

**SINTESIS METIL 2-ASETOKSIBENZOAT DARI MINYAK
GANDAPURA DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI SENYAWA
ANTITROMBOTIK**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

**ANDI CANDRA
I 211 08 061**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA
PONTIANAK
2014**

SKRIPSI

**SINTESIS METIL 2-ASETOKSIBENZOAT DARI MINYAK
GANDAPURA DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI SENYAWA
ANTITROMBOTIK**

Oleh:
ANDI CANDRA
NIM : I21108061

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura
Tanggal : 21 Januari 2014

Disetujui

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Prof. Dr. Sabirin Matsjeh, Ph.D
NIP : 194811101974121001


Iswahyudi, S.Si., Apt., Sp. FRS
NIP : 196912151997031101

Penguji I,

Penguji II,


Bambang Wlijianto, M.Sc., Apt
NIP : 198412312009121005


Sri Luliana, M. Farm., Apt
NIP : 198012262008122002

Mengetahui

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Tanjungpura


dr. Bambang Sri Nugroho, Sp.PD
NIP : 195112181978111001

Lulus Tanggal : 21 Januari 2014
No. SK Dekan FK : 4577a/UN22.9/DT/2013
Tanggal : 30 Desember 2013

SINTESIS METIL 2-ASETOKSIBENZOAT DARI MINYAK GANDAPURA DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI SENYAWA ANTITROMBOTIK

THE SYNTHESIS OF METHYL 2-ACETOXYBENZOATE FROM WINTERGREEN OIL AND THE TEST AS ANTITHROMBOTIC SUBSTANCE

Andi Candra^{*)}, Sabirin Matsjeh^{**)} dan Iswahyudi^{*)}

^{*)} Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

^{**)} Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Antitrombotik adalah senyawa penghambat agregasi trombosit yang banyak digunakan oleh pasien yang beresiko tinggi terkena serangan koroner akut. Salah satu senyawa yang sering digunakan sebagai antitrombotik adalah asam asetilsalisilat. Senyawa metil 2-asetoksibenzoat, yang biasanya dikenal dengan metil asetilsalisilat, merupakan salah satu ester turunan asetilsalisilat yang sampai saat ini masih belum jelas aktivitas antitrombotisnya. Pada penelitian ini, metil 2-asetoksibenzoat diperoleh secara sintesis, yaitu dengan mereaksikan minyak gandapura (mengandung 100% metil salisilat) dengan anhidrida asetat (1:2). Katalisator yang digunakan adalah natrium hidroksida. Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis menggunakan spektrometer massa dan infra merah. Aktivitas antitrombotis senyawa ini diuji dengan menggunakan parameter waktu pendarahan dan waktu koagulasi pada mencit jantan galur BALB/c. Pemberian bahan uji dilakukan secara oral sehari sekali selama empat minggu. Asam asetilsalisilat (30 mg/kgBB) digunakan sebagai kontrol positif dan CMC 0,5% digunakan sebagai kontrol negatif. Dari hasil penelitian, metil 2-asetoksibenzoat berhasil disintesis dengan rendemen sebesar 80,928%. Senyawa ini yang diberikan dengan dosis 16; 32 dan 64 mg/kgBB dapat meningkatkan waktu pendarahan secara signifikan dibandingkan hari ke-0 dan tampak meningkat terus setiap minggunya selama empat minggu pengamatan. Besarnya dosis dan lamanya waktu pemakaian berbanding lurus dengan peningkatan waktu pendarahan. Dari segi uji parameter waktu koagulasi, pada dosis 16 mg/kgBB tidak menunjukkan adanya peningkatan waktu koagulasi (waktu koagulasi cenderung menurun), pada dosis 32 mg/kgBB peningkatan waktu koagulasi cenderung fluktuatif (seperti kontrol positif), dan sedangkan pada dosis 64 mg/kgBB menunjukkan adanya peningkatan waktu koagulasi yang lebih baik dari satu minggu ke minggu selanjutnya.

Kata kunci: Antitrombotik, Asam asetilsalisilat, Metil 2-asetoksibenzoat.

Abstract

Antithrombotic agent is a drug that reduces thrombus formation. They can be used therapeutically for primary prevention, secondary prevention, or treatment of an acute thrombus. One of the most commonly used is acetylsalicylic acid. Methyl 2-asetoksibenzoate is one of the ester derivatives of acetylsalicylic acid but its antithrombotic activity is still not known well. In this study, methyl 2-acetoxybenzoate is synthesized by reacting wintergreen oil (containing 100% methyl salicylate) with acetic anhydride (1:2). Sodium hydroxide is used as the catalyst. The synthesized compound was identified by mass spectrometer and infrared spectrometer. The antithrombotic activity was tested by measuring bleeding and coagulation time of male BALB/c mice. The test substance given once a day orally during the period of 28 days. Acetylsalicylic acid (30 mg/kg BW) was used as positive control. As the results, the yield of the synthesized compound was 80,928%. This compound, at the dose of 16; 32 and 64 mg/kg BW, may increase bleeding time significantly. The magnitude of the dose and duration of use tends to be directly proportional to the increase in bleeding time. In terms of the test of coagulation time, 16 mg/kg BW of methyl 2-acetoxybenzoate didn't show an increase in coagulation time. At a dose of 32 mg/kg BW, the increase in coagulation time tends to fluctuate (similar to positive control). The increase of coagulation time is showed at a dose of 64 mg/kg BW and it is proportional with the duration of use.

Keywords: Acetylsalicylic acid, Antithrombotic, Methyl 2-acetoxybenzoate.

Pendahuluan

Trombosis adalah suatu pembentukan bekuan darah (trombus) di dalam pembuluh darah. Kelainan ini merupakan penyulit yang sering menyertai penyakit lain misalnya gagal jantung, diabetes mellitus, varises vena dan kerusakan arteri. Trombosis yang terjadi pada plak atheroma dalam pembuluh arteri koroner dapat menyebabkan infark miokardia sedangkan trombosis pada pembuluh darah vena kaki dapat menyebabkan varises vena dan emboli paru yang dapat mengobstruksi arteri paru (Lullman, 2000).

Data statistik WHO dalam laporan kesehatan dunia tahun tahun 2003 menunjukkan bahwa 16,7 juta atau sekitar 29,2% dari total kematian di seluruh dunia disebabkan oleh penyakit kardiovaskular. Data spesifik mengenai insiden di Asia masih terbatas, dahulu ada anggapan insiden di Asia rendah. Penelitian pada pasien pasca operasi Malaysia menemukan angka kejadian trombosis sama dengan di Negara Barat (Piovella, 2005).

Asam asetilsalisilat merupakan salah satu obat antitrombotik yang digunakan dalam pencegahan penyumbatan aliran darah dengan mekanismenya yaitu dengan mengasetilasi sisi aktif serin-530 dari enzim siklooksigenase secara ireversibel sehingga tidak terbentuk tromboksan A_2 di dalam trombosit dan prostasiklin (PGI_2) di pembuluh darah (Dewoto, 2007). Sejak tahun 1960 telah dilakukan sintesis senyawa turunan salisilat dengan tujuan memperoleh obat yang relatif minim efek samping dan lebih tinggi aktivitasnya daripada asam asetilsalisilat (Diyah, 1998). Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan modifikasi pada gugus benzoat pada asam asetilsalisilat.

Senyawa metil 2-asetoksibenzoat merupakan senyawa yang dalam bentuk metil ester dari asam asetilsalisilat. Senyawa ini masih belum ditelaah efek antitrombosisnya, namun beberapa penelitian telah mempublikasikan senyawa ini untuk anti akne (Boghosian, 1981) dan anti nyeri (Mukhrizal, 2013). Pada penelitian ini senyawa metil 2-asetoksibenzoat diuji efek antitrombosisnya dengan kontrol positif asam asetilsalisilat yang sudah diketahui dapat menghambat agregasi trombosit (Majerus, 2006).

Minyak gandapura merupakan minyak yang banyak mengandung senyawa metil salisilat dan relatif mudah diperoleh di Indonesia yang dikenal kaya akan sumber alamnya. Pada penelitian ini minyak gandapura dipilih sebagai *starting material* karena kandungannya yang kaya akan metil salisilat dan struktur senyawanya yang tidak jauh berbeda dengan senyawa target. Kemiripan struktur senyawa ini akan memudahkan dan menguntungkan karena hanya diperlukan sedikit modifikasi struktur senyawa hasil alam yang sudah ada secara alami daripada sintesis murni yang tergantung pada bahan baku impor yang pada umumnya sangat mahal.

Metodologi

Bahan

Minyak gandapura (dengan kandungan metil salisilat 100%) yang teregistrasi BPOM, anhidrida asetat p.a ($(CH_3CO)_2O$), natrium hidroksida p.a (NaOH), diklorometana (CH_2Cl_2), natrium karbonat 5%, asam asetilsalisilat (Aspirin), karboksimetilselulosa (CMC) 0,5% dan aquadest.

Alat

Seperangkat alat gelas standar, perangkat refluk, plat pemanas, termometer, pengaduk magnet, perangkat penyaring, corong pisah, timbangan analitik, indikator pH universal, kandang mencit, spuit berujung tumpul 1cc (oral), pisau bedah, *stopwatch*, sarung tangan, pipa kapiler, kapas, kertas saring, alat GCMS, alat spektroskopi infra merah dan alat penunjang lainnya.

Hewan Uji

Hewan Uji yang digunakan adalah mencit jantan galur BALB/c yang berbobot 25-35 gram dengan umur 2-3 bulan

Metode Sintesis Metil 2-asetoksibenzoat

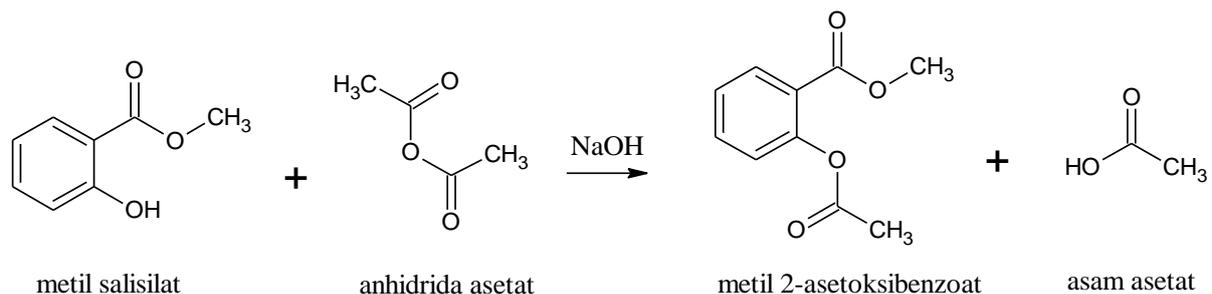
Minyak gandapura diambil sebanyak 7,6 gram (0,05 mol) dimasukkan ke dalam labu leher dua dan ditambahkan anhidrida asetat sebanyak 10,2 gram (0,1 mol). Selanjutnya ditambahkan natrium hidroksida sebanyak 0,4 gram. Campuran direfluks selama 3 jam pada suhu $65^\circ C$ sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Hasil refluks dimasukkan kedalam corong pisah kemudian ditambahkan

diklorometana sebanyak 10 mL. Kemudian diekstraksi dengan 20 ml aquadest sebanyak 2 kali. Fase organik diuapkan pada suhu 45°C selama 30 menit. kemudian didinginkan dalam lemari pendingin selama 2 x 24 jam (terbentuk padatan). Kemudian dilakukan rekristalisasi dengan cara Padatan yang didapat dipanaskan hingga mencair, tambahkan larutan NaHCO₃ 5% sebanyak 20 mL. Diamkan hingga terbentuk padatan

adalah waktu yang diperlukan untuk terbentuknya benang fibrin tersebut. (Vogel, 2002; Sukandar, 2008).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, senyawa metil 2-asetoksibenzoat disintesis dari bahan baku minyak gandapura. Minyak gandapura yang digunakan adalah minyak gandapura yang hanya mengandung metil salisilat. Adapun persamaan reaksi yang dilakukan pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Reaksi Sintesis Metil 2-asetoksibenzoat

kembali, lalu saring. kemudian dicuci dengan aquadest sebanyak 20 mL. Pencucian dengan aquadest dilakukan sebanyak 3 kali (Gerber, 2003).

Pengujian Efek Antitrombosis

Pada pengujian, mencit dibagi menjadi lima kelompok yang masing-masing kelompoknya terdiri atas 5 ekor mencit. Pengujian dilakukan dengan memberikan bahan uji selama 28 hari berturut-turut pada dosis 16, 32 dan 64 mg/kg bobot badan. Parameter yang digunakan, yaitu waktu pendarahan dan waktu koagulasi yang diukur pada hari ke-7, 14, 21, dan 28. Hasil uji diolah secara statistik menggunakan program komputer *SPSS 16.0 for windows*.

Pengukuran Waktu Pendarahan

Darah diperoleh dari ujung ekor mencit, darah yang keluar diserap dengan kertas penyerap. Interval waktu antara timbulnya tetes pertama darah hingga darah berhenti mengalir adalah waktu perdarahan (Vogel, 2002; Sukandar, 2008).

Pengukuran Waktu Koagulasi

Darah dari ujung ekor diserap dengan pipa kapiler selama 30 detik. Pipa kapiler dipatahkan setiap interval 15 detik hingga teramati pembentukan benang fibrin pada bagian yang dipatahkan. Waktu koagulasi

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa senyawa metil salisilat bereaksi 1:1 dengan anhidrida asetat. Namun dalam penelitian ini, perbandingan metil salisilat dengan anhidrida asetat yang digunakan untuk menghasilkan senyawa metil 2-asetoksibenzoat adalah 1:2. Alasan digunakannya perbandingan 1:2 adalah untuk memaksimalkan reaksi sintesis. Sebelumnya, pada saat uji pendahuluan telah digunakan perbandingan 1:1 dan hasil rendemen yang diperoleh kurang baik serta masih menyisakan metil salisilat dalam jumlah yang cukup banyak.

Katalis merupakan zat yang digunakan untuk meningkatkan laju reaksi. Dalam penelitian ini, katalis yang digunakan adalah natrium hidroksida (NaOH). NaOH merupakan katalis basa yang cukup kuat dan umum digunakan dalam reaksi asetilasi. Jumlah yang digunakan adalah sebanyak 0,4 gram (0,01 mol). Jumlah ini digunakan untuk mereaksikan metil salisilat sebanyak 6,7 gram (0,05 mol) dengan anhidrida asetat sebanyak 10,2 gram (0,1 mol). Banyaknya natrium hidroksida yang digunakan adalah berdasarkan orientasi yang dilakukan di laboratorium, dimana pada jumlah tersebut memberikan hasil reaksi yang maksimal.

Sintesis metil 2-asetoksibenzoat ini diawali dengan proses refluks. Reflüks dilakukan selama 3 jam dengan suhu 65°C. Waktu dan suhu proses refluks ini juga

berdasarkan hasil orientasi yang dilakukan di laboratorium, dimana pada waktu 3 jam dan suhu 65°C ini metil salisilat sudah bereaksi sempurna dengan anhidrida asetat. Kesempurnaan reaksi ini dapat dilihat dengan membekunya metil 2-asetoksibenzoat pada saat didinginkan dengan penangas es.

Campuran yang telah dingin ini masih mengandung pengotor dan dapat terhidrolisis kembali apabila dibiarkan. Oleh karena itu, dilakukan ekstraksi untuk memisahkan zat-zat pengotornya. Adapun zat-zat pengotor yang mungkin terdapat dalam campuran apabila ditinjau dari persamaan reaksinya adalah asam asetat, anhidrida asetat yang belum habis bereaksi, katalis dan air. Dari persamaan reaksi tersebut, dapat dilihat bahwa sebagian besar pengotor yang terdapat di dalam campuran adalah bersifat polar. Jadi, apabila diekstraksi dengan aquadest maka zat-zat ini akan terlarut ke dalam aquadest.

Ekstraksi dilakukan dengan penambahan aquadest sebanyak 2x20 ml di dalam corong pisah. Sebelum ekstraksi dilakukan, di tambahkan diklorometana sebanyak 10 ml terlebih dahulu agar metil 2-asetoksibenzoat terlarut di dalamnya dan terjauhkan dari proses hidrolisis oleh air pada saat pengekstraksian. Selain itu, zat-zat pengotor yang bersifat polar tidak banyak terikut pada fase ini dan akan cenderung terlarut dalam fase air.

Pada saat ekstraksi terbentuk 2 fase yaitu fase organik dan fase air. Fase organik berada pada lapisan bawah, sedangkan fase air berada pada lapisan atas. Fase yang diambil untuk pengerjaan selanjutnya adalah fase organik. Hal ini dikarenakan senyawa metil 2-asetoksibenzoat terlarut ke dalam fase organik yang berada pada lapisan bawah.

Fase organik yang diperoleh kemudian dipanaskan pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Hal ini bertujuan untuk menguapkan sebagian besar pelarutnya (diklorometana). Digunakan suhu 45°C karena suhu ini lebih tinggi 5°C dari titik didih diklorometana, dengan demikian pelarut diklorometana diharapkan dapat lebih cepat teruapkan. Setelah diuapkan, hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam lemari es bersuhu sekitar 5°C selama 2 x 24 jam untuk mengkristalkan metil 2-asetoksibenzoat. Lamanya waktu pendinginan ditemukan pada saat orientasi di labratorium. Zat ini ditemukan telah membeku sepenuhnya dalam kurun waktu ini.

Pada saat sebelum dimasukkan ke dalam lemari es, campuran metil 2-asetoksibenzoat masih bersifat cair. Hal ini dikarenakan masih terdapatnya campuran pelarut diklorometana sehingga zat ini masih mengalami penurunan titik lebur. Selama pendinginan ini, campuran ditutup namun dengan kondisi tidak kedap agar zat-zat organik volatil seperti diklorometana dapat menguap perlahan.

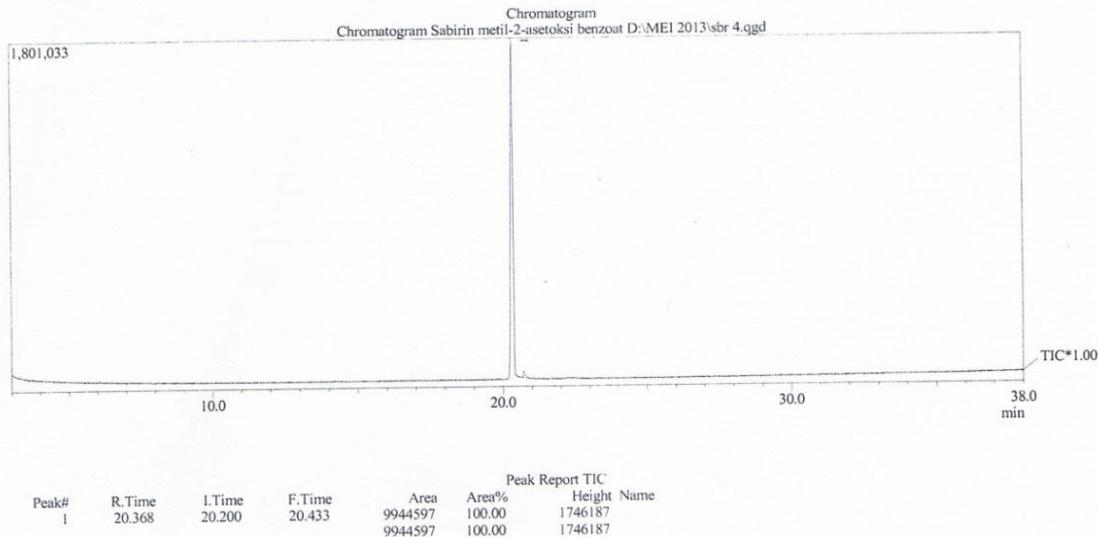
Tahap selanjutnya adalah rekristalisasi senyawa hasil sintesis (metil 2-asetoksibenzoat). Hal ini dilakukan untuk memurnikan senyawa yang telah didapat. Rekristalisasi dilakukan karena masih tercium aroma asam pada senyawa hasil sintesis. Aroma asam yang tercium menandakan masih terdapat senyawa asing pada hasil sintesis, yaitu asam asetat yang merupakan hasil samping reaksi antara minyak gandapura dengan anhidrida asetat, ataupun masih adanya anhidrida asetat yang bereaksi perlahan dengan uap air di sekitar sehingga menghasilkan aroma asam asetat.

Rekristalisasi dan penetralan dilakukan dengan cara menambahkan NaHCO_3 5% sebanyak 20 mL. Sebelum menambahkan NaHCO_3 5%, padatan metil 2-asetoksibenzoat dicairkan pada suhu titik lelehnya terlebih dahulu (45-50°C) agar cairan asam yang terperangkap dalam padatan dapat bereaksi dengan NaHCO_3 yang ditambahkan. Padatan akan mulai terbentuk kembali secara perlahan seiring penurunan suhu. Agar proses kristalisasi berjalan sempurna, penurunan suhu harus dilakukan secara perlahan. Selanjutnya kristal-kristal metil 2-asetoksibenzoat yang terbentuk kembali diambil secara dekantasi dan dibilas dengan 20 mL akuades dingin sebanyak 3 kali agar tidak terdapat sisa-sisa NaHCO_3 yang telah ditambahkan sebelumnya. Selanjutnya untuk pengeringannya, padatan didiamkan dalam desikator selama 24 jam.

Hasil sintesis yang telah diperoleh dihitung rendemennya (persentase beratnya). Perhitungan rendemen hasil sintesis dapat dilihat pada lampiran 6. Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, rendemen hasil sintesis senyawa metil 2-asetoksibenzoat adalah sebesar 80,928 %.

Senyawa metil 2-asetoksibenzoat yang telah diperoleh dari hasil sintesis diidentifikasi dengan menggunakan alat GCMS (*Gas Chromatography and Mass Spectroscopy / Kromatografi Gas dan Spektroskopi Massa*)

untuk mengetahui macam zat yang mungkin masih terdapat dalam hasil yang diperoleh dan beserta massa molekul zat tersebut. Berikut adalah gambar hasil kromatografi gas yang telah dilakukan.



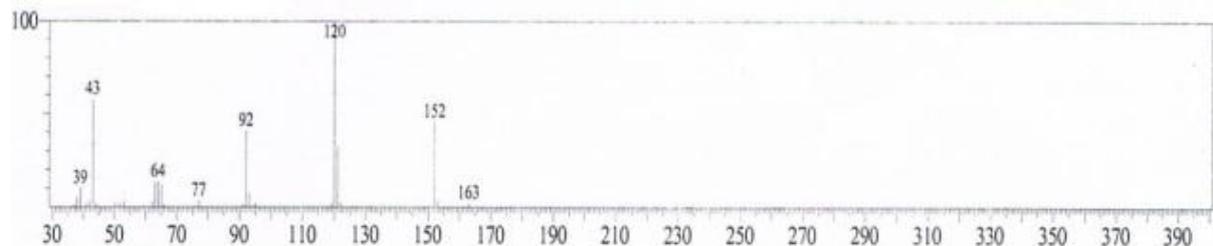
Gambar 2. Hasil Analisis Kromatografi Gas

Hasil analisis kromatografi gas yang ditunjukkan pada gambar 2 menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis telah diisolasi dengan baik karena pada kromatogram tersebut menunjukkan hanya terdapat 1 puncak dengan persen area = 100%. Hal ini mengindikasikan bahwa hanya terdapat satu macam senyawa yang terdapat dalam campuran atau dapat dikatakan sudah murni.

diperlihatkan pada gambar 3.

Pada gambar 3 menunjukkan massa ion molekul (M^{+}) dengan $m/z = 163$. Secara teoritis, baik menurut perhitungan jumlah massa molekul relatif maupun penelitian

sebelumnya (Gerber, 2003), massa per muatan (m/z) molekul metil 2-asetoksibenzoat adalah 194. Hal seperti ini bisa saja terjadi karena pada saat proses ionisasi dengan *electron impact*, seluruh ion molekul metil 2-asetoksibenzoat yang terbentuk telah terfragmentasi. Adapun kemungkinan lainnya yaitu pompa vakum dari alat spektroskopi massa yang digunakan tidak cukup kuat.

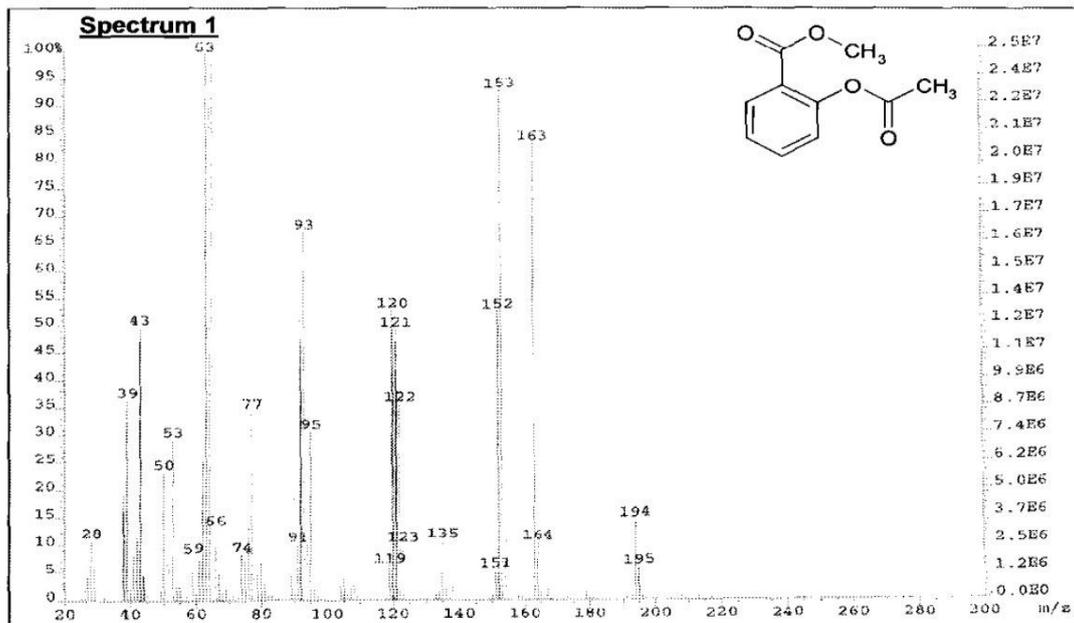


Gambar 3. Hasil Analisis Spektroskopi Massa

Dengan demikian, hasil ini memenuhi syarat untuk dilakukan pengujian farmakologi.

Analisis kemudian dilanjutkan dengan spektroskopi massa. Tujuan analisis ini adalah untuk mengetahui massa molekul senyawa hasil sintesis. Selain itu, pada spektroskopi massa juga dapat diketahui massa dari fraksi-fraksi pecahan senyawa yang dianalisis. Fraksi dari hasil analisis spektroskopi massa juga dapat digunakan untuk mengetahui ciri bentuk dari senyawa yang dianalisis. Hasil analisis spektroskopi massa yang telah dilakukan

Hasil analisis pada spektrometer massa pada gambar 3 juga menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki fragmen dengan $m/z = 163$; 152; 120; 92; 64 dan 43. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya (Gerber, 2003), fragmen senyawa ini memiliki $m/z = 194$; 163; 153; 120; 93; 63 dan 43 (gambar 4). Hasil fragmentasi ini tidak jauh berbeda dengan hasil analisis yang diperoleh. Perbedaannya terletak pada massa ion molekul saja yang tidak muncul pada penelitian ini. Jika berdasarkan tinjauan



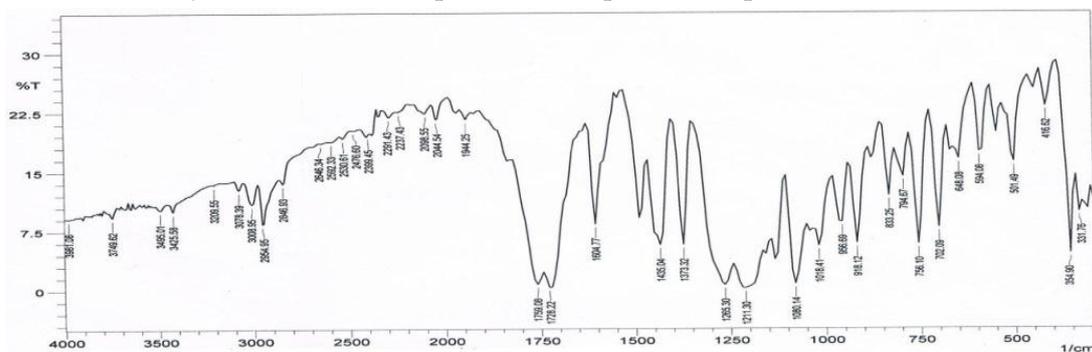
Gambar 4. Spektrum GC-MS Metil 2-asetoksibenzoat (Gerber, 2003)

teoritis ini, senyawa hasil sintesis yang diperoleh pada penelitian ini adalah metil 2-asetoksibenzoat.

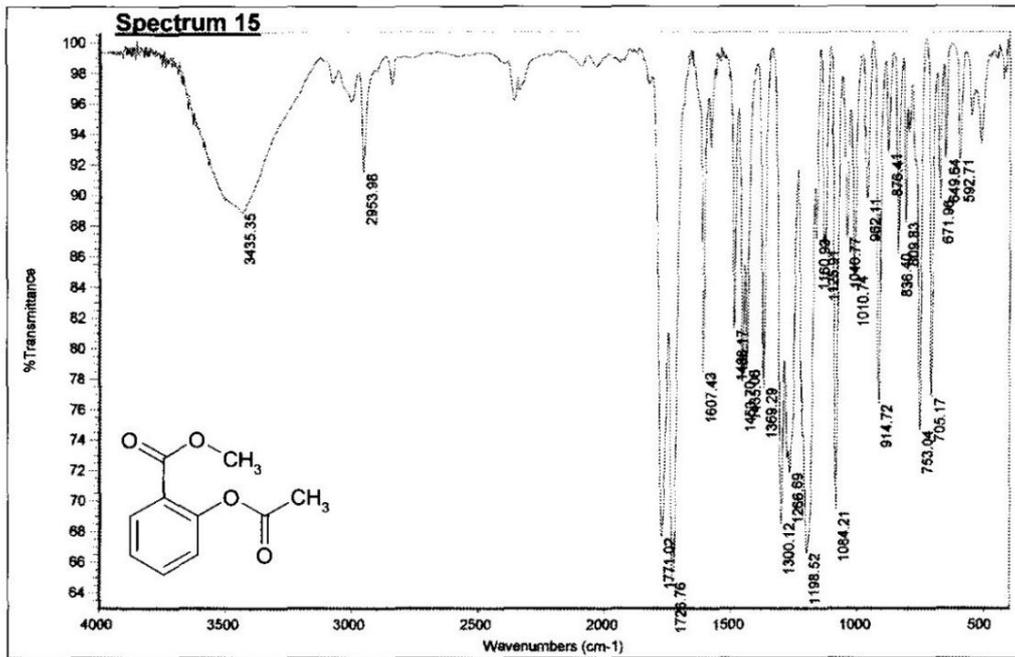
Identifikasi senyawa hasil isolasi kemudian dilanjutkan dengan analisis spektrofotometri infra merah untuk lebih memastikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah metil 2-asetoksibenzoat. Pada penelitian ini, terdapat dua kriteria yang akan diamati. Kriteria pertama yang dilihat pada identifikasi ini adalah masih ada atau tidaknya puncak serapan pada panjang gelombang 3590 cm^{-1} sampai 3650 cm^{-1} yang mengindikasikan keberadaan gugus hidroksil (-OH) pada senyawa fenol (Solomon, 2008). Kriteria kedua adalah ada atau tidaknya dua serapan khas senyawa ester yaitu pada panjang gelombang 1630 cm^{-1} sampai 1780 cm^{-1} (C=O) dan 1080 cm^{-1} sampai 1300 cm^{-1} (C-O) (Solomon, 2008). Senyawa metil 2-asetoksibenzoat dinyatakan terbentuk apabila

sudah tidak terdapat puncak serapan pada panjang gelombang 3590 cm^{-1} sampai 3650 cm^{-1} dan terdapat masing-masing dua puncak serapan pada panjang gelombang 1630 cm^{-1} sampai 1780 cm^{-1} dan 1080 cm^{-1} sampai 1300 cm^{-1} . Berikut ini adalah gambar hasil identifikasi spektroskopi infra merah senyawa metil 2-asetoksibenzoat yang telah diperoleh pada penelitian ini (gambar 5) dan hasil identifikasi yang telah dilakukan oleh Gerber pada tahun 2003 (gambar 6).

Dari gambar 5 dan 6, dapat dilihat bahwa keduanya menunjukkan adanya puncak serapan pada rentang 1728,22 cm^{-1} sampai 1759,08 cm^{-1} dan 1265,30 cm^{-1} sampai 1211,30 cm^{-1} , serta tidak terdapat puncak serapan pada 3590 cm^{-1} sampai 3650 cm^{-1} . Bila keduanya dibandingkan, senyawa metil 2-asetoksibenzoat yang disintesis pada penelitian ini sudah terbentuk dan memiliki kesamaan puncak serapan.



Gambar 5. Hasil Analisis Spektroskopi Infra Merah Senyawa Hasil Sintesis



Gambar 6. Hasil Analisis Spektroskopi Infra Merah (Gerber, 2003)

Terbentuknya senyawa ini didukung dengan terpenuhinya kriteria pertama yaitu tidak terdapat puncak serapan pada panjang gelombang 3590 cm^{-1} sampai 3650 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya serapan gugus hidroksil dan kriteria kedua yaitu terdapatnya dua serapan pada 1728,22 cm^{-1} dan 1759,08 cm^{-1} yang merupakan rentangan gugus karbonil, serta serapan pada panjang gelombang 1265,30 cm^{-1} dan 1211,30 cm^{-1} yang merupakan rentangan gugus C–O pada senyawa ester. Sebagai tambahan, terdapat juga serapan pada panjang gelombang 2954,95 cm^{-1} yang merupakan rentangan metil (C–H) (Stuart, 2004). Dengan demikian, senyawa hasil sintesis yang diperoleh pada penelitian ini adalah metil 2-asetoksibenzoat.

Pengujian daya antitrombosis merupakan metode pengujian yang digunakan untuk mengetahui efek suatu bahan uji terhadap kemampuan pembekuan darah (trombogenesis) dalam proses hemostatik di dalam tubuh. Pada pengujian ini, terdapat dua parameter yang diamati, yaitu waktu pendarahan dan waktu koagulasi. Waktu pendarahan diamati untuk melihat pengaruh bahan uji terhadap proses pembentukan sumbat hemostatik sementara, yaitu proses hemostasis fase trombosit. Adanya efek anti agregasi trombosit ditunjukkan oleh waktu pendarahan yang semakin panjang setelah pemberian bahan uji.

Pengamatan pada waktu koagulasi bertujuan untuk melihat pengaruh bahan uji terhadap proses pembentukan sumbat hemostatik sekunder, yaitu proses hemostasis fase koagulasi. Selama fase koagulasi, berbagai enzim dan proenzim berinteraksi. Aktivasi dari satu proenzim umumnya membentuk suatu enzim yang mengaktifkan suatu proenzim kedua dan seterusnya dalam suatu reaksi berantai. Tahapan dalam fase koagulasi menyebabkan perubahan fibrinogen yang bersirkulasi menjadi protein fibrin yang tidak larut. Saat jaringan kerja fibrin tumbuh, fibrin menutup permukaan sumbatan trombosit. Trombosit diperangkap di dalam suatu struktur yang sangat berserat, membentuk suatu bekuan darah yang menutup secara efektif bagian yang terluka dari pembuluh. Adanya efek ditunjukkan oleh waktu koagulasi yang semakin panjang setelah pemberian bahan uji.

Pada penelitian ini digunakan asam asetilsalisilat sebagai kontrol positif untuk mengetahui ada atau tidaknya efek antitrombosis pada bahan uji. Asam asetilsalisilat telah diketahui memiliki efek antitrombosis karena bahan ini mampu mengasetilasi enzim COX dan menghambat terbentuknya TXA₂ (Katzung dkk, 2009). Selain telah dijadikan sebagai prototip, obat ini merupakan standar dalam menilai obat sejenis (Wilmana dan Gunawan, 2007). Apabila bahan uji menunjukkan profil farmakologi yang menyerupai atau bahkan lebih baik dari

asam asetilsalisilat ini, maka bahan uji dapat dinyatakan memiliki efek antitrombosis.

Pemilihan dosis metil 2-asetoksibenzoat yang digunakan sebagai bahan uji pada penelitian ini adalah berdasarkan hasil skrining (uji pendahuluan) yang dilakukan di laboratorium. Dosis pendahuluan ditentukan dengan menyesuaikan jumlah mol dosis asam asetilsalisilat yang umum digunakan sebagai antitrombotik. Perhitungan konversi dosis dan pemilihan dosis bahan uji dapat dilihat pada lampiran 5. Sebagai dosis awal pada uji pendahuluan, digunakan dosis sebesar 32 mg/kg BB. Dosis ini ekuivalen mol dengan dosis asam asetilsalisilat yang digunakan sebagai kontrol positif (30 mg/kg BB). Pada dosis tersebut telah menunjukkan profil farmakologi yang mirip dengan kontrol positif. Untuk memudahkan penelitian selanjutnya dalam penentuan dosis efektif bahan uji, dosis dibagi ke dalam beberapa variasi yaitu dosis 16 mg/kg BB (seperuh dari dosis pendahuluan) sebagai sampel perlakuan 1, dosis 32 mg/kg BB (dosis pendahuluan yang telah ditentukan sebelumnya) sebagai sampel perlakuan 2 dan dosis 64 mg/kg BB (dua kali dari dosis pendahuluan) sebagai sampel perlakuan 3.

Berdasarkan data hasil penelitian, perbedaan waktu pendarahan yang bermakna mulai terjadi ketika semua kelompok telah diberi perlakuan yaitu pada hari ke-7, 14, 21 dan 28. Hal ini menunjukkan bahwa dengan diberikannya perlakuan, semua kelompok uji

mengalami perubahan lama waktu pendarahan. Dengan demikian telah diketahui bahwa perlakuan yang diberikan pada hewan uji telah mengubah lamanya waktu pendarahan sehingga waktu pendarahan dari setiap kelompok perlakuan berbeda antara satu sama lainnya. Data ringkas hasil penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa pada hari ke-7, kelompok perlakuan 2 dan 3 yang memiliki perbedaan paling signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Kelompok perlakuan 3 berada pada posisi puncak dan paling berbeda dengan yang lainnya. Pada hari ke-14, semua kelompok perlakuan dan kontrol positif telah berbeda signifikan terhadap kontrol negatif. Kelompok perlakuan 3 masih berada pada posisi puncak dan memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok lainnya. Pada hari ke-21, lama waktu pendarahan kelompok kontrol positif meningkat drastis dan memiliki perbedaan paling signifikan terhadap kelompok lainnya, sedangkan kelompok perlakuan 1 dan 2 menjadi tidak terlalu berbeda signifikan dengan kontrol negatif. Kelompok perlakuan 3 berada pada posisi kedua dan tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. Pada hari terakhir, semua kelompok telah berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 3 berada pada posisi puncak, disusul oleh kontrol positif pada posisi kedua, baru kemudian kelompok

Tabel 1. Rataan Waktu Pendarahan Semua Kelompok pada Hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 (dalam satuan detik)

Kelompok	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-28
Kontrol +	50,68±9,96 ^a	60,98±6,71 ^a	69,85±10,60 ^a	136,23±23,27 ^a	144,57±29,75 ^a
P-1	53,70±11,38 ^a	55,45±8,4 ^a	70,99±8,83 ^a	92,55±17,46 ^b	124,01±24,01 ^a
P-2	55,75±8,80 ^a	67,63±16,18 ^b	79,40±6,66 ^a	86,16±7,47 ^b	137,43±26,02 ^a
P-3	57,89±3,15 ^a	72,73±16,01 ^b	92,09±8,93 ^b	110,46±16,41 ^a	150,82±15,36 ^a
Kontrol -	57,37±14,99 ^a	43,60±8,14 ^a	34,70±9,28 ^c	77,14±14,46 ^b	65,80±10,89 ^b

Keterangan : Rataan waktu pendarahan ± standar deviasi (SD) (n=5). Nilai pada satu kolom yang sama diikuti huruf *superskrip* (a,b,c,d) yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata (Sig.<0,05).

perlakuan 2 dan 1. Diantara keempat kelompok ini, tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

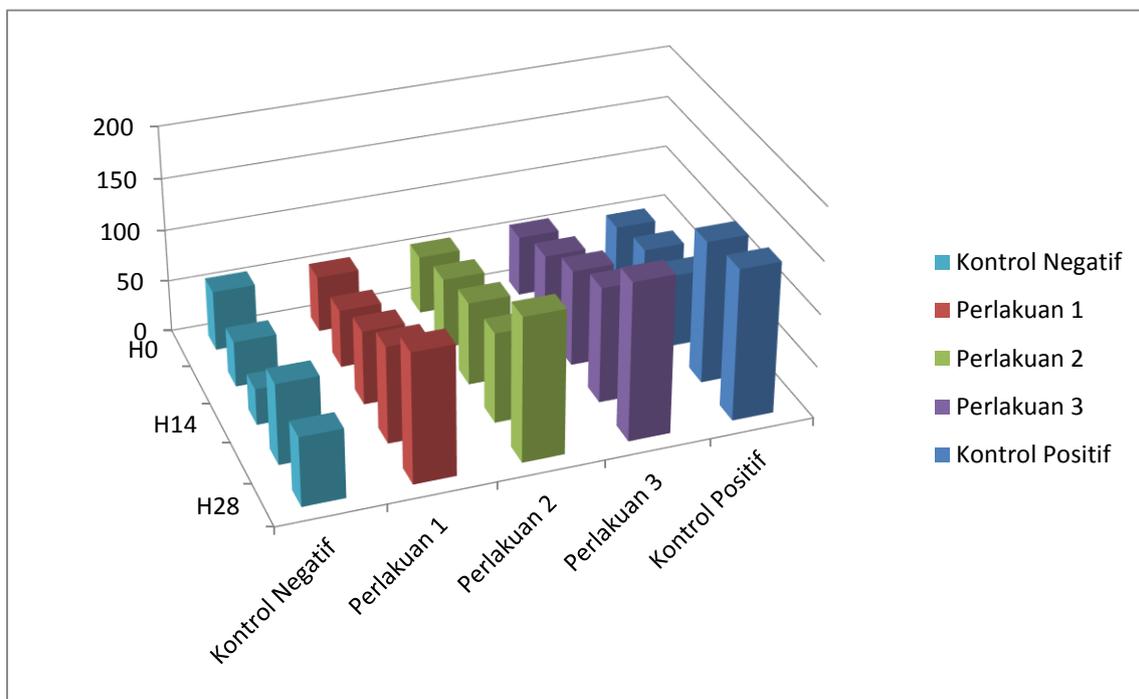
Pada penelitian ini, hasil pengujian efek antitrombosis dengan parameter waktu pendarahan pada semua kelompok perlakuan menunjukkan adanya peningkatan waktu pendarahan mencit yang cukup bermakna jika dibandingkan terhadap hari ke-0. Peningkatan waktu pendarahan terlihat terus terjadi hingga pada hari ke-28. Walaupun peningkatan waktu pendarahan ini cukup fluktuatif, pada hari terakhir pengukuran masih dapat terlihat bahwa waktu pendarahan akan terus meningkat dengan seiring meningkatnya waktu pemakaian dan dosis pemakaian. Hubungan yang sama juga terlihat terjadi pada kontrol positif namun tidak pada kontrol negatif. Walaupun kontrol negatif sempat terjadi peningkatan yang signifikan pada hari ke-21, waktu pendarahan kembali turun pada hari ke-28. Hubungan peningkatan waktu pendarahan terhadap waktu dan dosis dapat dilihat pada gambar 7.

Pada grafik peningkatan waktu pendarahan tersebut dapat terlihat bahwa lamanya pemakaian bahan uji berbanding lurus dengan meningkatnya waktu pendarahan. Selain itu, pola peningkatan waktu pendarahan antar kelompok perlakuan terlihat mirip antara satu sama lainnya. Pola ini menunjukkan

dengan meningkatnya dosis bahan uji yang digunakan akan meningkatkan lamanya waktu pendarahan.

Peningkatan lama waktu pendarahan bahan uji yaitu senyawa metil 2-asetoksibenzoat menyerupai peningkatan waktu pendarahan dengan kontrol positif atau asam asetilsalisilat yang bersifat kumulatif (semakin lamanya waktu pendarahan menyebabkan semakin lamanya waktu pendarahan). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa ini juga mampu menghambat proses hemostasis primer yang persis seperti asam asetilsalisilat, yaitu mengasetilasi enzim COX secara permanen sepanjang jangka hidup trombosit. Adanya perbedaan peningkatan waktu pendarahan antara perlakuan dengan kontrol positif terlihat pada hari ke-21. Perbedaan pola peningkatan waktu pendarahan ini masih belum diketahui.

Parameter yang diukur selanjutnya adalah waktu koagulasi yang menggambarkan proses hemostasis sekunder. Berdasarkan hasil analisis kemaknaan, terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan waktu koagulasi yang bermakna pada semua kelompok ketika sebelum diberi perlakuan. Perbedaan waktu koagulasi yang bermakna mulai terjadi ketika semua kelompok telah diberi perlakuan yaitu pada hari ke-7, 14, 21 dan 28. Hal ini menunjukkan bahwa dengan diberikannya



Gambar 7. Grafik Peningkatan Waktu Pendarahan

perlakuan, semua kelompok uji mengalami perubahan lama waktu koagulasi. Jadi, telah diketahui bahwa perlakuan yang diberikan pada hewan uji telah mengubah lamanya waktu koagulasi sehingga waktu koagulasi dari setiap kelompok perlakuan berbeda antara satu sama lainnya. Data ringkas hasil penelitian dapat dilihat pada tabel 2.

ke-14, kelompok perlakuan 1 tampak memiliki lama waktu koagulasi yang sama dengan kontrol negatif, sedangkan kelompok perlakuan 2 tampak tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif. Kelompok perlakuan 3 memiliki perbedaan yang signifikan dengan keempat kelompok lainnya. Pada hari ke-21, kelompok perlakuan 2 tampak berbeda

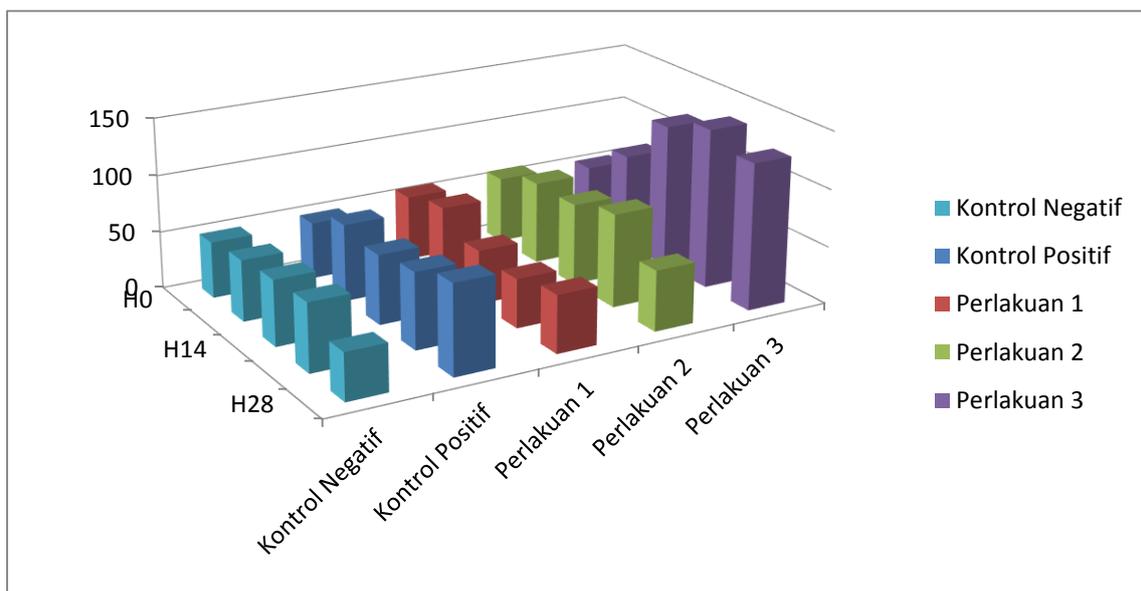
Tabel 2. Rataan Waktu Koagulasi Semua Kelompok Pada Hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 (dalam satuan detik)

Kelompok	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21	Hari ke-28
Kontrol +	49,34±14,57 ^a	67,11±6,22 ^a	60,82±5,40 ^a	66,56±9,27 ^a	78,27±11,65 ^a
P-1	56,75±12,07 ^a	65,50±9,77 ^a	47,09±9,63 ^b	42,79±4,46 ^b	50,24±8,89 ^b
P-2	58,07±14,28 ^a	71,70±7,33 ^b	70,92±13,08 ^a	81,31±12,33 ^c	52,85±7,87 ^b
P-3	52,98±14,21 ^a	81,11±14,77 ^b	125,14±12,57 ^c	139,22±11,93 ^d	127,77±12,43 ^c
Kontrol -	49,17±7,84 ^a	53,50±13,67 ^a	57,36±8,61 ^b	59,71±12,86 ^a	41,06±11,00 ^b

Keterangan : Rataan waktu pendarahan ± standar deviasi (SD) (n=5). Nilai pada satu kolom yang sama diikuti huruf *superskrip* (a,b,c,d) yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata (Sig.<0,05).

Pada hasil uji tersebut ditemukan bahwa pada hari ke-7, kelompok perlakuan 2 dan 3 yang memiliki perbedaan paling signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Kelompok perlakuan 3 berada pada posisi puncak dan paling berbeda dengan yang lainnya. Pada hari

signifikan dengan kelompok perlakuan 1, sedangkan kelompok kontrol negatif berada diantaranya. Kelompok perlakuan 2 juga tidak tampak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif. Sementara itu, kelompok perlakuan 3 mengalami lonjakan lama waktu



Gambar 8. Grafik Peningkatan Waktu Koagulasi

koagulasi dan memiliki perbedaan yang signifikan dengan semua kelompok. Pada hari terakhir, kelompok perlakuan 2 tampak mengalami penurunan dan menjadi tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan 1 dan kontrol negatif. Kelompok kontrol positif masih cenderung meningkat dan berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif, perlakuan 1 dan 2, namun masih belum menyetarai kelompok perlakuan 3. Kelompok perlakuan 3 masih tetap tertinggi dan berbeda signifikan dengan kelompok lainnya.

Menurut hasil penelitian, sebagian besar kelompok hasil pengujian menunjukkan bahwa peningkatan waktu koagulasi menciut cenderung tidak teratur setelah pemberian bahan uji metil 2-asetoksibenzoat selama 28 hari (Tabel 2). Pada kelompok perlakuan 1, data tampak cenderung menurun yang mengindikasikan bahwa pada dosis ini tidak memiliki efek meningkatkan lama waktu koagulasi. Pada kelompok perlakuan 2, data tampak ada sedikit peningkatan yang bersifat fluktuatif (mirip kontrol positif) namun tidak lebih baik daripada data kelompok perlakuan 3. Hal ini menunjukkan efek penghambatan hemostasis sekunder mulai terjadi pada dosis perlakuan 2 yaitu 32 mg/kg BB. Efek penghambatan tampak meningkat lebih baik pada dosis perlakuan 3, yaitu 64 mg/kg BB. Hubungan peningkatan waktu koagulasi terhadap waktu dan dosis dapat dilihat pada gambar 8.

Dari data grafik yang terlihat pada gambar 8, tampak bahwa sebagian besar data menunjukkan nilai yang saling berdekatan. Peningkatan waktu koagulasi ini tidak sebaik peningkatan waktu pendarahan seperti yang ditampilkan pada gambar 7. Secara teoritis, asam asetilsalisilat memang cenderung untuk menghambat proses hemostasis primer daripada proses hemostasis sekunder karena mekanisme kerjanya yaitu dengan mengasetilasi sisi aktif serin-530 dari enzim siklooksigenase secara ireversibel sehingga tidak terbentuk tromboksan A_2 di dalam trombosit dan prostasiklin (PGI_2) di pembuluh darah (Dewoto, 2007). Pada penelitian ini, tampaknya senyawa metil 2-asetoksibenzoat juga memiliki kecenderungan yang seperti asam asetilsalisilat yaitu lebih mempengaruhi hemostasis primer dibandingkan hemostasis sekunder. Walaupun demikian, pada dosis yang lebih besar (kelompok perlakuan 3), tampak bahwa senyawa ini juga mampu menghambat proses hemostasis sekunder dengan cukup baik.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa metil 2-asetoksibenzoat dapat disintesis dari minyak gandapura melalui asetilasi, dengan persentase hasil sebesar 80,928%. Senyawa ini juga memiliki efek antitrombosis yang berbanding lurus dengan besarnya dosis dan lama waktu pemakaiannya.

Daftar Pustaka

- Boghosian, M. P., dan Koda, R. T. 1981. Medical Use Of Esters Of Acetylsalicylic Acid to Treat Acne. *United States Patent*. Patent No. 4,244,948.
- Dewoto, H. R. 2007. *Antikoagulan, Antitrombotik, Trombolitik dan Hemostatik*. Dalam Gunawan. Farmakologi dan Terapi. Edisi ke-5. Jakarta: Percetakan Gaya Baru.
- Diyah, N. W. 1998. *Hubungan Struktur dan Aktivitas Antiinflamasi Turunan Asam Salisilat*. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Gerber, M. 2003. *Synthesis and Transdermal of Acetylsalicylic Acid and Derivatives*. Potchefstroom: Faculty of Health Science, School of Pharmacy (Pharmaceutical Chemistry). (Desertasi)
- Katzung, B. G., Masters, S., dan Trevor, A. 2009. Basic and Clinical Pharmacology. 11th Ed. San Francisco: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Lullman, H., Ziegler, A., Mohr, K., dan Bieger, D. 2000. *Color Atlas of Pharmacology*. Edisi ke-2. New York: Thieme. Stuttgart.
- Majerus, P. W., dan Tollefsen, D. M. 2006. Blood Coagulation and Anticoagulant, Thrombolytic, and Antiplatelet Drugs. Dalam Brunton, L. L. (Editor). *Goodman dan Gilman's: The Pharmacological Basis Therapeutics*. Edisi ke-11. New York: Mc Graw Hill.
- Piovella, F., Wang, C. J., Lu, H., Lee, K., Lee, L. H., Lee, W. C., Turpie, A. G. G., Gallus, A. S., Planès, A., Passera, R., dan Rouillon, A. 2005. Deep-vein thrombosis rates after major orthopedic surgery in Asia. An epidemiological study based on postoperative screening with centrally adjudicated bilateral venography. *J Thromb Haemost*. **3**: 2664 – 2670.
- Mukhrizal. 2013. Sintesis Metil 2-asetoksibenzoat dari Minyak Gandapura dan Uji Aktivitasnya sebagai Senyawa Analgesik. Pontianak: Universitas Tanjungpura. (Skripsi).
- Solomons, T. W. G., dan Fryhle, C. B. 2008. *Organic Chemistry*. Edisi ke-9. New York: John Wiley & Sons.
- Sukandar, E. Y., Sigit, J. I., dan Fitriyani, N. 2008. Efek Antiagregasi Platelet Ekstrak Air Bulbus Bawang Putih (*Allium Sativum* L.), Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) Dan Kombinasinya Pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster. *Majalah Farmasi Indonesia*. **19**(1): 1 – 11.
- Stuart, B. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Vogel, H. G. 2002. *Drug Discovery and Evaluation : Pharmacological Assays*. Edisi Ke-2. Berlin: Springer.
- Wilmana, P. F., dan Gunawan, S. G. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.