

Penentuan Dosis Asam *p*-metoksisinamat (APMS) Sebagai Antiinflamasi Topikal dan Studi Penetrasi APMS Melalui Kulit Tikus dengan dan Tanpa Stratum Korneum

Widji Soeratri, Tristiana Erawati, Diny Rahmatika, Noorma Rosita

Pharmaceutics Department, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: widjisoeratri@yahoo.com

Abstract

The aims of researchs to measure para methoxy cinnamic acid (PMCA) dose and the effect of stratum corneum on its penetration parameter. Para methoxy cinnamic acid dose was observe by comparing with diclofenac sodium 1% on decreasing oedema of hind paw Wistar rat that had been induced with 1% caragenan suspension. On the penetration of PMCA study was performed by use of fullthick rat skin membrane and its without stratum corneum, in undersaturated PMCA concentration.

Result of the study showed that PMCA exhibited antiinflammation topical effect 0.64 fold of 1% diklofenac sodium in the same route. Based on molarity equivalence calculation with diklofenac sodium, PMCA dose as antiinflammation topical was 8.7%. Regarding the PMCA penetration test had been concluded that there was a significant different statistically between flux of PMCA through fullthick rat skin membrane and none. Permeability of skin without stratum corneum was higher than the fullthick rat skin.

Keywords: Para methoxy cinnamic acid (PMCA), antiinflammation topical dose, penetration

PENDAHULUAN

Kencur (*Kaempferia galangal* L.) secara empiris telah diketahui memiliki efek antiinflamasi. Kandungan utama kencur adalah etil *p*-metoksisinamat (EPMS) (31,77%) yang di dalam tubuh mengalami hidrolisis menjadi senyawa aktif biologis, asam *p*-metoksisinamat (APMS), senyawa ini bekerja dengan menghambat enzim siklooksigenase, sehingga konversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin terganggu (Sadono dan Hasmono, 2000). Penggunaan Obat Anti Inflamasi Nonsteroid (OAINS) seringkali dapat menyebabkan iritasi saluran cerna (Ganeswara, 1995; Katzung, 2007). Salah satu upaya untuk menghindari efek samping tersebut, dikembangkan penggunaan obat secara topikal. Sediaan OAINS topikal yang telah beredar a.l. natrium diklofenak dengan dosis 1%, sementara dosis APMS untuk penggunaan topikal belum diketahui.

Pada penggunaan topikal obat antiinflamasi harus dapat berpenetrasi sampai lapisan viabel dermis kulit, karena reseptor antiinflamasi terdapat pada lapisan tersebut (Barry, 1983) Untuk dapat mencapai lapisan tersebut, diperlukan penembusan lapisan stratum korneum yang bertindak sebagai *rate limiting step* dalam proses penetrasi (Riviere, 1993).

Untuk mengetahui pengaruh *stratum corneum* terhadap penetrasi APMS, ditentukan parameter penetrasi APMS dengan dan tanpa stratum korneum (kulit telah distriping 40x), dengan menggunakan hewan coba tikus Wistar jantan.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, asam *p*-metoksisinamat (APMS) dan Na-Diklofenak yang diperoleh dari Sigma Aldrich, Ketamin, normal salin, karagenan dan membran kulit utuh dan yang telah dilakukan *stripping* dari tikus Wistar jantan (PUSVETMA), NaCl, KCl, NaHPO₄.12H₂O, KH₂PO₄ dan KBr (Merck). Pelarut yang digunakan adalah air suling diperoleh dari PT. Bratako

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rangkaian alat untuk uji penetrasi *Franz cells*, *Double beam Spectrophotometer* UV-Vis Cary 50 Conc. Shimadzu, *IR JASCO FT/IR-5300* Instrumen termometer, Neraca analitik, pH meter SCHOOT glas mainz tipe CG 842, alat uji suhu lebur *Differential Thermal Analysis* (DTA) SP 900 *Thermal System Metler Toledo* SP 85magnetic stirrer, Mikroskop elektron, *Thermostatic Waterbath* Mermert, spuit injeksi, disposable mikro kuvet, jangka sorong.

Metode kerja. Penentuan dosis APMS sebagai antiinflamasi ditentukan dengan cara membandingkan efektifitas antiinflamasi larutan Na-Diklofenak 1% dengan larutan APMS pada kesetaraan molaritasnya, yaitu $3,14 \times 10^{-2}$ molar, atau 5,59% APMS. Digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar sebagai subyek penelitian. Dipilih tikus jantan dengan tujuan mengurangi pengaruh hormonal subyek. Tikus yang digunakan berumur 3-4 bulan dengan berat 150-200 gram. Untuk meminimalkan terjadinya variasi biologis yang dapat mempengaruhi hasil uji antiinflamasi (Riviere, 1993). Subyek dibagi atas 3 kelompok yaitu satu kelompok yang akan diuji dengan larutan APMS, 1 kelompok yang akan diuji dengan larutan Na-diklofenak dan 1 kelompok sebagai kontrol negatif.

Pada tahap awal, tikus dianestesi dengan pemberian ketamin 20 mg/kg BB secara *intra muscular (im)*, kemudian ditempatkan pada papan dengan posisi terlentang. Permukaan plantar diolesi larutan sediaan dengan pengolesan sebanyak 50 kali menggunakan spatel logam. Tiga puluh menit setelah pengolesan larutan, tikus diinduksi inflamasi dengan injeksi 0,1 ml suspensi karagenan 1% dalam normal salin. Injeksi dapat dilakukan pada subplantar (di bawah kulit telapak kaki tikus) sebelah kanan *hind paw* tikus. Jarum 27G dengan *syringe* yang telah berisi karagenan disuntikan ke dalam ruang antara kulit dan otot secara hati-hati dan perlahan-lahan. Setelah injeksi dilakukan,

tikus dimasukkan ke dalam kandang sesuai dengan kelompoknya. Evaluasi tebal plantar dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran tebal plantar dilakukan pada menit ke- 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, dan 360 setelah pemberian 1% suspensi karagenan. Untuk mengantisipasi hilangnya efek anestesi, setiap 45 menit dilakukan anestesi ulang dengan ketamin pada dosis separuhnya (10 mg/kg BB).

Uji penetrasi larutan APMS pada kadar yang setara dengan dosis efektif Na-diklofenak yang telah didapatkan dilakukan terhadap dua jenis kulit tikus wistar jantan. Membran yang digunakan adalah berasal dari kulit tikus utuh dan kulit yang telah dihilangkan startum corneumnya. Untuk menghilangkan lapisan *stratum corneum* digunakan metode *tape stripping* sebanyak 40x. Uji penetrasi dilakukan dengan alat *Franz cells*. Media reseptor yang digunakan adalah dapar fosfat salin pH 7,4 ±0,5. Penentuan daya penetrasi dilakukan dengan menentukan kadar bahan aktif yang terpenetrasi antar waktu, dengan metode spektrofotometer pada λ maksimumnya. Suhu percobaan dikontrol untuk tetap konstan 37±0,05 °C. Dari kadar yang diperoleh dihitung harga fluks (laju penetrasi), selanjutnya dapat dihitung permeabilitas membran terhadap APMS. Dari data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji t untuk membandingkan fluks APMS melalui membran kulit utuh dan membran kulit tanpa stratum korneum

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Dosis. Data yang diperoleh berupa kurva tebal udem kaki tikus. Tebal udem merupakan selisih kaki tikus sebelum dan sesudah diradangkan, dengan rumus (Erawati et al., 2011):

$$C_u = C_t - C_0$$

Keterangan.

- C_u : Tebal udem kaki tikus setiap waktu,
- C_t : Tebal kaki tikus setelah diradangkan karagenan 1% pada waktu t
- C₀ : Tebal awal kaki tikus sebelum diradangkan dengan karagenan 1%

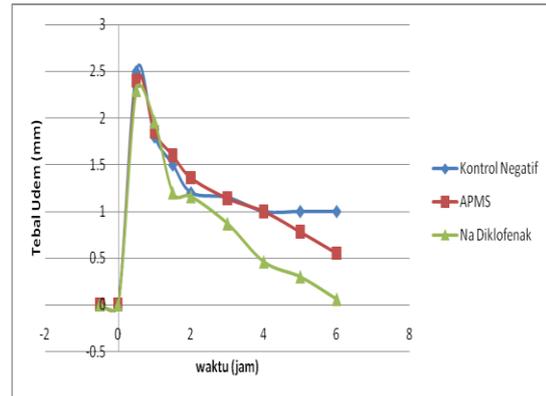
Profil hubungan antara tebal udem rata-rata tiap waktu dari larutan APMS, larutan Na-diklofenak dan kontrol negatif dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil perhitungan AUC, yang selanjutnya dihitung persen DAI berdasar rumus maka diperoleh hasil seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Dari data tebal udem rata-rata tersebut dapat dihitung nilai AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan tebal udem rata-rata tiap satuan waktu dengan rumus (Erawati et al., 2011):

$$AUC_{t_{n-1}}^{t_n} = \frac{C_{t_{n-1}} + C_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan. C_{t_{n-1}} : rata-rata tebal udem pada t_{n-1}, C_{t_n} : rata-rata tebal udem pada t_n



Gambar 1. Profil hubungan antara tebal udem tiap waktu (jam) vs tebal rata-rata tebal udem (mm) dari larutan APMS, larutan Na-diklofenak dan kontrol negatif

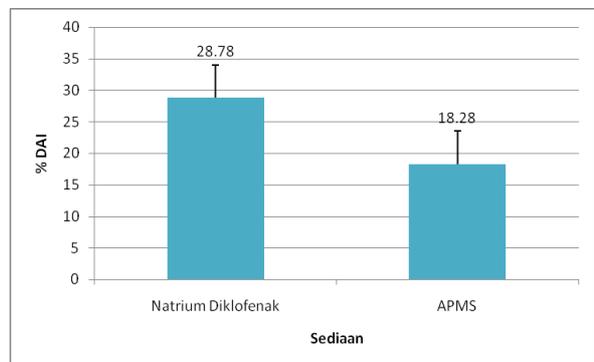
Persentase penghambatan tebal udem dihitung berdasarkan persen penurunan udem menggunakan rumus (Erawati et al., 2011):

$$\%DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan. AUC_k:AUC kurva tebal udem rata-rata terhadap waktu untuk kontrol negative, AUC_p:AUC kurva tebal udem rata-rata terhadap waktu untuk kelompok perlakuan pada tiap individu.

Tabel 1. Hasil Perhitungan AUC dan %Daya Anti-inflamasi

Sediaan	AUC (mm. jam)	%DAI
Kontrol Negatif	7.140	-
Larutan Natrium Diklofenak 3,14 x 10 ⁻² M	5.085	28.78
Larutan APMS 3,14 x 10 ⁻² M	5.835	18.28



Gambar 2. Persen daya antiinflamasi larutan natrium diklofenak dan larutan APMS pada kesetaraan molar 3,14 x 10⁻² M.

Dari perhitungan persen DAI diketahui bahwa persen DAI larutan APMS dan larutan Na-diklofenak berturut-turut adalah 28,78% dan 18,28 %. Setelah

dilakukan uji statistik t-test dengan $p=95\%$ ($\alpha=0,05$), diketahui bahwa persen DAI berbeda secara bermakna. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa penghambatan udem APMS lebih kecil daripada natrium diklofenak. Daya antiinflamasi topikal APMS sebesar 0,65 kali Na-diklofenak, sehingga berdasarkan kesetaraan molar APMS dengan 1% Na-diklofenak, maka dosis APMS adalah 8,7%.

Studi Penetrasi APMS. Dari hasil uji penetrasi APMS melalui membran kulit tikus Wistar utuh dan tanpa stratum korneum (dihilangkan dengan cara stripping) yang dilakukan selama 8 jam, diketahui harga fluks dan permeabilitas seperti yang tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Fluks APMS dan Permeabilitas Kulit terhadap APMS melalui membran kulit utuh dan membran kulit tanpa stratum korneum

Membran	Fluks ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{menit}$)	Permeabilitas \pm SD (cm/menit)	KV (%)
Kulit utuh	$0,299 \pm 0,075$	$3,56 \cdot 10^{-04} \pm 2,12 \cdot 10^{-04}$	(25,23)
tanpa Stratum korneum	$1,263 \pm 0,094$	$8,42 \cdot 10^{-04} \pm 2,64 \cdot 10^{-04}$	(7,42)

Setelah dilakukan uji statistik t-test dengan $p=95\%$ ($\alpha=0,05$) diketahui bahwa fluks maupun permeabilitas kulit utuh dan yang tidak terdapat stratum korneum berbeda secara bermakna. Permeabilitas kulit tanpa stratum korneum terhadap APMS 2,36 kali lebih besar dibanding melalui kulit utuh, atau APMS lebih mudah berpenetrasi pada kulit yang telah dihilangkan stratum korneumnya. Variasi penetrasi pada membran kulit utuh cukup besar meskipun variasi biologis sudah diupayakan minimal. Fenomena tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan sifat dan ketebalan stratum korneum kulit.

Tiap lapisan kulit memiliki daya permeabilitas yang berbeda-beda, khususnya pada lapisan epidermis dan dermis. Salah satu lapisan yang paling berperan dalam proses penetrasi adalah lapisan stratum korneum yang terletak di bagian terluar dari epidermis. Seperti yang telah diketahui penetrasi bahan aktif dapat terjadi melalui mekanisme transeluler, intraseluler, dan transpendegal (Ansel, 1989). Meskipun rute transeluler memiliki laju penetrasi kecil tetapi mekanisme ini lebih banyak terjadi terutama pada obat-obat yang bersifat

lipofilik, karena pada rute ini obat berpenetrasi melalui lapisan stratum korneum yang memiliki luas permukaan besar (Barry, 1983).

Pada membran kulit tanpa stratum korneum, lapisan yang bertindak sebagai barier utama pada proses penetrasi telah diangkat. Pengangkatan lapisan inilah yang menyebabkan peningkatan daya penetrasi APMS. Hal ini juga didukung oleh data yang didapat pada studi yang telah dilakukan oleh Menon (2012) yang membuktikan bahwa dengan menyingkirkan lapisan stratum korneum, memberikan daya permeabilitas yang meningkat dibandingkan permeabilitas membran kulit utuh.

Dari hasil penelitian ini selanjutnya disarankan dalam memformulasi APMS sebagai sediaan topikal perlu dipertimbangkan penggunaan *enhancer* yang bekerja dengan cara mempengaruhi struktur stratum korneum atau dipilih sistem penyampaian obat yang dapat mempengaruhi stratum korneum.

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel HC, 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi keempat, Jakarta : UI-Press, hal 490-492
- Barry BW, 1983. *Dermatological Formulation Percutaneous Absorption*, New York: Marcel Dekker Inc.
- Erawati T, Soeratri W, Hendradi E, Poerwanti T, Rosita N, 2011. Uji efektivitas asam para metoksisinamat sistem solid lipid nanopartikel dalam basis gel. *Laporan penelitian Project grant*, Fakultas Farmasi Unair
- Ganiswara SG, 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-4, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: Gaya Baru.
- Katzung BG, 2007. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. 10th ed. Jakarta: Salemba Medika, hal 589-590
- Menon GK, 2012. The structure and function of the stratum corneum, *International journal of Pharmaceutics*, 435, pp 3-8
- Riviere JE, 1993. Biological Factors in Absorption and Permeation, In: Zatz, J. A (Eds)., *Skin Permeation Fundamentals and Application*, Wheaton: Allured Publishing Corp, p. 113-125.
- Sadono, Hasmono D, 2000. Ketersediaan Hayati/ Profil Farmakokinetik Kristal APMS (Isolat Bahan Aktif Serbuk Rimpang Kencur) pada Hewan Coba Kelinci. *Laporan Penelitian*, Lemlit UNAIR.