Majalah Farmasi Indonesia, 12(2),72-78, 2001

IDENTIFIKASI METABOLIT PENTAGAMAVUNON-0 YANG ADA DI DALAM FESES SETELAH PEMBERIAN SECARA INTRAVENA PADA TIKUS PUTIH JANTAN GALUR SPRAGUE-DAWLEY

IDENTIFICATION OF PENTAGAMAVUNON-0 METABOLITE IN FAECES AFTER INTRAVENOUS INJECTION OF WHITE-MALE SPRAGUE DAWLEY-DERIVED RATS

Feriyanto Trisna Hadi, Sugiyanto, Oetari
Laboratorium Molekul Nasional Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Senyawa 2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin) siklopentanon atau Pentagamavunon-0 (PGV-0) sebagai calon obat anti-inflamasi baru, merupakan salah satu hasil modifikasi struktur kurkumin. Identifikasi metabolit di dalam feses dapat memperkuat informasi tentang biotransformasi obat secara menyeluruh dan dapat digunakan untuk mempelajari metabolit PGV-0 yang diekskresikan lewat empedu.

PGV-0 diberikan secara intravena dengan dosis 40 mg/kg BB pada tikus jantan. Feses dikumpulkan selama 24 dan 48 jam. Penelusuran adanya metabolit dibagi dalam dua bagian, yaitu dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dari feses. Pada feses yang diekskresikan dalam 24 jam ditemukan metabolit yang bersifat lebih polar dibanding PGV-0, berfluoresensi kuning lemah , dan mempunyai Rf = 0,48 pada kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel F_{254} dan fase gerak etil asetat. Dan tidak ditemukan metabolit PGV-0 glukuronida dan PGV-0 sulfat pada feses yang diekskresikan baik 24 jam maupun 48 jam.

Kata kunci : Pentagamavunon-0, biotransformasi, intravena, feses

ABSTRACT

The compound 2,5-bis-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzilidin) cyclopentanone or Pentagamavunon-0 (PGV-0) as the new anti-inflamatory drug candidate, is one of curcumin structure modification. Identification of metabolites in faeces could be strengthen the whole information about biotransformation of drug and could be use for studying on PGV-0 metabolites which are excreted through bile.

Male Sprague Dawley derived rats were used in all experiments. PGV-0 was given intravenously using dose at 40 mg/kg BB. Then the faeces callected after 24 and 48 hours. The metabolite investigation devided into two parts, etil acetate fraction and water fraction, of faeces. The faeces which is excreted after 24 hours, found was more-polar metabolite according to PGV-0; it has shoft-yellow flourencese and having Rf value = 0,48 on TLC, using silica gel F_{254} as the stationary phase and etil acetate as the mobile phase. No PGV-0 glucuronide and sulfate metabolites were detectable in faeces, which are excreted on 24 or 48 hours.

Key words : Pentagamavunon-0, biotransformation, intravenous, faeces

PENDAHULUAN

Pengetahuan tentang biotransformasi obat yang termasuk ruang lingkup farmakokinetika, menempati posisi penting dalam evaluasi keamanan dan kemanfaatan suatu obat. Dengan adanya proses biotransformasi ini, maka senyawa obat dan senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh akan diubah menjadi satu atau lebih metabolit yang umumnya bersifat polar, sehingga dapat lebih mudah diekskresikan dan tidak akan tinggal lama dalam tubuh yang bisa menimbulkan efek toksik (Castagnoli dan Low, 1982).

Senyawa 2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin) siklopentanon atau Pentagamavunon-0 (PGV-0) merupakan salah satu modifikasi struktur senyawa kurkumin baik pada rantai tengah maupun bagian aromatiknya, yaitu modifikasi gugus asetil aseton diganti dengan siklopentanon (Sardjiman, 1993). Studi

farmakokinetika yang telah dilakukan meliputi absorpsi, distribusi, dan ekskresi. Sedangkan proses biotransformasinya belum diketahui secara pasti.

Gambar 1. Struktur pentagamavunon-0 (PGV-0) atau 2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin) siklopentanon

Feses sebagai salah satu jalur ekskresi metabolit dapat memperkuat informasi tentang proses biotransformasi obat *in vivo* secara menyeluruh dan dapat digunakan untuk mempelajari metabolit yang diekskresikan melalui empedu (Valentine, 1983). Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi metabolit PGV-0 yang ada di dalam feses setelah pemberian secara intravena pada tikus putih jantan galur Sprague-Dawley. Sehingga dapat diketahui macam metabolit yang terbentuk dan jalur biotransformasi yang terjadi.

METODOLOGI

Bahan. Pentagamavunon-0 (PGV-0) dari Proyek Molekul Nasional, Fakultas Farmasi UGM, enzim arilsulfatase dan β-glukuronidase (Boehringer Mannheim, Germany), lempeng silika gel F_{254} tebal 0,25 mm (E. Merck).

Alat. Spektrofotometer *UV-Vis* (*Spectronic Genesis 5 Milton Roy*), bejana kromatografi, lampu *UV* (Shimadzu), *thermostatic water bath* (GFL type 1083) dan *metabolit cage*.

Cara kerja

Perlakuan terhadap subyek uji. Tikus putih jantan galur Sprague-Dawley dikandangkan di dalam *metabolit cage* selama percobaan. Sebelum pemberian obat, diambil feses yang dikumpulkan selama 24 jam sebagai feses kontrol. Hari selanjutnya tikus disuntik PGV-0 dosis 40 mg/kg BB dengan pelarut DMSO 50% (dalam air suling) secara intravena. Feses dikumpulkan selama 24 dan 48 jam berikutnya.

Identifikasi metabolit PGV-0 dalam feses. Feses dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 4 ml air suling lalu diaduk homogen. Kemudian diekstraksi dengan etil asetat (ditambahkan 3 ml etil asetat, vorteks selama 2 menit, lalu disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2500 rpm), sebanyak 2 kali. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C. Ekstrak yang didapat kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel F_{254} pendukung aluminium. Untuk mencari dan memisahkan metabolitnya digunakan fase gerak, antara lain etil asetat - CCl_4 (1:1)v/v dan etil asetat. Detektor yang digunakan adalah *UV* 254/366. Bercak yang dicurigai dipisahkan dengan kromatografi preparatif, lalu dilarutkan dalam etil asetat. Periksa spektranya pada spektrofotometer *UV-Vis.*

Fase air dibagi 3 bagian:

1. Hidrolisis dengan arilsulfatase
   Dua milliliter fraksi air ditambah 450 µl dapar asetat pH 5 dan 50 µl enzim arilsulfatase, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam (Nakamura *et al*., 1987).
2. Hidrolisis dengan β-glukuronidase
   Dua milliliter fraksi air ditambah 450 µl dapar asetat pH 5 dan 50 µl enzim β-glukuronidase, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit (Holder *et al*., 1978).
3. Hidrolisis dengan asam
   Dua milliliter fraksi air ditambah 500 µl HCl 0,66 N, diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit (Valentine, 1983).

Hasil perlakuan di atas kemudian diekstraksi dengan etil asetat. Fase etil asetat kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40°C. Hasilnya dielusi dengan fase gerak etil asetat-CCl_4 (1:1)v/v, detektor *UV* 254/366.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini penelusuran adanya metabolit dibagi dalam dua bagian berdasarkan tingkat kepolaran dari metabolit. Analisis fraksi etil asetat dilakukan untuk mencari metabolit yang larut dalam pelarut etil asetat. Sedangkan fraksi air digunakan untuk melihat adanya konjugat glukuronida dan sulfat yang larut dalam air.

Fraksi etil asetat dari feses

Di dalam fraksi etil asetat feses terdapat senyawa-senyawa endogen yang umumnya merupakan zat warna empedu, yaitu urobilin, bilirubin, dan biliverdin (With, 1968). Dan mungkin juga terdapat steroid (Valentine, 1983).

Untuk dapat memisahkan metabolit dari sampel biologis dapat digunakan kromatografi lapis tipis dengan pengembangan fase gerak yang sesuai. Fase gerak yang pertama adalah etil asetat-CCl_4 (1:1)v/v. Harga Rf nya pada tabel I.

Gambar 2 . Kromatogram hasil pemisahan fraksi etil asetat dengan etil asetat – CCl_4 (1:1)v/v; (1) kontrol, (2) perlakuan 24 jam, (3) perlakuan 48 jam, (3) pembanding PGV-0

Tabel I. Harga Rf dan warna fluoresensi hasil pemisahan fraksi etil asetat dengan etil asetat – CCl_4 (1:1)v/v (detektor *UV* 366)

Harga Rf Fraksi Etil Asetat			Fluoresensi	Pembanding PGV-0	
Kontrol	Perlakuan 24 jam	Perlakuan 48 jam		Rf	Fluoresensi
0,12	0,11	0,12	Biru	0,54	Kuning
0,20	0,19	0,20	Jingga		
0,29	0,29	0,29	Biru		
0,55	0,55	0,55	Biru		
0,80	0,79	0,79	Biru		
0,88	0,88	0,88	Jingga		

Hasil yang didapat ternyata tidak ditemukan PGV-0 pada feses perlakuan 24 dan 48 jam. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sarjiyani (2001). Profil kromatogram antara kontrol dan perlakuan adalah sama dan tidak ada bercak yang berbeda antara kontrol dan perlakuan.

Pengembangan dengan menggunakan fase gerak etil asetat ternyata menghasilkan bercak yang diduga metabolit (Gambar 1). Bercak tersebut berada di bawah dengan Rf = 0,48 (tabel II), yang berarti bersifat lebih polar dari PGV-0, karena lebih terikat kuat pada fase diam yang polar.

(a) semua fraksi etil (b) fraksi etil asetat perlakuan 24 jam

Gambar 3. Kromatogram hasil pemisahan dengan etil asetat, (1) kontrol, (2) perlakuan 24 jam, (3) perlakuan 48 jam, (4) pembanding PGV

Tabel II. Harga Rf dan warna fluoresensi hasil pemisahan fraksi etil asetat dengan etil asetat

(a) semua fraksi

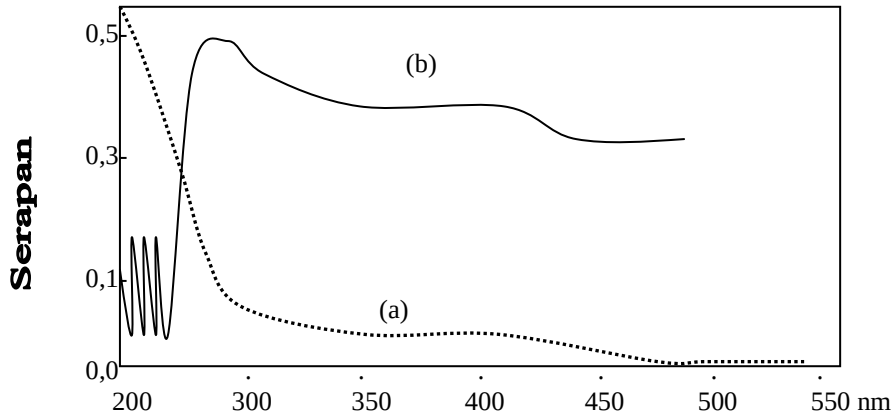
Fraksi Etil Asetat						Pembanding PGV-0	
Kontrol		Perlakuan 24 jam		Perlakuan 48 jam			
Rf	Fluoresensi	Rf	Fluoresensi	Rf	Fluoresensi	Rf	Fluoresensi
0,23	Jingga	0,24	Jingga	0,25	Jingga		
0,36	Biru	0,38	Biru	0,38	Biru		
		0,45	Kuning			0,55	Kuning
0,49	Biru	0,50	Biru	0,47	Biru		
0,59	Jingga	0,59	Jingga	0,57	Jingga		

(b) fraksi etil asetat perlakuan 24 jam

Fraksi Etil Asetat Perlakuan 24 jam		Pembanding PGV-0	
Rf	Fluoresensi	Rf	Fluoresensi
0,26	Jingga		
0,40	Biru		
0,48	Kuning	0,56	Kuning
0,55	Biru		
0,64	Jingga		

Senyawa yang diekskresikan dalam waktu 24 jam itu berfluoresensi kuning pada penyinaran dengan *UV* 366, yang berarti masih mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi seperti PGV-0. Bertambahnya polaritas mungkin disebabkan masuknya gugus fungsional yang bersifat menaikkan polaritas, atau kehilangan gugus $-CH_3$.

Untuk dapat mengisolasi senyawa pada KLT, harus digunakan fase gerak yang mempu memisahkan senyawa itu dengan baik, maka digunakan fase gerak kloroform-etil asetat (5:1)v/v. Kromatogram yang terjadi berbentuk pita yang terpisah satu sama lain. Identifikasi lebih lanjut digunakan spektrofotometer *UV-Vis*, yang dapat dilihat hasilnya pada gambar 2.



.

Gambar 4. Spektra isolat hasil pemisahan dengan kloroform – etil asetat (5:1)v/v
(a) dalam pelarut etanol(b) dalam pelarut etil asetat

Melihat gambar 4 hasil pemisahan dengan kloroform-etil asetat, yang diuji dengan spektrofotometer UV-Vis hanya ada puncak 266 nm untuk spektrum b dan spektrum a tidak tampak puncak yang kuat,

sehingga kromofor yang diperlihatkan pada pelacak bercak dengan UV 366 nm tidak menunjukkan sinkroni sasi hasil. Hal itu menunjukkan bahwa sebenarnya telah terjadi pengurangan ikatan rangkap yang terdapat pada pentagaamavunon-O.

Fraksi air dari feses

Hasil hidrolisis konjugat sulfat dengan aril sulfatase menghasilkan senyawa induk/metabolitnya yang kurang larut dalam air sehingga dapat diekstraksi dengan etil asetat. Pengembangan dengan etil asetat : CCl_4 (1:1)v/v digunakan untuk mendeteksi adanya PGV-0 bebas. Hasil kromatogram memperlihatkan profil yang sama, begitu juga dengan fluoresensinya. Dengan demikian berarti tidak ada perubahan yang berarti akibat perlakuan hidrolisis dengan arilsulfatase atau tidak ada senyawa obat atau metabolit yang terbebaskan dari hidrolisis ini.

Di dalam feses terdapat metabolit empedu, yaitu glukuronida bilirubin, maka metode pemisahan dengan kromatografi diperlukan untuk mengidentifikasi hasil pecahan konjugat itu. Ternyata hasil pemisahan memberikan kromatogram yang sama dengan kontrol, begitu juga dengan fluoresensi yang dihasilkan. Sehingga hasil hidrolisis ini tidak menghasilkan PGV-0 utuh, yang terkonjugasi dengan gugus glukuronida.

Konjugat glukuronida dapat dipecah secara non enzimatik, yaitu dengan larutan asam klorida (Valentine, 1983). Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis, fase gerak etil asetat : CCl_4 (1:1)v/v ternyata menghasilkan pola kromatogram yang sama dengan hidrolisis menggunakan enzim β-glukuronidase. Dan tidak ada bercak yang sejajar dengan pembanding PGV-0. Tidak ditemukannya metabolit PGV-0 glukuronida di dalam fraksi air dari feses, yang dihidrolisis dengan enzim β-glukuronidase maupun asam, mungkin disebabkan adanya peristiwa reduksi, seperti halnya kurkumin, sehingga PGV-0 utuh tidak dapat ditemukan dari hasil hidrolisis ini.

KESIMPULAN

Pada feses yang diekskresikan dalam 24 jam ditemukan metabolit yang lebih polar dibanding PGV-0, berfluoresensi kuning lemah, dengan Rf = 0,48 pada kromatografi lapis tipis, fase diam silika gel F_{254}, fase gerak etil asetat. Tidak ditemukan metabolit PGV-0 glukuronida dan PGV-0 sulfat di dalam feses yang diekskresikan baik 24 jam maupun 48 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih, kami haturkan kepada Grand Que Project atas seluruh pembiayaan yang diberikan dalam penelitian ini dan Pengelola Laboratorium Molekul Nasional atas segala fasilitas yang disediakan.

DAFTAR PUSTAKA

Castagnoli dan Low, 1982, Perubahan Metabolik Obat dan Senyawa Organik Sejenis, in Doerge, R. F., (Ed.), *Buku Text Wilson dan Gisvold, Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*, diterjemahkan oleh Achmad Mustofa Fatah, Semarang Press, Semarang, hal 155.

Holder, G. M., Plummer, J. L. and Ryan, A. J., 1978, The Metabolism and Excretion of Curcumin (1,7-Bis-(4-hydroksi-3-methoxy-phenyl)-1,6 heptadiene-3,5-dione) in the Rat. *Xenobiotica* **8** *(12*): 761 –768.

Nakamura, J., Baba, S., Nakamura, T., Sasaki, H. and Shibasaki, J., 1987, A Method for the Preparation of Calibration Curves for Acetaminophen Glucuronide and Acetaminophen Sulfate in Rabbit Urine Without Use of Authentic Compounds in High Performance Liquid Chromatography, *J. Pharmacobio-Dyn*, **10**: 673 – 677.

Sardjiman, 1993, *Sintesis 2,6-Bis-(3,5-dimetil-4-hidroksibenzilidin)sikloheksanon; 2,5-Bis-(3,5-dimetil-4-hidroksibenzilidin)siklopentanon dan Pentadien – 3-on dan Daya Antioksidasinya*, laporan penelitian, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta, 22-23.

Sarjiyani, 2001, *Jumlah Pentagamavunon-0 yang Diekskresikan dalam Tinja dan Urin selama 72 jam setelah Pemberian Intravena pada Tikus Betina Galur Sprague-Dawley*, Skripsi S-1, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, hal 46.

Valentine, J. L., 1983, Preanalitical Methodology for Drug Analysis in Biological Fluids, in Garret, E. R., and Hirtz, J. I., (Eds.), *Drug Fate and Metabolism ; Methods and Techniques*, vol 4, Marcel and Dekker, Inc., New York, hal 177-180.

With, T. K., 1968, *Bile Pigments: Chemical, Biological, and Clinical Aspect*, translated by Kennedy, J. P., Academic Press, New York, hal 585-586.