

## UJI TOKSISITAS AKUT SENYAWA ASAM p-METOKSISINAMAT YANG DISINTESIS DARI ETIL p-METOKSISINAMAT

### ACUTE TOXICITY TEST OF p-METHOXYCINAMIC ACID SYNTHETIC FROM ETHYL p-METHOXYCINAMAT

Sara Nurmala<sup>\*1</sup>, Indah Zahara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Pakuan Bogor 16143

<sup>2</sup>Program Studi Farmasi Stikes Prima Indonesia Bekasi 17610

\*Corresponding Author : sara.nurmala@unpak.ac.id

Submitted : 31 Januari 2020

Accepted : 28 April 2022

#### ABSTRACT

Kencur (*Kaempferia galanga L.*) is a plant that grows in Indonesia and is often used as a traditional spice. The main content of Kencur is ethyl p-methoxycinamic has a mild level of toxicity. Hydrolysis results from Ethyl p-methoxycinamic namely p-methoxycinamic acid have been widely studied as having antibacterial activity against *S. aureus* with MIC of 125 ppm. P-methoxycinamic acid has anti-inflammatory activity, topical anti-inflammatory power of 8.7% p-methoxycinamic acid based on molar equality with 1% Na-diclofenac. Cinnamic acid compounds have greater potential as an inhibitor of cervical cancer cells compared to methyl cinnamon because they have more hydrogen bonds. Hydrolysis of ethyl p-methoxycinamic to p-methoxycinamic acid has been carried out, then identification tests have been carried out covering the melting distance obtained values of 172–173°C. The results of TLC analysis with the mobile phase of methanol: acetone (2: 1) p-methoxycinamic acid compound gave an Rf value of: 0.67. The results of infrared spectrum analysis of hydrolysis compounds provide information on the presence of specific functional groups, namely carbonyl groups of acids (C = O) which are shown by the absorption band at wave number 1690.49 cm<sup>-1</sup>. Hydrogen bonding in carboxylic acid dimers weakens the C = O bond, resulting in absorption at lower wave numbers. In this spectrum CO groups of acids are shown at absorption of 1029.92 cm<sup>-1</sup>, aromatic C = C groups are shown by uptake at wave numbers 1602.74 cm<sup>-1</sup> and 1627.81 cm<sup>-1</sup>, while bands at wave number 828.37 cm<sup>-1</sup> indicates the presence of para-substituted aromatic nuclei. Acute toxicity test of p-methoxycinamic acid compound which was carried out in a span of 24 hours showed that p-methoxycinamic acid had a moderate level of toxicity.

**Keywords:** P-methoxycinamic acid, Acute Toxicity Test, Kencur.

#### PENDAHULUAN

Ribuan senyawa yang terdapat di alam dapat diisolasi dari sumber – sumber alami, seperti jamur, bakteri dan tumbuhan. Masyarakat Indonesia telah menggunakan tumbuhan obat – obatan secara turun menurun berdasarkan pengalaman sebagai alternatif pengobatan. Salah satu tanaman obat – obatan yang sering digunakan oleh masyarakat Indonesia adalah Kencur (*Kaempferia galanga L.*). Tanaman Kencur memiliki aroma yang sangat lembut dan khas sehingga mudah dibedakan dengan jenis Zingiberaceae yang lainnya. Kencur tumbuh dan berkembang pada musim tertentu, yaitu pada musim penghujan.

Kandungan utama kencur adalah etil p-metoksisinamat dan sudah banyak penelitian yang pernah dilakukan antara lain Senyawa Etil p-metoksisinamat yang diisolasi dari tanaman Kencur

mempunyai aktivitas sebagai tabir surya, karena mampu mengabsorpsi sinar UV-B pada panjang gelombang 290-320 nm [1] dan Uji Toksisitas Akut senyawa etil p-metoksinamat [2]. Senyawa etil p-metoksisinamat dapat dihidrolisis menjadi senyawa Asam p-metoksisinamat. Penelitian yang telah dilakukan terhadap senyawa Asam p-metoksisinamat antara lain pengujian aktivitas antibakteri dari Asam p-metoksisinamat menggunakan metode mikrodilusi menunjukkan bahwa Asam p-metoksisinamat hasil sintesis memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dengan MIC sebesar 125 ppm [3]. Hasil uji antibakteri memperlihatkan aktivitas antibakteri Etil p-metoksisinamat terhadap bakteri *Bacillus cereus* lebih baik dibandingkan terhadap bakteri lainnya. Transformasi gugus fungsi dari suatu ester menjadi asam karboksilat terhadap aktivitas antibakteri tidak berpengaruh secara signifikan [4].

Asam p-metoksisinamat memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, daya antiinflamasi topikal Asam p-metoksisinamat sebesar 8,7% berdasarkan kesetaraan molar dengan 1% Na-diklofenak [5]. Senyawa Asam sinamat berpotensi lebih besar sebagai inhibitor sel kanker serviks dibandingkan dengan metil sinamat karena memiliki ikatan hidrogen yang lebih banyak [6].

Suatu senyawa untuk dapat dijadikan senyawa obat perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui batas keamanan sebelum dilakukan pengujian terhadap efek farmakologinya, yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji toksisitas akut dengan menetapkan nilai LD<sub>50</sub> dari senyawa Asam p-metoksisinamat. yaitu dosis yang dapat membunuh 50% dari hewan coba yang diberikan sediaan uji [7]. Uji Toksisitas Akut pada hewan coba merupakan uji untuk menskrining toksisitas suatu senyawa obat baru [8]. Uji toksisitas sangat dibutuhkan untuk menentukan keamanan senyawa obat baru dalam hal uji aktivitas biologis yang dihasilkan Asam p-metoksisinamat. Penelitian toksikologi yang meliputi uji toksisitas akut dilakukan dengan memberikan zat kimia yang diuji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Hasil uji toksisitas akut, terutama potensi toksisitas akut (LD<sub>50</sub>) bermanfaat untuk mengetahui batas aman obat dan dapat memberikan informasi untuk penelitian selanjutnya dalam merencanakan pengujian aktivitas biologis etil p-metoksisinamat.

## METODOLOGI PERCOBAAN

### Isolasi etil p-metoksisinamat

Ke dalam perkolator yang dasarnya dilapisi kertas saring, dimasukkan serbuk rimpang kencur sebanyak lebih kurang 500 gram kemudian direndam dengan menggunakan n-heksan teknis berlebih. Perendaman dilakukan selama 24 jam, setelah itu kran perkolator dibuka dan cairan perkolasi ditampung dalam labu erlenmeyer. Proses perkolasi diulang sampai sempurna ( ditandai dengan cairan perkolasi tidak meninggalkan bekas noda pada gelas arloji). Cairan hasil perkolasi selanjutnya dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* sampai diperoleh ekstrak kental. Perkolat pekat tersebut didinginkan di dalam lemari es hingga terbentuk kristal. Kristal yang diperoleh disaring dengan kertas saring, dan selanjutnya dimurnikan secara rekristalisasi menggunakan campuran etanol-air (2:1). Proses rekristalisasi diulang sampai diperoleh kristal jarum berwarna putih.

### Sintesis Asam p-metoksisinamat

Bahan awal etil p-metoksisinamat kemudian membentuk garam natrium p-

metoksisinamat dengan penambahan natrium hidroksida kemudian dihidrolisis dengan asam klorida menjadi Asam p-metoksisinamat.

### Identifikasi Asam p-metoksisinamat Kromatografi lapis tipis

Lebih kurang 5 mg kristal hasil hidrolisis dilarutkan dengan 5 mL metanol. Masing-masing larutan tersebut ditotolkan sebanyak 10 µL pada lempeng silica GF254 menggunakan pipa kapiler, jarak rambat pada lempeng 10 cm. Kemudian diekspansi menggunakan eluen Metanol – aseton (2 : 1) pengamatan bercak pada lempeng kromatografi dapat dilihat dengan sinar lampu UV.

### Uji jarak lebur

Sejumlah serbuk hasil hidrolisis diisikan kedalam pipa kapiler setinggi 2,5 mm – 3,5 mm. Setelah dimampatkan menggunakan pipa kapiler yaitu dengan mengetuk – ngetukkan pipa kapiler sampai pipa terisi padat. Kemudian dengan menggunakan alat pengukur suhu lebur ditentukan jarak leburnya.

### Identifikasi spektrofotometri inframerah (FT-IR)

Sejumlah 1 mg zat digerus halus dengan 300 mg KBr sampai homogen. Dimasukkan kedalam cetakan KBr kemudian diratakan. Setelah itu buat spektrum inframerah pada bilangan gelombang 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>.

### Uji Toksisitas Akut

Hewan percobaan sebelumnya diaklimatisasi dahulu selama 7 hari agar hewan coba dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan dan hewan lainnya. Selama proses aklimatisasi hewan coba dalam penelitian ini yaitu tikus putih jantan diberi pakan pelet, wortel dan diberi minum secara *ad libitum*. Setelah diaklimatisasi dihitung Coefficient of Variation (CV) untuk mengetahui apakah tikus homogen atau tidak. Tikus dipuaskan makan selama 8 jam ketika akan diberi perlakuan namun tetap diberikan air minum.

Dosis acuan yang digunakan berdasarkan penelitian uji toksisitas akut terhadap etil p-metoksisinamat yang diisolasi dari rimpang kencur yang diberikan secara peroral memiliki nilai LD<sub>50</sub> yaitu sebesar 3.652 mg/Kg BB maka dapat disimpulkan berdasarkan kriteria penggolongan toksisitas sediaan uji bahwa etil p-metoksisinamat masuk dalam kategori toksik ringan. Penentuan nilai LD<sub>50</sub> menggunakan tabel Weil CS [9].

Tikus sebanyak 25 ekor dibagi menjadi empat kelompok perlakuan secara acak, yaitu kelompok kontrol yang diberikan cairan aquadest dan disiapkan

empat kelompok perlakuan yang diberikan dosis ekstrak sehingga masing masing kelompok hewan uji terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan.

**Tabel 1.** Perlakuan Kelompok Uji Toksisitas

Kelompok	Jumlah Tikus	Perlakuan
Kontrol	5	Aquadest
Dosis I	5	3 mg/BB tikus
Dosis II	5	30 mg/BB tikus
Dosis III	5	300 mg/BB tikus
Dosis IV	5	3000 mg/BB tikus

Tikus diamati enam jam dan selama pengamatan dilihat gejala toksik apa saja yang muncul. Setelah enam jam pengamatan dilakukan kembali pengamatan pada dua puluh empat jam setelah diberikan dosis uji dan dihitung jumlah kematian mencit pada kurun waktu dua puluh empat jam pada semua kelompok percobaan.

#### ANALISIS DATA

Data kematian yang didapat dari hasil pengamatan selama dua puluh empat jam dicatat dan kombinasi kematiannya dilihat pada tabel, kemudian ditentukan LD<sub>50</sub> dengan menggunakan rumus dibawah ini :

$$\text{Log } m = \text{lod } D + d(f + 1)$$

Keterangan :

m : merupakan Harga LD<sub>50</sub>

D : merupakan dosis terkecil yang digunakan

d : merupakan log r yaitu kelipatan dosis

f : merupakan faktor yang didapat dalam tabel

#### HASIL PEMBAHASAN

##### Isolasi etil p-metoksisinamat

Dari sejumlah lebih kurang 10 kg rimpang kencur segar diperoleh lebih kurang 2 kg serbuk kencur kering rendemen 20% dihitung terhadap rimpang kencur segar. Kemudian setiap 4 kali ekstraksi masing-masing ±500 gram dari serbuk kencur kering diperkolasi menggunakan n-heksan dan diperoleh lebih kurang 23,74 gram kristal etil p-metoksisinamat rendemen 1,187% dihitung terhadap serbuk kencur kering.

##### Sintesis Asam p-metoksisinamat

Lebih kurang 9,7860 gram etil p-metoksisinamat dihidrolisis diperoleh lebih kurang 8,1262 gram asam p-metoksisinamat rendemen 83,04% dihitung terhadap etil p-metoksisinamat.

##### Identifikasi Asam p-metoksisinamat

#### Kromatografi lapis tipis

Hasil analisis KLT dengan fase gerak metanol : aseton (2:1) senyawa asam p-metoksisinamat memberikan nilai R<sub>f</sub> = 0,67 ini menunjukkan bahwa senyawa Asam p-metoksisinamat bersifat lebih polar, makin besar nilai R<sub>f</sub> maka senyawa tersebut semakin polar.

#### Uji jarak lebur

Hasil analisis jarak lebur senyawa asam p-metoksisinamat 172,0 – 173,0°C senyawa asam p-metoksisinamat bersifat stabil karena memiliki jarak lebur yang tinggi.

#### Identifikasi spektrofotometri inframerah (FT-IR)

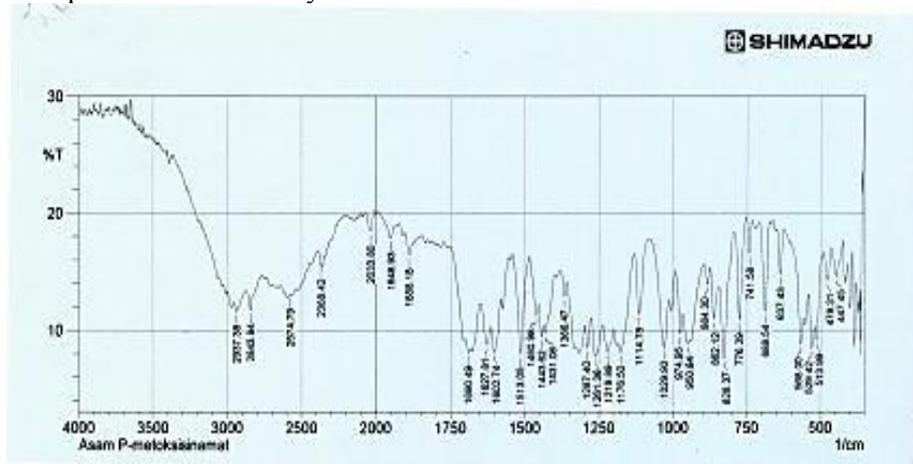
Analisis asam p-metoksisinamat menggunakan spektrofotometer inframerah memberikan informasi adanya gugus fungsional yang spesifik, yaitu gugus karbonil dari asam (C=O) yang ditunjukkan oleh pita serapan pada bilangan gelombang 1690,49 cm<sup>-1</sup>. Ikatan hidrogen pada dimer asam karboksilat memperlemah ikatan C=O, sehingga menghasilkan penyerapan pada bilangan gelombang yang lebih rendah. Pada spektrum ini gugus C-O dari asam ditunjukkan pada serapan 1029,92 cm<sup>-1</sup>, gugus C=C aromatik ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang 1602,74 cm<sup>-1</sup> dan 1627,81 cm<sup>-1</sup>, sedangkan pita pada bilangan gelombang 828,37 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya inti aromatik tersubstitusi para. Adanya ikatan hidrogen yang kuat dari asam-asam karboksilat menyebabkan serapan OH sangat lebar dan intensif didaerah 3300-2500 cm<sup>-1</sup>, pita tersebut biasanya berpusat didekat 3000cm<sup>-1</sup>. Lebarnya pita OH asam karboksilat seringkali dapat mengaburkan serapan CH aromatik dan CH alifatik. Pada spektrum ini, pita lebar OH ditunjukkan pada bilangan gelombang 2937,38 cm<sup>-1</sup> – 2574,79 cm<sup>-1</sup>. Spektrum FTIR asam p-metoksisinamat dapat dilihat pada gambar 1.

#### Uji Toksisitas Akut

Dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu pada hewan coba yang digunakan selama 7 hari, hewan coba ditempatkan di kandang hewan dengan suhu ruangan dan diberikan sirkulasi udara yang baik sehingga hewan coba dapat beradaptasi dengan lingkungan barunya. Kandang hewan dibersihkan setiap hari dengan mengganti sekam dan dibersihkan dari kotoran. Mencit diberikan pakan berupa pellet dan juga diberikan minum semua diberikan secara *ad libitum* ditandai dengan selalu terdapat sisa makanan dan minuman setiap harinya. Hewan coba yang digunakan adalah mencit dengan bobot 20-30 gram.

Pemberian sediaan uji pada penelitian ini dilakukan secara peroral. Dalam penetapan dosis, digunakan berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa

senyawa etil p-metoksisinamat memiliki nilai LD<sub>50</sub> sebesar 3.652 mg/Kg BB.



Gambar 1. Spektrum FTIR asam p-metoksinamat

Selesai hewan coba diaklimatisasi kemudian dihitung nilai Coefficient of Variation (CV) untuk melihat apakah hewan coba homogeny atau tidak dan didapatkan nilai CV yaitu 5%, nilai ini memenuhi syarat dengan syarat nilai CV adalah kurang dari 15%. Kemudian mencit dibagi kedalam kelompok, yaitu menjadi lima kelompok yang mana lima kelompok tersebut terdiri dari satu kelompok kontrol dan empat kelompok sediaan uji dan masing-masing kelompok dibuat pengulangan dengan masing-masing yaitu lima pengulangan.

Pemberian sediaan uji dilakukan secara peroral. Setelah sediaan uji diberikan dilakukan pengamatan gejala klinis yang dilakukan selama kurang lebih 30 menit setiap jam selama 6 jam kemudian dilanjutkan pengamatan setelah 24 jam pemberian sediaan uji. Yang diamati adalah gejala-gejala toksisitas yang muncul selama 24 jam diantaranya pengamatan pada sistem pernafasan hewan, perubahan aktifitas hewan, dan kerja jantung hewan percobaan. Hal-hal yang perlu diamati juga pada tubuh hewan percobaan yaitu pada mata, kulit, bulu dan juga diamati tingkah laku dan aktivitas motorik dari hewan coba.

Setelah dilakukan uji toksisitas akut pada mencit sebagai hewan coba dengan kelompok dosis sebagai berikut yaitu pada kelompok dosis I dan kelompok II tidak terdapat kematian dari hewan coba, kemudian pada dosis III didapatkan kematian sebanyak 80% mencit, sedangkan pada dosis ke IV terdapat kematian sebanyak 100% mencit sehingga didapatkan urutan kematiannya ( $r$ ) yaitu 0,0,4,5. Dari semua senyawa aktif yang ada dalam tanaman obat hampir memiliki toksisitas jika diberikan dalam dosis tinggi [10].

Dari hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa pada dosis I dan II hewan percobaan tidak

mengalami kematian (0%), pada dosis III hewan percobaan mengalami kematian sebanyak 4 tikus dari jumlah awal tikus sebanyak 5 dengan persentase kematian 80% sedangkan pada dosis IV semua tikus mengalami kematian sehingga persentase kematian yaitu 100% sehingga urutan kematian pada uji toksisitas akut yaitu 0,0,4,5. Berdasarkan tabel weil harga  $r$  0,0,4,5 mempunyai nilai  $f$  (factor) yaitu 0,70000. Kemudian dianalisis data kematian berdasarkan tabel weil sehingga nilai LD<sub>50</sub> dari senyawa asam p-metoksisinamat didapatkan 150,35 mg/BB tikus, sehingga berdasarkan kategori toksisitas akut asam p-metoksisinamat termasuk pada kategori toksik sedang.

## KESIMPULAN

Nilai Toksisitas akut senyawa Asam p-metoksisinamat dari hasil hidrolisis dari etil p-metoksisinamat yang diisolasi menggunakan pelarut n-heksan adalah sebesar 150,35 mg/BB tikus dan termasuk ke dalam kategori toksik sedang. Pemberian bahan uji asam p-metoksisinamat menimbulkan gejala toksik berupa aktifitas jantung menurun perlahan pada pemberian dosis IV, terjadi penurunan aktifitas gerak tikus, nafas tikus melambat pada dosis III.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Alamsyah, F. 2002. Uji Fototoksitas Senyawa Etilp-Metoksisinamat hasil Isolasi dari Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal L*) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan Radiasi UV 254 nm dan 356 nm. diakses di halaman <http://digilib.ubaya.ac.id/pustaka.php/150768> Pada tanggal 21 Januari 2020.

- [2] Nurmalia, S. 2017. Uji Toksisitas Akut Senyawa Etil p-Metoksisinamat yang diisolasi dari rimpang kencur (*Kaempferia galangal L.*). Jurnal Fitofarmaka 7 (2), 30-33.
- [3] Arkan, H. 2017. Sintesis Asam p-metoksisinamat dari rimpang kencur (*Kaempferia galangal L.*) dan uji aktivitas antibakterinya. diakses di halaman <https://akademik.unsoed.ac.id/index.php?r=artikelilmiah/view&id=17746> Pada tanggal 21 Januari 2020.
- [4] Fareza, M. S., Rehana, R., Nuryanti., Mujahidin, D. 2017. Transformasi Etil p-Metoksisinamat Menjadi Asam p-metoksisinamat dari Kencur (*Kaempferia Galanga L.*) Beserta Uji Aktivitas Antibakterinya. Jurnal Penelitian Kimia, 13(2), 176-190.
- [5] Soeratri, W., Erawati, T., Rohmatika, D., Rosita, N. 2014. Penentuan Dosis Asam p-metoksisinamat (APMS) Sebagai Antiinflamasi Topikal dan Studi Penetrasi APMS Melalui Kulit Tikus dengan dan Tanpa Stratum Korneum. Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia, 1(1), 28-30.
- [6] Ferwadi, S., Gunawan, R., Astuti, W. 2017. Studi Docking Molekular Senyawa Asam Sinamat Dan Derivatnya Sebagai Inhibitor Protein IJ4X Pada Sel Kanker Serviks. Jurnal Kimia Mulawarman, 14(2), 84-90.
- [7] Mustapa, M. A., Tutoli, T. S., Mooduto, A. M., 2018. Uji Toksisitas Akut Yang Diukur Dengan Penentuan LD50 Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Menggunakan Metode Thompson-Weil. Jurnal Sains dan Teknologi, Universitas Negeri Manado. 1(1), 105-117.
- [8] Pudjiastuti., Sa'roni., Nuratmi, B. 2001. Uji Toksisitas Akut (LD50) dan Antipiretik Infus Rimpang Zingiber Purpureum ROXB (Bengle) pada Hewan Percobaan. Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 11(3), 14-19.
- [9] Thompson dan Weil CS. 1952. Tables for Convenient Calculation of Median Effective Dose (LD50 or ED50) And Instructions in Their Use. Biometrics 8, 249-263.
- [10] Marlinda M., Sangi M, S., Wuntu AD. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea Americana Mill*). Jurnal MIPA Universitas Sam Ratulangi, (1), 24-28.