

# Sintesis O-(Isoleusil) Parasetamol dan Uji Aktivitas Analgesik terhadap Mencit (*Mus musculus*) dengan Metode *Hot Plate*

Ida Ayu Andri Parwitha<sup>(a)\*</sup>, Siswandono<sup>(b)</sup>

<sup>(a)</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Surabaya, Indonesia

<sup>(b)</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Parasetamol merupakan obat analgesik lini pertama yang digunakan dalam tata laksana nyeri. Penggunaan obat tersebut dalam jangka waktu panjang dengan dosis besar berpotensi memunculkan efek samping hepatotoksik. Guna meminimalkan efek samping dan meningkatkan aktivitas analgesik dari Parasetamol maka dilakukan modifikasi struktur -OH pada gugus parasetamol. Tujuan dari penelitian ini adalah mensintesis senyawa O-(isoleusil) parasetamol melalui reaksi *Schotten Baumann* antara Parasetamol dan Isoleusil klorida. Senyawa sintesis tersebut diuji aktivitas analgesiknya pada Mencit. Pemurnian senyawa hasil sintesis melalui proses rekristalisasi menggunakan campuran pelarut etanol:air (1:2) dan diperoleh senyawa berbentuk serbuk berbau menyengat dengan rendemen hasil 32%. Setelah senyawa terbukti murni maka dilanjutkan dengan identifikasi struktur senyawa menggunakan spektrofotometer inframerah dan spektrometer <sup>1</sup>H-NMR. Hasil uji menunjukkan bahwa senyawa hasil sintesis sesuai yang diharapkan. Pengujian aktivitas analgesik senyawa dilaksanakan pada Mencit (*Mus musculus*) dengan metode *hot plate*. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kg BB diberikan secara intraperitoneal dan parasetamol dengan dosis sama sebagai senyawa pembanding. Hasil penelitian menunjukkan nilai ED<sub>50</sub> O-(isoleusil) parasetamol 50 mg/kg BB dan ED<sub>50</sub> parasetamol adalah 66 mg/kg BB. Berdasarkan nilai ED<sub>50</sub> dapat disimpulkan bahwa O-(isoleusil) parasetamol memiliki aktivitas analgesik yang lebih tinggi dibanding parasetamol. Hasil uji statistik Tukey HSD menunjukkan bahwa aktivitas analgesik parasetamol dan O-(isoleusil) parasetamol tidak berbeda bermakna.

**Kata Kunci:** O-(isoleusil) parasetamol; analgesik; tionil klorida

## Synthesis of O-(Isoleucyl) Paracetamol and Analgesic Activity Assay using Hot Plate Method in Mice (*Mus Musculus*)

Paracetamol is a first-line analgesic drug used in pain management. The use of these drugs in the long term with larger doses has the potential to cause hepatotoxic side effects. The purpose of this study is to synthesize the O-(isoleucyl) paracetamol through the Schotten Baumann reaction. Purification of the compound was carried out through the recrystallization process using a mixture of ethanol: water (1: 2) solvent, and a pungent odor-shaped compound with a yield of 32%. The identification of the structure of the compound was using an infrared spectrophotometer and a <sup>1</sup>H-NMR spectrometer. The test results showed that the compound synthesized as expected. The analgesic activity of compounds was tested on mice (*Mus musculus*) using the hot plate method. The dose used in this study was 12.5; 25; 50; 100; 200 mg/kg body weight given intraperitoneally, with paracetamol as control positive. The value of ED<sub>50</sub> O- (isoleucyl) paracetamol 50 mg/kg BW and ED<sub>50</sub> paracetamol is 66 mg/kg BW. Based on ED<sub>50</sub> values, it can be concluded that O- (isoleucyl) paracetamol has higher analgesic activity than paracetamol. Tukey HSD statistical test results showed that the analgesic activity of paracetamol and O- (isoleucyl) paracetamol were not significantly different.

**Keyword:** O-(isoleucyl) paracetamol; analgesic; thionyl chloride

---

\*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1 Surabaya, e-mail: idaayu@ukwms.ac.id

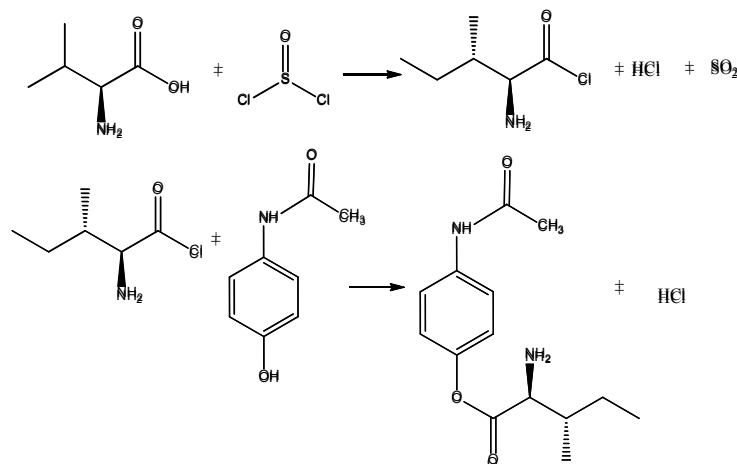
---

## PENDAHULUAN

Analgesik merupakan senyawa yang mampu menekan fungsi sistem saraf pusat maupun perifer secara selektif untuk mengatasi rasa nyeri tanpa mempengaruhi kesadaran dari pasien. Nyeri sendiri merupakan suatu perasaan sensoris dan subjektif yang umumnya berkaitan dengan kerusakan jaringan pada tubuh dan berfungsi sebagai pelindung juga penanda adanya gangguan di jaringan (Marie *et al.*, 2016). Parasetamol merupakan obat turunan para aminofenol yang luas digunakan oleh masyarakat Indonesia saat ini sebagai obat analgesik dan antipiretik. Dalam tata laksana nyeri seperti pada penyakit Osteoarthritis dan nyeri ringan lainnya merekomendasikan parasetamol sebagai analgesik pilihan pertama. Pada beberapa penyakit, terapi pereda nyeri dengan menggunakan obat analgesik dilaksanakan dalam jangka waktu yang panjang dan dosis besar. Pada dosis normal parasetamol relatif aman untuk digunakan, akan tetapi pada dosis lebih dari 4 gram per hari dan secara kronik berpotensi menimbulkan efek samping serius seperti hepatotoksik (Marie *et al.*, 2016; Jesse *et al.* 2017). Secara normal, parasetamol akan mengalami konjugasi oleh asam glukoronat dan sulfat membentuk metabolit utama dari parasetamol dan kemudian diekskresikan melalui urin. Sebagian kecil dari parasetamol juga akan mengalami proses oksidasi oleh enzim Cyp2E1 dan Cyp1A2 untuk membentuk metabolit reaktif N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI). Metabolit minor ini apabila dalam jumlah kecil tidak berbahaya bagi tubuh dan diekskresi melalui empedu. Penggunaan Parasetamol dalam dosis lebih dari 4 gram per hari dan secara kronik menyebabkan akumulasi NAPQI (Clark *et al.*, 2012). Mekanisme hepatotoksik dari Parasetamol muncul akibat adanya ikatan kovalen antara makromolekul hati dengan senyawa NAPQI sehingga secara perlahan sel hepatosit menjadi nekrosis (Ramachandran dan Jaeschke, 2017). Modifikasi struktur obat turunan para aminofenol telah dilaksanakan sejak lama, salah

satunya adalah Fenetsal yang merupakan hasil esterifikasi asam salisilat dengan parasetamol. Fenetsal terbukti memiliki aktivitas analgesik yang lebih besar dibandingkan parasetamol karena bersifat lebih lipofilik sehingga penetrasi membran biologis menjadi meningkat. Selain peningkatan efek analgesik, fenetsal juga memiliki toksisitas yang lebih rendah dikarenakan adanya tambahan gugus ester dapat meminimalkan proses pembentukan ion imidokuinon sehingga efek samping hepatotoksik menjadi lebih rendah (Siswandono, 2016).

Berdasarkan dari penelitian di atas, maka penting untuk dilaksanakan sintesis senyawa turunan parasetamol dengan aktivitas lebih optimal dan efek samping minimal. Tujuan dari penelitian ini adalah mensintesis senyawa O-(isoleusil) parasetamol melalui reaksi *Schotten Baumann* antara Parasetamol dan Isoleusil klorida. Senyawa sintesis tersebut diuji aktivitas analgesiknya pada Mencit dan diharapkan memiliki efek analgesik yang lebih tinggi dibandingkan parasetamol. Proses modifikasi struktur parasetamol menjadi senyawa turunannya yaitu O-(isoleusil) parasetamol dilaksanakan melalui reaksi *Schotten Baumann* dengan mereaksikan parasetamol dan isoleusil klorida (Gambar 1). Penambahan gugus isoleusil mengakibatkan senyawa turunan parasetamol menjadi lebih lipofilik karena adanya penambahan gugus  $-CH_3$  (Siswandono, 2016). Pembentukan ester dengan isoleusil klorida diharapkan dapat meminimalkan proses pembentukan NAPQI karena adanya faktor sterik sehingga senyawa baru tersebut memiliki aktivitas analgesik yang lebih tinggi dengan efek samping lebih rendah. Isoleusin merupakan salah satu asam amino esensial yang dapat membantu regenerasi sel hepatosit yang rusak akibat dari pemakaian parasetamol dalam dosis tinggi dan jangka panjang. Senyawa O-(isoleusil) parasetamol di uji aktivitas analgesik dengan menggunakan metode *hot plate* dan dibandingkan dengan aktivitas analgesik dari Parasetamol.



**Gambar 1.** Reaksi Kimia Pembentukan Senyawa O-(isoleusil) parasetamol

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah parasetamol *pharmaceutical grade* (Brataco, Indonesia), l-isoleusin *p.s* (Merck, Jerman), Tionil klorida *p.s* (Merck, Jerman), dan Etanol *p.a* (Merck, Jerman). Penentuan titik leleh menggunakan *Electrothermal Melting Point Apparatus* Buchi B-540. Penentuan spektra <sup>1</sup>H-NMR dengan alat FT-NMR Hitachi R-1900 90 MHz dalam pelarut CDCl<sub>3</sub>; sebagai standar internal dipakai tetrametilsilan (TMS). Penentuan spektra inframerah (IR) dengan alat spektrofotometer IR Shimadzu FTIR Jasco 5300. Kemurnian senyawa diuji secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan beberapa jenis eluen yang berbeda kepolarannya. Pengujian aktivitas analgesik dilaksanakan dengan menggunakan alat *Ugo Basile Plantar Test*.

### Sintesis Senyawa O-(isoleusil) parasetamol

Proses sintesis senyawa dilaksanakan melalui dua tahapan:

#### Tahap 1

Senyawa isoleusil klorida disintesis dengan mereaksikan isoleusin dengan tionil klorida (SOCl<sub>2</sub>). Masukan 4,59 gram isoleusin (0,035 mol) ke dalam labu alas bulat kemudian dilarutkan dengan 50 ml aseton. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 3 ml tionil klorida dalam lemari asam, dan refluks selama 1 jam (Zuffanti, 1948; Li dan Sha, 2008).

#### Tahap 2

Senyawa O-(isoleusil) parasetamol disintesis dengan mereaksikan isoleusil klorida dengan parasetamol berdasarkan reaksi *Schotten Baumann*. Timbang 4,53 gram parasetamol (0,030 mol) kemudian larutkan dengan 30 ml aseton dan campurkan dengan hasil refluks isoleusil klorida. Campuran parasetamol dan isoleusin klorida kemudian direfluks selama 3 jam. Setiap jam campuran diuji dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) (fase diam: silika gel F254, fase gerak: *n*-heksana : etil asetat (6:4)). Refluks dihentikan bila noda parasetamol telah hilang. Tambahkan 40 ml akuadest kedalam hasil refluks hingga terbentuk endapan. Saring endapan dengan menggunakan corong Buchner dan bilas dengan 25 ml akuadest sebanyak 2 kali. Proses rekristalisasi dilakukan untuk pemurnian senyawa hasil sintesis. Endapan yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan menggunakan pelarut campuran etanol:air (1:2). Endapan yang terbentuk kemudian disaring dengan menggunakan corong *buchner* dan dikeringkan pada oven suhu 70°C selama 1 jam.

### Penyiapan Hewan Coba

Digunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) galur Swiss Webster, jantan, umur 2-3

bulan, berat badan 20-30 gram, sehat, dan tidak ada kelainan yang tampak pada bagian tubuh. Sebelum diberi perlakuan pada mencit, dilakukan adaptasi dengan lingkungannya selama 1 minggu dan diberi pakan pellet standar serta minum *ad libitum*. Kandang mencit diletakkan di Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Widya Mandala Surabaya. Ruangan pemeliharaan dijaga pada suhu 22°C (± 2°C) dengan kelembapan (Rh) 55 – 70%. Penerangan akan disesuaikan mengikuti siklus siang dan malam pada hewan rodent (12 jam terang dan 12 jam gelap). Prosedur uji dan pemeliharaan hewan coba telah dinyatakan layak etik oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran UGM *Medical and Health Research Ethics Committee* (MHREC) No. KE/FK/0315/EC/2020.

Disiapkan 55 ekor mencit jantan kemudian dibagi secara acak menjadi 3 kelompok. Kelompok pertama atau kelompok uji diberi senyawa uji O-(isoleusil) parasetamol (12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kg BB) per dosis 5 ekor mencit. Kelompok kedua atau kelompok pembanding diberi senyawa parasetamol (12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kgBB) per dosis 5 ekor mencit. Kelompok ketiga atau kontrol diberi larutan *water for injection* sebanyak 5 ekor mencit.

### Uji Aktivitas Analgesik

Mencit diletakkan dalam wadah *hot plate* untuk beradaptasi selama 5 menit, setelah terlihat tenang dan tidak banyak bergerak maka sinari telapak kaki Mencit dengan cahaya inframerah. Catat waktu yang diperlukan hingga Mencit mengangkat atau menjilat kakinya sebagai waktu respon awal. Ambil Mencit dari *hot plate* dan berikan sediaan uji melalui rute *intraperitoneal*. Letakkan kembali ke wadah *hot plate* lalu sinari dengan cahaya inframerah pada telapak kaki mencit sebelah kiri. Stimulasi panas diberikan pada rentang waktu 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 dan 120 menit. Amati waktu yang dibutuhkan oleh mencit untuk merespon stimulasi panas.

### Analisa Data

Data pengamatan hasil uji aktivitas analgesik berupa waktu respons Mencit diuji menggunakan ANOVA satu arah pada α = 0,05. Analisa data dilanjutkan dengan pengujian *Tukey HSD* 5% untuk mengetahui kelompok dosis 12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kgBB yang memberikan perbedaan bermakna.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

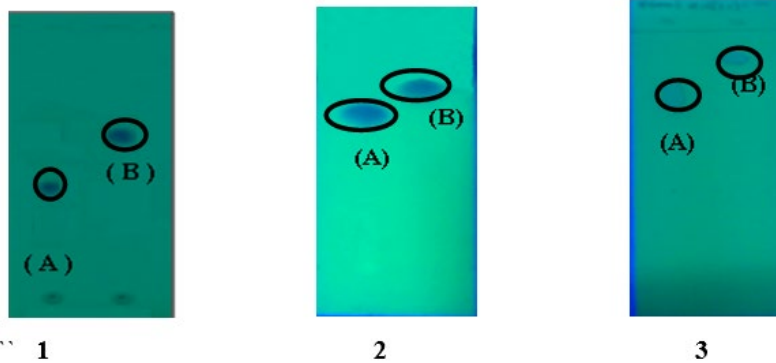
Pada uji organoleptis, senyawa hasil sintesis yang didapatkan adalah berbentuk serbuk, berwarna cokelat, berbau menyengat, tidak larut dalam air, larut dalam aseton maupun etil asetat. Warna cokelat berasal dari reaksi pembentukan halide asam yaitu antara isoleusin dengan tionil klorida. Perbedaan organoleptis antara senyawa hasil sintesis dengan parasetamol menandakan bahwa telah terjadi perubahan struktur dari se-

nyawa asal. Uji kemurnian senyawa hasil sintesis dilaksanakan dengan penentuan harga Rf (*Retardation Factor*). Hasil pemeriksaan KLT (Tabel 1 dan Gambar 2) pada 3 fase gerak yang berbeda kepolaran menunjukkan noda tunggal dan harga Rf lebih besar dibandingkan parasetamol pada fase gerak polar, semi polar, dan non polar. Berdasarkan dari hasil uji KLT dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis murni dan layak untuk dilaksanakan identifikasi struktur senyawa menggunakan spektrofotometer inframerah dan resonansi magnet inti. Dari spektra inframerah senyawa hasil sintesis (Gambar 3) dapat dibuktikan bahwa senyawa hasil sintesis bukan parasetamol, karena pada spektra inframerah senyawa hasil sintesis tidak ditemukan puncak OH fenolat pada 3325 cm<sup>-1</sup>, gugus -OH pada parasetamol telah tersubstitusi membentuk ester parasetamol yang dibuktikan dengan munculnya puncak pada 1735 cm<sup>-1</sup> yang merupakan C-O ester (Silverstein *et al.*, 2005; Pavia *et al.*, 2009). Pengujian struktur senyawa yang kedua dengan menggunakan spektrofotometer <sup>1</sup>H-NMR bertujuan untuk mengetahui jumlah atom H yang terdapat pada senyawa uji. Uji identifikasi ini menggunakan pelarut DMSO D<sub>6</sub>. Hasil identifikasi menunjukkan senyawa hasil sintesis

memiliki atom H yang lebih banyak dengan jumlah total atom H adalah 20 (Gambar 4). Hasil analisis spektra <sup>1</sup>H-NMR menunjukkan bahwa puncak -OH telah hilang dan terdapat penambahan puncak-puncak H dari gugus -NH<sub>2</sub> (8,43 ppm), -CH<sub>3</sub> (1,23 ppm), dan 2 gugus H (2,16 dan 3,76 ppm) (Pavia *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan, bahwa telah terbentuk senyawa ester dengan gugus isoleusil, sebagai hasil reaksi dari parasetamol dan isoleusil klorida. Berdasarkan dari hasil identifikasi struktur senyawa dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis adalah O-(isoleusil) parasetamol (Gambar 5).

**Tabel 1.** Nilai Rf Hasil Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis O-(isoleusil) parasetamol dan Parasetamol

Fase Gerak	Nilai Rf	
	Parasetamol	O-(isoleusil) parasetamol
Etil asetat : aseton (4:6)	0,42	0,54
n-heksana: kloroform: etanol (3:2:5)	0,57	0,60
n-heksana:etil asetat (6:4)	0,58	0,73



**Gambar 2.** Hasil Kromatografi Lapis Tipis

Keterangan gambar:

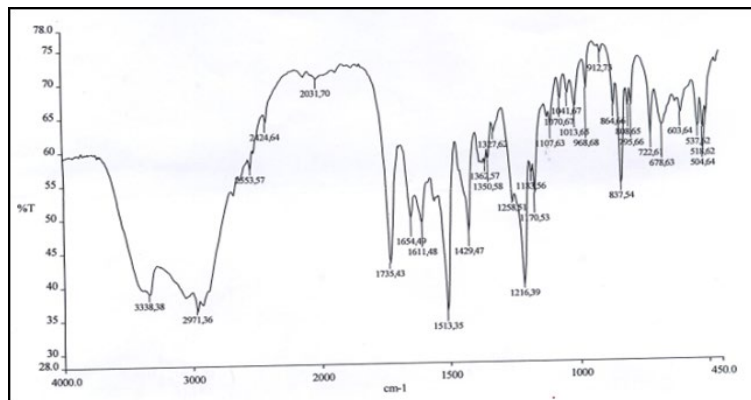
A. Parasetamol

B. Senyawa Hasil Sintesis

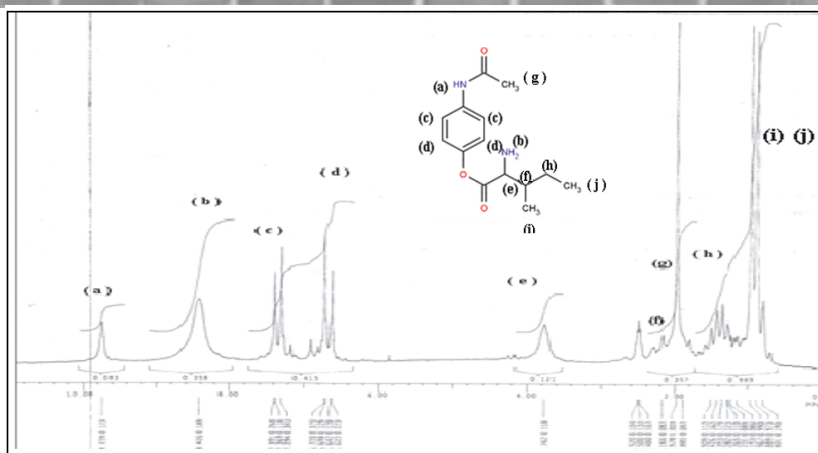
1. Fase diam: Silika Gel F<sub>254</sub>; Fase gerak: etil asetat : aseton (4:6).

2. Fase diam: Silika Gel F<sub>254</sub>; Fase gerak: n- heksana : kloroform : etanol (3:2:5)

3. Fase diam: Silika Gel F<sub>254</sub>; Fase gerak: n- heksana : etil asetat (6:4).



**Gambar 3.** Spektra Inframerah O-(isoleusil) parasetamol

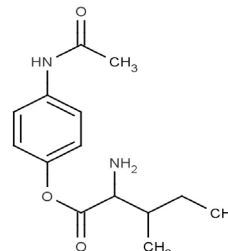


**Gambar 4.** Spektre <sup>1</sup>H-NMR O-(isoleusil) parasetamol

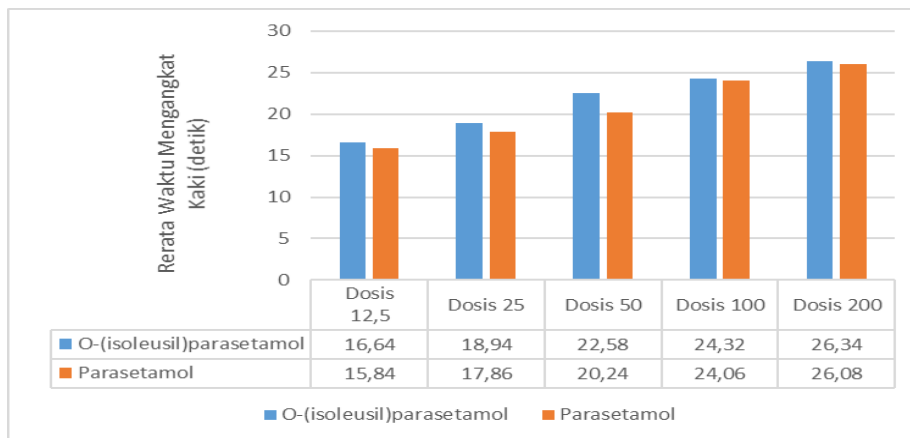
Aktivitas analgesik dilaksanakan dengan menggunakan metode *hot plate* dengan dosis baik untuk senyawa uji maupun pembanding adalah 12,5; 25; 50; 100; 200 mg/kg BB. Berdasarkan data yang didapat, peningkatan dosis parasetamol dan O-(isoleusil) parasetamol 12,5 – 200 mg/kg BB disertai dengan peningkatan waktu respon mencit terhadap stimulasi panas. Pada senyawa O-(isoleusil) parasetamol rata-rata waktu respon mencit terhadap stimulasi panas lebih tinggi di semua dosis dibandingkan dengan waktu respon rata-rata kelompok parasetamol, sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas analgesik O-(isoleusil) parasetamol lebih besar dibandingkan parasetamol (Gambar 6). Berdasarkan dari uji Tukey HSD 5% menunjukkan bahwa aktivitas analgesik antara kedua senyawa tidak memiliki perbedaan yang bermakna di seluruh kelompok dosis. Hal ini disebabkan karena, pembentukan gugus ester pada senyawa O-(isoleusil) parasetamol memang benar dapat meningkatkan aktivitas analgesik, yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan waktu respon mencit terhadap stimulasi panas disetiap dosis apabila dibandingkan dengan parasetamol, tetapi peningkatan aktivitas analgesik tersebut juga diikuti dengan peningkatan efek halangan ruang oleh karena

adanya ester pada gugus –OH parasetamol tersebut.

Nilai ED<sub>50</sub> senyawa O-(isoleusil) parasetamol lebih rendah (59 mg/kgBB) dibandingkan dengan parasetamol (66 mg/kgBB) yang dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis memiliki aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan parasetamol. Meskipun nilai ED<sub>50</sub> O-(isoleusil) parasetamol lebih rendah dibanding parasetamol, tetapi berdasarkan perhitungan statistik dengan uji Tukey HSD 5% menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas analgesik O-(isoleusil) parasetamol dengan parasetamol akibat adanya efek halangan sterik.



**Gambar 5.** Struktur Senyawa O-(isoleusil) parasetamol



**Gambar 6.** Grafik Rerata Waktu Respon Mencit Pada Kelompok Kontrol, Senyawa Uji, dan Senyawa Pembanding

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas maka dapat disimpulkan bahwa senyawa turunan parasetamol yaitu O-(isoleusil) parasetamol dapat di-

sintesis melalui reaksi asilasi antara parasetamol dan isoleusil klorida. Senyawa turunan tersebut memiliki aktivitas analgesik yang sebanding dengan parasetamol.

## DAFTAR PUSTAKA

Clark, R., Fisher, JE., Sketris, IS, Johnston, GM. 2012. Population prevalence of high dose paracetamol in dispensed paracetamol/opioid prescription combinations: an observational study, *BMC Clin Pharmacol.* 12: 11. Published 2012 Jun 18. doi:10.1186/1472-6904-12-11.

Jesse, C., Victor, N., Steven, H., Jeffrey, R., Paul, A., Simona, R. 2017. Patterns of Acetaminophen Use Exceeding 4 Grams Daily in a Hospitalized Population at a Tertiary Care Center, *Gastroenterology and Hepatology.* 10(1): 27 – 34.

Li, J. dan Sha Y. 2008. A convenient synthesis of amino acid methyl esters, *Molecules.* 13(5):1111-1119. doi:10.3390/molecules13051111.

Marrie, ACB., Terry, LS., Barbara, GW., Patrick, MM., Jill, MK. dan Joseph, TD. 2016. *Pharmacotherapy Principles & Practice*, 4th ed, New York: McGraw-Hill Medical. pp 521 – 522.

Pavia, DL., Lampman, GM., Kriz, GZ., Vyvyan, JR. 2009. *Introduction to Spectroscopy*, 4<sup>th</sup> ed, America: Belmont, pp 185 – 190.

Ramachandran, A. dan Jaeschke, H. 2017. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology, *Journal of Clinical and Translational Research.* 3(S1): 157 – 169.

Silverstein, RM., Wehrer, FX., Kiemle, DJ. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7<sup>th</sup> ed, America: John Wiley & Sons, Ltd, pp 198 – 200.

Siswandono, S 2016, *Kimia Medisinal*, 2<sup>nd</sup> ed. Surabaya: Airlangga University Press, pp 344 – 345.

Zuffanti, S 1948, Preparation of acyl chloride with thionyl chloride. *Journal of Chemical Education.* 25(9): 481.