

Uji Toksisitas Akut Dermal Gel Antioksidan Topikal C-4-Hidroksi-3-Metoksifenilkaliks[4] Resorsinarena Secara *In Vivo* Pada Tikus Wistar

Acute Dermal Toxicity Test of Topical Antioxidant Gel C-4-Hydroxy-3-Methoxyphenylcalyx[4]Resorcinene In Vivo in Wistar Rats

Wade Marlinda^(1*), Eti Nurwening Sholikhah⁽²⁾ & Tri Murini⁽³⁾

⁽¹⁾Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Pattimura, Indonesia

^(2 & 3)Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Indonesia

*Corresponding author: wademarlinda27@gmail.com

Abstrak

Pemberian antioksidan topikal merupakan cara yang efektif untuk melindungi kerusakan kulit yang disebabkan oleh sinar ultraviolet. Senyawa C-4-hidroksi-3-metoksifenilkaliks[4]-resorsinarena telah diteliti aktivitas antioksidannya, tabir surya, dan penghambat enzim tirosinase secara *in vitro* sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan topikal, oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas kulit akut terhadap gel antioksidan CHMFKR untuk mengetahui keamanannya. Uji toksisitas kulit akut ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya gejala toksik atau mortalitas setelah pemaparan gel. Penelitian eksperimental semu ini menggunakan rancangan post-test only controlled group design. Enam ekor tikus Wistar dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama menerima gel CHMFKR 12% dan kelompok kedua menerima basis gel sebagai kontrol. Tikus-tikus tersebut diamati berat badan, eritema, oedem, piloereksi, lakrimasi, hipersalivasi, kejang-kejang, dan diare selama 14 hari. Hasil pengamatan klinis pada kelompok perlakuan (gel CHMFKR 12%) dan kontrol (basis gel) selama 14 hari menunjukkan bahwa tidak terdapat tanda dan gejala toksisitas, serta tidak terdapat kematian. Gel senyawa CHMFKR tidak menyebabkan toksik atau kematian, dengan nilai LD50 > 200 mg/kg.

Kata Kunci: C-4-Hydroxy-3-Methoxyphenylcalix[4] Resorsinarena; Uji Toksisitas Akut Dermal; LD50; Antiosidan.

Abstract

Topical antioxidant administration is an effective way to protect the skin damage caused by ultraviolet. The C-4-hydroxy-3-methoxyphenylcalix[4]-resorcinarene compound has been studied for its antioxidant activity, sunscreen, and *in vitro* tyrosinase enzymes inhibitor so that it is potential to be developed as topical antioxidant. Therefore, it is necessary to conduct an acute dermal toxicity test of the antioxidant gel of CHMFKR to determine its safety. This acute dermal toxicity test was conducted to know the presence or absence of toxic symptoms or mortality after the exposure of the gel. This quasi experimental research using post-test only controlled group design. Six Wistar rats were divided into 2 groups. The first group received the 12% of CHMFKR gels and the second group received gel base as control. The rats were observed for body weight, erythema, oedem, piloerection, lacrimation, hypersalivation, convulsions, and diarrhea for 14 days. The clinical observations for both treatment (12% CHMFKR gels) and control (gel base) groups for 14-day showed that there were not any sign and symptom of toxicity, also there were not any mortality. The gel of CHMFKR compound did not causing toxic or death, with a value of LD50 > 200 mg/kg.

Keywords: C-4-Hydroxy-3-Methoxyphenylcalix[4] Resorcinarene; Acute Dermal Toxicity; LD50; Antioxidant

DOI: <https://doi.org/10.51849/j-p3k.v6i2.810>

Rekomendasi mensitasi :

Marlinda, W., Sholikhah, E. N. & Murini, T. (2025), Uji Toksisitas Akut Dermal Gel Antioksidan Topikal C-4-Hidroksi-3-Metoksifenilkaliks[4] Resorsinarena Secara *In Vivo* Pada Tikus Wistar. *Jurnal Penelitian Pendidikan, Psikologi dan Kesehatan (J-P3K)*, 6 (2): 1034-1043.

PENDAHULUAN

Kulit ialah organ tubuh yang terletak paling luar dan terbesar pada manusia, berfungsi sebagai lapisan penghalang guna melindungi tubuh terhadap pengaruh lingkungan, serta dapat ialah cermin bagi kesehatan seseorang (Brodell & Rosenthal, 2008). Perawatan dan pemeliharaan yang baik terhadap kulit menjadikan penampilan kulit seseorang akantampak sehat, terawat dan memancarkan kesegaran. Kulit memiliki struktur jaringan epitel yang kompleks, bersifat elastis, sensitif serta mempunyai jenis dan warna yang bervariasi tergantung pada iklim, ras, jenis kelamin dan umur (Lai-Cheong & McGrath, 2017).

Paparan kronis terhadap radiasi UV menimbulkan banyak efek samping pada kulit, seperti penuaan dini, kanker kulit dan penurunan kemampuan respon imun. Masalah kesehatan ini secara langsung berkaitan dengan pembentukan *reaktif oksigen spesies* (ROS) oleh radiasi UV (Jain & Agrawal, 2008). Berdasarkan besaran panjang gelombang yang dimiliki, sinar ultraviolet dibagi menjadi tiga kelas yaitu: ultraviolet A (UVA) dengan panjang gelombang 315-400 nm, ultraviolet B (UVB) dengan panjang 280-315 nm, dan ultraviolet C (UVC) dengan panjang gelombang 100-280 nm (Azevedo et al., 1999; Narayanan et al., 2010). Sinar ultraviolet C tidak dapat menembus kulit karena terhalang lapisan ozon. Namun, sinar ultraviolet A dan ultraviolet B dapat melewati lapisan ozon dan mempengaruhi fungsi biologis pada manusia (Azevedo et al., 1999).

Kulit yang terpapar radiasi sinar ultraviolet secara berlebihan akan menimbulkan respon akut berupa

inflamasi serta adanya proses degeneratif kronis yang disebabkan kelebihan produksi *reaktif oksigen spesies* (ROS) dan pembentukan radikal bebas akibat gangguan sistem antioksidan. Pemberian secara topikal antioksidan enzimatik dan non enzimatik ialah suatu cara yang efektif guna melindungi kulit terhadap kerusakan yang dimediasi oleh oksidatif ultraviolet. Antioksidan dapat menangkal oksidan yang berlebih dan memperkaya sistem antioksidan yang berkurang. Beberapa contoh senyawa antioksidan alami seperti asam lipoat, flavonoid, vitamin E, dan silymarin. terbukti efektif dalam mencegah dan menurunkan keparahan kerusakan kulit akibat sinar ultraviolet (Aquino et al., 2002).

Kaliksarena ialah salah satu senyawa organik yang banyak diteliti memiliki aktivitas sebagai antioksidan, tabir surya dan penyerap logam berat (Budiana, 2015). Senyawa kaliksarena yang disintesis dari senyawa turunan resorsinarenol yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan ialah kaliks [4] resorsinarena. Senyawa kaliks[4] resorsinarena yang disintesis dari bahan dasar resorsinol dan 4-metoksi benzaldehida (p-anisaldehyd) dengan HCl sebagai katalis ialah C-metoksifenil kaliks [4] resorsinarena. Studi pendahuluan guna mengevaluasi aktivitas antioksidan dari kaliks [4] senyawa resorsinarena dalam bentuk C-2- hidroksifenil kaliks [4] resorsinarena yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC₅₀ 77,43 µm/mL (Handayani et al., 2016). Senyawa C-4-hidroksi-3-metoksifenilkaliks[4]-resorsinarene (CHMFKR) memiliki potensi sebagai antioksidan, Fatmawati (2016)

menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 17,24 $\mu\text{g/mL}$. Senyawa C-4-Hidroksi-3-Metoksifenilkaliks(4) Resorsinare secara *in vitro* memiliki potensi 8,3 kali lebih besar menghambat enzim tirosine dibandingkan dengan hidrokuinon (Angelina, 2019).

Riset sebelumnya yang dilakukan oleh Mustiqawati (2019) dengan tiga konsentrasi gel senyawa CHMFKR yaitu 1%, 2%, dan 4% menunjukkan bahwa pada konsentrasi 4% dapat mengurangi eritema punggung kelinci yang diinduksi oleh UV C (Mustiqawati et al., 2019). Namun sejauh ini belum dilakukan riset mengenai uji iritasi akut dermal dan uji toksisitas akut dermal secara *in vivo* terhadap senyawa CHMFKR sehingga belum diketahui apakah senyawa yang dibuat dalam sediaan gel ini aman digunakan pada kulit. Oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas akut dermal.

METODE PENELITIAN

Riset ini ialah eksperimen kuasi rancangan percobaan berupa *post-test only control group design*. Pada riset ini akan dilakukan, uji iritasi dan uji toksisitas akut dermal secara *in vivo* menggunakan gel antioksidan senyawa C-4 hidroksi-3-metoksifenilkaliks[4] resorsinarena pada tikus Wistar guna uji toksisitas akut dermal.

Uji toksisitas akut dermal menggunakan hewan percobaan diperlukan guna mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemaparan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Tujuan uji toksisitas akut dermal ialah guna mendeteksi toksisitas intrinsik suatu zat,

memperoleh informasi bahaya setelah pemaparan suatu zat melalui kulit secara akut dan memperoleh informasi awal yang dapat digunakan guna menetapkan tingkat dosis dan merancang uji toksisitas selanjutnya serta menetapkan nilai LD50 suatu zat, penentuan penggolongan zat, menetapkan informasi pada label dan informasi absorpsi pada kulit (BPOM, 2014).

Dosis yang diperkirakan dapat memberikan gejala toksisitas sedang menurut *Globally Harmonized System* (UNECE, 2009) yaitu 50, 200, 1000 dan 2000 mg/kg berat badan (BB). Bila memungkinkan data dari struktur kimia yang mirip dengan sediaan uji harus diperhatikan. Bila tidak terdapat data struktur kimia tersebut, maka dosis awal dimulai dari 1000 mg/kg BB. Seluruh hewan diamati selama 14 hari. Dalam beberapa kasus, hewan yang diberi dosis terendah (50 mg/kg BB) terjadi kematian atau menunjukan gejala toksisitas yang berat, maka pada kondisi tersebut pengujian dihentikan dan sediaan uji dikategorikan dalam kategori 1 GHS. Namun perolehan tersebut perlu dikonfirmasi dengan cara menambah 1 ekor hewan uji. Bila hewan ke-2 ini mati, maka uji tidak perlu dilanjutkan, tetapi bila hewan ke-2 hidup, maka uji dilanjutkan dengan 3 ekor hewan tambahan. Pada pengujian dengan tambahan 3 ekor hewan tersebut mempunyai indikasi kematian yang besar, maka hendaknya pengujian dilakukan 1 demi 1 ekor dengan interval waktu pemberian yang memungkinkan guna melihat efek kematian dari hewan uji. Bila kematian ke- 2 terjadi, maka uji dihentikan dan sediaan uji dikategorikan pada kategori 1 (UNECE, 2009). Jika hanya

1 ekor yang mati dari ke-5 hewan uji, maka dikategorikan pada kategori 2 bila akan menggunakan dosis diatas 5000 mg/kg atau pengujian guna kategori 5 harus dipertimbangkan bahwa dosis tersebut sangat relevan dengan kepentingan guna melindungi manusia, hewan dan atau lingkungan.

Sebelum pengujian dimulai, hewan uji diaklimatisasi di ruang percobaan kurang lebih selama 5 hari dan hewan ditempatkan pada kandang individual sekurang-kurangnya 24 jam sebelum pengujian. Rambut hewan harus dicukur pada daerah punggung seluas kurang lebih 10%, dari permukaan tubuh guna tempat pemaparan sediaan uji. Pencukuran dimulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah kebawah badan pada tiap sisi. Hewan yang digunakan guna percobaan ialah hewan yang mempunyai kulit yang sehat (BPOM, 2014).

Hewan coba dipelihara di *animal house* Farmakologi dan Terapi FK-KMK UGM. Tikus wistar dipelihara dalam kandang berukuran 50 x 70 x 80 cm, satu kadang dihuni satu hewan uji pada suhu 15- 21°C dan kelembapan 45-46%. Hewan coba dipelihara dengan makanan standar dengan komposisi makanan terdiri atas serat kasar sebesar 15 –16%, protein yang sesuai sebesar 18–20% ditambah vitamin A,D,E,K diberikan dalam bentuk pellet dengan jumlah 40 g/kgBB dan minuman air putih (akuades) *ad libitum*. Ketika diberikan sayuran, maka sayuran dicuci terlebih dahulu.

Cara pembuatan gel dengan basis karbopol sebagai berikut: gel dibuat dengan carametil paraben dilarutkan dengan air suling sambil dipanaskan

hingga suhu 70°C, kemudian dimasukkan karbopol selanjutnya ditambahkan trietanolamin diukur pH-nya, kemudian diaduk hingga mengembang membentuk gel (metode mixer). Senyawa C-4-hidroksi-3-metoksifenilkaliks[4] resorsinarena yang didispersikan dengan propilenglikol dan gliserin di dalam lumpang selanjutnya ditambahkan ke dalam basis gel yang telah terbentuk, diaduk hingga homogen. Propilen glikol atau propana-1,2-diol ialah salah satu jenis pelarut atau kosolven yang dapat digunakan guna meningkatkan kelarutan senyawa CHMFKR. Trietanolamin digunakan sebagai pengembang sediaan gel dan gliserin dapat meningkatkan kemampuan sediaan guna mengabsorpsi air kedalam kulit sehingga kelembapannya terjaga.

Hewan yang digunakan ialah tikus putih, dewasa, sehat dan berat badan sekitar 200-300 g (BPOM, 2014). Jumlah subjek pada penelitian ini ialah 3 ekor tikus putih pada dosis pemberian 200mg/kg BB dan 3 ekor sebagai kontrol basis gel (OECD, 2017).

Dosis awal dipilih berdasarkan kategori *Globally Harmonized System* (GHS) guna toksisitas akut dermal yaitu dosis tetap, 50, 200, 1000 dan 2000 mg / kg berat badan (OECD, 2017). Pada riset ini dilakukan dengan menggunakan dosis 200 mg/kg BB atau setara dengan konsentrasi 12%. Basis gel digunakan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan selama 14 hari.

Bahan uji diberikan secara merata pada 10% dari seluruh permukaan kulit tubuh. Sediaan uji dipaparkan dengan tipis dan merata, guna menjaga sediaan uji tetap menempel pada kulit, area pemaparan ditutup dengan kasa steril dan plester (Hypafix®) yang tidak mengiritasi selama

24 jam. Setelah selesai periode paparan, sisa bahan uji yang masih menempel pada kulit dihilangkan dengan menggunakan akuades (BPOM, 2014).

Pemaparan gel pada kulit punggung tikus bertujuan guna memperpanjang kontak antara gel dan kulit tikus guna mempermudah bahan uji terpenetrasi kedalam kulit tikus, dilakukan penempelan secara tertutup pada punggung tikus menggunakan kasa steril dan plester (Hypafix®) yang tidak mengiritasi hal ini bertujuan guna menjaga dan membaantu absorpsi dari gel serta menghindari dari pengaruh lingkungan (Samirana et al., 2018).

Menurut OECD (2017) hewan uji yang digunakan guna toksisitas akut dermal ialah 3 ekor yang terdiri atas 1 ekor hewan uji pendahuluan dan 2 ekor hewan uji utama. Seluruh hewan diamati selama 14 hari. Sebagai kontrol digunakan 3 ekor tikus Wistar lain.

Periode pengamatan, Hewan diamati segera setelah pemberian dosis selama 24 jam pertama, dengan perhatian khusus mulai dari periode paparan, dan setiap hari dilakukan selama tidak kurang dari 14 hari. Harus dilakukan penimbangan berat badan sesaat dan sebelum diberi perlakuan, hari ke-7 dan hari ke-14, serta pada saat hewan sekarat. Pada akhir pengujian, berat badan hewan yang bertahan hidup dicatat sebelum hewan dikorbankan. Penilaian klinis, dilakukan secara individual terhadap adanya perubahan pada kulit yang terpapar sediaan, kulit difoto sesaat setelah paparan sediaan, hari ke-7 dan ke-14 guna melihat ada tidaknya eritema dan edema yang muncul. Pengamatan dilanjutkan pada tanda-tanda toksisitas

seperti piloereksia bulu, lakrimasi mata, hipersalivasi, kejang, diare dan kematian.

Analisis data masing-masing hewan dibuat dalam bentuk tabel yang menunjukkan dosis uji yang digunakan, jumlah hewan yang menunjukkan gejala toksisitas, jumlah hewan yang ditemukan mati selama uji dan yang mati karena sekarat (keadaan moribund). Analisis eritema dan edema pada hewan uji dilakukan dengan dihitung nilai iritasi (Indeks Iritasi primer) berupa eritema dan edema yang disebabkan sediaan uji ialah kombinasi dari seluruh observasi dari pengujian indeks iritasi primer dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (BPOM, 2014).

$$\text{Indeks Iritasi Primer} = \frac{A - B}{C}$$

Keterangan:

A = Jumlah nilai eritema dan edema seluruh titik pengamatan sampel pada jam ke 24, 48, dan 72 dibagi jumlah pengamatan

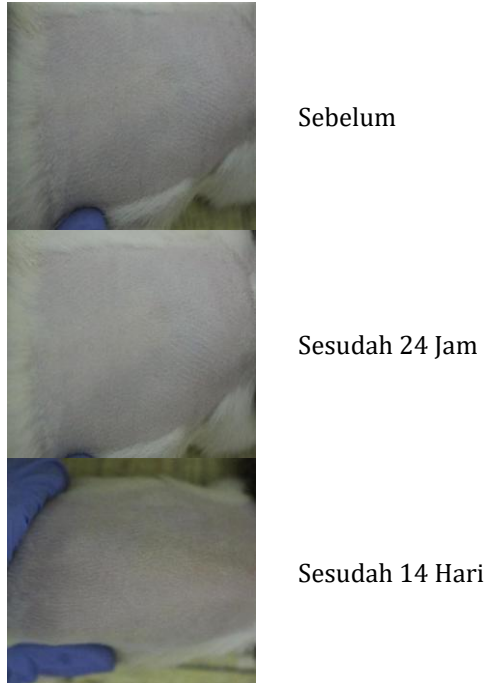
B = Jumlah nilai eritema dan edema seluruh titik pengamatan kontrol pada jam ke 24, 28 dan 72 dibagi jumlah pengamatan

C = Jumlah Hewan

Analisis data berat badan menggunakan uji paired sample t-test guna membandingkan kelompok dosis 200 mg/kg BB gel CHMFKR dan kontrol. Perolehan signifikan yang diperoleh dari uji paired sampel t-test yang disajikan dalam bentuk mean $\pm$ SD. Data analisis tanda toksisitas lainnya yang terdiri dari: piloereksia bulu, lakrimasi mata, hipersalivasi, kejang, diare dan kemaian disajikan dalam bentuk tabel dianalisis menggunakan metode visual dengan melihat tanda-tanda toksisitas yang dilakukan selama 14 hari. LD50 dianalisis dengan melihat 50% kematian hewan uji dengan dosis 200mg/kg BB.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berikut gambar hewan uji sebelum dan sesudah pemaparan gel antioksidan CHMFKR yang diamati selama 14 hari.



Gambar 1. Punggung tikus Wistar kelompok perlakuan sampel Gel antioksidan CHMFKR 12%



Gambar 2. Punggung tikus Wistar kelompok perlakuan kontrol basis gel antioksidan CHMFKR
 Pada gambar perolehan pengamatan sebelum, 24 jam pemaparan dan hari ke-14 pemaparan gel antioksidan CHMFKR selama 14 hari tidak menunjukkan adanya eritema dan udemata pada kulit tikus Wistar, skor eritema dan edema dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Score eritema dan edema

		Durasi Lesi Setiap Durasi								Total	
No. Tikus	Perlakuan	1 jam		24 Jam		48 Jam		72 Jam			
		E	U	E	U	E	U	E	U		
1	Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1		sampel	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2			0	0	0	0	0	0	0	0	0
3			0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nilai total kontrol (Tikus 1 + Tikus 2 + Tikus 3)									0		
Nilai total Sampel (Tikus 1 + Tikus 2 + Tikus 3)									0		
Catatan : 14 hari setelah pemaparan tidak terjadi efek samping yang signifikan terhadap kulit tikus dan semua tikus dalam keadaan sehat											

Pada tabel skor eritema dan edema pengamatan pada jam ke-1 setelah pemaparan gel antioksidan CHMFKR 12% (200mg/Kg BB) maupun kontrol basis gel tidak terjadi reaksi apapun pada kulit tikus Wistar. Pada jam Ke 24, 48, dan 72 juga demikian tidak terjadi reaksi apapun.

Berikut perhitungan indeks iritasi primer dari perolehan yang didapat.

$$\text{Indeks Iritasi Primer} = \frac{A - B}{C} = \frac{0 - 0}{0} = 0$$

Tabel 2. Berat badan tikus Wistar, sebelum dan sesudah perlakuan

Dosis (mg/kg)	Berat Badan (g) sebelum dan sesudah perlakuan gel CHMFKR dan kontrol			
	No. Tikus	Sebelum	Hari ke-7	Hari ke-14
Kontrol	1	206	200	198
	2	200	205	208
	3	202	207	210
	Mean	202,67±3,05	204	205,33
	± SD		±3,60	±6,42
200	1	202	207	211
	2	198	200	200
	3	201	203	204
	Mean	200,33 ±2,08	203,33	205
	± SD		±3,51	±5,57
Nilai P (antara Kontrol dan gel 12% (200mg/kg BB))		0,0590	0,4391	0,4824

Pada tabel 2. dilakukan penimbangan berat badan tikus sebelum, hari ke-7 dan hari ke-14 pada kelompok kontrol dan dosis 200 mg/kg BB, didapatkan nilai $p>0,05$ artinya tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada rata-rata perubahan berat badan tikus Wistar pada kelompok kontrol dan dosis 200 mg/kg BB.

Tabel 3. Pertambahan Berat badan tikus Wistar

Dosis (mg/kg)	Pertambahan Berat Badan (g) dalam seminggu perlakuan gel CHMFKR dan kontrol		
	No. Tikus	Hari ke-7 (%)	Hari ke-14 (%)
Kontrol	1	-2,25	-1
	2	2,50	1,46
	3	2,47	1,44
	Mean ± SD	0,90 ±2,73±	0,63 ±1,41
200	1	2,47	1,93
	2	1,01	0
	3	0,99	0,49
	Mean ± SD	1,49 ±0,84	0,80 ±1,00
Nilai P (antara Kontrol dan gel 12% (200mg/kg BB))		0,804	0,912

Pada tabel 3. pertambahan berat badan tikus Wistar hari ke-7 dan ke-14 pada kelompok kontrol dan dosis 200 mg, pada kelompok kontrol dan dosis 200 mg/kg BB terlihat penurunan rata-rata berat badan tikus Wistar dengan nilai $P>0,05$ tidak didapatkan perbedaan bermakna, ini disebabkan pada tikus 1 kelompok kontrol mengalami penurunan berat badan dan tikus 2 kelompok dosis tidak mengalami pertambahan berat badan.

Tabel 4. Hasil pengamatan klinis tanda-tanda toksisitas

Pengamatan	Hari Ke-1 sampai hari ke-14					
	Kontrol			12%		
	1	2	3	1	2	3
Eritema	-	-	-	-	-	-
Edema	-	-	-	-	-	-
Piloereksia bulu	-	-	-	-	-	-
Lakrimasi mata	-	-	-	-	-	-
Hipersalivasi	-	-	-	-	-	-
Kejang	-	-	-	-	-	-
Diare	-	-	-	-	-	-
Kematian	-	-	-	-	-	-

Keterangan : - Tidak terjadi

Berdasarkan tabel pengamatan klinis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan gel CHMFKR 12% (200mg/Kg BB) selama periode pengamatan yaitu 14 hari, tidak didapatkan adanya hewan coba yang mati ataupun tanda-tanda toksisitas setelah pemaparan gel antioksidan CHMFKR.

Uji toksisitas akut dermal menggunakan hewan percobaan diperlukan guna mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemaparan suatu sediaan uji dalam sekali pemberian melalui rute dermal. Uji ini dilakukan dengan metode *patch test* tertutup. Tikus betina dipilih karena mempunyai kulit yang sangat sensitive (BPOM, 2014).

Percobaan ini diawali dengan pengamatan iritasi kulit pada tikus Wistar setelah pemaparan sediaan uji selama 24 jam semua lokasi pemaparan dibersihkan dengan menggunakan akuades lalu dilakukan penilaian eritema dan edema seperti pada tabel 5. Pada tikus Wistar kontrol maupun perlakuan dosis 200 mg/kg BB didapatkan nilai 0 guna skor eritema maupun edema pada jam ke-1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan dan tidak terjadi lesi kulit lainnya.

Senyawa CHMFKR telah dilakukan uji aktivitas secara *in vivo* pada kelinci dengan menggunakan sediaan gel CHMFKR 4%

mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang menurunkan eritema dan udema pada kulit kelinci (Mustiqawati et al., 2019) dan mempunyai aktivitas penghambatan enzim tirosinase yang dapat menurunkan kadar melanin. Pengujian toksisitas akut dermal pada 24 jam pertama tidak terlihat tanda-tanda atau gejala toksisitas serta kematian, sampai hari ke-14 pada hewan uji dengan dosis 200mg/kgBB maupun kontrol seperti yang terlihat pada tabel 8. Hal ini menunjukkan bahwa gel yang digunakan sebagai bahan uji tergolong aman karena tidak menimbulkan reaksi efek samping serta tanda-tanda toksisitas

Toksisitas akut dermal serta iritasi pada kulit terjadi karena adanya pelepasan sitokin proinflamasi dari keratinosit yang dapat menimbulkan peradangan pada kulit sehingga dapat merangsang respon kimia, menyebabkan terjadinya gangguan pada sawar kulit, perubahan sel epideral serta pelepasan sitokin. Gejala yang timbul pada fase akut dermal biasanya eritema, edema, pengerasan kulit dan nyeri saat ditekan (Nair & Amber, 2017).

Pengamatan terhadap tanda-tanda toksisitas dilakukan 24 jam setelah pemberian gel CHMFKR. Dalam pengamatan diperoleh bahwa hewan beraktivitas normal tanpa-tanda toksisitas seperti kejang, piloereksia bulu, lakrimasi mata, dan hipersalivasi baik kelompok perlakuan 12 % (200mg/kg BB) maupun kelompok kontrol yaitu basis gel yang tidak diberikan senyawa CHMFKR. Setelah 24 jam dan 48 jam pengujian, sampai 14 hari tidak terjadi kematian. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa gel antioksidan CHMFKR memiliki nilai LD₅₀ lebih dari 200 mg/kgBB, yang menurut kategori *Globally Harmonized System*

(GHS) dosis tersebut termasuk dalam kategori 5 yang dapat dikatakan memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Selain itu, perubahan berat tikus putih *strain* Wistar selama 14 hari tidak terjadi perbedaan yang bermakna ($p>0,05$) jika dibanding dengan sebelum perlakuan, hari ke-7 dan hari ke-14 pada tikus putih *strain* Wistar perlakuan dosis 200mg/kg BB dan kontrol.

Tahap pengembangan obat diawali dengan proses sintesis atau isolasi senyawa dengan mempelajari hubungan struktur senyawa dan aktivitasnya. Senyawa C-4-hydroxy-3-methoxyphenyl-calix[4]-resorcinarene atau CHMFKR yang memiliki banyak gugus fenolik dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan kategori sangat kuat yang dinyatakan dengan 4 Nilai IC₅₀ sebesar 17,24µg/mL (Fatmasari, 2016). saat ini banyak riset mengenai Antioksidan topikal yang digunakan guna melawan stres oksidatif. Meskipun antioksidan dapat diberikan melalui diet tetapi terdapat pengaruh absorpsi dan kelarutan antioksidan sehingga yang sampai ke kulit hanya dalam jumlah terbatas. Pemakaian langsung pada kulit akan menambah perlindungan terhadap paparan radikal bebas (Andriana & Djauhari, 2017).

Riset yang dilakukan oleh Oliveire et al. (2014) mengujikan toksisitas akut oral secara *in vivo* pada senyawa turunan vanilin yaitu resorsinarena, tidak ditemukan gejala toksisitas sistemik hingga perilaku hewan uji dan tidak ada efek samping yang terjadi pada hewan uji setelah diberi perlakuan dosis 500 mg/kg BB (Oliveira et al., 2014). Utomo et al. (2013) juga mengujikan toksisitas akut oral secara *in vivo* pada senyawa tetrakis-N,N,N-trimethylammoniummethyl-C-3,4-

dimethoxyphenylcalix[4] resorcinarene dengan menggunakan hewan uji tikus jantan dan betina menggunakan dosis tunggal 2000 mg/kg BB selama 3 minggu, tidak ada hewan yang menunjukkan tanda-tanda toksisitas ataupun kematian karena itu senyawa resorsinarena diklasifikasikan sebagai zat yang tidak toksik (Utomo et al., 2013). Riset-riset ini mendukung senyawa C-4-hydroxy-3-methoxyphenyl-calix[4]-resorcinarene (CHMFKR) aman digunakan pada hewan uji. Pada riset menggunakan dosis 200 mg/kg BB setara dengan konsentrasi 12% gel antioksidan yang ialah dosis maksimal yang digunakan dan formulasi gel.

Setelah dilakukan sintesis senyawa dan uji aktivitas, tahap selanjutnya ialah dengan melakukan uji preklinik dan klinik, uji preklinik yang terdiri dari uji toksisitas, farmakodinamik dan farmakokinetik. Uji ini bisa dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo*. Namun guna uji toksisitas saat ini masih dilakukan dengan menggunakan hewan coba (BPOM, 2015). Semua perolehan pengamatan pada hewan dapat menentukan apakah riset ini layak guna dilanjutkan atau diteruskan pada uji selanjutnya yaitu uji toksisitas subronik dan kronik. Uji toksisitas terdiri dari berbagai uji toksisitas yaitu, uji toksisitas akut dermal, uji toksisitas subkronik, kronik dan uji toksisitas khusus yang meliputi uji teratogenitas, mutagenitas dan karsinogenitas (BPOM, 2014). uji toksisitas akut dermal dipilih dalam riset ini ialah sebagai langkah selanjutnya guna pemanfaatan senyawa CHMFKR sebagai senyawa antioksidan yang diformulasikan dalam sediaan gel yang digunakan secara topikal pada manusia.

SIMPULAN

Berdasarkan perolehan riset dapat disimpulkan bahwa Gel antioksidan CHMFKR 12% (200mg/kg BB) tidak menimbulkan efek iritasi pada tikus Wistar. Gel antioksidan CHMFKR 12% (200mg/kg BB) tidak menimbulkan gejala toksisitas. Nilai LD50 sediaan gel antioksidan C-4-Hidroksi-3-Metoksifenilkaliks[4] Resorsinarena yang diberikan secara topikal pada tikus Wistar ialah >200mg/kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran Kulit*, 4(1).
- Angelina, T. S. (2019). Uji aktivitas enzim tirosinase oleh senyawa C-4-hidroksi-3-metoksifenilkaliks(4)resorsinarena [Tesis Magister, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan UGM].
- Aquino, R., Morelli, S., Tomaino, A., Pellegrino, M., Saija, A., Grumetto, L., Puglia, C., Ventura, D., & Bonina, F. (2002). Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 183–191.
- Azevedo, J. S., Viana, N. S., & Soares, C. D. V. (1999). UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry. *Il Farmaco*, 54(9), 573–578.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2014). Pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo* (Peraturan Kepala BPOM No. 7 Tahun 2014). BPOM RI.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2015). Tata laksana dan penilaian obat pengembangan baru (Peraturan Kepala BPOM No. 16 Tahun 2015). BPOM RI.
- Brodel, L., & Rosenthal, K. (2008). Skin structure and function: The body's primary defense against infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 16(2), 113–117.
- Budiana, I. G. M. N. (2015). Synthesis of benzoic cinnamic calyxseries [4] resorsinarena and benzoil-sinamoyl calix [4] resorsinarena and its activity test as sunscreen and adsorbent Cr(III), Pb(II), and Cd (II) [Disertasi, Universitas Gadjah Mada].

- Fatmasari, N. (2016). Sintesis C-4-arilkaliks[4] resorsinarena seri benzoat sebagai antioksidan dan tabir surya [Skripsi, Universitas Gadjah Mada].
- Handayani, N. S., Jumina, Mustofa, & Swasono, R. T. (2016). Antioxidant assay of C-2-hydroxyphenylcalix[4]resorcinarene using DPPH method. *International Journal of ChemTech Research*, 9(2), 278–283.
- Jain, P. K., & Agrawal, R. K. (2008). Antioxidant and free radical scavenging properties of developed mono- and polyherbal formulations. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 22(3), 213–220.
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, 45(6), 347–351.
- Mustiqawati, E., Sholikhah, E. N., & Wirohardidjojo, Y. W. (2019). Uji aktivitas antioksidan senyawa C-4-hidroksi-3-metoksifenilkaliks[4]resorsinarena secara in vivo pada kelinci yang diinduksi dengan sinar ultraviolet C [Tesis Magister, Universitas Gadjah Mada].
- Nair, P. A., & Amber, R. A. (2017). Dermatitis contact. *Duke University Medical Center (NCBI)*.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. (2010). Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, 49, 978–986.
- Oliveira, C. B. S., Meurer, Y. S., Mareanne, G. O., Medeiros, W. M., Silva, F. O., Brito, A. C., Pontes, D. L., & Andrade, V. F. (2014). Comparative study on the antioxidant and anti-Toxoplasma activities of vanillin and its resorcinarene derivative. *Molecules*, 19(11), 18398–18410.
- Organization for Economic Cooperation and Development. (2017). OECD 402 guidelines for testing of chemicals—Acute dermal irritation/corrosion. OECD Publishing.
- Samirana, P. O., Pratiwi, D. M. N., Musdwiuni, N. W., Andhini, D. A. A., Mahendra, A. N., & Yadnya-Putra, A. G. R. (2018). Uji pendahuluan toksisitas akut dermal sediaan salep ekstrak etanol 70% daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terstandar. *Jurnal Kimia*, 12(2), 180–186.
- United Nations Economic Commission for Europe. (2009). Globally harmonized system (GHS) of classification and labelling of chemicals (3rd ed.).
- Utomo, S. B., Jumina, Siswanta, D., & Mustafa. (2013). Synthesis of tetrakis-N,N,N-trimethylammoniummethyl-C-3,4-dimethoxyphenylcalix[4]resorcinarene iodide based vanillin and its antidote activity for chromium(VI) intoxication. *Indonesian Journal of Chemistry*, 13(2), 158–165