



UNIVERSITAS SANATA DHARMA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

MRICAN, TROMOL POS 29 YOGYAKARTA 55002

TELP: (0274) 513301, 515352 EXT. 1526, 1527, FAX. (0274) 562383 - TELEGRAM: SADHAR YOGYA Rek. a/n Lembaga Penelitian No. 287 01 00277005 CIMB Niaga

SURAT PERJANJIAN PENUGASAN PELAKSANAAN HIBAH PENELITIAN DRPM KEMRISTEKDIKTI TAHUN ANGGARAN 2016 Nomor : 027a /Penel.LPPM USD/IV/2016

Pada hari ini Rabu tanggal enam belas bulan Maret tahun dua ribu enam belas, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. **Dr. Anton Haryono, M.Hum.** : 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. Yustina Sri Hartini, Apt.** : Dosen Universitas Sanata Dharma, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2016 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 2016, Nomor: 010/HB-LIT/III/2016.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Tahun 2016 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 2016 dengan judul: **Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & pav.) sebagai Imunostimulan secara In Vivo (Skim: Hibah Fundamental)**
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 2016 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-042.06-0.1.401516/2016; tanggal 7 Desember 2015.

Pasal 2

- (1) **PIHAK PERTAMA** menyerahkan dana penelitian sebagaimana dimaksud dalam pasal 1 sebesar Rp. 60.000.000 (*Enam 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-042.06-0.1.401516/2016; tanggal 7 Desember 2015.
- (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 $70\% \times \text{Rp. } 60.000.000 = \text{Rp. } 42.000.000$ (Empat puluh dua juta rupiah), dibayarkan setelah Surat Perjanjian Penugasan ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
 - b. Pembayaran Tahap Kedua/Terakhir sebesar 30% dari total dana yaitu $30\% \times \text{Rp. } 60.000.000 = \text{Rp. } 18.000.000$ (Delapan belas juta rupiah), dibayarkan setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke laman Simlitabmas selambat-lambatnya **tanggal 12 Juli 2016** 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 12 juli 2016**.
 - 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 (2) 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 2016**.

Pasal 5

- (1) **PIHAK KEDUA** wajib mengunggah ke laman **SIMLITABMAS** serta menyerahkan *hardcopy* dan *softfile* kepada **PIHAK PERTAMA** selambat-lambatnya tanggal **12 Juli 2016** 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 2016 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 **15 Oktober 2016**;
 - b. Laporan akhir hasil penelitian, laporan keuangan 100%, capaian hasil, poster, artikel ilmiah dan profile pada tanggal **27 Oktober 2016**;
- Serta menyerahkan dokumen 1.a. dan 1.b. di atas kepada **PIHAK PERTAMA** dalam bentuk *hardcopy* dan *softfile* paling lambat tanggal **27 Oktober 2016**.
- (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 5 (lima) eksemplar 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 X Tahun 2016**:
- a. Bentuk/ukuran kertas kuarto;
 - b. Warna cover/sampul sesuai ketentuan yang ditetapkan;

- c. Pada bagian bawah sampul ditulis: Dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian kepada Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian yang ditandatangani oleh Rektor USD dan Koordinator Kopertis Wilayah V (ditulis nomor dan tanggalnya: **Nomor: 010/HB-LIT/III/2016; Tanggal: 15 Maret 2016**)

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

Ketua LPPM



Dr. Anton Haryono, M.Hum

PIHAK KEDUA

Ketua Peneliti



Dr.Yustina Sri Hartini, Apt.



UNIVERSITAS SANATA DHARMA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

MRICAN, TROMOL POS 29 YOGYAKARTA 55002

TELP: (0274) 513301, 515352 EXT. 1526, 1527, FAX. (0274) 562383 - TELEGRAM: SADHAR YOGYA Rek. a/n Lembaga Penelitian No. 287 01 00277005 CIMB Niaga

SURAT PERJANJIAN PENUGASAN PELAKSANAAN HIBAH PENELITIAN DRPM KEMRISTEKDIKTI TAHUN ANGGARAN 2016 Nomor : 027a /Penel.LPPM USD/IV/2016

Pada hari ini Rabu tanggal enam belas bulan Maret tahun dua ribu enam belas, kami yang bertanda tangan di bawah ini:

1. **Dr. Anton Haryono, M.Hum.** : 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. Yustina Sri Hartini, Apt.** : Dosen Universitas Sanata Dharma, dalam hal ini bertindak sebagai pengusul dan Ketua Pelaksana Penelitian Tahun Anggaran 2016 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 2016, Nomor: 010/HB-LIT/III/2016.

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA**, secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Tahun 2016 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 2016 dengan judul: **Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & pav.) sebagai Imunostimulan secara In Vivo (Skim: Hibah Fundamental)**
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 2016 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-042.06-0.1.401516/2016; tanggal 7 Desember 2015.

Pasal 2

- (1) **PIHAK PERTAMA** menyerahkan dana penelitian sebagaimana dimaksud dalam pasal 1 sebesar Rp. 60.000.000 (*Enam 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-042.06-0.1.401516/2016; tanggal 7 Desember 2015.
- (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 $70\% \times \text{Rp. } 60.000.000 = \text{Rp. } 42.000.000$ (Empat puluh dua juta rupiah), dibayarkan setelah Surat Perjanjian Penugasan ini ditandatangani oleh kedua belah pihak.
 - b. Pembayaran Tahap Kedua/Terakhir sebesar 30% dari total dana yaitu $30\% \times \text{Rp. } 60.000.000 = \text{Rp. } 18.000.000$ (Delapan belas juta rupiah), dibayarkan setelah **PIHAK KEDUA** mengunggah ke laman Simlitabmas selambat-lambatnya **tanggal 12 Juli 2016** 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 12 juli 2016**.
 - 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 (2) 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 2016**.

Pasal 5

- (1) **PIHAK KEDUA** wajib mengunggah ke laman **SIMLITABMAS** serta menyerahkan *hardcopy* dan *softfile* kepada **PIHAK PERTAMA** selambat-lambatnya tanggal **12 Juli 2016** 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 2016 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**:
- Catatan harian dan penggunaan dana 30%, pada tanggal **15 Oktober 2016**;
 - Laporan akhir hasil penelitian, laporan keuangan 100%, capaian hasil, poster, artikel ilmiah dan profile pada tanggal **27 Oktober 2016**;
- Serta menyerahkan dokumen 1.a. dan 1.b. di atas kepada **PIHAK PERTAMA** dalam bentuk *hardcopy* dan *softfile* paling lambat tanggal **27 Oktober 2016**.
- (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 5 (lima) eksemplar 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 X Tahun 2016**:
- Bentuk/ukuran kertas kuarto;
 - Warna cover/sampul sesuai ketentuan yang ditetapkan;

- c. Pada bagian bawah sampul ditulis: Dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian kepada Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian yang ditandatangani oleh Rektor USD dan Koordinator Kopertis Wilayah V (ditulis nomor dan tanggalnya: **Nomor: 010/HB-LIT/III/2016; Tanggal: 15 Maret 2016**)

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
Ketua LPPM



Dr. Anton Haryono, M.Hum

PIHAK KEDUA
Ketua Peneliti



Dr. Yustina Sri Hartini, Apt.



UNIVERSITAS

SANATA DHARMA

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

SURAT TUGAS PENELITIAN

No. 010/ LPPM USD /II/2016

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Sanata Dharma Yogyakarta dengan ini memberikan tugas kepada:

Nama : Dr. Yustina Sri Hartini, Apt.
Pekerjaan : Dosen
NIP/NIDN/Golongan : P.1557/ 0511096901/ Pembina IV/a
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Farmasi
Status : Ketua Peneliti

Untuk melaksanakan penelitian Desentralisasi yang didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan dengan:

Judul Penelitian : Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & pav.) sebagai Imunostimulan secara In Vivo.
Skim Penelitian : Penelitian Fundamental (Lanjutan Th.ke 2).
Waktu Penelitian : Februari – November 2016

Penerima tugas penelitian wajib mematuhi ketentuan-ketentuan penelitian sebagaimana diatur oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan.

Demikian surat tugas penelitian ini dibuat, mohon dilaksanakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 Februari 2016
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Sanata Dharma



Dr. Anton Haryono, M.Hum.
Ketua

Tembusan:

1. Yth. Rektor
2. Yth. Wakil Rektor I
3. Yth. Dekan/Direktur Pasca Sarjana
4. Yth. Ketua Program Studi
5. Arsip



**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**KAJIAN KEMANFAATAN DAN KEAMANAN SENYAWA HASIL
ISOLASI DAN EKSTRAK DARI DAUN SIRIH MERAH (*Piper
crocatum* Ruis & Pav.) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN SECARA *IN
VIVO***

**Ketua: Dr. Yustina Sri Hartini, M.Si.,Apt. (NIDN : 0511096901)
Anggota 1: Prof. Dr. L. Hartanto Nugroho, M.Agr. (NIDN: 0030046502)**

Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

**UNIVERSITAS SANATA DHARMA
OKTOBER 2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul	Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) sebagai Imunostimulan secara In Vivo
Peneliti/Pelaksana	
Nama Lengkap	YUSTINA SRI HARTINI M.Si., Apt.
Perguruan Tinggi	Universitas Sanata Dharma
NIDN	0511096901
Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
Program Studi	Farmasi
Nomor HP	08122968364
Alamat surel (e-mail)	yustinahartini@usd.ac.id
Anggota (1)	
Nama Lengkap	Drs LAURENTIUS HARTANTO NUGROHO
NIDN	0030046502
Perguruan Tinggi	Universitas Gadjah Mada
Institusi Mitra (jika ada)	-
Nama Institusi Mitra	-
Alamat	-
Penanggung Jawab	-
Tahun Pelaksanaan	Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan	Rp 60.000.000,00
Biaya Keseluruhan	Rp 149.060.000,00

Mengetahui,
Wakil Dekan Fak. Farmasi USD

(Dr. Anna Pri Wulandari, Apt.)
NIP/NIK P. 1571

Yogyakarta, 21 - 10 - 2016
Ketua,


(YUSTINA SRI HARTINI M.Si., Apt.)
NIP/NIK P. 1557

Menyetujui,
Ketua LPPM USD

(Dr. Anton Haryono, M.Hum.)
NIP/NIK P. 1306

RINGKASAN

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag dari 2 senyawa neolignan hasil isolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yakni Pc-1 dan Pc-2 pada dosis 5 mg/kgBB, setara dengan aktivitas fagositosis makrofag 450 mg/kgBB ekstrak daun tersebut. Sel fagosit bila teraktivasi berlebihan dapat menyebabkan reaksi merugikan terhadap sel itu sendiri melalui produksi ROS dan mediator inflamasi, sehingga imunostimulan yang juga bersifat antioksidan dan antiinflamasi lebih direkomendasikan. Lebih lanjut penelitian ini akan mengkaji aktivitas antioksidan dan aktivitas antiinflamasi dari Pc-1 dan Pc-2 serta ekstrak daun sirih merah.

Penelitian sebelumnya telah menetapkan karakter Pc-1 dan Pc-2, dan telah diperoleh titik lebur Pc-1 (kemurnian 100%), akan dilanjutkan dengan pemurnian Pc-2 dan penetapan titik leburnya. Telah diteliti keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada organ bunga, daun, dan batang dari 3 spesies *Piper* yakni *P. betle*, *P. nigrum*, dan *P. longum*, untuk melengkapi pemetaan distribusi kedua senyawa tersebut pada anggota marga *Piper* yang lain maka akan diteliti keberadaan kedua senyawa tersebut pada *P. cubeba*, *P. aduncum*, dan *P. bacatum*.

Studi pada berbagai tanaman obat dari Cina menunjukkan hubungan yang kuat antara kapasitas antioksidan dengan kadar fenol total sehingga selain mengukur aktivitas antioksidan ekstrak daun tujuh spesies dari marga *Piper*, penelitian ini juga akan mengukur kadar fenol total.

Isolasi Pc-1 dan Pc-2 dilaksanakan dengan cara yang sama dengan penelitian sebelumnya, permurnian Pc-2 dilakukan dengan kromatografi kolom. Deteksi keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada *P. cubeba*, *P. aduncum*, dan *P. bacatum* menggunakan metode KLT densitometri dan GC-MS. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *DPPH radical scavenging*, dan aktivitas antiinflamasi diukur dengan metode *Carrageenan induced paw edema*.

Hasil penelitian menunjukkan antioksidan dan antiinflamasi senyawa imunostimulan Pc-1 dan Pc-2 maupun ekstrak daun *P. crocatum*, titik lebur Pc-2, aktivitas antioksidan pada enam ekstrak daun *Piper* (*P. crocatum*, *P. betle*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. cubeba*, *P. aduncum*, *P. bacatum*) berserta kadar fenol totalnya. Informasi tersebut dapat menjadi dasar penetapan tingkat kemanfaatan pemakaian ekstrak ataupun senyawa hasil isolasi dari ekstrak daun *P. crocatum*, informasi tentang alternatif sumber senyawa imunostimulan tersebut pada spesies *Piper* selain *P. crocatum*, dan dasar pemanfaatan ekstrak daun tujuh spesies *Piper* sebagai antioksidan.

Kata kunci : sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), ekstrak *Piper*, neolignan, antioksidan, antiinflamasi, kadar fenol total

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, sehingga penelitian berjudul ‘Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz & pav.) sebagai Imunostimulan secara *In Vivo*’ dapat penulis jalani dan kemudian penulis dapat menyampaikan laporan akhir penelitian hibah yang didanai DIKTI melalui skim penelitian fundamental tahun anggaran 2016 ini. Penelitian ini merupakan penelitian tahun kedua, dan merupakan lanjutan dari penelitian dalam rangka disertasi, perolehan hibah fundamental ini sungguh sangat mendukung keberlanjutan pengembangan ilmu setelah studi S3, untuk itu penulis ucapkan terima kasih.

Tak ada kendala berarti yang penulis temui untuk mengerjakan penelitian ini, oleh karena itu saat ini penulis dapat menyampaikan laporan akhir penelitian sesuai proposal yang telah diajukan. Kendala biaya dapat diatasi dengan adanya dana yang telah penulis terima, sehingga penelitian dapat berjalan lancar. Saat ini 100% dari proses penelitian telah selesai dilaksanakan. Sesuai dengan rencana pada proposal penelitian ini, saat ini penulis telah menyusun draft buku ajar (Fitokimia; kandungan kimia & aktivitas farmakologis sirih) dan mempublikasikan sebagian hasil penelitian ini dengan mendeseminasikannya pada seminar nasional Immunologi (Immunomodulator dan Sistem Imun, 2 Juni 2016), seminar internasional (International Symposium on Bioinformatics, Chemometrics, and Metabolomics, 18 Oktober 2016), dan jurnal internasional (submitted pada Tropical Journal of Pharmaceutical Research). Publikasi hasil penelitian selanjutnya pada seminar internasional (26th Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA) Congress) tanggal 9-13 November 2016 di Bangkok Thailand; dan kemudian penulisan manuskrip untuk jurnal internasional berikutnya.

Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih dapat disempurnakan dan juga dilanjutkan, oleh karena itu apabila ada kritik dan saran demi perbaikan dan pengembangan penelitian ini, peneliti sangat berterimakasih

Yogyakarta, Oktober 2016
Ketua Peneliti

DAFTAR ISI	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
BAB 5. KESIMPULAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	33

DAFTAR LAMPIRAN	Halaman
1. Print screen submitted manuskrip pada Trop. J. of Pharm. Res.	29
2. Halaman sampul draft buku ajar	30
3. Invitation letter the 26 th FAPA congress, 9-13 November 2016	31
4. Sertifikat oral presenter seminar internasional, ISBCM, 18 Oktober 2016	32
5. Sertifikat oral presenter seminar nasional imunologi, 2 Juni 2016	34
6. Daftar capaian luaran kegiatan	35

PENDAHULUAN

Tanaman terdiri dari banyak senyawa kimia, senyawa yang bertanggung jawab terhadap efek terapeutik tanaman disebut senyawa aktif. Senyawa aktif farmakologis yang bertanggung jawab terhadap efek terapeutik obat/tanaman dapat berupa senyawa tunggal ataupun campuran dari senyawa (Robbers *et al.*, 1996; Samuelsson, 1999). Senyawa tunggal dapat mempunyai aktivitas terapeutik yang lebih rendah dibanding ekstrak, dan sebaliknya. Deharo dan Ginsburg (2011) menyatakan bahwa kegagalan mengisolasi senyawa aktif dari ekstrak aktif kemungkinan karena labilnya atau ketidakstabilan senyawa aktif tersebut sehingga mengalami degradasi pada proses ekstraksi, atau karena senyawa tersebut menunjukkan aktivitasnya hanya ketika mereka berinteraksi dalam ekstrak.

Saat ini masih banyak masyarakat yang menggunakan obat tradisional, karena obat tradisional lebih memiliki daya tarik psikologis dibanding obat modern. Pada keadaan tertentu, obat modern cenderung mahal, kadang berefek menyakitkan, dan peluang untuk sembuh tipis (Spinella, 2005). Di Indonesia, daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi dari daun sirih merah (*Piper crocatum*, Ruiz & Pav.) mempunyai aktivitas imunostimulan (Hartini dkk., 2013^a). Lebih lanjut, uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vivo* terhadap senyawa Pc-1 dan Pc-2 yang diisolasi dari daun sirih merah (DPc) juga menunjukkan aktivitas imunostimulan (Hartini dkk., 2013^b). Isolasi terhadap senyawa Pc-1 dan Pc-2 dan identifikasi struktur kimianya telah dilakukan (Kustiawan, 2012; Hartini *et al.*, 2014). Karakterisasi kedua senyawa menunjukkan Pc-1 memiliki titik lebur 165,2-166,9°C (kemurnian 100%), sedangkan Pc-2 (kemurnian 96,7%) belum diperoleh titik leburnya. Deteksi dengan metode KLT densitometri dan GC MS menunjukkan bahwa Pc-1 dan Pc-2 terdapat pada spesies *Piper* lain yakni sirih hijau (*P. betle*) dan cabe jawa (*P. longum*), sehingga kemungkinan senyawa tersebut tidak dapat digunakan sebagai senyawa penanda (*marker*) bagi DPc, kecuali diketahui ada kekhususan pola keberadaan kedua senyawa dalam DPc yang berbeda dengan pola keberadaan kedua senyawa dalam daun spesies *Piper* yang lain. Lebih lanjut akan diteliti

keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada 3 spesies *Piper* lain yakni *P. cubeba*, *P. aduncum*, dan *P. bacatum*.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas imunostimulan Pc-1 dan Pc-2 pada dosis 5 mg/kgBB setara dengan ekstrak DPc pada dosis 450mg/kgBB. Sel-sel fagosit berperan penting pada mekanisme anti inflamasi dan mekanisme pertahanan tubuh namun bila teraktivasi berlebihan maka sel tersebut dapat menyebabkan reaksi yang merugikan sel itu sendiri melalui produksi *reactive oxygen species* (ROS), enzim proteolitik, dan mediator-mediator inflamasi (Celada and Nathan, 1994; Noveli *et al.*, 1989; Laskin *et al.*, 1995). Komponen seluler sistem imun mengandung asam lemak tak jenuh yang merupakan target utama bagi radikal bebas (Bendich, 1993). Aktivitas fagositosis makrofag karena perlakuan dengan Pc-1 dan Pc-2 relatif tinggi, akan tetapi tidak menyebabkan produksi nitrit oksid (NO) yang berlebihan. Nitrit oksid merupakan produk reaksi arginin yang dikatalisis enzim *inducible oxide synthase* (iNOS). Enzim iNOS dan ROS diaktivasi ketika proses fagolisosom (Abbas *et al.*, 2007). Kedua senyawa tersebut kemungkinan dapat menjaga fungsi sel-sel imun dengan melindunginya dari dampak aktivitas fagositosis makrofag yang berlebihan. Hal ini mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan dan atau anti inflamasi dari kedua senyawa tersebut. Hal ini diperkuat dengan laporan tentang aktivitas antioksidan ekstrak DPc (Suratmo, 2008). Aktivitas anti inflamasi dari spesies *Piper* juga telah dilaporkan. Ekstrak buah *P. longum* Linn dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi (Jain *et al.*, 1994), demikian juga neolignan yang berasal dari ekstrak buah *P. nigrum* L. (Tasleem *et al.*, 2014). Senyawa Pc-1 dan Pc-2 merupakan golongan senyawa neolignan, selain menguji aktivitas antioksidan kedua senyawa tersebut, penelitian ini juga menguji aktivitas antiinflamasi kedua senyawa dan ekstrak DPc. Imunostimulan yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi lebih direkomendasikan, oleh karena itu akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari Pc-1 dan Pc-2, serta sumber senyawa tersebut yakni ekstrak DPc. Studi pada berbagai tanaman obat dari Cina menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara kapasitas antioksidan dengan kadar fenol total, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa fenolik merupakan kontributor

utama dari kapasitas antioksidan berbagai tanaman tersebut (Li *et al.*, 2008). Selain mengukur aktivitas antioksidan ekstrak dari tujuh spesies Piper, penelitian ini juga akan mengukur kadar fenol totalnya. Kandungan fenolik total tertinggi dideteksi pada fraksi etil asetat sebesar 559,38 µg EGCG/mg dibandingkan ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi butanol dan fraksi air (Risidian *et al.*, 2011). Penelitian ini mengukur kadar senyawa fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak daun *Piper* sp.

Obat tradisional harus memenuhi kriteria kemanfaatan (*efficacy*) dan keamanan (*safety*) (World Health Organization, 2000). Dari penelitian ini telah diperoleh informasi tentang kemanfaatan dan keamanan pemakaian DPc sebagai imunostimulan baik berupa ekstrak maupun senyawa hasil isolasinya. Kemanfaatan pemakaian DPc diukur dari aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO secara *in vivo*. Senyawa hasil isolasi (Pc-1 dan Pc-2) pada dosis 5 mg/kgBB memiliki aktivitas imunostimulan yang setara dengan ekstrak DPc pada dosis 450 mg/kgBB. Keamanan pemakaian ekstrak DPc telah diukur dari uji histopatologi dan uji fungsi hati hewan uji. Ekstrak DPc pada dosis 150, 300, dan 450 mg/kgBB tidak menyebabkan kerusakan organ hati dan ginjal. Publikasi kami terdahulu melaporkan bahwa pemberian Pc-1 pada dosis 2,5; 5; dan 10 mg/kgBB tidak menyebabkan perubahan histopatologi ginjal dan hati mencit. Pemberian Pc-2 pada ketida dosis tersebut juga tidak berpengaruh pada histopatologi ginjal, akan tetapi pada dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis dan bahkan pada dosis 5 mg/kgBB menyebabkan nekrosis hati (Hartini *et al.*, (2014). Hal tersebut mengindikasikan bahwa pemakaian Pc-1 maupun ekstrak DPc sebagai imunostimulan lebih direkomendasikan dari pada Pc-2. Lebih lanjut penelitian ini akan mengukur aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari ekstrak DPc dan kedua senyawa tersebut.

Hasil penelitian yang dilakukan Fitriyani dkk. (2011) juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirih merah yang diberikan secara oral memiliki aktivitas antiinflamasi pada tikus putih yang diinduksi karagenin dan aktivitas antiinflamasi tertinggi terjadi pada dosis 50 mg/kg BB. Penggunaan obat NSAID secara peroral dapat menimbulkan berbagai efek samping seperti masalah lesi

pada lambung dan efek trombotik pada kardiovaskular (Alam, *et al.*, 2013). Maka dari itu pengobatan antiinflamasi secara topikal bisa dijadikan alternatif untuk mengurangi efek samping yang ditimbulkan. Terapi topikal merupakan metode yang nyaman serta terhindar dari jalur metabolisme obat pertama (*first-pass metabolism*) di hati. Terapi topikal digunakan untuk menghindari risiko yang mempengaruhi penyerapan obat pada terapi peroral, misalnya perubahan pH, aktivitas enzim, dan pengosongan lambung yang dapat mengiritasi saluran cerna (Asmara, dkk, 2012). Penelitian ini menguji aktivitas antiinflamasi secara topikal baik ekstrak, fraksi terpilih, dan isolat Pc-1 dan Pc-2.

Kontribusi penelitian ini pada pengembangan IPTEKS-SOSBUD berupa temuan tentang:

1. Aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dari ekstrak daun sirih merah (DPc) serta kedua senyawa hasil isolasi dari DPc (Pc-1 dan Pc-2). Imunostimulan yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi dapat mengantisipasi efek merugikan yang disebabkan oleh aktivitas imunostimulan yang berlebihan, sehingga imunostimulan yang sekaligus memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi lebih direkomendasikan.
2. Angka titik lebur Pc-2 dengan tingkat kemurnian senyawa sebesar 100%, sehingga melengkapi data yang telah ada sebelumnya tentang karakter dua senyawa hasil isolasi dari DPc.
3. Keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada organ bunga, daun, dan batang dari tujuh spesies *Piper* yang tumbuh di Indonesia (*P. crocatum*, *P. betle*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. cubeba*, *P. aduncum*, *P. bacatum*) informasi ini dapat dimanfaatkan untuk alternatif sumber senyawa Pc-1 dan Pc-2 selain dari DPc, sekaligus membandingkan kespesifikan keberadaan kedua senyawa pada masing-masing spesies. Belum ada publikasi tentang senyawa penanda dari tanaman sirih merah, apabila keberadaan kedua senyawa tersebut spesifik polanya dan berbeda dengan keberadaan pada spesies *Piper* yang lain, maka senyawa tersebut dapat dijadikan sebagai senyawa penanda (*marker compound*) bagi DPc.

4. Aktivitas antioksidan dan kadar fenol total ekstrak tujuh spesies Piper yakni: *P. crocatum*, *P. betle*, *P. longum*, *P. nigrum*, *P. cubeba*, *P. auncum*, dan *P. bacatum*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Obat tradisional harus memenuhi kriteria kemanfaatan (*efficacy*) dan keamanan (*safety*) Organisasi kesehatan dunia telah menetapkan panduan untuk evaluasi keamanan dan kemanfaatan dari tanaman obat tradisional (World Health Organization, 2000). Dari banyak sediaan obat tradisional yang berbahan tanaman obat, ekstrak merupakan bentuk sediaan obat dari bahan tanaman yang mudah distandarisasi, meliputi aspek mutu, kejelasan kandungan kimia, aspek keamanan, dan khasiatnya. Standarisasi akan lebih sulit apabila tanaman tersebut tidak ada kesesuaian antara khasiat dan manfaatnya, atau efeknya, apalagi senyawa aktifnya belum diketahui sama sekali (List dan Schmidt, 1989). Menurut *The European Medicines Agency* (EMA), senyawa penanda (*marker compound*) adalah konstituen kimia atau sekelompok konstituen dari produk obat herbal yang ditetapkan untuk kepentingan kontrol kualitas, bisa tanpa memperhatikan aktivitas terapetiknya. Idealnya senyawa penanda merupakan komponen unik yang berkontribusi terhadap efek terapetik dari obat herbal (Li *et al.*, 2008). Satu atau sekelompok senyawa dalam tumbuhan dapat menjadi *biomarker*. Keberadaan dan kadar senyawa aktif tersebut dapat diacu untuk menetapkan kebenaran bahan suatu formula obat (Daniel, 2006).

Neolignan dari Piper

Marga Piper memiliki lebih dari 1000 spesies yang tersebar di seluruh dunia dan merupakan marga paling representatif dari suku *Piperaceae*. Banyak tanaman dari marga *Piper* telah dilaporkan mengandung produk alam yang memiliki berbagai aktivitas biologis (Parmar *et al.*, 1997; Jaramillo dan Manos, 2001). Tumbuhan sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) termasuk dalam famili *Piperaceae*, dengan nama ilmiah *Piper crocatum*, Ruiz & pav. (Judd *et al.*, 2002). Beragam senyawa telah diisolasi dari spesiies Piper, dan diklasifikasikan

dalam 12 kategori yakni *alkaloids/amides*, *propenylphenols*, *lignans*, *neolignans*, *terpenes*, *steroids*, *kawapyrones*, *piperolides*, *chalcones* and *dihydrochalcones*, *flavones*, *flavanones* dan senyawa lainnya (Parmar *et al.*, 1997).

Senyawa imunostimulan yang diisolasi dari daun sirih merah merupakan golongan senyawa neolignan (Kustiawan, 2012; Hartini *et al.*, 2014). Neolignan dapat diisolasi dengan berbagai pelarut seperti kloroform, etanol, heksan, dan metanol (Tsai *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2013; Leon-Diaz *et al.*, 2013). Isolasi neolignan dari marga *Piper* dilakukan dengan pelarut etanol (Kustiawan, 2012), sedangkan metanol digunakan untuk mengisolasi neolignan dari *P. argyrophyllum* (Singh *et al.*, 1996), dari *P. kadsura* (Kim *et al.*, 2010), dari *P. taiwanense* (Chen *et al.*, 2013). Ekstrak metanol berbagai marga tanaman telah diuji aktivitas imunomodulatornya, dan tanaman spesies *Piper* yang diekstraksi dengan methanol dan diuji aktivitas imunomodulatornya yakni dari *Piper betle* (Kanjwani *et al.*, 2008), *Piper longum* (Sunila and Kuttan, 2004).

Neoligan terdistribusi lebih sempit dibandingkan lignan, pada umumnya terutama pada *Magnoliales* dan *Piperales*. Neolignan kemungkinan memegang peranan penting dalam mekanisme pertahanan tanaman, yakni sebagai antibakteri, antifungi, dan *antifeedant* (Bruneton, 1999). Beberapa lignan dan neolignan telah diisolasi dari genus *Piper* dan menunjukkan berbagai bioaktivitas yakni antitumor, antiviral, inhibitor cAMP fosfodiesterase, dan antimikroba (Chang *et al.*, 1985, MacRae and Towers, 1984, Joshi *et al.*, 1990). Jensen *et al.* (1993) melaporkan senyawa neolignan dari *Piperaceae*. Aktivitas senyawa neolignan yang diisolasi dari beberapa marga *Piper* telah banyak dilaporkan yakni: neolignan dari *P. sumatranum* (Malhotra *et al.*, 1990), dari *P. polysyphorum* (Ma *et al.*, 1991), dari *P. capense* (Green *et al.*, 1991), *P. schmidtii* (Tyagi *et al.*, 1993), dari *P. wightii* (Prasad *et al.*, 1994), dari *P. clarkii* (Prasad *et al.*, 1995), dari *P. argyrophyllum* (Singh *et al.*, 1996), dari *P. decurrens* (Chauret *et al.*, 1996), dari *P. aequale* (Maxwell *et al.*, 1999), dari *P. regnellii* (Benevides *et al.*, 1999, Marcal *et al.*, 2010), dari *P. wallichii* (Duan *et al.*, 2010), dari *P. taiwanense* (Chen *et al.*, 2013), dari *P. kadsura* atau *P. futokadsura* (Chang *et al.*, 1985, Lin *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2010, Kuo *et al.*, 2000), dan dari *P. crocatum* (Kustiawan, 2012).

Karakterisasi kedua senyawa senolignan tersebut menunjukkan bahwa Pc-1 memiliki titik lebur 165,2-166,9°C (kemurnian 100%), sedangkan Pc-2 (kemurnian 96,7%) belum diperoleh titik leburnya (Hartini *et al.*, 2015). Isolasi senyawa dari *Magnolia fargesii* menghasilkan stereoisomer neolignan yang berada bersama-sama dengan lignan dan neolignan lainnya (Lee *et al.*, 2009). Untuk permurnian isolat, KLT preparatif tidak dapat diandalkan untuk memisahkan stereoisomer. Stereoisomerisme merupakan penjelasan tentang kejadian dimana 2 atau lebih senyawa memiliki tipe dan jumlah atom-atom yang sama dan ikatan kimia yang sama tetapi berbeda pengaturan ruangnya. Stereoisomer adalah senyawa yang memiliki formula dan pengaturan ikatan yang sama tetapi pengaturan ruang atom-atomnya berbeda (Chang, 1987).

Studi pendahuluan secara *in vitro* terhadap ekstrak metanol daun sirih merah (DPc) dan fraksi-fraksi hasil pemisahan dari ekstrak tersebut menunjukkan bahwa ekstrak maupun fraksi tersebut mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Hartini, dkk., 2013^a). Makrofag mempunyai peran penting dalam respon imun. Fungsi utama makrofag dalam imunitas bawaan adalah memfagositasi partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati. Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efekturnya hanya setelah sel tersebut diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. Fungsi efektor dari makrofag yang teraktivasi termasuk diantaranya adalah membunuh mikroba yang terfagositosis, terutama dengan produksi *reactive oxygen species*, nitrit oksid (NO), dan enzim lisosomal (Abbas *et al.*, 2007). Isolasi dan uji daya imunostimulan secara *in vivo* terhadap 2 senyawa (Pc-1 dan Pc-2) dari DPc menunjukkan bahwa Pc-1 mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO demikian juga Pc-2. Kedua senyawa tersebut berbeda dalam hal efek terhadap organ hati hewan uji. Pemeriksaan histopatologis terhadap ginjal dan hati hewan uji menunjukkan bahwa perlakuan dengan Pc-1 tidak menunjukkan gangguan pada ginjal maupun hati, sedangkan perlakuan dengan Pc-2 menunjukkan pengaruh normal pada ginjal akan tetapi menyebabkan degenerasi hidropis serta nekrosis hati (Hartini, dkk., 2013^b; Hartini *et al.*, 2013^c;

Hartini *et al.*, 2014). Pemeriksaan histopatologis dan uji fungsi hati dari hewan uji yang diberi perlakuan dengan ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & pav.) telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa perlakuan dengan 450 mg/kgBB ekstrak DPc menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO yang setara dengan 5 mg/kgBB Pc-1 maupun Pc-2 (Hartini *et al.*, 2015).

Nitrit oksid merupakan produk reaksi arginin yang dikatalisis enzim inducible oxide synthase (iNOS). Enzim iNOS dan *reactive oxygen species* (ROS) diaktivasi ketika proses fagolisosom (Abbas *et al.*, 2007). Sel-sel fagosit berperan penting pada mekanisme anti inflamasi dan mekanisme pertahanan tubuh, akan tetapi bila teraktivasi berlebihan, sel tersebut dapat menyebabkan reaksi yang merugikan sel itu sendiri melalui produksi ROS, enzim proteolitik, dan mediator-mediator inflamasi (Celada and Nathan, 1994; Noveli *et al.*, 1989). Komponen seluler sistem imun mengandung asam lemak tak jenuh yang merupakan target utama bagi radikal bebas (Bendich, 1993). Aktivitas fagositosis makrofag karena perlakuan dengan Pc-1 dan Pc-2 relatif tinggi, akan tetapi tidak menyebabkan produksi NO yang berlebihan (Hartini *et al.*, 2014). Hal ini mungkin disebabkan kedua senyawa tersebut dapat menjaga fungsi sel-sel imun dengan melindunginya dari dampak aktivitas fagositosis makrofag yang berlebihan. Ekstrak DPc memiliki aktivitas antioksidan (Suratmo, 2008), sehingga Pc-1 dan Pc-2 yang diisolasi dari ekstrak DPc kemungkinan merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Kemampuan antioksidatif tersebut kemungkinan dengan cara menangkap kelebihan radikal bebas, sehingga tidak berdampak merugikan bagi fungsi sistem imun.

Radikal Bebas dan Antioksidan

Pada dasarnya, keberadaan beberapa radikal bebas di dalam tubuh dalam konsentrasi rendah berguna sebagai sinyal redoks seluler dan berperan dalam fungsi imun. Contohnya nitrit oksida ($\text{NO}\bullet$) yang disintesis oleh sel-sel endothelium, fagositosis dan sel lainnya dapat berperan dalam meregulasi tekanan darah dan membunuh parasit yang masuk ke dalam tubuh. Radikal superoksida

($O_2^{\bullet-}$) yang diproduksi oleh sel fagositosis dapat berperan dalam membunuh bakteri. Superoksida ($O_2^{\bullet-}$) juga dihasilkan oleh sel-sel lain seperti sel endotelium, limfosit dan fibroblast sebagai sinyal molekul interseluler (Halliwell, 2001). Peningkatan jumlah radikal bebas di dalam tubuh dapat memicu terjadinya stres oksidatif sehingga menyebabkan fungsi dan struktur sel-sel mengalami gangguan atau kerusakan (Halliwell, 2001). Ketika radikal bebas terbentuk, molekul reaktif tersebut bereaksi, mengubah struktur dan fungsi beberapa komponen penting di dalam sel. Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid atau DNA dan menginisiasi terjadinya penyakit degeneratif, seperti penuaan, kanker, penyakit jantung, alzheimer, degenerasi syaraf, aterosklerosis, katarak dan inflamasi (Padmanabhan & Jangle, 2012).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif, spesies nitrogen, dan radikal bebas lainnya sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, kanker, dan penuaan. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai (Halliwell, 2001). Beberapa studi mengindikasikan bahwa tanaman-tanaman obat Cina berisi berbagai antioksidan alami seperti asam fenolat, flavonoid dan tannin yang lebih memiliki potensi antioksidan dibanding tanaman pangan (Cai *et al.*, 2004). Studi terhadap tanaman-tanaman tersebut menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara kapasitas antioksidan dengan kadar fenol total, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa fenolik merupakan kontributor pokok/mayor dari kapasitas antioksidan tanaman-tanaman tersebut (Li *et al.*, 2008).

Inflamasi

Inflamasi/peradangan adalah respon biologis kompleks jaringan vascular terhadap agen agresif seperti patogen, iritasi, atau sel yang rusak. Inflamasi akut adalah response yang awalnya ditandai dengan meningkatnya pergerakan plasma

dan sel sistem kekebalan bawaan, seperti neutrofil dan makrofag, dari darah ke dalam jaringan yang terluka. Tanda-tanda standar inflamasi disajikan oleh peningkatan aliran darah, metabolisme sel tinggi, vasodilatasi, pelepasan mediator terlarut, ekstrasvasasi cairan dan masuknya seluler (Ferrero-Miliani, *et al.*, 2007). Inflamasi ditunjukkan dengan adanya 4 tanda yang mudah dikenali yakni kemerahan (*tumor/redness*), panas (*heat*), nyeri (*pain*), dan pembengkakan (*swelling*) (Beg *et al.*, 2011).

Keberadaan agen inflamasi menyebabkan sel membran menginduksi aktivasi fosfolipase A2 diikuti dengan pelepasan asam arakidonat dan mediator inflamasi seperti sitokin, serotonin, histamin, prostaglandin dan leukotrien yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, sehingga memfasilitasi migrasi leukosit ke situs peradangan (Dassoler, *et al.*, 2004). Neolignan-neolignan yang diisolasi dari kulit batang *Piper kadsura* (Piperaceae), merupakan senyawa yang bernilai untuk dikembangkan dalam bidang farmakognosi untuk pengobatan beberapa kelainan inflamasi pada manusia serta pada penghambatan produksi ROS pada PMN neutrophils karena induksi polymethacrylic (Lin *et al.*, 2006).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan utama untuk membuat ekstrak yakni daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & pav.)/DPc, daun *P. betle*, daun *P. cubeba*, daun *P. nigrum*, daun *P. retrofractum*, daun *P. aduncum*, dan daun *P. bacatum* yang dikumpulkan dari Sleman, Yogyakarta. Senyawa hasil isolasi yakni Pc-1 dan Pc-2, diisolasi dari ekstrak metanol DPc. Bahan untuk ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi senyawa berupa metanol *grade* teknis dan *grade* pro analisis (pa), kloroform pa, n-heksana pa, etil asetat pa, aseton pa, dan silika gel 60. Bahan untuk uji antioksidan meliputi larutan buffer pospat, deoksiribosa, reagen Fenton, FeCl₃, EDTA, hydrogen peroksida, TCA 1%, TBA 1%. Bahan untuk uji antiinflamasi berupa carrageenan/karagenin, CMC 1%, asetosal.

Hewan uji berupa mencit Swiss, kelaikan etik diproses pada Komisi *Ethical Clearance* untuk Penelitian Praliniik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu.

3.2. Peralatan

Alat yang digunakan yakni neraca, oven, maserator, *sintered glass*, *magnetic stirrer*, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), spuit injeksi 1 ml, 3 ml, dan 10 ml, sonde, pipa kapiler, tabung eppendorf, neraca elektronik, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 50 ml, labu takar (10 dan 100 ml), beaker glass (250 dan 500 ml), *melting point tester* (Mettler Toledo), spektrofotometri UV-Visible GENESYS 20 (spektrofotometer dan kuvet), timbangan analitik, lemari kaca dilengkapi kipas angin, mikropipet (100, 200, dan 1000 µl), vortex Thermolyne 37600, *plethysmometer*, kandang, tempat makanan dan minuman tikus, timbangan, spidol, sonde lambung, stop watch.

3.3. Rencana Jalannya Penelitian

3.3.1. Pembuatan ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav., daun *P. cubeba*, daun *P. aduncum*, dan daun *P. bacatum*.

Daun *Piper sp.* segar dibersihkan, dikeringkan, dan kemudian

dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Maserat dipisahkan dan ditampung sedangkan ampas dimaserasi 2 kali lagi dengan pelarut yang sama. Maserat dari 3 kali maserasi dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol daun *Piper kental*.

3.3.2. Isolasi Pc-1 dan Pc-2 dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum*

Ruiz & Pav.

Isolasi Pc-1 dan Pc-2 diawali dengan proses fraksinasi ekstrak metanol DPc menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Pelarut yang digunakan berturut-turut 50 ml n-heksana, 50 ml kloroform, 50 ml kloroform, 50 ml etil asetat, dan 100 ml metanol untuk mendapatkan fraksi I, II, III, IV, dan V. Kedua senyawa tersebut akan berwarna biru ungu meredam pada deteksi dengan UV 254 nm, tak tampak pada UV 366 nm, dan berwarna coklat pada deteksi dengan serium (IV) sulfat dan pemanasan. Pada kromatogram KLT dengan fase gerak kloroform:etil asetat (9:1), crocadin mempunyai R_f 0,7 dan deasetil crocadin mempunyai R_f 0,3. Isolasi senyawa dari fraksi hasil KCV dari ekstrak metanolik DPc dilakukan secara KLT-Preparatif. Hasil kerokan isolat dari lempeng KLT-P dikumpulkan, dilarutkan dengan kloroform:metanol (1:1) kemudian disaring, diuapkan, hingga didapat isolat berupa kristal.

3.3.3. Pemurnian isolat Pc-2 dengan kromatografi kolom

Isolat Pc-2 yang diperoleh pada proses 3.3.2, dikumpulkan kemudian dilakukan kromatografi kolom menggunakan *gradient* pelarut dengan kombinasi pelarut kloroform pa dan methanol pa.

3.3.4. Uji kandungan senyawa fenolik total dan ekstrak daun 6 spesies *Piper* lainnya

Penetapan kandungan fenolik total dengan metode Folin Ciocalteu menurut Rami *et al.* (2013) yaitu larutan ekstrak metanol diambil 0.5 mL dari konsentrasi 200 µg/mL dan ditambahkan 2 mL reagen Folin Ciocalteu, didiamkan selama 5 menit dalam suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 4 mL Na₂CO₃ (Natrium Karbonat) 1 M dan inkubasi 30 menit. Absorbansi

diukur pada $\lambda = 735$ nm dengan spektrofotometer. Hasil dinyatakan dalam mg ekivalen asam galat per gram ekstrak $\pm$ SD. Standar kurva yang digunakan adalah asam galat dengan konsentrasi 40, 50, 60, 70, 80 $\mu\text{g/mL}$. Rumus perhitungan :

$$T = C.V/M$$

Keterangan

T = kandungan fenolik total (mg/g); C= konsentrasi hasil perhitungan dari absorbansi yang didapat (mg/ml); V= volume senyawa uji (ml); M= massa senyawa uji (mg).

3.3.5. Uji aktivitas antioksidan Pc-1, Pc-2 dan ekstrak metanol DPc dan ekstrak daun 6 spesies Piper lainnya.

3.3.5.1.1.1. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Analisis kuantitatif aktivitas antioksidan menggunakan kombinasi metode Mullick *et al.* (2013) dan Shanmugapriya *et al.* (2011) dengan modifikasi. Ekstrak sampel sebanyak 10 mg dilarutkan ke dalam 10 ml metanol. Larutan stok ekstrak dalam metanol dibuat seri (200, 400, 600, 800, dan 1000 $\mu\text{g/ml}$). Larutan ekstrak sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan dengan 2 ml 0,05 mM larutan DPPH dan diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dengan seri pengenceran (20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/ml}$). Larutan sampel kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan λ 517 nm. Menurunnya nilai absorbansi dari larutan DPPH menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Aktivitas antioksidan (AOA) dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut.

$$\text{AOA (\%)} = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100$$

A_o = larutan DPPH tanpa sampel (kontrol)

A_s = larutan DPPH dengan sampel

Data persentase aktivitas dari beberapa konsentrasi kemudian digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linear. Nilai IC_{50} menunjukkan jumlah antioksidan yang dibutuhkan untuk menghambat 50% konsentrasi DPPH (Antolovich *et al.*, 2002; Tirzitis & Bartosz, 2010). Semakin tinggi aktivitas antioksidan maka nilai IC_{50} semakin rendah (Molyneux, 2004). Nilai IC_{50} DPPH ditentukan menggunakan Microsoft Excel 2007. Grafik linear dari persentase penghambatan digunakan untuk menentukan persamaan linear $y=ax + b$, dimana y merupakan % penghambatan yang dicari absorbansinya pada λ 365 nm segera, dan setelah 1, 2, dan 3 menit.

3.3.6. Uji Aktivitas Antiinflamasi Pc-1, Pc-2, dan ekstrak metanol DPc

Ekstrak, fraksi, dan isolat-isolat yang telah didapatkan diuji pada mencit betina Swiss. Pengujian antiinflamasi dilakukan secara topikal pada kulit punggung mencit. Tiap hewan uji disiapkan, lalu bulu punggung digunting terlebih dahulu kemudian dioleskan Veet untuk merontokkan bulu yang belum tercukur sempurna. Kulit punggung yang telah tercukur dibiarkan selama 1 hari untuk menghindari adanya inflamasi yang disebabkan oleh pencukuran. Tiap hewan uji diinjeksikan karagenin sesuai konsentrasi yang didapatkan dari uji pendahuluan secara subkutan, lalu dioleskan masing-masing ekstrak, fraksi, dan isolat-isolat dalam bentuk sediaan cream dengan luas area $2,25\text{cm}^2$. pengukuran yang dilakukan ialah edema yang muncul dengan pengukuran tebal lipat kulit punggung mencit menggunakan jangka sorong digital setiap 1 jam selama 6 jam untuk melihat penghambatan inflamasi dari ekstrak, fraksi, dan isolat-isolat daun sirih merah.

3.3.7. Pemeriksaan keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada *P. cubeba*, *P. aduncum*, dan *P. bacatum*

Beberapa spesies dari marga *Piper* (*P. cubeba*, *P. aduncum*, *P. bacatum*) diekstraksi dengan pelarut metanol, kemudian diperiksa secara kualitatif

dan kuantitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis densitometry serta metode GC MS, dengan pembandingan ekstrak *P. crocatum* Ruiz & pav, senyawa Pc-1 dan Pc-2.

b. Pengukuran kadar fenol total ekstrak metanol DPc dan ekstrak daun 6 spesies Piper lainnya

Pengukuran kadar fenol total menggunakan metode Folin Ciocalteau (Mullick *et al.*, 2013) dengan modifikasi. Ekstrak sampel dilarutkan ke dalam metanol sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Sebanyak 100 µl campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan 100 µl reagen Folin Ciocalteau 50%. Campuran kemudian diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang dan ditambahkan 2 ml Natrium karbonat 2%. Volume campuran dibuat menjadi 3 ml dengan menambahkan akuades. Setelah itu, campuran disimpan 1 menit dalam water bath 100°C kemudian dibiarkan dingin dalam gelap. Sampel kemudian diabsorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Total fenol kemudian dihitung menggunakan kurva standar dari asam galat 1 mg/ml.

Alur penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada Gambar 2.

3.4. Analisis Data

Analisis statistik untuk aktivitas antioksidan serta aktivitas antiinflamasi menggunakan uji anova satu jalan dan Tukey. Hasil pemeriksaan kualitatif dan kuantitatif keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada berbagai spesies dari marga *Piper* dianalisis secara deskriptif dengan cara membandingkan dengan data pada *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Capaian penelitian ini berupa:

1. Presentasi oral pada seminar nasional Imunologi “Imunomodulator dan Sistem Imum”, tanggal 2 Juni 2016 di Yogyakarta. Judul makalah: ‘Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dan Sirih Hijau (*Piper betle*)’
2. *Accepted* poster presentation pada seminar international 26th The Federation of Asian Pharmaceutical Associations (FAPA) Congress 2016 di Bangkok, Thailand, tanggal 9-13 November 2016. Judul makalah: ‘The antioxidant activity of leaf methanolic extracts from various *Piper* species’.
3. Oral presentation pada seminar internasional “2016 International Symposium on Bioinformatics, Chemometrics, and Metabolomics” tanggal 18 Pktober 2016 di IPBICC, Bogor-Indonesia. Judul makalah: ‘The Accumulation of Two Neolignans in The Leaves, Stems, and Flowers of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)’
4. Submitted manuskrip pada jurnal internasional “Tropical Journal of Pharmaceutical Research” judul manuskrip : ‘The Comparison of Two Neolignans Isolated from red Betel Leaf and Its Extract against Macrophage Phagocytic, The Level of AST, and Histopathological Features of The Liver in Mice’’ Registration number: 20157857 tanggal submit: 13 Oktober 2016.
5. Draft buku ajar berjudul : FITOKIMIA, kandungan kimia dan aktivitas farmakologis sirih.

A. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun *Piper aduncum* dan *Piper bacatum*

Penelusuran pustaka menunjukkan belum terdapat publikasi tentang kandungan kimia *Piper aduncum* dan *Piper bacatum*. Hasil skrining fitokimia pada penelitian ini menunjukkan bahwa daun *Piper aduncum* dan *Piper bacatum* mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, saponin, polifenol, tannin, steroid, dan terpenoid (Tabel 1 dan 2).

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun *Piper aduncum* (sirih lengkung)

Metabolit Sekunder	Hasil	Ciri khas larutan
Alkaloid	+	terbentuk endapan putih
		terbentuk warna orange
Flavonoid	+	terbentuk endapan kuning dibagian tengah tabung
Minyak atsiri	+	terdapat bau aromatik setelah penambahan etanol
Saponin	+	terbentuk busa setinggi 1-10 cm
Polifenol	+	terbentuk endapan putih pada dasar tabung
Tanin	+	terbentuk warna hitam kehijauan pada tabung uji dibanding control
Steroid dan terpenoid	+	terbentuk warna merah kecoklatan pada lapisan bawah dan warna hijau pekat pada lapisan atas

Keterangan: (-) : Tidak terdeteksi (+) : Terdeteksi

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun *Piper bacatum* (rinu)

No	Uji Fitokimia	Hasil	Kesimpulan
1.	Alkaloid	terbentuk endapan putih	+
		terbentuk warna orange	+
2.	Flavonoid	terbentuk endapan kuning dibagian tengah tabung	+
3.	Tanin dan polifenol	terbentuk warna hitam kehijauan pada tabung uji dibanding kontrol	+
		terbentuk endapan putih pada dasar tabung	+
4.	Saponin	terbentuk busa setinggi 1-10 cm	+
6.	Steroid dan terpenoid	terbentuk warna merah kecoklatan pada lapisan bawah dan warna hijau pekat pada lapisan atas	+

Keterangan: (-) : Tidak terdeteksi (+) : Terdeteksi

Alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, saponin, polifenol, tannin, steroid, dan terpenoid merupakan metabolit sekunder, senyawa tersebut tidak dibutuhkan secara vital untuk hidupnya tanaman seperti halnya kebutuhan akan karbohidrat, protein, lemak. Diduga senyawa-senyawa tersebut diproduksi oleh tanaman dengan tujuan tertentu, yakni merupakan senyawa yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri, sebagai senyawa penarik organisme lain yang dapat membantu reproduksinya, ataupun merupakan mekanisme detoksikasi senyawa dalam tanaman tersebut (Dewick, 2002). Parmar *et al.* (1997) telah melaporkan

kandungan kimia berbagai spesies dari Genus Piper. Senyawa yang diisolasi dari 16 spesies genus Piper yang dilaporkan tersebut merupakan golongan alkaloid, lignin/neolignan yang merupakan senyawa fenolik, dan terpene. Belum ada laporan tentang senyawa yang diisolasi *Piper aduncum* dan *Piper bacatum*, penelitian selanjutnya, dapat dilakukan isolasi dan identifikasi struktur kimia dari senyawa dari kedua spesies tersebut.

A. Hasil uji deteksi keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada organ daun, batang, dan bunga *P. crocatum* dengan metode GC-MS

Organ tempat penimbunan metabolit sekunder tidak selalu sebagai tempat biosintesisnya, bahkan senyawa yang sama disintesis pada organ yang berbeda pada tumbuhan yang berbeda. Neolignan merupakan metabolit sekunder yang disintesis melalui jalur asam sikimat; diketahui ditimbun di akar, batang dan daun *Piper regnellii* dengan konsentrasi yang bervariasi tergantung jenis neolignannya. Profil dua senyawa neolignan (Pc-1 dan Pc-2) yang diisolasi dari ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada daun, batang, dan bunga sirih merah dideteksi menggunakan metode kromatografi Thin Layer Chromatography (TLC) densitometry dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Kromatogram TLC densitometry menunjukkan bahwa Pc-1 dengan area sebesar 88.06 % pada Retardation factor (Rf) 0.58, sedangkan Pc-2 dengan area sebesar 72.54% pada Rf 0.24. Kromatogram GC-MS menunjukkan bahwa Pc-1 dengan area 100%, m/z 460.3, dan retention time (RT) pada menit ke-29.986, sedangkan Pc-2 dengan area 96.681%, m/z 418.3, dan RT pada menit ke-29.495. Pada daun, Pc-1 mempunyai Rf 0.58, RT pada menit ke-30.139 dengan area 31.726%. Batang mengandung Pc-1 pada Rf 0.58 dengan kadar 29.531 % dan RT pada menit ke-29.936, sedangkan pada bunga di Rf 0.58, RT pada menit ke 29.929 dengan area 5.259%. Senyawa Pc-2, pada daun mempunyai Rf 0.23, RT pada menit ke-29.509 dengan area 19.798%. Batang mengandung Pc-2 pada Rf 0.24, RT di menit ke-29.488 dengan area 13.533%, sedangkan pada bunga di Rf 0.24, RT di menit ke-29.508 dengan area 16.209% (Tabel 3). Kromatogram TLC densitometry dan GC-MS menunjukkan bahwa

senyawa neolignan (Pc-1 dan Pc-2) terdapat pada daun, batang, dan bunga sirih merah dengan konsentrasi tertinggi pada daun .

Tabel 3. Persen area dari senyawa Pc-1 and Pc-2 pada ekstrak daun, batang, dan bunga sirih merah

Ekstrak sirih merah	Pc-1	Pc-2
Daun	31.726%	19.798 %
Batang	29.531 %	13.533 %
Bunga	5.259 %	16.209 %

B. Hasil uji deteksi keberadaan Pc-1 dan Pc-2 pada organ *P. aduncum*, *P. bacatum*, dan *P. cubeba*

Hasil uji deteksi menunjukkan bahwa Pc-1 dan Pc-2 terdapat pada *Piper aduncum* dan *Piper bacatum*. *Piper cubeba* tidak menunjukkan adanya kedua senyawa tersebut. *Piper aduncum* menunjukkan kandungan Pc-1 dan Pc-2 pada organ daun dan bunga, sedangkan pada batang tidak terdeteksi adanya Pc-1. *Piper bacatum* positif mengandung Pc-1 dan Pc-2 pada organ daun dan batang, sedangkan pada bunga hanya positif mengandung Pc-1 sedangkan Pc-2 tidak terdeteksi (Tabel 4).

Tabel 4. Keberadaan senyawa Pc-1 and Pc-2 pada ekstrak daun, batang, dan bunga Piper sp.

Spesies	Organ	Pc-1	Pc-2
<i>P. aduncum</i>	Bunga	+	+
	Batang modifikasi/sulur	-	+
	Daun	+	+
<i>P. bacatum</i>	Bunga	+	-
	Batang modifikasi/sulur	+	+
	Daun	+	+
<i>P. cubeba</i>	Bunga	-	-
	Batang modifikasi/sulur	-	-
	Daun	-	-

Catatan : senyawa standar : Pc-1 & PC-2; deteksi UV 254 kemudian disemprot dengan serum sulfat kemudian dipanaskan pada suhu tinggi

Kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman dipengaruhi oleh factor

genetic/hereditas, tahap-tahap pertumbuhan, dan lingkungan tempat tumbuh tanaman (Robber et al., 1999). Variasi kandungan senyawa Pc-1 dan Pc-2 pada ketiga spesies Piper tersebut menunjukkan bahwa dalam satu genus dimana secara genetic berbeda terdapat perbedaan kandungan jenis maupun jumlah senyawa. Perbedaan tersebut juga kemungkinan dipengaruhi oleh tahap pertumbuhan yang dilalui serta perbedaan lingkungan tempat tumbuh dari ketiga spesies Piper tersebut. Hasil penelitian ini menginformasikan bahwa senyawa Pc-1 dan Pc-2 bisa diperoleh dari spesies lain selain Piper crocatum, yakni dari *Piper aduncum* dan *Piper bacatum*.

C. Hasil uji antioksidan ekstrak *Piper* sp.

Sel-sel fagosit berperan penting pada mekanisme pertahanan tubuh namun bila sel teraktivasi berlebihan dapat menyebabkan reaksi yang merugikan sel itu sendiri melalui produksi Reactive Oxygen Species (ROS) dan nitrit oksid (NO). Ketika proses fagolisosom, inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) dan ROS diaktivasi. Nitrit oksid merupakan produk reaksi arginin yang dikatalisis enzim iNOS. Ekstrak metanol daun sirih merah merupakan imunostimulan, mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Kemampuan aktivasi fagositosis makrofag ekstrak tersebut relatif tinggi, akan tetapi tidak menyebabkan produksi NO yang berlebihan, kemungkinan ekstrak daun sirih merah dapat menjaga fungsi sel-sel imun dengan melindunginya dari dampak aktivitas fagositosis makrofag yang berlebihan. Penelitian ini mempelajari aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun sirih merah, fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak tersebut serta dua senyawa hasil isolasi yakni Pc-1 dan Pc-2. Rutin merupakan imunostimulan dan antioksidan dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding/kontrol positif. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah lebih kuat dibandingkan fraksi-fraksi hasil pemisahannya dan bahkan terhasdap isolatnya yakni Pc-2. Aktivitas antioksidan terbesar ditunjukkan oleh isolat Pc-1. Dibandingkan dengan rutin, aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi, maupun isolat dari daun sirih merah jauh lebih rendah. Ic50 rutin pada 0.135 µg/ml sedangkan isolat Pc-1 pada 46.632 µg/ml (Tabel 5).

Tabel 5. Nilai IC₅₀ rutin, ekstrak, fraksi, dan isolat dari daun sirih merah

Bahan uji	replikasi	IC ₅₀ (μ g/ml)	Mean
Rutin	1	0.135	0.135 $\pm$ 0.004
	2	0.131	
	3	0.139	
Pc-1	1	45.936	46.632 $\pm$ 1.4675
	2	45.642	
	3	48.642	
Pc-2	1	142.936	140.889 $\pm$ 0.455
	2	140.112	
	3	139.622	
Fraksi I & II	1	305.121	302.083 $\pm$ 4.406
	2	296.119	
	3	305.010	
Fraksi III	1	264.311	265.400 $\pm$ 3.650
	2	262.419	
	3	269.472	
Fraksi IV & V	1	166.879	169.941 $\pm$ 2.047
	2	169.623	
	3	173.321	
Daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	1	91.957	84.341 $\pm$ 6.878
	2	82.484	
	3	78.583	

Penelitian ini juga menguji aktivitas antioksidan beberapa spesies daun genus Piper yakni: *P. aduncum*, *P. bacatum*, *P. cubeba*, *P. longum*, dan *P. nigrum*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang paling kuat berturut-turut adalah sirih hijau (*P. betle*), sirih lengkung (*P. aduncum*), sirih lada (*P. nigrum*), kemukus (*P. cubeba*), rinu (*P. bacatum*), sirih merah (*P. crocatum*), , dan kemudian cabe jawa (*P. longum*/*P. retrofractum*) (tabel 6).

Tabel 6. Nilai IC₅₀ ekstrak metanol daun beberapa spesies sirih

Bahan uji	replikasi	IC ₅₀ (µg/ml)	Rerata ± SD
Daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	1	91.957	84.341± 6.878
	2	82.484	
	3	78.583	
Daun sirih hijau (<i>P. betle</i>)	1	26.954	26.915±0.455
	2	27.349	
	3	26.441	
Daun cabe jawa (<i>P. longum</i>)	1	309.112	307.196± 4.406
	2	302.157	
	3	310.320	
Daun lada (<i>P. nigrum</i>)	1	31.596	30.074± 1.431
	2	28.756	
	3	29.871	
Daun rinu (<i>P. bacatum</i>)	1	43.856	42.117±2.047
	2	39.861	
	3	42.635	
Daun sirih lengkung (<i>P. aduncum</i>)	1	167.803	167.539± 4.601
	2	162.812	
	3	172.002	
Daun kemukus (<i>P. cubeba</i>)	1	31.756	30.074±1.920
	2	28.763	
	3	29.703	

Hasil Penetapan kandungan fenol total

Kandungan total fenol yang diukur pada konsentrasi ekstrak 200 µg/ml menunjukkan bahwa kandungan fenol total terbesar pada sirih hijau (*P. betle*), kemudian sirih lengkung (*P. aduncum*), kemukus (*P. cubeba*), rinu (*P. bacatum*), sirih merah (*P. crocatum*), cabe jawa (*P. longum*/*P. retrofractum*) dan yang terendah adalah daun lada (*P. nigrum*) (Tabel 7). Menurut Cai *et al.* (2004), senyawa fenol berkontribusi secara signifikan bagi aktivitas antioksidan tanaman.

Penelitian ini mendukung hal tersebut, kandungan fenol total dari daun sirih hijau paling besar dibandingkan dengan sirih spesies lain dan aktivitas antioksidan sirih hijau paling kuat. Secara umum kandungan fenol total dari 7 spesies genus *Piper* tersebut berkisar pada angka tertentu yakni antara 133-198 μ g/ml, hal ini menunjukkan spesies genus *Piper* mengandung senyawa fenolik yang relative tinggi.

Tabel 7. Hasil Penetapan Kandungan Fenolik Total ekstrak daun *Piper* sp.

Bahan uji (200 μ g/ml)	replikasi	Kandungan fenol total	Rerata $\pm$ SD
Daun sirih merah (<i>P. crocatum</i>)	1	151.217	154.608 $\pm$ 3.358
	2	153.665	
	3	158.336	
Daun sirih hijau (<i>P. betle</i>)	1	201.837	198.236 $\pm$ 7.372
	2	203.116	
	3	189.756	
Daun cabe jawa (<i>P. longum</i>)	1	133.40	140.43 $\pm$ 5.1219
	2	142.45	
	3	145.45	
Daun lada (<i>P. nigrum</i>)	1	130.50	133.831 $\pm$ 5.4365
	2	129.52	
	3	141.51	
Daun rinu (<i>P. bacatum</i>)	1	152.715	149.964 $\pm$ 3.545
	2	151.214	
	3	145.964	
Daun sirih lengkung (<i>P. aduncum</i>)	1	183	183.500 $\pm$ 4.270
	2	188	
	3	179.5	
Daun kemukus (<i>P. cubeba</i>)	1	149.925	155.157 $\pm$ 5.642
	2	154.41	
	3	161.135	

Hasil uji daya anti inflamasi ekstrak, fraksi dan isolat senyawa dari daun sirih merah

Ekstrak, fraksi, dan isolat senyawa dari daun sirih merah dapat menurunkan terjadinya inflamasi pada hewan uji yang diinduksi dengan karagenin. Meskipun secara statistik berbeda bermakna akan tetapi isolat maupun fraksi dari ekstrak tidak menunjukkan perbedaan aktivitas antiinflamasi yang besar (Tabel 8). Hal ini mengindikasikan bahwa campuran senyawa dalam ekstrak lebih potensial menghasilkan aktivitas antiinflamasi dibandingkan fraksi (campuran beberapa senyawa) dan isolat (senyawa tunggal). Houghton (2009) menyatakan bahwa banyak tanaman obat yang memiliki senyawa aktif tidak dapat diisolasi dan/atau tidak menunjukkan efek nyata ketika mereka diuji sebagai isolat. Ekstrak tersebut berisi campuran kompleks senyawa, senyawa tersebut dapat hilang atau menjadi inaktif. Ekstrak yang menunjukkan aktivitas, kemudian dapat terjadi bahwa senyawa menjadi tak terukur aktivitasnya ketika diisolasi dan diuji aktivitasnya.

Tabel 8: Hasil uji antiinflamasi ekstrak daun sirih merah, fraksi dari ekstrak daun sirih merah, dan isolat senyawa Pc-1 dan Pc-2.

Kelompok	Rerata AUC ($\bar{X} \pm SE$)	% PI $\pm$ SE
I : Kontrol Negative/Karagenin	26.18 $\pm$ 1.18	-0.02 $\pm$ 4.50
II : Kontrol Pembawa/Biocream	29.41 $\pm$ 1.12	-12.38 $\pm$ 4.27
III : Ekstrak Konsentrasi 2%	18.11 $\pm$ 1.01	30.79 $\pm$ 3.87
IV: Ekstrak Konsentrasi 4%	18.36 $\pm$ 0.66	29.83 $\pm$ 2.51
V : Ekstrak Konsentrasi 8%	16.63 $\pm$ 0.72	36.45 $\pm$ 2.75
VI : Fraksi dari Ekstrak Konsentrasi 2%	21.23 $\pm$ 0.59	18.89 $\pm$ 2.25
VII : Fraksi dari Ekstrak Konsentrasi 4%	17.61 $\pm$ 0.57	32.72 $\pm$ 2.19
VIII : Fraksi dari Ekstrak Konsentrasi 8%	13.48 $\pm$ 0.29	47.73 $\pm$ 1.68
IX : Isolat Pc-1	17.15 $\pm$ 0.48	35.77 $\pm$ 1.80
X : Isolat Pc-2	14,72 $\pm$ 0,78	43,77 $\pm$ 2,99

Keterangan: AUC: total tebal lipatan kulit dalam mm/jam

PI : persen pengambatan inflamasi

Senyawa Pc-1 dan Pc-2 adalah dua senyawa dari banyak senyawa dalam

ekstrak daun sirih merah. Aktivitas antiinflamasi dari ekstrak daun sirih merah dapat berasal dari senyawa selain Pc-1 dan Pc-2, sehingga fraksi yang berisi senyawa Pc-1 maupun Pc-2 serta senyawa tunggal Pc-1 dan Pc-2 menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang lebih rendah disbanding ekstrak.

BAB 5. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa :

1. Nilai IC_{50} aktivitas antioksidan dari ekstrak, fraksi I&II, Fraksi III, Fraksi IV & V, senyawa Pc-1, dan PC-2 dari daun sirih merah berturut-turut sebesar: 84.341 ± 6.878 , 302.083 ± 4.406 , 265.400 ± 3.650 , 169.941 ± 2.047 , 46.632 ± 1.4675 , dan 140.889 ± 0.455 .
2. Aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi, dan isolat senyawa dari daun sirih merah relative kecil disbanding aktivitas antioksidan rutin
3. Dari 6 spesies Piper, aktivitas antioksidan terbesar pada daun sirih hijau (*P. betle*), kemudian sirih lengkung (*P. aduncum*), sirih lada (*P. nigrum*), kemukus (*P. cubeba*), rinu (*P. bacatum*), sirih merah (*P. crocatum*), dan terkecil cabe jawa (*P. longum/P. retrofractum*).
4. Kandungan fenol total terbesar pada sirih hijau (*P. betle*), kemudian sirih lengkung (*P. aduncum*), rinu (*P. bacatum*), kemukus (*P. cubeba*), sirih merah (*P. crocatum*), cabe jawa (*P. longum/P. retrofractum*) dan yang terendah adalah daun lada (*P. nigrum*), dengan nilai berturut-turut: 198.236 ± 7.372 , 183.500 ± 4.270 , 155.157 ± 5.642 , 154.608 ± 3.358 , 149.964 ± 3.545 , 140.43 ± 5.1219 , dan 133.831 ± 5.4365 .
5. Ekstrak, fraksi, dan isolat senyawa (Pc-1 dan Pc-2) menunjukkan aktivitas antiinflamasi. Kenaikan kadar ekstrak dan fraksi tidak menunjukkan kenaikan aktivitas antiinflamasi yang linier. Aktivitas antiinflamasi Pc-2 lebih besar dibanding Pc-1

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2007, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. 2011, *Basic Immunology*, 3rd ed., Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Alamgir, M. and Uddin, S.K. 2010, Recent Advances on The Ethnomedicinal Plants as Immunomodulatory Agents, *Ethnomedicine*, 3, 227-244.
- Amano, F. and Noda, T. 1995, Improved detection of nitric oxide radical (NO*) production in an activated macrophage culture with a radical scavenger, carboxy PTIO, and Griess reagent, *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 368: 425-428.
- Archana, Jatawa S., Paul R., and Tiwari A. 2011, Indian Medicinal Plants: A Rich Source of Natural Immuno-Modulator, *International Journal of Pharmacology*, 7 (2): 198-205.
- Backer, C.A., and Den Brink van B.J.R. 1963, *Flora of Java*, Published under the auspices of the rijksherbarium, Leiden.
- Bafna, A.R., and Misra, S.H. 2004. Immunomodulatory Activity of Methanol Extracts of Flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn., *Ars Pharmaceutica*, 45: 281-291.
- Chang, M.C., Uang, B.J., Tsai, C.Y., Lin, B.R., Lee, C.S., Chen, Y.J., Chang, C.H., Tsai, Y.L., Kao, C.J., and Jeng, J.H. 2007, Hydroxychavicol, a novel betel leaf component, inhibits platelet aggregation by suppression of cyclooxygenase, thromboxane production and calcium mobilization, *British Journal Pharmacology*, 152: 73-82.
- Daniel, M. 2006, *Medicinal Plants Chemistry and Properties*, Enfield, Science publishers, New Hampshire, pp: 3-4.
- Deharo, E. and Ginsburg, H. 2011, Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts, *Malaria Journal*, 10 (suppl 1): 55-60.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widyarini, S., dan Yuswanto, A. 2013^a, Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *In Vitro*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 11 (2): 108-115.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widyarini, S., dan Yuswanto, A. 2013^b, Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Senyawa Kode Pc-2 dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *In Vivo*, Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia, ISBN No. 978-602-17629-0-5, halaman 9-19, Palembang 14-16 Maret 2013.
- Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widyarini, S., dan Yuswanto, A. 2013^c, *In Vivo* Immunomodulatory and Histopathological Effect of Two Compounds Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), *Proceedings 6th Asian Association of School of Pharmacy Conference*, halaman: *Pharmaceutical chemistry/Drug discovery – oral*, Singapore, 14-17 November 2013.
- Kanjwani, D.G., Marathe, T.P., Chipunkar, S.V., Fan Sathaye, S.S., 2008, Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of Piper

- betel*, *Scandinavian Journal of Immunology*, 65: 589-593.
- Laksmi, B.S. and Naidu, K.C. 2010. Comparative morphoanatomy of *Piper betle* L. cultivars in India. *Annals of Biological Research*, 2: 128-134.
- Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L., and Xu, H. 2008, Chemical Markers for The Quality Control of Herbal Medicines: An Overview, *Chinese Medicine*, 3 (7): 1-16.
- List, P.H. and Schmidt, P.C. 1989, *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press, INC, Florida.
- Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D., and Inwood, M.J.H. 1969, *Medical Laboratory Technic and Clinical Pathology*, 2nd ed., Sanders Company WB, Toronto, pp.987-1231.
- Jaramillo, M.A. and Manos, P.S. 2001, Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (*Piperaceae*). *American Journal of Botany*, 2001;88:706-716.
- Min, H.J., Nam, J, Yu, E.S., Hong, J., Seo, E., and Hwang, E. 2009, Effect of Naturally Occuring Hydroxychavicol Acetat on The Cytokine Production in T Helper Cells, *International Immunopharmacology*, 9: 448-454.
- Houghton. PJ dalam Mukherjee, P.K. 2002, *Quality Control of Herbal Drugs, An Approach to Evaluation of Botanical*, 1st Ed. Business Horizons Pharmaceutical Publishers, New Delhi, p.86.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., and Boll, P.M. 1997, Phytochemistry of Genus *Piper*, *Phytochemistry*, 46: 597-673.
- Risdian, C., Widowati, W., Mozet, T., Wargasetia, T.L., dan Khong, K., 2011, Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Leaves Extract and Its Different Solvent Fractions of *Piper betle* L. In Vitro, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2(1): 141-145.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., and Tyler, V.E. 1996, *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Williams & Wilkins, Maryland USA, pp.10,137.
- Samuelsson, G. 1999, *Drugs of Natural Origin*, 4th ed., Swedish Pharmaceutical Press, Sweden, B.K. pp.46-48.
- Sanchez, S., Paredes, S.D., Shancez, C.L., Barriga, C., Reiter, R.J., and Rodriguez, A.B. 2008, Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism, *Neuroendocrinology Letters*, 29 (6): 1026-1032.
- Spinella, M., 2005, *Concise Handbook of Psychoactive Herbs*, The Haworth Herbal Press, Oxford.
- Sunila, E.S. dan Kuttan, G. 2004, Immunomodulatory and Antitumor Activity of *Piper longum* Linn. and Piperine, *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 339-346.
- Wagner, H., 1999, Search for Potent Immunomodulatory Agents from Plants and Other Sources, dalam *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*, (Bohlin, L. dan Bruhn, J.G., Ed.), Kluwer Academic Publisher, AH Dordrecht, The Netherlands.
- Wagner, H., and Prosch, A. 1985, Immunostimulatory Drugs of Fungi and Higher Plants, dalam *Economic and Medicinal Plant Research*, (Farnsworth, N.,

dan Wagner, H., Ed.), Vol.1, Academic Press, London.
World Health Organization, 2000, *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Geneva.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research

Official Journal of Pharmacotherapy Group

Journal Menu

- Journal Home
- Find Articles
- Current Issue
- Archives

For Contributors

- Author Guidelines
- Submit a Manuscript
- Manuscript Status

For Reviewers

- Reviewer's Guide

Get Access

- Subscriber Login
- Subscription Information
- Subscribe to Journal
- Renew Subscription

About this Journal

ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic)

Submitted Manuscripts

To submit REVISED MANUSCRIPT, click on the title of the appropriate manuscript

Ref no	Article Title	Stage	Date submitted	
20157857	The Comparison of Two Neoplasms Isolated from Red Betel Leaf and Its Extract against Macrophage Phagocytic Activity, the Level of AST, and Histopathological Features of the Liver in Mice	Being processed	13-10-2016	Modify

Tropical Journal of Pharmaceutical Research

Official Journal of Pharmacotherapy Group

Journal Menu

- Journal Home
- Find Articles
- Current Issue
- Archives

For Contributors

- Author Guidelines
- Submit a Manuscript
- Manuscript Status

For Reviewers

- Reviewer's Guide

Get Access

- Subscriber Login
- Subscription Information
- Subscribe to Journal
- Renew Subscription

About this Journal

- Aim & Scope
- Editorial Board
- Ethics & Malpractice
- Privacy statement
- Terms of Use
- Contact Us

Journal Tools

- Make Payment
- Advertisement
- Copyright Form
- Get Sample Copy
- Get Email Alert
- Reprints
- Subscription

Control Panel

- Editor's login
- Reviewer's login

Title: The Comparison of Two Neoplasms Isolated from Red Betel Leaf and Its Extract against Macrophage Phagocytic Activity, the Level of AST, and Histopathological Features of the Liver in Mice

Manuscript Information

Manuscript Review Comments

Payment Information

Abstract

Purpose: A single active compound isolated from a plant extract may show a lower, equal, or greater activity compared to its extract. The two neoplasms (Pc-1 and Pc-2) has been isolated from red betel (Piper crocatum Ruiz & Pav.) leaf. The aim of this study was to compare the phagocytic activity of macrophage and histopathological feature in mice treated with Pc-1, Pc-2 and its extract.

Methods: Peroral administration of Pc-1 and Pc-2 (5 mg/kg body weight), and red betel leaf methanolic extract (150, 300, 450 mg/kg body weight) were carried out for 14 days. Methanolic extract of red betel leaf (Pc extract) phagocytic effect was determined by macrophage phagocytosis and nitric oxide (NO) assays. The morphological feature of liver and kidney were observed using light microscope. The results were then compared to those of control group. The level of SGOT/AST Serum and SGPT/ALT serum were also measured from the blood serum before the study was started and at 21th day after L. monocytogenes infection.

Results: The phagocytic activity of macrophage given 450 mg/kg body weight extract was equal to 5 mg/kg body weight of both isolated compound of Pc-extract. The activity pattern such as PP, IP, and EP of extract, Pc-1, and Pc-2 were similar, as well as the NO production. Treatment resulted in no differences histopathological features in the liver with the exception Pc-2 treatment caused hydropic degeneration on liver.

Conclusion: The Pc-1 and Pc-2 (5 mg/kg body weight) isolated from Pc-extract have equal macrophage phagocytic activity with 450 mg/kg body weight of the extract. Histopathological features of the liver have the same result.

Keywords: Red betel (Piper crocatum Ruiz & Pav.), isolated compound, extract, phagocytic, histopathological

Corresponding author's email: yustinaharini@uad.ac.id

Comments for Editor:

corresponding author email: yustinaharini@uad.ac.id, yustinaharini@yahoo.com

Copyright form: [20157857x.pdf](#)

Article Ref: 20157857 Overall position: Being processed (see below) Submission date: 13-10-2016

File name	Submission date	Status	Status date	
1st submission with and without	13-10-2016	Pending		Review

Buku Ajar

FITOKIMIA

Kandungan kimia & aktivitas farmakologis sirih

Oleh:

Yustina Sri Hartini

Laurentius Hartanto Nugroho

2016

Universitas Sanata Dharma X Mail - Yustina Sri Hartini - ... X

https://outlook.office.com/owa/?realm=usd.ac.id&exsvurl=1&ll-cc=1033&modurl=0

Most Visited Getting Started

Office 365 Outlook

New | Delete | Archive | Junk | Sweep | Move to | Categories | Undo

☐ Inbox All

usulan yang lagi iseng Wed 7/27
No preview is available.

☐ Pengurus Pusat IAI
Fwd: UNDANGAN RAPAT, 28 JULI Tue 7/26
----- Forwarded message ----- Fr...

☒ FAPA 2016
INVITATION LETTER Tue 7/26
June 1, 2016 Dear Yustina Sri Hartini IN...

☐ Kaprodi Farmasi
Dosen luar biasa untuk Praktikum Tue 7/26
Terimakasih bu Yustina atas informasinya...

☐ A. Dwi Priyana
SK Penguji Skripsi Mon 7/25
Kepada Yth. Bapak/Ibu Penguji Skripsi Pr...

☐ ResearchGate
Congratulations Yustina Sri, you a Mon 7/25
Your research is in the spotlight. It's a big...

June 1, 2016

Dear Yustina Sri Hartini

INVITATION LETTER

On behalf of the 26th FAPA 2016 Congress, I am pleased to invite you to our congress that will be held at Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand, during 9-13 November 2016.

We would be delighted to have you present at this important event which we anticipate will attract approximately 2000 international delegates. Full information about the conference can be found in our website at: www.fapa2016.com.

Please note that all delegates are responsible for payment of their own registration fees, accommodation and travel expenses, and delegates will not be funded by the conference organizer. If you wish to obtain more information, please do not hesitate to contact the Chair of Scientific Program Committee, Prof. Pornsak Sriamornsak by e-mail to [fapa2016scientific@yandex.com]

Yours sincerely,

Windows Taskbar: 10:04 PM 8/3/2016



ISBCM 2016

International Symposium on Bioinformatics, Chemometrics, and Metabolomics | IPBCC, Bogor-Indonesia
18th October 2016



Hosted by

- Tropical Biopharmaca Research Center IPB
- Metabolomics Research Cluster - DRI IPB
- Working Group on Bioinformatics, FMIPA IPB

CERTIFICATE

This is to certify that

Dr. Yustina Sri Hartini

has participated as

Oral Presenter

in

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOINFORMATICS, CHEMOMETRICS AND METABOLOMICS

held at

**IPB International Convention Center, Bogor – Indonesia
18th October 2016**

**Tropical Biopharmaca Research Center,
Director,**



Dr. Irmanida Batuarda, MSI

**Organization Committee
Chairman,**



Dr. Mohamad Rafi, SSI, MSI

**Directorate of Research & Innovation IPB,
Director,**



Prof. Dr. Ir. Iskandar Zulkarnaen Siregar, M.Fc.Sc

Supported by



Indonesian Society for
Bioinformatics and Biodiversity

Sponsored by



Complete solution for your research



ISBCM 2016

International Symposium on Bioinformatics,
Chemometrics, and Metabolomics | IPBCC, Bogor-Indonesia
18th October 2016



Hosted by

- Tropical Biopharmaca Research Center IPB
- Metabolomics Research Cluster - DRI IPB
- Working Group on Bioinformatics, FMIPA IPB

CERTIFICATE

This is to certify that

Prof. Dr. Laurentius Hartanto Nugroho, M.Agr

has participated as

Poster Presenter

in

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOINFORMATICS, CHEMOMETRICS AND METABOLOMICS

held at

**IPB International Convention Center, Bogor – Indonesia
18th October 2016**

**Tropical Biopharmaca Research Center,
Director,**



Dr. Irmanida Batuwara, MSI

**Organization Committee
Chairman,**



Mohamad Rafi

Dr. Mohamad Rafi, SSI, MSI

**Directorate of Research & Innovation IPB,
Director,**



Prof. Dr. Ir. Iskandar Zulkarnaen Siregar, M.For.Sc

Supported by



Indonesian Society for
Bioinformatics and Biodiversity

Sponsored by





Sertifikat

Diberikan kepada :

Yustina Sri Hartini

Atas peran sertanya sebagai: **Peserta & Presenter Oral**

SEMINAR NASIONAL IMUNOLOGI

"Immunomodulator dan Sistem Imun"

Dengan SKP (Satuan Kredit Partisipan) dari PD IAI DIY No. 219/IAI-DIY/SK-SKP/IV/2016
Peserta: 2 SKP, Presenter Oral: 3 SKP, Pembicara: 3 SKP, Panitia: 1 SKP, Moderator: 1 SKP

Yogyakarta, 2 Juni 2016



Prof. Dr. Subagus Wahyuono
Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.
Dekan Fakultas Farmasi UGM

Dr. Ritmaleni, S.Si.
Ketua Panitia

FORMULIR EVALUASI ATAS CAPAIAN LUARAN KEGIATAN

Ketua YUSTINA SRI HARTINI M.Si.,Apt.
Perguruan Tinggi Universitas Sanata Dharma
Judul Kajian Kemanfaatan dan Keamanan Senyawa Hasil Isolasi dan Ekstrak dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & pav.) sebagai Imunostimulan secara In Vivo
Skema Penelitian Fundamental
Waktu Kegiatan Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun

Luaran yang direncanakan dan jumlah capaian

No	Luaran yang Direncanakan	Jumlah Capaian
----	--------------------------	----------------

CAPAIAN DISERTAI DENGAN LAMPIRAN BUKTI-BUKTI LUARAN KEGIATAN

1. PUBLIKASI ILMIAH

	Keterangan
Artikel jurnal ke-1.	
Nama jurnal yang dituju	Tropical Journal of Pharmaceutical Research
Klasifikasi jurnal	Internasional
Impact factor jurnal	0.54
Judul artikel	The Comparison of Two Neolignans Isolated from Red Betel Leaf and Its Extract against Macrophage Phagocytic Activity, the Level of AST, and Histopathological Features of the Liver in Mice
Status naskah	Sedang ditelaah

2. BUKU AJAR

	Keterangan
Buku ajar ke-1.	
Judul	FITOKIMIA Kandungan kimia & aktivitas farmakologis sirih
Penulis	Yustina Sri Hartini & Laurentius Hartanto Nugroho
Penerbit	USD Press (sedang proses)
No ISBN	NA (sedang proses)

3. PEMBICARA PADA PERTEMUAN ILMIAH (SEMINAR/SIMPOSIUM)

	Keterangan
Pertemuan Ilmiah ke-1.	
Judul Makalah	The Antioxidant Activity of Leaf Methanolic Extracts from Various Piper Species
Nama Pertemuan Ilmiah	The 26th Federation of Asian Pharmaceutical Association Congress
Tempat Pelaksanaan	Bangkok Thailand
Waktu Pelaksanaan	11/9/2016 12:00:00 AM
Jenis Pertemuan	Internasional
Status naskah	Sedang direview
Pertemuan Ilmiah ke-2.	
Judul Makalah	The Accumulation of Two Neolignans in the Leaves, Stems, and Flowers of Red Betel (<i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.)
Nama Pertemuan Ilmiah	International Symposium on Bioinformatics, Chemometris and Metabolomics 2016
Tempat Pelaksanaan	Bogor
Waktu Pelaksanaan	10/18/2016 12:00:00 AM
Jenis Pertemuan	Internasional
Status naskah	Sudah dilaksanakan
Pertemuan Ilmiah ke-3.	
Judul Makalah	Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) dengan Sirih Hijau (<i>Piper betle</i>)
Nama Pertemuan Ilmiah	Seminar Imunologi "Imunomodulator & Sistem Imun"
Tempat Pelaksanaan	Yogyakarta
Waktu Pelaksanaan	6/2/2016 12:00:00 AM
Jenis Pertemuan	Nasional
Status naskah	Sudah dilaksanakan

4. SEBAGAI PEMBICARA KUNCI (KEYNOTE SPEAKER)

	Keterangan
--	------------

5. UNDANGAN SEBAGAI VISITING SCIENTIST PADA PERGURUAN TINGGI LAIN

	Keterangan
--	------------

6. CAPAIAN LUARAN LAINNYA

Capaian	Uraian

Yogyakarta, 21 10 - 2016
Ketua,



(YUSTINA SRI HARTINI M.Si., Apt.)