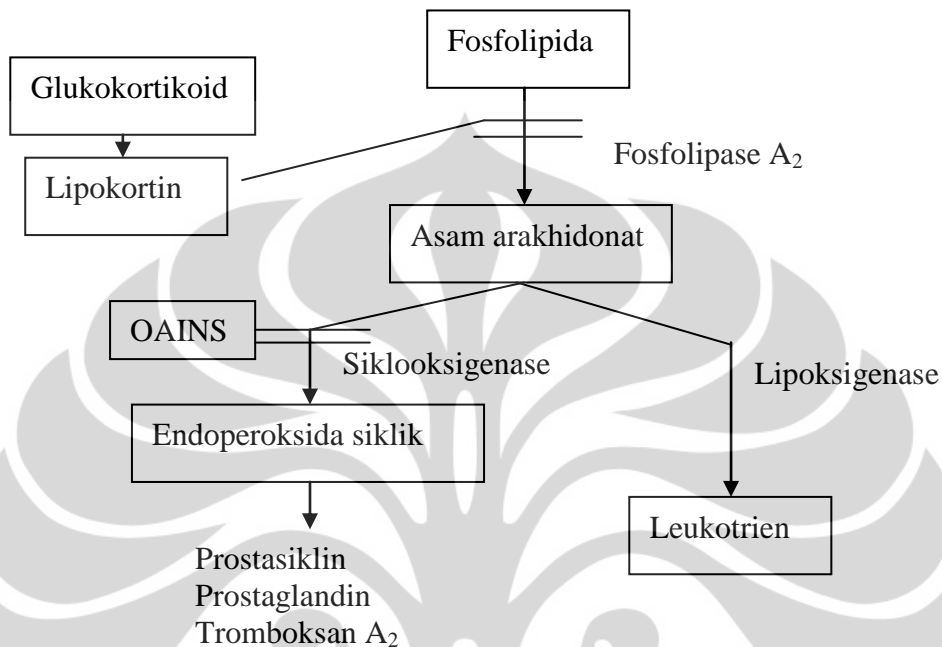


Gambar 2.1. Rumus struktur asam prostanoat dan asam arakhidonat. A. Asam prostanoat, B. Asam arakhidonat.

Prostaglandin dihasilkan oleh jaringan yang sedang terluka atau sakit yang disintesis dari asam lemak tak jenuh rantai panjang yaitu asam arakhidonat. Terdapat dua jalur utama reaksi-reaksi yang dialami oleh asam arakhidonat pada metabolismenya, yaitu jalur siklooksigenase yang bermuara pada prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan serta jalur lipoksigenase yang menghasilkan asam-asam hidroperoksieikosatetraenoat (HPETE). Prostaglandin yang dihasilkan bergantung enzim pengkonversi berikutnya yang terdapat pada sel-sel tertentu. Sebagai contoh : sel-sel endotelial terutama menghasilkan PGI_2 , sedangkan sel-sel platelet terutama menghasilkan TXA_2 .

Pada selaput lendir traktus gastrointestinal, prostaglandin berefek protektif. Prostaglandin meningkatkan resistensi selaput lendir terhadap iritasi mekanis, osmotis, termis atau kimiawi. Dalam suatu penelitian ditunjukkan bahwa

pengurangan prostaglandin pada selaput lendir lambung memicu terjadinya tukak. Hal ini membuktikan peranan penting prostaglandin untuk memelihara fungsi barier selaput lendir (Kartasmita, 2002).



[Sumber : Syarif, 2007, telah diolah kembali]

Gambar 2.2 Bagan pembentukan prostaglandin

2.3. Siklooksigenase

Siklooksigenase merupakan enzim terikat membran yang telah ditemukan dalam retikulum endoplasmik dan membran inti (Orbaniyah, Ismadi, & Oetari, 2003).

Awal tahun 1990-an ditemukan bahwa Siklooksigenase ada dalam dua bentuk iso (COX-1 dan COX-2), yang berbeda dalam distribusinya di jaringan dan regulasinya. COX-1 pada dasarnya terdapat dalam hampir semua tipe sel dan mengambil bagian pada mekanisme fisiologis. Secara garis besar siklooksigenase-1 esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna dan trombosit. Sedangkan COX-2 adalah enzim yang dapat diinduksi, yang diproduksi misalnya pada proses-proses yang dapat menimbulkan inflamasi (Syarif, 2007).

Namun demikian, pada penelitian lanjutan ditemukan bahwa COX-2 ternyata tidak hanya inducibel melainkan juga konstitutif dan terdapat pada berbagai jaringan. Pada kondisi fisiologis ekspresi konstitutif COX-2 ditemukan pada ginjal, pembuluh darah, paru-paru, tulang, pankreas, sumsum tulang belakang dan selaput lendir lambung (Kartasasmita, 2002).

Karakteristik enzim siklooksigenase-1 dan -2 dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2.1. Karakteristik enzim Siklooksigenase 1 dan Siklooksigenase 2.

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	Konstitutif	Inducibel
Induktor	-	Sitokin, LPS
Jumlah asam amino	599	604
Lokasi	Membran inti	Membran inti
Kofaktor	1 mol Heme	1 mol Heme
Tempat pengikatan asam asetat salisilat	Serin-529	Serin-516
Spesifitas substrat	Asam arakhidonat, asam linoleat	Asam arakhidonat, asam linoleat, asam eikosapentenoat
Aktivitas	23 mmol asam arakhidonat/mg/menit	11 mmol asam arakhidonat/mg/menit

[Sumber : Kartasasmita, 2002]

2.4. Inhibitor Selektif Siklooksigenase 2

Untuk mengurangi toksisitas obat antiradang bukan steroid klasik adalah penghambatan selektif COX-2. Karena semua obat antiradang bukan steroid klasik merupakan inhibitor tidak selektif COX-1 dan COX-2, maka diusahakan membuat senyawa yang dapat menghambat aktifitas COX-2 secara selektif.

Secara struktural terdapat beberapa golongan inhibitor selektif COX-2, yaitu:

1. Turunan karbosiklis dan heterosiklis yang terikat visinal dengan *moieties* aril,
2. Turunan diaril- atau aril/heteroaril-eter dan -tioeter,
3. Turunan cis-stilben, serta
4. Keton diaril dan aril/heteroaril.

Sampai tahun 2000 telah berhasil disintesis sekitar 500 senyawa inhibitor selektif COX-2. Awalnya, *COX-2 selective inhibitors* atau *coxib* dikembangkan untuk menghindari efek samping pada saluran cerna yang umum dijumpai pada penggunaan OAINS nonselektif. Tetapi ternyata beberapa *coxib* ditemukan berisiko terhadap kardiovaskular. Potensi *coxib* dibedakan berdasarkan selektifitasnya. *Coxib* yang lebih baru (valdekoksib, etorikoksib, lumirakoksib) menghambat COX-2 lebih selektif dari selekoksib atau rofekoksib.

Selekoksib dan valdekoksib sama-sama memiliki suatu ikatan sulfonamida, yakni suatu metabolit aktif dari prodrug parekoksib. Uji klinis memperlihatkan bahwa kedua obat ini efektif mengatasi osteoarthritis. Pada hasil uji juga terlihat, insiden ulser gastrik dan duodenum secara endoskopi pada pasien yang menggunakan obat ini lebih rendah secara bermakna daripada pasien yang menerima OAINS nonselektif. Sementara rofekoksib dan etorikoksib sama-sama memiliki suatu gugus sulfon. Tetapi rofekoksib harus ditarik dari peredaran lantaran terkait dengan resiko kardiovaskularnya.

Oleh karena itu, diharapkan inhibitor selektif COX-2 menunjukkan kerja antiinflamasi yang setara dengan obat antiinflamasi non steroid klasik tetapi dengan toksisitas lebih ringan pada saluran gastrointestinal dan risiko kardiovaskular (Crofford, 2000).

2.5. Antigen

Antigen atau imunogen adalah bahan yang dapat memicu pembentukan respon imun atau bahan yang bereaksi dengan antibodi. Secara fungsional, antigen dibedakan menjadi imunogen dan haptan. Imunogen umumnya merupakan suatu protein yang memiliki ukuran molekul yang besar, sedangkan haptan merupakan senyawa kimia dengan ukuran kecil, tidak bersifat imunogenik sehingga tidak

dapat mengaktifkan sel B untuk memproduksi antibodi. Agar dapat memicu pembentukan antibodi, suatu hapten dikonjugasikan dengan molekul besar yang disebut sebagai molekul pembawa. Molekul pembawa umumnya protein yang bersifat multivalen dan imunogenik, contohnya *keyhole limpet hemocyanin* (KLH), tiroglobulin, ovalbumin, dan imunoglobulin ayam (Rittenburg, 1990).

Determinan antigenic (epitop) adalah kelompok kimia terkecil dari suatu antigen yang dapat membangkitkan respons imun. Suatu antigen dapat memiliki dua atau lebih molekul *determinan antigenic*, satu molekul pun dalam keadaan yang sesuai dapat menstimulasi respons yang jelas (Sloane, E., 2004).

Hapten dikenal oleh sel B sedangkan molekul pembawa oleh sel T. Hapten membentuk epitop pada permukaan molekul pembawa yang dikenali oleh sistem imun sehingga merangsang pembentukan antibodi. Daerah ini dapat bereaksi secara spesifik dengan reseptor antigen (Bratawidjaja, 2004). Diantara senyawa hapten yaitu kontaminan pada bahan pangan dan pakan seperti mikotoksin, pestisida, antibiotik dan senyawa lain dengan bobot molekul rendah.

Berdasarkan epitopnya antigen terbagi atas empat jenis, yaitu :

- 1). Unideterminan univalen, antigen yang hanya memiliki satu jenis epitop pada tiap molekulnya (hapten);
- 2). Unideterminan multivalen, antigen yang memiliki lebih dari dua epitop yang sama pada satu molekulnya;
- 3). Multideterminan univalen, antigen yang memiliki beberapa epitop yang berbeda, tetapi masing-masing hanya satu pada tiap molekulnya (protein);
- 4). Multideterminan multivalen, antigen yang memiliki beberapa epitop berbeda yang masing-masing terdiri dari dua atau lebih pada tiap molekulnya. Contohnya antigen dengan bobot molekul besar dan kompleks secara kimiawi, seperti polimer protein.

Berdasarkan spesifitasnya, antigen dibagi menjadi lima kelompok, yaitu :

1. Heteroantigen, umum dimiliki oleh berbagai spesies;
2. Xenoantigen, yang hanya dimiliki spesies tertentu;
3. Alloantigen (isoantigen), antigen spesifik yang hanya dimiliki individu tertentu dalam suatu spesies;

4. Antigen yang hanya dimiliki organ tertentu; dan
5. Autoantigen, yang dimiliki oleh tubuh sendiri.

Sedangkan menurut ketergantungannya terhadap sel T, antigen terbagi atas *T-dependent*, memerlukan bantuan sel T untuk dikenali sebelum menimbulkan respon antibodi (seluler), dan *T-independent* yang dapat menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi tanpa bantuan sel T (Bratawidjaja, 2004).

2.6. Antibodi

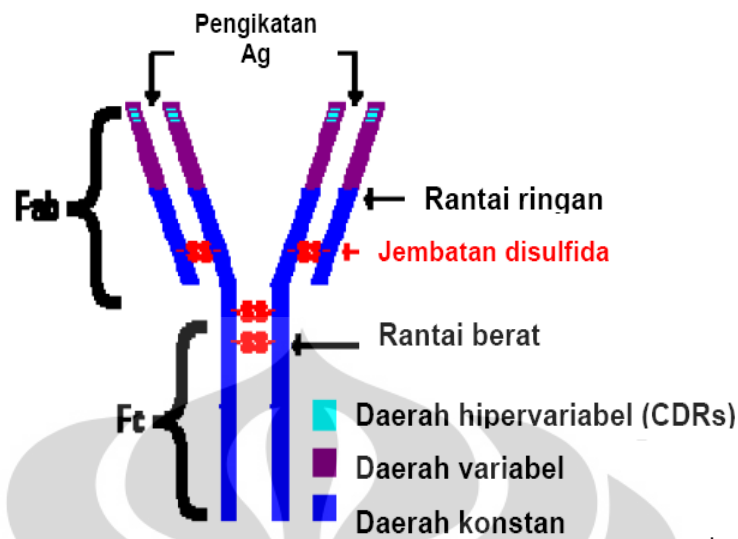
Antibodi adalah protein yang dihasilkan oleh sel limfosit B sebagai respon terhadap tubuh karena adanya kontak dengan antigen (Bratawidjaja, 2004). Antibodi disebut juga dengan imunoglobulin (Ig) karena terdiri dari protein globular. Antibodi yang terdapat dalam tubuh hewan dan manusia terbagi dalam lima kelompok yaitu : IgA, IgD, IgE, IgG, dan IgM.

1. IgA mencapai 15 % dari semua antibodi dalam serum darah dan ditemukan dalam sekresi tubuh seperti keringat, *saliva*, air mata, pernapasan, *genitourinary*, dan sekresi usus, serta air susu ibu. Fungsi utama IgA adalah untuk melawan mikroorganisme pada setiap titik masuk potensial ke dalam tubuh.
2. IgD dalam serum darah dan limfe relatif sedikit, tetapi banyak ditemukan dalam limfosit B. Hanya sedikit yang diketahui mengenai fungsinya, antibodi ini membantu memicu respons imun.
3. IgE biasanya ditemukan dalam konsentrasi darah yang sangat rendah. Kadarnya meningkat selama reaksi alergi dan pada penyakit parasitik tertentu. Antibodi ini terikat pada reseptor sel mast dan basofil serta menyebabkan pelepasan histamin dan mediator kimia lainnya.
4. IgG mencapai 80 % sampai 85 % dari keseluruhan antibodi yang bersirkulasi dan merupakan satu-satunya antibodi yang dapat menembus plasenta dan memberikan imunitas pada bayi baru lahir. Antibodi ini akan diproduksi besar-besaran saat terjadi pajanan kedua dan yang berikutnya terhadap suatu antigen spesifik. Antibodi ini berfungsi sebagai pelindung terhadap

mikroorganisme dan toksin yang bersirkulasi, mengaktifasi sistem komplemen dan meningkatkan keefektifan sel fagositik.

5. IgM merupakan antibodi pertama yang tiba di sisi infeksi pada pajanan awal terhadap antigen. Pajanan kedua mengakibatkan peningkatan produksi IgG. Antibodi IgM mengaktifasi komplemen dan memperbanyak fagositosis, tetapi umur antibodi ini relatif pendek. Karena ukurannya, maka molekul ini menetap dalam pembuluh darah dan tidak memasuki jaringan sekitar (Sloane, 2004).

Antibodi memiliki berat molekul 145.000 – 950.000 dengan struktur dasar menyerupai huruf Y dan empat rantai polipeptida yang terdiri dari dua rantai berat (*heavy chain*) dan rantai ringan (*light chain*) yang setara, dimana satu dengan yang lainnya dihubungkan oleh rantai disulfida. Rantai ringan terdiri atas *lambda* (λ) dan *kappa* (κ) yang disusun oleh 220 – 230 asam amino. Sedangkan rantai berat terdiri atas 450 – 600 asam amino. Setiap rantai, baik rantai ringan maupun berat, mempunyai ujung amino yang disebut daerah variabel (*variable region*) yang panjangnya sekitar 110 asam amino. Daerah variabel inilah yang bervariasi antara suatu antibodi dengan antibodi yang lain sehingga mampu mengenali antigen yang berbeda (Yuwono, T., 2007). Daerah variabel memiliki dua domain; fragmen Fab yaitu fragmen yang mempunyai daerah pengikatan antigen dan fragmen Fc yang dapat mengkristal dan berperan dalam regulasi kekebalan. Daerah variabel terdiri dari daerah hipervariabel (HV) dan daerah *framework* (FR). Daerah hipervariabel merupakan daerah pengikatan antigen (*antigen-binding site*) yang disebut paratop atau disebut juga daerah penentu komplemen (*complementary-determining regions*, CDRs) yang masing-masing terdiri dari 6 – 10 asam amino. Daerah ini berperan penting dalam reaksi antigen-antibodi yang menjadi dasar analisis secara imunoasai (Maryam, 2007).



[Sumber : Maryam, 2007]

Gambar 2.3. Struktur dasar Immunoglobulin (Ig)

Antibodi dihasilkan oleh sel limfosit B (sel B) yang termasuk kedalam sistem imun spesifik. Pada saat pertama kali suatu antigen masuk kedalam tubuh akan terjadi sensitisasi, kemudian sel-sel imun merekamnya. Pada paparan berikutnya, sel-sel imun sudah mengenali antigen tersebut karena telah mempunyai antibodi yang dapat mengikat atau menangkap antigen tersebut.

2.6.1. Antibodi poliklonal

Setiap sel B memproduksi satu jenis antibodi spesifik. Jika suatu antigen yang memiliki beberapa jenis epitop masuk kedalam tubuh vertebrata, maka masing-masing sel B akan menghasilkan antibodi yang sesuai dengan antigen tersebut. Proses pembentukan antibodi oleh sel B dimulai ketika suatu antigen terikat pada permukaan sel B tertentu akan terjadi induksi sel B untuk berproliferasi dan masing-masing sel memproduksi antibodi spesifik terhadap antigen tersebut. Dengan adanya bagian variabel yang berbeda, maka antibodi yang terbentuk memiliki epitop yang berbeda-beda dan bereaksi spesifik dengan antigennya. Campuran antigen ini banyak terdapat dalam serum dan disebut antibodi poliklonal.

Antibodi poliklonal memiliki epitop yang beragam sehingga dapat berinteraksi dengan beragam antigen, terutama yang memiliki kesamaan struktur

molekul. Hal ini dapat menimbulkan kesalahan interpretasi dalam analisis yang menggunakan metode imunoasai berbasis antibodi poliklonal (Maryam, 2007).

2.6.2. Antibodi monoklonal

Antibodi monoklonal adalah antibodi buatan identifik karena diproduksi oleh salah satu jenis sel imun saja dan semua klonnya merupakan sel *single parent*. Antibodi monoklonal mempunyai sifat khusus yang unik yaitu dapat mengenal suatu molekul, memberikan informasi tentang molekul spesifik dan sebagai terapi target tanpa merusak sel sehat sekitarnya. Antibodi monoklonal murni dapat diproduksi dalam jumlah besar dan bebas kontaminasi. Manusia dan tikus mempunyai kemampuan untuk membentuk antibodi yang dapat mengenali antigen (Hanafi & Syahrudin, 2007).

Antibodi monoklonal merupakan antibodi yang dihasilkan oleh klon dari sel tunggal hasil fusi sel limfosit B dengan sel mieloma yang memiliki homogenitas, afinitas dan spesifitas tinggi. Hasil fusi kedua sel dipilih yang menghasilkan satu jenis antibodi dan bagian variabel yang sama. Sel limfosit B diperoleh dari limpa mencit yang diimunisasi secara berulang dengan antigen tertentu, sehingga dihasilkan sel hiperium yang membawa sifat-sifat genetik sel induknya untuk memproduksi antibodi (Rittenburg, 1990).

2.7. Immunoassay

Immunoassay yaitu teknik analisis dengan menggunakan pereaksi yang dihasilkan oleh sistem imun, yaitu antibodi. Aplikasi imunoasai sangat luas terutama di bidang kedokteran, baik untuk diagnosis maupun terapi suatu penyakit. Dibandingkan dengan metode analisis lainnya, imunoasai memiliki kelebihan karena sangat ekonomis, mudah dan cepat dalam aplikasinya, serta memiliki spesifitas dan sensitifitas yang tinggi.

Sifat antibodi yang dapat mengikat antigen spesifik di dalam tubuh merupakan dasar dari metode analisis secara imunoasai karena reaksi ini juga dapat terjadi di luar tubuh. Dalam hal ini, antigen dapat merupakan agen penyakit, cemaran mikroba, senyawa kimia atau kontaminan alami. Antibodi yang digunakan dapat berupa antibodi poliklonal atau monoklonal (Maryam, 2007).

EIA merupakan salah satu teknik *immunoassay* yang prinsipnya adalah reaksi antigen-antibodi, dapat dideteksi dengan penambahan konjugat dilabel enzim aktif yang bereaksi dengan substrat menghasilkan warna spesifik yang dapat dibaca pada alat kolorimeter/spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu.

EIA terbagi menjadi dua jenis, yaitu heterogen dan homogen. Dalam EIA heterogen aktivitas label enzim tidak dipengaruhi oleh reaksi antigen-antibodi dan diperlukan pemisahan fraksi terikat dan tidak terikat. Sedangkan dalam EIA homogen aktivitas enzim sebagai label tergantung pada reaksi antigen-antibodi sehingga tidak diperlukan pemisahan. Contoh metode EIA yang banyak digunakan untuk pengujian yaitu *enzyme multiplied technique* (EMIT) dan ELISA. Dewasa ini, EIA lebih difokuskan pada ELISA karena metode ini paling banyak dikembangkan dan diaplikasikan.

Enzyme Immunoassay (EIA) atau biasa dikenal juga dengan ELISA merupakan salah satu teknik uji serologis yang mulai dikenalkan pada tahun 1971 oleh Engvall dan Perlmann. Hasil pengujian EIA dapat dinilai secara kualitatif maupun kuantitatif. Penilaian kualitatif dapat dibaca secara visual melalui perubahan warna yang terjadi dan dibedakan dari kontrol yang tidak berwarna (positif atau negatif). Penilaian secara kuantitatif dilakukan dengan membaca perubahan warna yang terbentuk menggunakan *EIA reader*. Pengujian EIA memiliki spesifisitas dan sensitifitas yang tinggi. EIA paling banyak digunakan karena sederhana, terpercaya dengan mekanisme yang mudah (Rittenburg, 1990).

2.8. Uji Aktivitas Penghambatan Siklooksigenase

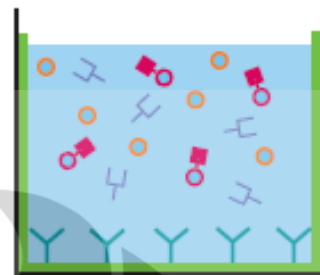
2.8.2. Pengukuran Menggunakan *Enzyme Immuno Assay* (EIA)

Pengukuran ini berdasarkan pada kompetisi antara Prostaglandin (PG) dan suatu konjugat Prostaglandin-asetilkolinesterase (AChE) yang merupakan *PG tracer* untuk berikatan dengan Prostaglandin antiserum yang jumlahnya terbatas. 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*

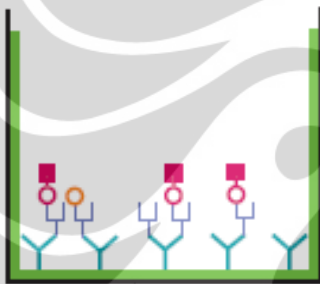
monoclonal anti-rabbit antibody) yang telah dimasukkan sebelumnya pada sumur uji. Sumur uji ini kemudian dicuci untuk menghilangkan reagen yang tidak berikatan dan kemudian reagen Ellman's, yang berisi asetiltiokolin (substrat untuk AChE) dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat), ditambahkan ke sumur uji.



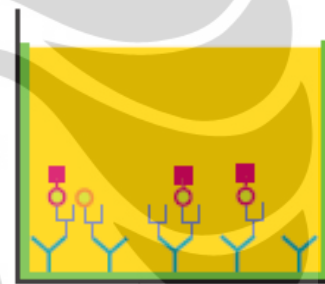
Plate dilapisi dengan antibodi anti-kelinci monoklonal mencit



Inkubasi dengan *tracer*, anti-serum, dan standar atau sampel.



Dicuci untuk menghilangkan reagen-reagen yang tidak berikatan








Pengembangan menggunakan Reagen Elman

[Sumber : Cayman Chemicals Inc., Ann Arbor, MI., 2010, telah diolah kembali]

Gambar 2.4. Skema Proses EIA

Keterangan :

-  : antibodi antikelinci monoklonal mencit
-  : protein bloking
-  : PG-*tracer*
-  : antiserum spesifik
-  : Prostaglandin bebas

Asetilkolin akan dihidrolisis oleh asetilkolinesterase pada *PG tracer* yang berikatan pada sumur uji, menghasilkan tiokolin dan asam asetat. Tiokolin selanjutnya bereaksi dengan 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) menghasilkan asam 5-tio-2-nitrobenzoat yang berwarna kuning terang, yang menyerap cahaya sinar tampak dengan kuat pada λ 412 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 (Cayman Chemical Inc., Ann Arbor, MI., 2010).

2.8.3. Pengukuran malondialdehid (MDA)

Perubahan asam arakhidonat menjadi Prostaglandin oleh siklooksigenase menghasilkan produk samping malondialdehid (MDA) yang dapat diukur intensitas fluoresensinya. Siklooksigenase tersebut berasal dari keping darah segar manusia. Plasma yang kaya akan keping darah ditambahkan senyawa uji, diinkubasi pada 37°C selama 15 menit, lalu ditambah natrium arakhidonat, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit, selanjutnya reaksi dihentikan dengan penambahan 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.

2.8.4. Pengukuran 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 μ M, pH 8,1), yang berfungsi 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 arakhidonat dan TMPD dan diukur perubahan serapan pada panjang gelombang 611 nm selama 30 detik. Kecepatan reaksi awal diukur, dan kecepatan oksidasi nonspesifik pada saat tidak ada enzim dikurangkan sebelum perhitungan persentase hambatan (Fernandez de Arriba et al., 1999). Cara uji ini hanya menentukan aktivitas penghambatan senyawa uji spesifik pada COX-2.

2.8.5. Pengukuran Darah Manusia Lengkap (*Whole Human Blood Assay*)

Sampel diambil dari 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 µL darah terheparinasi diinkubasi bersama 5 µL larutan senyawa uji dengan berbagai konsentrasi (misalnya, 5 sampai 20 µM) atau pelarut senyawa uji (misalnya, DMSO) atau larutan baku pembanding (misalnya, selekoksib 10 µM), dengan ditambahkan atau tidak ditambahkan lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari E-coli sebanyak 10 µg/mL pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pengadukan 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 hanya menentukan aktivitas penghambatan senyawa uji spesifik pada COX-2.

2.9. EIA Plate Reader

2.9.2. Prinsip

EIA *plate reader* adalah sebuah fotometer yang dirancang untuk mengukur serapan cahaya (*Optical Density/OD*) dari sampel cair pada plat mikro. Mempunyai spektrum visibel antara 400 – 750 nm, beberapa diantaranya juga bekerja pada tingkatan dekat dengan UV sampai Inframerah yaitu antara 200 –

999 nm. Biasanya mempunyai kisaran linier dari serapan 0,000 sampai dengan 4,000 OD dengan resolusi 0,0001. EIA *plate reader* ini menggerakkan plat mikro melalui cahaya lampu. Waktu yang dibutuhkan untuk membaca satu plat dengan 96 sumuran adalah 15 detik. Sumuran yang dapat dibaca mulai dari 6, 12, 24, 48 dan 96 sumuran. Sebelum pembacaan dapat dilakukan pengocokan terlebih dahulu dengan suhu maksimal 50° C dan jangka waktu maksimal 16 menit.

EIA *plate reader* yang paling sederhana menyediakan data tercetak melalui output yang sensitif terhadap panas. Sedangkan yang paling modern saat ini dihubungkan dengan komputer, yang dapat menampilkan perhitungan menggunakan *software* tertentu, misalnya Gen5 (Lim, 2012).

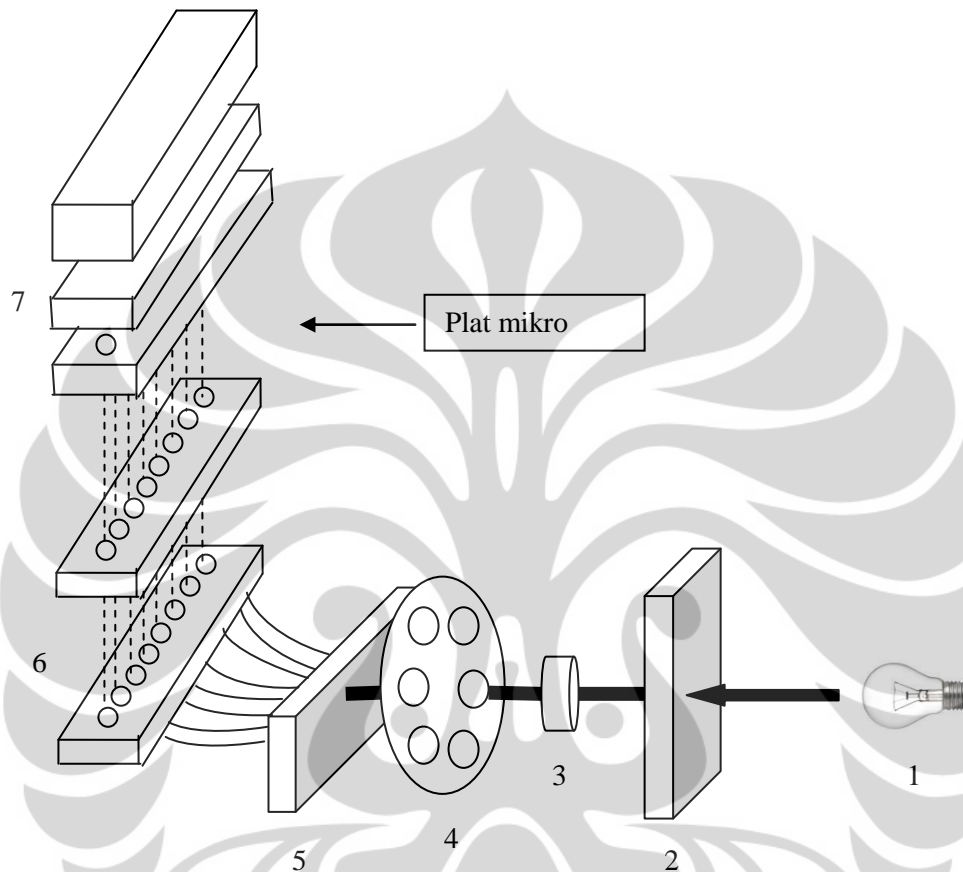
2.9.3. Sistem Optik

Sistem optik terdiri dari komponen-komponen :

1. Lampu halogen tungsten
Merupakan sumber cahaya yang digunakan
2. Diafragma
Diafragma ini akan memotong sorotan cahaya untuk meminimalkan derau elektronik.
3. Lensa kondensor
Bagian dari sinar tampak dan sinar dengan panjang gelombang yang lebih panjang akan melewati lensa ini. Sinar UV dan sisa-sisa sinar tampak akan dipantulkan.
4. Filter penyebar
Panjang gelombang ditentukan dari filter yang digunakan.
5. *Fiber bundle*
Setelah melalui filter penyebar, sorotan cahaya akan mencapai ujung dari *fiber bundle*, yang akan membagi cahaya menjadi delapan jalur sinar paralel yang sama dan akan membelokkan cahaya tersebut ke atas.
6. Lensa fokus
Setelah cahaya dibagi, cahaya akan melalui sebuah sistem fokus dari delapan lensa fokus.

7. Detektor

Delapan sorotan cahaya akan melalui dasar dari lubang sel (sumuran) kemudian akan melalui sampel menuju detektor yang akan mengukur intensitas cahaya.



[Sumber : Aziz, A., 1999, telah diolah kembali]

Gambar 2.5. Skema sistem optik EIA *Plate Reader*

Keterangan :

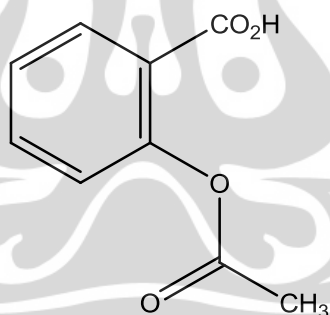
1. Lampu halogen tungsten
2. Diafragma
3. Lensa kondensor
4. Filter penyebar
5. *Fiber bundle*
6. Lensa fokus
7. Detektor

2.9.4. Sistem Proses

Mikro *processor* akan mengontrol pengukuran dan *signal* proses dari alat tersebut. Fotometer yang memiliki pengubah program linier / logaritma akan menghasilkan sebuah *output* yang merupakan serapan dari sampel. Serapan tersebut akan otomatis secara serentak terbaca pada komputer (Lim, 2012).

2.10. Asetosal

Asetosal (asam asetil salisilat), kelompok obat ini merupakan cikal bakal berkembangnya OAINS. Asetosal menimbulkan efek analgesia, anti inflamasi, dan anti piretik dengan menekan produksi prostaglandin dan tromboksan dengan menghambat siklooksigenase (COX-1 dan COX-2). Oleh karena itu asetosal dan turunannya disebut juga dengan OAINS konvensional, karena tidak selektif terhadap salah satu tipe siklooksigenase. Asam asetil salisilat, lebih dikenal sebagai antiplatelet pada dosis rendah daripada sebagai pengobatan gejala arthritis (Ulas Obat, 2006).



[Sumber : Martindale, The Complete Drug Reference 36st, 2009)

Gambar 2.6. Struktur kimia Asetosal

Rumus molekul : $C_9H_8O_4$

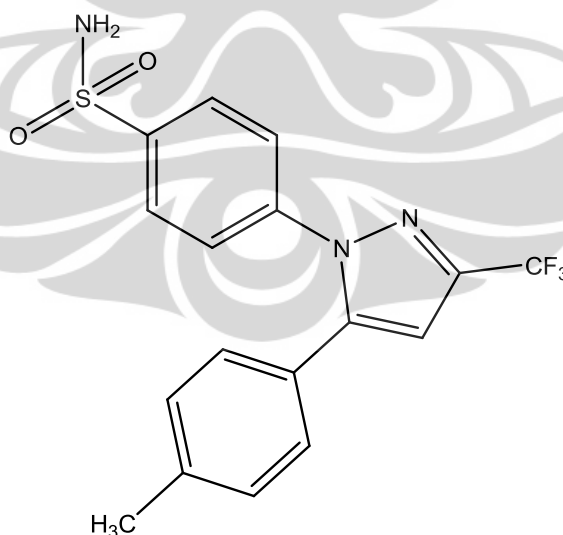
Berat molekul : 180,16

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 asam asetat.

Kelarutan : Sukar larut dalam air; mudah larut dalam etanol; larut dalam kloroform dan dalam eter (Martindale, The Complete Drug Reference 36st, 2009).

2.11. Selekoksisib

Selekoksisib merupakan kelompok obat generasi pertama golongan inhibitor selektif COX-2. Selekoksisib disetujui oleh FDA untuk pengobatan osteoarthritis dan polyarthritis menahun pada tahun 1998. Selekoksisib memiliki profil optimal pada pengujian *in vitro* dan *in vivo*. Selekoksisib ini menunjukkan aktivitas selektif secara *in vitro* (COX-1 IC₅₀ 13 mmol, COX-2 IC₅₀ 0,04 mmol) dan menunjukkan aktivitas anti-inflamasi pada pengujian menggunakan tikus yang telah diinduksi arthritis (ED₅₀ 0,4 mg/kg). Selekoksisib dikontraindikasikan selama kehamilan dan pada pasien dengan ulkus GI. Dalam hal ini peran COX-2 untuk penyembuhan luka menjadi jelas, sekali cedera ulseratif hadir, COX-2 meningkat terhadap respons penyakit dan COX-2 tampaknya menjadi penting untuk penyembuhan luka di dalam perut dengan meningkatkan aliran darah lambung, mengurangi sekresi asam lambung dan memungkinkan proliferasi sel epitel. Konsekuensinya, semakin selektif COX-2 inhibitor seperti selekoksisib menyebabkan penyembuhan luka tertunda dan dapat memperburuk cedera (Dannhardt, G. & S. Laufer, 2000).



[Sumber : Martindale, The Complete Drug Reference 36st, 2009)

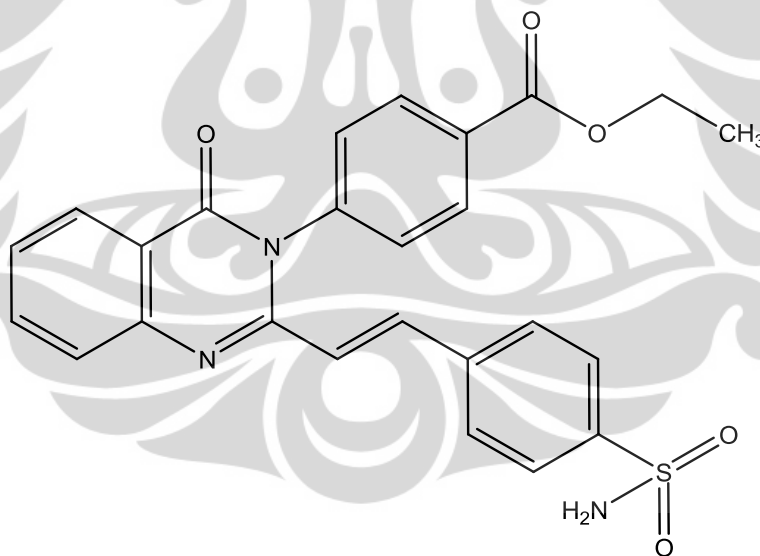
Gambar 2.7. Struktur kimia Selekoksisib

Rumus molekul : C₁₇H₁₄F₃N₃O₂S

- Berat molekul : 381,4
 Titik lebur : 160°-164° C
 Pemerian : Serbuk berwarna putih, serbuk kristal putih amorf; tidak berbau.
 Kelarutan : Praktis tidak larut air (Martindale, The Complete Drug Reference 36st, 2009).

2.12. Etil 4-{4-okso 2-[(E)-2-{4-sulfamoilfenilenil}3,4 dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat

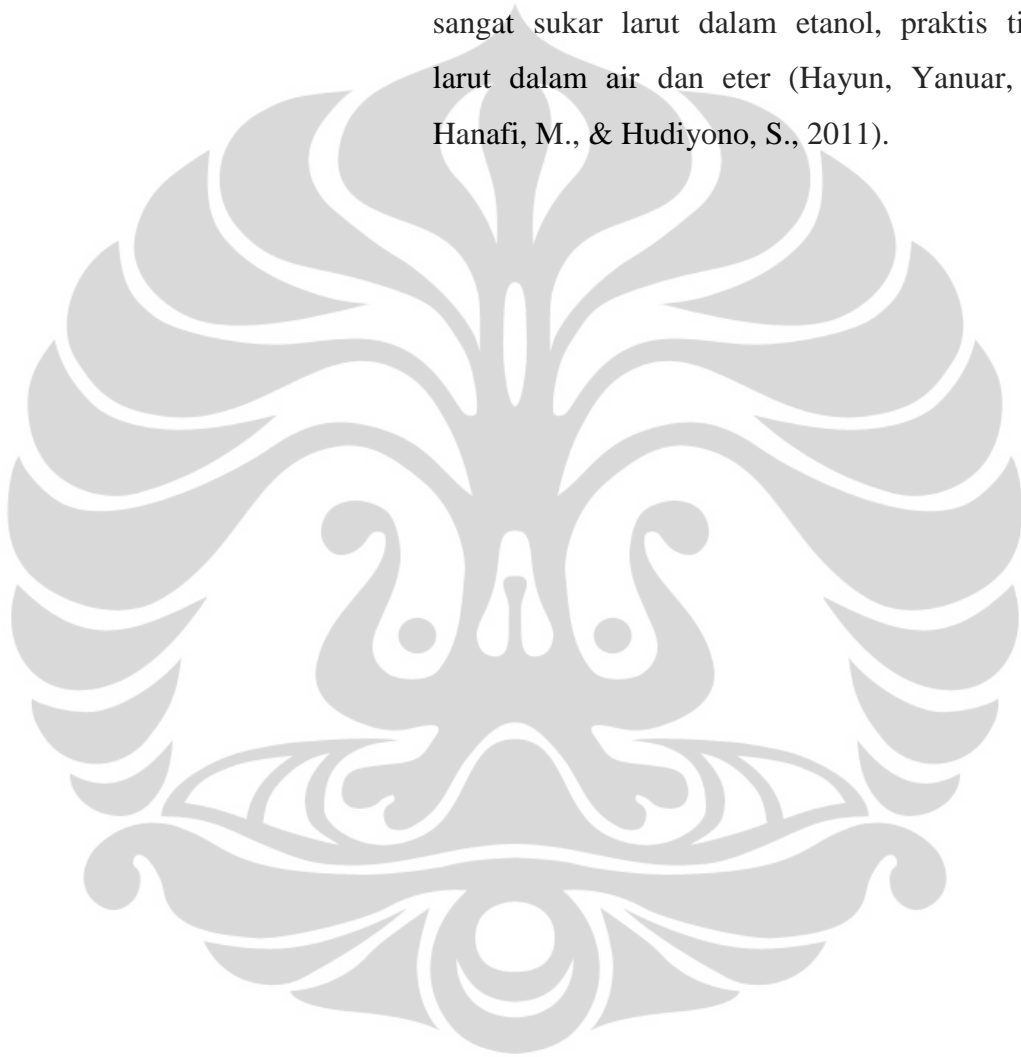
Senyawa dengan nama etil 4-{4-okso 2-[(E)-2-{4-sulfamoilfenilenil}3,4 dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat merupakan senyawa hasil reaksi kondensasi senyawa etil 4-(2-metil-4-okso-3,4-dihidrokuinazolin-3-il)benzoat dengan senyawa 4-formilbensulfonamida dalam pelarut asetat glasial dan katalis natrium asetat anhidrat. Struktur produk hasil reaksi dielusidasi berdasarkan data spektra FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C NMR, dan MS (Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyo, S., 2011).



[Sumber : Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyo, S., 2011]

Gambar 2.8. Struktur kimia Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfenilenil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat

Rumus molekul	: $C_{25}H_{21}N_3SO_5$
Berat molekul	: 475,516
Organoleptis	: serbuk berwarna kuning pucat, tidak berbau
Jarak lebur	: $239^{\circ} - 240^{\circ}C$
Kelarutan	: Mudah larut dalam dimetilsulfoksid, larut dalam tetrahidrofuran, sukar larut dalam asetonitril, sangat sukar larut dalam etanol, praktis tidak larut dalam air dan eter (Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyono, S., 2011).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, dari bulan Februari sampai Mei 2012.

3.2. Alat

Kit EIA (Cayman Chemicals Inc. No. Katalog 560101); *plate reader* (Biotek ELx808); timbangan analitik (AND); penangas air (Memmert); pipet mikro (Eppendorf); tabung mikro; rak tabung reaksi; rak tabung mikro; *orbital shaker* (Lab Line); *vortex* (As One); *sentrifuge* (Heraeus Sepatech); alat gelas.

3.3. Bahan

Sampel senyawa etil 4-{4-okso 2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}3,4 dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat (hasil sintesis Hayun dkk); senyawa pembanding asetosal (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd.) dan selekoksib (Hasil isolasi dari kapsul Celebrex-Pfizer); *96 well plate* (No. Katalog 400012); dapar reaksi (No. Katalog 460104); COX-2 (ovine) – (No. Katalog 460101); *heme* (No. Katalog 460102); asam arakhidonat (substrat) - (No. Katalog 460103); air *Ultrapure* (No. Katalog 400000); KOH 0,1M (No. Katalog 460105); HCl 1M (No. Katalog 460105); timah (II) klorida (No. Katalog 460107); dimetilsulfoksid (Merck).

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Penyiapan Bahan

3.4.1.1. Pembuatan Larutan Pereaksi

1. Dapar Reaksi

Diencerkan 5 mL Dapar Reaksi pekat dengan 45 mL air *Ultrapure*.

2. *Heme*

Diencerkan 100 μ L *heme* dengan 400 μ L dapar reaksi.

3. Asam arakhidonat (Substrat)

Dipindahkan 50 μL substrat persediaan ini ke vial lain, tambahkan 50 μL KOH, *vortex*, dan encerkan dengan 400 μL air *Ultrapure*.

4. Asam hidroklorida 0,1 M

Diencerkan 500 μL HCl 1 M dengan 4,5 mL air *Ultrapure* untuk menghasilkan konsentrasi 0,1 M.

5. Timah (II) klorida

Ditambahkan 5 mL HCl 0,1 M ke dalam vial persediaan timah (II) klorida dan *vortex*. Apabila tidak melaksanakan semua reaksi COX dalam satu hari, ditimbang 125 mg timah (II) klorida dalam vial lain dan tambahkan 2,5 mL HCl 0,1 M.

6. Dapar EIA

Diencerkan isi satu vial konsentrat dapar EIA dengan 90 mL air *Ultrapure*. Dibilas vial untuk membersihkan garam yang mengendap.

7. Dapar Cuci

Diencerkan isi Dapar Cuci konsentrat sehingga menjadi 2 Liter dengan air *Ultrapure* dan tambahkan 1 mL Tween 20. Dapar cuci volume yang lebih kecil dapat dibuat dengan mengencerkan dapar cuci konsentrat 1:400 dan menambahkan Tween 20 (0,5 mL/L dapar cuci).

8. *Tracer AChE* Skrining Prostaglandin

Direkonstitusi PG *Tracer* Skrining dengan 6 mL dapar EIA.

9. Antiserum Skrining Prostaglandin

Direkonstitusi PG Skrining Antiserum dengan 6 mL dapar EIA.

3.4.1.2. Pembuatan Larutan Standar Prostaglandin

Dilakukan Standar PG terliofilasi dalam 1 mL dapar EIA. Konsentrasi larutan ini adalah 10 ng/mL (standar *bulk*). Kemudian dibuat larutan standar Prostaglandin dengan delapan konsentrasi yang berbeda, yaitu 2000 pg/mL; 1000 pg/mL; 500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,3 pg/mL; dan 15,6 pg/mL. Untuk membuat standar yang digunakan dalam EIA : Siapkan 8 tabung uji dan beri label S1 hingga S8. Diisikan 800 μL dapar EIA pada tabung S1 dan 500 μL dapar EIA pada tabung S2 – S8. Dipindahkan 200 μL standar *bulk* pada tabung

S1 dan kocok hingga homogen. Secara serial encerkan standar ini dengan mengambil 500 μL dari tabung S1 dan memasukkannya ke tabung S2, kocok hingga homogen. Kemudian ambil 500 μL dari tabung S2 dan memasukkannya ke tabung S3, kocok hingga homogen. Ulangi proses ini untuk tabung S4 – S8. Skema penyiapan standar PG dapat dilihat pada Lampiran 4 bagan 1.

3.4.1.3. Pembuatan Larutan Inhibitor

1. Larutan induk Selekoksisib

Ditimbang seksama lebih kurang 10 mg Selekoksisib dilarutkan dengan DMSO, 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 DMSO dan Dapar Reaksi (1:1).

2. Larutan induk Asetosal

Ditimbang seksama lebih kurang 5 mg Asetosal dilarutkan dengan DMSO, cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 mL, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 μM). Dibuat pengenceran dengan konsentrasi 50, 25, 10, dan 1 μM , menggunakan pelarut campuran DMSO dan Dapar Reaksi (1:1).

3. Larutan induk etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat

Ditimbang seksama lebih kurang 12 mg etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat dilarutkan dengan DMSO, cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 mL, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 μM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 20, 15, 10, dan 5 μM , menggunakan pelarut campuran DMSO dan Dapar Reaksi (1:1).

3.4.2. Uji Penghambatan Aktivitas COX-2

3.4.2.1. Pelaksanaan Reaksi

1. Inaktivasi enzim

Dipipet 20 μL COX-2 dan diinaktifkan selama 3 menit dalam air mendidih.

2. Pereaksian diatas penangas air suhu 37° C.

Dipipet 970 μL dapar reaksi, dimasukkan ke dalam tabung BC. Dipipet 950 μL dapar reaksi, dimasukkan ke dalam tabung inhibitor dan IA. Ditambahkan 10 μL *heme* ke semua tabung uji. Kemudian tambahkan 10 μL COX-2 inaktif ke tabung BC dan 10 μL COX-2 aktif ke semua tabung inhibitor dan IA. Ditambahkan 20 μL pelarut (campuran (1:1) Dapar reaksi dan DMSO). Ditambahkan 20 μL larutan inhibitor pada tabung inhibitor lalu *vortex*. Inkubasi selama 10 menit. Ditambahkan 10 μL asam arakhidonat pada semua tabung uji, *vortex* dan inkubasi kembali selama 2 menit. Lalu ditambahkan 50 μL HCl 1 M pada setiap tabung uji.

3. Diangkat semua tabung uji dari penangas air.

4. Ditambahkan 100 μL larutan timah (II) klorida pada tiap tabung uji dan *vortex*. Diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar.

5. Disentrifugasi 4000 rpm (10 – 20 menit) semua tabung uji, hingga diperoleh supernatan yang jernih.

3.4.2.2. Pengenceran Hasil Reaksi

1. Sampel BC

Dimasukkan 990 μL dapar EIA pada tabung mikro, ditambahkan 10 μL supernatan sampel BC, dikocok hingga homogen.

2. Sampel IA

Dimasukan 990 μL dapar EIA pada tabung mikro pengenceran pertama lalu ditambahkan 10 μL supernatan sampel IA, kocok hingga homogen. Dimasukkan 950 μL dapar EIA pada tabung mikro pengenceran kedua lalu ditambahkan 50 μL larutan sampel IA dari tabung mikro pengenceran pertama, kocok hingga homogen.

3. Sampel inhibitor COX-2

Dimasukkan 990 μL dapar EIA pada tabung mikro pengenceran pertama lalu ditambahkan 10 μL supernatan sampel inhibitor COX-2, kocok hingga homogen. Dimasukkan 950 μL dapar EIA pada tabung mikro pengenceran kedua lalu tambahkan 50 μL larutan sampel inhibitor COX-2 dari tabung mikro pengenceran pertama, kocok hingga homogen.

3.4.2.3. Pelaksanaan EIA

1) Penambahan larutan bahan

1. Dapar EIA : ditambahkan 100 μL dapar EIA pada sumur pengikatan non spesifik (NSB). Kemudian tambahkan 50 μL dapar EIA untuk sumur Pengikatan maksimum (Bo)
2. Standar Skrining PG : ditambahkan 50 μL dari tabung S8 pada sumur standar paling bawah. Ditambahkan 50 μL dari S7 pada masing-masing dua sumur standar berikutnya.
3. Sampel-sampel *background* (tabung uji BC) : ditambahkan 50 μL sampel per sumur. Masing-masing sampel diuji dua kali.
4. Sampel-sampel aktivitas inisial COX 100% (tabung uji IA) : ditambahkan 50 μL sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada pengenceran kedua dengan masing-masing pengenceran diuji dua kali.
5. Sampel-sampel COX Inhibitor : ditambahkan 50 μL sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada pengenceran kedua dengan masing-masing pengenceran diuji dua kali.
6. *Tracer AChE* Skrining PG : ditambahkan 50 μL *tracer* skrining PG pada masing-masing sumur kecuali sumur-sumur Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).
7. Antiserum Skrining PG : ditambahkan 50 μL Antiserum skrining PG pada masing-masing sumur kecuali Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).

2) Inkubasi Lempeng

Lempeng ditutup dengan film plastik dan diinkubasi selama 18 jam pada temperatur kamar di atas *orbital shaker*.

3) Pengembangan Lempeng

Direkonstitusi satu vial Reagen Elman dengan 20 mL air *Ultrapure*. Dikосongkan sumur-sumur dan cuci limakali dengan Dapar Cuci. Ditambahkan 200 μL Reagen Elman pada tiap sumur uji lalu ditambahkan 5 μL *tracer* pada sumur Aktivitas Total (TA).

4) Pembacaan Lempeng

Sebelum lempeng dibaca, *shake* lempeng didalam *plate reader* lalu dibaca lempeng pada panjang gelombang 405 dan 415 nm. Serapan dicek secara berkala (ukur setiap 15 menit selama 105 menit) sampai sumur B_0 mencapai minimum 0,3. Lempeng dibaca bila serapan sumur B_0 pada rentang 0,3 – 1,0.

3.4.3. Analisis/Perhitungan

Data diplot sebagai %B/ B_0 *versus* log konsentrasi menggunakan kurva log-logit (*data reduction software*).

$$B_0 \text{ terkoreksi} = \overline{B_0} - \overline{NSB} \quad (3.1)$$

$$\%B/B_0 S_n = \frac{S_n - \overline{NSB}}{B_0 \text{ terkoreksi}} \times 100 \quad (3.2)$$

Keterangan :

$\overline{B_0}$ = serapan rata-rata sumur pengikatan maksimum (B_0)

\overline{NSB} = serapan sumur rata-rata pengikatan non spesifik (NSB)

S_n = serapan standar Prostaglandin ke-n

n = 1 sampai 8

1. Plot Kurva Standar

Plot %B/ B_0 untuk standar S1-S8 *versus* konsentrasi PG, menggunakan linier (y) dan log (x). Plot data sebagai logit (B/ B_0) *versus* log konsentrasi dan lakukan pencocokan regresi linier.

2. 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. Kalikan sampel-sampel COX dengan faktor pengenceran yang sesuai (BC = 100; IA dan Inhibitor = 2000).

$$\text{IA terkoreksi} = A = \text{IA} - \text{BC} \quad (3.4)$$

$$\text{Sampel terkoreksi} = B = \text{Sampel} - \text{BC} \quad (3.5)$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3.6)$$

- c. Buat grafik persen inhibisi dengan konsentrasi inhibitor untuk menentukan nilai IC_{50} .

Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % penghambatan sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} \quad (3.7)$$

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

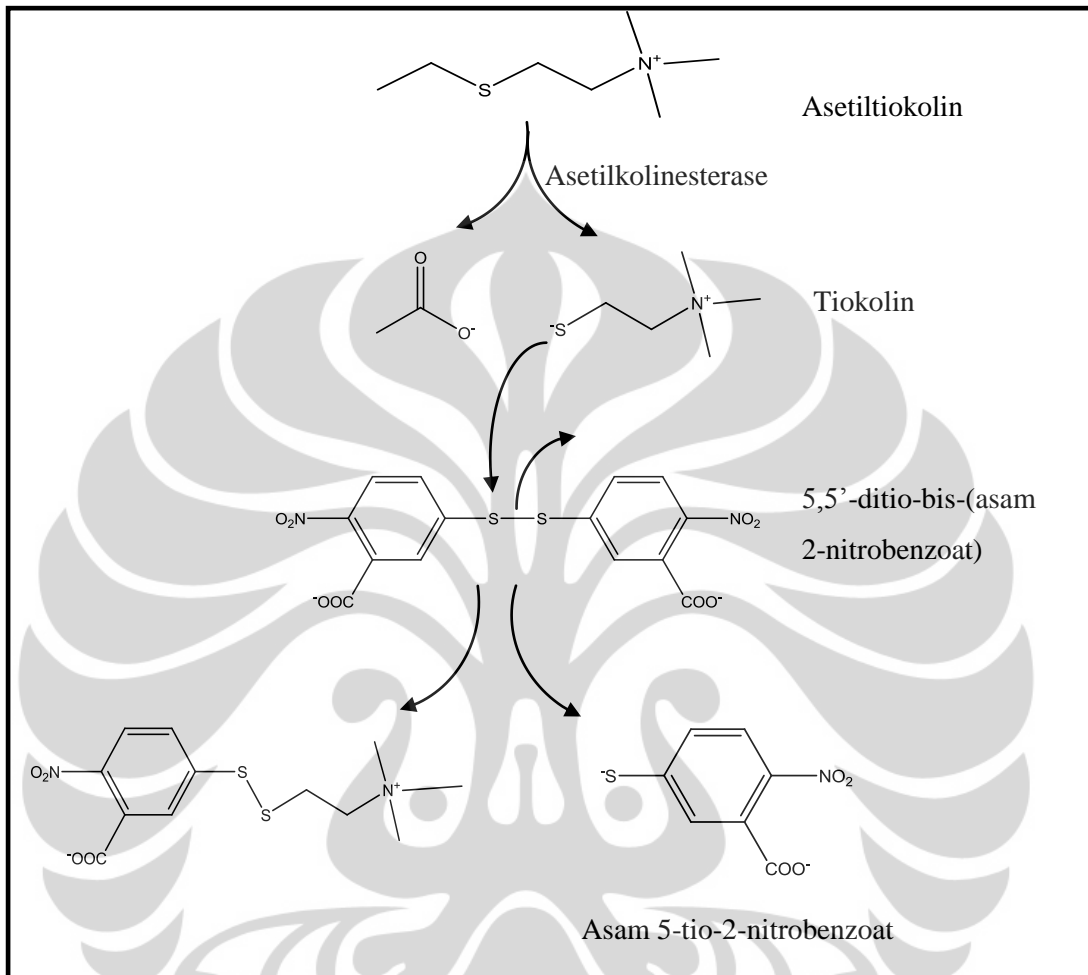
4.1. Uji Penghambatan Aktivitas COX-2

Pengujian hambatan aktivitas Siklooksigenase-2 dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan kit *COX (ovine) Inhibitor Screening Assay*. Siklooksigenase (COX) merupakan katalisis pertama biosintesis asam arakhidonat menjadi PGH₂. Uji aktivitas inhibitor COX (*ovine*) dilakukan secara langsung dengan mengukur PGF_{2α}, dengan cara mereduksi PGH₂ dari COX yang dihasilkan dalam reaksi menggunakan timah (II) klorida (SnCl₂). Produk prostanoid ini diukur melalui *Enzyme Immunoassay* (EIA), menggunakan antiserum yang spesifik berikatan dengan Prostaglandin.

Prinsip dari pengukuran ini berdasarkan pada pengikatan antara antigen dan antibodi. Antibodi yang digunakan yaitu antibodi anti-kelinci monoklonal mencit (*mouse monoclonal anti-rabbit antibody*) yang telah dimasukkan terlebih dahulu pada sumur uji. Kemudian kedalam sumur uji dimasukkan PG *tracer*, antiserum, standar dan sampel inhibitor. Selanjutnya diinkubasi selama 18 jam, selama masa inkubasi inilah terjadi kompetisi antara Prostaglandin (PG) dengan suatu konjugat Prostaglandin-asetilkolinesterase (AChE) yang merupakan PG *tracer* untuk berikatan dengan Prostaglandin antiserum. Kompleks antiserum kelinci-PG ini kemudian berikatan dengan antibodi anti-kelinci monoklonal mencit (*mouse monoclonal anti-rabbit antibody*).

Sumur uji ini kemudian dicuci dengan dapar cuci untuk menghilangkan reagen-reagen yang tidak berikatan, kemudian ditambahkan ke dalam sumur uji yaitu reagen Ellman's, yang berisi asetiltiokolin (substrat untuk AChE) dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat). Asetilkolin akan dihidrolisis oleh asetilkolinesterase yang ada pada PG *tracer* yang berikatan pada sumur uji, menghasilkan tiokolin dan asam asetat. Tiokolin ini selanjutnya bereaksi dengan 5,5'-ditio-bis-(asam 2-nitrobenzoat) yang akan menjadi asam 5-tio-2-nitrobenzoat yang berwarna kuning terang. Intensitas warna inilah yang dapat 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 uji 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.



[Sumber : Cayman Chemicals Inc., Ann Arbor, MI., 2010, telah diolah kembali]

Gambar 4.1. Reaksi katalisis oleh Asetilkolinesterase

Kit yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan COX-2 ini terdiri atas COX-2 (*ovine*) dan KOH yang siap digunakan, dapar reaksi, *heme*, asam arakhidonat (substrat), asam hidroklorida 1 M, timah (II) klorida, dapar EIA, dapar cuci, *Tracer AChE* skrining Prostaglandin, Antiserum Skrining Prostaglandin, Standar Prostaglandin, dan Reagen Elman. Bahan-bahan yang perlu disiapkan adalah bahan-bahan yang harus diencerkan atau harus direkonstitusi terlebih dahulu, sedangkan bahan-bahan yang siap pakai seperti enzim, KOH, HCl 1 M dan air *Ultrapure* dapat langsung digunakan untuk pereaksian COX-2. Setelah dilakukan pengenceran, larutan bahan tersebut harus

Universitas Indonesia

disimpan pada suhu dan jangka waktu tertentu. Suhu dan waktu penyimpanan dapat dilihat pada tabel 3.1. Jika penyimpanannya tidak ditempat yang sesuai atau digunakan melebihi batas waktu peyimpanannya, kestabilan larutan tersebut berkurang maka akan mempengaruhi penghambatan aktivitas enzim.

Selanjutnya dibuat larutan standar Prostaglandin dengan delapan konsentrasi yang berbeda, yaitu 2000 pg/mL; 1000 pg/mL; 500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,3 pg/mL; dan 15,6 pg/mL. Larutan standar Prostaglandin ini digunakan untuk membuat kurva kalibrasi (lampiran 4 bagan 1). Dari kurva kalibrasi tersebut dapat digunakan untuk menghitung jumlah prostaglandin yang terbentuk dari masing-masing sampel inhibitor.

Sebagai senyawa pembanding digunakan Asetosal yang merupakan inhibitor COX non selektif dan Selekoksisib yang merupakan inhibitor selektif COX-2. Mula-mula larutan induk masing-masing sampel inhibitor dibuat pada konsentrasi 100 μ M, lalu dibuat pengenceran untuk Asetosal dengan konsentrasi 50 μ M; 25 μ M; 10 μ M dan 1 μ M. Untuk Selekoksisib dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10 μ M; 1 μ M; 0,1 μ M dan 0,01 μ M. Sedangkan untuk senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat juga dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100 μ M, lalu dibuat pengenceran dengan konsentrasi 20 μ M; 15 μ M; 10 μ M dan 5 μ M. Pertimbangan konsentrasi pengenceran masing-masing larutan inhibitor ini berdasarkan data % inhibisi yang dihasilkan setelah pengukuran uji penghambatan aktivitas COX-2. Pengujian diawali dengan menggunakan konsentrasi 10 μ M dari masing-masing larutan inhibitor, dilanjutkan dengan konsentrasi lebih besar atau lebih kecil dari 10 μ M, sampai didapat % inhibisi diatas 50 % untuk menghitung nilai IC₅₀ dari masing-masing inhibitor tersebut. Tetapi untuk senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat itu sendiri dikarenakan kelarutannya yang praktis tidak larut dalam air, sedangkan dalam tahapan reaksi yang dilakukan menggunakan air sebagai pelarut dari buffer reaksi (merupakan stimulasi dari sistem biologis yang terjadi pada tahapan reaksi pembentukan Prostaglandin), maka konsentrasi tertinggi yang memungkinkan senyawa tersebut dapat melarut yaitu 20 μ M.

Selekoksib yang digunakan sebagai standar inhibitor selektif COX-2 diperoleh dari isolasi sediaan kapsul Celebrex®. Hasil isolasi lalu dilakukan uji kemurnian menggunakan metode Jarak lebur, Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofotometri UV, dan Spektrofotometri IR (Lampiran 8). Dari hasil uji kemurnian tersebut lalu dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (referensi pembandingan), dan hasilnya menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh identik dengan pembandingan yang ada sehingga dapat disimpulkan bahwa selekoksib hasil isolasi tersebut dapat digunakan untuk pengujian.

Pada tahapan pelaksanaan reaksi perlu diperhatikan penambahan-penambahan bahan dan waktu inkubasinya. Pelaksanaan reaksi dilakukan diatas penangas air suhu 37° C, suhu tersebut disamakan dengan suhu tubuh manusia begitu juga pada saat pengukuran menggunakan *plate reader* di inkubasi terlebih dahulu pada suhu 37° C. Pada tahap awal pereaksian, ke dalam setiap tabung uji dimasukan dapar reaksi yang fungsinya disini sebagai stimulasi cairan biologis tubuh, lalu ditambahkan *heme* yang merupakan kofaktor dari COX-2. Sedangkan asam arakhidonat yang ditambahkan setelah inkubasi 10 menit berperan sebagai substrat yang akan menginisiasi reaksi pembentukan prostaglandin. Setelah diinkubasi kembali selama 2 menit, tahap terakhir reaksi dengan menambahkan HCl 1 M yang berfungsi untuk menghentikan reaksi.

Pada pengujian dengan menggunakan metode ini juga dilakukan pengukuran terhadap sumuran NSB, B₀, TA, BC dan IA 100%. Dimana sumur NSB (*Non-Specific Binding*) ini merupakan sumur yang menghasilkan serapan dari ikatan yang tidak spesifik (non imunologi) antara *tracer* dan sumur dari mikroplate tersebut. Ikatan ini mungkin terjadi dalam jumlah yang sangat kecil sehingga serapan yang dihasilkan juga seharusnya rendah. Sumur B₀ (*Maximum binding*) akan menghasilkan serapan yang maksimum (serapan paling tinggi) karena ke dalam sumur ini hanya terdapat PG *tracer* dan antiserum, yang artinya tidak ada kompetisi antara Prostaglandin bebas dan PG *tracer* untuk berikatan dengan antiserum. Sumur TA (*Total Activity*) menghasilkan serapan dari aktivitas enzimatik total dari ikatan asetilkolinesterase. Serapan yang diperoleh dari sumur TA ini tidak diikutsertakan dalam perhitungan karena hanya merupakan analog untuk aktivitas spesifik *tracer* yang bersifat radioaktif.

Sumur BC (*Background*) merupakan sumur yang berisi reagen yang mengandung enzim inaktif juga tanpa penambahan PG *tracer*, sehingga seharusnya tidak ada reaksi enzimatik didalam sumur BC tersebut, artinya PG tidak terbentuk, antiserum tidak dapat berikatan dengan PG, sehingga seharusnya tidak menghasilkan serapan. Tetapi pada kenyataannya masih ada serapan yang diperoleh dari sumur ini. Hal ini mungkin saja karena masih ada sedikit enzim yang masih aktif sehingga masih ada sedikit Prostaglandin yang terbentuk. Sedangkan di dalam sumur IA 100% (*Initial Activity*) terjadi reaksi enzimatik yang maksimum (aktivitas enzim 100%) karena ke dalam sumur ini tidak ditambahkan larutan inhibitor, PG bebas yang dihasilkan lebih banyak daripada PG *tracer* yang jumlahnya terbatas, sehingga PG bebas inilah yang paling banyak berikatan dengan antiserum.

Serapan larutan uji diukur secara berkala setiap 15 menit sampai didapat serapan sumur B_0 antara 0,3 – 1,0. Dari pengujian didapatkan bahwa pada umumnya serapan sumur B_0 yang berada diantara rentang 0,3 – 1,0 adalah pengukuran selama 60 menit. Sehingga untuk selanjutnya data yang digunakan untuk analisis adalah pada pengukuran menit ke-60.

4.2. Analisis Data

Serapan yang dihasilkan dari sumur B_0 dan NSB digunakan untuk menghitung B_0 terkoreksi yang selanjutnya dihitung B/B_0 yaitu perbandingan serapan yang diperoleh dari sumur standar atau sampel dengan serapan dari sumur B_0 . Dari B/B_0 inilah yang selanjutnya dapat dibuat kurva kalibrasi untuk standar Prostaglandin. Dimana loggit B/B_0 sebagai sumbu y dan konsentrasi prostaglandin sebagai sumbu x. Maka diperoleh persamaan regresinya yaitu $y = -0,6352\ln(x) + 2,9058$ dan $r = 0,9961$. Selanjutnya dihitung pula loggit B/B_0 dari masing-masing sampel BC, IA dan inhibitor. Sehingga jika diplotkan kedalam kurva kalibrasi maka akan diperoleh konsentrasi prostaglandin yang terbentuk dari masing-masing sampel tersebut, dan juga dapat dihitung % inhibisi dari sampel inhibitor.

Hasil pengujian yang dilakukan diperoleh IC_{50} untuk Asetosal yaitu 24,97 μM , Selekoksisib 0,43 μM dan senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}3,4 dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat sebesar 16,91 μM seperti

yang terlihat pada histogram gambar 4.6. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat mempunyai kemampuan yang lebih besar menghambat aktivitas COX-2 dibandingkan dengan Asetosal tetapi kemampuannya lebih kecil dibandingkan dengan selekoksib terhadap enzim yang sama. Sebagai pembanding, pengujian juga dilakukan terhadap asetosal dan Selekoksib. Hasil IC₅₀ yang diperoleh dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Tabel 4.1). Dibandingkan dengan referensi dari penelitian sebelumnya terlihat bahwa hasil pengujian IC₅₀ yang dilakukan oleh peneliti lebih kecil dibandingkan dengan referensi yang ada, hal ini dapat disebabkan karena kondisi enzim yang peneliti gunakan mungkin sudah mengalami penurunan kualitas yang disebabkan oleh penyimpanan yang kurang baik pada saat pengiriman/transportasi. Tetapi hasil yang diperoleh masih dapat diterima karena kondisi, pelaksana, waktu dan lokasi pengujian yang berbeda akan diperoleh hasil yang berbeda pula.

Tabel 4.1. Perbandingan data IC₅₀ hasil pengujian dengan penelitian sebelumnya

Senyawa	IC ₅₀ (μM)	
	Hasil pengujian	Referensi
Asetosal	24,97	2,4 (Chen, Qiao-Hong. 2005) 93 (Reddy, M. V. R., et al., 2005) 2,4 (Chowdhury, M.A., et al., 2009)
Selekoksib	0,43	0,07 (Chen, Qiao-Hong. 2005) 1,7 (Reddy, M. V. R., et al., 2005) 0,30 (Abdel-Aziz, 2011) 0,05 (Yue Li, et al., 2011)
Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat	16,91	-

Enzyme Immunoassay merupakan metode analisa semi kuantitatif yang mempunyai beberapa keunggulan maupun kelemahan. Keunggulan metode ini yaitu sensitif, spesifik dan cepat. Dengan metode ini, sejumlah sampel dapat dideteksi dalam waktu yang bersamaan dengan menggunakan sedikit reagen dan dalam waktu yang relatif singkat. Sedangkan kelemahan dari metode ini yaitu dapat terjadi kesalahan pengujian akibat kontrol negatif yang menunjukkan respons positif yang disebabkan adanya antibodi sekunder atau antigen asing yang dapat berinteraksi dengan antibodi/antigen yang dilabel enzim tersebut. Antibodi atau antigen asing tersebut dapat berasal dari kemungkinan adanya senyawa pengganggu pada saat pengukuran. Dengan adanya senyawa pengganggu, juga dapat menyebabkan terjadi kesalahan estimasi sehingga hasil yang diperoleh antara satu pengukuran dengan pengukuran yang lain bisa berbeda, misalnya % KV yang cukup besar. Senyawa pengganggu disini adalah senyawa-senyawa organik misalnya SnCl_2 yang digunakan pada saat pelaksanaan reaksi EIA. Oleh karena itu, sebelum dilakukan pengenceran, perlu dilakukan pemisahan terhadap senyawa-senyawa organik tersebut dengan cara sentrifugasi, dimana supernatan yang diperoleh harus benar-benar jernih. Kesalahan-kesalahan sedikit saja yang terjadi pada saat pelaksanaan reaksi maupun pengukuran EIA, akan sangat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Misalnya pada sampel BC, sampel ini seharusnya tidak menghasilkan PG (kontrol negatif) tetapi ternyata menghasilkan respons positif dan juga didapatkan % KV yang lebih dari 15%, hal ini mungkin disebabkan karena pengerjaan yang kurang hati-hati sehingga masih terdapat senyawa pengganggu yang mempengaruhi reaksi EIA pada sumur tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat dapat menghambat Siklooksigenase-2 dengan nilai IC_{50} 16,91 μ M. Sedangkan nilai IC_{50} senyawa pembanding asetosal dan selekoksib yaitu 24,97 μ M dan 0,43 μ M. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat memiliki potensi penghambatan aktivitas siklooksigenase-2 lebih kecil dibandingkan dengan senyawa pembanding selekoksib.

5.2. Saran

1. Sebaiknya perlu dilakukan juga uji aktivitas penghambatan terhadap Siklooksigenase-1 sehingga dapat diketahui selektivitasnya antara Siklooksigenase-1 dan Siklooksigenase-2.
2. Untuk membandingkan hasil yang diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode yang lain dari uji penghambatan aktivitas Siklooksigenase-2.
3. Untuk memudahkan pengerjaan dan mendapatkan hasil yang lebih baik, pada saat pelaksanaan EIA sebaiknya digunakan pipet mikro yang *multichannel*.

DAFTAR ACUAN

- Ammon, H.P.T., Safayhi, H., Mack, T. & Sabieraj, J. (1993). Mechanism of antiinflammatory action of curcumin and boswellic acid. *J. of Ethnopharmacology*. 113-119.
- Abdel-Aziz, A.A.M, Kamal E.H. ElTahir, & Yousif A. Asiri. (2011). Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study. *E. J. of Med. Chem.* 46, 1648 – 1655.
- Aziz, A. (1999). *Pengembangan Metode ELISA Langsung Untuk Penentuan Residu Kloramfenikol*. Depok: FMIPA UI. 8 – 14.
- Bratawidjaja, K.G. (1991). *Imunologi Dasar*. Edisi kedua. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 3–23.
- Campbell, W.B. (1991). *Lipid-Derived Autacoids : Eicosanoids and Platelet-Activating Factor*. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed 8(1). New York : Pergamen Press. 600–602, 605–606.
- Cayman Chemicals Inc, Ann Arbor, MI. (2010). Retrieved from Cayman's COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit, Catalog No. 560101: <http://www.caymanchem.com>.
- Champe, Pamela C., Richard A. H., & Denise R. F. (2005). *Lippincott's Illustrated Reviews : Biochemistry*. Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins. 143–149.
- Chen, Qiao-Hong, P. N. Praveen Rao & Edward E. K. (2005). Design, synthesis, and biological evaluation of N-acetyl-2-carboxybenzenesulfonamides: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* 13, 2459 – 2468.
- Chowdhury, M.A. (2009). Synthesis and biological evaluation of salicylic acid and N-acetyl-2-carboxybenzenesulfonamide regioisomers possessing a N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one pharmacophore: Dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 19, 6855-6861.
- Crofford, L.J. (2000). Clinical Experience with Specific COX-2 Inhibitors in Arththritis. *Curr. Pharm.* 6(17), 1725-1736.
- Dannhardt, G. & S. Laufer. (2000). Structural Approach to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore?. *Curr. Med. Chem.* 7, 1101-1112.

- Hanafi, A. R., & Syahrudin, E. (2007, Januari 01). *Antibodi Monoklonal dan Aplikasinya Pada Terapi Target (Targeted Therapy) Kanker Paru*. Retrieved Juni 23, 2012, from Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FKUI-RS Persahabatan. Jakarta: <http://www.klikpdpi.com/jurnal-warta/jri-01-07/jurnal-7.htm>.
- 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. & 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. 21–31.
- Kartasasmita, Rahmana Emran. (2002). *Perkembangan Obat Antiradang Bukan Steroid*. Fakultas Kedokteran UGM. 75 (27/4).
- Kurumbail, R.G. et al. (1996). Structural Basis For Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflamantory Agents. *Nature (Lond)*, 384(6610), 644-648.
- Lim, L. (Performer). (2012). *BioTek's Solution to ELISA Detection*. Depok : Seminar Plate Reader BioTek, 24 April 2012.
- Marks D. B. Marks A. D.; & Smith C. M. (2000). *Biokimia kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Jakarta : EGC. 116 – 120.
- Maryam, R. (2007). *Produksi Antibodi Monoklonal Menggunakan Konjugat Fumonisin B₁-Ovalbumin Sebagai Antigen untuk Deteksi Fumonisin Secara Imunoasai*. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 14-24.
- Murray, R. K., Daryl K. G., Peter A. M., & Victor W. R. (2003). *Biokimia Harper* (Andry Hartono, Penerjemah). Jakarta : EGC. 53, 67-74
- Orbaniyah, S., Ismadi M., & Oetari. (2003). Kemampuan Menghambat dan Sifat Hambatan Analog Kurkumin Terhadap Aktivitas Enzim Siklooksigenase. *Sains Kesehatan Fakultas Kedokteran UGM*, 16(1/31).
- Primo, F. T., & Froehlich, P. E. (2005). Celecoxib Identification Methods. *Acta Farm. Bonaerense* 24(3), 421-425.
- Reddy, M.V.R. (2005). Design, synthesis, and biological evaluation of (E)- and (Z)-styryl-2-acetoxyphenyl sulfides and sulfones as cyclooxygenase-2 inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* 13, 1715-1723.
- Rittenburg, J.H. dan Smith C.J. (1990). Fundamentals of immunoassay. In Development and Application of Immunoassay for Food Analysis. *Elsevier Applied Science*, 1, 29-57.

- Sacher, Ronald A., McPherson Richard A. (2002). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium, E/11*. Jakarta : EGC. 223
- Sloane, E. (2004). *Anatomi dan Fisiologi Untuk Pemula*. Jakarta : EGC. 254-257.
- Sumardjo, Damin. (2006). *Pengantar Kimia, Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta*. Jakarta : EGC. 389.
- Syarif, Amir, et al. (2007). *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta. 230 – 242.
- Ulas Obat, Terapi Arthritis : Alih Strategi Terapi OAINS*. (2006, April). Retrieved Mei 2012, from Majalah Farmacia : <http://www.majalah-farmacia.com>.
- (2009). In S. C. Sweetman, *Martindale, The Complete Drug Reference 36st* (pp. 20, 34). London: The Pharmaceutical Press.
- Yue, Li, et al., (2011). Syntheses and characterization of nimesulide derivatives for dual enzyme inhibitors of both cyclooxygenase-1/2 and 5-lipoxygenase. *Bioorg. & Med. Chem.* 19, 2074 – 2083.
- Yuwono, T. (2007). *Biologi Molekular*. Jakarta : Erlangga. 239-240.
- Zhang, WY., Yang, X., Jin, D., & Zhu, X. (2004). Expression and Enzyme Activity Determination of Human COX-1 and-2 in Baculovirus-Insect Cell System. *Acta Pharmacologica Sinica, Chinese Pharmacological Society*, 1000-1006.

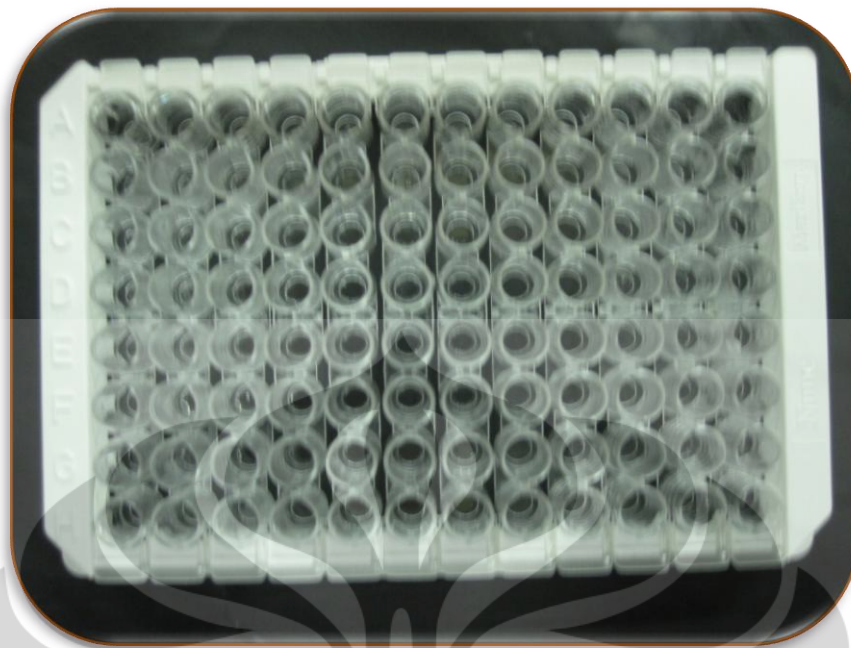




Gambar 3.1. *Plate reader* Biotek ELx808



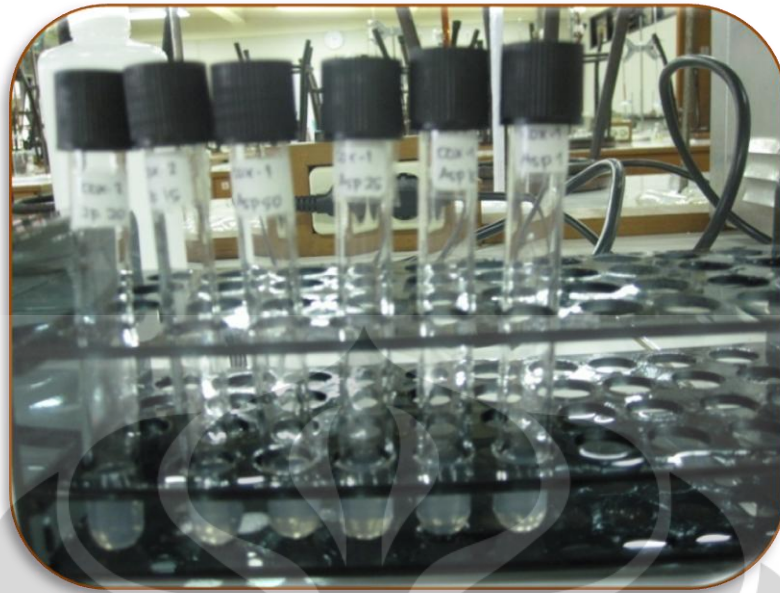
Gambar 3.2. *Plate reader* dan perangkat komputer



Gambar 3.3. *Plate 96 sumuran*



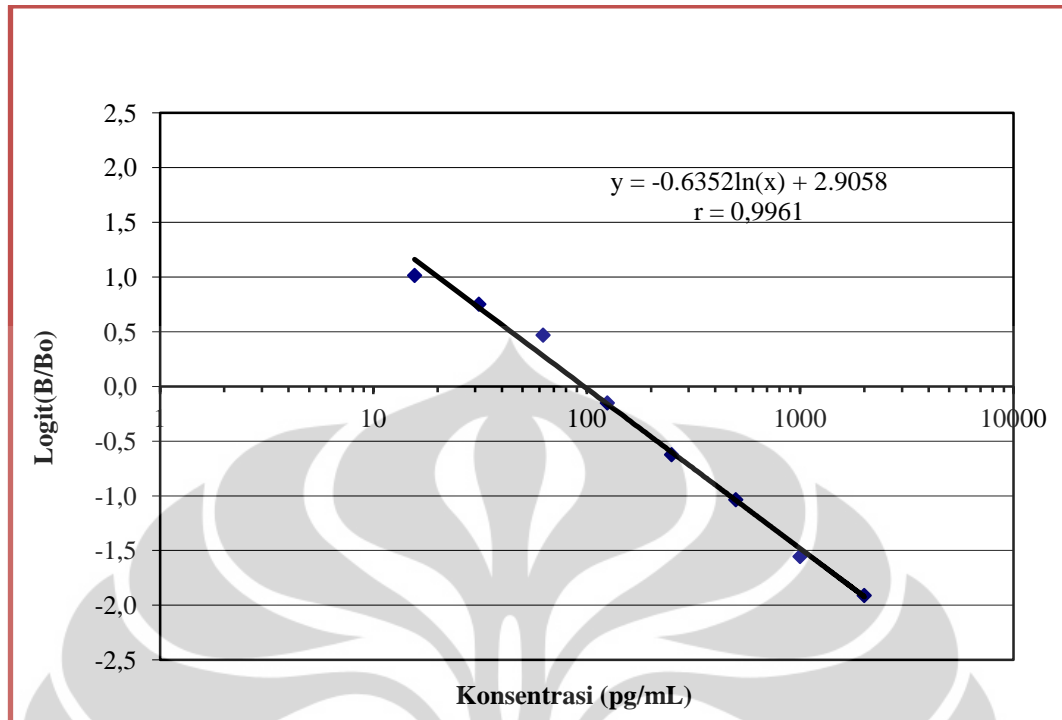
Gambar 3.4. Bahan-bahan reaksi inhibisi COX (*ovine*)



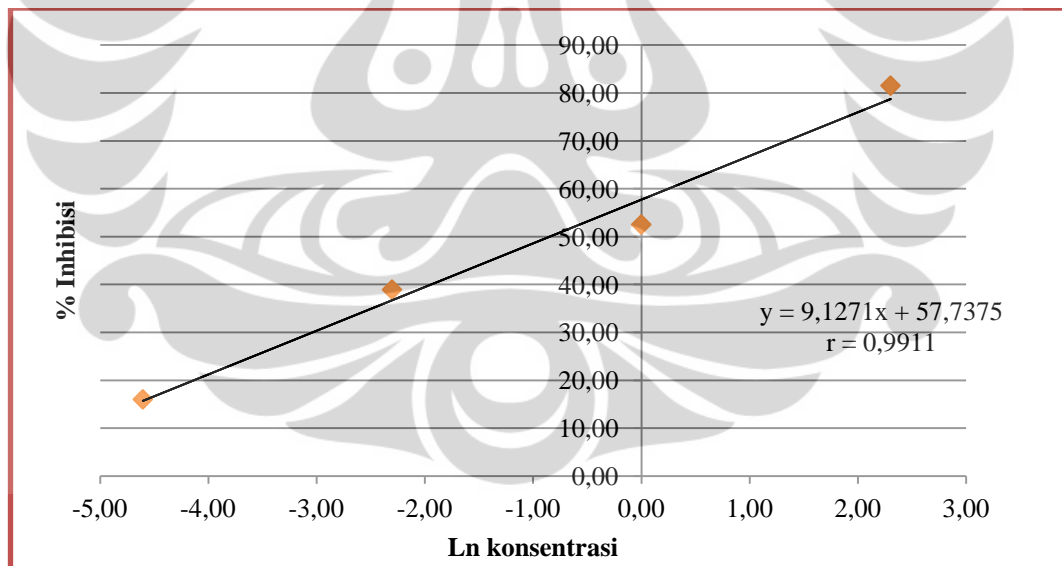
Gambar 3.5. Tabung-tabung pelaksanaan reaksi inhibisi COX



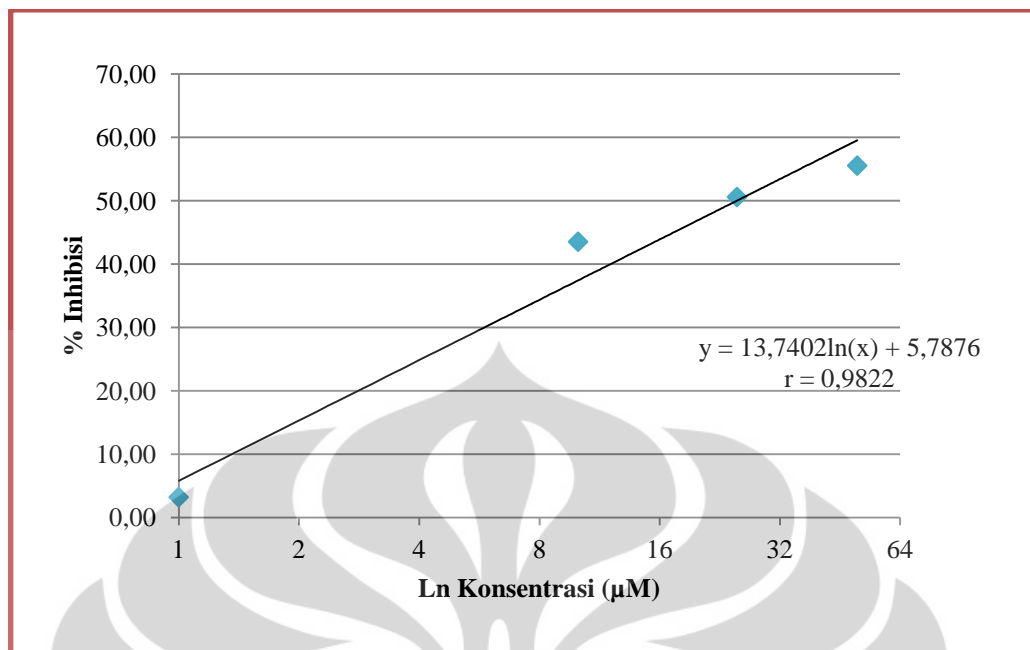
Gambar 3.6. Pelaksanaan reaksi diatas penangas air suhu 37° C



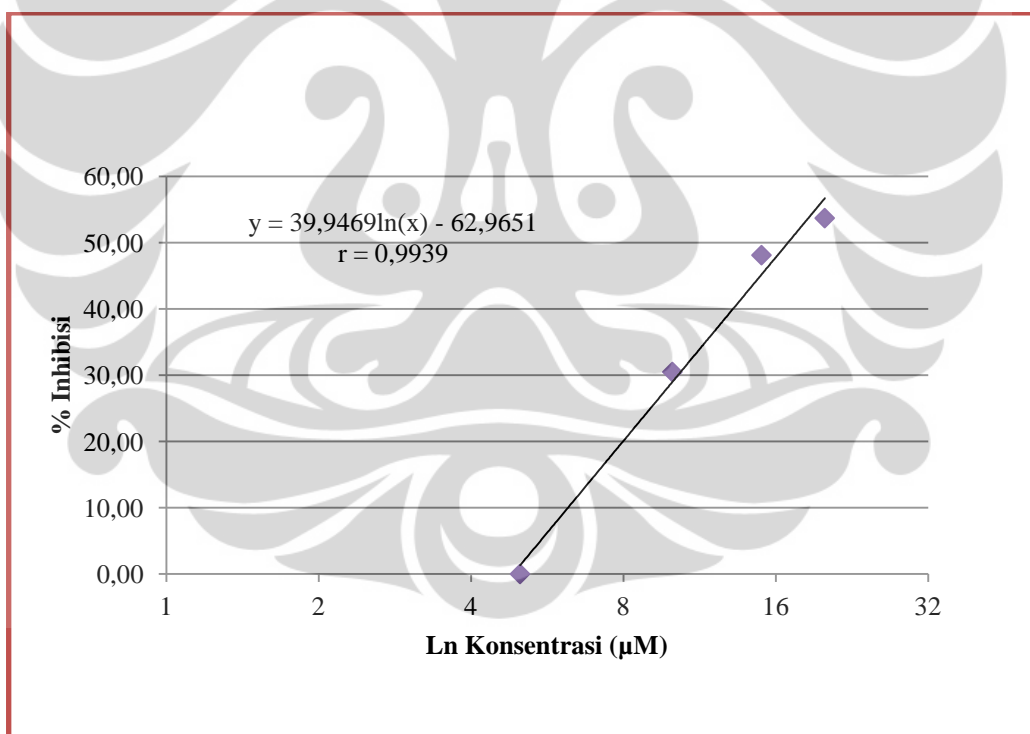
Gambar 4.2. Kurva standar Prostaglandin



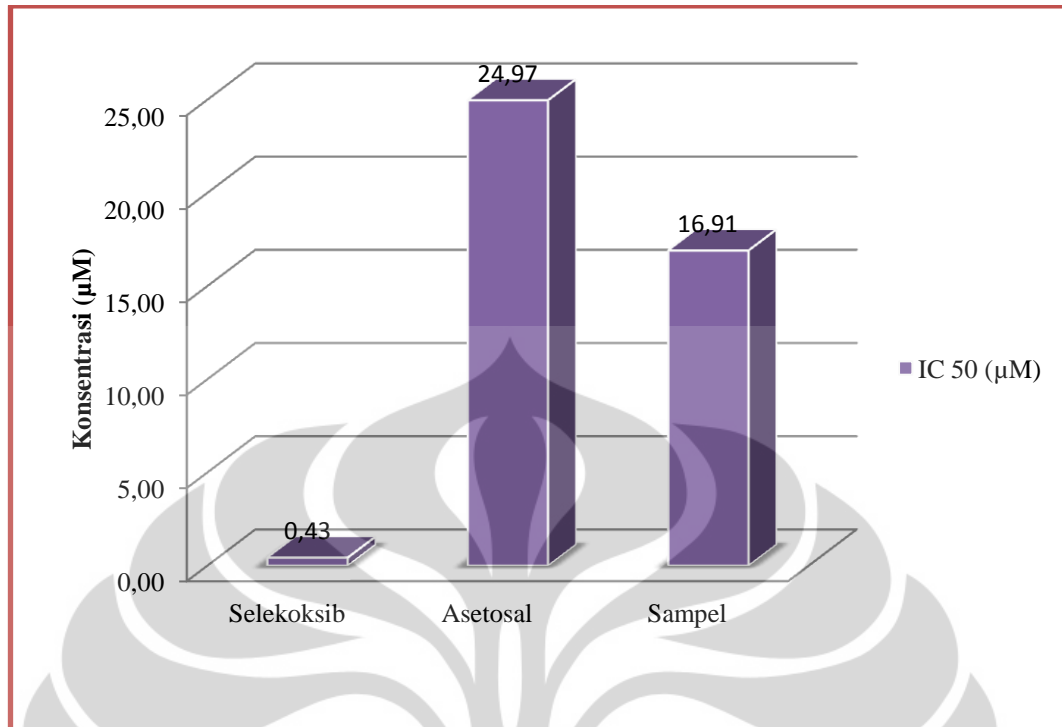
Gambar 4.3. Kurva inhibisi Seleksib



Gambar 4.4. Kurva inhibisi asetosal



Gambar 4.5. Kurva inhibisi etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat



Gambar 4.6. Diagram perbandingan IC 50 antara Selekoksib, Asetosal dan sampel senyawa uji



Tabel 3.1. Kondisi penyimpanan bahan-bahan pereaksi

Nama Bahan	Penyimpanan		Waktu Stabilitas Larutan
	Sebelum Pengenceran	Sesudah Pengenceran	
PG Screening EIA Antiserum	-20 ⁰ C	4 ⁰ C	4 minggu
PG Screening EIA AchE tracer	-20 ⁰ C	4 ⁰ C	1 minggu
PG Screening EIA Standar	-20 ⁰ C	4 ⁰ C	6 minggu
Buffer EIA	Suhu kamar	Suhu kamar	2 bulan
Buffer Cuci	Suhu kamar	Suhu kamar	2 bulan
Buffer Reaksi	-20 ⁰ C	Suhu kamar	1 bulan
Tween 20*	Suhu kamar	Suhu kamar	-
Ig G yang dilapisi pada plate*	4 ⁰ C	4 ⁰ C	-
96 sumuran plate*	Suhu kamar	Suhu kamar	-
Ellman's reagen	-20 ⁰ C	Suhu kamar	-
COX-2*	-80 ⁰ C	-80 ⁰ C	6 minggu
Heme	-20 ⁰ C	Suhu kamar	12 jam
Asam Arakidonat (substrat)	-20 ⁰ C	Suhu kamar	1 jam
Asam Hidroksida (KOH)	-20 ⁰ C	Suhu kamar	-
Asam Klorida (HCl)	-20 ⁰ C	Suhu kamar	1 bulan
Stano Klorida	-20 ⁰ C	Suhu kamar	8 jam

* Tidak diencerkan.

- Tidak ada keterangan waktu stabilitas

Tabel 4.2. Data Kurva kalibrasi standar prostaglandin

Konsentrasi (pg/ml)	Serapan rata-rata	B/Bo	Persamaan regresi
2000,00	0,167	0,129	$y = -0,6352\ln(x) + 2,9058$ $r = 0,9961$
1000,00	0,226	0,174	
500,00	0,340	0,262	
250,00	0,452	0,349	
125,00	0,599	0,462	
62,50	0,797	0,615	
31,25	0,881	0,679	
15,63	0,951	0,743	

Tabel 4.3. Data serapan Blanko, NSB, Bo, IA 100% dan BC

Nama sampel	Serapan
Blanko	0,116
	0,110
NSB	0,116
	0,114
Bo	1,430
	1,375
	1,429
IA	0,409
	0,399
	0,404
	0,437
BC	1,368
	1,356
	1,373
	1,351

Tabel 4.4. Data uji aktivitas penghambatan oleh Selekoksisib

Konsentrasi sampel (µM)	Serapan rata-rata	Konsentrasi prostaglandin rata-rata (pg/ml)	% inhibisi	Persamaan regresi	IC 50 (µM)
10	0,706	256411,4	81,51	$y = 9,1271\ln(x) + 57,7375$ $r = 0,9911$	0,43
1	0,523	658674,8	52,50		
0,1	0,481	847222,2	38,91		
0,01	0,431	1164982,5	15,99		

Tabel 4.5. Data uji aktivitas penghambatan oleh Asetosal

Konsentrasi sampel (μM)	Serapan rata-rata	Konsentrasi prostaglandin rata-rata (pg/ml)	% inhibisi	Persamaan regresi	IC 50 (μM)
50	0,545	616953,5	55,51	$y = 13,7402\ln(x) + 5,7876$ $r = 0,9822$	24,97
25	0,509	685561,0	50,57		
10	0,493	783571,0	43,50		
1	0,409	1342482,0	3,19		

Tabel 4.6. Data uji aktivitas penghambatan oleh etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}benzoat

Konsentrasi sampel (μM)	Serapan rata-rata	Konsentrasi prostaglandin rata-rata (pg/ml)	% inhibisi	Persamaan regresi	IC 50 (μM)
20	0,528	642261,4	53,69	$y = 39,9469\ln(x) - 62,9651$ $r = 0,9939$	16,91
15	0,508	719741,6	48,10		
10	0,495	964203,7	30,47		
5	0,323	283606,38	-		

Tabel 4.7. Data ringkasan hasil perhitungan

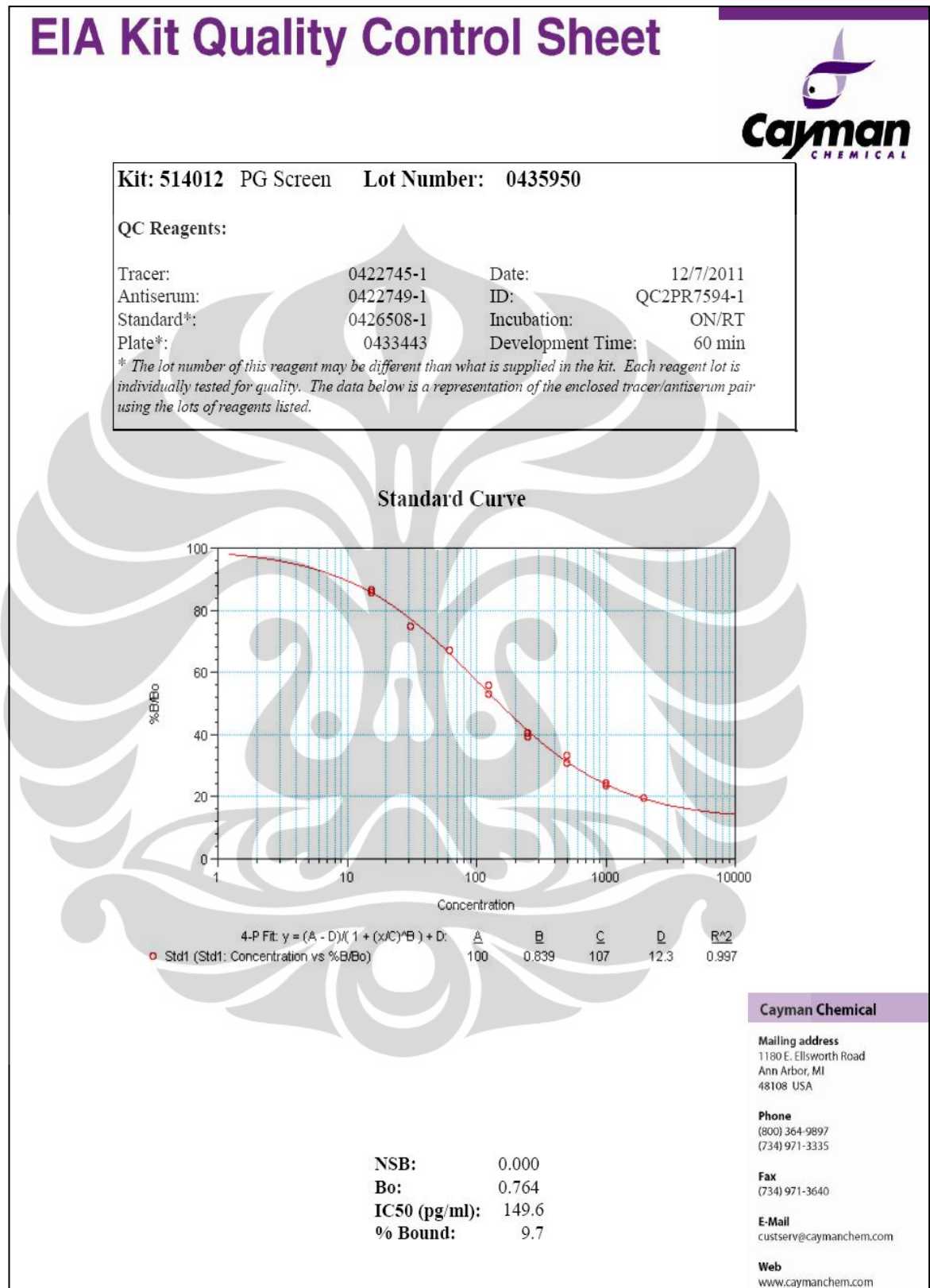
Nama Sampel	Serapan	B/Bo	PG (pg/mL)	SD	% KV	%Inhibisi
BC	1,368	0,967	50,6	30,95	50,18	-
	1,356	0,957	72,8			
	1,373	0,970	39,8			
	1,351	0,953	83,6			
IA	0,409	0,227	1338151,6	68722,80	4,96	-
	0,399	0,219	1435340,4			
	0,404	0,223	1385594,6			
	0,437	0,248	1108997,1			
Asetosal 50 μM	0,556	0,340	550587,3	93855,91	15,21	55,51
	0,517	0,310	683319,6			
	0,540	0,328	600851,6			
	0,533	0,322	624588,4			
Asetosal 25 μM	0,535	0,324	617691,3	95982,34	14,00	50,57
	0,500	0,297	753430,8			
	0,537	0,326	610887,1			
	0,515	0,309	691132,9			
Asetosal 10 μM	0,501	0,298	749064,1	48800,06	6,23	43,50
	0,486	0,286	818077,8			
	0,498	0,295	762260,7			
	0,489	0,289	803650,9			
Asetosal 1 μM	0,399	0,219	1435340,4	131321,59	9,78	3,19
	0,419	0,235	1249623,6			
	0,412	0,229	1310732,4			
	0,404	0,223	1385594,6			
Selekoksib 10 μM	0,711	0,460	250135,5	8875,57	3,46	81,51
	0,701	0,452	262687,4			
	0,708	0,457	253833,2			
	0,704	0,454	258853,4			
Selekoksib 1 μM	0,523	0,315	660528,1	2620,99	0,40	52,50
	0,524	0,316	656821,5			
	0,520	0,312	671804,2			
	0,527	0,318	645854,5			
Selekoksib 0,1 μM	0,496	0,294	771221,4	107481,46	12,69	38,91
	0,466	0,271	923223,1			
	0,483	0,284	832835,7			
	0,479	0,281	853045,1			
Selekoksib 0,01 μM	0,419	0,228	1328926,8	231852,35	19,90	15,99
	0,453	0,261	1001038,1			
	0,410	0,228	1328926,8			
	0,453	0,261	1001038,1			
Sampel 20 μM	0,527	0,318	645854,5	5081,38	0,79	53,69
	0,529	0,319	638668,3			
	0,520	0,312	671804,2			
	0,536	0,325	614277,7			
	0,513	0,307	699057,5			

Sampel 15 μM	0,503	0,299	740425,7	29251,79	4,06	48,10
	0,507	0,302	723520,6			
	0,509	0,304	715249,1			
Sampel 10 μM	0,457	0,264	976217,1	16989,52	1,76	30,47
	0,461	0,267	952190,3			
	0,451	0,259	1013757,3			
	0,476	0,278	868614,9			
Sampel 5 μM	0,332	0,167	2425251,1	283606,38	10,80	-
	0,317	0,156	2774412,0			
	0,315	0,154	2826331,1			
	0,330	0,166	2468048,3			





LAMPIRAN

Lampiran 1 : Lembar *quality control* kit EIA

Lampiran 2 : 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: Name of Product:	阿司匹林颗粒 ACETYL SALICYLIC ACID DC100	取样日期: Sampling Date	2010-04-16	报告日期: Report Date	2010-04-19
批号: Batch No	100401	生产日期: Date of Manufacturing	2010-04-08	失效期: Expiry Date	2014-04
批量: Quantity	0.3 kg	检验记录号: Record No	3012015	报告编号: Report No	3012015
标准依据: Reference Standard	BP2007/USP32/EP6.0 BP2007/USP32/EP6.0				
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			
碳酸钠试液不溶物 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 (%) Sulphates (%)	≤0.04	≤0.02			
氯化物 (%) Chloride (%)	≤0.014	≤0.011			
炽灼残渣 (%) Residue on ignition (%)	≤0.05	0.04			
含量 (以干品计) (%) Assay (on dried basis) (%)	99.5-100.5	100.1			
醇溶液澄清度和色泽 Clarity and Color of alcohol solution	应澄清, 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	0.064			
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 (%)	LCD ≤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: 孙祥祥 放行日期: 2010.4.19 质检负责人: 孙祥祥 复核者: 孙祥祥 报告者: 孙祥祥
Released by: QA Release Date: QC Manager: Rechecked by: Reported by:

Lampiran 3 : Perhitungan penimbangan sampel

Selekoksib

BM : 381,4

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

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

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

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

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

$$x = 1907 \text{ mg/L} = 1,907 \text{ mg/mL} = 9,54 \text{ mg/5mL} \approx 10 \text{ mg/5mL}$$

Asetosal

BM : 180,2

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

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

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

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

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

$$x = 901 \text{ mg/L} = 0,901 \text{ mg/mL} = 4,51 \text{ mg/5 mL} \approx 5 \text{ mg/5 mL}$$

Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfenilenil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]}

benzoat

BM senyawa uji = 475,516

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

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

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

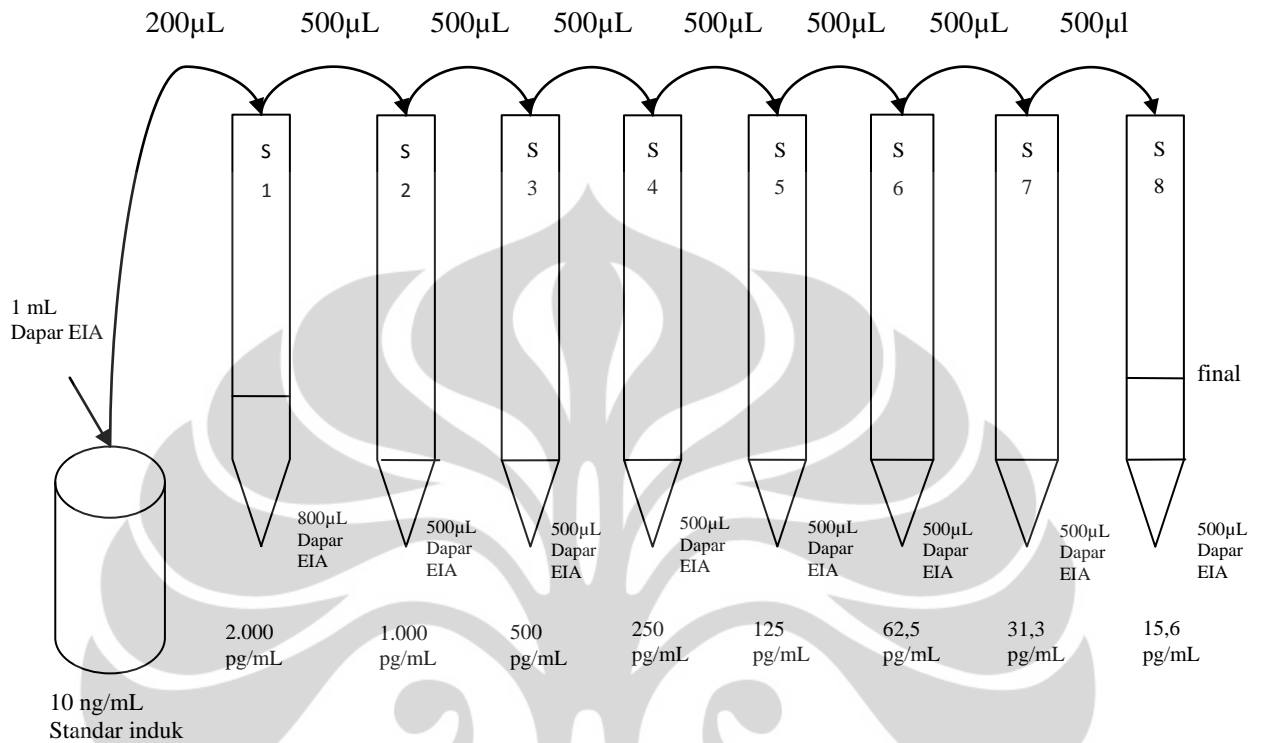
$$x = 5 \text{ mmol/L} \cdot 475,516$$

$$x = 2377,58 \text{ mg/L} = 2,37758 \text{ mg/ml} = 11,89 \text{ mg/5 mL}$$

$$\approx 12 \text{ mg/5 mL}$$

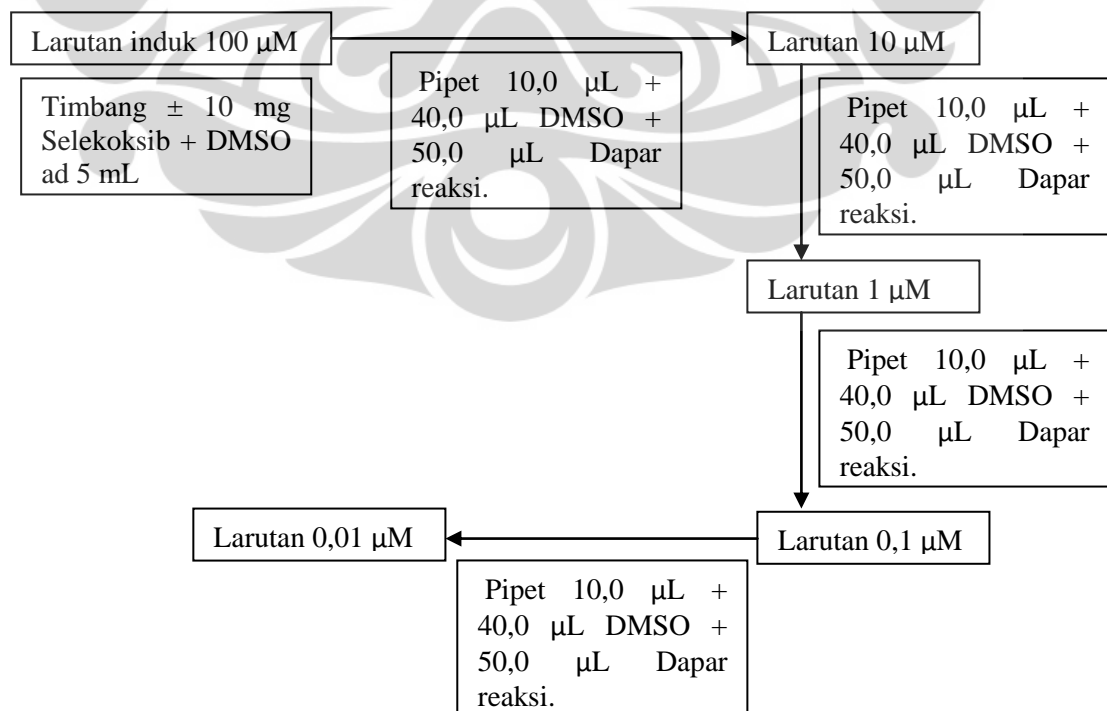
Lampiran 4 : Cara kerja

Bagan 1. Pembuatan larutan standar Prostaglandin

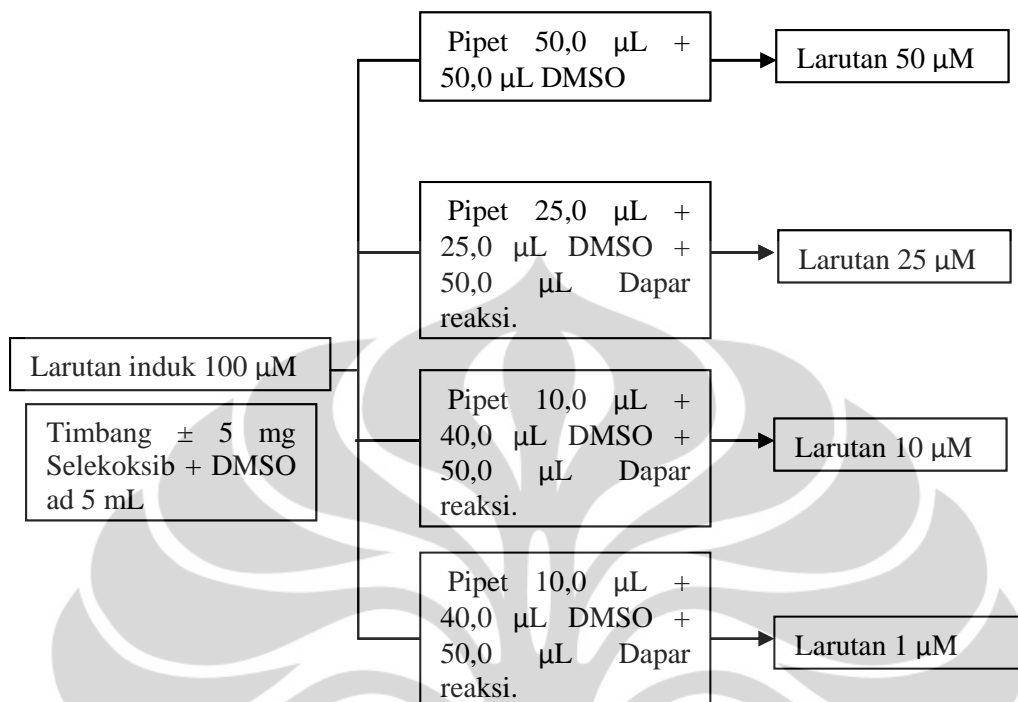


Bagan 2. Pembuatan Larutan Inhibitor

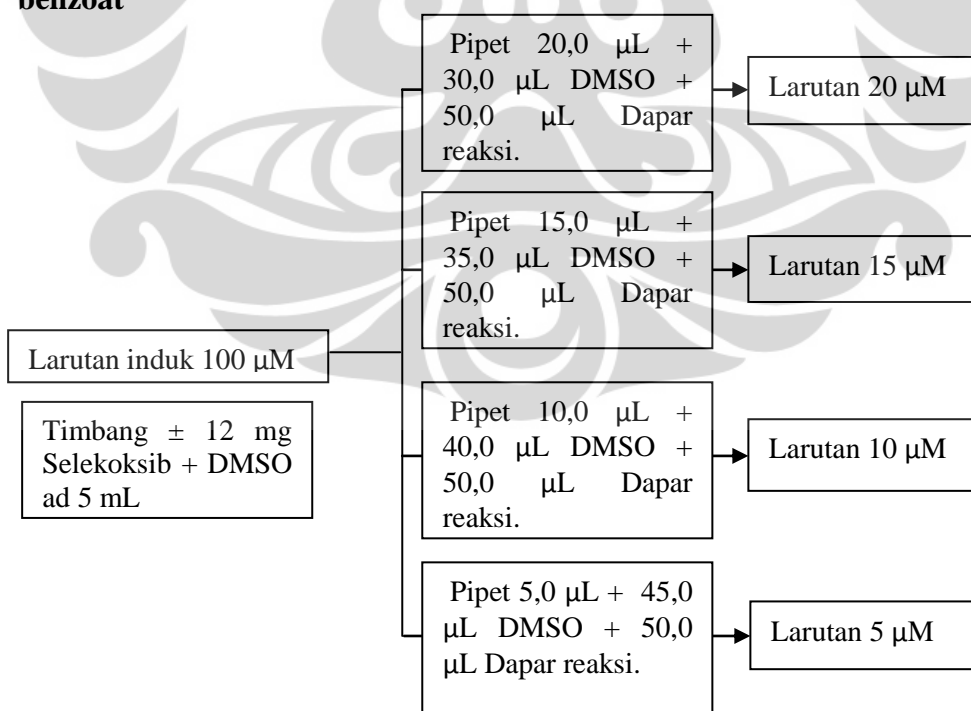
Selekoksib



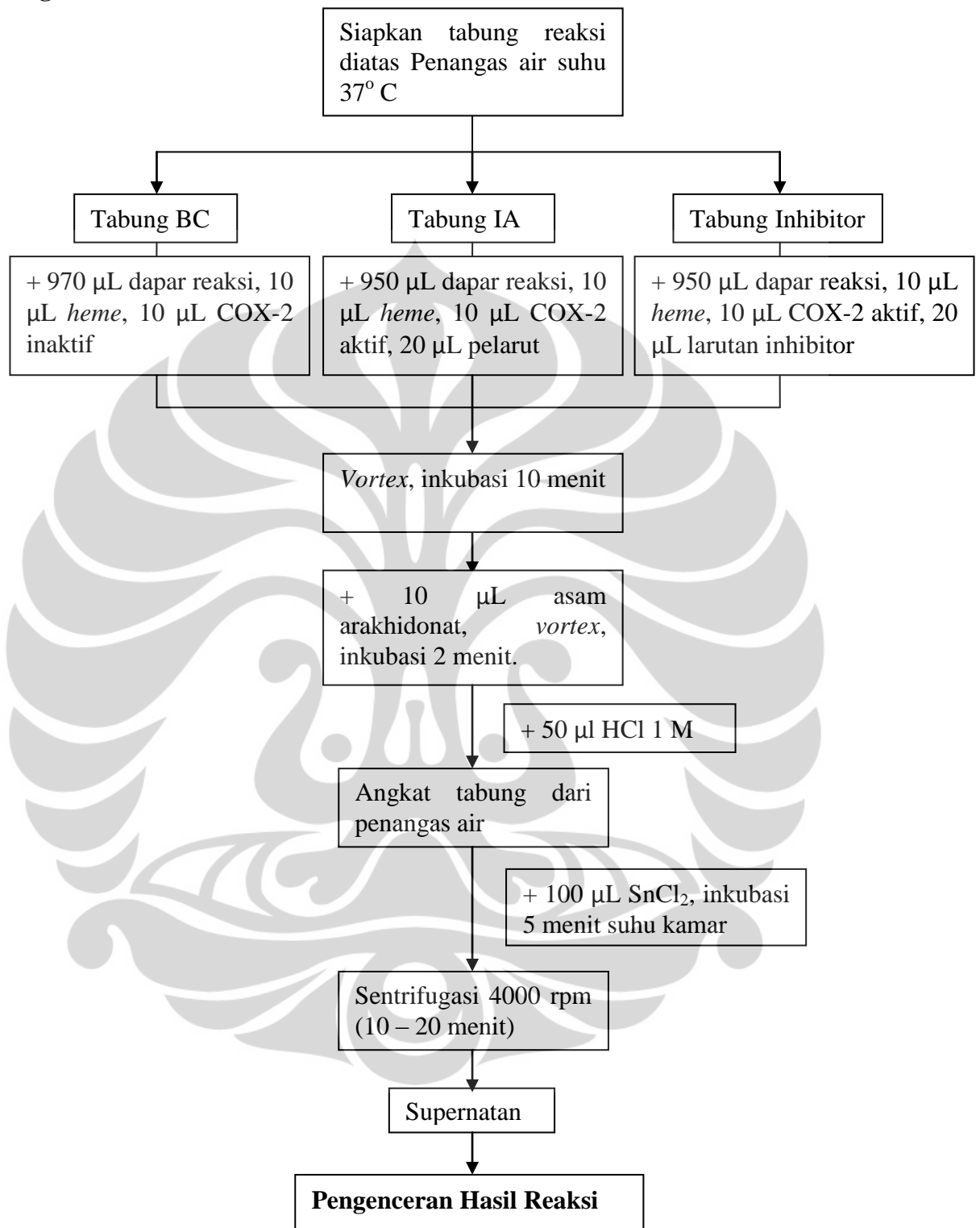
Asetosal

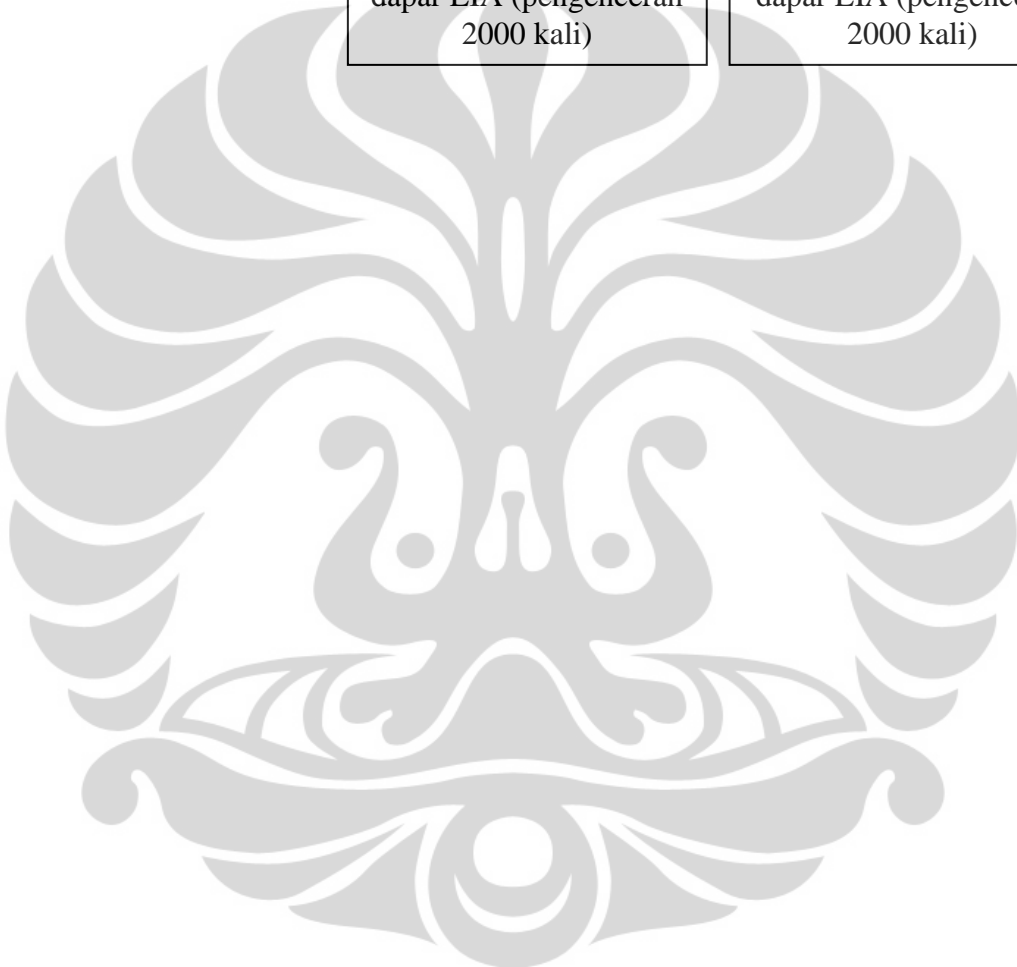
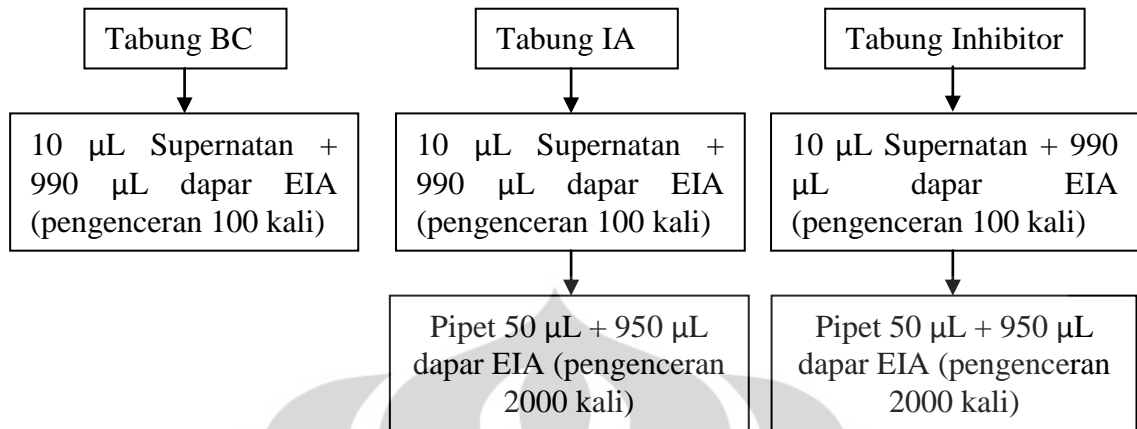


Etil 4-{4-okso-2-[(E)-2-{4-sulfamoilfeniletetil}-3,4-dihidrokuinazolin-3-il]} benzoat



Bagan 3. Pelaksanaan Reaksi COX-2



Bagan 4. Pengenceran Hasil Reaksi

Lampiran 5 : Format lempeng sumur uji sampel

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	BC	BC	H	H	H	H	H	H	H
B	Blk	S2	S2	‡	‡	H	H	H	H	H	H	H
C	NSB	S3	S3	H	H	H	H	H	H	H	H	H
D	NSB	S4	S4	H	H	H	H	H	H	H	H	H
E	Bo	S5	S5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
F	Bo	S6	S6	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G	Bo	S7	S7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	TA	S8	S8	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Keterangan :

Blk = *Blank*

TA = *Total Activity*

NSB = *Non-Specific Binding*

Bo = *Maximum Binding*

S1 – S8 = *Standar 1 – 8*

BC = *Background*

‡ = *Initial Activity 100%*

H = *Inhibitor COX-2*

Lampiran 6 : Contoh Perhitungan Manual

Perhitungan % inhibisi

Diket : $\overline{Bo} = 1,298$

$$\overline{NSB} = 0,002$$

$$\begin{aligned} \text{Maka } Bo \text{ terkoreksi} &= 1,298 - 0,002 \\ &= 1,296 \end{aligned}$$

Misal serapan S1 (setelah dikurangi serapan blanko) adalah 0,173 dan 0,165 maka

$$\text{Untuk } 0,173 \rightarrow B/Bo = \frac{0,173-0,002}{1,296} = 0,132$$

$$\text{Loggit} = \frac{\ln 0,132}{1-0,132} = -1,883$$

$$\text{Untuk } 0,165 \rightarrow B/Bo = \frac{0,165-0,002}{1,296} = 0,126$$

$$\text{Loggit } B/Bo = \frac{\ln 0,126}{1-0,126} = -1,939$$

Buat kurva kalibrasi Prostaglandin dengan sumbu x adalah konsentrasi Prostaglandin dan sumbu y adalah loggit B/Bo. Didapat persamaan regresinya $y = -0,6352\ln(x) + 2,9058$ dan $r = 0,9961$.

Lalu dari kurva kalibrasi tersebut dihitung konsentrasi Prostaglandin masing-masing sampel :

- BC

$$\text{Untuk serapan } 1,373 \rightarrow B/Bo = \frac{1,373-0,002}{1,296} = 0,970$$

$$\text{Loggit } B/Bo = \frac{\ln 0,970}{1-0,970} = 3,491$$

$$\text{Konsentrasi PG} \rightarrow 3,491 = -0,6352\ln(x) + 2,9058$$

$$x = 0,3980 \text{ pg/mL} \cdot \text{Pengenceran}$$

$$x = 0,3980 \cdot 100$$

$$x = 39,80 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Untuk serapan } 1,351 \rightarrow B/Bo = \frac{1,351-0,002}{1,296} = 0,953$$

$$\text{Loggit } B/Bo = \frac{\ln 0,953}{1-0,953} = 3,020$$

$$\text{Konsentrasi PG} \rightarrow 3,020 = -0,6352\ln(x) + 2,9058$$

$$x = 0,836 \text{ pg/mL} \cdot \text{Pengenceran}$$

$$x = 0,836 \text{ pg/mL} \cdot 100$$

$$x = 83,60 \text{ pg/mL}$$

$$\text{Konsentrasi PG BC rata-rata} = \frac{39,80 + 83,60}{2} = 61,7 \text{ pg/mL}$$

- Untuk IA dan Inhibitor pengenceran dikali 2000

Hitung IA terkoreksi = $1386746,0 - 61,7 = 1386684 \text{ pg/mL}$ dan sampel terkoreksi misalnya Asetosal $50 \mu\text{M} = 616953,5 - 61,7 = 616891,8 \text{ pg/mL}$.

$$\text{Maka \% inhibisi Asetosal } 50 \mu\text{M} = \frac{1386684 + 616891,8}{1386684} \times 100 = 55,51 \%$$

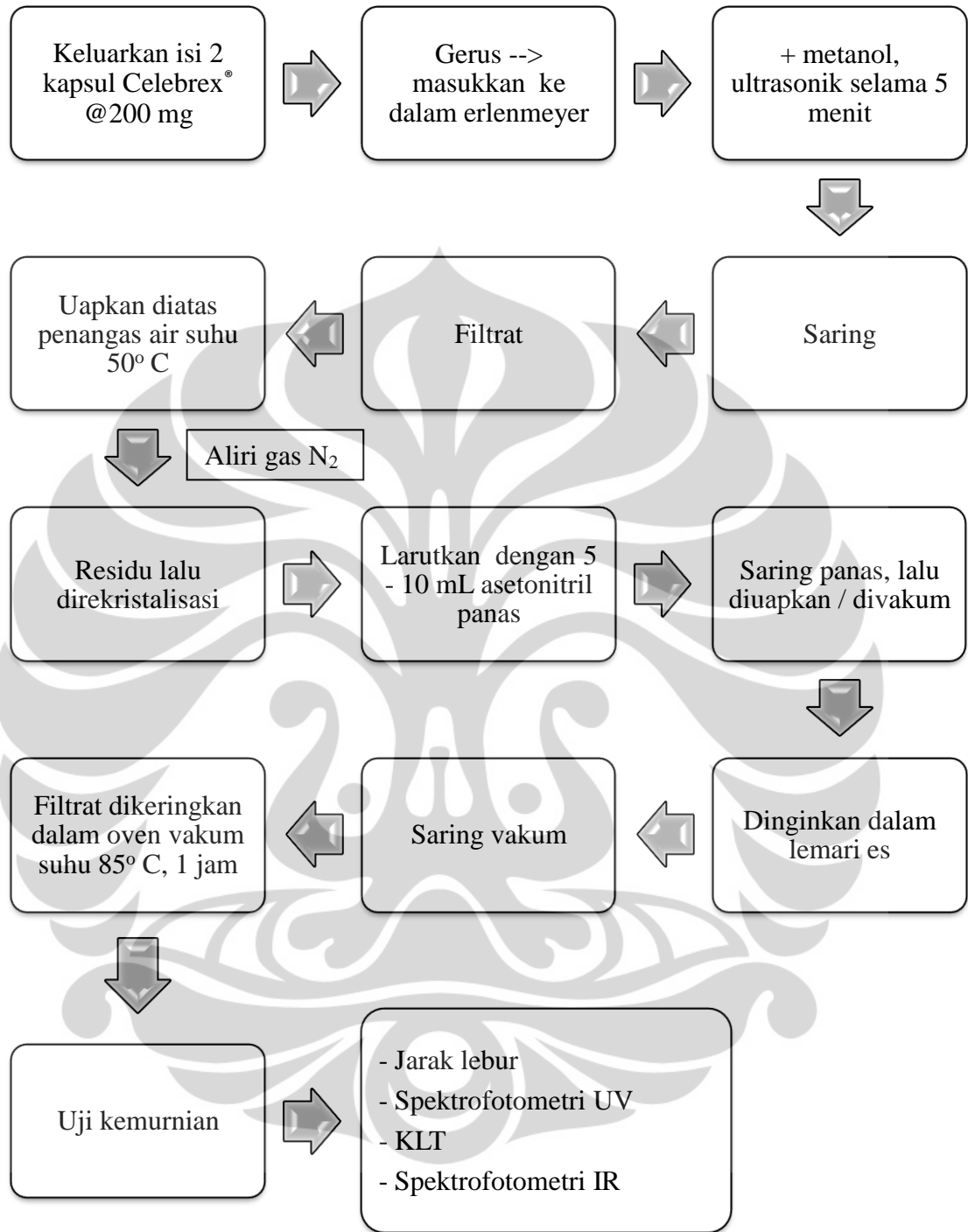
Rumus Perhitungan % KV

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

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

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

Lampiran 7 : Skema Isolasi Selekoksisib



Lampiran 8 : Hasil uji kemurnian selekoksib

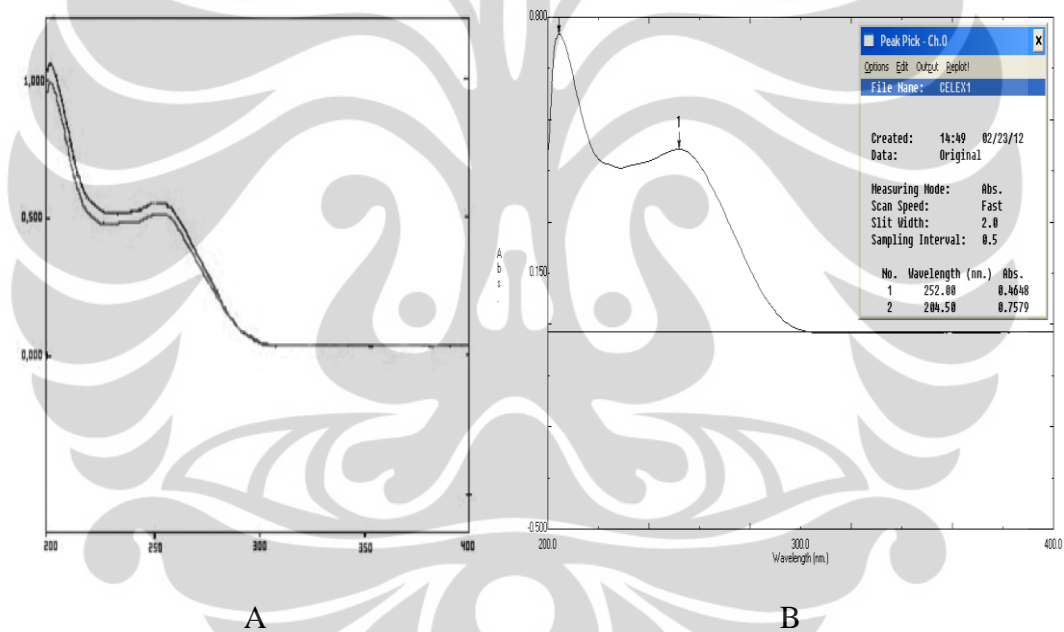
Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fabian Teixeira Primo dan Pedro E. Froehlich (2005).

a. Jarak Lebur

Tabel 4.8. Hasil jarak lebur Selekoksib

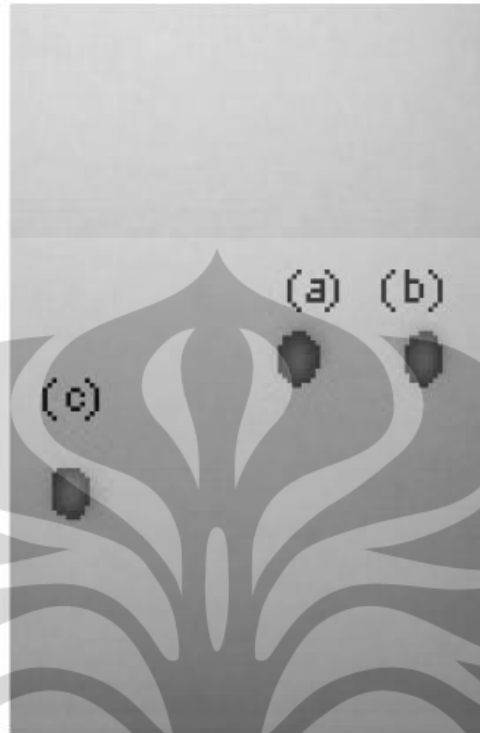
Pembanding	Hasil isolasi
161,3° – 162,2° C	154° – 155° C. Faktor Koreksi alat +7° C

b. Spektrofotometri UV



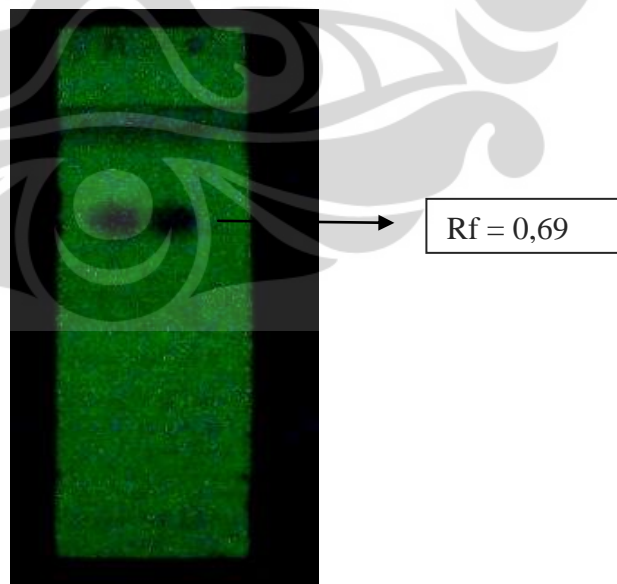
Gambar 4.7. Kurva Spektrofotometri UV Selekoksib. A. Pembanding dan B. Hasil Isolasi dari Celebrex[®]

c. Kromatografi Lapis Tipis



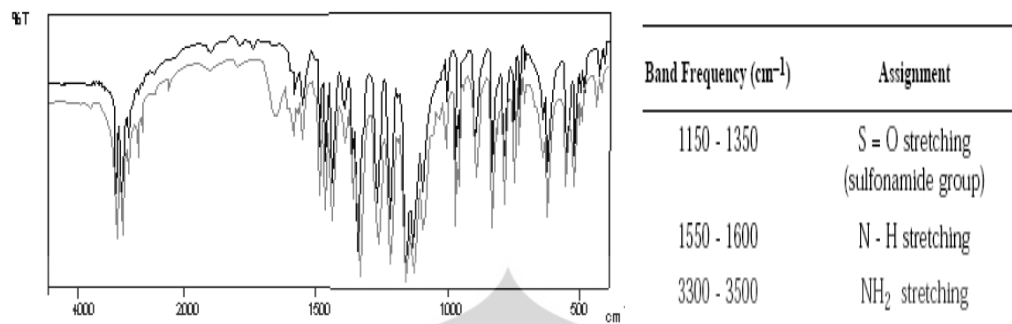
Gambar 4.8. Bercak KLT pembanding Selekoksib.

Keterangan : (a). Sampel; (b). Standar Selekoksib; dan (c). Rofecoxib. Rf sampel dan standar Selekoksib 0,45 sedangkan Rofecoxib 0,32.

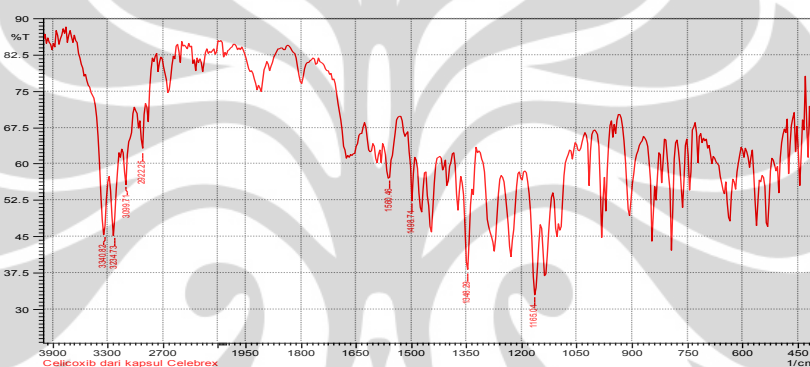


Gambar 4.9. Hasil KLT Selekoksib dari Celebrex[®]

d. Spektrofotometri IR



Gambar 4.10. Kurva Spektrofotometri IR dari Pembanding Selekoksib



Gambar 4.11. Kurva Spektrometri IR Selekoksib hasil isolasi dari Celebrex[®]

Lampiran 9 : Daftar singkatan

AINS	: Antiinflamasi Non Steroid
B	: Binding
B ₀	: Binding nol
BC	: Background
Blk	: Blanko
COX	: Cyclooxygenase
DMSO	: Dimethylsulfoxide
ED ₅₀	: Effective Dose 50%
EIA	: Enzyme Immunoassay
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration
HCl	: Hydro Chloride
HPETE	: Hidroperoksieikosatetraenoat
IA	: Initial Activity
IC ₅₀	: Inhibition Concentration 50%
Ig	: Immunoglobulin
KOH	: Kalium Hidroksida
KV	: Koefisien Variasi
NSB	: Non Spesific Binding
OAINS	: Obat Antiinflamasi Non Steroid
PG	: Prostaglandin
PGI ₂	: Prostaglandin I ₂
SD	: Simpangan Deviasi
SnCl ₂	: Stano Chloride
TA	: Total Activity
TXA ₂	: Tromboxan A ₂