



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN SENYAWA
4-[(E)-2-(4-OKSO-3-FENIL-KUINAZOLIN-2-
IL)ETENIL]BENZENSULFONAMIDA
TERHADAP SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2)**

SKRIPSI

**HARRY UTOMO
0806453592**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN SENYAWA
4-[(E)-2-(4-OKSO-3-FENIL-KUINAZOLIN-2-
IL)ETENIL]BENZENSULFONAMIDA
TERHADAP SIKLOOKSIGENASE-2 (COX-2)**

SKRIPSI

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

**HARRY UTOMO
0806453592**

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

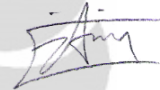
ii

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, 9 Juli 2012



Harry Utomo

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Harry Utomo

NPM : 0806453592

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Harry Utomo
NPM : 0806453592
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-(4-
Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]
bensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2
(COX-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 : Drs. Hayun, M.Si., Apt.

(.....)

Penguji I : Prof. Dr. Maksum Radji, M.Biomed., Apt.

(.....)

Penguji II : Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt.

(.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

He has made the two seas to flow freely, so that they meet together, between them is a barrier which they can't pass.

[Holy Qur'an – Ar Rahmān: 19-20]

Dia membiarkan dua lautan mengalir yang keduanya kemudian bertemu, di antara keduanya ada batas yang tidak dilampaui oleh masing-masing.

[Al-Qur'an – Ar Rahmān: 19-20]

"Nothing is so dangerous to the progress of the human mind than to assume that our views of science are ultimate, that there are no mysteries in nature, that our triumphs are complete, and that there are no new worlds to conquer."

[Sir Humphry Davy, *British chemist* (December 17th, 1778 – May 29th, 1829)]

"Tidak ada yang begitu berbahaya untuk kemajuan pikiran manusia daripada berasumsi bahwa pandangan kita terhadap ilmu pengetahuan adalah utama, bahwa tidak ada misteri di alam, bahwa kemenangan kita lengkap, dan bahwa tidak ada dunia baru untuk ditaklukkan."

[Sir Humphry Davy, ahli kimia Inggris (17 Desember 1778 – 29 Mei 1829)]

Hope to be a contribution to the world, from the noblest science, and continuing contributions of Ibn Sina (Avicenna) et al.

Semoga menjadi kontribusi bagi dunia, dari ilmu pengetahuan yang paling mulia, dan meneruskan kontribusi Ibnu Sina dkk.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penelitian, sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini,
2. Drs. Hayun, M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah dengan sabar membimbing dan mengarahkan, memberikan bantuan, nasehat, dan perhatian, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini,
3. Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan banyak perhatian, saran dan bantuan selama masa perkuliahan,
4. Dr. Arry Yanuar, M.Si., Apt., yang atas segala saran, bimbingan, dan ilmu yang bermanfaat yang diberikan kepada penulis selama masa penelitian hingga penulisan skripsi ini,
5. Para laboran khususnya mba Devfanny dan mba Lia Indriana; dan karyawan Farmasi UI khususnya Bapak Ma'ruf dan Bapak Imih,
6. Ibu Nur Islami dan Bapak Moch. Wiranto yang telah melahirkan diriku ke dunia ini dan memberikan kasih sayang yang tidak akan dapat aku balas,
7. Ifthah Nur S., S.Farm., Apt., yang telah dengan penuh cinta dan kesabaran membantu dan menemani kehidupanku,
8. Saudaraku Arif Arrahman, S.Farm., Apt., dan keluargaku di farmasi Raditya Iswandana, S.Farm., Apt., dan Taufik Indra R., S. Farm., Apt., yang telah memberi bantuan dukungan baik moril maupun materil selama ini,

9. Teman-teman tim penelitian uji aktivitas penghambatan QHEBSA dan analognya,
10. Teman-teman Farmasi angkatan 2008 khususnya Khairul Basyar yang menjadi adik kelas sejak SMP dan mahasiswa penelitian dari semua KBI atas kerja sama, dukungan, dan bantuannya selama kuliah.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima segala kritik dan saran demi perbaikan di masa yang akan datang. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu farmasi pada khususnya.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Harry Utomo
NPM : 0806453592
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

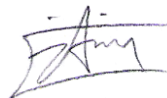
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2 (COX-2)

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 9 Juli 2012
Yang menyatakan



(Harry Utomo)

ABSTRAK

Nama : Harry Utomo
Program Studi : Farmasi
Judul : Uji Aktivitas Penghambatan Senyawa 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida terhadap Siklooksigenase-2 (COX-2)

Penelitian aktivitas penghambatan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida terhadap siklooksigenase-2 (COX-2) telah dilakukan untuk menentukan aktivitas senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida dalam menghambat secara selektif enzim COX-2. Pengujian aktivitas dilakukan menggunakan kit COX (*ovine*) *Inhibitor Screening Assay*, dimana prostaglandin (PG) yang dihasilkan ditentukan melalui metode *Enzyme Immunoassay* (EIA). Selanjutnya diukur menggunakan *microplate reader* pada λ 415 nm. Persen inhibisi senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida pada konsentrasi 1, 5, 10, dan 20 μ M berturut-turut yaitu 19,50; 33,62; 37,29; dan 42,22. Persen inhibisi senyawa pembanding pertama Aspirin pada konsentrasi 1, 10, 25, dan 50 μ M berturut-turut yaitu 3,19; 43,50; 50,56; dan 55,51. Persen inhibisi senyawa pembanding kedua *Celecoxib* pada konsentrasi 0,01; 0,1; 1; dan 10 μ M berturut-turut yaitu 15,99; 38,91; 52,50; dan 81,51. Perbandingan persen inhibisi ketiga senyawa tersebut pada konsentrasi yang sama yaitu 10 μ M menunjukkan *Celecoxib* memiliki aktivitas penghambatan COX-2 tertinggi, sedangkan senyawa uji 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida memiliki aktivitas penghambatan COX-2 terendah dan nilai IC_{50} -nya tidak dapat diperoleh karena dari empat konsentrasi larutan uji yang dianalisis, tidak ada yang menghasilkan persen inhibisi melebihi 50%.

Kata Kunci : 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensulfonamida, COX-2, *Enzyme Immunoassay* (EIA), IC_{50} , persen inhibisi
xv+44 halaman ; 14 gambar; 6 tabel; 9 lampiran
Daftar Pustaka : 25 (1986-2012)

ABSTRACT

Name : Harry Utomo
Study Program : Pharmacy
Title : Inhibitory Activity Assay of 4-[(E)-2-(4-Oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide on Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Research on the inhibitory activity of compound 4-[(E)-2-(4-oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide on cyclooxygenase-2 (COX-2) was performed to determine the activity of the compound 4-[(E)-2-(4-oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide in selectively inhibiting COX-2 enzyme. Activity assays performed using the COX (ovine) Inhibitor Screening Assay kit, in which prostaglandin (PG) that was produced, determined using Enzyme Immunoassay (EIA) method. Next, PG was measured using microplate reader at λ 415 nm. Percent inhibition of compound 4-[(E)-2-(4-oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide at concentrations of 1, 5, 10, and 20 μM respectively is 19,50; 33,62; 37,29; and 42,22. Percent inhibition of the first comparator compound Aspirin at concentrations of 1, 10, 25, and 50 μM respectively is 3,19; 43,50; 50,56; and 55,51. Percent inhibition of the second comparator compound Celecoxib at concentrations of 0,01; 0,1; 1 and 10 μM respectively is 15,99; 38,91; 52,50; and 81,51. Comparison of percent inhibition of all three compounds at the same concentration of 10 μM showed that Celecoxib has the highest inhibitory activity on COX-2, while the test compound 4-[(E)-2-(4-oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide have the lowest COX-2 inhibitory activity, and the IC_{50} value can not be obtained because from the four concentrations of test solutions analyzed, none of which produce over 50% of percent inhibition.

Key Words : 4-[(E)-2-(4-oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)ethenyl]benzenesulfonamide, COX-2, Enzyme Immunoassay (EIA), IC_{50} , percent inhibition
xv+44 pages ; 14 figures; 6 tables; 9 appendices
References : 25 (1986-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vii
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida	3
2.2. Aspirin.....	4
2.3. <i>Celecoxib</i>	4
2.4. Siklooksigenase-1 dan -2	5
2.5. Penghambat Selektif Siklooksigenase-2	6
2.6. Uji-uji Penghambatan Siklooksigenase (COX)	7
2.7. Asetilkolinesterase (AChE)	11
2.8. <i>Microplate Reader</i> (ELISA Reader)	11
BAB 3 METODE PENELITIAN	13
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2. Alat	13
3.3. Bahan	13
3.4. Cara Kerja	13
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
5.1. Kesimpulan.....	29
5.2. Saran	29
DAFTAR ACUAN	30
Lampiran	33

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Data Senyawa 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida.....	3
Tabel 2.2	Data Aspirin	4
Tabel 2.3	Data <i>Celecoxib</i>	5
Tabel 2.4	Karakteristik Siklooksigenase-1 dan -2.....	5
Tabel 4.1	Data Persen Inhibisi Sumur BC, IA, dan Senyawa-senyawa Uji.....	25
Tabel 4.2	Perbandingan Nilai IC ₅₀ Hasil Pengujian dengan Penelitian Sebelumnya	28

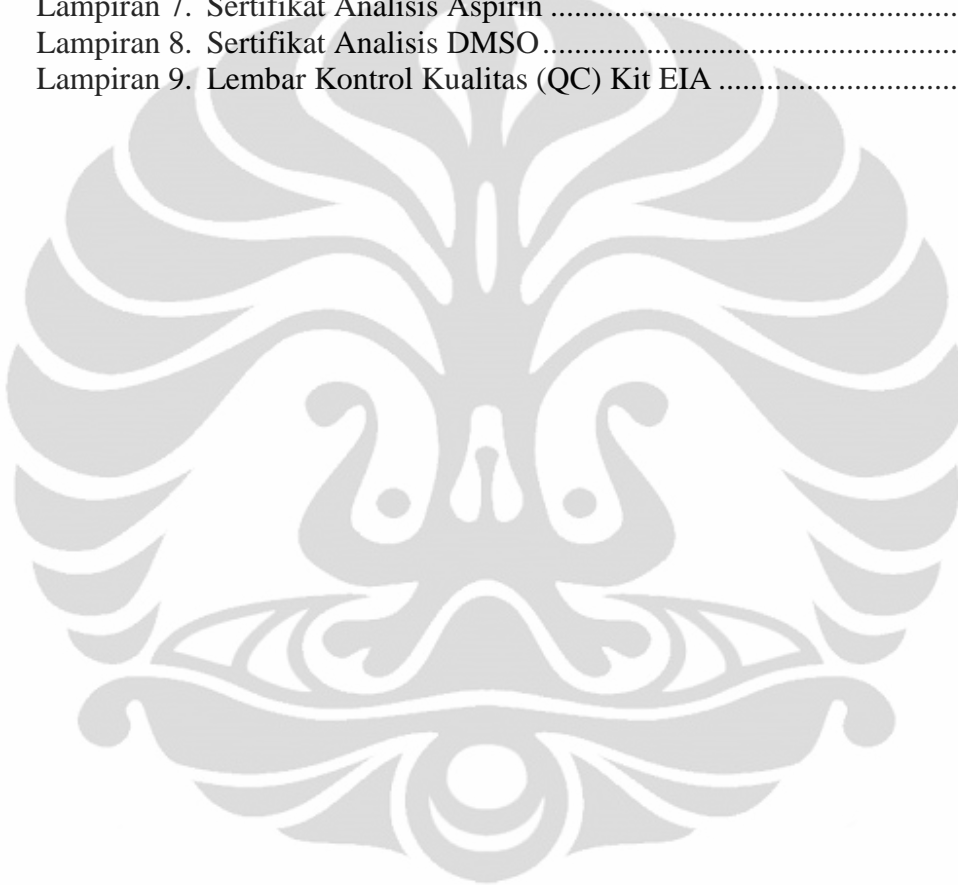


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Molekul 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida	3
Gambar 2.2	Struktur Molekul Aspirin (Asetosal)	4
Gambar 2.3	Struktur Molekul <i>Celecoxib</i>	4
Gambar 2.4	Struktur Molekul <i>Celecoxib</i> (1) dan <i>Rofecoxib</i> (2).....	6
Gambar 2.5	Skema Proses EIA.....	10
Gambar 2.6	Reaksi yang Dikatalisis oleh AChE.....	11
Gambar 2.7	Skema <i>Microplate Reader</i>	12
Gambar 3.1	Skema Penyiapan Larutan Standar PG.....	15
Gambar 3.2	Format Lempeng Sumur Uji.....	18
Gambar 4.1	Kurva Kalibrasi Larutan Standar PG	24
Gambar 4.2	Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan Aspirin	26
Gambar 4.3	Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan <i>Celecoxib</i>	26
Gambar 4.4	Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida.....	27
Gambar 4.5	Diagram Perbandingan % Inhibisi Aspirin, <i>Celecoxib</i> , dan 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida pada Konsentrasi 10 μM	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Penimbangan Sampel	33
Lampiran 2. Skema Pengenceran Sampel	34
Lampiran 3. Skema Isolasi <i>Celecoxib</i>	36
Lampiran 4. Hasil Isolasi <i>Celecoxib</i>	36
Lampiran 5. Tabel Kondisi Penyimpanan Bahan-bahan Kit EIA	39
Lampiran 6. Gambar Alat dan Bahan yang Digunakan Selama Penelitian.....	39
Lampiran 7. Sertifikat Analisis Aspirin	42
Lampiran 8. Sertifikat Analisis DMSO	43
Lampiran 9. Lembar Kontrol Kualitas (QC) Kit EIA	44



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Setiap obat baru yang dihasilkan harus memiliki aksi yang selektif untuk mengurangi efek samping yang tidak diinginkan. Pada penanganan beberapa penyakit seperti pencegahan pembentukan thrombus intravaskular oleh platelet pada penyakit kardiovaskular, selektivitas penghambatan terhadap siklooksigenase-1 (COX-1) yang akan mencegah pembentukan tromboksan A₂ (TxA₂) menjadi penting (Panara, 1999; Scheimer, 2003). Di sisi lain, selektivitas penghambatan terhadap COX-2 akan mencegah pembentukan prostaglandin E₂ (PGE₂) yang merupakan mediator penting pada proses timbulnya rasa nyeri/sakit, namun dengan tingkat keamanan yang lebih baik pada gastrointestinal (Smyth & Fitz, 2007).

4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida merupakan senyawa hasil sintesis dan senyawa baru turunan dari 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon (Hudiyono & Hayun, 2011). Senyawa tersebut merupakan senyawa diaril heterosiklik. Sejumlah senyawa diaril heterosiklik memiliki aktivitas sebagai inhibitor selektif siklooksigenase-2 (Dannhardt & Laufer, 2000) dan berdasarkan hasil skrining virtual, senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida diperkirakan memiliki aktivitas dalam menghambat selektif COX-2 (Hayun, Yanuar, Hanafi, & Hudiyono, 2011).

Dari sejumlah studi hubungan struktur dan aktivitas senyawa yang memiliki efek penghambatan selektif COX-2, seperti gugus fungsi sulfonamida (-SO₂NH₂) atau N-asetilsulfonamida (-SO₂NHCOCH₃) pada posisi para dari salah satu cincin arilnya, dibutuhkan untuk menghasilkan potensi dan selektivitas inhibisi COX-2 (Dannhardt & Laufer, 2000; Kurumbail, et al., 1996). Oleh karena itu, senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida berpotensi sebagai obat anti-inflamasi non-steroid selektif COX-2 baru.

Penelitian ini merupakan penelitian untuk mengetahui aktivitas penghambatan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida terhadap COX-2, serta untuk mengetahui aktivitasnya

dalam menghambat kerja enzim tersebut. Uji aktivitas penghambatan COX-2 dilakukan menggunakan kit COX (ovine) *Inhibitor Screening Assay* dengan metode *Enzyme Immunoassay* (EIA) yang diukur menggunakan *microplate reader*. Metode tersebut dipilih karena dapat menguji inhibisi baik COX-1 dan COX-2, sehingga dapat digunakan untuk melakukan skrining inhibitor-inhibitor isozim spesifik. Pengujian terlebih dahulu dilakukan pada konsentrasi inhibitor sebesar 10 μM . Bila pada konsentrasi tersebut persen inhibisi enzim yang terukur lebih kecil dari 50%, maka konsentrasi dinaikkan sepuluh kali konsentrasi awal. Sebaliknya, bila persen inhibisi enzim yang terukur lebih besar dari 50%, maka dilakukan pengenceran konsentrasi inhibitor menjadi sepersepuluh konsentrasi awal.

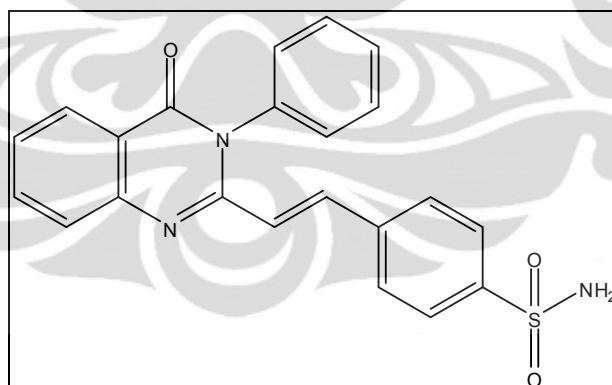
1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas penghambatan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida terhadap COX-2.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida (Senyawa 2a)

Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida terbentuk sebagai hasil kondensasi senyawa 2-metil-3-fenil-4(3H)-kuinazolinon dengan senyawa 4-formilbenzensulfonamida dalam pelarut asam asetat glasial dan katalis natrium asetat anhidrat (Hudiyono & Hayun, 2011). Senyawa-senyawa yang mengandung sistem cincin 4(3H)-kuinazolinon telah dilaporkan mempunyai berbagai aktivitas biologis berbeda-beda, antara lain anti-inflamasi, anti-histamin H₂, dan lain-lain. Aktivitas biologi senyawa tersebut bergantung pada jenis dan posisi gugus-gugus fungsi pada sistem cincin tersebut. Pada skrining virtual senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida, senyawa tersebut diperkirakan memiliki aktivitas dalam menginhibisi selektif COX-2 (Hayun, Yanuar, Hanafi, & Hudiyono, 2011).



[Sumber : Hudiyono & Hayun, 2011]

Gambar 2.1. Struktur Molekul 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida

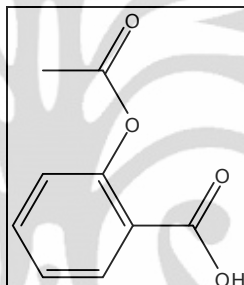
Tabel 2.1. Data Senyawa 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida

Rumus Molekul	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ SO ₃
Berat Molekul	403,45

Bentuk dan Warna	Serbuk kuning pucat
Jarak Lebur (°C)	277-278
Kelarutan	Praktis tidak larut dalam air dan eter; sangat sukar larut dalam etanol; sukar larut dalam asetonitril dan kloroform; larut dalam THF; mudah larut dalam DMSO
Rf KLT (cm)	0,23
Fase Gerak KLT	Etil asetat:sikloheksana:NH ₄ OH (1:1:0,075)

[Sumber : Hudiyono & Hayun, 2011]

2.2 Aspirin (Asetosal)



[Sumber : Merck & Co., Inc., 2001]

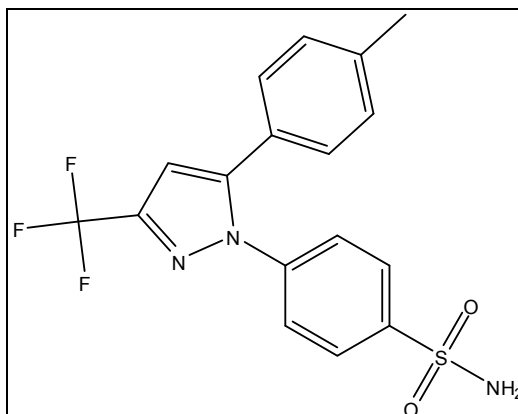
Gambar 2.2. Struktur Molekul Aspirin (Asetosal)

Tabel 2.2. Data Aspirin

Rumus molekul	C ₉ H ₈ O ₄
Berat molekul	180,2
Bentuk dan warna	Kristal, serbuk kristal, granul tidak berwarna atau putih
Titik lebur (°C)	135
Kelarutan	1:300 air, 1:5 etanol, 1:17 kloroform dan 1:10-15 eter

[Sumber : Moffat, Jackson, Moss, & Widdop, 1986]

2.3 Celecoxib



[Sumber : Merck & Co., Inc., 2001]

Gambar 2.3. Struktur Molekul *Celecoxib*

Tabel 2.3. Data *Celecoxib*

Rumus molekul	$C_{17}H_{14}F_3N_3O_4S$
Berat molekul	381.4
Bentuk dan warna	Padatan kuning pucat
Jarak lebur ($^{\circ}C$)	157 – 159
Kelarutan	Sukar larut dalam air ($< 3,3$ mg/mL) ¹ , mudah larut dalam DMSO (200 mg/mL) dan etanol (100 mg/mL) ²

[Sumber : Moffat, Jackson, Moss, & Widdop, 1986; ¹Tiwari, Kinikar, Pillai, & Gokulan, 2010;

²LC Laboratories, 2012]

2.4 Siklooksigenase-1 dan -2

Awal tahun 90-an ditemukan bahwa enzim siklooksigenase terdapat dalam dua bentuk (isoform), yaitu COX-1 dan COX-2 (Dannhardt & Laufer, 2000; Meyer-Kirchrath & Schrör, 2000). Kedua isoform berbeda distribusinya pada jaringan dan juga memiliki fungsi regulasi yang berbeda. COX-1 merupakan enzim utama yang mengkatalisis pembentukan prostanoïd regulatoris pada berbagai jaringan, terutama pada selaput lendir traktus gastrointestinal, ginjal, platelet dan epitel pembuluh darah. Bertolak belakang dengan COX-1, COX-2 tidak konstitutif tetapi dapat diinduksi, antara lain bila ada stimulus radang, mitogenesis atau onkogenesis. Setelah stimulasi tersebut lalu terbentuk prostanoïd yang merupakan mediator nyeri dan radang. Penemuan ini mengarah kepada hipotesis, bahwa COX-1 mengkatalisis pembentukan prostaglandin “baik” yang bertanggung jawab menjalankan fungsi-fungsi regulasi fisiologis, sedangkan COX-2 mengkatalisis pembentukan prostaglandin “jahat” yang menyebabkan radang (Dannhardt & Laufer, 2000). Sehubungan dengan hipotesis tersebut maka toksisitas obat anti inflamasi non steroid klasik pada saluran gastrointestinal disebabkan oleh hambatan tidak selektif obat tersebut terhadap aktifitas COX-1 dan COX-2 (Kartasasmita, 2002).

Tabel 2.4. Karakteristik Siklooksigenase-1 dan -2

Parameter	Siklooksigenase-1	Siklooksigenase-2
Regulasi Mrna	Konstitusional	Diinduksi
Induktor	-	Sitokin, LPS

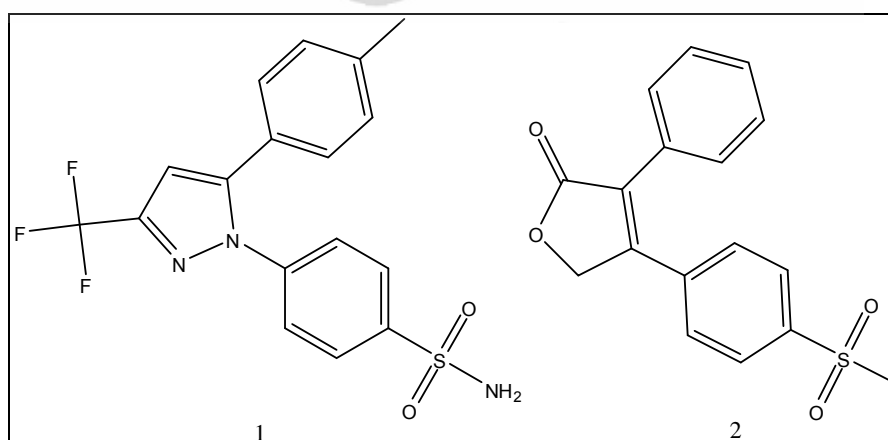
Jumlah asam amino	599	604
Berat molekul (kDa)	70	70-72
Lokalisasi	Membran inti, RE	Membran inti, RE
Kofaktor	1 mol Heme	1 mol Heme
Tempat asetilasi	Ser529	Ser516
Spesifisitas substrat	Asam arakidonat, asam γ -linolenat	Asam arakidonat; asam γ -linolenat, α -linolenat; asam eikosapentenoat
Aktivitas	23 mmol asam arakidonat/mg/menit	11 mmol asam arakidonat/mg/menit

[Sumber : Dannhardt & Laufer, 2000]

2.5 Penghambat Selektif Siklooksigenase-2

Strategi pertama untuk mengurangi toksisitas obat anti inflamasi non 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 karbosiklik dan heterosiklik yang terikat visinal dengan gugus 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 (Dannhardt & Laufer, 2000). Dua dari senyawa tersebut, *celecoxib* dan *rofecoxib* yang merupakan turunan karbosiklik dan heterosiklik, telah lolos uji klinik dan telah dipasarkan.



[Sumber: Merck & Co., Inc., 2001]

Gambar 2.4. Struktur Molekul *Celecoxib* (1) dan *Rofecoxib* (2)

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

2.6 Uji-uji Penghambatan Siklooksigenase (COX)

Uji aktivitas inhibisi terhadap COX dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain :

2.6.1 Pengukuran Intensitas Fluoresensi Produk Samping Malondialdehid (MDA)

Pada proses perubahan asam arakhidonat menjadi prostaglandin (PG) dengan adanya enzim COX menghasilkan produk samping, yaitu malondialdehid (MDA). Produk tersebut dapat diukur intensitas fluoresensinya. Enzim COX dapat diperoleh dari keping darah segar manusia. Plasma yang banyak mengandung keping darah tersebut ditambahkan dengan senyawa uji, diinkubasi pada 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan natrium arakhidonat dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 30 menit. Selanjutnya, reaksi dihentikan dengan penambahan pereaksi asam tiobarbiturat, diinkubasi pada 80°C selama 15 menit dan didinginkan. Setelah itu, campuran disentrifugasi pada 4°C 3000 rpm selama 15 menit, kemudian dilakukan pengukuran terhadap supernatan yang didapatkan. Pengukuran intensitas fluoresensinya dilakukan dengan spektrofluorometer pada panjang gelombang eksitasi 534 nm dan emisi 554 nm. Cara ini dilakukan untuk menentukan aktivitas inhibisi total senyawa uji pada enzim COX-1 dan COX-2 (Nurrochmad, Supardjan, & Sardjiman, 1998).

2.6.2 Pengukuran Perubahan Kromogen N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD)

Aktivitas enzim COX juga dapat ditentukan dengan pengukuran perubahan kromogen N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) yang terjadi

selama proses reduksi PGG₂ menjadi PGH₂, yang dilakukan dengan metode spektrofotometri. Campuran reaksi yang terdiri dari hematin dan fenol dalam dapar Tris-HCl (100 µM, pH 8,1) (sebagai kofaktor), ditambahkan dengan enzim COX yang telah diinkubasi dengan pembawa atau dengan larutan senyawa uji dalam dimetilsulfoksid pada suhu 37°C selama 1-10 menit. Enzim tersebut (COX-2) dapat diperoleh dari plasenta biri-biri. Selanjutnya, ke dalam campuran tersebut ditambahkan larutan segar asam arakhidonat dan TMPD. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap perubahan serapan pada panjang gelombang 611 nm selama 30 detik. Kecepatan reaksi awal (linier selama l.k. 15 detik) diukur dan kecepatan oksidasi nonspesifik saat enzim tidak ada dikurangkan sebelum perhitungan persentase inhibisi (Hernandez, de Arriba, Merlos, Fuentes, Crespo, & Nieto, 2001). Cara ini dilakukan untuk menentukan aktivitas inhibisi senyawa uji spesifik terhadap COX-2.

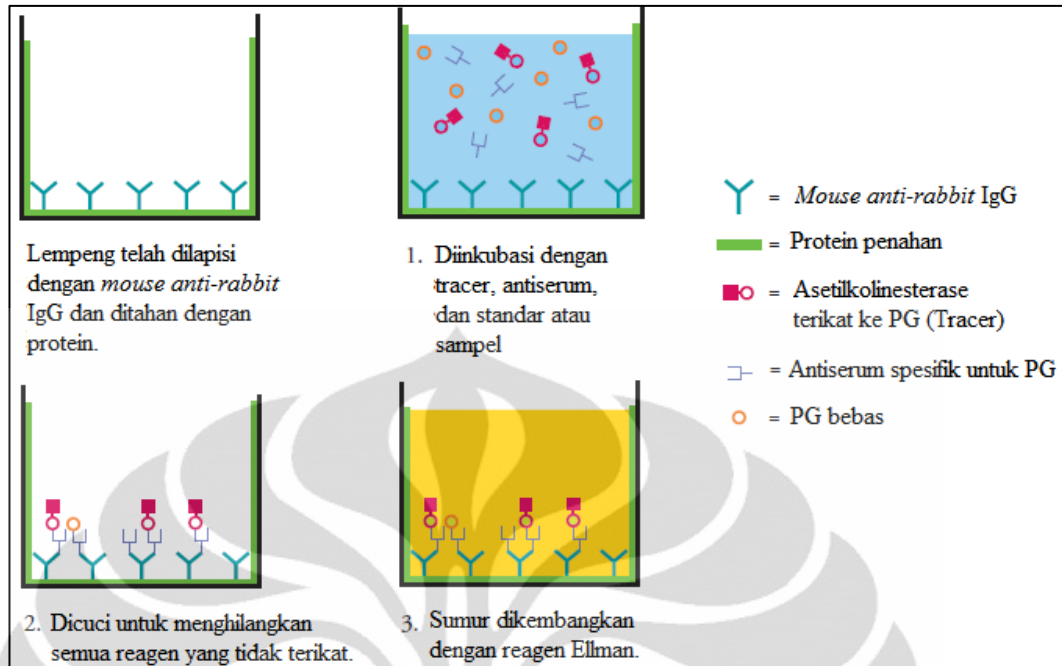
2.6.3 Pengujian Keseluruhan Darah Manusia (*Whole Human Blood Assay*)

Dilakukan pengambilan sampel darah manusia segar dari sukarelawan yang tidak mengonsumsi obat AINS selama 14 hari sebelumnya. Sampel darah tersebut dikumpulkan dalam tabung berisi heparin (20 U/mL). Sebanyak 500 µL darah terheparinasi ditambahkan dengan 5µL larutan senyawa uji dalam berbagai konsentrasi (misalnya, 5 - 20 µM) atau pelarut senyawa uji (misalnya, DMSO) atau larutan baku pembanding (misalnya, celecoxib 10 µM), dan dengan ditambahkan atau tidak ditambahkan lipopolisakarida (LPS) 10 µg/mL (berasal dari *E.coli* 026:B6) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Inkubasi dilakukan dengan pengocokan lembut untuk menginduksi aktivitas COX-2. Selanjutnya, reaksi dihentikan dengan melakukan perendaman tabung tersebut ke dalam air dingin. Kemudian, dilakukan pemisahan plasma dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C 13000 rpm selama 10 menit dan disimpan pada -20°C, sampai dilakukan pengukuran kadar PGE₂ menggunakan kit ELISA spesifik. Cara ini dilakukan untuk menentukan aktivitas inhibisi senyawa uji spesifik terhadap COX-2 (Hernandez, de Arriba, Merlos, Fuentes, Crespo, & Nieto, 2001; Hassanein, Khalifa, El-Samaloty, El-Rahim, Taha, & Ismail, 2008).

2.6.4 *Enzyme Immunoassay (EIA)*

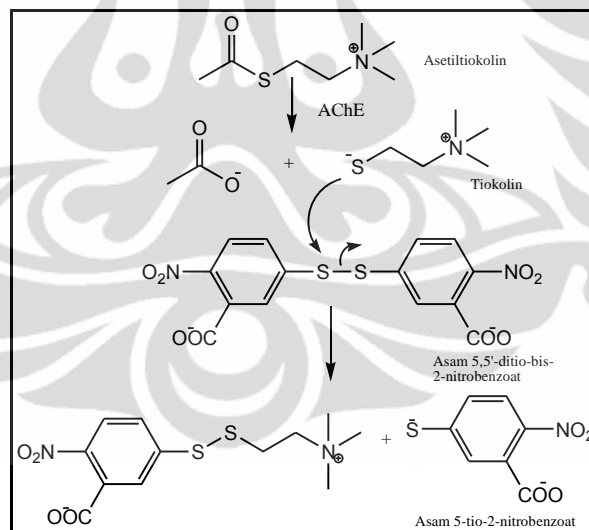
Enzim COX merupakan agen pengkatalis proses pembentukan PGH_2 dari asam arakidonat. PGH_2 tersebut dapat direduksi dalam reaksi COX dengan timah (II) klorida (SnCl_2) yang menghasilkan prostanoid. Produk prostanoid tersebut dapat diukur dengan EIA, menggunakan antiserum dengan kespesifikan yang luas berikatan dengan senyawa PG (Cayman Chemical Co., 2010). Pengukuran ini dilakukan untuk penentuan skrining inhibitor COX.

Pengukuran tersebut dilakukan berdasarkan kompetisi PG dan suatu konjugat PG-asetilkolinesterase (AChE) (*PG tracer*) untuk berikatan dengan antiserum yang jumlahnya dibatasi. Konsentrasi *PG tracer* dibuat tetap, sedangkan PG bervariasi, maka jumlah *PG tracer* yang dapat diikat oleh antiserum berbanding terbalik dengan konsentrasi PG di dalam sumur uji. Kemudian, kompleks antiserum kelinci-PG berikatan dengan antibodi anti-kelinci monoklonal mencit (*mouse monoclonal anti-rabbit antibody*) yang telah dimasukkan sebelumnya pada sumur uji. Lalu, sumur uji dicuci dengan tujuan untuk menghilangkan reagen yang tidak berikatan. Kemudian, ditambahkan reagen Ellman [berisi asetiltiokolin (substrat untuk AChE) dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) (DTNB)] ke sumur uji tersebut (Gambar 2.5). Asetilkolin akan dihidrolisis oleh AChE dari *PG tracer* yang berikatan pada sumur uji, menghasilkan tiokolin dan asam asetat (Gambar 2.6). Kemudian, tiokolin bereaksi dengan DTNB menghasilkan asam 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB) yang berwarna kuning terang, yang menyerap cahaya sinar tampak dengan kuat pada λ 412 nm ($\epsilon = 13.600$). Dilakukan pengukuran intensitas warna (serapan) dengan cara spektrofotometri. Nilai serapan tersebut sebanding dengan jumlah *PG tracer* dan berbanding terbalik dengan jumlah PG yang ada dalam sumur uji selama proses inkubasi. Dengan demikian, semakin besar aktivitas inhibitor COX, semakin kecil PG yang diproduksi, semakin banyak *PG tracer* yang diikat pada sumur uji, dan semakin besar intensitas warna yang terbentuk (Cayman Chemical Co., 2010).



[Sumber : Cayman Chemical Co., 2010]

Gambar 2.5. Skema Proses EIA



[Sumber : Cayman Chemical Co., 2010]

Gambar 2.6. Reaksi yang Dikatalisis oleh AChE

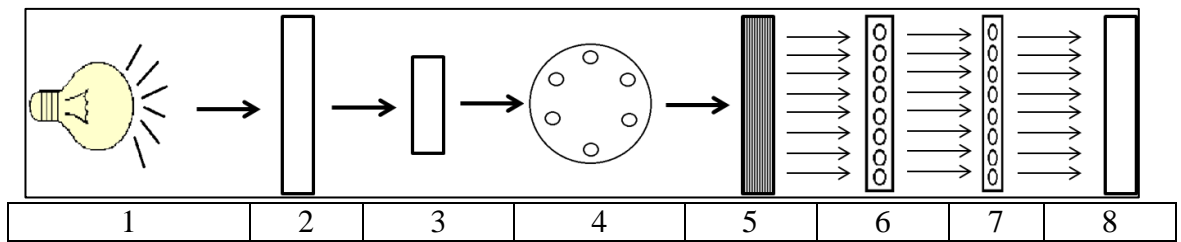
Pengujian dilakukan dengan menggunakan kit uji skrining inhibitor COX (ovine), nomor katalog 560101 dari Cayman Chemical (*Cayman's COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kits, catalog No. 560101*). Pada uji ini mencakup enzim COX-1 dan COX-2, sehingga dapat digunakan untuk melakukan skrining inhibitor-inhibitor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

2.7 Asetilkolinesterase (AChE)

AChE memiliki beberapa keuntungan dibandingkan enzim-enzim lain yang biasanya digunakan untuk EIA. Tidak seperti *horseradish peroxidase* (HRP), AChE sangat stabil pada kondisi pengujian, memiliki rentang pH yang besar (pH 5-10), dan tidak terhambat oleh garam dapur dan pengawet. Karena AChE stabil selama tahap pengembangan, tidak perlu menggunakan 'stop reagent', dan lempeng dapat dibaca kapanpun pada keadaan yang sesuai (Cayman Chemical Co., 2010).

2.8 Microplate Reader (ELISA Reader)

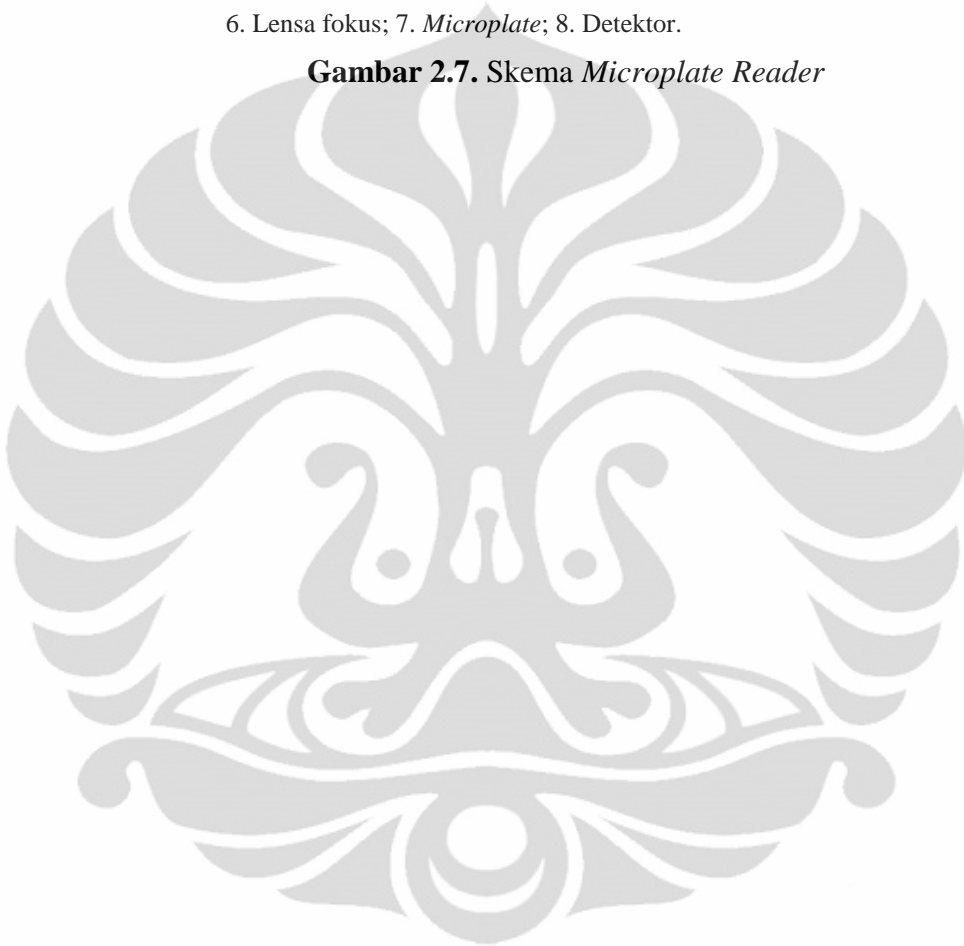
Microplate reader adalah suatu spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). *Microplate reader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis (Heredia, Adams, Fields, Held, & Harbertson, 2006). Perbedaan dengan spektrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya antara 400 sampai 750 nm (nanometer). Beberapa *microplate reader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340-700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya untuk sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 sampai 3 mm. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian. Saat ini beberapa *microplate reader* menggunakan sistem berkas cahaya ganda (World Health Organization, 2008).



[Sumber : Azis, 1999]

Keterangan : 1. Sumber cahaya; 2. Diafragma; 3. Lensa kondensor; 4. Filter; 5. *Fiber bundle*;
6. Lensa fokus; 7. *Microplate*; 8. Detektor.

Gambar 2.7. Skema *Microplate Reader*



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Farmasi, FMIPA UI, Depok dalam jangka waktu Februari 2012 sampai dengan Mei 2012.

3.2 Alat

Lempeng 96 sumur (Cayman Chemical[®]), *Microplate reader* (Biotek Instruments[®]), *orbital shaker* (Lab Line[®]), penangas air (Mettler[®]), pipet mikro (Eppendorf[®] dan Gilson[®]), alat sentrifugasi (Heraeus Sepatech[®]) timbangan analitik (Adam[®]), *vortex mixer* (As One[®]), dan alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Dimetil sulfoksida (DMSO) p.a. (Merck[®]), Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida (hasil sintesis Hayun), Aspirin (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co.), *Celecoxib* (hasil isolasi dari kapsul Celebrex[®]), Kit EIA [(no. katalog 560101, Cayman Chemical[®]): COX-2, Heme, dapar reaksi, asam arakidonat, kalium hidroksida (KOH), asam klorida (HCl), timah (II) klorida (SnCl₂)], air *UltraPure*.

3.4 Cara Kerja

3.4.1. Penyiapan Bahan

3.4.1.1. Pembuatan Larutan Pereaksi

1. Dapar Reaksi

Encerkan 5 mL Dapar Reaksi pekat dengan 45 mL air UltraPure.

2. Heme

Encerkan 100 µL heme dengan 400 µL Dapar Reaksi.

3. Asam Arakidonat

Pindahkan 50 µL substrat persediaan ini ke vial lain, tambahkan 50 µL KOH, vortex, dan encerkan dengan 400 µL air UltraPure.

4. HCl 0,1 M

Encerkan 500 μL HCl 1 M dengan 4,5 mL air UltraPure untuk menghasilkan konsentrasi 0,1 M.

5. SnCl_2

Tambahkan 5 mL HCl 0,1 M HCl ke dalam vial persediaan SnCl_2 dan vortex. Apabila tidak melaksanakan semua reaksi COX dalam satu hari, timbang 125 mg SnCl_2 dalam vial lain dan tambahkan 2,5 mL HCl 0,1 M.

6. Dapar EIA

Encerkan isi satu vial konsentrat dapar EIA dengan 90 ml air UltraPure. Bilas vial untuk membersihkan garam yang mengendap.

7. Dapar Cuci

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

8. *Tracer AChE Skrining Prostaglandin*

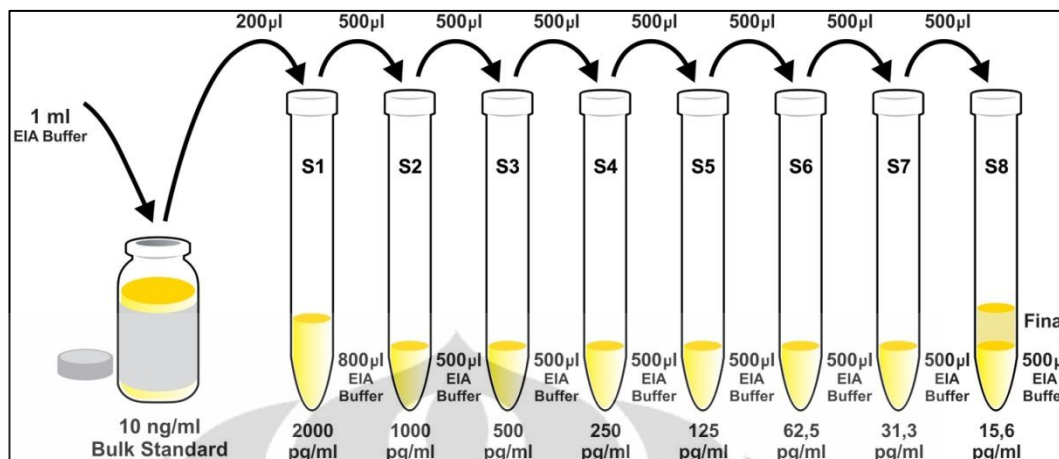
Rekonstitusi PG Tracer Skrining dengan 6 mL dapar EIA.

9. *Antiserum Skrining Prostaglandin*

Rekonstitusi PG Skrining Antiserum dengan 6 mL dapar EIA.

3.4.1.2. Pembuatan Larutan Standar Prostaglandin

Larutkan Standar PG terliofilasi dalam 1 mL dapar EIA. Konsentrasi larutan ini adalah 10 ng/mL (standar *bulk*). Untuk membuat standar untuk digunakan dalam EIA : Siapkan 8 tabung uji dan beri label S1 hingga S8. Isikan 800 μL dapar EIA pada tabung S1 dan 500 μL dapar EIA pada tabung S2 – S8. Pindahkan 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.



[Sumber : Cayman Chemical Co., 2010]

Gambar 3.1. Skema Penyiapan Larutan Standar PG

3.4.1.3. Pembuatan Larutan Inhibitor

1. Larutan Aspirin

Timbang seksama 4,51 mg Aspirin larutkan dengan DMSO. Cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 mL, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 µM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 50, 25, 10, dan 1 µM, menggunakan pelarut campuran (1:1) DMSO dan dapar reaksi.

2. Larutan *Celecoxib*

Timbang seksama 9,79 mg *Celecoxib* larutkan 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 (1:1) DMSO dan dapar reaksi.

3. Larutan 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida

Timbang seksama 10,09 mg sampel, larutkan dengan DMSO. Cukupkan volumenya dengan DMSO hingga 5 mL, kocok hingga homogen (konsentrasi 100 µM). Buat pengenceran dengan konsentrasi 20, 10, 5, dan 1 µM, menggunakan pelarut campuran (1:1) DMSO dan dapar reaksi.

3.4.2. Uji Aktivitas Penghambatan COX-2

3.4.2.1. Pelaksanaan Reaksi COX-2

1. Inaktivasi enzim

Pipet 20 µl enzim COX-2 dan inaktifkan selama 3 menit dalam air mendidih.

2. Pereaksian diatas penangas air suhu 37° C.

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

3. Angkat semua tabung uji dari penangas air.

4. Tambahkan 100 µl larutan Stano klorida pada tiap tabung uji dan vortex. Inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar.

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

3.4.2.2. Pengenceran Reaksi COX-2

1. Sampel BC

Masukkan 990 dapar EIA pada tabung mikro, tambahkan 10 µl supernatan sampel BC, kocok hingga homogen.

2. Sampel IA

Masukan 990 µl dapar EIA pada tabung mikro pengenceran pertama lalu tambahkan 10 µl supernatan sampel IA, kocok hingga homogen. Masukkan 950 dapar EIA pada tabung mikro pengenceran kedua lalu tambahkan 50 µl larutan sampel IA dari tabung mikro pengenceran pertama, kocok hingga homogen.

3. Sampel inhibitor COX-2

Masukkan 990 μl dapar EIA pada tabung mikro pengenceran pertama lalu tambahkan 10 μl supernatan sampel inhibitor COX-2, kocok hingga homogen. Masukkan 950 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
 - a. *Dapar EIA* : Tambahkan 100 μL dapar EIA pada sumur pengikatan non spesifik (NSB). Tambahkan 50 μL dapar EIA untuk sumur Pengikatan maksimum (Bo)
 - b. *Standar Skrining PG* : Tambahkan 50 μL dari tabung S8 pada sumur standar paling bawah. Tambahkan 50 μL dari S7 pada masing-masing dua sumur standar berikutnya. Teruskan prosedur ini hingga semua standar terisi.
 - c. *Sampel-sampel background (tabung uji BC1 dan BC2)* : Tambahkan 50 μL sampel per sumur. Masing-masing sampel diuji dua kali.
 - d. *Sampel-sampel aktivitas inisial COX 100% (tabung uji IA2 dan IA3)* : Tambahkan 50 μL sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada pengenceran kedua dengan masing-masing pengenceran diuji dua kali.
 - e. *Sampel-sampel COX Inhibitor (tabung uji C2 dan C3)* : Tambahkan 50 μL sampel per sumur. Diuji masing-masing sampel pada pengenceran kedua dengan masing-masing pengenceran diuji dua kali.
 - f. *Tracer AChE Skrining PG* : Tambahkan 50 μL tracer skrining PG pada masing-masing sumur kecuali sumur-sumur Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).

- g. *Antiserum Skrining PG* : Tambahkan 50 μ L Antiserum skrining PG pada masing-masing sumur kecuali Total aktivitas (TA) dan blanko (Blk).

	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

[Sumber : Cayman Chemical Co., 2010]

Gambar 3.2. Format Lempeng Sumur Uji

Keterangan :

Blk = *Blank*

S1-S8 = Standar PG 1-8

NSB = *Non-Specific Binding*

BC = *Background*

Bo = *Maximum Binding*

‡ = *Initial Activity* 100%

TA = *Total Activity*

H = *Inhibitor COX-2*

2) Inkubasi Lempeng

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

3) Pengembangan Lempeng

- Rekonstitusi satu vial Reagen Elman dengan 20 mL air UltraPure.
- Kosongkan sumur-sumur dan cuci limakali dengan Dapar Cuci.
- Tambahkan 200 μ L Reagen Elman pada tiap sumur uji
- Tambahkan 5 μ L tracer pada sumur Aktivitas Total (TA).

4) Pembacaan Lempeng

Sebelum lempeng dibaca, *shake* lempeng didalam plate reader lalu baca lempeng pada panjang gelombang 405 dan 415 nm. Serapan dicek secara berkala (ukur setiap 15 menit selama 105 menit) sampai sumur Bo

Universitas Indonesia

mencapai minimum 0,3. Lempeng dibaca bila serapan sumur Bo pada rentang 0,3-1,0.

3.4.3. Analisis/Perhitungan

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

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

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

n = 1 sampai 8

1. Plot Kurva Standar

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

$$IA \text{ terkoreksi} = A = IA - BC \quad (3.3)$$

$$\text{Sampel terkoreksi} = B = \text{Sampel} - BC \quad (3.4)$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (3.5)$$

- c. Buat grafik persen inhibisi dengan konsentrasi inhibitor untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi $y = a + bx$. Aktivitas inhibisi dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% (IC₅₀) yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat kerja COX-2 sebesar 50% (Murray, 2009).

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Lempeng 96 sumur yang digunakan pada penelitian ini telah dilapisi dengan antibodi Immunoglobulin G (IgG) pada tiap sumurnya, sehingga dapat langsung digunakan. Kit EIA yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas bahan-bahan yang siap untuk digunakan dan bahan-bahan yang perlu diencerkan atau direkonstitusi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan yang siap untuk digunakan antara lain COX-2 (ovine), HCl 1 M, KOH, dan air *Ultrapure*. Untuk bahan-bahan yang perlu diencerkan atau direkonstitusi sebelum digunakan untuk pereaksian COX-2 antara lain dapar reaksi, dapar EIA, dapar cuci, heme, asam arakidonat, HCl 0,1 M, SnCl₂, PG *Tracer*, Antiserum, PG Standar, dan Reagen Ellman. Setelah diencerkan atau direkonstitusi, larutan bahan-bahan tersebut harus disimpan pada suhu dan jangka waktu tertentu yang telah ditentukan. Suhu dan waktu penyimpanan larutan dapat dilihat pada Lampiran 4. Bila larutan bahan tidak disimpan pada suhu dan jangka waktu yang sesuai, stabilitas larutan tersebut akan berkurang sehingga dapat mempengaruhi reaksi penghambatan enzim yang terjadi.

Pengujian aktivitas penghambatan COX-2 dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode COX (ovine) *Inhibitor Screening Assay*. COX merupakan katalisator pertama biosintesis asam arakidonat menjadi PGH₂. Skrining inhibitor COX (ovine) dilakukan secara langsung dengan mengukur PGF_{2α}, dengan cara mereduksi PGH₂, yang dihasilkan dari konversi asam arakidonat oleh COX, menggunakan SnCl₂. Produk prostanoid tersebut diukur melalui EIA, menggunakan antiserum yang spesifik berikatan dengan PG.

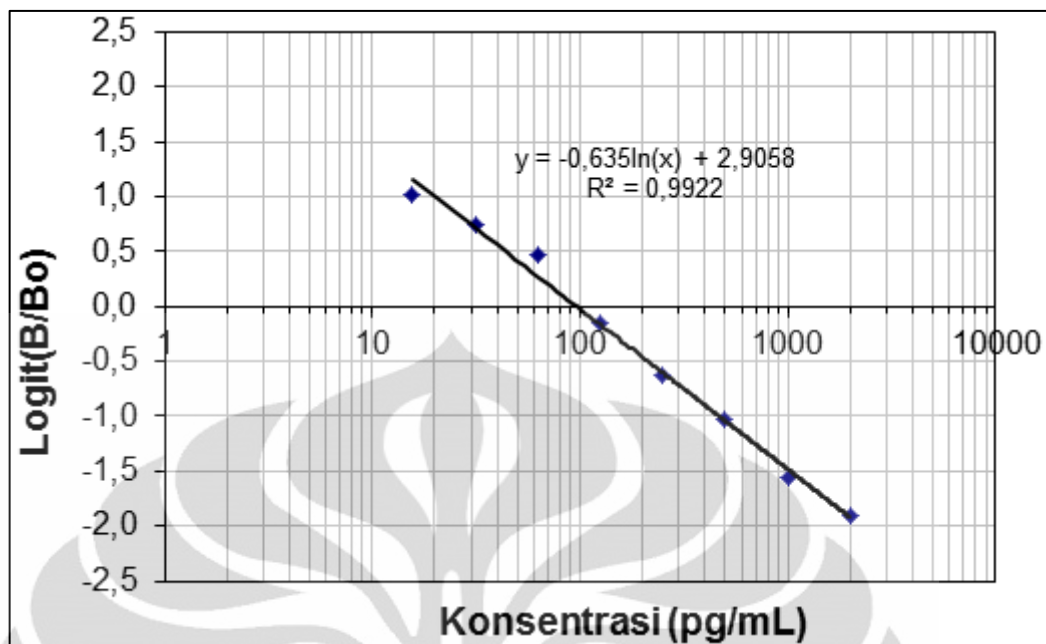
Prinsip dari pengukuran ini berdasarkan pada pengikatan antara antigen dan antibodi. Ke dalam sumur uji dimasukkan PG *tracer*, antiserum, PG standar dan sampel-sampel inhibitor lalu diinkubasi di atas *orbital shaker* selama 18 jam. Selama masa inkubasi tersebut terjadi kompetisi antara PG yang terbentuk dengan PG yang dilabel oleh enzim asetilkolinesterase (AChE) yang merupakan PG

tracer untuk berikatan dengan antiserum. Kompleks antiserum-PG atau antiserum-PG *tracer* kemudian berikatan dengan IgG.

Setelah diinkubasi selama 18 jam, sumur-sumur dicuci sebanyak lima kali menggunakan dapar cuci, dengan tujuan menghilangkan PG atau PG *tracer* yang tidak berikatan dengan antiserum. Selanjutnya ke dalam sumur-sumur ditambahkan Reagen Ellman yang berisi asetiltiokolin (substrat bagi AChE) dan asam 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoat) (DTNB). Asetiltiokolin dihidrolisis oleh AChE pada PG *tracer* yang berikatan dengan antiserum di sumur uji dan menghasilkan ion asetat (CH_3COO^-) dan tiokolin. Tiokolin yang terbentuk bereaksi dengan DTNB dan menghasilkan asam 5-tio-2-nitrobenzoat (TNB). Terbentuknya TNB ditandai dengan munculnya warna kuning pada larutan di sumur-sumur uji. Semakin banyak TNB yang terbentuk, semakin kuat intensitas warna kuning yang muncul. Intensitas warna tersebut kemudian diukur secara spektrofotometri cahaya tampak (*visible*) pada panjang gelombang (λ) maksimum 412 nm. Karena tidak tersedia *filter* λ 412 nm, pengukuran dilakukan menggunakan *filter* λ 415 nm. Besarnya serapan yang diberikan oleh suatu sumur berbanding lurus dengan jumlah PG *tracer* yang berikatan pada sumur tersebut, dan berbanding terbalik dengan jumlah PG yang ada dalam sumur uji selama inkubasi. Jadi, semakin kuat suatu inhibitor untuk menghambat COX-2, semakin kecil jumlah PG yang dihasilkan. Sebaliknya, PG *tracer* yang dapat berikatan dengan antiserum pada sumur uji semakin banyak, sehingga dapat meningkatkan intensitas warna yang dihasilkan.

Pada pengujian dengan menggunakan metode ini juga dilakukan pengukuran terhadap sumuran *Non-Specific Binding* (NSB), *Maximum binding* (B_0), *Total Activity* (TA), *Background* (BC) dan *Initial Activity* 100% (IA). Sumur NSB merupakan sumur yang menghasilkan serapan dari ikatan yang tidak spesifik (non-immunologis) antara *tracer* dan sumur dari lempeng mikro. Ikatan tersebut terjadi dalam jumlah yang sangat kecil sehingga serapan yang diberikan juga rendah. Sumur B_0 memberikan serapan yang paling tinggi karena di dalam sumur ini hanya terdapat PG *tracer* dan antiserum, yang artinya tidak ada kompetisi antara PG bebas dan PG *tracer* untuk berikatan dengan antiserum. Sumur TA memberikan serapan dari aktivitas enzimatik total dari ikatan AChE. 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 yang dihasilkan dari sumur B₀ dan NSB digunakan untuk menghitung B₀ terkoreksi (B₀T). Selanjutnya dihitung B/B₀ yaitu perbandingan serapan yang diperoleh dari sumur standar atau sampel dengan serapan dari sumur B₀. Dari nilai B/B₀ dapat dibuat kurva kalibrasi untuk PG standar, dimana logit B/B₀ sebagai sumbu vertikal (sumbu y) dan konsentrasi PG yang terbentuk sebagai sumbu horizontal (sumbu x). Sebagai standar digunakan PG yang dibuat menjadi larutan 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. Dari delapan konsentrasi tersebut, digunakan untuk membuat kurva standar/kalibrasi PG. Selanjutnya persamaan kurva kalibrasi dapat digunakan untuk menghitung jumlah PG yang terbentuk dari masing-masing sampel inhibitor. Dari kurva kalibrasi PG standar diperoleh persamaan regresi: $y = -0,635 \ln(x) + 2,9058$; $R^2 = 0,9922$; dan $r = 0,9961$ (Gambar 4.1). Dihitung pula logit B/B₀ dari masing-masing sampel BC, IA dan inhibitor, yang selanjutnya dimasukkan ke persamaan regresi kurva kalibrasi PG standar untuk memperoleh konsentrasi PG yang terbentuk dari masing-masing sumur. Konsentrasi PG yang terbentuk dari masing-masing sumur inhibitor akhirnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi dari inhibitor.



Gambar 4.1. Kurva Kalibrasi Larutan Standar PG

Senyawa pembanding yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Aspirin yang sudah sangat umum diketahui sebagai inhibitor non-selektif COX-1 dan COX-2, dan *Celecoxib* yang merupakan inhibitor selektif COX-2. Aspirin, *Celecoxib*, dan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida masing-masing dibuat larutan induk pada konsentrasi 100 μM . Selanjutnya dibuat pengenceran untuk Aspirin dengan konsentrasi 50 μM ; 25 μM ; 10 μM dan 1 μM ; *Celecoxib* dengan konsentrasi 10 μM ; 1 μM ; 0,1 μM dan 0,01 μM ; dan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida dengan konsentrasi 20 μM ; 10 μM ; 5 μM ; dan 1 μM .

Pertimbangan konsentrasi pengenceran masing-masing larutan inhibitor didasarkan pada data persen inhibisi yang dihasilkan setelah pengukuran uji aktivitas penghambatan COX-2. Pengujian pertama menggunakan konsentrasi 10 μM dari masing-masing larutan inhibitor, dilanjutkan dengan konsentrasi yang lebih besar atau lebih kecil dari 10 μM hingga didapat persen inhibisi di atas 50%, untuk memperoleh nilai IC_{50} dari masing-masing inhibitor. Akan tetapi, karena kelarutan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida kurang baik dalam dapar reaksi, yang mana merepresentasikan cairan biologis tubuh, maka konsentrasi tertinggi yang

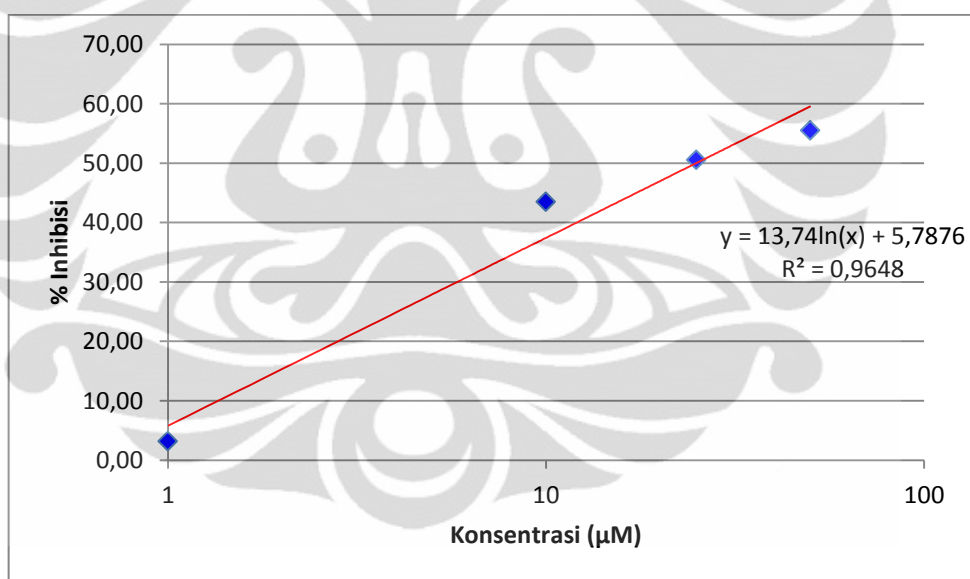
memungkinkan senyawa tersebut dapat melarut dengan sempurna yaitu pada 20 μM .

Dari pengujian yang dilakukan, diperoleh nilai IC_{50} untuk Aspirin sebesar 24,97 μM , *Celecoxib* sebesar 0,43 μM dan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida tidak memiliki IC_{50} dikarenakan tidak ada persen inhibisi yang melampaui 50% seperti yang terlihat pada Tabel 4.1. Bila hasil tersebut diekstrapolasikan dan dihitung menggunakan persamaan $y = 7,5777\ln(x) + 20,072$ (Gambar 4.4), diperoleh prediksi nilai IC_{50} senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida sebesar 51,91 μM . Dari hasil ini dapat diketahui bahwa senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida mempunyai kemampuan yang lebih kecil dalam menghambat aktivitas enzim COX-2 dibandingkan dengan Aspirin dan *Celecoxib*. Kurva konsentrasi (μM) versus % inhibisi larutan Aspirin, *Celecoxib*, dan 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida dapat dilihat pada Gambar 4.2, Gambar 4.3, dan Gambar 4.4. Pada konsentrasi yang sama yaitu 10 μM , senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida memiliki aktivitas penghambatan terhadap COX-2 paling rendah dibandingkan dengan Aspirin dan *Celecoxib* (Gambar 4.5).

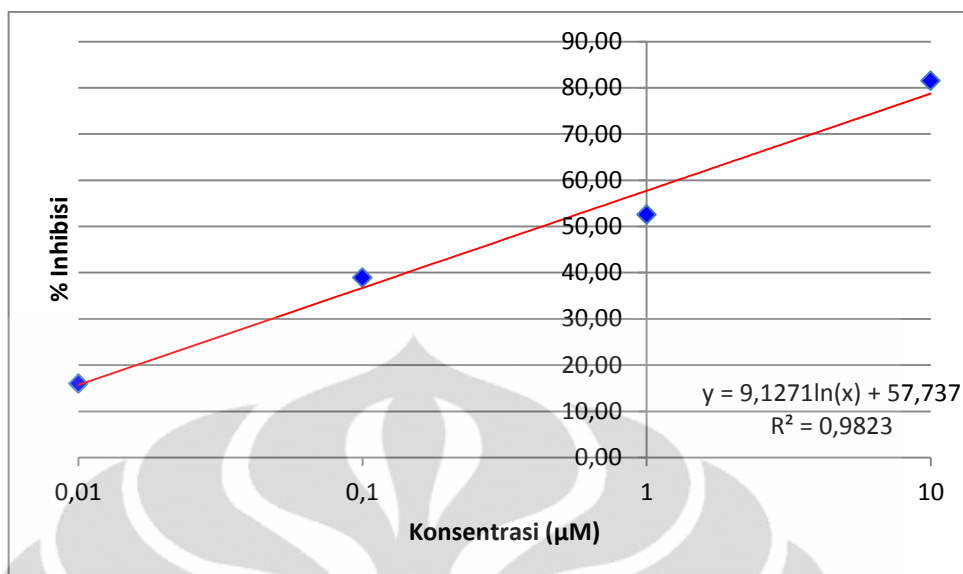
Tabel 4.1. Data Persen Inhibisi Sumur BC, IA, dan Senyawa-senyawa Uji

Senyawa	Konsentrasi yang Diuji (μM)	PG Terbentuk (pg/mL)	SD	% KV	Stand ar Error	% Inhibisi
BC		61,7	30,95	50,18	21,89	
IA		1386746,0	68722,80	4,96	48594,36	
Aspirin	1	1342482,0	131321,59	9,78	92858,39	3,19
	10	783571,0	48800,06	6,23	34506,85	43,50
	25	685561,0	95982,34	14,00	67869,77	50,56
	50	616953,5	93855,91	15,21	66366,15	55,51

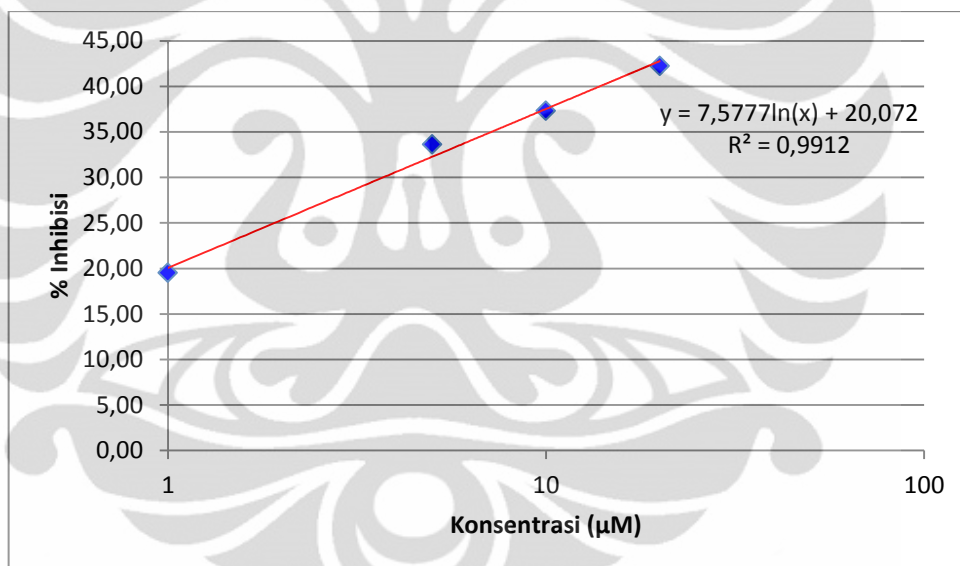
<i>Celecoxib</i>	0,01	1099958,4	75612,11	6,87	53465,84	15,99
	0,1	847222,2	107481,46	12,69	76000,87	38,91
	1	658674,8	2620,99	0,40	1853,32	52,50
	10	256411,4	8875,57	3,46	6275,97	81,51
4-[(E)-2-(4-okso-3-fenilkuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida	1	1116367,9	20582,94	1,84	14554,34	19,50
	5	920529,6	19999,40	2,17	14141,71	33,62
	10	869611,8	52009,26	5,98	36776,10	37,29
	20	801282,4	3349,64	0,42	2368,56	42,22



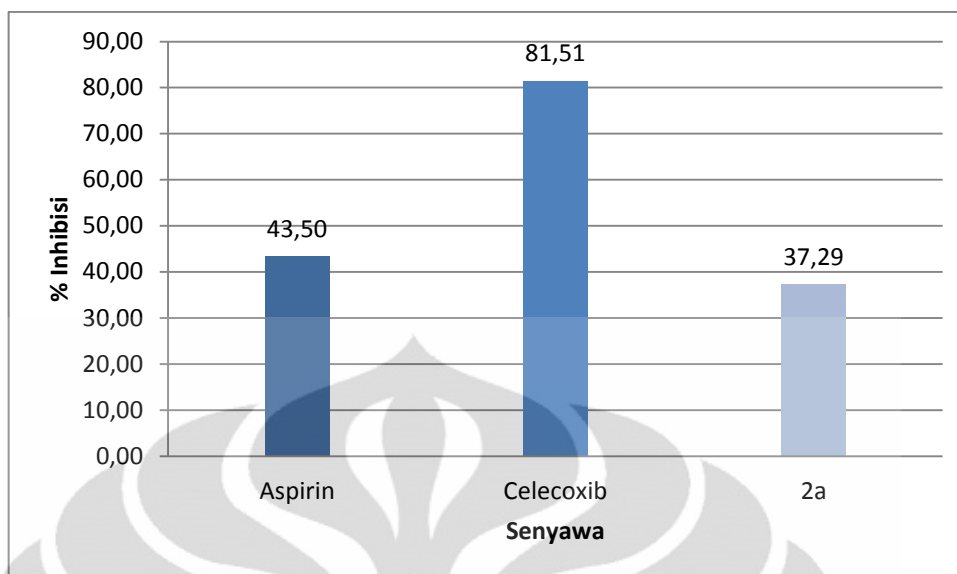
Gambar 4.2. Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan Aspirin



Gambar 4.3. Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan *Celecoxib*



Gambar 4.4. Kurva Konsentrasi (μM) vs % Inhibisi Larutan 4-[(E)-2-(4-Oxo-3-phenyl-quinazolin-2-yl)etenil]benzensulfonamida



Gambar 4.5. Diagram Perbandingan % Inhibisi Aspirin, *Celecoxib*, dan 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]bensensulfonamida pada konsentrasi 10 μM

Pada tahap pelaksanaan reaksi diperhatikan penambahan bahan-bahan dan waktu inkubasinya. Pelaksanaan reaksi dilakukan di atas penangas air pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Suhu tersebut dianalogikan dengan suhu dalam tubuh manusia. Saat pengukuran menggunakan *microplate reader* juga diinkubasi terlebih dahulu pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Pada pereaksian tahap pertama, ke dalam setiap tabung uji dimasukkan dapar reaksi yang berfungsi sebagai representasi cairan biologis tubuh. Tahap kedua, ditambahkan COX-2 dan heme yang berfungsi sebagai kofaktor COX-2. Tahap ketiga, ditambahkan asam arakidonat yang merupakan substrat bagi COX-2 setelah inkubasi 10 menit. Reaksi pembentukan PG diinisiasi oleh penambahan asam arakidonat tersebut. Tahap keempat, setelah diinkubasi kembali selama 2 menit, ditambahkan HCl 1 M yang berfungsi untuk menghentikan reaksi pembentukan PG.

Nilai IC_{50} Aspirin dan *Celecoxib* yang diperoleh dari penelitian ini, dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari penelitian-penelitian sebelumnya (Tabel 4.2). Perbandingan pada tabel memperlihatkan hasil yang berbeda-beda. Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi pengujian dan kualitas reagen yang berbeda, serta faktor lain yang dapat mempengaruhi pengujian akan memberikan hasil yang berbeda pula.

Tabel 4.2. Perbandingan Nilai IC₅₀ Hasil Pengujian dengan Penelitian Sebelumnya

Senyawa	IC ₅₀ (μM)	
	Hasil pengujian	Referensi
Aspirin	24,97	2,4 ¹
<i>Celecoxib</i>	0,43	0,07 ¹ 0,30 ²
4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida	-	-

[Sumber : ¹ Chen, Praveen Rao, & Knaus, 2005; ² Abdel-Aziz, ElTahir, & Asiri, 2011]

Pada penelitian ini digunakan *Celecoxib* sebagai senyawa pembanding inhibitor COX-2 yang diperoleh dari hasil isolasi kapsul Celebrex[®]. *Celecoxib* hasil isolasi diuji kemurniannya secara kualitatif menggunakan lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT), spektrofotometer UV, spektrofotometer infra merah (IR), dan alat pengukur jarak lebur. Hasil uji kemurnian tersebut lalu dibandingkan dengan hasil pada penelitian sebelumnya dan hasilnya identik. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh telah murni, sehingga layak untuk digunakan dalam pengujian.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida tidak memiliki nilai IC_{50} dikarenakan dari empat konsentrasi uji, tidak satupun yang menunjukkan persen inhibisi melampaui 50%. Inhibisi paling besar pada konsentrasi 20 μ M sebesar 42,22%. Prediksi nilai IC_{50} dari ekstrapolasi sebesar 51,91 μ M.

5.2 Saran

Perlu diteliti lebih lanjut mengenai optimasi kelarutan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil] benzensulfonamida untuk mendapatkan nilai IC_{50} yang pasti dan penghambatan senyawa 4-[(E)-2-(4-okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida terhadap COX-1, agar dapat diketahui selektifitasnya.

DAFTAR ACUAN

- Abdel-Aziz, A. A.-M., ElTahir, K. H., & Asiri, Y. A. (2011). Synthesis, Anti-inflammatory Activity and COX-1/COX-2 Inhibition of Novel Substituted Cyclic Imides. Part 1: Molecular Docking Study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1648-1655.
- Azis, A. (1999). *Pengembangan Metode ELISA Langsung untuk Penentuan Residu Kloramfenikol*. Depok: FMIPA UI.
- Catella-Lawson, F., *et al.* (1999). Effects of Specific Inhibition of Cyclooxygenase-2 on Sodium Balance, Hemodynamics, and Vasoactive Eicosanoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289(2), 735-741.
- Cayman Chemical Co. (2010). *COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit Catalog No. 560101*. Ann Arbor, Michigan, United States of America: Cayman Chemical Company.
- Chen, Q.-H., Praveen Rao, P. N., & Knaus, E. E. (2005). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of N-Acetyl-2-Carboxybenzenesulfonamides: a Novel Class of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2459-2468.
- Crofford, L.J. (2000). Clinical Experience with Specific COX-2 Inhibitors in Arthritis. *Curr. Pharm.*, 6(17), 1725-1736.
- Dannhardt, G., & Laufer, S. (2000). Structural Approach to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore? *Curr. Med. Chem.*, 7, 1101-1112.
- Hassanein, H. H., Khalifa, M., El-Samaloty, O. N., El-Rahim, M. A., Taha, R. A., & Ismail, M. F. (2008). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Imidazolone Derivatives as Potential COX-2 Inhibitors. *Archives of Pharmacal Research*, 31(5), 562-568.
- Hayun, Yanuar, A., Hanafi, M., & Hudiyono, S. (2011). Virtual Screening of 2,3-disubstituted-4(3H)-quinazolinones Possessing Benzenesulfonamide Moiety for COX-2 Inhibitor. *Bioinformation*, 7(5), 246-250.
- Heredia, T., Adams, D., Fields, K., Held, P., & Harbertson, J. (2006). Evaluation of a Comprehensive Red Wine Phenolics Assay Using a Microplate Reader. *Am. J. Enol. Vit.*, 57(4), 497-502.

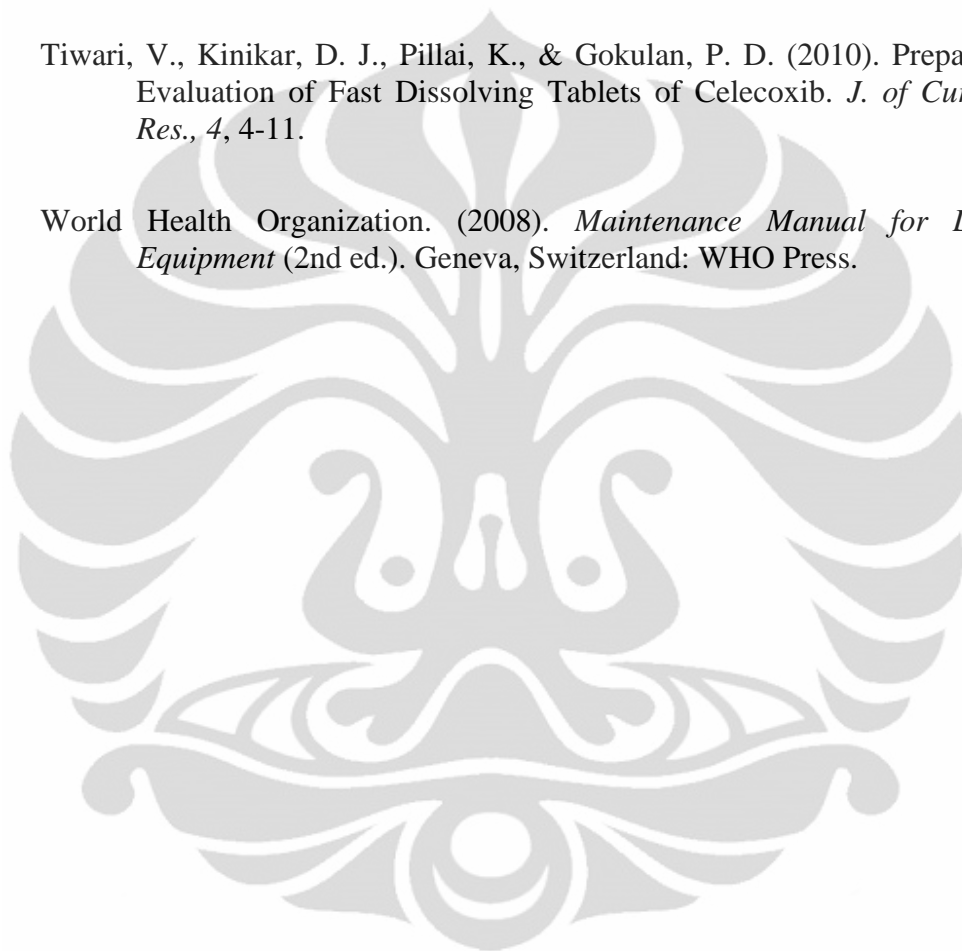
- Hernandez, M., de Arriba, A. F., Merlos, M., Fuentes, L., Crespo, M. S., & Nieto, M. L. (2001). Effect of 4-Trifluoromethyl Derivatives of Salicylate on Nuclear Factor kB-Dependent Transcription in Human Astrocytoma Cells. *British Journal of Pharmacology*, 132, 547-555.
- Hudiyono, S., & Hayun. (2011). *Laporan Akhir Hibah Riset Pasca Sarjana UI*. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Kartasmita, R. E. (2002). Perkembangan Obat Antiradang Bukan Steroid. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, XXVII(4), 75-91.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., et al. (1996). Structural Basis for Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflammatory Agents. *Nature*, 384, 644-648.
- LC Laboratories. (2012). Retrieved June 13, 2012, from <http://www.lclabs.com/PRODFILE/A-C/C-1502.php4>
- Merck & Co., Inc. (2001). *The Merck Index* (13th ed.). (M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, J. R. Obenchain Jr., J. R. Gallipeau, M. D' Arecca, et al., Eds.) Whitehouse Station, New Jersey, United States of America: Merck Research Laboratories.
- Meyer-Kirchrath, J., & Schrör, K. (2000). Cyclooxygenase-2 Inhibition and Side Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in the Gastrointestinal Tract. *Curr. Med. Chem.*, 7, 1121-1129.
- Moffat, A. C., Jackson, J. V., Moss, M. S., & Widdop, B. (Eds.). (1986). *Clarke's Isolation and Identification of Drugs* (2nd ed.). London, England: Pharmaceutical Press.
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. (2009). *Biokimia Harper* (27th ed.). (B. U. Pedit, Penerj.) Jakarta: EGC.
- Nurrochmad, A., Supardjan, A. M., & Sardjiman. (1998). Penghambatan Siklooksigenase oleh Siklovalon dan Tiga Senyawa Analognya. *Majalah Farmasi Indonesia*, IX(4), 180-185.
- Panara, M.R. (1999). Dose Dependent Inhibition of Platelet COX-1 and Monocyte COX-2 by Meloxicam in Healthy Subject. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290(3), 276-280.

Primo, F. T., & Fröhlich, P. E. (2005). Celecoxib Identification Methods. *Acta Farm. Bonaerense*, 24(3), 421-425.

Smyth, E., & Fitz, G. (2007). The Eicosanoid: Prostaglandins, Tromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds. In *Basic & Clinical Pharmacology*. San Francisco: McGraw-Hill.

Tiwari, V., Kinikar, D. J., Pillai, K., & Gokulan, P. D. (2010). Preparation and Evaluation of Fast Dissolving Tablets of Celecoxib. *J. of Curr. Pharm. Res.*, 4, 4-11.

World Health Organization. (2008). *Maintenance Manual for Laboratory Equipment* (2nd ed.). Geneva, Switzerland: WHO Press.



Lampiran 1. Perhitungan Penimbangan Sampel

1. Celecoxib

BM : 381,4

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

Perhitungan :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

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

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

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

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

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

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

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

2. Aspirin

BM : 180,2

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

Perhitungan :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

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

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

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

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

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

$$x = 0,901 \text{ mg/mL}$$

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

Lampiran 1. Perhitungan Penimbangan Sampel (lanjutan)

3. 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida

BM = 403,45

Konsentrasi larutan induk : 100 μM

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

Perhitungan :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

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

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

$$x = 5000 \mu\text{M} \cdot 403,45$$

$$x = 5 \text{ mmol/L} \cdot 403,45$$

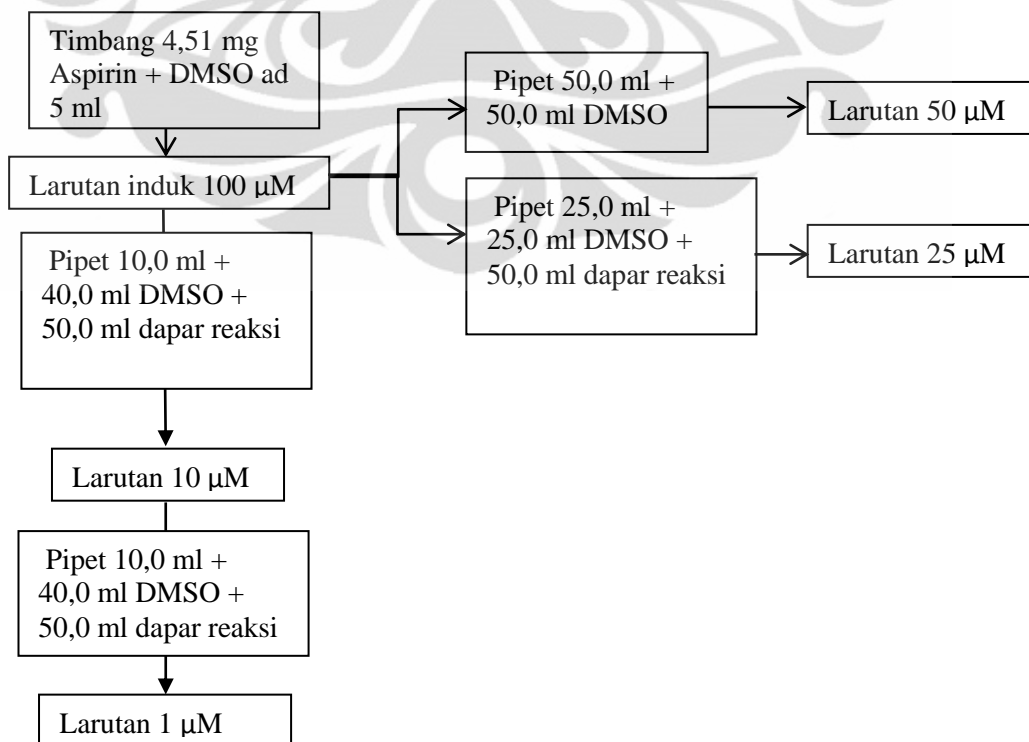
$$x = 2017,27 \text{ mg/L}$$

$$x = 2,01727 \text{ mg/mL}$$

$$x = 10,09 \text{ mg/5 mL}$$

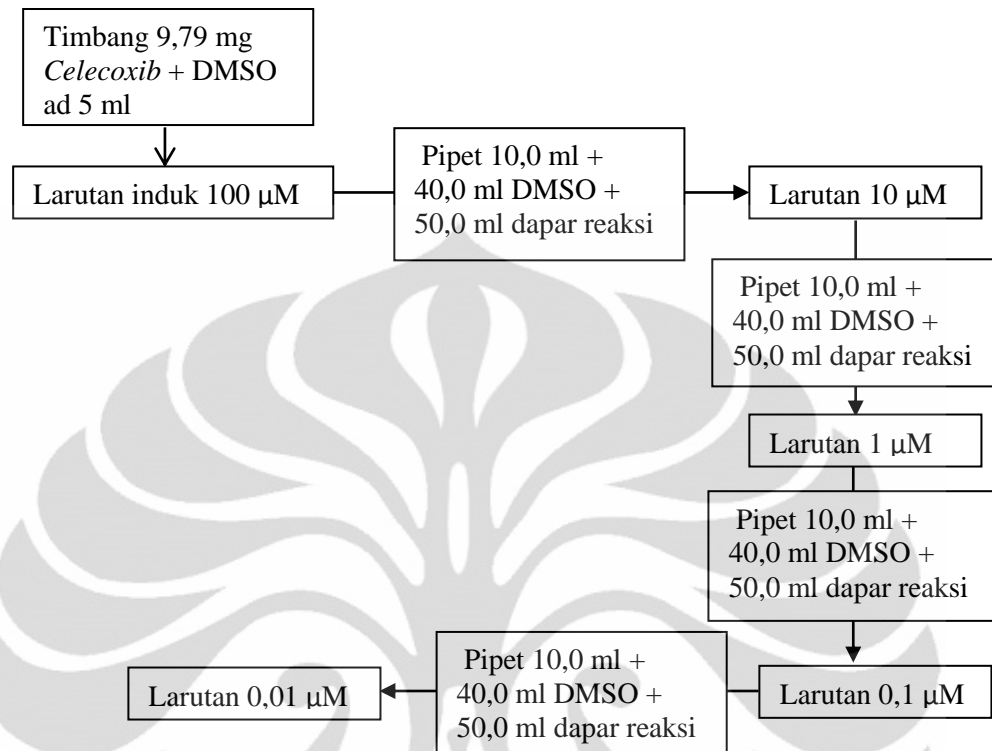
Lampiran 2. Skema Pengenceran Sampel

1. Aspirin

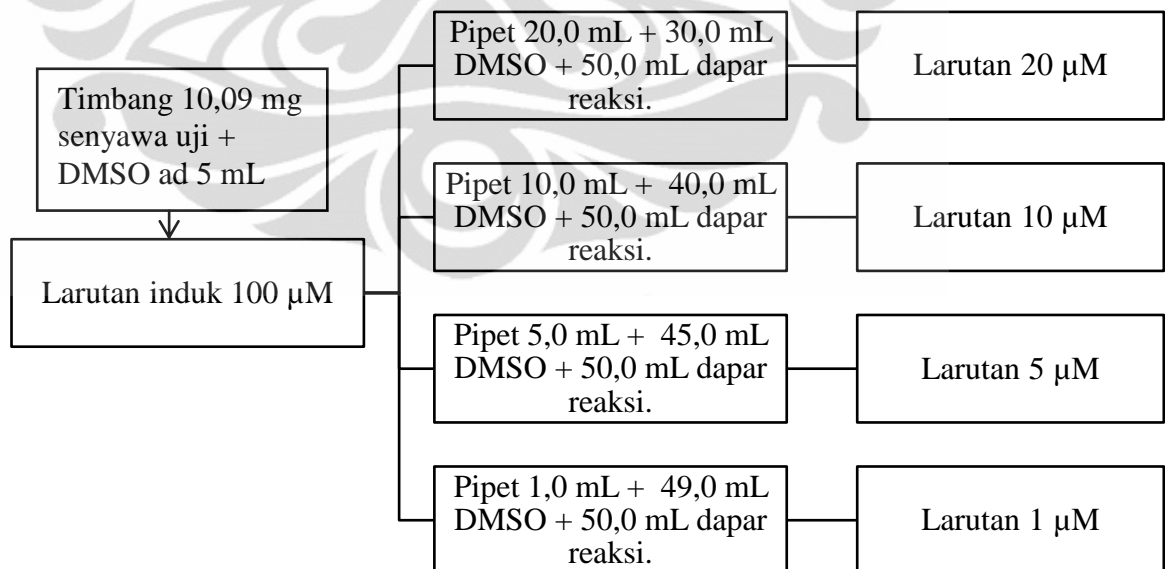


Lampiran 2. Skema Pengenceran Sampel (lanjutan)

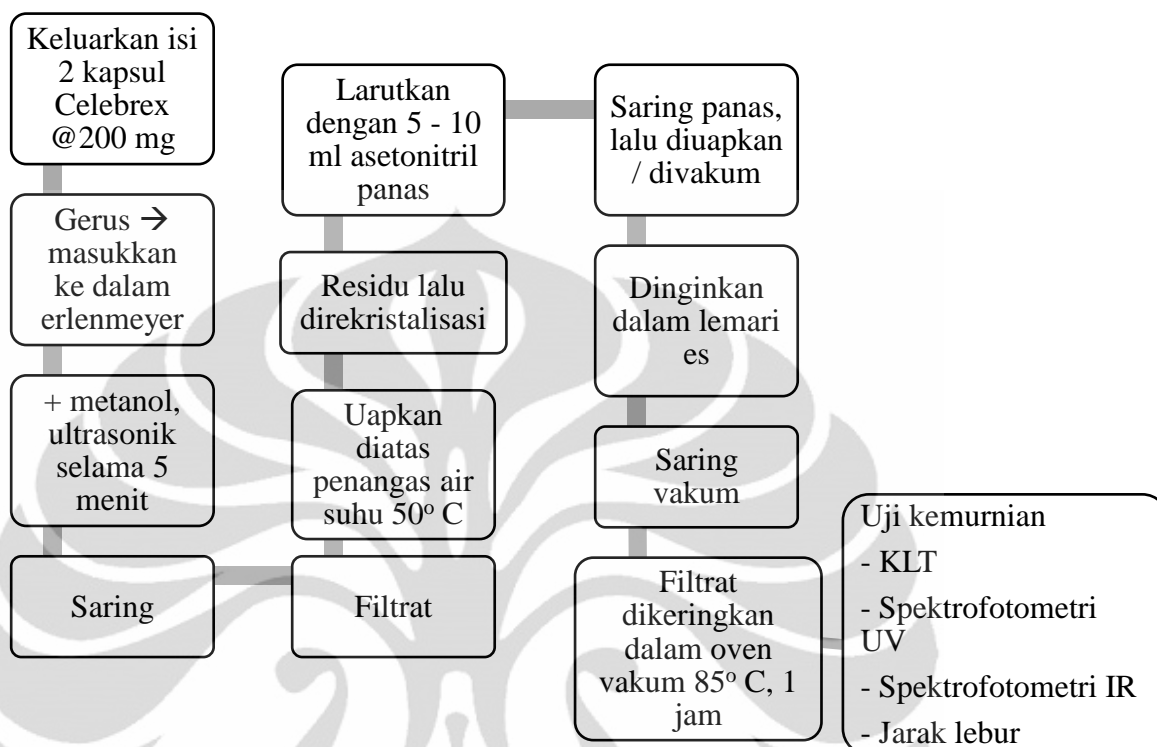
2. Celecoxib



3. 4-[(E)-2-(4-Okso-3-fenil-kuinazolin-2-il)etenil]benzensulfonamida



Lampiran 3. Skema Isolasi *Celecoxib*

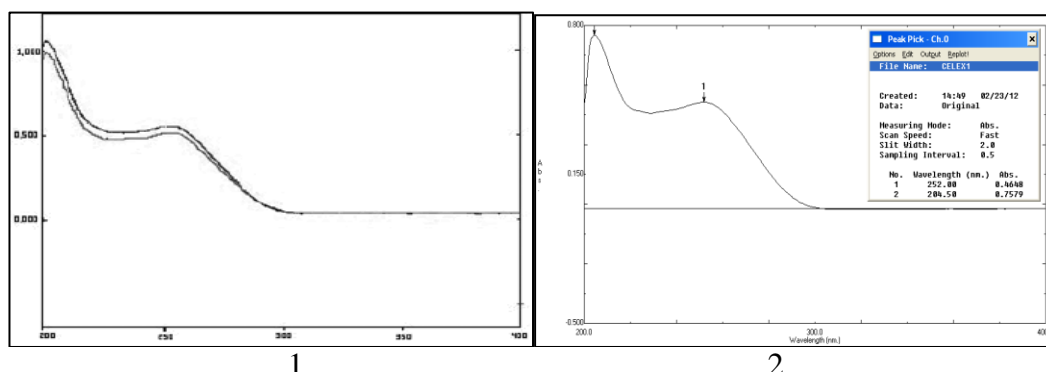


Lampiran 4. Hasil Isolasi *Celecoxib*

a. Jarak Lebur

Jarak lebur yang terukur untuk *Celecoxib* pembanding sebesar 161,3-162,2 °C (Primo & Fröhlich, 2005), sedangkan untuk *Celecoxib* isolat sebesar 154-155 °C dengan faktor koreksi alat +7 °C.

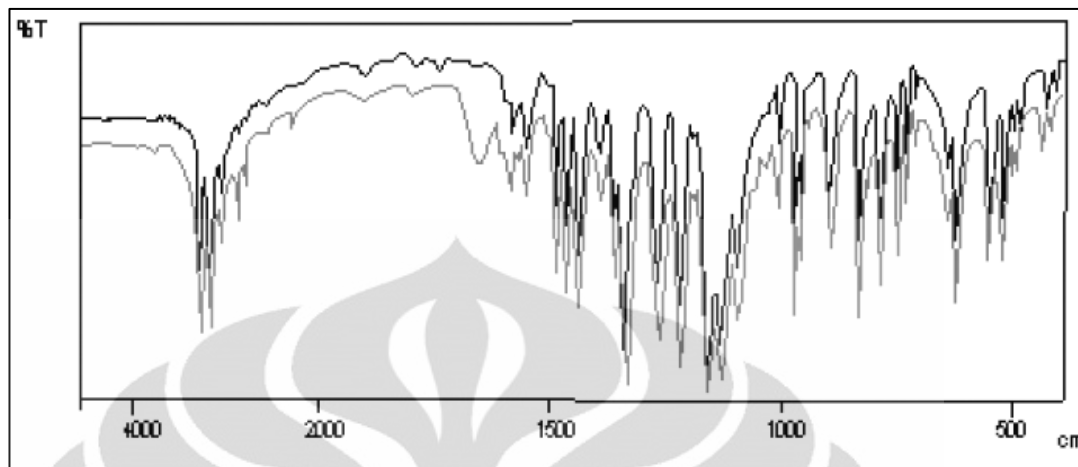
b. Spektrofotometri UV



[Sumber : Primo & Fröhlich, 2005 (Gambar 1)]

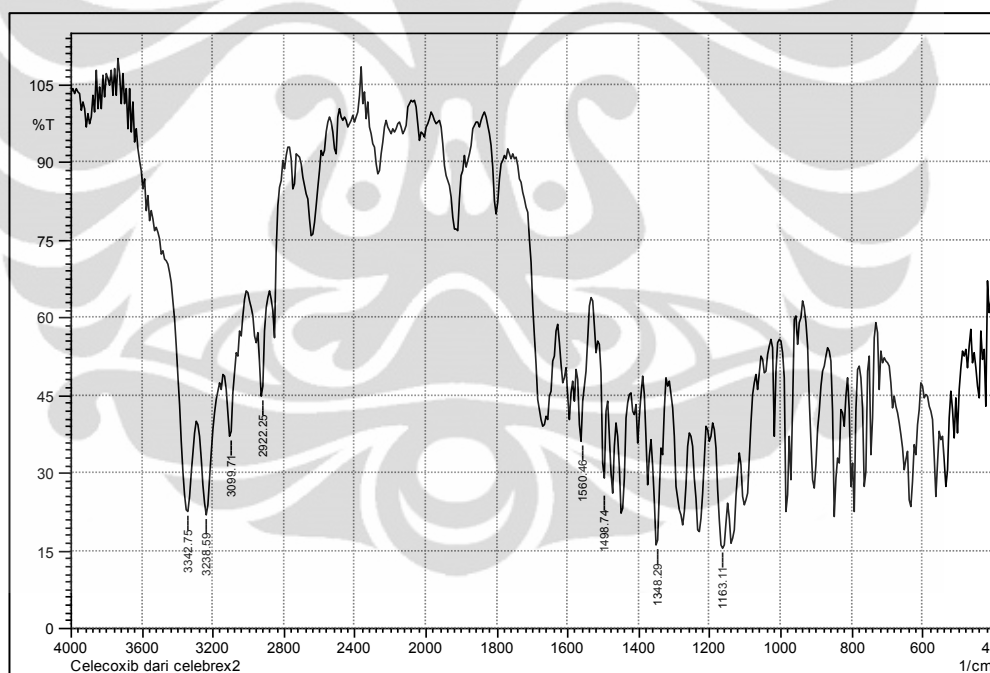
Gambar 1. Spektrum UV *Celecoxib* Pembanding (1) dan *Celecoxib* Isolat (2)

c. Spektrofotometri Infra Merah (IR)



[Sumber : Primo & Fröhlich, 2005]

Gambar 2. Spektrum IR *Celecoxib* Pembanding



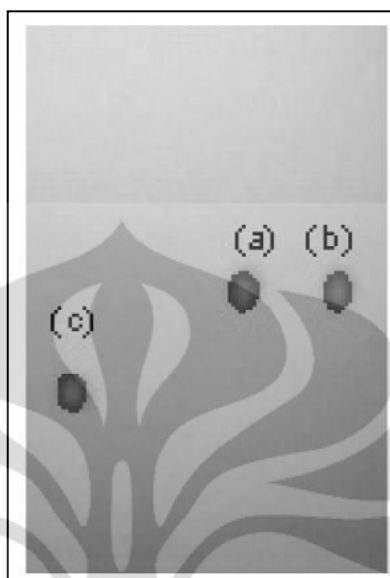
Gambar 3. Spektrum IR *Celecoxib* Isolat

Tabel 1. Bilangan Gelombang dan Gugus Fungsi dari *Celecoxib* Pembanding dan Isolat

Senyawa	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
<i>Celecoxib</i> pembanding ¹	1350-1150	S=O ulur (sulfonamida)
	3500-3300	NH ₂ ulur
<i>Celecoxib</i> isolat	1348 dan 1163	S=O ulur (sulfonamida)
	3342-3238	NH ₂ ulur

[Sumber : ¹ Primo & Fröhlich, 2005]

d. Kromatografi Lapis Tipis



[Sumber : Primo & Fröhlich, 2005]

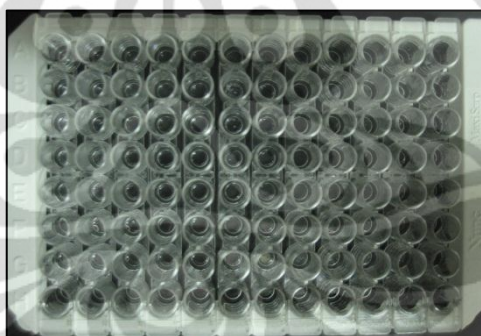
Gambar 4. Bercak KLT *Celecoxib* Isolat (a), *Celecoxib* Pembanding (b), dan *Rofecoxib* (c)



Gambar 5. Bercak KLT *Celecoxib* Isolat

Lampiran 5. Tabel Kondisi Penyimpanan Bahan-bahan Kit EIA

Bahan	Suhu Penyimpanan		Waktu Stabilitas Larutan
	Sebelum	Sesudah	
PG Screening EIA Antiserum	-20 °C	4 °C	4 pekan
PG Screening EIA AChE Tracer	-20 °C	4 °C	1 pekan
PG Screening EIA Standar	-20 °C	4 °C	6 pekan
Dapar EIA	Suhu kamar	Suhu kamar	2 bulan
Dapar Cuci	Suhu kamar	Suhu kamar	2 bulan
Dapar Reaksi	-20 °C	Suhu kamar	1 bulan
Tween 20	Suhu kamar	Suhu kamar	-
IgG pada sumur	4 °C	4 °C	-
Reagen Ellman	-20 °C	Suhu kamar	-
COX-2	-80 °C	-80 °C	6 pekan
Heme	-20 °C	Suhu kamar	12 jam
Asam Arakidonat	-20 °C	Suhu kamar	1 jam
Kalium Hidroksida	-20 °C	Suhu kamar	-
Asam Klorida	-20 °C	Suhu kamar	1 bulan
Timah (II) Klorida	-20 °C	Suhu kamar	8 jam

Lampiran 6. Gambar Alat dan Bahan yang Digunakan Selama Penelitian**Gambar 1.** Lempeng Mikro 96 Sumur (Cayman Chemical®)**Gambar 2.** Bahan-bahan Kit EIA (Cayman Chemical®)

Lampiran 6. Gambar Alat dan Bahan yang Digunakan Selama Penelitian (lanjutan)



Gambar 3. Pipet Mikro [Eppendorf[®] (kiri) dan Gilson[®] (kanan)]



Gambar 4. Vortex Mixer (As One[®])



Gambar 5. Penangas Air (Mettmert[®] WNB 14)

Lampiran 6. Gambar Alat dan Bahan yang Digunakan Selama Penelitian (lanjutan)



Gambar 6. Alat Sentrifugasi (Heraeus Sepatech® Labofuge 15000)



Gambar 7. *Orbital Shaker* (Lab Line®)



Keterangan : 1. Komputer dengan perangkat lunak Gen5; 2. *Microplate reader* (Biotek Instruments®)

Gambar 8. Peralatan *Microplate Reader* (Biotek Instruments®)

Lampiran 7. Sertifikat Analisis Aspirin

山东新华制药股份有限公司 Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., Ltd. 14 Dongyi Road, Zhong Diao District, Zibo, Shandong, P.R. China Certificate of Analysis 41082		
产品名称: Name of Product: 阿司匹林颗粒 ACETYLSALICYLIC ACID GRANULES	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: 2010-04
批重: 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	应符合规定 Complies
B. 水杨酸熔点 (°C) B. melting point of salicylic acid (°C)	158-161	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	0.00
易炭化物 Readily carbonization substances	≤对照液Q ≤Matching Fluid Q	≤对照液Q ≤Matching Fluid Q
硫酸盐 (%) Sulfates (%)	≤0.04	≤0.00
氯化物 (%) Chloride (%)	≤0.014	≤0.011
炽灼残渣 (%) Residue on ignition (%)	≤0.05	0.04
含量 (以干燥品计) (%) Assay (on dried basis) (%)	99.5-100.5	100.1
澄清液澄清度和色泽 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	0.00
总杂质 (%) Total impurities (%)	≤0.25	0.089
粒度: 14-60目 (%) Particle Size: 14-60 mesh (%)	>70	94.1
通过80目筛 (%) Pass through 80 mesh (%)	≤10	1.9
残留溶剂 (%) Residual solvents (%)	LOD ≤ 0.5	0.00
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: 孙祥军 Released by QA:	放行日期: 2010.4.19 QC负责人: 孙祥军 Release Date:	复核者: 孙祥军 报告者: 孙祥军 Rechecked by: Reported by:

Lampiran 9. Lembar Kontrol Kualitas (QC) Kit EIA

