

**UJI AKTIVITAS PENANGKAP RADIKAL DPPH
ANALOG KURKUMIN SIKLIK dan N-HETEROSIKLIK
MONOKETON**

SKRIPSI



Oleh :

**RINA RATNA WULANDARI
K 100 050 300**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit degeneratif dan penuaan dini merupakan implikasi akibat stres oksidatif yang ditimbulkan oleh terakumulasinya radikal bebas dalam jaringan tubuh. Secara normal di dalam tubuh manusia terdapat suatu radikal bebas yang bersifat sangat reaktif, yang akan berinteraksi dengan bagian-bagian tubuh maupun sel-sel tertentu dan menyebabkan sel tersebut menjadi tidak normal (Morteir *et al.*, 1995). Hal ini terjadi karena adanya nutrisi yang buruk, tingginya stres fisik maupun psikologis, paparan polutan dari udara, makanan dan air, paparan berlebih dari antibiotika dan obat-obat lainnya, menyebabkan semakin banyaknya radikal bebas dalam tubuh (Moelyono *et al.*, 2000). Jika jumlahnya sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatis tubuh, namun jika berlebih akan memicu efek patologis (Middleton *et al.*, 2000). Reaksi tersebut akan berhenti bila radikal itu diredam. Oleh karena itu diperlukan senyawa yang dapat meredam efek negatif dari radikal bebas ini yang disebut dengan antioksidan (Halliwell, 1992).

Kurkumin 1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6 heptadiena-3,5-dion merupakan senyawa α , β diketon asiklik diaril yang berwujud kristal kuning jingga. Kurkumin memiliki aktivitas biologi yang tinggi meliputi aktivitas antioksidan, aktivitas antikanker, aktivitas antiangiogenesis dan lain-lain. Mekanisme antioksidan pada kurkumin dihubungkan dengan adanya atom H dari gugus fenolik (Sun *et al.*, 2004). Sebagai penangkap radikal, kurkumin dapat menjaga integritas membran sel

yang diakibatkan peristiwa degradasi oksidatif karena adanya radikal oksigen dan radikal-radikal reaktif lainnya (Tonnesen *et.al.*,1993).

Stabilitas kurkumin sangat dipengaruhi oleh pH lingkungan dan cahaya. Dalam lingkungan berair dengan kondisi basa, kurkumin mudah terhidrolisis dan terdegradasi. Hal ini karena adanya gugus metilen aktif (-CH₂-) diantara dua gugus keton pada senyawa tersebut (Tonnesen dan Karlsen, 1985). Pengembangan potensi analog kurkumin tidak hanya memodifikasi gugus tengah (gugus β diketon) tetapi juga memodifikasi rantai samping. Senyawa analog kurkumin pentagamavunon-1 (2,5-bis-(4-hidroksi-3,5-dimetil) benzilidin siklopentanon (PGV-1) yang merupakan analog kurkumin dengan substituen inti aromatis pada rantai samping berupa gugus 4-hidroksi dan 3,5-dimetil menunjukkan aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara T47D lebih kuat dibanding kurkumin (Da'i, 2007). Penelitian lain menunjukkan bahwa modifikasi analog kurkumin pada rantai samping dengan gugus 4-hidroksi dan 3,5-dimetil, serta modifikasi pada gugus tengah dengan N-heterosiklik (1-etil, piperidin 4 -on) memiliki aktivitas penangkap radikal dengan IC₅₀ sebesar 94,26% (Youssef *et al.*, 2003). Berdasarkan pertimbangan tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas penangkap radikal analog kurkumin N-Heterosiklik monoketon yaitu senyawa 3,5-bis-(4-hidroksi-3-metoksi-benzilidin)-piperidin-4-on dan 3,5 -bis-(4-hidroksi-3,5-dimetil benzilidin)-piperidin 4-on yang dibandingkan dengan senyawa analog kurkumin siklik dan kurkumin.

B. Perumusan Masalah

Bagaimana potensi penangkap radikal dari senyawa analog kurkumin siklik monoketon menggunakan metode DPPH dibandingkan dengan kurkumin dan apakah

senyawa analog kurkumin N-heterosiklik monoketon juga memiliki aktivitas penangkap radikal?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi penangkap radikal dari senyawa analog kurkumin siklik monoketon menggunakan metode DPPH dibandingkan dengan kurkumin dan mengetahui aktivitas penangkap radikal dari senyawa analog kurkumin N-heterosiklik monoketon.

D. Tinjauan Pustaka

1. Antioksidan dan antiradikal

a. Pengertian antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi pada makanan, obat yang dapat mengakibatkan ketengikan (*rancidity*) pada makanan maupun kerusakan (degradasi) pada obat (Pokorny *et al.*, 2001).

b. Mekanisme antioksidan

Antioksidan dapat menghambat atau memperlambat oksidasi melalui dua jalur yaitu: (1) melalui penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*). Antioksidan jenis ini disebut sebagai antioksidan primer. Termasuk dalam jenis ini adalah vitamin E (α -tokoferol) dan flavonoid, dan (2) tanpa melibatkan penangkapan radikal bebas. Antioksidan ini disebut dengan antioksidan sekunder yang mekanisme pengikatannya melalui pengikatan logam; menangkap oksigen; mengubah hidroperoksida menjadi spesies non radikal; menyerap sinar ultraviolet dan

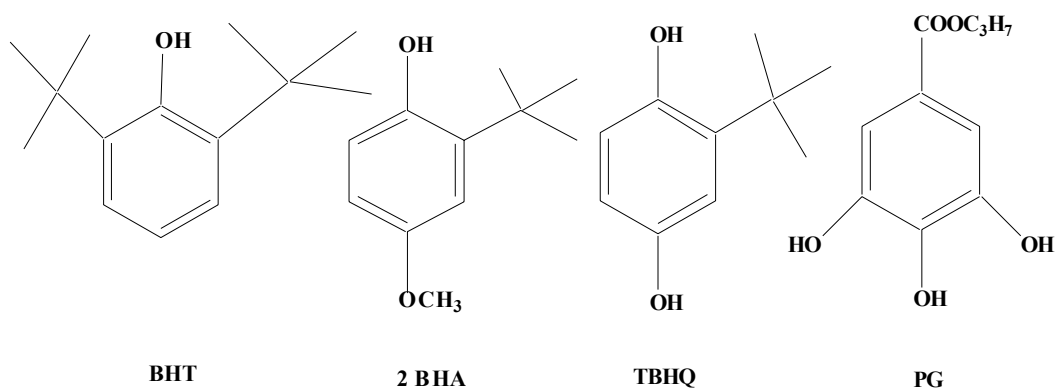
mendeaktivasi oksigen singlet (Pokorny *et al.*, 2001).

c. Sumber antioksidan

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintetik reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksi dan hasil ekstraksi bahan alami).

1) Antioksidan Sintetik

Ada empat antioksidan sintetik yang penggunaannya meluas dan menyebar di seluruh dunia, yaitu Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), Propil galat, Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ).



Gambar 1 : Struktur kimia beberapa antioksidan sintetik (Pokorny *et al.*, 2001).

2) Antioksidan Alami

Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992 *cit* Nurhayati, 2000).

Senyawa bahan alami yang digunakan sebagai antioksidan antara lain : β -

karoten, karotenoid, vitamin C dan vitamin E, ekstrak teh hijau, senyawa polifenol dan flavonoid, senyawa prosianidin, serta senyawa kurkumin dan kurkuminoid lainnya (Windono, 2001).

Kurkumin merupakan senyawa antioksidan yang baik karena mampu menangkap radikal-radikal bebas (radikal oksigen, nitrogen, superoksida dan hidroksi) yang berperan sebagai inisiator dalam reaksi oksidasi, menetralkan radikal-radikal bebas tersebut, mencegah proses peroksidasi lipid yang menghasilkan radikal-radikal bebas dan menghambat enzim oksidatif seperti sitokrom-P-450 (Majeed *et al.*, 1995).

Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu : larut dalam air dan larut dalam lemak. Antioksidan yang larut dalam air meliputi vitamin C dan asam urat. Sedangkan antioksidan yang larut dalam lemak meliputi ubiquinon, retinoid, karotenoid dan tokoferol (vitamin E). Protein plasma, Glutation Sulfhidril (GSH), asam urat, vitamin C, karotenoid, tokoferol dan flavonoid merupakan antioksidan yang terdapat dalam makanan (Midleton *et al.*, 2000).

Pemilihan antioksidan untuk tujuan tertentu dipengaruhi oleh kebutuhan sistem dan sifat antioksidan yang tersedia.

Sifat antioksidan yang diharapkan antara lain :

- 1) Harus efektif pada konsentrasi rendah
- 2) Tidak beracun
- 3) Mudah dan aman dalam penanganannya
- 4) Tidak memberikan sifat yang tidak dikehendaki, seperti : perubahan warna, bau, rasa dan lain-lain (Tranggono, 1990).

2. Radikal bebas

a. Pengertian radikal bebas

Radikal bebas merupakan atom atau gugus atom apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Karena jumlah elektron ganjil, maka tidak semua elektron dapat berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif (Fessenden and Fessenden, 1982). Jika jumlahnya sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatik tubuh, namun jika berlebih, memicu efek patologis (Midleton *et al.*, 2000).

b. Sifat-sifat Radikal Bebas

Perusakan sel oleh radikal bebas reaktif didahului oleh kerusakan membran sel, dengan rangkaian proses sebagai berikut :

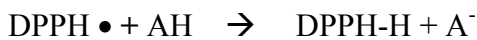
- 1) Terjadi ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen membran (enzim-enzim membran, komponen karbohidrat membran plasma), sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi reseptor.
- 2) Oksidasi gugus tiol pada komponen membran oleh radikal bebas yang menyebabkan proses transport lintas membran terganggu.
- 3) Reaksi peroksidasi lipid dan kolesterol membran yang mengandung asam lemak tak jenuh majemuk (PUFA = *Poly Unsaturated Fatty Acid*). Hasil peroksidasi lipid membran oleh radikal bebas berefek langsung terhadap kerusakan membran sel, antara lain dengan mengubah fluiditas, *cross-linking*, struktur dan fungsi membran serta menyebabkan kematian sel.

Dalam keadaan normal tubuh kita mempunyai mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas. Kerusakan sel akibat radikal bebas baru dapat terjadi apabila kemampuan mekanisme pertahanan tubuh menurun (Gitawati, 1995).

3. Metode DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Senyawa DPPH adalah radikal bebas yang stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh antioksidan akan berwarna kuning (*difenil pikrilhidrazin*). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer H[•], sekaligus juga untuk penghambatan radikal bebas. Campuran reaksi berupa larutan sampel yang dilarutkan dalam etanol absolut dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 30 menit, dibaca pada panjang gelombang 517 nm. Hasil perubahan warna dari ungu menjadi kuning stokiometrik dengan jumlah elektron yang ditangkap. Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi kemampuan antiradikal suatu senyawa sebab hasil terbukti akurat, reliabel dan praktis, selain itu sederhana, cepat dan memerlukan sedikit sampel (Huang *et al.*, 2005; Sanchez-Moreno, 2002).

Adanya senyawa yang bereaksi sebagai antiradikal akan mereduksi radikal DPPH menurut reaksi :



Sebagai akibatnya maka penambahan senyawa yang bereaksi sebagai antiradikal akan menurunkan konsentrasi DPPH akan menyebabkan penurunan absorbansinya dibandingkan dengan absorbansi kontrol yang tidak diberi dengan senyawa uji yang diduga mempunyai aktivitas antiradikal (Rohman dan Riyanto, 2004).

Metode lain yang dapat mengukur potensi penangkap radikal antara lain:

a. Pengujian aktivitas antioksidan dengan sistem linoleat-tiosianat

Asam linoleat merupakan asam lemak tak jenuh dengan 2 buah ikatan rangkap yang mudah mengalami oksidasi membentuk peroksida. Peroksida ini

selanjutnya mengoksidasi ion ferro menjadi ion feri yang kemudian bereaksi dengan ammonium tiosianat membentuk kompleks feri tiosianat ($\text{Fe}(\text{SCN})_3$) yang berwarna merah. Intensitas warna merah ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Semakin intens warna merahnya menunjukkan bahwa semakin banyak peroksida yang terbentuk.

b. pengujian dengan asam tiobarbiturat (TBA)

Pengujian ini berdasarkan adanya malonaldehid yang terbentuk dan asam lemak bebas tak jenuh dengan paling sedikit mempunyai 3 ikatan rangkap dua. Malonaldehid selanjutnya bereaksi dengan asam tiobarbiturat membentuk produk kromogen yang berwarna merah yang dapat diukur pada panjang gelombang 532 nm.

c. Pengujian dengan sistem β -karoten-linoleat

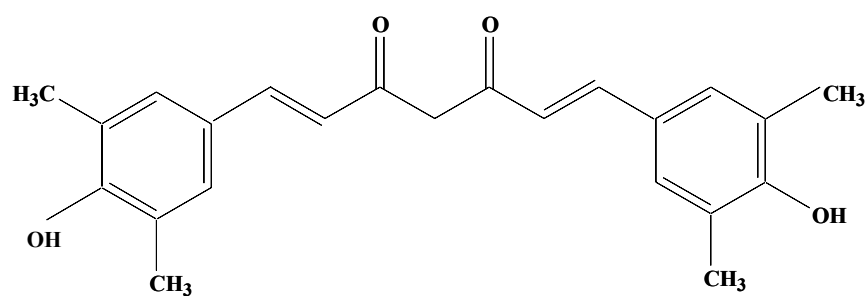
Pengujian ini dilakukan dengan mengamati kecepatan terjadinya pemucatan warna β -karoten. Selain ini juga dilakukan dengan bilangan pengujian peroksida, pengujian dengan bilangan para-anisidin dan pengujian dengan bilangan oktanoat (Pokorny *et al.*, 2001).

4. Aktivitas kurkumin dan analog kurkumin

a. Kurkumin

Kurkumin atau 1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6 heptadiena-3,5-dion (Gambar 2) merupakan senyawa α , β diketon asiklik diaril yang berwujud kristal kuning jingga. Kurkumin merupakan salah satu bahan pewarna tambahan makanan yang diambil dari kunyit. Di alam kurkumin selalu terdapat dengan 2 senyawa turunan lainnya yaitu demetoksi kurkumin dan bis demetoksi kurkumin, yang dikenal dengan nama kurkuminoid.

Kurkumin memiliki aktivitas biologi yang tinggi meliputi aktivitas antioksidan, aktivitas antikanker, aktivitas antiangiogenesis dan lain-lain. Mekanisme antioksidan pada kurkumin dihubungkan dengan adanya atom H dari gugus fenolik (Sun *et al.*, 2004). Sebagai penangkap radikal kurkumin dapat menjaga integritas membran sel yang diakibatkan peristiwa degradasi oksidatif karena adanya radikal oksigen dan radikal-radikal reaktif lainnya (Tonnesen *et.al.*, 1993). Aktivitas penangkap radikal senyawa kurkumin juga telah diteliti oleh Rao (1997). Pada penelitian tersebut kurkumin menunjukkan aktivitas sebagai penangkap radikal hidroksi, radikal superoksid dan oksigen singlet. Dengan aktivitas penangkap radikal tersebut, kurkumin dapat berfungsi sebagai penangkap spesi reaktif yang menyebabkan terjadinya kerusakan lipid, hemoglobin dan DNA yang menjadi faktor pencetus terjadinya kanker, inflamasi dan penyakit lain yang mungkin muncul.



Gambar 2. Struktur Kimia Kurkumin atau 1,7-bis (4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6 heptadiena-3,5-dion

Stabilitas kurkumin sangat dipengaruhi oleh pH lingkungan dan cahaya. Dalam lingkungan berair dengan kondisi basa, kurkumin mudah terhidrolisis dan terdegradasi. Hal ini karena adanya gugus metilen aktif (-CH₂-) diantara dua gugus keton pada senyawa tersebut (Tonnesen dan Karlsen, 1985). Ketidakstabilan kurkumin dipengaruhi adanya cahaya yang dapat mendegradasi secara fotokimia

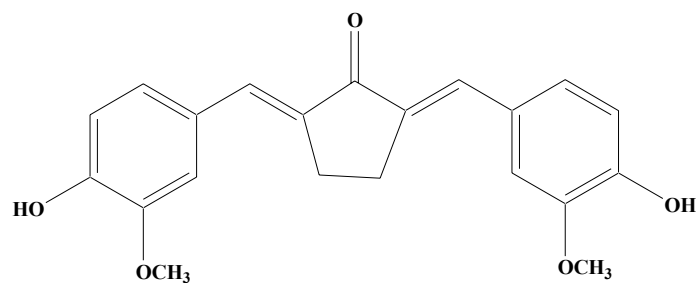
(Tonnesen *et al.*, 1986). Dengan pertimbangan tersebut dilakukan modifikasi terhadap struktur kurkumin. Modifikasi gugus β diketon menjadi analog gugus monoketon dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas senyawa analog kurkumin (Da'i *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa modifikasi struktur kurkumin menjadi suatu senyawa analog kurkumin menghasilkan efek farmakologi yang lebih baik dibanding senyawa kurkumin sendiri (Adams *et al.*, 2004). Salah satu upaya modifikasi struktur kurkumin adalah mengubah struktur pada gugus β diketon dengan gugus lain. Menurut Adams *et al.* (2004), modifikasi gugus β diketon dengan gugus N-heterosiklik mengakibatkan senyawa hasil modifikasi memiliki aktivitas antikanker lebih baik dibanding kurkumin dan Cisplatin sebagai kontrol. Penelitian lain menunjukkan pemasukan atom N pada gugus heksanon untuk menggantikan gugus β diketon senyawa kurkumin dapat meningkatkan efek sitotoksik senyawa analog kurkumin tersebut (Sun *et al.*, 2005). Pengembangan potensi analog kurkumin tidak hanya memodifikasi gugus tengah (gugus β diketon) tetapi juga memodifikasi rantai samping. Senyawa analog kurkumin pentagamavunon-1 (2,5-bis-(4-hidroksi-3,5-dimetil) benzilidin siklopentanon (PGV-1) yang merupakan analog kurkumin dengan substituen inti aromatis pada rantai samping berupa gugus 4-hidroksi dan 3,5-dimetil menunjukkan aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara T47D lebih kuat dibanding kurkumin (Da'i, 2007). Penelitian lain menunjukkan bahwa modifikasi analog kurkumin pada rantai samping dengan gugus 4-hidroksi dan 3,5-dimetil, serta modifikasi pada gugus tengah dengan N-heterosiklik (1-etil, piperidin 4 -on) memiliki aktivitas penangkap radikal dengan IC_{50} sebesar 94,26% (Youssef *et al.*, 2003).

b. Pentagamavunon-0

Analog monoketon yang sudah dikembangkan antara lain adalah pentagamavunon-0 (2,5-bis(4-hidroksi-3-metoksi)-benzilidin-siklopentanon atau PGV-0 dan pentagamavunon-1 (2,5-bis (4-hidroksi-3,5-dimetil)-benzilidin-siklopentanon dikenal sebagai PGV-1. Senyawa 2,5-bis(4'-hidroksi-3-metoksi-benzilidin)-siklopentanon disingkat PGV-0 (Gambar 3) merupakan salah satu senyawa analog kurkumin melalui penggantian gugus diketon (pada gugus tengah kurkumin) dengan siklopentanon. Senyawa tersebut disintesis pertama kali oleh Kodak pada tahun 1960 serta digunakan sebagai bahan campuran dalam pembuatan polimer film forming photosensitive (Soediman dan Martono, 2007). Senyawa tersebut memiliki aktivitas farmakologis sebagai antifungi, antibakteri,

penghambat siklooksigenase dan antiinflamasi (Sardjiman, 2000). Pentagamavunon-0 juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan karena adanya gugus fenolik pada strukturnya.

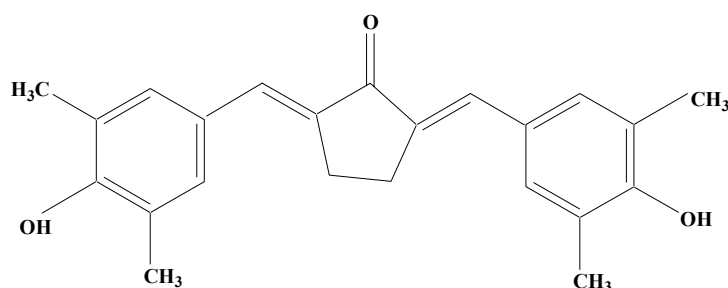


Gambar 3. Struktur Pentagamavunon-0 (Da'i *et al.*, 2007)

c. Pentagamavunon-1

Pentagamavunon-1 atau PGV-1 (Gambar 4) merupakan senyawa hasil

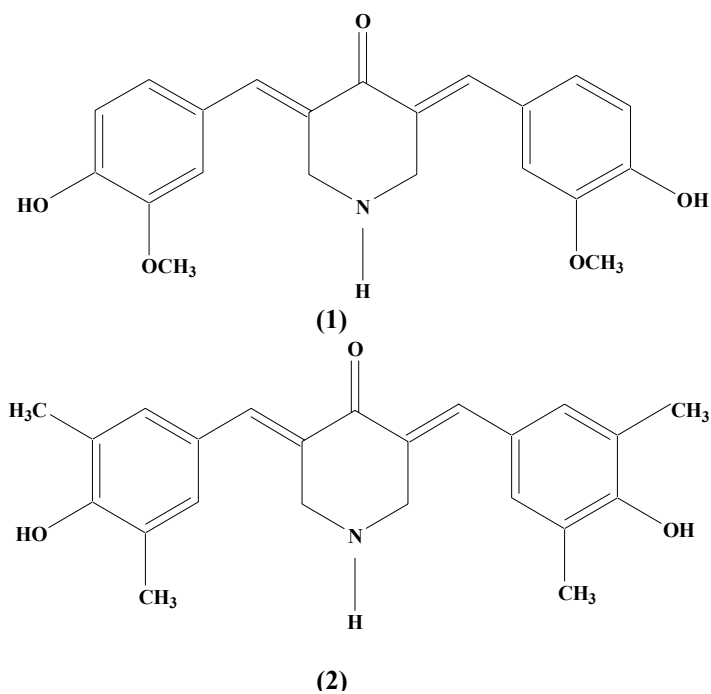
modifikasi struktur dari kurkumin. Dengan nama kimia (2,5-bis(4-hidroksi,3,5-dimetil)-benzilidin-siklopentanon (Ikawati *et al.*, 2007). Senyawa kimia ini merupakan analog kurkumin yang diketahui mempunyai aktivitas antioksidan (Da'i, 1998), antiinflamasi non imunologis (Sardjiman, 2000) melalui penghambatan biosintesis prostaglandin jalur siklooksigenase (Nurrochmad, 1997). Aktivitas lainnya yaitu analgetik (Sadik, 2003) dan antiproliferasi terhadap sel kanker payudara (Sarir, 2005).



Gambar 4. Struktur pentagamavunon-1 (Da'i *et al.*, 2007)

d. Analog Kurkumin N-Heterosiklik Monoketon

Analog kurkumin N-heterosiklik monoketon 3,5-bis-(4-hidroksi-3-metoksi-benzilidin)-piperidin-4-on dan 3,5-bis-(4-hidroksi-3,5 dimetil-benzilidin)-piperidin-4-on (Gambar 5) merupakan analog kurkumin yang dimodifikasi pada gugus tengah maupun pada rantai samping. Berdasarkan pertimbangan diatas maka diharapkan modifikasi analog kurkumin pada gugus tengah dengan suatu N-heterosiklik monoketon dan rantai samping dengan substituen gugus 4-hidroksi dan 3-metoksi serta 4-hidroksi dan 3,5-dimetil dapat memberikan aktivitas farmakologi yang lebih baik berdasarkan struktur kimianya dibanding kurkumin dan analog kurkumin yang dikembangkan sebelumnya yaitu PGV-0 dan PGV-1.



Gambar 5. Struktur kimia senyawa Analog kurkumin N-Heterosiklik monoketon.

Keterangan :

1. 3,5-bis-(4-hidroksi-3-metoksi-benzilidin)-piperidin-4-on.
2. 3,5 -bis-(4-hidroksi-3,5-dimetil benzilidin)-piperidin 4-on.

E. LANDASAN TEORI

Masuda *et al.*, (1999) telah menemukan mekanisme penangkapan radikal oleh kurkumin. Berdasarkan mekanisme Masuda, gugus hidroksi fenolik berperan dalam penangkapan radikal pertama kali pada kurkumin. Menurut Majeed *et al.*, (1995) yang melakukan analisis struktur kurkumin dan aktivitas biologisnya memberikan analisisnya sebagai berikut:

1. Gugus OH fenolik berperan dalam aktivitas antioksidan.
2. Gugus β -diketon berperan dalam aktivitas antiinfeksi, antikanker dan antimutagenik.
3. Ikatan rangkap berperan dalam aktivitas antiinfeksi, antikanker dan antimutagenik.

Kurkumin memiliki aktivitas antioksidan karena ada gugus OH fenolik yang terdapat pada rantai sampingnya. Senyawa analog kurkumin siklik dan N-Heterosiklik Monoketon juga memiliki gugus OH fenolik pada rantai sampingnya, sehingga senyawa tersebut juga memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa analog kurkumin siklik dan N-Heterosiklik monoketon merupakan senyawa analog kurkumin dengan modifikasi gugus β diketon pada kurkumin menjadi gugus monoketon. Modifikasi ini diharapkan dapat meningkatkan stabilitas dan aktivitas senyawa analog kurkumin. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa modifikasi struktur kurkumin menjadi suatu analog kurkumin menghasilkan efek farmakologi yang lebih baik dibanding dengan senyawa kurkumin sendiri (Adams *et al.*, 2004). Modifikasi pada gugus tengah dengan N-heterosiklik (1-etil,piperidin 4 -on) memiliki aktivitas penangkap radikal memiliki aktivitas penangkap radikal IC_{50} sebesar 94,26% (Youssef *et al.*, 2003). Jadi, senyawa analog kurkumin N-Heterosiklik Monoketon memiliki aktivitas penangkap radikal.

F. HIPOTESIS

Senyawa analog kurkumin siklik dan N-Heterosiklik monoketon memiliki aktivitas penangkap radikal DPPH.