

-  [Dashboard](#)
-  [Explore SINTA](#)
-  [Mutation History](#)
-  [List Verificator PT](#)
-  [My SINTA](#)
-  [Covid-19](#)

DETAIL DOCUMENT

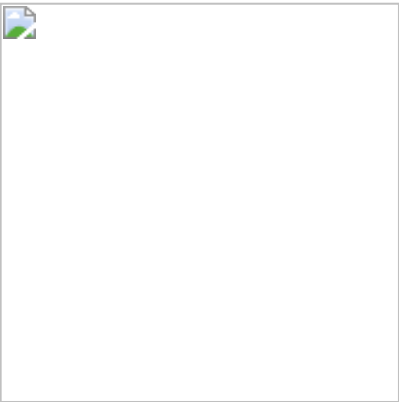
Research

Detail Research

Verified by Maria Dwi Budi Jumpowati at 2022-08-13 21:07:04

NIDN Leader
0520077201

Leader Name
SRI HARTATI YULIANI



PDDIKTI Code PT (Leader)
051012

Institution (Leader)
Universitas Sanata Dharma

Title

Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe

Skema Abbreviation
PTUPT

Skema Name
Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi

The First year of the proposal
Tahun Pertama Usulan
2016

Proposed Year of Activities
Tahun Usulan Kegiatan
2017

The Year of The Activity
Tahun Pelaksanaan Kegiatan
2018

Duration of activity
Lama Kegiatan
3 Year

Proposal Status
didanai

Funds are approved
Rp. 50.000.000,-

SINTA Afiliasi ID
422

Funds Institution
Universitas Sanata Dharma

✔ in sync with Sinta Affiliation

Target TKT
TKT 0

Hibah Program
Penelitian Desentralisasi

Focus Area

Kesehatan

Fund Source Category
Pemerintah

Fund Source

Country Fund Source
ID

- Research Member

SRI HARTATI YULIANI

Registered in Sinta using SRI HARTATI YULIANI (Sinta ID : 5977336)

Status : Leader (Leader) | Universitas Sanata Dharma
- ENADE PERDANA ISTYASTONO

Registered in Sinta using ENADE PERDANA ISTYASTONO (Sinta ID : 31032)

Status : Member (Member 2) | Universitas Sanata Dharma
- FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO

Registered in Sinta using FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO (Sinta ID : 31047)

Status : Member (Member 1) | Universitas Sanata Dharma
- MAYWAN HARIONO

Registered in Sinta using MAYWAN HARIONO (Sinta ID : 6195897)

Status : Member (Member 3) | Universitas Sanata Dharma



UNIVERSITAS SANATA DHARMA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

MBICAN, TROMOL POS 29 YOGYAKARTA 55002

TELP. 0274611301, 51557 EXT. 156, 157, FAX. 0274611303 - TELEGRAM : SADHAR YOGYA Rek. dan Lembaga Penelitian No. 287 01 00277005 CEMB Naga

SURAT PERJANJIAN PENUGASAN PELAKSANAAN HIBAH PENELITIAN DRPM KEMRISTEKDIKTI TAHUN ANGGARAN 2018 Nomor : 017 /Penel.LPPM USD/III/2018

Pada hari ini Jumat tanggal enam belas bulan Februari tahun dua ribu delapan belas, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Dr. rer. nat. Herry Pribawanto Suryawan : Wakil ketua LPPM Universitas Sanata Dharma, bertindak atas nama Rektor Universitas Sanata Dharma yang selanjutnya dalam Surat Perjanjian Penugasan ini disebut sebagai **PIHAK PERTAMA**;
2. Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt. : Dosen Universitas Sanata Dharma, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2018 untuk selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**.

Perjanjian penugasan ini berdasarkan pada Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian bagi dosen Perguruan Tinggi Swasta Kopertis Wilayah V Tahun Anggaran 2018, Nomor: 010/HB-LIT/II/2018.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Tahun 2018 dengan ketentuan dan syarat-syarat sebagaimana diatur dalam pasal-pasal sebagai berikut:

Pasal 1

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA**, dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk melaksanakan Penelitian Tahun 2018 dengan judul: *Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe*
- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggung jawab penuh atas pelaksanaan, administrasi, dan keuangan atas pekerjaan sebagaimana dimaksud pada ayat 1 dan berkewajiban menyerahkan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya dalam bendel laporan yang tersusun secara sistematis kepada **PIHAK PERTAMA**.
- (3) Pelaksanaan Penugasan Penelitian Tahun 2018 sebagaimana dimaksud pada ayat 1 didanai dari DIPA (Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran) Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor: DIPA-042.06.1.401516/2018; tanggal 5 Desember 2017.

Pasal 2

- (1) **PIHAK PERTAMA** menyerahkan dana penelitian sebagaimana dimaksud dalam pasal 1 sebesar Rp. 50.000.000 (Lima puluh juta rupiah) yang berasal dari DIPA (Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran) Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor: DIPA-042.06.1.401516/2018; tanggal 5 Desember 2017.

(2) Dana Penugasan Pelaksanaan sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. Pembayaran Tahap Pertama sebesar 70% dari total bantuan dana kegiatan yaitu $70\% \times \text{Rp } 50.000.000 = \text{Rp } 35.000.000$ (Tiga puluh lima juta rupiah), dibayarkan setelah Surat Perjanjian Penugasan ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
- b. Pembayaran Tahap Kedua/Terakhir sebesar 30% dari total dana yaitu $30\% \times \text{Rp } 50.000.000 = \text{Rp } 15.000.000$ (Lima belas juta rupiah), dibayarkan setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke laman Simlitabmas selambat-lambatnya **tanggal 10 September 2018** dokumen sebagai berikut:
 1. Catatan harian dan laporan penggunaan keuangan 70% yang telah dilaksanakan;
 2. Laporan kemajuan pelaksanaan penugasan penelitian;Serta menyerahkan kedua dokumen sebagaimana dimaksud di atas (b.1. dan b.2.) dalam bentuk hardcopy dan softfile kepada **PIHAK PERTAMA** paling lambat **tanggal 14 September 2018**.
- c. **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab mutlak dalam pembelanjaan dana tersebut pada ayat (1) sesuai dengan proposal kegiatan yang telah disetujui dan berkewajiban untuk menyerahkan kepada **PIHAK PERTAMA** semua bukti-bukti pengeluaran sesuai dengan jumlah dana yang diberikan oleh **PIHAK PERTAMA**.
- d. **PIHAK KEDUA** berkewajiban mengembalikan sisa dana yang tidak dibelanjakan ke kepada **PIHAK PERTAMA** untuk disetor ke Kas Negara.

Pasal 3

Dana Pelaksanaan Penugasan Penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 ayat 1 dibayarkan kepada **PIHAK KEDUA** melalui rekening yang diajukan dan atas nama **PIHAK KEDUA**.

Pasal 4

- (1) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan penugasan penelitian.
- (2) **PIHAK KEDUA** berkewajiban menindaklanjuti dan mengupayakan hasil penelitian yang dilakukannya untuk memperoleh paten dan/atau publikasi ilmiah dalam jurnal nasional/ internasional dan/atau teknologi tepat guna atau rekayasa sosial dan/atau buku ajar sesuai dengan luaran yang dijanjikan pada proposal.
- (3) Perolehan hasil sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dimanfaatkan sebesar-besarnya untuk pelaksanaan Tri Dharma Perguruan Tinggi.
- (4) **PIHAK KEDUA** berkewajiban untuk melaporkan perkembangan perolehan hasil sebagaimana dimaksud pada ayat (2) kepada **PIHAK PERTAMA** selambat-lambatnya pada tanggal **26 Oktober 2018**.

Pasal 5

- (1) **PIHAK KEDUA** wajib mengunggah ke laman **SIMLITABMAS** serta menyerahkan hardcopy dan softfile kepada **PIHAK PERTAMA** selambat-lambatnya **tanggal 14 September 2018** catatan harian, laporan penggunaan keuangan 70%, dan laporan kemajuan pelaksanaan kegiatan penelitian sesuai ketentuan.
- (2) **PIHAK PERTAMA** melakukan **Monitoring dan Evaluasi Internal** terhadap kemajuan pelaksanaan Program Hibah Penelitian tahun 2018 sebelum pelaksanaan **Monitoring dan Evaluasi Eksternal** oleh

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

- (3) Perubahan terhadap susunan tim peneliti dan substansi pelaksanaan penelitian dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan tertulis dari Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

.Pasal 6

- (1) **PIHAK KEDUA** harus menyampaikan Surat Pernyataan telah menyelesaikan seluruh pekerjaan yang dibuktikan dengan **pengunggahan pada SIMLITABMAS**:

- a. Catatan harian dan penggunaan dana 30%, pada tanggal 12 November 2018;
- b. Laporan akhir hasil penelitian, laporan keuangan 100%, capaian hasil, poster, artikel ilmiah dan profile pada tanggal 12 November 2018;

Serta menyerahkan dokumen 1.a dan 1.b. di atas kepada **PIHAK PERTAMA** dalam bentuk hardcopy dan softfile beserta bukti pengunggahan paling lambat tanggal 16 November 2018.

- (2) Apabila sampai batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan penelitian ini **PIHAK KEDUA** belum mengunggah ke SIMLITABMAS Berita Acara Penyelesaian Pekerjaan (BAPP) hasil pekerjaan seluruhnya, maka **PIHAK KEDUA** dikenakan denda sebesar 1 permil setiap hari keterlambatan sampai dengan setinggi-tingginya 5 persen dari nilai surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian, terhitung dari tanggal jatuh tempo yang telah ditetapkan sampai dengan berakhirnya pembayaran dana hibah penelitian oleh **PIHAK KEDUA**.
- (3) **PIHAK KEDUA** wajib menyerahkan 4 (empat) eksemplar dan 2 (dua) softcopy dalam bentuk CD Laporan Akhir Hasil Penelitian kepada **PIHAK PERTAMA**, yang oleh LPPM USD akan dikirimkan ke: Perpustakaan Nasional RI, Pusat Dokumentasi Ilmiah Indonesia LIPI, BAPPENAS, Perpustakaan USD, dan Arsip LPPM USD.
- (4) Jumlah eksemplar Laporan Akhir Hasil Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (3) di atas belum termasuk yang diperuntukkan bagi tim peneliti.
- (5) Laporan Akhir Hasil Penelitian dalam bentuk hardcopy sebagaimana dimaksud pada ayat (3) di atas harus memenuhi ketentuan seperti yang tercantum pada buku **Panduan Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat di Perguruan Tinggi Edisi XI**:
 - a. Bentuk/ukuran kertas kuarto;
 - b. Warna cover/sampul sesuai ketentuan yang ditetapkan;
 - c. Laporan hasil Penelitian sebagaimana tersebut pada pasal 6 ayat (1) ditulis dalam format font Times New Romans ukuran 12 spasi 1,5 kertas A4 pada bagian bawah sampul (cover) ditulis:

Dibiayai oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Nomor : 109/SP2H/LT/DRPM/2018

Pasal 7

- (1) Apabila **PIHAK KEDUA** selaku ketua peneliti sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 tidak dapat menyelesaikan pelaksanaan penelitian ini, maka **PIHAK KEDUA** wajib mengusulkan pengganti ketua peneliti sesuai bidang ilmu yang diteliti dan merupakan salah satu anggota tim kepada **PIHAK PERTAMA**.

- (2) Apabila **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan tugas dan tidak ada pengganti ketua sebagaimana dimaksud dalam Pasal 1 maka **PIHAK KEDUA** harus mengembalikan dana kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.
- (3) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 dijumpai adanya indikasi duplikasi dengan penelitian lain dan/atau diperoleh indikasi ketidakjujuran/iktikad krang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka kegiatan penelitian tersebut dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterima kepada **PIHAK PERTAMA** yang selanjutnya disetor ke Kas Negara.

Pasal 8

Hal-hal dan/atau segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggungjawab **PIHAK KEDUA** dan harus dibayarkan ke Kas Negara sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Pasal 9

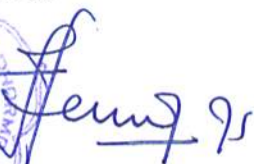
- (1) Hak atas kekayaan intelektual yang dihasilkan dari pelaksanaan penelitian ini diatur dan dikelola sesuai dengan peraturan dan perundang-undangan yang berlaku.
- (2) Hasil penelitian berupa peralatan dan/atau alat yang dibeli dari kegiatan penelitian ini adalah milik negara yang dapat dihibahkan kepada lembaga lain melalui Surat Keterangan Hibah.

Pasal 10

- (1) Apabila terjadi perselisihan antara **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA** dalam pelaksanaan perjanjian ini akan dilakukan penyelesaian secara musyawarah, dan bila tidak tercapai penyelesaian secara musyawarah maka penyelesaian dilakukan melalui jalur hukum.
- (2) Hal-hal yang belum diatur dalam perjanjian ini diatur kemudian oleh kedua belah pihak secara musyawarah.

Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Hibah Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua) dan bermaterai cukup sesuai dengan ketentuan yang berlaku.

PIHAK PERTAMA
Wakil ketua LPPM


Dr. rer. nat. Herry Pribawanto Suryawan

PIHAK KEDUA
Ketua Peneliti



Dr. Sri Hartati Yuliani, Apt.

Bidang Unggulan: Farmasi/Penyakit Degeneratif dan Bahan Alam
Kode>Nama Rumpun Ilmu: 405/Farmasetika dan Teknologi Farmasi

LAPORAN AKHIR TAHUN KE-2
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



PENGEMBANGAN SEDIAAN PENYEMBUH LUKA BAGI PENDERITA DIABETES
DENGAN BAHAN AKTIF EKSTRAK TEMPE

Tahun ke-2 dari rencana 3 tahun

Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt.
ENADE PERDANA ISTYASTONO, Ph.D., Apt.
FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO, M.Sc.
MAYWAN HARIONO, Ph.D., Apt

Dibiayai oleh:
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Nomor:
1. 109/SP2H/LT/DRPM/2018
2. 017/Penel.LPPM USD/III/2018

UNIVERSITAS SANATA DHARMA

November 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengembangan Sediaan Penyembuh Luka bagi Penderita Diabetes dengan Bahan Aktif Ekstrak Tempe

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr SRI HARTATI YULIANI, S.Si, Apt, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma
NIDN : 0520077201
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Farmasi
Nomor HP : 081328712851
Alamat surel (e-mail) : srihartatiyuliani@usd.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : ENADE PERDANA ISTYASTONO S.Farm, Apt, M.Sc.,
PhD
NIDN : 0506087901
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma

Anggota (2)

Nama Lengkap : FLORENTINUS DIKA OCTA RISWANTO S.Farm,
M.Sc.
NIDN : 0516108801
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma

Anggota (3)

Nama Lengkap : MAYWAN HARIONO S.Si, Apt, MSi, Doktor
NIDN : 0501057801
Perguruan Tinggi : Universitas Sanata Dharma

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 314,897,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi

(Dr. Yustina Sri Hartini, Apt)
NIP/NIK NPP.1557

Kab. Sleman, 1 - 11 - 2018

Ketua,



(Dr SRI HARTATI YULIANI, S.Si, Apt, M.Si)
NIP/NIK NPP.1828

Menyetujui,
Ketua LPPM USD

(Dr. rer. Nat. Herry P. Suryawan)
NIP/NIK NPP.2336

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman pengesahan.....	ii
Daftar isi	iii
Ringkasan	iv
Bab 1. Pendahuluan.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan	2
C. Tujuan Penelitian.....	2
D. Urgensi Penelitian	2
E. Rencana Target Tahunan	3
Bab 2. Tinjauan Pustaka	4
A. Posisi Penelitian Ini Dalam Konteks Penelitian Luka Diabetikum.....	4
B. Mekanisme Molekuler Penyembuhan Luka Diabetikum	5
C. Genistein, Bahan Aktif Dalam Ekstrak Tempe	5
D. Sediaan Penyembuh Luka	6
E. Peta Jalan Penelitian	6
Bab 3. Metodologi	8
A. Alat Dan Bahan Penelitian	8
B. Cara Penelitian.....	8
Bab 4. Hasil Sementara	11
Bab 5. Kesimpulan Sementara.....	20
Bab 6. Rencana Selanjutnya	21
Referensi	22
Lampiran	28

RINGKASAN

Indonesia adalah satu dari 10 negara dengan jumlah penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% pada usia produktif dan diperkirakan akan semakin tinggi dalam 20 tahun ke depan. Sebanyak 25% penderita diabetes menderita ulcer pada kaki dan 84% diantaranya berakhir pada amputasi. Ulcer kaki pada penderita diabetes seringkali berakhir dengan amputasi karena terjadinya proses penyembuhan luka yang dihambat. Produksi faktor pertumbuhan menurun pada penderita diabetes. Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes menurun produksi VEGF, terhambatnya proses neovasculogenesis, turunnya jumlah eNOS yang berakibat menurunnya EPC yang bermigrasi ke area luka.

Genistein mempunyai aktivitas mempercepat penyembuhan luka dengan mekanisme stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin, meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS. Melalui mekanisme tersebut genistein berpotensi mempercepat penyembuhan luka diabetikum. Sebagai sumber genistein digunakan tempe. Tempe merupakan kedelai yang telah mengalami fermentasi. Fermentasi terbukti meningkatkan genistein kedelai.

Pada tahun pertama akan dilakukan optimasi proses ekstraksi terhadap genistein dan daidzein. Desain penelitian yang digunakan adalah Desain Faktorial 3 faktor 2 level. Faktor yang digunakan adalah lama ekstraksi, konsentrasi etanol dan rasio penyari-tempe. Penyari yang digunakan adalah etanol karena genistein dan daidzein, isoflavon terbanyak dalam tempe, larut dalam etanol.

Hasil menunjukkan bahwa untuk genistein dan daidzein, waktu ekstraksi mempunyai efek paling signifikan disusul dengan kadar etanol. Ukuran partikel tempe kering mempunyai efek negatif terhadap kadar genistein dan daidzein yang terekstrak dari tempe. Kondisi optimum yang dapat digunakan untuk mengekstrak genistein dan daidzein dalam jumlah maksimal adalah kadar etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit.

Luaran wajib yang telah dihasilkan tahun ini adalah HKI terdaftar yang berjudul “Metode Ekstraksi Isoflavon Aglikon Dari Kedelai Dan Produk Turunan Dari Kedelai Tersebut” dengan no pendaftaran paten PID201706447. Luaran tambahan adalah berupa publikasi ilmiah pada jurnal internasional bereputasi terindeks Scopus yang telah terbit adalah 1) Optimization of genistein and daidzein extraction from tempeh-fermented product of soybean published pada “Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research vol 6(4), 2018”; 2) Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) in Wound Healing of Diabetic Foot Ulcer: Molecular Target and Structure-based Drug published pada “Wound Medicine vol 22, 2108”. Presentasi oral pada seminar internasional telah dilaksanakan pada “Ma Chung International Conference on Chromatography” dengan judul makalah Analytical Method Validation and Determination of Daidzein and Genistein in Ethanolic Extract of Tempeh Using RP-HPLC. Presentasi poster akan dilaksanakan pada tanggal 12-13 September 2018 pada “Internasional Seminar of Natural Product” dengan judul makalah “The effect of particle size, extration time, and solvent on daidzein amount extracted from tempeh-a fermented product of soybean”. Luaran lain yang telah dibuat adalah draft publikasi internasional Scopus dengan judul “Wound Healing Effect of Tempeh Extract: *In Vitro*, *In Silico*, and *In Vivo* Study”

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Diabetes adalah penyakit kronis dan apabila terjadi komplikasi dengan penyakit lain akan berakibat serius pada penderitanya. Indonesia adalah salah satu dari 10 negara dengan penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% penderita pada usia produktif (Mihardja et al., 2014). Penderita diabetes mempunyai resiko menderita ulcer kaki sebesar 25% (Boulton et al., 2005; Cavanagh et al., 2005). Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan penderita sehat (Hamed et al., 2010). Akibat penyembuhan yang lama ini, 84% penderita ulcer kaki pada pasien diabetes menjalani amputasi (Brem and Tomic-Canic, 2007). **Ketersediaan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes sangat potensial dikembangkan.**

Pada penderita diabetes produksi beberapa faktor pertumbuhan pada proses penyembuhan luka menurun (Brem and Tomic-Canic, 2007) diantaranya Vascular Epythelial Growth Factor (VEGF) (Hamed et al., 2010), respon angiogenesis (Galiano et al., 2004), makrofag (Maruyama et al., 2007), akumulasi kolagen, jumlah jaringan granulasi, penurunan migrasi dan proliferasi keratinosit dan fibroblas (Brem and Tomic-Canic, 2007) serta keseimbangan antara extracellular matrix (ECM) dan remodellingnya oleh MMPs (Lobmann et al., 2002). Penurunan produksi faktor pertumbuhan tersebut menyebabkan proses penyembuhan luka pada penderita diabetes lebih lambat dibandingkan pada pasien normal (Brem and Tomic-Canic, 2007).

Genistein, isoflavon kedelai, telah terbukti menurunkan stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). Mekanisme genistein dalam proses penyembuhan luka tersebut terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetikum (Eo et al., 2015). **Genistein dalam ekstrak tempe sangat potensial dikembangkan sebagai sediaan penyembuh luka diabetikum.** Sebagai sumber genistein digunakan tempe. Tempe merupakan kedelai yang telah mengalami fermentasi. Fermentasi terbukti meningkatkan genistein kedelai (Chaiyasut et al., 2010; Hong et al., 2012).

Penelitian mengenai “Sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes dengan bahan aktif ekstrak tempe” ini sesuai, sejalan dan mendukung **Bidang Unggulan Universitas Sanata**

Dharma yaitu Penyakit degeneratif dan bahan alam. Penelitian ini mengambil Topik Unggulan Universitas yaitu Pengembangan sediaan farmasi mengembangkan obat bahan alam untuk penyakit degenerative berbasis bukti ilmiah (database obat bahan alam Indonesia, pendekatan farmasi klinis dan komunitas).

B. Permasalahan

Permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah penggunaan ekstrak tempe sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum dan pengembangan sediaan penyembuh luka diabetikum.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian “Pengembangan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes dengan bahan aktif ekstrak tempe” mempunyai tujuan khusus

Tahun 1.

1. Optimasi ekstraksi genistein sebagai senyawa yang paling banyak diketahui aktivitasnya dalam ekstrak tempe.
2. Standardisasi ekstrak tempe sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum

Tahun 2.

1. Menelusuri target molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum
2. Menentukan kadar ekstrak tempe dalam mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum

Tahun 3.

1. Memformulasi sediaan penyembuh luka diabetikum yang efektif, aman dan nyaman.

D. Urgensi Penelitian

Indonesia adalah salah satu dari 10 negara dengan penderita diabetes terbesar yaitu 4,6% penderita pada usia produktif (Mihardja et al., 2014). Penderita diabetes mempunyai resiko menderita ulcer kaki sebesar 25% (Boulton et al., 2005; Cavanagh et al., 2005). Proses penyembuhan luka pada penderita diabetes memerlukan waktu yang lebih lama (Hamed et al., 2010) sebagai akibat 84% penderita ulcer kaki pada pasien diabetes menjalani amputasi (Brem and

Tomic-Canic, 2007). Selama ini belum ada sediaan yang khusus digunakan untuk penyembuhan luka diabetikum. **Pengembangan sediaan penyembuh luka bagi penderita diabetes sangat penting untuk dilakukan.**

Genistein adalah bahan aktif dalam ekstrak tempe yang banyak diketahui mempunyai aktivitas biologis. Genistein telah banyak diteliti berpotensi mempercepat penyembuhan luka (Emmerson et al., 2010). Genistein telah terbukti menurunkan stress karena oksidasi, memodulasi ekspresi proinflamatori sitokin (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis pada luka, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). Luka pada penderita diabetes mengakibatkan stress oksidasi meningkat, kenaikan aktivitas iNOS dan menurunnya angiogenesis pada luka (Brem and Tomic-Canic, 2007), sehingga **karena aktivitasnya genistein sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.**

Kebaharuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah penggunaan ekstrak tempe sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum dan pengembangan sediaan penyembuh luka diabetikum berbahan aktif bahan alam.

E. Rencana Target Tahunan

Tabel 1. Rencana Target Tahunan

No	Jenis luaran		Indikator Capaian		
			TS	TS+1	TS+2
1.	Publikasi ilmiah	Internasional bereputasi	-	reviewed	
		Nasional terakreditasi	reviewed		
2.	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan	
		Nasional	-	-	-
3.	HKI	Paten sederhana	-	-	terdaftar
4.	Teknologi tepat guna		-	-	produk
5.	Buku Ajar		-	-	drafft

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Posisi Penelitian ini dalam Konteks Penelitian Luka Diabetikum

Pasien diabetes dengan luka (ulcer) di kaki sebagian besar mengarah pada amputasi, hal tersebut terjadi disebabkan karena penderita sebagian besar menderita neuropati (Brem and Tomic-Canic, 2007). Hampir semua proses penyembuhan luka pada penderita diabetes terganggu (Hamed et al., 2014). Terjadi penurunan produksi faktor pertumbuhan diantaranya Vascular Epythelial Growth Factor (VEGF) (Hamed et al., 2010), respon angiogenesis (Galiano et al., 2004), makrofag (Maruyama et al., 2007), akumulasi kolagen, jumlah jaringan granulasi, penurunan migrasi dan proliferasi keratinosit dan firoblas (Brem and Tomic-Canic, 2007), serta ketidakseimbangan antara extracellular matrix (ECM) dan remodellingnya oleh MMPs (Lobmann et al., 2002). Bahan alam yang dapat meningkatkan produksi faktor pertumbuhan di atas berpotensi digunakan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.

Penggunaan bahan alam sudah mulai digunakan dalam penyembuhan luka diabetikum (Radhakrishna et al., 2016). Flavonoid dan luteolin yang terkandung pada tanaman *Marynia annua* Lin (Lodhi and Singhai, 2013), sedangkan flavonoid dari tanaman *Tephrosia purpurea* Linn (Lodhi et al., 2013) terbukti mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme menangkap radikal bebas (Lodhi and Singhai, 2013), menaikkan level protein dan enzim serta merangsang terjadinya angiogenesis (Lodhi et al., 2013). Notoginsenosida suatu saponin dari tanaman *Panax notoginseng* mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme meningkatkan agregasi platelet, proliferasi fibroblast, meningkatkan angiogenesis dan memperingan inflamasi (Zhang et al., 2016). Ekstrak triterpenoid tanaman *Centella asiatica* diketahui meningkatkan epiteliasi, produksi kolagen, menurunkan MMPs dan menghambat produksi nitrit oksida sehingga dapat mempercepat penyembuhan luka diabetikum (Mahmood et al., 2016). Senyawa fenolik dari tanaman *Catharanthus roseus* L mempercepat penyembuhan luka diabetikum dengan mekanisme meningkatkan produksi kolagen dan antioksidan (Singh et al., 2014). **Bahan alam sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif penyembuh luka diabetikum.**

Genistein, suatu isoflavon dari kedelai, telah diteliti kemampuannya sebagai penyembuh luka (Miyazaki et al., 2002). Aktivitas biologis genistein dalam proses penyembuhan luka

diantaranya mempunyai aktivitas anti-inflamasi melalui penghambatan COX-2 (Song et al., 2003), menekan pelepasan interleukin 1- β (Sutrisno et al., 2014), memperbaiki enzim anti-oksidan (Valsecchi et al., 2011), merangsang pelepasan asam hialuronat yang merupakan bahan baku penting dalam proses regenerasi kulit (Miyazaki et al., 2002), dan menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011). Genistein mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum karena kemampuannya dalam menurunkan stress oksidasi (Park et al., 2011), meningkatkan angiogenesis, dan mencegah kenaikan aktivitas iNOS (Tie et al., 2013). **Genistein, kandungan aktif ekstrak tempe, sangat potensial dikembangkan sebagai bahan aktif sediaan penyembuh luka diabetikum.**

Kebaharuan dalam penelitian ini adalah pembuatan sediaan penyembuh luka diabetikum dengan bahan aktif ekstrak tempe (bahan alam).

B. Mekanisme molekuler penyembuhan luka diabetikum

Proses penyembuhan pada penderita diabetes berbeda dengan pasien normal (Falanga, 2005), termasuk tidak berfungsinya respon inflamasi, penurunan formasi granulasi jaringan dan terganggunya angiogenesis (Cianfarani et al., 2006). Fibroblast yang diisolasi dari luka diabetikum menunjukkan penurunan respon proliferasi terhadap faktor pertumbuhan (Loots et al., 2002) diantaranya TGF β 1 (Hasan et al., 1997), platelet-derived growth factor, dan sitokin lain (Stanley et al., 1997). Abnormalitas seluler lain yang muncul pada penderita diabetes diantaranya makrofag pada penderita diabetes memperlihatkan penurunan TNF- α , interleukin 1 β dan VEGF (Zykova et al., 2000). Aktivasi berlebihan dari beberapa MMPs diantaranya MMP-9 dapat mengganggu migrasi sel dan menyebabkan pecahnya beberapa matriks protein dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam proses penyembuhan luka (Signorelli et al., 2005). Senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan respon inflamasi, menaikkan formasi granulasi jaringan dan meningkatkan angiogenesis pada penderita diabetes akan dapat mempercepat proses penyembuhan luka diabetikum.

C. Genistein, bahan aktif dalam ekstrak tempe

Tempe adalah kedelai yang terfermentasi. Sebagai sumber genistein dipilih tempe karena fermentasi terbukti meningkatkan jumlah genistein pada kedelai (Chaiyasut et al., 2010; Hong et

al., 2012). Genistein merupakan salah satu isoflavon utama kedelai (Rostagno et al., 2007). Kelarutan isoflavon dipengaruhi oleh pH. Pada pH 4 – 6 kelarutan isoflavon lebih rendah dibandingkan kelarutannya pada pH 7 (Barbosa et al., 2006). Kelarutan genistein pada media air adalah 3×10^{-6} M (Stancanelli et al., 2007). Log P, ukuran hidrofobisitas senyawa, genistein mempunyai Log P sebesar 2,09 (Nakada et al., 2009).

Degradasi senyawa isoflavon dipengaruhi oleh pH lingkungan (Chadha et al., 2011) dan panas (Stintzing et al., 2006). Genistein stabil pada kondisi netral, dan tidak stabil baik pada kondisi asam maupun basa (Chadha et al., 2011). Genistein pada suhu 150 °C pH 3 akan terdegradasi sempurna selama 7 setelah pemanasan. Sedangkan pada kondisi netral baik genistein masih stabil selama 7 jam (Stintzing et al., 2006).

D. Sediaan Penyembuh Luka

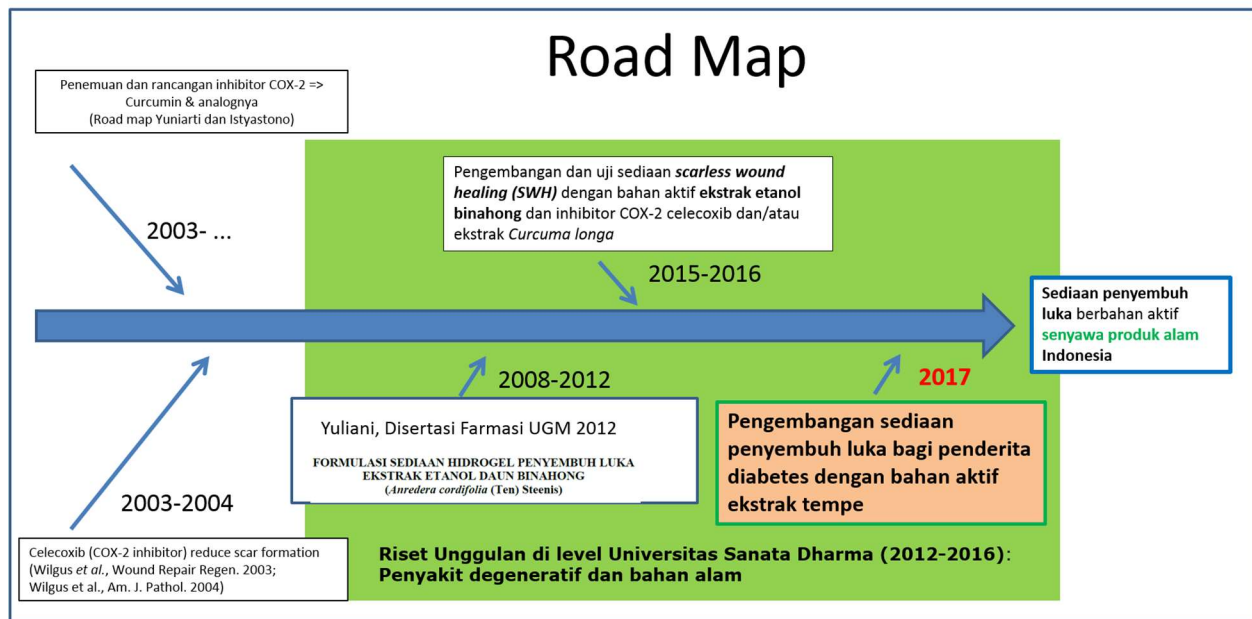
Sediaan penyembuh luka terbuka harus steril (Moynihan and Crean, 2009). Sediaan penyembuh luka hendaknya lembab (Okan et al., 2007), mengabsorpsi dan menghilangkan eksudat, mengisolasi panas, mencegah kontaminasi, menyediakan lingkungan yang kondusif untuk membangun pertahanan alami tubuh (Mallefet and Dweck, 2008). Keuntungan lingkungan yang lembab adalah mencegah dehidrasi dan kematian sel, mempercepat angiogenesis, meningkatkan pecahnya jaringan yang mati dan fibrin (Field and Kerstein, 1994).

Bahan penutup luka yang bersifat oklusif dapat meminimalkan jaringan nekrosis dengan mencegah pengeringan, membantu menghilangkan jaringan mati (*debridement*), dan membentuk barier melawan organisme patogen dari luar sehingga meminimalkan inflamasi yang terjadi (Davis et al., 1990). Penggunaan bahan yang lebih bisa menahan lembab akan meningkatkan lingkungan yang lebih suportif dibandingkan bahan yang tidak mampu menahan lembab (Eaglstain et al., 1988). Bahan yang mampu menahan lembab berhubungan dengan menurunnya infeksi, pasien lebih nyaman dan mengurangi kejadian bekas luka (Campton-Johnston and Wilson, 2001).

E. Peta Jalan Penelitian

Penelitian yang diusulkan berdasar pada penelitian terdahulu pengusul yang mengembangkan sediaan hidrogel penyembuh luka dengan bahan aktif ekstrak etanol daun binahong (Yuliani and Istyastono, 2012; Yuliani, 2012; Yuliani et al., 2012). Pengusul juga terlibat

aktif dalam penelitian penemuan senyawa obat untuk anti-inflamasi, baik yang terkait sistem imun via jalur reseptor histamin (Istyastono et al., 2011a, 2011b; Lim et al., 2010, 2009; Sirici et al., 2012; Smits et al., 2010; Wijtmans et al., 2011) maupun non imun via jalur COX (Istyastono, 2012; Radifar et al., 2013; Yuniarti et al., 2012, 2011). Pada saat ini pengusul juga sedang mengerjakan penelitian dengan judul “Sediaan Hidrogel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) sebagai sediaan scarless wound healing dengan adisi inhibitor siklooksigenase-2 celecoxib” menggunakan dana Hibah Bersaing Dikti. Kombinasi pengetahuan dan pengalaman pengusul di bidang formulasi sediaan hidrogel penyembuh luka dan bidang penemuan obat anti-inflamasi akan sangat bermanfaat pada pelaksanaan penelitian yang diusulkan.



Gambar 1. Peta jalan penelitian yang diusulkan. Keterangan: 2015-2016 merupakan penelitian yang sedang dikerjakan saat ini dengan skema Hibah Bersaing dan penelitian yang diusulkan melalui proposal ini

BAB 3. METODOLOGI

A. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa: (i) Ekstrak tempe; (ii) Genistein (Sigma-Aldrich); dan (iii) bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian formulasi hidrogel dan optimasi formula hidrogel penyembuh luka berbahan aktif ekstrak etanol daun binahong (Yuliani and Istyastono, 2012; Yuliani, 2012; Yuliani et al., 2012) meliputi: etanol, methanol, carbopol, sodium karboksimetilselulosa (Na-CMC), kalsium alginat (Ca-alginat), gliserol, sodium benzoat, kalium sorbat, formalin dengan kualitas setidaknya *pharmaceutical grade*. Penelitian ini menggunakan hewan uji berupa tikus; (iv) bahan untuk analisis seperti methanol HPLC grade (E-Merck), kolom HPLC (Shimadzu); (v) bahan penelusuran mekanisme molekuler seperti PBS, EDTA, kit MMP9 menurut Cianfarani et al., (2006) dan Galkowska et al., (2006). **Peralatan** yang digunakan dalam penelitian ini adalah: (i) Alat-alat gelas lazim di Laboratorium Kimia Analisis, Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Farmakologi-Toksikologi; (ii) *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC; LC-10AD Shimadzu); dan (iii) peralatan ELISA dan peralatan uji imunohistokimia.

B. Cara Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain faktorial pada tahun pertama dan ketiga sedangkan pada tahun kedua merupakan penelitian eksperimental murni.

Tahun 1

Pada tahun pertama dilakukan optimasi ekstraksi tempe sehingga didapatkan ekstrak tempe dengan kandungan genistein yang tinggi. Optimasi ekstraksi genistein tempe ini dilakukan menggunakan desain faktorial 3 faktor 2 level. Faktor (variabel bebas) yang diteliti dalam penelitian ini adalah lama ekstraksi (level rendah 2 jam dan level tinggi 4 jam), suhu ekstraksi (level rendah 50°C dan level tinggi 70°C) dan rasio penyari-tempe (level rendah 4:1 dan level tinggi 10:1). Penyari yang digunakan adalah etanol 95%. Respon (variabel tergantung) dalam penelitian ini adalah kadar genistein ekstrak tempe. Setelah didapat kondisi optimal, maka ekstrak yang didapat distandardisasi dengan parameter kadar genistein dalam ekstrak tempe dan berat jenis ekstrak tempe. **Indikator capaian** pada tahun pertama adalah didapatkannya kondisi optimum

ekstraksi genistein ekstrak tempe meliputi lama ekstraksi, suhu ekstraksi dan rasio penyari-tempe. Indikator yang lain adalah kadar genistein dan berat jenis ekstrak tempe. **Luaran** yang diharapkan dalam penelitian tahap ini adalah artikel dalam jurnal nasional terakreditasi “Majalah Obat Tradisional”.

Tahun 2

Pada tahun kedua dilakukan penentuan kadar ekstrak tempe dalam sediaan yang mempercepat penyembuhan luka diabetikum dan penelusuran mekanisme molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum. Penentuan kadar ekstrak tempe dalam sediaan dilakukan dengan metode eksisi. Sebelum digunakan untuk uji penyembuhan luka, tikus diberi injeksi aloksan dengan dosis 250 mg/kgBB, kemudian tikus tersebut dicek kadar gula darahnya. Tikus dengan kadar gula darah puasa > 8 mmol/L digunakan sebagai tikus diabetes. Lima kelompok tikus terinduksi aloksan (diabetes) dengan perlakuan 1) pembawa; 2) 2,5% ekstrak tempe dalam pembawa; 3) 5% ekstrak tempe dalam pmbawa; 4) 10% ekstrak tempe dalam pembawa dan 5) tanpa perlakuan ditambah dengan 5 kelompok tikus normal dengan perlakuan yang sama sebagai kelompok kontrol. Parameter yang diukur adalah kecepatan penyembuhan luka dari masing-masing kelompok (Teoh et al., 2009).

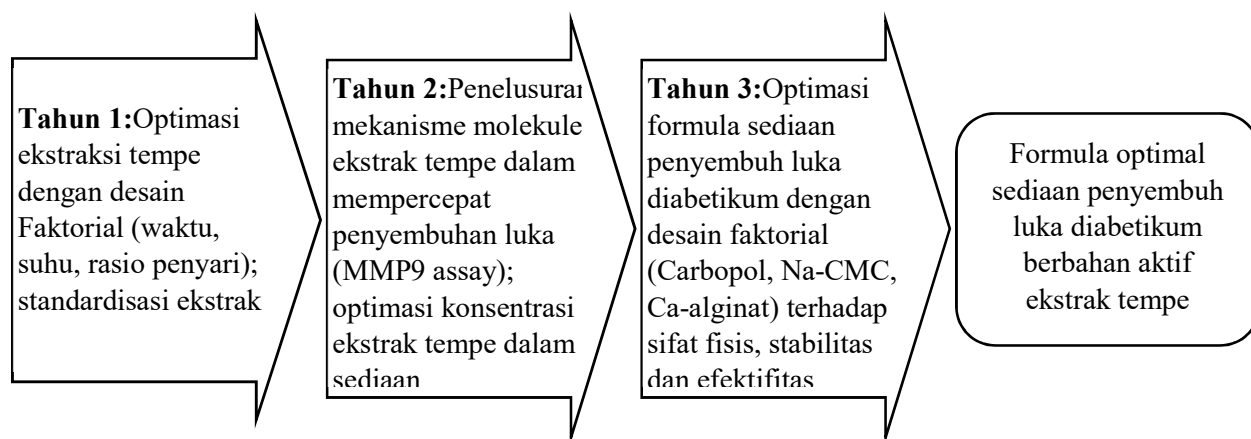
Uji mekanisme molekuler diwakili oleh salah satu target protein yang terlibat dalam perlambatan pembentukan jaringan baru yang berasosiasi dengan penyembuhan luka. Protein ini adalah enzim Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) yang bekerja dengan menghidrolisis ikatan peptida protein pada pembentukan jaringan baru sehingga menghambat penyembuhan luka. Apabila enzim ini dihambat, maka proses pembentukan jaringan baru pasca luka akan berjalan normal. Penelitian sebelumnya telah melaporkan beberapa senyawa flavonoid dan turunannya yang aktif menghambat kinerja MMP9 dengan $IC_{50} < 100 \mu M$ di antaranya luteolin (Ji et al., 2009), xanthohumol (Philips et al., 2010) dan biflavonoid biacacetin (Nanjan et al., 2015). Pada prinsipnya, percobaan dilakukan dengan mereaksikan enzim MMP9 dengan ekstrak tempe yang diuji sebagai inhibitor MMP9 pada konsentrasi yang dianggap tertinggi (contoh 250 $\mu g/mL$) dalam larutan buffer Tris-HCl pH 7.5. Campuran tersebut direaksikan dalam pelat sumur-96 sambil diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu mengacu pada pustaka (Nicolotti et al., 2012). Selanjutnya, campuran ditambahkan substrat (dalam hal ini peptida yang mengandung fluorofofor), diinkubasi kembali pada suhu dan waktu sesuai pustaka. Campuran reaksi kemudian dibaca emisinya menggunakan fluorescence microlate reader dan dibandingkan dengan kontrol negatif

(tanpa ekstrak tempe). Perbedaan antara bacaan kontrol negatif dan perlakuan dibagi bacaan kontrol negatif lalu dikalikan 100% didefinisikan sebagai persen hambatan ekstrak tempe terhadap MMP9. Apabila hambatannya $> 50\%$, perhitungan IC_{50} bisa dilakukan dengan membuat satu seri konsentrasi ekstrak tempe dan diuji dengan prosedur yang sama.

Indikator dalam penelitian ini adalah 1) ditemukannya kadar ekstrak tempe yang dapat mempercepat penyembuhan luka diabetikum dan 2) ditemukannya mekanisme molekuler ekstrak tempe dalam mempercepat penyembuhan luka diabetikum. **Luaran** yang diharapkan adalah publikasi artikel pada jurnal internasional bereputasi “Journal of Pharmaceutical Science and Research”.

Tahun 3

Penelitian tahun ke-3 akan dilakukan optimasi formula sediaan penyembuh luka diabetikum. Penelitian menggunakan desain faktorial dengan 3 faktor 2 level. Faktor yang digunakan dalam penelitian ini adalah carbopol (level rendah 0,5% dan level tinggi 1,25%), Na-CMC (level rendah 0,75% dan level tinggi 1,5%), dan Ca-alginat (level rendah 1% dan level tinggi 2%). Respon yang diharapkan dari penelitian ini adalah daya sebar, daya lekat, viskositas, kecepatan pelepasan obat dari sediaan dan stabilitas sediaan menurut ICH *guideline*. Setelah didapatkan formula optimum maka formula optimum tersebut diuji kembali ke tikus terinduksi aloksan (diabetes) untuk melihat kemampuan dari sediaan menghantarkan bahan aktifnya. **Indikator** yang diharapkan dari penelitian tahun ke-3 adalah formula optimum sediaan penyembuh luka diabetikum yang aman, efektif dan nyaman. Sedangkan **luaran** yang diharapkan pada tahun ke-3 ini adalah **paten sederhana (HKI)** dan **draff buku ajar**.



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian, uraian detail terdapat pada Bab 3 Subbab B.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL TAHUN 1

Tujuan dari penelitian di tahun pertama ini adalah mempelajari dan mengoptimasi factor-faktor yang berpengaruh terhadap ekstraksi genistein dan daidzein dari tempe. Faktor-faktor yang dipelajari adalah konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi. Etanol dipilih sebagai pelarut karena pertimbangan keamanan, lebih murah dan tidak berbahaya dibandingkan pelarut lain.

Ketiga faktor tersebut dioptimasi menggunakan desain faktorial penuh 2^3 . Desain tersebut menghasilkan 8 eksperimen, setiap eksperimen dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan data konsentrasi genistein dan daidzein digunakan untuk analisis statistika desain faktorial. Hasil percobaan tersaji pada tabel 2.

Tabel 2. Rencana desain faktorial 2^3 dan hasil nilai kadar genistein dan daidzein.

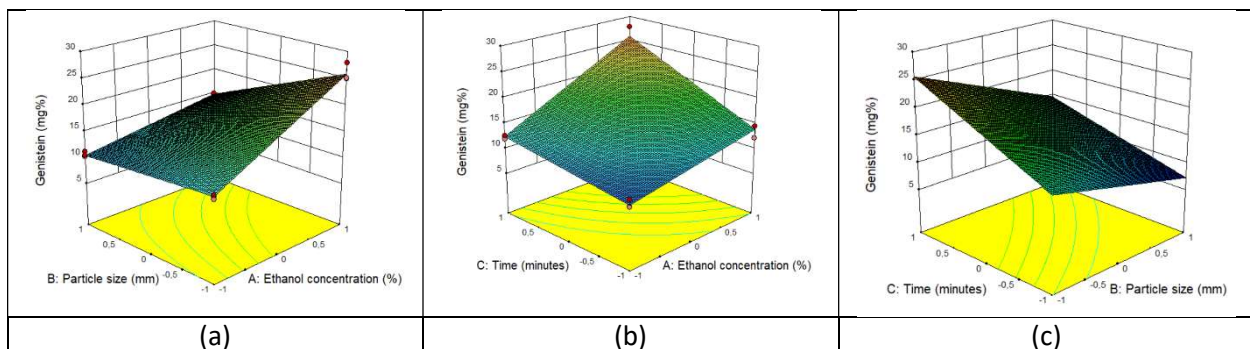
Run	Level factor desain faktorial			Genistein (mg%)	Daidzein (mg%)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	1	1	-1	7,26	4,27
2	1	-1	1	25,12	18,84
3	1	1	-1	7,66	4,46
4	-1	-1	1	11,93	9,25
5	-1	1	-1	11,04	11,17
6	1	-1	1	25,04	18,44
7	1	-1	-1	12,13	10,29
8	-1	1	1	11,15	9,98
9	-1	1	1	10,46	9,98
10	1	-1	-1	14,53	10,52
11	1	-1	1	27,92	21,38
12	1	1	1	14,92	11,29
13	-1	-1	-1	8,66	7,43
14	-1	1	-1	11,34	11,35
15	-1	-1	1	12,36	10,67
16	-1	-1	-1	8,67	7,47
17	-1	-1	-1	9,97	7,94
18	-1	-1	1	12,62	9,2
19	1	1	1	14,91	11,26
20	-1	1	1	10,22	9,75
21	-1	1	-1	10,92	11,1
22	1	-1	-1	14,49	10,4
23	1	1	-1	7,02	4,16
24	1	1	1	14,33	11,84

Efek konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi terhadap kadar genistein.

Model persamaan dibuat dengan mengaplikasikan analisis multiple regresi pada data percobaan kadar genistein. Hasilnya seperti pada persamaan di bawah ini:

$$Y = 13.11 + 2.33X_1 - 2.18X_2 + 2.80X_3 - 2.25 X_1X_2 + 2.13 X_1X_3 - 1.07 X_2X_3 \quad (1)$$

Hasil analisis varian (ANOVA) menunjukkan bahwa model valid. Model mempunyai nilai-F 161,98 dan R-kuadrat 0,9828. Nilai Adj R-kuadrat akan merevisi Nilai R-kuadrat dari ukuran sampel dan jumlah item. Nilai Adj R-kuadrat 0,9767 merupakan nilai yang tinggi dan sangat mendukung signifikansi model. Validasi internal dilakukan dengan validasi leave-one-out. Hasil validasi adalah nilai Pred R-kuadrat 0,9657. Hal ini mempunyai makna tidak terdapat outlier data. Analisis regresi menghasilkan probabilitas signifikan dari nilai F ($p < 0,0001$) dari model untuk memperkirakan konsentrasi genistein yang diekstraksi dari tempe. Pada tingkat signifikansi 5%, variabel independen yang signifikan dalam model ekstraksi genistein adalah intercept ($p < 0,0001$), X_1 ($p < 0,0001$), X_2 ($p < 0,0001$), X_3 ($p < 0,0001$), X_1X_2 ($p < 0,0001$), X_1X_3 ($p < 0,0001$), dan X_2X_3 ($p < 0,0001$). Dari ketiga faktor tersebut, waktu ekstraksi ternyata memiliki efek paling tinggi terhadap konsentrasi genistein yang diekstraksi dari tempe yang ditunjukkan dengan nilai koefisien tertinggi (2,80) diikuti oleh konsentrasi etanol (2,33) sedangkan ukuran partikel tempe kering memiliki efek negatif. Interaksi konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi juga menunjukkan efek positif yang signifikan terhadap konsentrasi genistein. Waktu ekstraksi menunjukkan efek positif (2,80) pada ekstraksi genistein. Ini menyiratkan bahwa meningkatnya waktu ekstraksi akan meningkatkan genistein yang diekstraksi dari tempe. Ukuran partikel tempe kering menunjukkan efek negatif (-2,18) pada ekstraksi genistein. Artinya, menurunkan ukuran partikel akan meningkatkan genistein yang diekstraksi dari tempe.



Gambar 3. Respon permukaan efek factor pada konsentrasi genistein yang diekstraksi dari tempe

Plot tiga dimensi (plot kontur) yang mewakili pengaruh konsentrasi etanol, ukuran partikel tempe kering dan waktu ekstraksi dihasilkan oleh persamaan (2) dan disajikan pada Gambar 3. Plot dihasilkan oleh masing-masing pasangan factor, dan faktor ketiga dibuat tetap pada nilai yang menghasilkan respon tertinggi. Gambar 3a menunjukkan pengaruh ukuran partikel tempe kering dan konsentrasi etanol. Pada level rendah konsentrasi etanol, penurunan ukuran partikel tidak merubah secara signifikan konsentrasi genistein. Sebaliknya, pada level tinggi konsentrasi etanol, mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi genistein. Begitu pula dengan efek ukuran partikel, peningkatan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi genistein pada level ukuran partikel yang rendah. Respon maksimum dicapai pada konsentrasi etanol 100% dan ukuran partikel 0,6 mm. Pengaruh waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol ditunjukkan pada Gambar 3b. Pada level tinggi kedua faktor tersebut, peningkatan level faktor akan meningkatkan konsentrasi genistein yang diekstrak dari tempe kering. Konsentrasi genistein maksimum diperoleh pada konsentrasi etanol pada 100% dan waktu ekstraksi 270 menit. Gambar 3c menunjukkan pengaruh waktu ekstraksi dan ukuran partikel tempe kering. Pada tingkat tinggi waktu ekstraksi, mengurangi ukuran partikel akan secara signifikan meningkatkan konsentrasi genistein. Mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan area kontak antara partikel padat dan pelarut. Ini akan meningkatkan nilai koefisien difusi genistein. Konsentrasi maksimum genistein adalah 26,03 mg% yang mencapai konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit.

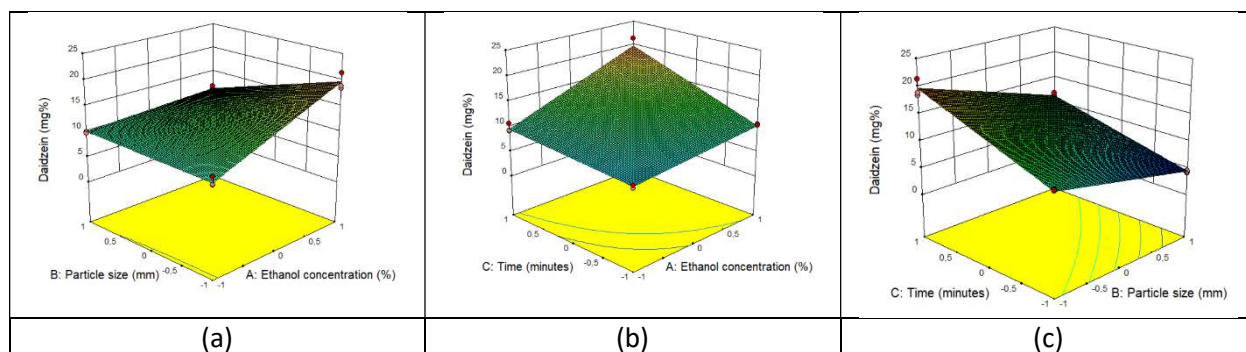
Efek konsentrasi etanol, ukuran partikel dan waktu ekstraksi terhadap kadar daidzein.

Model persamaan dibuat dengan mengaplikasikan analisis multiple regresi pada data percobaan kadar genistein. Hasilnya seperti pada persamaan di bawah ini:

$$Y = 10,52 + 0,91 X_1 - 1,30 X_2 + 2,14 X_3 - 2,25X_1X_2 + 1,94 X_1X_3 - 0,67 X_2X_3 \quad (2)$$

Hasil ANOVA untuk ekstraksi daidzein dari tempe kering menunjukkan bahwa modelnya valid. Nilai F 143.76 menyiratkan bahwa modelnya signifikan. R-kuadrat dari model adalah 0,9807. Pred R-kuadrat 0,9615 dan Adj R-squared 0,9738 karena selisihnya kurang dari 0,2 maka hal ini menunjukkan bahwa model valid. Validitas internal dilakukan dengan leave-one-out cross validation. Hasilnya tinggi dari Pred R-kuadrat sebesar 0,9615. Ini menunjukkan bahwa tidak ada data outlier dari konsentrasi daidzein pada proses ekstraksi. Analisis regresi yang dihasilkan dari

model ini menunjukkan probabilitas nilai F ($p < 0,0001$) yang signifikan untuk memperkirakan konsentrasi daidzein yang diambil dari tempe. Variabel independen yang signifikan pada tingkat signifikansi 5% adalah intercept ($p < 0,0001$), X1 ($p < 0,0001$), X2 ($p < 0,0001$), X3 ($p < 0,0001$), X1X2 ($p < 0,0001$), X1X3 ($p < 0,0001$), dan X2X3 ($p < 0,0001$). Waktu ekstraksi ternyata memiliki pengaruh paling tinggi terhadap proses ekstraksi daidzein dari tempe yang diikuti dengan konsentrasi etanol. Waktu ekstraksi memiliki nilai positif (2,14), artinya peningkatan waktu ekstraksi akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Di sisi lain, ukuran partikel tempe kering memiliki nilai negatif (-1,30), artinya penurunan ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Interaksi antara konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi memiliki nilai positif juga.



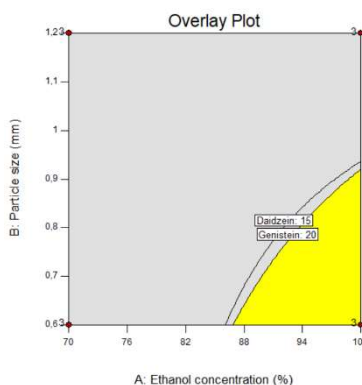
Gambar 4. Respon permukaan efek factor pada konsentrasi daidzein yang diekstraksi dari tempe

Gambar 4 menyajikan plot kontur tiga dimensi untuk pengaruh konsentrasi etanol, ukuran partikel tempe kering dan waktu ekstraksi pada konsentrasi daidzein yang diambil dari tempe kering. Plot kontur dikembangkan dengan persamaan (2). Plot diproduksi oleh masing-masing pasangan faktor, dan faktor ketiga diambil dalam respon tertinggi konsentrasi daidzein. Gambar 4a menunjukkan pengaruh konsentrasi etanol dan ukuran partikel tempe kering. Pada konsentrasi etanol level rendah, memperkecil ukuran partikel tidak meningkatkan konsentrasi daidzein yang diekstraksi dari tempe kering, namun pada level tinggi konsentrasi etanol, mengurangi ukuran partikel akan meningkatkan konsentrasi daidzein secara signifikan. Pengaruh konsentrasi etanol memiliki nilai positif 0,91, meningkatkan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Di sisi lain, pada level ukuran partikel yang rendah, meningkatkan konsentrasi etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein secara signifikan. Efek waktu ekstraksi dan konsentrasi etanol ditunjukkan pada Gambar 4b. Kedua faktor tersebut secara signifikan mempengaruhi konsentrasi daidzein pada level tinggi faktor. Meningkatkan waktu ekstraksi dan konsentrasi

etanol akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Pada level rendah kedua faktor tersebut, konsentrasi daidzein tidak meningkat secara signifikan. Gambar 2c mengilustrasikan efek waktu ekstraksi dan ukuran partikel ekstrak kering pada konsentrasi daidzein. Pada tingkat rendah dan tingkat tinggi ukuran partikel (0,6 dan 1,2 mm masing-masing) meningkatkan waktu ekstraksi secara signifikan akan meningkatkan konsentrasi daidzein. Konsentrasi maksimum daidzein dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit yang menghasilkan tempe 19,42 mg% daidzein / tempe kering.

Kondisi optimal proses ekstraksi genistein dan daidzein tempe

Gambar 3 menunjukkan bahwa konsentrasi genistein maksimum dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Di sisi lain, Gambar 4 menunjukkan bahwa konsentrasi daidzein maksimum dihasilkan pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Baik genistein dan daidzein memiliki kondisi yang sama untuk mencapai konsentrasi tertinggi yang diekstrak dari tempe kering. Gambar 5 menunjukkan overlay plot kontur genistein dan ekstraksi daidzein yang dikembangkan dengan persamaan (2) dan (3).



Gambar 5. Overlay plot dari plot kontur genistein dan daidzein. Waktu ekstraksi dijaga 270 menit

Gambar 5 menunjukkan bahwa proses ekstraksi akan menghasilkan 20 mg% genistein jika konsentrasi etanolnya lebih dari 87% dan ukuran partikel kurang dari 0,9 mm pada saat waktu ekstraksi 270 menit. Daidzein 15 mg% dapat dicapai dengan proses ekstraksi pada konsentrasi etanol lebih dari 85% dan ukuran partikel kurang dari 0,93 mm pada saat waktu ekstraksi 270 menit. Daerah kuning mewakili kondisi proses ekstraksi yang menghasilkan genistein minimal 20

mg% tempe kering dan minimal 15 mg% daidzein tempe kering. Ini disebut kondisi optimal untuk ekstraksi genistein dan daidzein dari tempe.

B. HASIL TAHUN 2

Pada tahun kedua ini dilakukan uji in vitro dan in vivo ekstrak tempe terstandar genistein dan daidzein. Telah selesai dilakukan uji in vitro ekstrak tempe terstandar genistein dan daidzein terhadap MMP-9 yang diduga ekspresinya meningkat pada penderita diabetes.

Uji Enzmatik secara in vitro

Tiga sampel yang terdiri dari ekstrak tempe, standar genistein dan standar daidzein diuji kemampuannya menghambat aktivitas MMP-9. Substrat (peptida) bereaksi dengan MMP-9 dengan katalisis oleh ion Zn sebagai ligan di dekat tempat reaksi. Ion ini menjembatani propeptida berikatan dengan ikatan SH yang disebut sebagai sistein berubah menjadi ikatan enzim-substrat pada daerah katalisis. Pada saat inhibitor diaplikasikan pada sistem enzim-substrat, ikatan yang terjadi seharusnya terdegradasi secara reversibel. Tabel 3 memperlihatkan hasil uji penghambatan MMP-9 oleh ekstrak tempe, standar genistein, standar daidzein inhibitor NNGH sebagai kontrol positif.

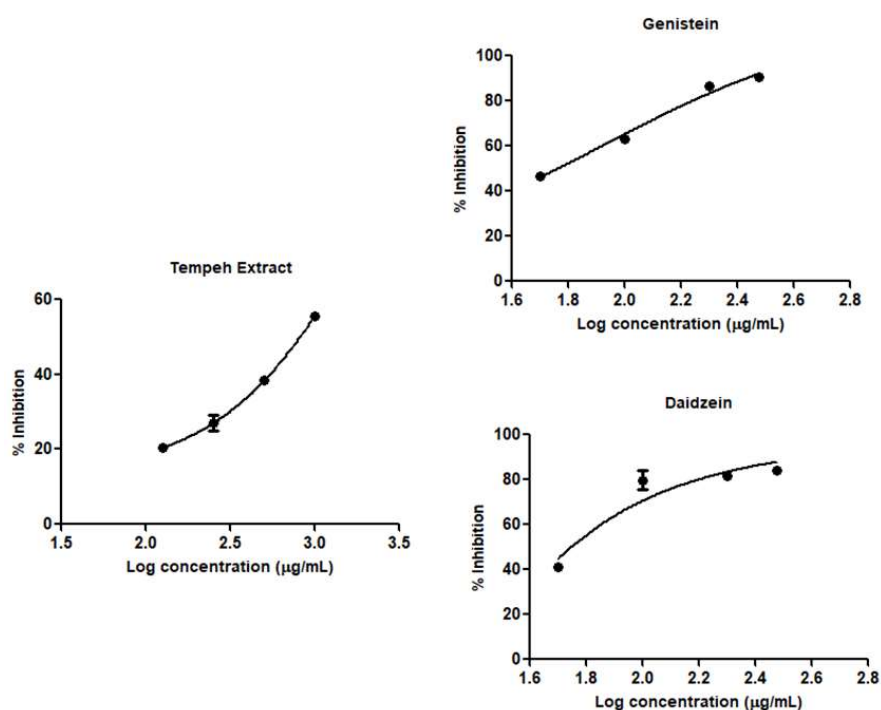
Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa ekstrak tempe mempunyai kemampuan menghambat MMP-9 sekitar 56% pada konsentrasi ekstrak 1 mg/mL. Menurut Aderogba et al (2013) penghambatan ekstrak pada 1 mg/mL dapat dibagi menjadi 4 kategori: aktif (70-100%), moderat (40-70%) dan aktivitas rendah (20-40%). Dengan demikian ekstrak tempe dapat didefinisikan aktif secara moderat. Hasil perhitungan IC_{50} dari ekstrak adalah 2,14 mg/mL yang berarti semakin banyak ekstrak tidak dapat meningkatkan penghambatan terhadap MMP-9. Hal ini disebabkan oleh kurva sigmoid kurva obat – dosis yang diperlihatkan oleh *pocket site* enzim sudah jenuh ditempati oleh ligan.

Aktivitas ekstrak terhadap MMP-9 dapat dibandingkan dengan kandungan 2 isoflavon di dalamnya yaitu genistein dan daidzein. Genistein dan Daidzein memperlihatkan penghambatan yang tinggi terhadap MMP-9 yaitu 87% dan 82% pada konsentrasi 0,2 mg/mL. Yang menarik adalah daidzein memperlihatkan IC_{50} pada konsentrasi nanoMolar sedangkan genistein mempunyai IC_{50} dalam konsentrasi mikroMolar. Konsentrasi IC_{50} daidzein setara dengan NNGH yang mempunyai penghambatan sebesar 80%, walaupun demikian inhibitor NNGH sangat lebih poten dibandingkan

dengan isoflavon karena yang digunakan adalah 0,02 μM . Kurva hubungan obat-aktivitas dapat dilihat pada gambar 6.

Tabel 3. Hasil uji in vitro ekstrak tempe, genistein, daidzein dan kontrol positif (inhibitor NNGH) terhadap MMP-9.

Sampel	% Inhibisi	Konsentrasi	IC ₅₀
Tempeh extract	56%	1 mg/mL	2.14 mg/mL
Genistein	87%	0.2 mg/mL = 740 μM	290 μM
Daidzein	82%	0.2 mg/mL = 780 μM	19.6 nM
NNGH Inhibitor ((+) control))	80%	0.02 μM	



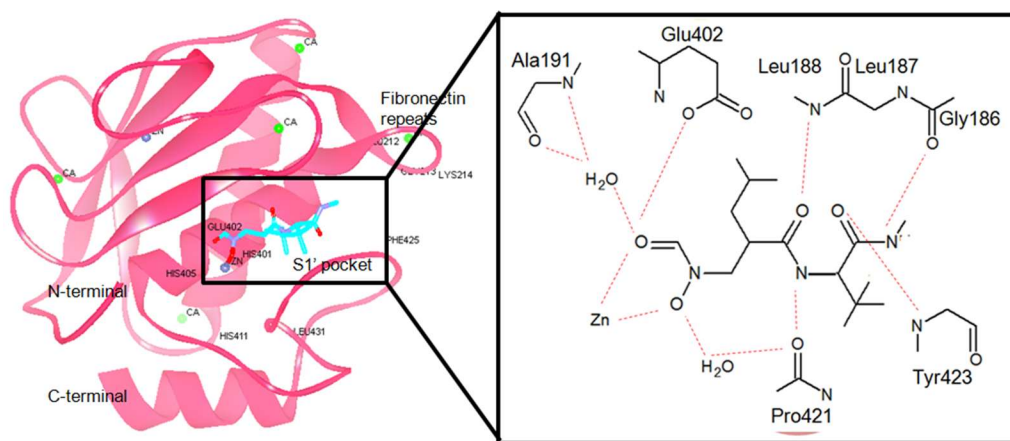
Gambar 6. Kurva respon dosis obat – aktivitas ekstrak tempe, genistein, dan daidzein terhadap MMP-9 secara in vitro.

Uji *In Silico*

Interaksi molekuler antara ligan dan enzim dapat didekati menggunakan pendekatan in silico jika tidak ada co-crystal atau struktur NMR. Molecular docking adalah salah satu metode in silico untuk memprediksi dengan cepat atau untuk menjelaskan perilaku molekul antara ligan dan enzim pada asosiasi dengan eksperimen in vitro. Dua ligan yaitu genistein dan daidzein, yang merupakan

2 senyawa yang dianggap bertanggungjawab terhadap aktivitas ekstrak dalam menghambat MMP-9 secara in vitro, dilakukan docking pada binding site MMP-9.

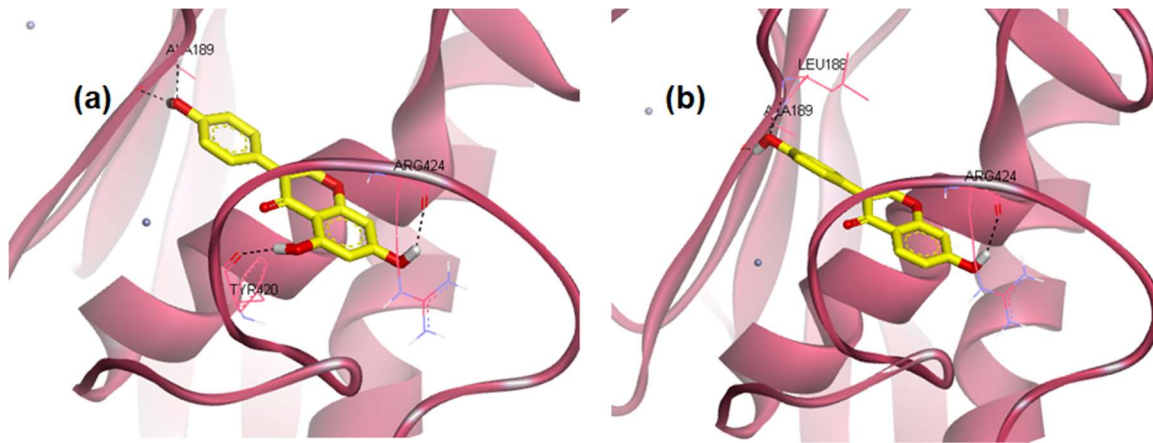
Rantai panjang MMP-9 terdiri dari presignal, domain propeptida, domain katalitik, ditambahkan 3 pengulangan fibronectin tipe 2, penambahan area unik kolagen-like tipe 5 dan domain hemopexin. Pada PDB 1GKC, MMP-9 adalah co-kristalisasi dengan ligan hidoksamat peptidik $N\sim 2\sim\sim[(2R)-2-\{[formyl(hydroxy)amino]methyl\}-4-methylpentanoyl]-N,3\text{-dimethyl-L-}$ valinamide. Ligan berikatan dengan tempat aktif MMP-9 dengan interaksi dengan: N-amide group of LEU188 dan TYR423; O-carbonyl group of GLY186 dan PRO421. Disamping itu, sebagai zinc endopeptida, ion zinc membentuk kompleks koordinat dengan grup O-hidroksamat yang juga dimediasi oleh air untuk berinteraksi ALA191 dan PRO421. Sebagai tambahan, O-hidroksamat berinteraksi dengan O-karboksilat dari GLU402. Gambar 7 memperlihatkan ikatan hidoksamat peptida pada site aktif dari MMP-9.



Gambar 7. Model ikatan dari inhibitor hidoksamat pada tempat aktif MMP-9 (diambil dari pustaka (27) dengan ijin).

Docking dari genistein dan daidzein pada tempat aktif MMP-9 menghasilkan menghasilkan energi bebas ikatan sebesar masing-masing (ΔG_{bind}) = -9.75 and -9.57 kcal/mol. Pose docking untuk keduanya selama 100 kali run, hanya ada satu kluster mengandung pose yang sangat mirip dengan toleransi RMS (RMSTOL) menjadi 2.0 Å. Genistein berinteraksi dengan residu asam amino seperti ALA189, TYR420 dan ARG424, dimana daidzein berinteraksi dengan LEU188, ALA189 and ARG 424 melalui ikatan hidrogen. Adanya interaksi melalui ikatan hidrogen ini, daidzein daidzein lebih relevan dibanding genistein karena dapat berinteraksi dengan setidaknya satu residu asam amino seperti yang terjadi pada inhibitor hidoksamat yaitu Leu188, yang mana genistein tidak

dapat berinteraksi samasekali dengan residu asam amino. Hal inilah yang menjelaskan mengapa daidzein secara *in vitro* lebih aktif dibandingkan dengan genistein. Gambar 8 mengilustrasikan pose docking genistein dan daidzein.



Gambar 8. Pose docking dari (a) genistein dan (b) daidzein pada tempat aktif MMP-9.

BAB 5. KESIMPULAN SEMENTARA

A. Kesimpulan tahun 1

Model ekstraksi genistein dan daidzein mempunyai probabilitas nilai F ($p < 0,0001$) yang signifikan untuk memprediksi genistein dan daidzein yang diambil dari tempe kering. Validasi internal dilakukan dengan cara leave-one-out dan menghasilkan Pred R-squared yang tinggi untuk genistein dan daidzein masing masing 0,9657 dan 0,9615. Kondisi ekstraksi optimal dicapai pada konsentrasi etanol 100%, ukuran partikel 0,6 mm dan waktu ekstraksi 270 menit. Ini menghasilkan 26,03 mg% genistein dan 19,42 mg% daidzein yang diekstrak dari tempe kering.

B. Kesimpulan tahun 2

Secara in vitro ekstrak tempe mempunyai aktivitas moderat dalam menghambat ekspresi MMP-9. Sedangkan genistein dan daidzein mempunyai aktivitas tinggi dalam menghambat MMP-9. Apabila dibandingkan antara genistein dan daidzein, maka daidzein mempunyai aktivitas penghambatan yang lebih tinggi karena terdapat setidaknya terdapat satu residu asam amino yang berinteraksi seperti inhibitor hidroksamat.

BAB 6. RENCANA SELANJUTNYA

Rencana tahun ke-3 yang akan dilakukan adalah

1. Melakukan uji in vivo terhadap ekstrak tempe pada hewan uji mencit terinduksi aloksan.
2. Pembuatan sediaan penyembuh luka

REFERENSI

- Aderogba, M. A., Ndhlala, A. R., Rengasamy, K. R., & Van Staden, J. (2013). Antimicrobial and selected in vitro enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*, 18(10), 12633-12644.
- Barbosa, A.C.L., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., 2006. Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chem.* 98, 757–766. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.014
- Boulton, A.J.M., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., Apelqvist, J., 2005. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 366, 1719–24. doi:10.1016/S0140-6736(05)67698-2
- Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin. Invest.* 117, 1219–1222. doi:10.1172/JCI32169.
- Campton-Johnston, S., Wilson, J., 2001. Infected wound management: advanced technologies, moisture-retentive dressings, and die-hard methods. *Crit. Care Nurs. Q.* 24, 64–77. doi:10.1109/10.7291
- Cavanagh, P.R., Lipsky, B. a, Bradbury, A.W., Botek, G., 2005. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 366, 1725–1735. doi:10.1016/S0140-6736(05)67699-4
- Chadha, G., Sathigari, S., Parsons, D.L., Jayachandra Babu, R., 2011. In vitro percutaneous absorption of genistein from topical gels through human skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37, 498–505. doi:10.3109/03639045.2010.525238
- Chaiyasut, C., Kumar, T., Tipduangta, P., 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African J. Biotechnol.* 9, 4120–4126.
- Cianfarani, F., Zambruno, G., Brogelli, L., Sera, F., Lacal, P.M., Pesce, M., Capogrossi, M.C., Failla, C.M., Napolitano, M., Odorisio, T., 2006. Placenta Growth Factor in Diabetic Wound Healing Altered Expression and Therapeutic Potential. *Cell Inj. Repair, Aging Apoptosis* 169, 1167–1182. doi:10.2353/ajpath.2006.051314
- Copeland, R. A. (2004). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons
- Davis, S.C., Mertz, P.M., Eaglstein, W.H., 1990. Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream. *J. Surg. Res.* 48, 245–248. doi:10.1016/0022-4804(90)90220-V
- Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mehle, A.L., Mertz, P.M., 1988. Optimal use of an occlusive dressing to enhance healing. Effect of delayed application and early removal on wound healing. *Arch Dermatol* 124, 392–395. doi:10.1001/archderm.1988.01670030058022
- Emmerson, E., Campbell, L., Ashcroft, G.S., Hardman, M.J., 2010. The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 321, 184–193. doi:10.1016/j.mce.2010.02.026
- Eo, H., Ann, J., Lim, Y., 2015. Dietary Supplementation of Genistein Attenuates Inflammatory Responses and Oxidative Stress during Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *J. Agric. Sci.* 7, 80–. doi:10.5539/jas.v7n2p80

- Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736–1743.
- Field, C.K., Kerstein, M.D., 1994. Overview of wound healing in a moist environment. *Am. J. Surg.* 167, 2–6. doi:10.1016/0002-9610(94)90002-7
- Galiano, R.D., Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H.G., Gurtner, G.C., 2004. Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *Am. J. Pathol.* 164, 1935–1947. doi:10.1016/S0002-9440(10)63754-6
- Galkowska, H., Wojewodzka, U., Olszewski, W.L., 2006. Chemokines , cytokines , and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 4, 558–565. doi:10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x
- Hamed, S., Bennett, C.L., Demiot, C., Ullmann, Y., Teot, L., Desmoulière, A., 2014. Erythropoietin , a novel repurposed drug : An innovative treatment for wound healing in patients with diabetes mellitus. *Wound Repair Regen.* 22, 23–33. doi:10.1111/wrr.12135
- Hamed, S., Ullmann, Y., Masoud, M., Hellou, E., Khamaysi, Z., Teot, L., 2010. Topical Erythropoietin Promotes Wound Repair in Diabetic Rats. *J. Invest. Dermatol.* 130, 287–294. doi:10.1038/jid.2009.219
- Hasan, A., Murata, H., Falabella, A., Ochoa, S., Zhou, L., 1997. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor- b 1 , 1. *J. Dermatol. Sci.* 16, 59–66.
- Hong, G.-E., Mandal, P.K., Lim, K.-W., Lee, C.-H., 2012. Fermentation Increases Isoflavone Aglycone in Black Soybean Pulp. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 7, 502–511.
- Istyastono, E.P., 2012. Construction and optimization of structure-based virtual screening protocols to identify cyclooxygenase-1 inhibitors using open babel, spores and plants. *Indones. J. Chem.* 12, 141–145.
- Istyastono, E.P., de Graaf, C., de Esch, I.J.P., Leurs, R., 2011a. Molecular determinants of selective agonist and antagonist binding to the histamine H4 receptor. *Cur. Top. Med. Chem.* 11, 661–79.
- Istyastono, E.P., Nijmeijer, S., Lim, H.D., Stolpe, A. Van De, Roumen, L., Kooistra, A.J., Vischer, H.F., Esch, I.J.P. De, Leurs, R., Graaf, C. De, 2011b. Molecular Determinants of Ligand Binding Modes in the Histamine H4 Receptor: Linking Ligand-Based Three-Dimensional Quantitative Structure–Activity Relationship (3D-QSAR) Models to in Silico Guided Receptor Mutagenesis Studies. *J. Med. Chem.* 54, 8136–8147.
- Ji, H.-T., Shi, X.-J., Hong, Y., Wang, Y., Wang, H.-L., Wang, Z.-Y., Fang, X.-X., 2009. Inhibition of matrix metalloproteinases activities by luteolin. *Chem Res Chin Univ.* 25, 895–898. doi:1005-9040(2009)-06-895-04.
- Lim, H.D., de Graaf, C., Jiang, W., Sadek, P., McGovern, P.M., Istyastono, E.P., Bakker, R. a, de Esch, I.J.P., Thurmond, R.L., Leurs, R., 2010. Molecular determinants of ligand binding to H4R species variants. *Mol. Pharmacol.* 77, 734–43. doi:10.1124/mol.109.063040

- Lim, H.D., Istyastono, E.P., van de Stolpe, A., Romeo, G., Gobbi, S., Schepers, M., Lahaye, R., Menge, W.M.B.P., Zuiderveld, O.P., Jongejan, A., Smits, R. a, Bakker, R. a, Haaksma, E.E.J., Leurs, R., de Esch, I.J.P., 2009. Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H3 and H4 receptors: synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3987–94. doi:10.1016/j.bmc.2009.04.007
- Lobmann, R., Ambrosch, A., Schultz, G., Waldmann, K., Schiweck, S., Lehnert, H., 2002. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 45, 1011–1016. doi:10.1007/s00125-002-0868-8
- Lodhi, S., Jain, A.P., Sharma, V.K., Singhai, A.K., 2013. Wound-Healing Effect of Flavonoid-Rich Fraction from *Tephrosia purpurea* Linn . on Streptozotocin- Induced Diabetic Rats Wound-Healing Effect of Flavonoid-Rich Fraction from *Tephrosia purpurea* Linn . *J. Herbs. Spices Med. Plants* 19, 191–205. doi:10.1080/10496475.2013.779620
- Lodhi, S., Singhai, A.K., 2013. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn . on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 253–259. doi:10.1016/S1995-7645(13)60053-X
- Loots, M.A.M., Kenter, S.B., Au, F.L., Galen, W.J.M. Van, Middelkoop, E., Bos, J.D., 2002. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF , IGF-I , bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 153–160.
- Mahmood, A., Tiwari, A.K., Şahİn, K., Küçük, Ö., Ali, S., 2016. Triterpenoid saponin-rich fraction of *Centella asiatica* decreases IL-1 β and NF- κ B , and augments tissue regeneration and excision wound repair. *Turkish J. Biol.* 40, 399–409. doi:10.3906/biy-1507-63
- Mallefet, P., and Dweck, A.C., 2008, Mechanism of Wound Healing Examined, *Personal Care*, 9 (3), 75 – 83
- Maruyama, K., Asai, J., Ii, M., Thorne, T., Losordo, D.W., Amore, P.A.D., 2007. Decreased Macrophage Number and Activation Lead to Reduced Lymphatic Vessel Formation and Contribute to Impaired Diabetic Wound Healing. *Am. J. Pathol.* 170, 1178–1191. doi:10.2353/ajpath.2007.060018
- Mihardja, L., Soetrisno, U., Soegondo, S., 2014. Prevalence and clinical profile of diabetes mellitus in productive aged urban Indonesians. *J. Diabetes Investig.* 5, 507–512. doi:10.1111/jdi.12177
- Miyazaki, K., Hanamizu, T., Iizuka, R., Chiba, K., 2002. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 15, 175–183. doi:63546
- Mohan, V., Gibbs, A. C., Cummings, M. D., Jaeger, E. P., & DesJarlais, R. L. (2005). Docking: successes and challenges. *Current pharmaceutical design*, 11(3), 323-333.
- Moynihan, H., Crean, A., 2009. Physicochemical Basis of Pharmaceuticals, Physicochemical Basic of Pharmaceuticals. Oxford University Press.
- Nakada, M., Imai, M., Suzuki, I., 2009. Impact of ethanol addition on the solubility of various soybean isoflavones in supercritical carbon dioxide and the effect of glycoside chain in isoflavones. *J. Food Eng.* 95, 564–571. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.020

- Nanjan, P., Nambiar, J., Nair, B.G., Banerji, A., 2015. Synthesis and discovery of (I-3,II-3)-biacacetin as a novel non-zinc binding inhibitor of MMP-2 and MMP-9. *Bioorg Med Chem*, 23, 3781-3787. doi: 10.1016/j.bmc.2015.03.084
- Nicolotti, O., Catto, M., Giangreco, I., Barletta, M., Leonetti, F., Stefanachi, A., Pisani, L., Cellamare, S., Tortorella, P., Loiodice, F., Carotti, A., 2012. Design, synthesis and biological evaluation of 5-hydroxy, 5-substituted-pyrimidine-2,4,6-triones. doi:10.1016/j.ejmech.2012.09.036
- Okan, D., Student, M., Woo, K., Clinic, W.H., Ayello, E.A., Advisor, S., Editor, C.A., Care, W., Sibbald, R.G., Sciences, P.H., Clinic, W.H., Editor, C.A., Care, W., 2007. The Role of Moisture Balance in Wound Healing. *Adv. Ski. Wound Care* 39–53.
- Park, E., Lee, S.M., Jung, I.K., Lim, Y., Kim, J.H., 2011. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410, 514–519. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.013
- Philips, N., Samuel, M., Arena, R., Chen, Y-J., Conte, J., Natrajan, P., Haas, G., Gonzalez, S., 2010. Direct inhibition of elastase and matrixmetalloproteinases and stimulation of biosynthesis of fibrillar collagens, elastin, and fibrillins by xanthohumol. *J Cosmet Sci*, 61, 125. doi: 10.1111/j.1468-2494.2010.00609_4.x
- Radhakrishna, K., Karri, N.R., Baskaran, M., Kuppusamy, G., 2016. Treatment of Diabetic Foot Ulcers Potential Use of Herbal Medicines in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Med. Sci.* 14, 34–42.
- Radifar, M., Yuniarti, N., Istyastono, E.P., 2013. PyPLIF-assisted redocking indomethacin-(R)-alpha-ethyl-ethanolamide into cyclooxygenase-1. *Indones. J. Chem.* 13, 283–286.
- Rostagno, M. a, Palma, M., Barroso, C.G., 2007. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Anal. Chim. Acta* 597, 265–272. doi:10.1016/j.aca.2007.07.006
- Rowell, S., Hawtin, P., Minshull, C. A., Jepson, H., Brockbank, S. M., Barratt, D. G., & Pauptit, R. A. (2002). Crystal structure of human MMP9 in complex with a reverse hydroxamate inhibitor. *Journal of molecular biology*, 319(1), 173-181.
- Signorelli, S.S., Malaponte, G., Libra, M., Di, L., Celotta, G., Petrina, M., Nicotra, G.S., Indelicato, M., Navolanic, P.M., 2005. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc. Med.* 10, 1–6.
- Singh, A., Singh, P.K., Singh, R.K., 2014. Antidiabetic and Wound Healing Activity of *Catharanthus roseus* L . in Streptozotocin- Induced Diabetic Mice. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 2, 686–692.
- Sirci, F., Istyastono, E.P., Vischer, H.F., Kooistra, A.J., Nijmeijer, S., Kuijter, M., Wijtmans, M., Mannhold, R., Leurs, R., De Esch, I.J.P., De Graaf, C., 2012. Virtual Fragment Screening: Discovery of Histamine H3 Receptor Ligands u Using Ligand-based and Protein-Based Molecular Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 3308–3324. doi:10.1021/ci3004094

- Smits, R. a., Adami, M., Istyastono, E.P., Zuiderveld, O.P., Van Dam, C.M.E., De Kanter, F.J.J., Jongejan, A., Coruzzi, G., Leurs, R., De Esch, I.J.P., 2010. Synthesis and QSAR of Quinazoline Sulfonamides As Highly Potent Human Histamine H4 Receptor Inverse Agonists. *J. Med. Chem.* 53, 2390–2400. doi:10.1021/jm901379s
- Song, H., Koo, T.Y., Park, J.H., Song, K.H., Kim, S.T., Choi, I.S., Choi, W.J., Mok, W.K., Min, H.S., Yoon, D.S., 2003. Inhibition of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Expression by Genistein in Breas Cancer Cell-line. *J. Korean Breast Cancer Soc.* 6, 277–282.
- Stancanelli, R., Mazzaglia, A., Tommasini, S., Calabrò, M.L., Villari, V., Guardo, M., Ficarra, P., Ficarra, R., 2007. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 980–984. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.025
- Stanley, C.A., Park, H.-Y., Phillips, T.J., Russakovsky, V., Menzoian, J.O., 1997. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J. Vasc. Surg.* 26, 994–1001.
- Stintzing, F.C., Hoffmann, M., Carle, R., 2006. Thermal degradation kinetics of isoflavone aglycones from soy and red clover. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 373–377. doi:10.1002/mnfr.200500187
- Sutrisno, S., Mastryagung, D., Khairiah, R., Tridiyawati, F., Artina, N., Hidayati, D., Noorhamdani, N., Santoso, S., 2014. The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation, and apoptosis in endometriosis cell culture. *J. Exp. Integr. Med.* 4, 299–304. doi:10.5455/jeim.200414.or.102
- Teoh, S.L., Latiff, A.A., Das, S., 2009. The effect of topical extract of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing in nondiabetic rats and in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 815–822. doi:10.1111/j.1365-2230.2008.03117.x
- Tie, L., An, Y., Han, J., Xiao, Y., Xiaokaiti, Y., Fan, S., Liu, S., Chen, A.F., Li, X., 2013. Genistein accelerates refractory wound healing by suppressing superoxide and FoxO1 / iNOS pathway in type 1 diabetes ☆. *J. Nutr. Biochem.* 24, 88–96. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.02.011
- Valsecchi, A.E., Franchi, S., Panerai, A.E., Rossi, A., Sacerdote, P., Colleoni, M., 2011. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 694–702. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.060
- Wijtmans, M., de Graaf, C., de Kloe, G., Istyastono, E.P., Smit, J., Lim, H., Boonnak, R., Nijmeijer, S., Smits, R. a., Jongejan, A., Zuiderveld, O., de Esch, I.J.P., Leurs, R., 2011. Triazole Ligands Reveal Distinct Molecular Features That Induce Histamine H 4 Receptor Affinity and Subtly Govern H 4 /H 3 Subtype Selectivity. *J. Med. Chem.* 54, 1693–1703. doi:10.1021/jm1013488
- Yuliani, S.H., 2012. Formulasi Sediaan Hidrogel Penyembuh Luka Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). Disertasi Fakultas F.

- Yuliani, S.H., Fudholi, A., Pramono, S., Marchaban, H., 2012. Physical Properties of Wound Healing Gel of Ethanolic Extract of Binahong (*Anredera cordifolia*) During Storage. *Indones. J. Phar.* 23, 203–208.
- Yuliani, S.H., Istyastono, E.P., 2012. Aplikasi Desain Faktorial untuk Mempelajari Proses Ekstraksi pada Ekstraksi Asam Ursolat dari Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). *Medicinus* submitted.
- Yuniarti, N., Ikawati, Z., Istyastono, E.P., 2011. The importance of ARG513 as a hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitors in a virtual screening campaign. *Bioinformation* 6, 164–6.
- Yuniarti, N., Nugroho, P.A., Asyhar, A., Sardjiman, S., Ikawati, Z., Istyastono, E.P., 2012. In Vitro and In Silico Studies on Curcumin and Its Analogues as Dual Inhibitors for cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). *ITB J. Sci.* 44, 51–66. doi:10.5614/itbj.sci.2012.44.1.5
- Zhang, E., Gao, B., Yang, L., Wu, X., Wang, Z., 2016. Notoginsenoside Ft1 Promotes Fibroblast Proliferation via PI3K / Akt / mTOR Signaling Pathway and Benefits Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 324–332.
- Zykova, S.N., Jenssen, T.G., Berdal, M., Olsen, R., Myklebust, R., Seljelid, R., 2000. Altered Cytokine and Nitric Oxide Secretion In Vitro by Macrophages From Diabetic Type II – Like db / db Mice. *Diabetes* 49, 1451–1458.

LAMPIRAN

Daftar lampiran:

1. HKI terdaftar yang berjudul “Metode Ekstraksi Isoflavon Aglikon Dari Kedelai Dan Produk Turunan Dari Kedelai Tersebut” dengan no pendaftaran paten PID201706447
2. Manuscript yang sudah terbit pada jurnal internasional terindeks scopus: Wound Medicine 22, 1 – 13, 2018 dengan judul artikel “Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) in wound healing of diabetic foot ulcer: Molecular target and structure-based drug design”
3. Manuscrip yang telah terbit pada jurnal internasional terindeks Scopus: Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research 6 (4) 231-241, 2018 dengan judul artikel “ Optimization of genistein and daidzein extraction from tempeh-fermented product of soybean”
4. Serifikat dari Internastional Seminar on Natural Product Chemistry di Bandung 12 -13 September 2018.
5. Draft manuscript berjudul Wound Healing Effect of Tempeh Extract: *In Vitro*, *In Silico*, and *In Vivo* Study

FORMULIR PERMOHONAN PENDAFTARAN PATEN INDONESIA
APPLICATION FORM OF PATENT REGISTRATION OF INDONESIA

Data Permohonan (Application)	
Nomor e-Filing : WFP2017015132 <i>Number of e-Filing</i>	Tanggal Permohonan : 2017-09-22 <i>Date of Submission</i>
Nomor Permohonan : PID201706447 <i>Number of Application</i>	Jumlah Klaim : 10 <i>Total Claim</i>
Jenis Permohonan : Paten Non UMKM <i>Type of Application</i>	Jumlah Halaman : 18 <i>Total Page</i>
Judul : METODE EKSTRAKSI ISOFLAVON AGLIKON DARI KEDELAI DAN PRODUK TURUNAN DARI KEDELAI TERSEBUT <i>Title</i>	
Abstrak : Invensi ini menyediakan suatu metode ekstraksi isoflavon aglikon terstandar genistein dan daidzein. Dimulai dengan proses fermentasi kedelai menggunakan ragi Rhizopus sp. Selanjutnya menghancurkan kedelai atau produk turunan dari kedelai tersebut menjadi kecil yang kemudian didefatisasi dengan menggunakan petroleum eter, dan selanjutnya dikeringkan. Serbuk hasil defatisasi dihaluskan kembali sampai ukuran tertentu kemudian dimaserasi menggunakan etanol dengan kadar tertentu selama waktu tertentu sehingga menghasilkan maserat kental yang kemudian diekstraksi kembali dengan metode ekstraksi liquid-liquid menggunakan etil asetat dan air. Fraksi etil asetat dikeringkan sehingga membentuk ekstrak kering yang kaya akan isoflavon aglikon. <i>Abstract</i>	

Permohonan PCT (PCT Application)	
Nomor PCT : <i>PCT Number</i>	Nomor Publikasi : <i>Publication Number</i>
Tanggal PCT : <i>PCT Date</i>	Tanggal Publikasi : <i>Publication Date</i>

Pemohon (Applicant)		
Nama (Name)	Alamat (Address)	Surel/Telp. (Email/Phone)
Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
ENADE PERDANA ISTYASTONO	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
FLORENTINUS DIKA OCTA	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
MICHAEL RAHARJA GANI	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779

Penemu (Inventor)		
Nama (Name)	Alamat (Address)	Surel/Telp. (Email/Phone)
Dr. SRI HARTATI YULIANI, Apt	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo, Depok, Yogyakarta 55282, YOGYAKARTA, 55282, Indonesia	adnanhardie@gmail.com 08118097779
ENADE PERDANA ISTYASTONO	Fakultas Farmasi, Kampus 3 Universitas Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo,	adnanhardie@gmail.com 08118097779