

Toksisitas dan Anti-inflamasi Senyawa 1,5-Bis(3'-Etoksi-4'-Hidroksifenil)-1,4- Pentadien-3-on (EHP)

(Toxicity and Antiinflammatory Effect of 1,5-Bis(3'-Ethoxy-4'-Hydroxyphenyl)-1,4- Pentadiene-3-One (EHP))

ESTI MUMPUNI^{1*}, LESTARI RAHAYU¹, ARIEF NUROCHMAD²

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640.

²Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta.

Diterima 15 Juli 2014, Disetujui 5 Maret 2015

Abstrak: Senyawa 1,5-bis(3'-etoksi-4'-hidroksifenil)-1,4-pentadien-3-on (EHP) adalah senyawa analog kurkumin, telah disintesis sebelumnya dengan metode kondensasi aldol dan terbukti mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada kurkumin. Telah dilakukan uji keamanan bahan calon obat meliputi uji toksisitas (LD₅₀) dengan metode Weil C.S. dan uji aktivitas antiinflamasi secara *in vivo*. Nilai LD₅₀ dari senyawa EHP adalah sebesar 6,8675 g/kg BB dengan kriteria toksik ringan sehingga cukup aman sebagai calon bahan obat. Aktivitas anti-inflamasi senyawa EHP dianalisis dengan mengukur derajat bengkak pada kaki tikus. Hasil uji efek anti-inflamasi EHP dosis 137,35 mg, 274,70 mg dan 549,40 mg sama dengan aspirin 90 mg/200 g BB.

Kata kunci: toksisitas, anti-inflamasi, EHP.

Abstract: The 1,5-bis(3'-ethoxy-4'-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene -3-one (EHP) is a curcumin analogue. The structure has also been identified before. EHP is obtained, which has been pharmacologically proven to have higher antioxidant activity than curcumin. The objectives of this research were to determine the acute toxicity (LD₅₀) of EHP compound by Weil C.S. method using male mice as experimental animals and to determine its antiinflammatory activity. The LD₅₀ value of the synthesized EHP compound is 6,8675 g/kg body weight (bw) with the criteria of mild toxic, so it is assumed to be safe as drug substance candidate. The anti-inflammatory activity of the compound was determined by observed legs swelling index of the mouse. Anti-inflammatory activity of EHP with doses of 137.35 mg, 274.70 mg and 549.40 mg were equal to aspirin with the dose of 90 mg/200 g bw.

Keywords: toxicity, anti-inflammatory, EHP.

PENDAHULUAN

KURKUMIN diketahui memiliki beberapa aktifitas farmakologi, antara lain: antioksidan, anti-inflamasi, antikarsinogenik dan antibakteri. Karena aktivitas tersebut, maka kurkumin dijadikan sebagai senyawa penuntun pada penemuan senyawa obat baru yang lebih poten^(1,2). Senyawa 1,5-bis(3'-etoksi-4'-

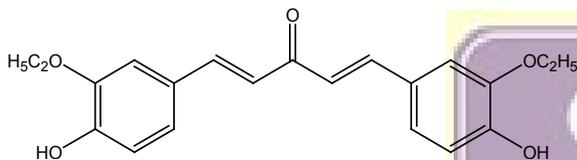
hidroksifenil)-1,4-pentadien-3-on (EHP) adalah salah satu senyawa baru hasil sintesis dengan struktur dasar kurkumin. Pada penelitian terdahulu telah dilakukan sintesis, karakterisasi dan uji antioksidan senyawa tersebut⁽³⁾.

Senyawa EHP (Gambar 1) dapat disintesis dengan bahan baku aseton dan etil vanilin dengan katalis asam klorida atau kalium hidroksida baik suhu dingin maupun suhu kamar dengan reaksi kondensasi aldol. Dari proses ini diperoleh rendemen 20-44%. Senyawa ini juga telah dikarakterisasi dengan

* Penulis korespondensi, Hp. 08151663201
e-mail: esti_mumpuni@yahoo.com

berbagai instrumen dan dielusidasi strukturnya. Seperti kurkumin, senyawa ini telah diuji aktivitas antioksidannya dengan hasil antioksidan lebih tinggi daripada kurkumin, juga inhibisi terhadap enzim siklooksigenase (COX-2) dan lipooksigenase (LOX-5) secara *in silico*^(4,5). Enzim siklooksigenase dan lipooksigenase adalah enzim yang berperan pada metabolisme asam arakidonat menjadi leukotrien dan prostaglandin yang menyebabkan inflamasi^(4,5).

Mengacu pada aktivitas kurkuminoid dan berdasarkan hasil penelitian *in silico* senyawa EHP yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya diharapkan senyawa ini potensial untuk dikembangkan sebagai calon obat. Pada penelitian ini akan dilakukan uji keamanan dan aktivitas senyawa EHP meliputi uji toksisitas (LD_{50}) dan uji aktivitas anti-inflamasi secara *in vivo*. Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh senyawa calon obat anti-inflamasi turunan kurkumin.



Gambar 1. Struktur senyawa 1,5-bis(3'-etoksi-4'-hidroksifenil)-1,4-pentadien-3-on (EHP).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Senyawa 1,5-bis(3'-etoksi-4'-hidroksifenil)-1,4-pentadien-3-on (EHP) yang telah dikarakterisasi sifat kimia fisiknya. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih galur DDY dengan jenis kelamin jantan, berat badan 20-25 g dan tikus putih dengan berat badan 180-200 g umur 3 bulan, 1% karagenin dalam larutan NaCl 0,9%, larutan NaCl 0,9%, antiseptik dan etanol 70%.

Alat. Timbangan hewan, timbangan analitik, *stop watch*, alat suntik dengan jarum oral dan intra plantar, alat pengukur udem kaki (pletismometer).

METODE. Uji Toksisitas (Penetapan LD_{50})⁽⁷⁾. Uji toksisitas akut (LD_{50}) senyawa dilakukan dengan metode Weil C.S^(6,7), dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba dengan jenis kelamin jantan. Pemberian zat uji dilakukan *per oral*. Perhitungan nilai LD_{50} dilakukan dengan menggunakan tabel biometrik dari Weil C.S⁽⁷⁾. Uji ini terdiri dari dua tahap percobaan, yaitu pengujian tahap I dan II.

Pengujian Toksisitas Tahap I. Disiapkan 3-4 kelompok hewan coba. Masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor mencit dengan jenis kelamin jantan dan berat badan mencit antara 20-25g. Terhadap setiap kelompok diberi senyawa uji dengan dosis kelompok yang merupakan kelipatan sepuluh

dari dosis kelompok lain secara *per oral*. Susunan kelompok uji adalah sebagai berikut: kelompok I (dosis A mg/20g bb mencit), kelompok II (dosis Ax10 mg/20g bb mencit), kelompok III (dosis Ax10x10 mg/20g bb mencit), kelompok IV (dosis Ax10x10x10 mg/20g bb mencit). Jumlah kematian dihitung setelah 24 jam. Bila setelah 24 jam tidak seekor mencit pun yang mati, maka dosis peninjagan diperbesar dengan memberikan konsentrasi sediaan yang lebih besar.

Pengujian Toksisitas Tahap II. Apabila pada dosis peninjagan salah satu kelompok mencit ada yang mati minimal dua ekor, percobaan dilanjutkan dengan jumlah kelompok sama, yaitu empat kelompok hewan coba dan masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor hewan coba. Dosis yang diberikan pada kelompok hewan coba pada penetapan nilai LD_{50} tahap II adalah berdasarkan hasil pengamatan jumlah mencit yang mati pada percobaan tahap I. Dosis terkecil untuk tahap II mendekati atau sama dengan dosis yang menimbulkan kematian minimal dua ekor pada tahap I, sedangkan dosis terbesar mendekati atau sama dengan dosis yang menimbulkan kematian lebih dari dua ekor pada percobaan tahap I. Jika pada tahap I kelompok II tidak ada yang mati dan kelompok III dan IV mati enam ekor, maka dosis terkecil pada tahap II adalah dosis kelompok II, yaitu Ax10 mg/20 g Bb mencit dan dosis terbesar adalah Ax10x10x10 mg/20 g Bb mencit. Kemudian disiapkan empat kelompok yang masing-masing terdiri dari lima ekor hewan coba, dengan susunan kelompok uji sebagai berikut: kelompok A (dosis kelompok II mg/20g bb mencit), kelompok B (dosis kelompok II x R mg/20g Bb mencit), kelompok C (dosis kelompok II x R x R mg/20g bb mencit), kelompok D (dosis kelompok II x R x R x R mg/20g bb mencit). Jumlah kematian dihitung setelah 24 jam. R merupakan anti log dari d.

Pada tahap II ini, nilai LD_{50} sudah dapat dihitung. Untuk menghitung LD_{50} dapat menggunakan tabel Weil C.S dan juga menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Log } LD_{50} = \text{Log } D + d (f+1)$$

D adalah dosis terkecil, d adalah log kelipatan dosis/jumlah kelompok - 1, f adalah faktor (dalam tabel), nilai df dicari dalam tabel⁽⁷⁾.

Rentang LD_{50} adalah sebagai berikut: batas atas $LD_{50} = \text{antilog} (\log m + 2 \delta \log m)$, batas bawah $LD_{50} = \text{antilog} (\log m - 2 \delta \log m)$, $\delta \log m = d \times \delta f$, $\delta f =$ suatu faktor dari tabel⁽⁷⁾.

Uji Efek Antiinflamasi. Induksi udem dilakukan pada kaki hewan coba yaitu tikus putih dengan suspensi karagenin secara intraplanar. Sediaan uji diberikan secara oral, 1 jam sebelum induksi udem. Ukuran kaki udem diukur dengan alat yang bekerja

berdasarkan hukum Archimedes (pletismometer). Tikus dipuaskan \pm 18 jam dari makanan sebelum pengujian, air minum tetap diberikan. Tikus dikelompokkan secara acak, kelompok kontrol negatif hanya menerima induksi karagenin, kelompok kontrol positif diberikan suspensi larutan aspirin dan kelompok perlakuan diberikan larutan uji dengan 3 tingkatan dosis. Volume pemberian sediaan uji sebesar 1 mL/ 100 g bb. Konsentrasi larutan uji dan aspirin diatur sedemikian rupa sehingga volume larutan uji tidak melebihi 1 mL/100 g bb tikus. Satu jam setelah pemberian sediaan uji atau larutan pembawa (larutan NaCl 0,9%), telapak kaki kiri semua tikus disuntik secara intraplantar dengan 0,05 mL suspensi karagenin. Volume kaki kiri diukur setiap 15 menit selama 3-4 jam dengan cara mencelupkannya ke dalam alat pletismometer. Semua data yang diperoleh ditabulasi dan hasil setiap kelompok di rata-rata. Volume telapak kaki kelompok kontrol dan perlakuan dibandingkan secara statistik dengan uji Anova satu arah. Apabila terdapat perbedaan bermakna, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Bila terdapat perbedaan bermakna, dihitung nilai reduksi radang (%) dengan rumus:

$$\text{Reduksi radang} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

A = volume rata rata telapak kaki kelompok kontrol
B = Volume rata rata telapak kaki kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan Nilai LD₅₀ Senyawa EHP. Tahap I dalam penetapan nilai LD₅₀ dengan metode Weil C.S⁽⁷⁾. merupakan tahap orientasi. Dalam pengerjaannya selama penelitian ini, tahap I ini dibagi menjadi tiga kali tahap orientasi, yaitu tahap I.a, tahap I.b dan tahap I.c. Dari tabulasi data (Tabel 1), dapat dilihat kelipatan dosis yang menyebabkan kematian dengan yang tidak menyebabkan kematian pada mencit adalah sebesar 2 sehingga nilai R dapat dihitung. Dari data tersebut diperoleh nilai R = 1,1892. Nilai R ini dijadikan kelipatan dosis untuk tahap selanjutnya.

Tabel 1. Orientasi dosis sediaan uji untuk tahap I.a.

Kelompok	Jumlah mencit	Dosis sediaan uji (g/kg bb)	Kematian
I	1	0,8438	Tidak
II	1	1,6875	Tidak
III	1	3,3750	Tidak
IV	1	6,7499	Ya

Tahap I.b dengan menggunakan kelipatan dosis 1,1892. Kematian pada tahap I.b terjadi hanya pada kelompok terakhir (IV) dengan dosis sediaan uji 6,7499 g/kg bb sehingga dilakukan tahap I.c untuk menaikkan tingkatan dosis hingga nilai LD₅₀ dapat dihitung. Kematian pada tahap I.c mulai terjadi pada kelompok III dan IV dengan dosis sediaan uji III 8,0269 g/kg bb dan IV dengan dosis sediaan uji 9,5456 g/kg bb. Setelah dilakukan tahap orientasi untuk menentukan tingkatan dosis yang digunakan, dilakukan tahap II untuk menghitung nilai LD₅₀.

Tabel 2. Tingkatan dosis penetapan nilai LD₅₀ dengan metode Weil C.S⁽⁷⁾.

Kelompok	Jumlah mencit	Dosis sediaan uji (g/kg BB)	Jumlah kematian
I	5	5,6760	0
II	5	6,7499	2
III	5	8,0269	5
IV	5	9,5456	5

Berdasarkan data pada Tabel 2 dan tabel biometrik Weil CS⁽⁷⁾, diketahui nilai $f = 0,10000$ dan nilai $\delta f = 0,24495$. Dengan demikian, nilai LD₅₀ dapat dihitung sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Log LD}_{50} &= \log D + d (f + 1) \\ &= \log 5,6760 + \log 1,1892 (0,10000 + 1) \\ &= 0,8368 \\ \text{LD}_{50} &= \text{antilog } 0,8368 \\ &= 6,8675 \pm 0,5826 \text{ g/kg bb} \end{aligned}$$

Berdasarkan kriteria toksisitas relatif Gosselin, Smith, and Hodge Scale, senyawa hasil sintesis yang masih berupa campuran EHP dan etil vanilin mempunyai nilai LD₅₀ sebesar 6,8675 g/kg BB, yang termasuk ke dalam kriteria toksik ringan. Sebagai perbandingan, nilai LD₅₀ senyawa etil vanilin adalah sebesar 1,590 mg/kg bb tikus dengan kriteria toksik sedang.

Efek Antiinflamasi Senyawa EHP pada Tikus. Pengujian efek antiinflamasi dilakukan dengan menggunakan alat pletismometer dengan prinsip pengukuran berdasarkan hukum Archimedes⁽⁶⁾. Induksi radang dilakukan secara kimia menggunakan larutan karagenin 1% (b/v), yang disuntikkan secara intraplantar pada telapak kaki tikus sebanyak 0,1 mL. Pembentukan radang oleh karagenin menghasilkan peradangan akut dan tidak menyebabkan kerusakan jaringan. Karagenin sebagai penyebab radang dapat dipengaruhi oleh obat antiradang. Responnya terhadap obat antiinflamasi lebih peka dibandingkan dengan iritan lainnya.

Untuk percobaan ini, tikus dibagi menjadi 5 kelompok secara acak (A, B, C, D, E), tiap kelompok

Tabel. 3 Uji statistik beda nyata jujur.

Kelompok	Rata-rata	Beda hasil rata-rata antar kelompok				
		A	B	C	D	E
A	375,137	-	-	-	-	-
B	392,125	16,987	-	-	-	-
C	380,400	11,725	5,2625	-	-	-
D	389,100	8,700	3,025	2,237	-	-
E	505,550	120,450*	111,75*	108,725*	106,487*	-

Keterangan :

* : beda nyata jujur $q1\% (5;20) = 5,29$ $q5\% (5;20) = 4,23$; A: kelompok A dengan dosis 137,35 mg; B: kelompok B dengan dosis 274,70 mg; C : kelompok C dengan dosis 549,40 mg; D : kelompok D kontrol positif aspirin 90 mg/200 g bb; E : kelompok E kontrol negatif air suling 2 mL/ 200 g bb.

terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok A diberi sediaan uji senyawa hasil sintesis dengan dosis 137,35 mg *per oral* (*p.o.*) 1 jam sebelum pemberian karagenan 1%. Kelompok B diberi sediaan uji senyawa hasil sintesis dengan dosis 274,70 mg *p.o.* 1 jam sebelum pemberian karagenan 1%. Kelompok C diberi sediaan uji senyawa hasil sintesis dengan dosis 549,40 mg *p.o.* 1 jam sebelum pemberian karagenan 1%. Kelompok D (kontrol positif) diberi aspirin dosis 90 mg/ 200 g bb tikus *p.o.* 1 jam sebelum pemberian karagenan 1%. Kelompok E (kontrol negatif) diberi air suling 2 mL/ 200 g bb tikus *p.o.* 1 jam sebelum pemberian karagenan 1%.

Pengukuran volume awal pada telapak kaki tikus dilakukan sebelum pemberian karagenan dan selanjutnya pada menit ke-30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 setelah pemberian karagenan. Pengukuran

dengan cara telapak kaki tikus dicelupkan pada bejana berisi air raksa pada alat pletismometer dilakukan tanpa tekanan, setelah itu dilihat kenaikan cairan pada miniskus tabung.

Dari Gambar 2 dapat dilihat volume udem kaki tikus dengan waktu pada kontrol negatif lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa uji dan kontrol positif. Senyawa uji dengan dosis 137,35 mg, 274,70 mg dan 549,40 mg tidak menunjukkan perbedaan bermakna yang dapat dilihat dari hasil analisis Anova, dan bila dibandingkan dengan kontrol positif, senyawa hasil sintesis juga tidak berbeda bermakna.

Dari hasil analisis varian diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}^*$ maka analisis dilanjutkan dengan Uji BNJ (Beda Nyata Jujur). Dari hasil uji BNJ dapat dilihat bahwa masing-masing senyawa memiliki beda nyata jujur terhadap kontrol negatif.

SIMPULAN

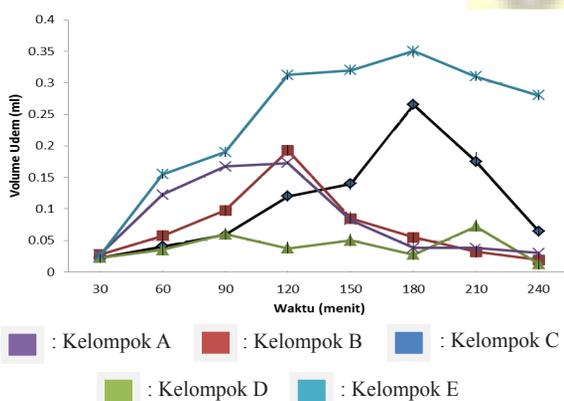
Senyawa EHP memiliki nilai LD_{50} sebesar 6,8675 g/kg bb dengan kriteria toksik ringan dan menghasilkan efek antiinflamasi dengan dosis 137,35 mg, 274,70 mg dan 549,40 mg. Efek tersebut setara dengan pemberian aspirin 90 mg/200 g bb.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan kepada Ditlitabmas Ditjen DIKTI untuk dana penelitian Hibah Bersaing DIPA KOPERTIS Wilayah III No. 023.04.2.189705/2013 dan 008/K3/KM/SPK/2013.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ibnu GG, Supardjan AM. Recent progress in curcumin pharmacology research. The Henk Timmerman International Seminar on Pharmaco-chemistry. Jakarta, Indonesia, July 10, 2007.



Gambar 2. Grafik hubungan antara waktu pengamatan dengan volume udem telapak kaki tikus.

Keterangan :

Kelompok A: Senyawa hasil sintesis dosis 137,35 mg
 Kelompok B: Senyawa hasil sintesis dosis 274,70 mg
 Kelompok C: Senyawa hasil sintesis dosis 549,40 mg
 Kelompok D: Kontrol positif diberi aspirin dosis 90 mg/200 g bb
 Kelompok E: Kontrol negatif diberi aquadest 2 ml/200 g bb

2. Sardjiman SS, Samhoedi M, Hakim L, Vandergoot H, Timmerman H. Synthesis and structure activity relationship 1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-ones-and cycly analogues an antioxidative agent. Yogyakarta: Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University; 2003. 175-84.
3. Esti M, Indriana P, Evi L, Enjang R. Sintesis dan uji antioksidan senyawa 1,5-bis(3'-etoksi-4'-hidroksifenil)-1,4-pentadien-3-on. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2010. 8(2): 93-102.
4. Esti M, Agus N, Mayagustina A, Bambang SAS. The molecular docking of 1,5-diphenyl-1,4-pentadien-3-on derivates as the inhibitor of COX-2 enzyme. Henk Timmerman International Seminar& Awards (HTSIA) on Structure Based Drug Design, Yogyakarta, 2009.
5. Esti M, Budi I, Mayagustina A, Bambang SAS. *Docking* molekul derivat 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on sebagai inhibitor enzim LOX-5. Seminar dan Kongres Nasional ISFI, Jakarta, 2009.
6. Lu FC. Toksikologi, dasar asas, organ sasaran, dan penelitian resiko. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Edi Nugroho. Jakarta: UI Press; 1995.
7. Weil CS. Table for convinent calculation of median effective dose (LD_{50}) and instruction in their use biometrics. 1952.

