

Uji toksisitas akut senyawa poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena sebagai antidotum keracunan logam berat

Susy Yunita Prabawati^{1*}, Jumina², Mustofa³, Sri Juari Santosa²

¹Program Studi Kimia

Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta
Jl. Marsda Adisucipto No. 1 Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. 55281

²Departemen Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Jl. Geografi Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. 55281

³Bagian Farmakologi dan Terapi

Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Jl. Farmako Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. 55281

*E-mail: susy.prabawati@uin-suka.ac.id

Abstrak: Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi senyawa poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena (PMK[6]H) sebagai antidotum keracunan logam berat dengan melihat ketoksikan akut (LD₅₀) dan menilai gejala klinis akibat pemberian PMK[6]H pada mencit jantan dan betina. Penelitian ini mengikuti rancangan acak lengkap dengan menggunakan mencit jantan dan betina galur Balb/C, sehat, umur 2-3 bulan dengan berat sekitar 20 gram. Percobaan terdiri dari 5 kelompok mencit jantan dan 5 kelompok mencit betina @ 5 ekor (satu kelompok sebagai kontrol). Tiap kelompok dosis uji diberikan PMK[6]H dengan 4 tingkat dosis uji (260; 130; 65; 32,5 mg/kgBB). Dilakukan pengamatan gejala klinis dan jumlah kematian yang terjadi pada hewan uji pada 3 jam pertama pemberian bahan uji hingga 24 jam, kemudian pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari untuk menentukan nilai LD₅₀. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal bahan uji tidak memberikan pengaruh terhadap gejala-gejala klinis yang timbul dan tidak menunjukkan gejala-gejala aneh timbulnya keracunan. Pemberian dosis tunggal bahan uji pada mencit jantan dan betina juga tidak menimbulkan kematian pada seluruh kelompok perlakuan. Diperoleh nilai LD₅₀ dari PMK[6]H > 260 mg/kgBB untuk mencit jantan dan betina. Hasil analisis ANOVA terhadap perbedaan berat organ mencit baik jantan maupun betina, secara umum memberikan hasil bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari berbagai berat organ vital dari 5 kelompok perlakuan yang ada. Dengan demikian senyawa PMK[6]H cukup aman untuk digunakan sebagai antidotum keracunan logam berat.

Kata Kunci: antidotum, LD₅₀, logam berat, poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena, toksisitas akut

Abstract: This study was conducted to determine the potential of poly-monoallyloxy-calix[6]arene (PMK[6]H) compounds as antidotes for heavy metal poisoning by observing acute toxicity (LD₅₀) and assessing clinical symptoms due to administration of PMK[6]H in male and female mice. This study followed a completely randomized design using male and female mice of the Balb/C strain, healthy, aged 2-3 months with a weight of around 20 grams. The experiment consisted of 5 groups of male mice and 5 groups of female mice @ 5 mice (one group as a control). Each test dose group was given PMK[6]H with 4 test dose levels (260; 130; 65; 32.5 mg/kgBW). Observations were made on clinical symptoms and the number of deaths that occurred in test animals in the first 3 hours of administration of the test material up to 24 hours, then observations were continued for up to 14 days to determine the LD₅₀ value. The results of the study showed that administration of a single dose of the test material did not affect the clinical symptoms that arose and did not show any strange symptoms of poisoning. Single dose administration of test material to male and female mice also did not cause death in all treatment groups. The LD₅₀ value of PMK[6]H was obtained > 260 mg/kgBW for male and female mice. The results of ANOVA analysis of the differences in organ weight of both male and female mice, generally showed that there was no significant difference in the various vital organ weights of the 5 treatment groups. Thus, the PMK[6]H compound is safe enough to be used as an antidote for heavy metal poisoning.

Keywords: antidote, LD₅₀, heavy metal, poly-monoallyloxy-calix[6]arene, acute toxicity

PENDAHULUAN

Kelompok senyawa kaliksarena merupakan salah satu bahan sintesis yang cukup potensial untuk dikembangkan. Kaliksarena termasuk dalam kelompok senyawa makromolekul yang mengandung cincin aromatis dalam suatu deret siklis yang dihubungkan oleh gugus metilen (Santos, 2021). Senyawa ini dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan termasuk sebagai obat ataupun antidotum keracunan logam berat (Yang & Villiers, 2005; Paul et al., 2023). Hal ini dikarenakan keunikan dari struktur geometri dan terdapatnya gugus-gugus aktif pada kaliksarena.

Logam berat dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui berbagai cara seperti inhalasi melalui asap pabrik, kontaminasi alat masak pada makanan atau melalui proses rantai makanan di lingkungan. Penanganan umum yang diberikan kepada individu yang mengalami keracunan logam berat adalah dengan memberikan suatu antidotum. Senyawa makrosiklik turunan kaliksarena dapat berpotensi sebagai obat/antidotum keracunan logam berat karena struktur kaliksarena yang memiliki gugus-gugus aktif seperti $-OH$, $-SH$, dan $C=O$. Gugus-gugus inilah yang berperan dalam pembentukan senyawa pengkelat dengan ion logam.

Penelitian kaliksarena dalam bidang kedokteran diawali oleh Archimbaud et al. (1994). Hasil penelitiannya secara *in vivo* menunjukkan bahwa senyawa kaliks[6]sulfonat dan kaliks[8]sulfonat dapat digunakan sebagai antidotum keracunan uranium yaitu mampu menurunkan kadar uranium dalam ginjal tikus. Penelitian kemudian semakin berkembang pada beberapa tahun belakangan ini seperti dilaporkan oleh Yuksel et al. (2021) yang menyelidiki sifat adsorpsi dan sensor senyawa kaliks[4]arena terhadap obat antivirus favipiravir menggunakan metode DFT (*Density Functional Theory*). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa senyawa kaliks[4]arena memiliki potensi sebagai sensor elektronik dan sensor fungsi untuk mendeteksi molekul favipiravir. Molekul ini banyak digunakan dalam pengobatan penyakit Covid-19 yang baru-baru ini muncul. Potensi senyawa kaliks[4]arena dan kaliks[6]arena juga mulai dikembangkan sebagai kandidat obat antitumor dan antiHIV (Bezouska et al., 2010; Kamada et al., 2010; Tsou et al., 2010; Oguz et al., 2020). Selain itu pemanfaatan turunan kaliksarena ternyata juga efektif sebagai antibakteri dan antimikroba (Utomo et al., 2019; Surphik et al., 2020). Kemajuan terkini di dalam bidang kimia makromolekul berbasis kaliksarena menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki potensi besar dalam mengatasi toksisitas kemoterapi kanker dan mencapai pengiriman obat yang ditargetkan (Paul, 2023).

Sebagai kandidat obat, maka suatu bahan harus memenuhi persyaratan aman dan bermanfaat yang didasarkan pada bukti data yang sah (Basilotta et al., 2021). Penggunaan suatu bahan sebagai obat, harus sesuai standar resmi yang menyatakan dosis lazim/dosis maksimum. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya efek samping akibat menggunakan obat yang melebihi dosis standar atau dosis lazim. Uji toksisitas akut merupakan bagian dari uji pra-klinik. Uji toksisitas akut bertujuan untuk menetapkan LD_{50} (dosis mematikan pada 50% sampel) dan mengevaluasi gejala toksik, efek toksik yang mungkin terjadi, serta mekanisme kematian. Fokus uji toksisitas akut adalah untuk mendeteksi adanya toksisitas suatu zat, mengidentifikasi organ yang rentan, dan mengumpulkan informasi mengenai risiko setelah pemberian zat secara akut. Selain itu, uji ini memberikan data awal yang berguna untuk menentukan dosis yang perlu diuji pada tahap toksisitas berikutnya. Evaluasi ini dilakukan dalam rentang waktu 24 jam hingga 30 hari setelah pemberian senyawa untuk mengukur efek toksiknya (Sastyarina, 2013). Pada penelitian uji toksisitas akut paling tidak digunakan 4 peringkat dosis. Dosis dibuat

sebagai suatu peringkat dengan kelipatan logaritmik yang tetap. Dosis terendah merupakan dosis yang tidak menyebabkan timbulnya efek atau gejala keracunan, dan dosis tertinggi merupakan dosis yang menyebabkan kematian semua (100%) hewan uji (Penny et al, 2022).

Struktur geometri dan gugus-gugus aktif yang dimiliki oleh PMK[6]H, sangat memungkinkan untuk membentuk khelat dan dimanfaatkan sebagai antidotum keracunan logam berat. Meskipun telah dilakukan sintesis dan karakterisasi senyawa PMK[6]H oleh Prabawati et al. (2011), namun sejauh ini belum ada laporan uji toksisitas akut secara in vivo, sehingga penelitian ini merupakan studi awal untuk mengevaluasi keamanannya untuk mengetahui efek toksik yang dapat menimbulkan potensi toksisitas akut dari PMK[6]H sehingga aman untuk digunakan sebagai suatu kandidat obat.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan satu jenis hewan uji yaitu mencit jantan dan mencit betina, galur Balb/C yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UGM, yang berumur 2-3 bulan dengan bobot sekitar 20 gram. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena (PMK[6]H) hasil sintesis Prabawati et al. (2011), CMC-Na (Merck), dan formalin teknis 10%. Sedangkan spuit injeksi dan jarum oral No.14, neraca analitis, timbangan mencit, stirrer, seperangkat alat gelas (gelas beker, gelas ukur, labu takar, pipet, gelas arloji), seperangkat alat bedah (gunting, pinset).

Percobaan terdiri dari 5 kelompok mencit jantan dan 5 kelompok mencit betina, masing-masing kelompok 5 ekor (satu kelompok sebagai kontrol). Tiap kelompok dosis uji diberikan PMK[6]H dengan 4 tingkat dosis uji, yaitu:

1. Kelompok 1: kelompok kontrol diberi 1 ml larutan CMC-Na 0,5 % secara oral dosis tunggal
2. Kelompok 2: kelompok dosis terbesar, diberi sediaan uji dengan dosis 260 mg/kgBB secara oral dosis tunggal
3. Kelompok 3: diberi sediaan uji dengan dosis 130 mg/kgBB secara oral dosis tunggal
4. Kelompok 4: diberi sediaan uji dengan dosis 65 mg/kgBB secara oral dosis tunggal
5. Kelompok 5: kelompok dosis terendah, diberi sediaan uji dengan dosis 32,5 mg/kgBB secara oral dosis tunggal

Pengamatan gejala klinis terhadap hewan uji dilakukan pada 3 jam pertama pemberian bahan uji hingga 24 jam, kemudian pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari. Kriteria pengamatan meliputi pengamatan fisik dan diamati pula jumlah kematian yang terjadi pada hewan uji untuk menentukan nilai LD₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan gejala klinis yang timbul setelah pemberian PMK[6]H meliputi pengamatan terhadap tingkah laku mencit, seperti aktivitas lokomotorik, reaksi-reaksi aneh, suara, interaksi terhadap sekitar, tremor, kondisi mata dan bulu. Perilaku mencit setelah pemberian dosis tunggal ini diamati untuk mengetahui adanya pengaruh bahan uji terhadap gejala-gejala keracunan. Data pengamatan gejala klinis dari masing-masing hewan uji dapat ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Gejala klinis hewan uji pada uji toksisitas akut dari PMK[6]H

Kelompok	Perlakuan	Jenis	N	Gejala toksik
I	Kontrol	Jantan	5	-
		Betina	5	-
II	Dosis 1: 260 mg/kgBB	Jantan	5	-

		Betina	5	-
III	Dosis 2: 130 mg/kgBB	Jantan	5	-
		Betina	5	-
IV	Dosis 3: 65 mg/kgBB	Jantan	5	-
		Betina	5	-
V	Dosis 4: 32,5 mg/kgBB	Jantan	5	-
		Betina	5	-

Keterangan: - = tidak timbul gejala keracunan; + = timbul gejala keracunan

Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal bahan uji tidak memberikan pengaruh terhadap gejala-gejala klinis yang timbul. Pengamatan gejala klinis diamati pada 3 jam pertama, 24 jam sampai dengan 14 hari. Sampai dengan hari ke-14, tidak ada tanda-tanda keracunan yang timbul akibat pemberian bahan uji. Semua hewan uji pada setiap peringkat dosis bahan uji, tidak menunjukkan gejala-gejala aneh timbulnya keracunan. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pemberian dosis tunggal PMK[6]H dengan dosis 260, 130, 65, dan 32,5 mg/kgBB tidak memengaruhi perilaku mencit jantan dan betina dibandingkan dengan kelompok kontrol selama pengamatan intensif mulai 3 jam pertama sampai dengan 14 hari pengamatan.

Pengamatan terhadap jumlah kematian pada hewan uji juga dilakukan untuk menentukan nilai LD₅₀ dari PMK[6]H. Hasil uji toksisitas akut disajikan pada Tabel 2.

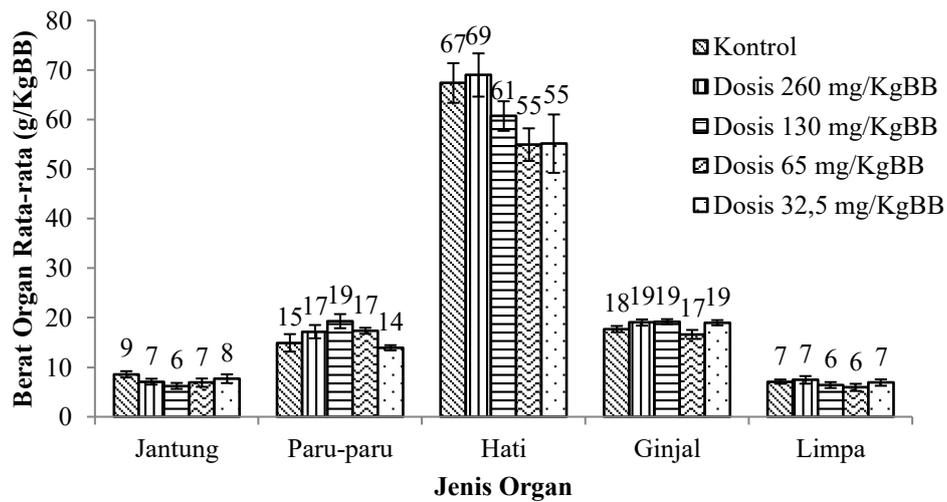
Tabel 2. Hasil uji toksisitas akut PMK[6]H menggunakan mencit

Kelompok	Perlakuan	Jenis	N	Jumlah yang mati	LD ₅₀ semu
I	Kontrol	Jantan	5	0	LD ₅₀ > 260 mg/KgBB
		Betina	5	0	
II	Dosis 1: 260 mg/kgBB	Jantan	5	0	
		Betina	5	0	
III	Dosis 2: 130 mg/kgBB	Jantan	5	0	
		Betina	5	0	
IV	Dosis 3: 65 mg/kgBB	Jantan	5	0	
		Betina	5	0	
V	Dosis 4: 32,5 mg/kgBB	Jantan	5	0	
		Betina	5	0	

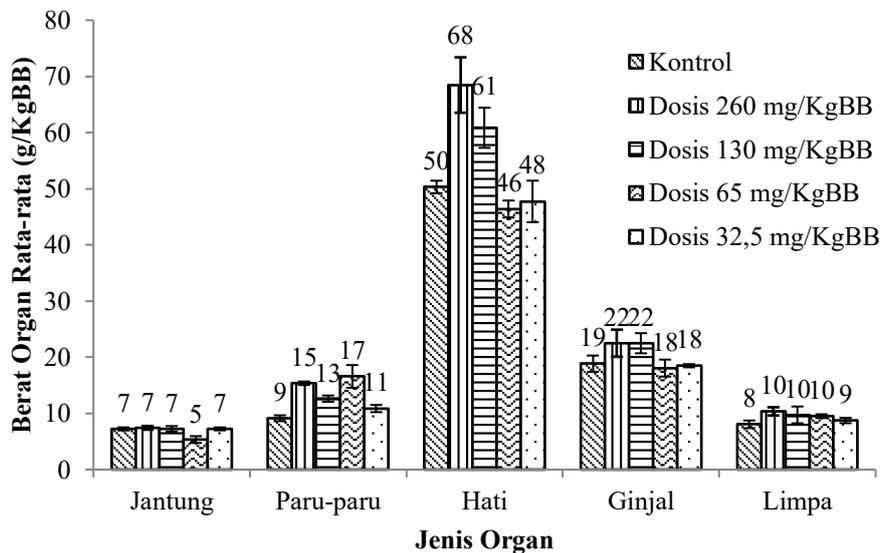
Keterangan: 0 = tidak timbul gejala keracunan

Hasil pengamatan sebagaimana terlihat pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal bahan uji pada mencit jantan dan betina tidak menimbulkan kematian pada seluruh kelompok perlakuan baik terhadap kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dengan dosis tertinggi. Dengan demikian nilai LD₅₀ dari bahan uji PMK[6]H tidak dapat ditentukan, tetapi hanya dapat ditentukan sebagai nilai LD₅₀ semu saja. Pemberian bahan uji hingga dosis terbesar secara teknis tidak menimbulkan kematian hewan uji, sehingga dapat dikatakan nilai LD₅₀ PMK[6]H adalah lebih besar dari 260 mg/KgBB untuk mencit jantan dan betina.

Pada hari ke-14 mencit dibedah untuk diambil beberapa organ penting seperti jantung, paru-paru, hati, ginjal dan limpa. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian bahan uji PMK[6]H terhadap organ-organ tersebut. Perubahan berat organ pada mencit jantan dan betina (dalam g/kgBB) mencit pada hari ke-14, ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Histogram berat organ mencit jantan pada uji toksisitas akut



Gambar 2. Histogram berat organ mencit betina pada uji toksisitas akut

Hasil uji statistik dengan menggunakan analisis ANOVA *One-way* untuk menguji apakah ada perbedaan berat organ jantung, paru-paru, hati, ginjal dan limpa pada mencit jantan dan betina pada uji toksisitas akut ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil analisis uji ANOVA *One-way* dari berat organ mencit jantan dan betina dibandingkan dengan kontrol

Jenis organ	Jenis mencit	Keterangan
Jantung	Jantan	TB
	Betina	TB
Paru-paru	Jantan	TB
	Betina	B
Hati	Jantan	B
	Betina	B
Ginjal	Jantan	TB
	Betina	B
Limpa	Jantan	TB
	Betina	TB

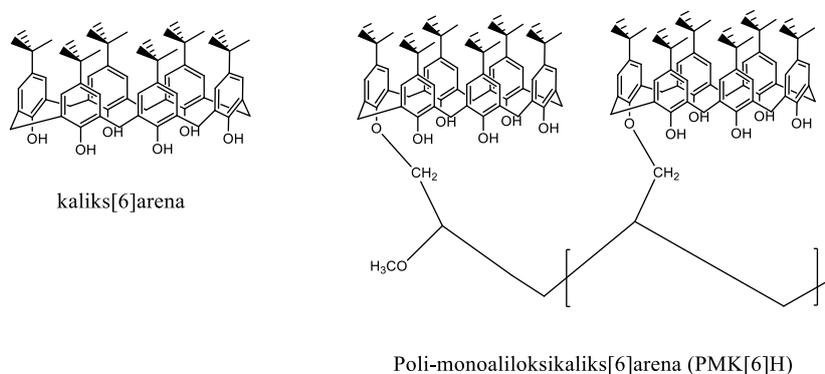
Keterangan: B = berbeda bermakna; TB = tidak berbeda bermakna

Hasil uji ANOVA *One-way* untuk berat jantung mencit jantan diperoleh nilai signifikansi yaitu sebesar 0,237 ($>0,05$). Hal ini berarti bahwa tidak ada perbedaan berat jantung pada mencit jantan dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat paru-paru mencit jantan diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,592 ($>0,05$) yang berarti bahwa tidak ada perbedaan berat paru-paru pada mencit jantan dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat hati mencit jantan diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,002 ($< 0,05$) maka berarti ada perbedaan berat hati pada mencit jantan dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat ginjal mencit jantan diperoleh nilai signifikansi yaitu sebesar 0,575 ($>0,05$). Hal ini berarti bahwa tidak ada perbedaan berat ginjal pada mencit jantan dari 5 perlakuan dosis yang ada. Sementara itu untuk berat limpa mencit jantan memberikan hasil bahwa berat limpa paling berat adalah pada kelompok II (Dosis 260 mg/KgBB) sebesar 0,1565 g (SD=0,0167) dan terendah pada kelompok IV (Dosis 65 mg/KgBB) sebesar 0,1246 g (SD=0,0152). Dari hasil uji ANOVA diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,711 ($>0,05$) yang berarti bahwa tidak ada perbedaan berat hati pada mencit jantan dari 5 perlakuan dosis yang ada.

Hasil uji ANOVA *One-way* untuk berat jantung mencit betina diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,062 ($>0,05$). Hal ini berarti bahwa tidak ada perbedaan berat jantung pada mencit betina dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat paru-paru mencit betina diperoleh nilai signifikansi yaitu sebesar 0,021 ($< 0,05$) maka ada perbedaan berat paru-paru pada mencit betina dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat hati mencit betina diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,007 ($< 0,05$) maka ada perbedaan berat hati pada mencit betina dari 5 perlakuan dosis yang ada. Untuk berat ginjal mencit betina diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,015 ($< 0,05$) maka ada perbedaan berat ginjal pada mencit betina dari 5 perlakuan dosis yang ada. Sedangkan untuk berat limpa mencit betina memberikan hasil bahwa berat limpa paling berat adalah pada kelompok II (Dosis 260 mg/KgBB) sebesar 0,2590 g (SD=0,0183) dan terendah pada kelompok I (kontrol) sebesar 0,2015 g (SD=0,0170). Dari hasil uji ANOVA diperoleh nilai signifikansi yaitu sebesar 0,323 ($>0,05$) maka berarti tidak ada perbedaan berat limpa pada mencit betina dari 5 perlakuan dosis yang ada.

Berdasarkan analisis ANOVA terhadap perbedaan berat organ mencit baik jantan maupun betina, secara umum memberikan hasil bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna dari berbagai berat organ vital pada mencit yaitu jantung, paru-paru, hati, ginjal dan limpa dari 5 kelompok perlakuan yang ada. Hal ini berarti bahwa pemberian dosis bahan uji pada berbagai tingkat dosis tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap perubahan berat organ mencit setelah perlakuan. Dari data-data yang diperoleh pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian bahan uji tidak memberikan perbedaan berat organ mencit baik jantan maupun betina dibandingkan dengan kontrol sehingga dapat dikatakan bahan uji cukup aman untuk digunakan. Hal ini didukung pula dari hasil pengamatan secara makroskopis, bahwa tidak terlihat adanya kerusakan pada organ-organ tersebut. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan hasil penelitian beberapa tahun terakhir dalam penggunaan molekul makrosiklik kaliksarena sebagai penghantar obat dan sistem sensor obat (Galindo et al., 2014; Kumar et al., 2019). Turunan kaliks[n]arena memberikan beberapa keuntungan dengan sifat dari gugus-gugus fungsional seperti gugus R-SO₃H, *tert*-butil, *iso*-propil, -COOH dan -OH pada bagian atas dan bawah kaliksarena, stabilitas kimianya, rongga hidrofobik, toksisitas nol, dan profil pelepasan terkontrol yang membuat kaliksarena cocok untuk penyerap dan sensor obat (Yuksel, 2021).

Senyawa poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena (PMK[6]H merupakan senyawa baru hasil turunan dari kaliks[6]arena. Gambar 3 merupakan gambar struktur dari senyawa kaliks[6]arena dan poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena.



Gambar 3. Struktur senyawa kaliks[6]arena dan poli-monoaliloksikaliks[6]arena

Struktur geometri senyawa kaliks[6]arena yang menyerupai keranjang memungkinkan senyawa ini dapat diaplikasikan sebagai senyawa anti racun (antidotum) keracunan logam berat. Dalam keadaan terpolimerisasi, maka lingkaran gugus -OH dan rongga molekul kaliks[6]arena akan tersusun berjajar secara teratur membentuk struktur yang menyerupai terowongan. Situs-situs aktif tempat terjadinya pengikatan ion logam juga menjadi lebih banyak dan tersebar secara merata dalam suatu rantai polimer. Demikian pula dengan PMK[6]H, ditinjau dari struktur kimianya, PMK[6]H juga memiliki gugus-gugus aktif yaitu -OH dalam jumlah yang lebih banyak dalam setiap molekulnya sehingga diharapkan juga akan mampu membentuk kelat dan dapat dimanfaatkan sebagai antidotum keracunan logam berat. Kaliksarena dapat berfungsi sebagai *carrier* (pembawa) obat karena mampu membentuk kompleks inklusi dengan molekul obat, meningkatkan kelarutan dan stabilitasnya. Hal ini karena kaliksarena membentuk kompleks inklusi dengan molekul obat melalui interaksi Van der Waals, ikatan hidrogen, dan interaksi hidrofobik (jika obat bersifat nonpolar) (Paul et al., 2023).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data secara kualitatif maupun kuantitatif maka dapat dikatakan bahwa secara umum pemberian sediaan uji berupa poli-monoaliloksi-kaliks[6]arena (PMK[6]H) pada mencit jantan dan betina galur Balb/C dari dosis uji terendah (32,5 mg/kgBB) sampai dengan dosis tertinggi (260 mg/kgBB) tidak menimbulkan efek toksik yang berarti. Potensi ketoksikan akut (LD₅₀) dari PMK[6]H yaitu 260mg/kgBB karena pemberian bahan uji hingga dosis tertinggi tidak menimbulkan kematian hewan uji. Hasil analisis ANOVA terhadap perbedaan berat organ vital, sebagian besar menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini didukung dengan hasil pengamatan secara makroskopis, bahwa tidak terlihat adanya kerusakan pada organ-organ tersebut. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa hasil uji awal (pra-klinik) dari bahan uji cukup aman untuk digunakan sebagai suatu kandidat obat dan diperlukan uji toksisitas sub-akut, sub-kronik, atau kronik lanjutan untuk dapat digunakan sebagai obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Archimbaud, M., Henge-Napoli, M.H., Liliebaum, D., Desloges, M., & Montagne, C. (1994). Application of calixarenes for the decorporation of uranium: present limitation and further trends. *Radiat. Prot. Dosim.*, 53(1-4), 327-330. <https://doi.org/10.1093/rpd/53.1-4.327>.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2022). *Panduan Penyusunan Protokol Uji Praklinik Uji Toksisitas Akut*. Jakarta: Direktorat Registrasi Obat Tradisional, Suplemen Kesehatan dan Kosmetik, Badan Pengawas Obat dan Makanan.
- Basilotta, R.; Mannino, D.; Filippone, A.; Casili, G.; Prestifilippo, A.; Colarossi, L.; Raciti, G.; Esposito, E.; & Campolo, M. (2021). Role of calixarene in chemotherapy delivery strategies. *Molecules*, 26(3963), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules26133963>.
- Bezouška, K., Šnajdrová, R., Kr`enek, K., Vanc`urová, M., Kádek, A., Adámek, D., Lhoták, P., Kavan, D., Hofbauerová, K., Man, P., Bojarová, P., & Kr`en, V. (2010). Carboxylated calixarenes bind strongly to CD69 and protect CD69+ killer cells from suicidal cell death induced by tumor cell surface ligands. *Bioorgan. Med. Chem.*, 18, 1434–1440. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.01.015>.
- Galindo-Murillo, R., Olmedo-Romero, A., Cruz-Flores, E., Petrar, P., Kunsagi-Mate, S., & Barroso-Flores, J. (2014). Calix[n]arene-based drug carriers: A DFT study of their electronic interactions with a chemotherapeutic agent used against leukemia, *Computational and Theoretical Chemistry*, 1035, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2014.03.001>.
- Kamada, R., Yoshino, W., Nomura, T., Chuman, Y., Imagawa, T., Suzuki, T., & Sakaguchi, K. (2010). Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tumor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(15), 4412–4415. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.06.053>.
- Kumar, R., Sharma, A., Singh, H., Suating, P., Kim, H.S., Sunwoo, K., Shim, I., Gibb, B.C., & Kim, J.S. (2019). Revisiting fluorescent calixarenes: From molecular sensors to smart materials. *Chem. Rev.*, 119 (16), 9657–9721. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00605>.
- Oguz, M., Gul, A., Karakurt, S., & Yilmaz, M. (2020). Synthesis and evaluation of the antitumor activity of Calix[4]arene L-proline derivatives. *Bioorganic Chemistry.*, 94(103207), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103207>.
- Paul, S., Jeyaprakash, R.S., Venkatachalam, H., & Jayashree, B.S. (2023). Calixarenes and their Relevance in Anticancer Drug Development. *Medicinal Chemistry*, 19(10), 939-945. <https://doi.org/10.2174/1573406419666230703114605>.
- Prabawati, S.Y., Jumina, J., Santosa, S. J., & Mustofa, M. (2011). Synthesis of a series of Calix[6]arenes Polymer from *p-ter*-buthylphenol. *International Conference on Bioscience and Biotechnology*, 1(1), 93-100.
- Santos, M. B., and Marcos, P. M. (2021). *Calixarene Complexes: Synthesis, Properties and Applications*. Switzerland: MDPI.
- Satriyana, Y. (2013). Uji toksisitas akut dan subakut pada pemberian ekstrak etanol bawang tiwai (*Eleutherine Americana* Merr.). *J. Trop. Pharm. Chem.*, 2(2), 118-124.
- Shurpik, D. N., Padnya, P. L., Stiokov, I. I., & Cragg P. J. (2020). Antimicrobial activity of calixarenes and related macrocycles. *Molecules*, 25(21), 1-32. <https://doi.org/10.3390/molecules25215145>.
- Tsou, L. K., Dutschman, G. E., Gullen, E. A., Telpoukhovskaia, M., Yung-Chi, C., & Hamilton, A. D. (2010). Discovery of a synthetic dual inhibitor of HIV and HCV infection based on a tetrabutoxy-calix[4]arene scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(7), 2137–2139. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.043>.
- Yang, W., & Villiers, M. M., (2005). Effect of 4-sulphonato-calix(n)arene and cyclodextrins on the solubilization of niclosamide, a poorly water soluble anthelmintic. *The AAPS Journal*, 7(1): 241-248. <https://doi.org/10.1208/aapsj070123>.
- Yuksel, N., Köse, A., & Fellah, M. F. (2021). The supramolecularly complexes of calix[4]arene derivatives toward favipiravir antiviral drug (used to treatment of COVID-19): a DFT study on the geometry optimization, electronic structure and infrared spectroscopy of adsorption and sensing. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 101(1-2), 77–89. <https://doi.org/10.1007/s10847-021-01087-1>.