

**EFEK IMUNOMODULATOR DUA SENYAWA NEOLIGNAN  
HASIL ISOLASI DARI EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH  
MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.):  
Kajian Imunitas Seluler dan Humoral**

**DISERTASI**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai  
derajat Doktor (Dr.)



Diajukan Oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

Kepada  
**PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA  
2014**

# DISERTASI

## EFEK IMUNOMODULATOR DUA SENYAWA NEOLIGNAN HASIL ISOLASI DARI ESKTRAK METANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.): Kajian Imunitas Seluler dan Humoral

dipersiapkan dan disusun oleh

**YUSTINA SRI HARTINI**

**10/306420/SFA/00049**

telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 29 Agustus 2014

### Promotor

Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.

### Ko Promotor I

drh. Sitarina Widyarini, M.P., PhD.

### Ko Promotor II

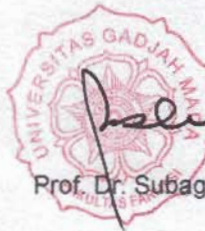
Dr. Agustinus Yuswanto, S.U., Apt.

### Mengetahui:

Fakultas Farmasi

Universitas Gadjah Mada

Dekan,



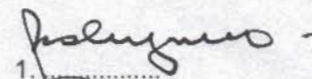
Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.

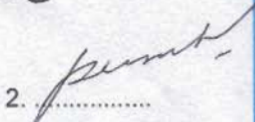
### Tim Penguji:

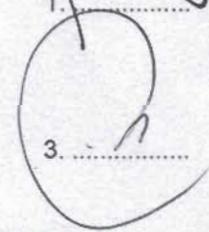
**Ketua:** Dr. Akhmad Kharis Nugroho, M.Si., Apt.


### Anggota:


1. Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt.
2. drh. Sitarina Widyarini, M.P., PhD.
3. Dr. Agustinus Yuswanto, S.U., Apt.
4. Prof. Dr. Wahyono, S.U., Apt.
5. Prof. dr. Marsetyawan HNE Soesatyo, M.Sc., PhD.
6. Dr. drh. Retno Murwanti, M.P.
7. Prof. (Ris). Dr. Leonardus Broto Sugeng Kardono
8. Dr. Erna Prawita Setyowati, M.Si., Apt.

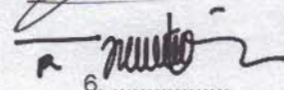
1.  .....


2.  .....

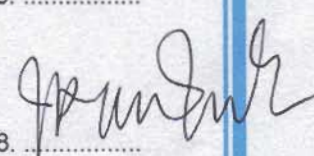
3.  .....

4.  .....

5.  .....

6.  .....

7.  .....

8.  .....

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam disertasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh derajat kesarjanaan pada strata apapun di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, September 2014



Yustina Sri Hartini

**Disertasi ini kusembahkan bagi kedua anaku, Bagaskara Eka Nugraha  
dan Niroga Boma Nugraha, serta suamiku L. Hartanto Nugroho.**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas karunia kasih, keselamatan, dan kesehatan yang telah diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini dengan baik. Disertasi berjudul 'Efek Imunomodulator Dua Senyawa Neolignan Hasil Isolasi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*, Ruiz & Pav.): Kajian imunitas seluler dan humoral' ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai derajat Doktor (Dr.) pada Program Pascasarjana Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Penyelesaian disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak berupa bantuan moril maupun materiil, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Yayasan Sanata Dharma, Rektor Universitas Sanata Dharma, dan Dekan Fakultas Farmasi USD, atas ijin serta dukungan moril maupun materiil untuk menempuh Pendidikan Program Doktor di UGM.
2. Rektor, Dekan Fakultas Farmasi, dan Pengelola Program Pascasarjana Prodi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi UGM, atas penerimaan dan fasilitas untuk menempuh pendidikan doktor bagi penulis.
3. Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt., selaku promotor, atas perhatian, dukungan, teladan, bimbingan yang sangat berharga, dan banyak waktu yang telah tersita untuk selalu menyemangati dan mendampingi penulis dari awal hingga akhir pelaksanaan pendidikan doktor yang penulis tempuh serta penulisan disertasi.

4. drh. Sitarina Widayarni, M.P., PhD., selaku ko-promotor, atas perhatian, dukungan, teladan, bimbingan yang sangat berharga, dan banyak waktu yang telah tersita untuk selalu menyemangati dan mendampingi penulis dari awal hingga akhir penulisan disertasi.
5. Dr. Agustinus Yuswanto, S.U., Apt., selaku ko-promotor, atas perhatian, waktu yang diluangkan, dan bimbingan yang sangat berharga bagi penulis dari awal hingga akhir penulisan disertasi.
6. Prof. Dr. Wahyono, S.U., Apt., Prof. dr. Marsetyawan HNE Soesatyo, M.Sc., PhD., dan Dr. drh. Retno Murwanti, M.P., selaku penilai kelayakan dan penguji disertasi, atas waktu, tenaga, dan pikiran untuk menilai dan mengarahkan demi perbaikan keilmuan dan naskah disertasi penulis.
7. Dr. Erna Prawita Setyowati, M.Si., Apt. dan Prof. (Ris) Dr. Leonardur Broto Sugeng Kardono, selaku penguji disertasi, atas waktu, tenaga, dan pikiran untuk menguji dan mengarahkan demi perbaikan keilmuan dan naskah disertasi penulis.
8. Menteri Pendidikan Nasional melalui Direktorat Jenderal DIKTI, atas bantuan berupa beasiswa BPPS dan Hibah Penelitian Disertasi Doktor.
9. Kepala B2P2TOOT Kementerian Kesehatan RI, Kepala Bagian Biologi Farmasi Fak. Farmasi UGM, Ketua Komisi *Ethical Clearance* untuk Penelitian Praktikum LPPT UGM, Kepala Laboratorium Parasitologi serta Kepala Bagian Farmakologi dan Terapi Fak. Kedokteran UGM, dan Kepala Lab. Fak. Farmasi USD, atas fasilitas terkait penelitian yang telah diberikan bagi penulis.

10. Jeffry Julianus, M.Si., Bapak Y.Wagiran dan Bapak Aditya Bimo dari Lab. Farmasi USD; Ibu Juana, Ibu Rumbiwati dari Lab. Parasitologi serta Bapak Nurhadi dari Bag. Farmakologi dan Terapi Fak. Kedokteran UGM; dan seluruh staff di Program Pascasarjana Prodi Ilmu Farmasi Fak. Farmasi UGM; atas layanan terkait proses pendidikan selama studi S3 bagi penulis.
11. Andayana Puspitasari, M.Si., Apt. Sutomo, M.Si., Apt., Joko Santosa, M.Si., dan semua teman-teman mahasiswa S-3 Prodi Ilmu Farmasi Fak. Farmasi UGM; atas kebersamaan dan kesediaan berbagi banyak hal, serta Ibu Paula Mariana Kustiawan, mahasiswa S-2 Program Pascasarjana UGM atas standar senyawa hasil isolasi dari daun sirih merah yang telah diberikan bagi penulis.
12. Keluarga besar Bapak H. Tugiyono dan keluarga besar Bapak F. Padmowiryo (alm.), atas perhatian, doa, dukungan, dan pengertiannya.
13. Yang tercinta kedua anakku: Bagaskara Eka Nugraha dan Niroya Boma Nugraha, serta suamiku L. Hartanto Nugroho; atas cinta kasih, kepercayaan, pengertian, dan pengorbanannya.
14. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebut satu-persatu, atas bantuannya baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata, penulis berharap bahwa disertasi ini bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan, namun penulis menyadari bahwa disertasi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu saran demi perbaikan disertasi ini sangat penulis harapkan.

Yogyakarta, September 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR SINGKATAN .....	xvi
INTISARI .....	xvii
<i>ABSTRACT</i> .....	xviii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
A. Latar Belakang .....	1
1. Perumusan masalah .....	4
2. Keaslian penelitian .....	5
3. Urgensi (kepentingan) penelitian .....	7
B. Tujuan Penelitian .....	7
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	9
A. Isolasi Senyawa dari Tanaman .....	9
B. Bioaktivitas Tanaman dari Marga <i>Piper</i> .....	17
C. Toksisitas Tanaman dari Marga <i>Piper</i> .....	18
D. Sirih Merah ( <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) .....	20
E. Neolignan .....	24
F. Sistem Imun .....	26
G. Imunitas terhadap Bakteri Intraseluler .....	36
H. Imunomodulator Berasal dari Tanamam .....	39
I. Keterangan Empiris .....	42
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	45
A. Bahan .....	45
B. Peralatan .....	46
C. Jalannya Penelitian .....	47
1. Ekstraksi dan fraksinasi ekstrak metanol daun sirih merah ( <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) .....	47
2. Uji aktivitas fagositosis makrofag ekstrak dan fraksi secara <i>in vitro</i> .....	48



3. Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun sirih merah ( <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) .....	50
4. Penelitian pendahuluan efek imunomodulator secara <i>in vivo</i> .....	52
5. Penelitian utama efek imunomodulator secara <i>in vivo</i> ...	61
D. Variabel Penelitian .....	63
E. Definisi Operasional Variabel Penelitian .....	63
F. Analisis Data .....	66
<b>BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b> .....	69
A. Hasil Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi .....	69
B. Hasil Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag secara <i>In Vitro</i> ...	81
C. Hasil Penelitian Pendahuluan Efek Imunomodulator Isolat	84
D. Hasil Penelitian Utama Efek Imunomodulator <u>1</u> dan <u>2</u>	93
1. Aktivitas fagositosis makrofag .....	93
2. Aktivitas produksi nitrit oksid .....	99
3. Aktivitas proliferasi limfosit .....	102
4. Aktivitas produksi imunoglobulin G .....	105
5. Aktivitas produksi interleukin 12 .....	107
6. Aktivitas produksi interleukin 10 .....	109
7. Pengaruh <u>1</u> dan <u>2</u> pada gambaran histopatologis hati dan ginjal .....	112
<b>BAB V. PEMBAHASAN UMUM</b> .....	119
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	136
A. Kesimpulan .....	136
B. Saran .....	136
DAFTAR PUSTAKA .....	138
LAMPIRAN .....	156
RINGKASAN .....	169
SUMMARY .....	175
NASKAH PUBLIKASI .....	181

## DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1. Penggabungan fraksi berdasar hasil uji KLT fraksi-fraksi hasil KCV ekstrak metanol daun <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav. menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat .....	71
Tabel 2 Hasil fraksinasi ekstrak metanol daun <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav. menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, etil asetat, dan metanol untuk isolasi <u>1</u> dan <u>2</u> .....	72
Tabel 3. Efek perlakuan dengan <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal pada hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> .....	113

## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Keaslian penelitian .....	8
Gambar 2. Sirih merah ( <i>Piper crocatum</i> , Ruiz & Pav.) .....	21
Gambar 3. Penampang lintang daun <i>Piper crocatum</i> . Ep: epidermis, mep: multiple epidermis, p: parenkim, bk: bunga karang, VB: <i>vascular bundle</i> (jaringan pengangkut), sz: <i>schizogenous oil cavity</i> (Sutikno dkk.,2011).....	22
Gambar 4. Struktur kimia senyawa neolignan hasil isolasi dari daun <i>Piper crocatum</i> (Kustiawan, 2012) .....	24
Gambar 5. Aktivasi dan fungsi makrofag dalam imunitas yang diperantarai sel (Abbas <i>et al.</i> , 2007) .....	30
Gambar 6. Respon imun humoral primer dan sekunder (Abbas <i>et al.</i> , 2007) .....	34
Gambar 7. Jalur sinyal IL-12 ( Hamza <i>et al.</i> , 2010) .....	35
Gambar 8. Imunitas bawaan dan adaptif terhadap bakteri intraseluler (Unanue, 1997) .....	38
Gambar 9. Kerangka konsep berpikir .....	44
Gambar 10a. Bagan/skema isolasi <u>1</u> dan <u>2</u> serta uji pendahuluan efek imunomodulator isolat .....	67
Gambar 10b. Bagan/skema uji utama efek imunomodulator <u>1</u> dan <u>2</u> .....	68
Gambar 11. Kromatogram Lapis Tipis dari ekstrak dan 5 fraksi hasil KCV dengan fase gerak CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1) (A), penampak bercak UV 254 nm (B), penampak bercak serium (IV) sulfat dan pemanasan .....	72
Gambar 12. Kromatogram Lapis Tipis Preparatif dengan fase gerak CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1) dan penampak bercak UV 254 nm (A), isolat <u>1</u> (B), isolat <u>2</u> .....	73
Gambar 13. Kristal isolat <u>1</u> dan serbuk isolat <u>2</u> dilihat di bawah mikroskop perbesaran 400x.....	74

Gambar 14.	Kromatogram Lapis Tipis isolat <u>1</u> dan <u>2</u> dengan penampak bercak UV 254 nm menggunakan 4 sistem fase gerak (A), CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1), (B), CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (1:9), (C), Heksan:EtOAc (3:1), dan (D), Heksan:Aseton (3:1) .....	74
Gambar 15.	Kromatogram Lapis Tipis isolat <u>1</u> dan <u>2</u> dengan penampak bercak serium (IV) sulfat dilanjutkan pemanasan menggunakan 4 sistem fase gerak (A), CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1), (B), CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (1:9) (C) Heksan:EtOAc (3:1), dan (D), Heksan:Aseton (3:1) .....	75
Gambar 16.	Spektrogram UV isolat dengan pelarut kloroform (A), <u>1</u> (B), <u>2</u> .....	75
Gambar 17.	Kromatogram HPLC <u>1</u> pada $\lambda$ 234,5 nm .....	76
Gambar 18.	Kromatogram HPLC <u>2</u> pada $\lambda$ 234,5 nm .....	77
Gambar 19.	Kromatogram Lapis Tipis senyawa dengan fase gerak CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1) dan penampak bercak UV 254 nm (A), Bercak tunggal isolat <u>1</u> dan <u>2</u> , (B), Ko-kromatografi isolat <u>1</u> dan fraksi standar (FS), (C), Ko-kromatografi isolat <u>2</u> dan fraksi standar (FS) .....	78
Gambar 20.	Kromatogram Lapis Tipis senyawa dengan fase gerak CHCl <sub>3</sub> :EtOAc (9:1) dan penampak bercak serium sulfat dilanjutkan pemanasan (B), Ko-kromatografi <u>1</u> dan fraksi standar (FS), (C), Ko-kromatografi <u>2</u> dan fraksi standar (FS) .....	78
Gambar 21.	Perbedaan struktur kimia <u>1</u> dan <u>2</u> .....	79
Gambar 22.	Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara <i>in vitro</i> dari ekstrak metanol daun <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.....	82
Gambar 23.	Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara <i>in vitro</i> dari fraksi-fraksi hasil KCV pada dosis 150 $\mu$ g/ml .....	84
Gambar 24.	Fagositosis lateks oleh makrofag peritoneal mencit setelah diinfeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> perbesaran 400x (A), makrofag memfagositasi lateks (B), makrofag tidak memfagositasi lateks (C), lateks tidak difagositasi makrofag .....	85

Gambar 25.	Aktivitas fagositosis makrofag setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, * menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	86
Gambar 26.	Produksi NO setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> ....	89
Gambar 27.	Proliferasi limfosit setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> .....	89
Gambar 28.	Kadar titer IgG setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> .	90
Gambar 29.	Kadar interleukin-12 setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, * menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	91
Gambar 30.	Kadar interleukin-10 setelah mencit diinfeksi <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean ± SD, * menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	91
Gambar 31.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap persentase fagositosis makrofag mencit setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, * menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	94
Gambar 32.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap indeks fagositosis makrofag mencit setelah diinfeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, *menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	95
Gambar 33.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap efisiensi fagositosis makrofag mencit setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, *menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	96
Gambar 34.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap produksi NO setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD, *menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol .....	99

Gambar 35.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap proliferasi limfosit setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, perlakuan dengan <u>1</u> dan <u>2</u> tidak menunjukkan perbedaan bermakna (P<0,05) terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut .....	102
Gambar 36.	Fase-fase respon imun adaptif (Abbas <i>et al.</i> , 2007) .....	103
Gambar 37.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap titer IgG pada mencit setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> . Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, * menandakan terdapat perbedaan bermakna (P<0,05) terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut .....	106
Gambar 38.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap kadar IL-12 setelah induksi dengan <i>L. monocytogenes</i> pada mencit BALB/c. Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, * menandakan terdapat perbedaan bermakna (P<0,05) terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut .....	107
Gambar 39.	Efek <u>1</u> dan <u>2</u> terhadap kadar IL-10 setelah infeksi dengan <i>L. monocytogenes</i> pada mencit. Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, perlakuan dengan <u>1</u> dan <u>2</u> tidak menunjukkan perbedaan bermakna (P<0,05) terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut .....	110
Gambar 40.	Efek perlakuan dengan <u>1</u> dan <u>2</u> pada hati (A,B,C,D) dan ginjal (E) mencit pada hari ke-21 setelah induksi dengan <i>L. monocytogenes</i> , dengan pewarnaan HE, pembesaran 400X (A), hepatosit pada hati normal (B), hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik sedang (C), hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik difus (D), hepatosit yang mengalami nekrosis (E), glomerulus pada ginjal normal .....	114
Gambar 41.	Kemungkinan mekanisme aksi imunomodulator dari <u>1</u> dan <u>2</u> yang diisolasi dari ekstrak metanol daun <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav. ....	135

## DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi/determinasi tanaman sirih merah .....	156
Lampiran 2. Surat keterangan kelaikan etik .....	157
Lampiran 3. Perhitungan dosis 2 berdasar dosis pemakaian daun sirih merah secara tradisional .....	158
Lampiran 4. Surat keterangan hasil pemeriksaan preparat histopatologi hati dan ginjal mencit .....	159
Lampiran 5. Struktur senyawa proantosianidin A-1, licarin A, perseal D, dan obovaten .....	160
Lampiran 6. Hasil analisis perbedaan PF, IF, dan EF antar kelompok pada uji fagositosis makrofag perlakuan <u>1</u> dan <u>2</u> dengan one-way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19.....	161
Lampiran 7. Hasil analisis perbedaan kadar NO antar kelompok pada uji produksi NO perlakuan <u>1</u> dan <u>2</u> dengan one-way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19 .....	163
Lampiran 8. Hasil analisis perbedaan antar kelompok pada uji titer IgG perlakuan <u>1</u> dan <u>2</u> dengan one-way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19 .....	165
Lampiran 9. Hasil analisis perbedaan kadar IL-12 antar kelompok pada uji IL-12 perlakuan <u>1</u> dan <u>2</u> dengan one-way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19 .....	167

## DAFTAR SINGKATAN

DPc	Daun <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
P-TLC	<i>Preparative Thin Layer Chromatography</i>
KLT-P	Kromatografi Lapis Tipis Preparatif
KCV	Kromatografi Cair Vakum
VLC	<i>Vacuum Liquid Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
FTL	Fraksi Tak Larut metanol 60%
FL	Fraksi Larut metanol 60%
CMCNa	<i>Carboxymethyl Cellulose Natrium</i>
NO	Nitrit Oksid/ <i>Nitric Oxid</i>
PF	Persentase Fagositosis
IF	Indeks Fagositosis
EF	Efisiensi Fagositosis
PP	<i>Phagocytosis Percentage</i>
PI	<i>Phagocytosis Index</i>
PE	<i>Phagocytosis Efficiency</i>
MTT	<i>3-[4,5-(dimethylthiazol-2-yl)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> ]
OD	<i>Optical Density</i>
IgG	Imunoglobulin G
IL-12	Interleukin 12
IL-10	Interleukin 10



## INTISARI

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) banyak digunakan sebagai obat tradisional. Beberapa aktivitas farmakologis ekstrak dari daun sirih merah telah dilaporkan. Secara *in vivo*, ekstrak daun sirih merah meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag tetapi tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit maupun titer imunoglobulin G. Uji *in vitro* senyawa hasil isolasi (**1** dan **2**) dari daun sirih merah menunjukkan bahwa **1** dan **2** pada dosis 5 µg/ml dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Isolat **1** dan **2** diidentifikasi sebagai neolignan yakni senyawa 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3, 5-dienone dan senyawa 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone). Penelitian ini bertujuan menetapkan efek imunomodulator dan efek terhadap gambaran histopatologis dari perlakuan dengan **1** dan **2** secara *in vivo* pada mencit.

Isolat **1** dan **2** (2,5; 5; dan 10 mg/kgBB) diuji efek imunomodulatornya terhadap respon imun mencit BALB/c yang diinduksi dengan *Listeria monocytogenes*. Efek **1** dan **2** terhadap respon imun seluler ditetapkan melalui uji aktivitas fagositosis makrofag, produksi nitrit oksid, dan proliferasi limfosit; sedangkan efek terhadap respon imun humoral ditetapkan melalui pengukuran titer imunoglobulin G. Lebih lanjut ditetapkan efek **1** dan **2** terhadap produksi interleukin 12 dan interleukin 10. Efek perlakuan **1** dan **2** terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit diperiksa secara mikroskopis dengan pengecatan hematoksilin-eosin. Analisis statistik data efek imunomodulator menggunakan *one-way* ANOVA dilanjutkan uji Tukey, sedangkan analisis gambaran histopatologis hati dan ginjal secara deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara *in vivo*, **1** dan **2** (5 dan 10 mg/kg berat badan) meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Pada dosis 2,5; 5; dan 10 mg/kg berat badan, **1** dan **2** meningkatkan produksi nitrit oksid dan interleukin 12, tetapi pengaruh terhadap proliferasi limfosit, titer imunoglobulin G dan produksi interleukin 10 tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Perlakuan dengan **1** (2,5; 5; dan 10 mg/kg berat badan) tidak berpengaruh terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal, sedangkan **2** pada dosis 2,5 mg/kg berat badan menyebabkan degenerasi hidropis dan dosis 5 mg/kg berat badan menyebabkan nekrosis hati.

Kata kunci : *Piper crocatum* Ruiz & Pav., isolasi, imunomodulator, *in vivo*, gambaran histopatologis

## ABSTRACT

Red betel (*Piper crocatum*) leaf is widely used as a traditional medicine in Indonesia. Some of the pharmacological activities of red betel leaf extract have been reported. The *in vivo* study reported that red betel leaf extract had macrophage phagocytic activity but had no significantly effect on lymphocyte proliferation and immunoglobulin G titre. *In vitro* study of two isolated compounds (**1** and **2**) from red betel leaf extract showed that at the dose of 5 µg/ml increased macrophage phagocytic activity. The **1** dan **2** were identified as neolignans, i.e., 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3, 5-dienone and 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone. This study aim to determine the *in vivo* immunomodulatory and histopathological features effect of **1** dan **2** on mice.

Isolate **1** and **2** were tested on BALB/c mice immune response induced by *Listeria monocytogenes*. The **1** and **2** cellular immune response determined through macrophage phagocytic activity test, nitric oxide production, and lymphocyte proliferation, whereas the compounds effect on the humoral immune response determined by measuring immunoglobulin G titre. Furthermore, **1** and **2** effect on the IL-12 and IL-10 productions were also determined. Histopathological features effects of **1** and **2** were observed from the liver and kidney which made by hematoxyllin-eosin staining, and observed microscopically. The data of immunomodulatory effects were analysed using one-way ANOVA followed by Tukey test, while the liver and kidney histopathological features were analysed descriptively.

This *in vivo* study show that **1** and **2** (5 mg/kg body weight) increase the phagocytic activity of macrophages. At the doses of 2.5, 5, and 10 mg/kg body weight, **1** and **2** increase the production of nitric oxide and interleukin 12 but the mice lymphocyte proliferation, immunoglobulin G titre, and interleukin 10 production have no significantly differences compare to control. The treatment with **1** (2.5, 5, and 10 mg/kg body weight) has no histopathological features effect on both liver and kidney, but at the dose of 2.5 and 5 mg/kg body weight **2** induce liver hidropic degeneration and necrosis respectively.

Key words : *Piper crocatum*, Ruiz & Pav., isolation, immunomodulatory, *in vivo*, histopathological features



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar Belakang

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Pengobatan alami seharusnya menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru yang mampu menjadi target reseptor yang spesifik. Tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator pada umumnya memiliki aktivitas memicu imunitas spesifik dan non spesifik (Wagner and Proksh, 1985). Beberapa diantara tanaman tersebut memicu imunitas humoral maupun seluler, sedang yang lainnya hanya mengaktifkan komponen seluler dari sistem imun, misalnya fungsi fagositosis tanpa berpengaruh pada imunitas humoral maupun seluler (Bafna dan Misrha, 2004). Pada penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat, pemilihan tanaman yang akan diteliti dapat berupa tanaman yang faktanya digunakan masyarakat, meskipun tidak disebut pada dokumentasi maupun publikasi yang telah ada (Mukherjee, 2008). Banyak tanaman yang bersifat imunostimulator dan hanya beberapa tanaman yang telah diskriming aktivitas imunostimulannya, sehingga tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis (Kumar *et al.*, 2011).

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) banyak digunakan sebagai obat tradisional. *Piper betle* dan *Pipe longum* merupakan tanaman dalam marga *Piper* yang digunakan sebagai obat tradisional. Ekstrak metanol yang diperoleh dengan metode maserasi dari kedua tanaman tersebut dilaporkan memiliki aktivitas imunomodulator (Kanjwani *et al.*, 2008; Sunila and Kuttan, 2004). Penelitian tentang

aktivitas imunomodulator daun *Piper crocatum* (DPc) secara *in vivo* menunjukkan bahwa ekstrak etanol maupun ekstrak n-heksana DPc mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag akan tetapi tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013). Uji titer immunoglobulin G (IgG) dari ekstrak n-heksana DPc pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan adanya efek immunosupresan pada dosis 10 mg/kgBB, tetapi pada dosis 100 mg/kg BB menunjukkan efek imunostimulan (Wahyudi, 2010), sedangkan ekstrak etanol DPc pada dosis 10, 100, dan 300 mg/kgBB tidak berpengaruh terhadap titer IgG (Wiweko, 2010). Secara *in vitro*, senyawa hasil isolasi dari ekstrak etanol DPc (1 dan 2) pada dosis 5 µg/ml dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Isolat 1 dan 2 yang diidentifikasi sebagai neolignan tersebut mempunyai struktur kimia yang mirip, 1 memiliki gugus asetil, berbeda dari isolat 2 yang memiliki gugus hidroksil (Kustiawan, 2012).

Sirih merah, sebagai obat tradisional harus memenuhi kriteria kemanfaatan (*efficacy*) dan keamanan (*safety*) (*World Health Organization, 2000*). Dalam penelitian ini kemanfaatan DPc diukur melalui pengujian aktivitas terapeutik senyawa hasil isolasi dari DPc, yakni aktivitas memodulasi sistem imun. Penelitian ini juga memeriksa pengaruh perlakuan dengan senyawa tersebut terhadap gambaran *histopatologis hati dan ginjal hewan uji*.

Obat-obatan maupun ekstrak yang secara *in vitro* menunjukkan aktivitas, dapat menunjukkan non aktif ketika diuji secara *in vivo* (Wagner *et al.*, 1999; Kanjwani *et al.*, 2008). Penelitian yang sudah dilakukan berupa pengukuran respon imun non spesifik secara *in vitro* yakni uji aktivitas fagositosis makrofag ekstrak DPc

maupun 1 dan 2 pada dosis 5 µg/ml (Kustiawan, 2012). Penelitian ini bertujuan mengukur efek imunomodulator isolat 1 dan 2 dengan variasi dosis dan dilakukan secara *in vivo*. Respon imun dikelompokkan menjadi respon imun bawaan yang bersifat non spesifik dan respon imun adaptif atau spesifik (Abbas *et al.*, 2007). Respon imun spesifik terdiri dari respon imun seluler dan humoral. Respon imun non spesifik yang diukur pada penelitian ini berupa aktivitas fagositosis makrofag dan produk dari aktivitas makrofag yakni nitrit oksid (NO). Respon imun seluler ditetapkan melalui pengukuran proliferasi limfosit, sedangkan respon imun humoral ditetapkan dengan pengukuran titer IgG. Respon imun juga dipengaruhi oleh sitokin, misalnya interleukin 12 (IL-12), dan interleukin 10 (IL-10). Sitokin memerantari dan mengatur fungsi dari sel-sel imunitas bawaan dan adaptif. Lebih lanjut dalam penelitian ini ditetapkan pengaruh perlakuan dengan isolat 1 dan 2 terhadap produksi IL-12 dan IL-10.

Respon imun hewan uji dapat diinduksi dengan infeksi bakteri. Induksi respon imun mencit pada penelitian ini dilakukan dengan *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler fakultatif, akan menginduksi respon imun bawaan dan adaptif. Respon imun bawaan terhadap bakteri intraseluler dilaksanakan oleh fagosit dan sel-sel NK, interaksi antara sel-sel tersebut diperantari oleh sitokin. Respon imun adaptif terhadap bakteri tersebut merupakan imunitas yang diperantari sel, dimana sel T mengaktivasi fagosit untuk mengeliminasi bakteri (Abbas *et al.*, 2007; Unanue, 1997). *Listeria monocytogenes* telah banyak digunakan sebagai model untuk mempelajari respon imun bawaan dan adaptif, terutama aktivasi makrofag (Farr *et al.*, 1977; Godfrey *et al.*, 1983). Makrofag melaksanakan sebagian

besar fungsi efekturnya 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*, NO, dan enzim lisosomal. Makrofag yang teraktivasi merupakan sumber utama produksi IL-12, sitokin imunoregulator kunci pada infeksi bakteri dan virus, sebaliknya IL-10 menghentikan respon makrofag yang teraktivasi sehingga menghambat produksi IL-12 (Abbas *et al.*, 2007, Hamza *et al.*, 2010).

Hati dan ginjal merupakan organ untuk metabolisme dan ekskresi obat, potensial untuk dipengaruhi oleh bahan-bahan toksik. Ekstrak etanol DPc menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal ayam yakni berupa kongesti, degenerasi, dan nekrosis, meskipun mampu menghambat kematian hewan yang diuji tantang virus *Avian influenza* H5N1 tersebut (Nugraha, 2010). Hal tersebut berbeda dengan efek pada hati dan ginjal tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B, pada dosis 300 mg/kgBB ekstrak n-heksana maupun ekstrak etanol DPc tidak menyebabkan kerusakan pada kedua organ tersebut (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010). Dalam penelitian ini pengaruh perlakuan dengan isolat 1 dan 2 diperiksa melalui gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit.

## 1. Perumusan masalah

*Perumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:*

- a. Apakah senyawa yang diisolasi dari daun sirih merah (1 dan 2) bermanfaat untuk memodulasi sistem imun ?
- b. Bagaimana pengaruh perlakuan dengan senyawa yang diisolasi dari daun sirih merah (1 dan 2) terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal hewan uji ?

## 2. Keaslian penelitian

Penelitian tentang efek imunomodulator secara *in vivo* dan pemeriksaan gambaran histopatologis pada hati dan ginjal mencit yang diinduksi dengan *L. monocytogenes*, karena perlakuan dengan senyawa hasil isolasi dari daun sirih merah (**1** dan **2**), belum pernah dilakukan. Penelitian lain yang relevan dengan penelitian ini dilakukan oleh beberapa peneliti. Rachmawaty dkk. (2013) dan Wicaksono *et al.* (2009), masing-masing mempublikasikan hasil penelitiannya, yakni tentang aktivitas antimikobakterium ekstrak etanol dan aktivitas antiproliferatif ekstrak metanol dari daun sirih merah. Uji antiinflamasi ekstrak metanol daun sirih merah pada tikus putih dilaporkan oleh Fitriyani (2011). Penelitian yang belum dipublikasikan yakni tentang: aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak daun sirih merah (Suratmo, 2008), efek sitotoksik dan induksi apoptosis ekstrak etanol daun sirih merah (Tirta, 2010). Penelitian menggunakan tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B dilakukan oleh Aprianto (2011), Indriyani (2011), Wiweko (2010), dan Wahyudi (2010). Berturut-turut penelitian tersebut adalah uji aktivitas imunomodulator ekstrak etanol daun sirih merah terhadap peningkatan titer IgG dan histopatologis tikus; uji aktivitas imunomodulator ekstrak n-heksana daun sirih merah terhadap peningkatan titer IgG dan histopatologis tikus; uji aktivitas imunomodulator ekstrak n-heksana daun sirih merah terhadap peningkatan titer IgG dan histopatologis tikus; serta uji aktivitas imunomodulator ekstrak etanolik daun sirih merah terhadap proliferasi limfosit dan fagositosis makrofag. Fraksi dari ekstrak daun sirih merah diteliti secara *in vitro* oleh Kurniawan (2011), Yuristriyani (2012), dan Ardianto (2013). Berturut-turut



penelitian tersebut adalah uji efek sitotoksik dan induksi apoptosis fraksi larut dan tidak larut kloroform ekstrak etanolik daun sirih merah terhadap sel T47D dan myeloma; uji potensi fraksi tak larut n-heksana ekstrak etanol daun sirih merah terhadap fagositosis makrofag dan proliferasi limfosit; dan uji aktivitas imunomodulator fraksi n-heksana ekstrak etanolik daun sirih merah terhadap fagositosis makrofag dan proliferasi limfosit. Uji aktivitas fraksi dari ekstrak daun sirih merah secara *in vivo* terhadap fagositosis makrofag, proliferasi sel TCD4<sup>+</sup> dan TCD8<sup>+</sup> serta titer antibodi dilakukan oleh Werdani (2012). Yuristriyani (2012) dan Werdani (2012) menggunakan *phytohemagglutinin* untuk menginduksi tikus. Secara *in vitro*, uji aktivitas senyawa hasil isolasi dari ekstrak etanol daun sirih merah terhadap aktivitas fagositosis makrofag dilakukan oleh Kustiawan (2012).

Penelitian yang dilakukan ini berbeda dengan penelitian tersebut di atas. Kustiawan (2012) melakukan uji *in vitro* 1 dan 2 dengan satu dosis, respon imun hewan uji tidak diinduksi dan hanya diukur satu parameter saja yakni aktivitas fagositosis makrofag. Peneliti yang lain melakukan uji pada ekstrak dan fraksi dari ekstrak DPc, belum melakukan uji untuk isolat senyawa dari DPc. Penelitian ini menguji efek imunomodulator isolat 1 dan 2 dengan 3 seri dosis, secara *in vivo* terhadap mencit yang respon imunnya diinduksi dengan *Listeria monocytogenes*. Parameter yang diukur tidak hanya aktivitas fagositosis makrofag saja, tetapi juga aktivitas produksi NO, proliferasi limfosit, titer IgG, produksi IL-12 dan IL-10, maupun pemeriksaan gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit karena perlakuan dengan isolat 1 dan 2. Skema tentang keaslian penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.

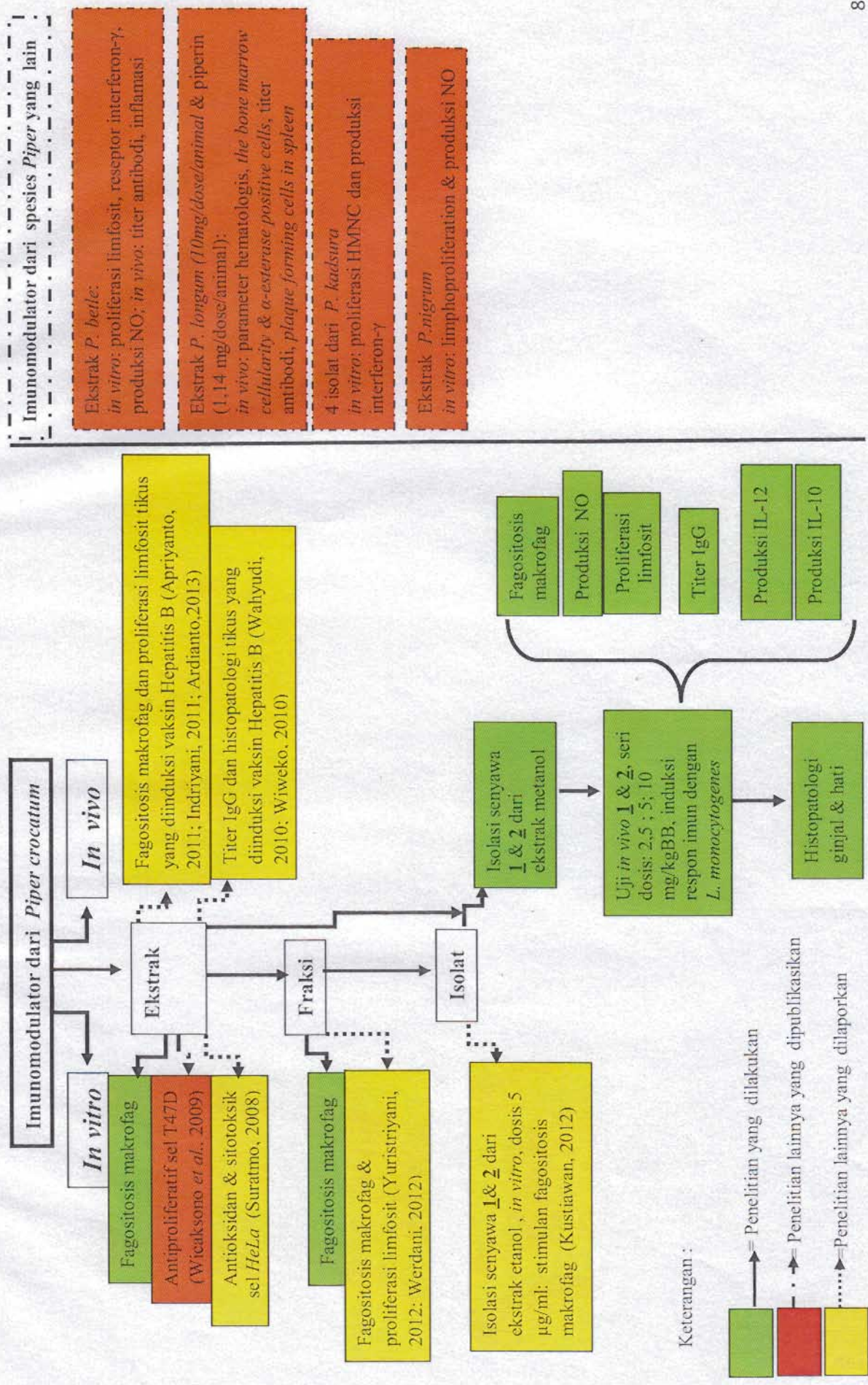
### 3. Urgensi (kepentingan) penelitian

Penelitian tentang efek imunomodulator senyawa dari daun sirih merah secara *in vivo* merupakan hal baru. Saat ini belum ditemukan publikasi baik di jurnal nasional maupun internasional tentang isolat senyawa baik senyawa imunomodulator maupun senyawa dengan aktivitas farmakologis lainnya yang berasal dari DPc. Hasil penelitian ini dapat memberi bukti ilmiah efek imunomodulator isolat senyawa dari DPc, serta pengaruh perlakuan isolat senyawa dari DPc terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit. Sampai saat ini belum ada laporan tentang senyawa aktif dari DPc, padahal idealnya standarisasi obat didasarkan pada komponen unik yang berkontribusi terhadap efek terapetiknya. Ditetapkannya isolat senyawa imunomodulator sebagai senyawa aktif dari DPc Pemeriksaan pengaruh senyawa aktif dari DPc terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit, akan mendukung proses standarisasi DPc.

### B. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yakni:

- a. Mengetahui pengaruh perlakuan dengan senyawa yang diisolasi dari DPc (1 dan 2) terhadap respon imun mencit yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes*, secara *in vivo*.
- b. Mengetahui pengaruh perlakuan dengan senyawa yang diisolasi dari DPc (1 dan 2) terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes*, secara *in vivo*.



Gambar 1. Keaslian Penelitian



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Isolasi Senyawa dari Tanaman

Pengobatan alami merupakan bahan kajian dan sumber penting untuk mendapatkan senyawa obat baru (Alamgir and Uddin, 2010). Alam telah menyediakan banyak sumber obat sejak dahulu kala, dan berbagai senyawa sintetikpun dibuat berdasar model senyawa dari bahan alam (Vlietinck and Apers, 2001; Heinrich *et al.*, 2004). Produk alam (*natural product*) dapat berupa keseluruhan organisme yakni tanaman, hewan, atau mikroorganisme yang belum diproses kecuali proses pengawetan sederhana seperti pengeringan. Istilah *crude extract* digunakan untuk produk alam seperti tanaman, bagian dari tanaman, ekstrak, dan eksudat yang bukan senyawa murni (Samuellsen, 1999).

##### 1. Ekstraksi

Tanaman terdiri dari banyak senyawa kimia, senyawa yang bertanggung jawab terhadap efek terapeutik tanaman disebut senyawa aktif (*active constituents*), yang lain disebut senyawa inert. Seringkali keberadaan senyawa inert dapat mengubah ataupun mencegah absorbtivitas atau potensi dari senyawa aktif. Untuk meniadakan efek tak diinginkan dari senyawa inert, dilakukan ekstraksi terhadap senyawa aktif. Senyawa aktif farmakologis bertanggung jawab terhadap efek terapeutik obat/tanaman, dapat berupa senyawa tunggal ataupun campuran dari senyawa (Robbers *et al.*, 1996).

Ekstrak/sari dari tanaman merupakan campuran dari banyak senyawa dan senyawa tertentu seringkali hanya merupakan bagian yang sangat kecil. Ekstrak

merupakan sediaan berasal dari semua senyawa yang dapat larut ke dalam pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara diantaranya maserasi, perkolasi, infundasi, ekstraksi pelarut, maupun destilasi. Maserasi merupakan prosedur ekstraksi paling sederhana dan sesuai baik untuk jumlah sedikit maupun skala produksi industrial (Samuelsson, 1999). Penyarian zat aktif dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya (List and Schmidt, 1989; Voight, 1984). Pengulangan proses perendaman merupakan upaya untuk mendapatkan sebanyak mungkin senyawa yang terekstraksi. Jenis pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi sangat menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi. Senyawa dalam tanaman biasanya berada di dalam sel, pelarut harus dapat berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan molekul senyawa yang diinginkan kemudian dengan arah berlawanan melewati dinding sel dan bercampur dengan cairan di sekelilingnya (Samuelsson, 1999). Cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan penyari di luar sel dengan cairan penyari di dalam sel. Kesetimbangan akan terjadi antara senyawa terlarut di dalam sel dengan pelarut di sekitar jaringan tanaman, dimana kecepatan kesetimbangan tersebut dipengaruhi oleh suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan dari pelarut. Maserasi dilakukan pada suhu kamar, karena diharapkan senyawa yang tidak tahan pemanasan tidak rusak oleh adanya pemanasan, efektivitas ekstraksi dioptimalkan dengan pengadukan (Voight, 1984; Samuelsson, 1999).

Senyawa bioaktif dapat merupakan kelas kimiawi yang berbeda dan dapat diperoleh dari metode ekstraksi yang berbeda (Meireles, 2009; Reverchon and Marrone, 2001). Beberapa hal perlu diperhatikan ketika memilih metode untuk mendapatkan suatu molekul senyawa bioaktif seperti toksisitas dari pelarut yang digunakan, stabilitas senyawa dan selektivitas dari proses (Brunner, 1994; McHugh and Krukonis, 1994). Lemos *et al.* (2012) telah membandingkan metode ekstraksi dengan cara superkritikal dengan metode sokhletasi, dan menemukan bahwa metode yang berbeda menghasilkan jumlah ekstrak yang berbeda dan perbedaan tingkat aktivitas antibakteri dari ekstrak pula.

## 2. Fraksinasi

Fraksinasi berfungsi untuk memisahkan suatu zat yang diinginkan dari sistem campuran. Uji aktivitas fraksi-fraksi hasil pemisahan dari campuran senyawa produk alam akan menuntun untuk isolasi dan identifikasi struktur kimia senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Senyawa aktif yang telah diketahui struktur kimianya ini kemudian dapat digunakan sebagai obat ataupun sebagai model atau sebagai prekursor untuk penemuan obat baru (Samuelsson, 1999). Komponen dalam ekstrak dari suatu organisme dapat dipisahkan menjadi kelompok-kelompok senyawa berdasarkan kemiripan karakteristik fisikokimianya. Proses ini disebut fraksinasi dan dapat dilakukan dengan berbagai cara, antara lain presipitasi, ekstraksi pelarut-pelarut, *cracking emulsions*, ekstraksi bertingkat, *salting out*, dialisis, elektroforesis, dan kromatografi (Houghton and Raman, 1998).

Kromatografi merupakan suatu metode untuk pemisahan campuran, menggunakan dua fase yakni fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*). Fase diam sering disebut adsorben atau penyerap, sedangkan bahan tempat melekatnya fase diam disebut penyangga. Pengembangan adalah proses ketika fase gerak digerakkan melalui fase diam untuk menghasilkan pemisahan kromatografi. Setelah senyawa-senyawa dipisahkan dengan pengembangan, hasilnya dideteksi atau divisualisasikan. Senyawa yang dipisahkan biasanya disebut linarut, atau secara kelompok disebut cuplikan. Hasil keseluruhan disebut kromatogram. Titik tempat campuran ditotolkan pada ujung pelat atau lembaran disebut titik awal. Garis depan pelarut ialah bagian atas fase gerak atau pelarut ketika ia bergerak melalui lapisan, dan setelah pengembangan selesai, merupakan tinggi maksimum yang dicapai oleh pelarut. Perilaku senyawa tersebut di dalam sistem kromatografi tertentu dinyatakan dengan harga  $R_f$ , yakni angka yang diperoleh dengan membagi jarak yang ditempuh oleh bercak linarut dengan jarak yang ditempuh oleh garis depan pelarut. Jarak tersebut diukur dari titik awal, dan harga  $R_f$  beragam mulai dari 0 sampai 1 (Gritter *et al.*, 1985).

Beberapa metode kromatografi melibatkan fase diam padat (cair-padat) yang sering disebut kromatografi serap dan beberapa metode lainnya melibatkan fase diam zat cair (cair-cair) disebut kromatografi partisi. Metode kromatografi cair dapat menggunakan fase diam berupa lapisan tipis pada sejenis penyangga seperti pada kromatografi lapis tipis, atau berupa lembaran seperti pada kromatografi kertas, atau fase tersebut dalam kolom yang diwadahi dengan tabung kaca, logam, atau plastik seperti pada kromatografi kolom (Gritter *et al.*, 1985).



Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan kromatografi cair yang paling sederhana, dapat memisahkan senyawa yang amat berbeda seperti senyawa organik alam dan organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion anorganik, dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal. Kelebihan metode KLT yakni pemakaian pelarut dan cuplikan yang jumlahnya sedikit dan penotolan cuplikan berganda. Metode ini sederhana dan dapat diandalkan untuk mendukung identifikasi makroskopis dan mikroskopis terhadap suatu tanaman obat serta identifikasi ekstrak maupun sediaan obat yang berbahan tanaman obat (List and Schmidt, 1989; Houghton and Raman, 1998).

Senyawa yang dipisahkan dengan KLT dideteksi dengan zat berwarna atau dengan zat-zat yang dapat didorong untuk berpendar atau yang menyerap radiasi Ultra Violet (UV). Zat yang tidak berwarna dan tidak menyerap sinar UV atau berpendar pada paparan sinar UV harus divisualisasikan dengan reagen deteksi yang cocok untuk membentuk warna, fluoresensi atau menyerap UV (Mukherjee, 2002).

Kromatografi Cair Vakum (KCV) atau *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) pertama kali disebutkan oleh Coll *et al.* (1977) untuk pemisahan diterpen. Kromatografi Cair Vakum merupakan bentuk kromatografi kolom yang terutama bermanfaat untuk fraksinasi ekstrak kasar dengan cepat. Kolom yang digunakan pendek tidak lebih dari 5 cm dan relatif besar dengan diameter dalam 0,5 - 1,0 cm untuk pemisahan senyawa dengan berat kurang dari 100 mg, dan 5 cm untuk pemisahan 1 - 10 gram senyawa. Fase gerak dihisap oleh adanya pengurangan

tekanan. Fraksi biasanya dikumpulkan sebagai tapisan (*aliquot*) dari pelarut yang polaritasnya semacam (Coll and Bowden, 1986; Houghton and Raman, 1998).

### 3. Isolasi

Isolasi produk alam berbeda dari isolasi makromolekul lain, karena produk alam lebih kecil dan beragam kimiawinya dibandingkan protein yang relatif homogen, asam nukleat dan karbohidrat, sehingga metode isolasi produk alam harus mempertimbangkan hal tersebut (Cannell, 1998). Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) merupakan metode paling sederhana dan murah untuk isolasi suatu senyawa atau senyawa dari campuran, akan tetapi hanya sedikit jumlah yang didapat dari setiap prosedur fraksinasi (Houghton dan Raman, 1998). KLTP adalah cara yang ideal untuk pemisahan cuplikan kecil (50 mg sampai 1 g) dari senyawa yang kurang atsiri. Cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi pelat lapisan besar dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis cuplikan sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita. Pita ditampakkan dengan cara yang tidak merusak senyawa, dan penyerap yang mengandung pita dikerok dari pelat kaca, kemudian cuplikan diehusi dari penyerap dengan pelarut polar (Gritter *et al.*, 1985). Dengan metode KLTP dimungkinkan untuk mengisolasi hingga 40 mg senyawa. Identitas dan kemurnian senyawa kemudian dapat dimonitor menggunakan teknik spektroskopi. Langkah pemurnian lebih lanjut, misalnya rekristalisasi, mungkin dilakukan jika diperlukan (Houghton and Raman, 1998). Prasad *et al.* (1995) mengisolasi 2 neolignan dari *P. clarkii* menggunakan metode KLTP, Singh *et al.* (1996) menggunakan metode tersebut

untuk mengisolasi 10 neolignan dari *P. argyrophylum*, demikian juga Chen *et al.* (2013) menggunakannya untuk mengisolasi 3 neolignan dari *P. taiwanense*.

Kemurnian senyawa hasil isolasi diperlukan untuk kepentingan penetapan struktur senyawa juga agar diperoleh data yang valid (bebas dari variabel eksperimental lain) pada pengujian biologis maupun kimiawi serta agar dapat ditetapkan profil dosis-aktivitas dari senyawa tersebut (Cannel, 1998). Kemurnian dari hasil isolasi (isolat) sebaiknya selalu dicek dengan paling tidak 4 sistem KLT yang berbeda, jika memungkinkan dilakukan dengan HPLC. Isolat yang diharapkan murni ini harus dikonfirmasi dengan cara *spiking* senyawa dengan bahan otentik. Isolat dikatakan senyawa murni apabila tidak ada perluasan dan pembentukan bahu terjadi dalam puncak profilnya (Houghton and Raman, 1998).

#### 4. Deteksi isolat

Spektroskopi Ultra Violet-visual (UV-vis) merupakan teknik pengukuran konsentrasi suatu senyawa berdasarkan pengukuran absorbansi atau transmisi sinar yang melewati senyawa tersebut. Spektrofotometri UV menghasilkan radiasi panjang gelombang antara 200-400, dan molekul-molekul yang tidak mempunyai ikatan rangkap tidak menyerap sinar pada panjang gelombang 200-800 nm. Senyawa yang mempunyai sistem konjugasi dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV, semakin panjang sistem konjugasinya maka semakin besar panjang gelombang absorpsinya.

Penampakan noda kromatogram dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain:

a. Penampakan pada sinar UV 254 nm

Pada UV 254 nm, lempeng KLT akan berfluoresensi sedangkan noda (isolat pada KLT) akan tampak berwarna gelap karena pendaran oleh senyawa yang mempunyai gugus kromofor. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm karena adanya daya interaksi antara UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng KLT. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi (Mukherjee, 2002; Ganjar and Rohman, 2007).

b. Penampakan pada sinar UV 366 nm

Pada UV 366 nm, noda (isolat pada KLT) akan berfluoresensi dan lempeng KLT akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi. Noda yang tampak pada UV 366 nm terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluoresensi pada sinar UV 366 nm (Mukherjee, 2002; Ganjar dan Rohman, 2007).

c. Pereaksi semprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %

Reagen asam sulfat digunakan untuk mendeteksi senyawa organik pada umumnya dan lignan-lignan yang spesifik (Fried and Sharma, 1994; Wagner and Bladt, 1996). Prinsip penampakan noda pereaksi semprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % adalah berdasarkan kemampuan asam sulfat yang bersifat oksidator dalam merusak senyawa hidrokarbon dari zat aktif simplisia sehingga panjang gelombangnya akan bergeser ke arah yang lebih panjang (UV menjadi visual) sehingga noda menjadi tampak oleh mata (Mukherjee, 2002; Ganjar dan Rohman, 2007).

## **B. Bioaktivitas Tanaman dari Marga *Piper***

Marga *Piper* memiliki lebih dari 1000 spesies yang tersebar di seluruh dunia dan merupakan marga paling representatif dari suku *Piperaceae* (Jaramillo and Manos, 2001). Tanaman dari marga *Piper* terdistribusi di daerah tropis maupun sub tropis, spesies dari marga *Piper* bermanfaat dari segi komersial, ekonomis maupun pengobatan. Banyak tanaman dari marga *Piper* telah dilaporkan mengandung produk alam yang memiliki berbagai aktivitas biologis (Parmar *et al.*, 1997; Amonkar *et al.*, 1986; Lee-Chen *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007). Spesies dari marga *Piper* telah banyak dilaporkan mengandung metabolit sekunder berupa senyawa golongan alkaloid, profenilfenol, terpen, steroid, kawapiron, calkon dan dihidrocalkon, flavon, flavanon, lignan, dan neolignan (Kirtikar and Basu, 1993; Parmar *et al.*, 1997).

Ekstrak metanol *P. betle* L adalah kandidat baru untuk aktivitas immunosupresif (Kanjwani *et al.*, 2008). Ekstrak etanol *Piper betle* menurunkan histamin dan produksi *granulocytet macrphage-colony stimulating factor* (GM-CFS) dengan reaksi hipersensitivitas yang diperantarai IgE (Wirotasangthong *et al.*, 2008). Fraksi n-heksana dan fraksi kloroform daun *P. betle* L. mampu memicu respon imun pada tikus BALB/c dan menunjukkan aktivitas antiparasit terhadap *Brugia malayi* (Singh *et al.*, 2009). Ekstrak metanol *Piper longum* menghambat VEGF dan sitokin proinflamatori dan angiogenesis tumor pada mencit C57BL/6 (Sunila and Kuttan, 2006). Piperin dari *P. longum* dilaporkan memiliki aktivitas immunomodulator (Sunila and Kuttan, 2004). Selain terdapat dalam *Piper longum*, piperin juga terdapat dalam beberapa spesies *Piper* yang lain (Parmar *et al.*, 1997).

### **C. Toksisitas Tanaman dari Marga *Piper***

Beberapa tanaman yang mempunyai khasiat terapeutik diketahui mampu membantu stabilitas organ dalam pada hewan. Beberapa tanaman lainnya mempunyai efek samping pada organ-organ, kemungkinan karena variasi jumlah dari bahan toksik yang ada pada tanaman tertentu (Ataman *et al.*, 2006). Uji toksisitas pada hewan dilakukan pada obat baru untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya senyawa toksik. Hal tersebut membantu menetapkan batas atas asupan obat tersebut (Sofowora, 1993). Apabila efek toksik suatu obat rendah, maka ada peluang bahwa obat tersebut dapat digunakan untuk terapi (Ataman *et al.*, 2006). Peningkatan konsentrasi senyawa aktif dalam ekstrak tanaman tidak selalu bermanfaat, dan dapat memicu terjadinya efek biologis yang merugikan (Pepato *et al.*, 2001).

Eksrak air *P. guineense* memiliki aktivitas antioksidan yang dapat bersifat memperbaiki kerusakan hati yang berhubungan dengan paparan etanol kronis pada tikus (Nwozo *et al.*, 2012). Ekstrak metanol *P. longum* melindungi kerusakan histopatologis miokardium karena induksi isoproterenol pada tikus (Chauhan *et al.*, 2010). Sedangkan uji toksisitas akut dan subkronik dari ekstrak air buah *P. chaba* pada tikus jantan dan betina tidak menunjukkan efek toksik (Jaijoy *et al.*, 2011).

Pada studi yang lain, dilaporkan bahwa pemberian dosis tinggi ekstrak air *Piper guineense* menyebabkan berkurangnya aktivitas gerak serta nafsu makan pada hewan uji. Pada organ ginjal dan hati juga menunjukkan perubahan kondisi sitoarsitektornya, beberapa di antaranya adalah patologis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *P. guineense* bersifat toksik pada dosis dan pada pemberian dalam jangka panjang (Obeye *et al.*, 2007). Asupan *P. guineense* pada dosis 20 mg/kg BB, merupakan faktor resiko untuk gangguan fungsi hati pada tikus (Umoh *et al.*, 2013). Selain itu, dilaporkan bahwa *P. nigrum* memodulasi perubahan patologis dan enzimatis pada hati dan usus tikus (Nalini *et al.*, 1998). Menurut Ali *et al.* (2003) *P. nigrum* berperan pada peningkatan efek merugikan pada parameter hematologis tikus yang mendapat radiasi ion gamma.

Pigmentasi tak normal pada pasien yang mempunyai riwayat pemakaian uap air daun *P. betle* untuk membasuh muka juga telah dilaporkan. Berdasar hasil uji klinik dan temuan histopatologiss, diduga kelainan pigmentasi tersebut mungkin disebabkan oleh induksi senyawa kimia dalam daun *P. betle* seperti fenol, alkohol, katekol, dan derivat bensen, kemungkinan melalui penghambatan sintesis melanin atau melanositotoksitas (Liao *et al.*, 1999).

Ekstrak etanol maupun ekstrak n-heksana daun *P. crocatum* pada dosis 300 mg/kgBB tidak menyebabkan kerusakan pada ginjal maupun hati tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010). Pada studi sebelumnya juga dilaporkan bahwa ekstrak etanol daun *P. crocatum* menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal berupa kongesti, degenerasi, dan nekrosis, meskipun mampu menghambat kematian ayam akibat infeksi virus *Avian influenza* H5N1 (Nugraha, 2010).

Studi sitotoksik neolignan menunjukkan bahwa paling tidak satu gugus OH bebas sangat penting untuk menginduksi terjadinya sitotoksitas (Kong *et al.*, 2005). Licarin A, neolignan yang memiliki gugus OH pada atom C<sub>4</sub>' dilaporkan memiliki aktivitas supresan produksi IL-10, namun demikian tidak toksik pada organ hati dan ginjal (Leon-Diaz *et al.*, 2013).

#### **D. Sirih merah (*Piper crocatum*, Ruiz & Pav.)**

Tumbuhan sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) termasuk dalam famili *Piperaceae*. Klasifikasi sirih merah menurut Judd *et al.* (2002) adalah sebagai berikut:

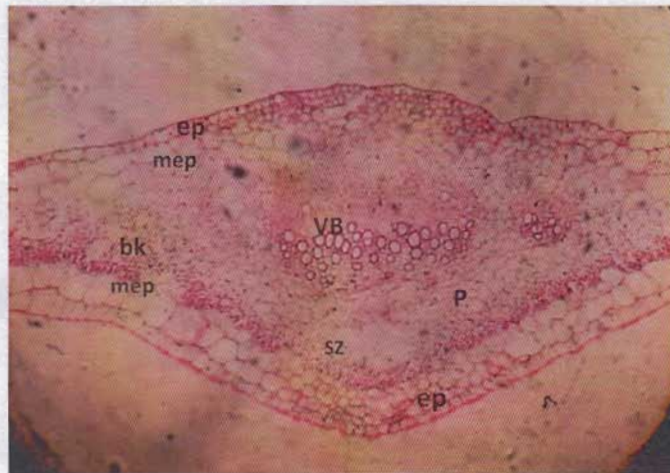
<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Divisio</i>	: <i>Magnolophyta Magnoliophytina</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliatae Magnollidae Magnolianae</i>
<i>Order</i>	: <i>Piperales</i>
<i>Family</i>	: <i>Piperaceae C Agardh</i>
<i>Genus</i>	: <i>Piper</i>
<i>Species</i>	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav





Gambar 2. Sirih merah (*Piper crocatum*, Ruiz & Pav.)(foto : dokumen pribadi)

Sel-sel epidermis pada daun tersusun atas selapis sel dan memiliki lapisan kutikula yang tipis, setelah epidermis terdapat multiple epidermis, tidak dijumpai adanya lapisan sub epidermis akan tetapi teramati adanya organ-organ modifikasi dari epidermis yaitu stomata dan trikoma. Terdapat saluran yang dihasilkan dari robekkan-robekkan sel, menurut Lakshmi and Naidu (2010), saluran tersebut berfungsi sebagai saluran minyak. Di bagian permukaan bawah daun terdapat trikoma tipe glanduler, menurut Souza *et al.* (2004) trikoma glanduler merupakan trikoma sekretori, di sebelah dalam multiple epidermis terdapat jaringan mesofil yang terdiferensiasi menjadi palisade dan bunga karang. Jaringan palisade tersusun atas sel-sel silindris, yang didalamnya terdapat banyak kloroplas dan terdapat pula sel-sel sekresi.



Gambar 3. Penampang lintang daun *Piper crocatum*. Ep: epidermis, mep: multiple epidermis, p: parenkim, bk: bunga karang, VB: vascular bundle (jaringan pengangkut), sz: schizogenous oil cavity (Sutikno dkk., 2011)

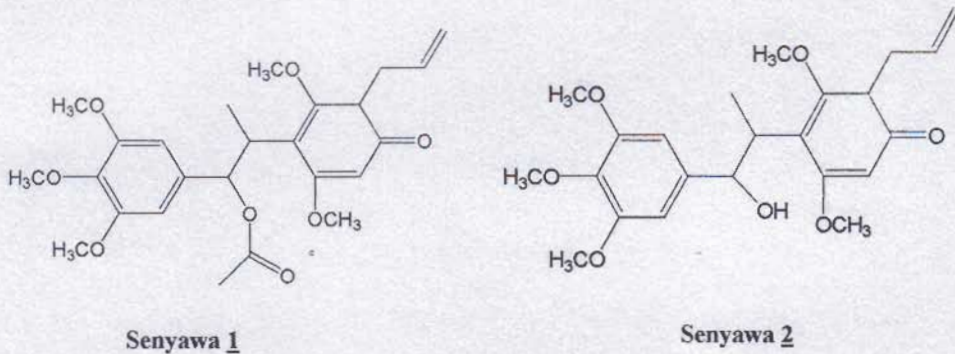
Berdasarkan keberadaan palisadenya, daun *P. crocatum* bertipe bilateral. Jaringan bunga karang tersusun atas sel-sel poligonal dengan ruang-ruang antar sel yang berisi sel sekresi (Sutikno dkk., 2011).

Metabolit sekunder pada tanaman disimpan dalam jaringan sekretori. Jaringan sekretori dikelompokkan berdasar proses metabolisme dan tempat penimbunan substansi hasil metabolisme. Berdasar proses metabolisme jaringan sekretori berupa jaringan rekretori, sekretori, dan eksretori, contohnya hidatoda, kelenjar garam, dan kapur. Berdasar tempat penimbunan substansi hasil metabolisme, jaringan sekretori terdiri dari jaringan yang menghasilkan substansi yang sedikit atau belum mengalami modifikasi, misalnya hidatoda, kelenjar garam dan nektar, yang kedua jaringan sekretori tempat dihasilkannya senyawa hasil biosintesis baik substansi hidrofilik maupun lipofilik contohnya idioblas mucilago, sel-sel mirosin, trikoma glanduler, dan latisifer (Fahn, 1979). Nugroho dkk. (2008) melaporkan bahwa ada korelasi positif antara kandungan nikotin dan ukuran trikoma glanduler daun tembakau.

Daun sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid, polifenolat, tanin dan minyak atsiri (Safitri and Fahma, 2008). Hasil analisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometri* (GC-MS) terhadap minyak atsiri, menunjukkan adanya 39 senyawa, diantaranya kavikol, eugenol, tran-karyopilen, eugenol asetat dan beta-selinen (Sulistiyani dkk., 2007). Suratmo (2008) melaporkan bahwa ekstrak etanol DPc memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 33,44 ppm dan sitotoksik terhadap sel *HeLa* dengan waktu inkubasi 24 jam diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 1197,43 ppm. Ekstrak metanol memiliki efek sitotoksik pada sel kanker payudara (T47D) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 44,25 ppm kemungkinan melalui jalur *p44/p42-dependent* (Wicaksono *et al.*, 2009). Penelitian terkait DPc juga dilakukan oleh Alfarabi dkk. (2010), Erviana (2011), dan Rachmawaty dkk. (2013).

Penelitian tentang aktivitas anti inflamasi ekstrak metanol DPc dilaporkan oleh Fitriyani dkk. (2011). Uji efek ekstrak n-heksana DPc pada dosis 10 mg/kgBB terhadap peningkatan titer IgG pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan adanya efek immunosupresan, sedangkan pada dosis 100 mg/kg BB menunjukkan efek immunostimulan (Wahyudi, 2010). Ekstrak etanol DPc pada dosis 10, 100, dan 300 mg/kgBB tidak mempunyai efek imunomodulasi terhadap titer IgG tikus (Wiweko, 2010). Pada dosis 300 mg/kgBB, ekstrak n-heksana maupun ekstrak etanol tidak menyebabkan kerusakan pada ginjal maupun hati (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010). Uji aktivitas proliferasi limfosit dan fagositosis makrofag pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol DPc menaikkan indeks fagositosis tetapi tidak mempengaruhi proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011). Secara *in vitro* dilaporkan bahwa fraksi dari

ekstrak DPc memiliki aktivitas fagositosis makrofag, dan fraksi tak larut n-heksana ekstrak etanol DPc menurunkan proliferasi limfosit (Tirta, 2010; Kurniawan, 2011; Yuristiyani, 2012; Ardianto, 2013). Uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari isolat **1** (senyawa 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3, 5-dienone) dan isolat **2** (senyawa 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone) yang diisolasi dari fraksi tidak larut kloroform ekstrak etanol DPc menunjukkan bahwa pada dosis 5 µg/ml aktivitas fagositosis makrofag kedua isolat tersebut sebanding dengan Imboost<sup>®</sup> (Kustiawan, 2012) (Gambar 4).



**Gambar 4.** Struktur kimia senyawa neolignan hasil isolasi dari daun *Piper crocatum* (Kustiawan, 2012)

### E. Neolignan

Neolignan terbentuk dari penggabungan 2 fenilpropan ( $C_6-C_3$ ) melalui ikatan tak simetris rantai samping alifatiknya, merupakan metabolit sekunder yang memegang peranan penting pada mekanisme pertahanan hidup tanaman, sebagai senyawa antimikroba, antifungi, dan antifeedant (Robbers *et al.*, 1996). Neolignan merupakan senyawa yang terbentuk dari kondensasi unit-unit fenilpropan, dimana

variasi ikatan hanya pada satu karbon  $\beta$ , misalnya 8-3', 8-1', 3-3', 8-O-4'. Diantara neolignan, banyak kemungkinan kopling menghasilkan lebih besar variasi struktur (Bruneton, 1999). 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). Beberapa tanaman yang diuji aktivitas imunomodulatornya diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol yakni dari *Piper betle* (Kanjwani *et al.*, 2008), *Piper longum* (Sunila and Kuttan, 2004), dan dari tanaman lainnya (Schepetkin *et al.*, 2005; Tripathy and Pradhan, 2013; Jayathirtha and Misrha, 2004; Satpute *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2010; Roshan and Savitri, 2013).

Neolignan 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).

## F. Sistem Imun

Tubuh manusia terus menerus dikelilingi oleh mikroba patogen, meskipun demikian pada tubuh yang imunokompeten, hanya sebagian kecil dari patogen tersebut yang benar-benar masuk ke dalam sirkulasi darah dan menyebabkan gejala klinis. Hal ini disebabkan oleh berbagai mekanisme pertahanan, yang bila berfungsi normal akan memungkinkan tubuh melawan terjadinya infeksi mikroba patogen. Sumsum tulang, kelenjar timus, limpa, dan kelenjar limfe adalah organ-organ yang dibutuhkan agar tugas sistem imun tubuh dapat berfungsi secara normal (Shen and Louie, 2005).

Sistem imun adalah kumpulan dari sel-sel, jaringan-jaringan, dan molekul-molekul yang menjadi perantara ketahanan tubuh terhadap infeksi. Reaksi koordinasi dari sel-sel, jaringan-jaringan, dan molekul-molekul terhadap infeksi mikroba disebut respon imun. Fungsi fisiologis dari sistem imun adalah untuk mencegah infeksi dan menyembuhkannya apabila telah terjadi infeksi. Sistem imun terdiri dari imunitas

bawaan (*innate/natural/native immunity*) dan imunitas didapat (*adaptive/specific/acquired immunity*) (Abbas and Lichtman, 2011; Male *et al.*, 2006).

#### 1. Sistem imun bawaan (non spesifik)

Komponen utama sistem imun bawaan adalah pertahanan fisik dan kimiawi seperti epitelial dan substansi antimikroba yang diproduksi pada permukaan epitel, berbagai jenis protein dalam darah termasuk di antaranya komponen-komponen sistem komplemen, mediator inflamasi lainnya dan berbagai sitokin, sel-sel fagosit yaitu sel-sel polimorfonuklear dan makrofag serta sel *natural killer* (NK). Imunitas bawaan merupakan perlindungan awal terhadap infeksi, dimiliki manusia sejak lahir. Imunitas bawaan bertugas menghalangi masuknya patogen dan apabila patogen tersebut berhasil memasuki jaringan tubuh, akan memusnahkannya dengan cepat. Lapisan epitelial, sel-sel spesifik, dan antibiotik alami pada epitelia merupakan lini pertama pertahanan tubuh terhadap infeksi, berfungsi menghalangi masuknya patogen. Jika mikroba dapat menembus epitelia dan memasuki jaringan atau sirkulasi, patogen ini akan diserang oleh fagosit-fagosit khususnya limfosit yang disebut *natural killer* (NK), dan beberapa protein plasma termasuk protein sistem komplemen (Roitt, 1997; Abbas and Lichtman, 2011).

#### 2. Sistem imun adaptif (spesifik)

Sistem imun adaptif atau sistem imun didapat, mempunyai kemampuan mengenal benda yang dianggap asing sehingga sistem ini hanya menyingkirkan zat asing yang telah dikenal sebelumnya secara spesifik. Komponen dari sistem imun adaptif yakni limfosit-limfosit beserta produknya misalnya antibodi. Limfosit mengekspresikan reseptor yang secara spesifik mengenali antigen yakni komponen

maupun produk mikroba. Respon imun adaptif, dapat dipicu ketika mikroba atau antigen menembus jaringan epitelial dan diantarkan ke organ limfoid dimana kemudian dapat dikenali oleh limfosit-limfosit. Dua tipe imunitas adaptif yakni imunitas seluler dan imunitas humoral diperantarai oleh sel-sel dan molekul-molekul yang berbeda, akan melawan patogen ekstraseluler dan intraseluler. Limfosit merupakan sel yang secara spesifik mengenali dan merespon antigen asing sehingga menjadi mediator imunitas humoral maupun seluler (Abbas *et al.*, 2007).

a. Respon imun humoral

Limfosit B adalah satu-satunya sel yang mampu memproduksi antibodi, mengenali antigen ekstraseluler dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi, berfungsi sebagai perantara imunitas humoral. Fungsi terpenting antibodi adalah mencegah mikroba yang ada di permukaan mukosal dan dalam darah, agar tidak masuk dan berkolonisasi dalam sel inang dan jaringan-jaringannya, sehingga antibodi ini mencegah terjadinya infeksi tetap (Abbas *et al.*, 2007; Abbas and Lichtman, 2011).

b. Respon imun seluler

Limfosit T, merupakan sel yang memerantarai imunitas seluler, mengenali antigen dari mikroba intraseluler dan berfungsi menghancurkan mikroba tersebut maupun sel yang terinfeksi. Sel T tidak memproduksi antibodi. Limfosit T terdiri dari populasi yang jelas fungsinya yakni sel T *helper* (Th) dan sel T sitotoksik/*cytolytic T lymphocytes* (CTLs). Pada respon terhadap stimulasi antigen, sel Th mensekresi protein yang disebut sitokin. Sitokin tersebut

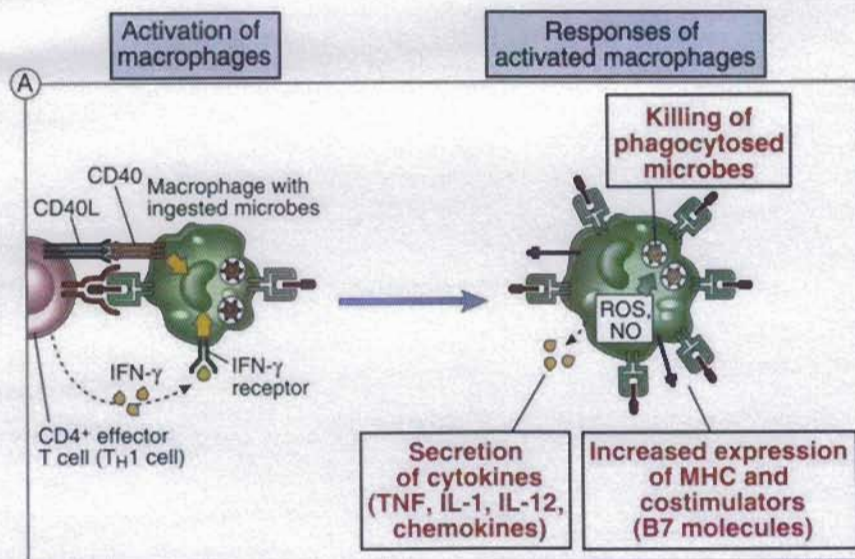


berfungsi menstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel T sendiri, dan mengaktifkan sel-sel lain, termasuk sel B, makrofag, dan leukosit lainnya. Sel CTLs membunuh sel-sel yang memproduksi antigen asing, seperti sel-sel yang terinfeksi virus dan mikroba intraseluler lainnya (Abbas *et al.*, 2007). Sel T helper dikelompokkan dalam subset Th1 dan Th2 berdasar sitokin yang diproduksinya. Paradigma Th1/Th2 menggambarkan kondisi keseimbangan keduanya (Mosmann and Coffman, 1989). Penemuan subset sel T yang lain menunjukkan bahwa sel T CD4<sup>+</sup> naïve dapat berkembang menjadi sel Th1, Th2, Treg, dan T17. Paradigma Th1/Th2 belum dapat menjelaskan tentang mekanisme yang terjadi dalam berbagai proses imunologik, hingga dikemukakannya sel T regulator (Treg) dan sel Th17 (Nakayamada *et al.*, 2012).

### 3. Makrofag

Makrofag mempunyai peran penting dalam respon imun. Fungsi utama makrofag dalam imunitas bawaan adalah mem-fagositosis partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati. Fagositosis merupakan proses yang dimulai dari terjadinya kontak partikel asing dengan reseptor permukaan sel diikuti dengan pemanjangan membran plasma yang mengelilingi partikel asing, yang disebut fagosom. Fagosom bergabung dengan lisosom membentuk fagolisosom. Pada saat yang sama dengan mikroba sedang terikat oleh reseptor fagosit dan dicerna tersebut, reseptor memberikan sinyal yang mengaktifkan beberapa enzim dalam fagolisosom. Salah satu enzim tersebut, disebut *reactive oxygen species* (ROS), toksik teradap mikroba yang ditelan (*ingest*). Enzim kedua disebut *inducible nitric*

*oxide synthase* (iNOS), mengkatalisis perubahan arginin menjadi nitrit oksid (NO), yang merupakan pembunuh mikroba. Makrofag memproduksi sitokin yang merekrut dan mengaktifkan leukosit. Makrofag juga mensekresi *growth factor* dan enzim yang berfungsi memperbaiki jaringan rusak dan menggantinya dengan jaringan terkait. Selain itu, makrofag menstimulasi limfosit T dan mempertinggi imunitas adaptif serta merespon produk dari sel-sel T dan berfungsi sebagai efektor dari imunitas yang diperantarai sel (Abbas and Lichtman, 2011).



Gambar 5. Aktivasi dan fungsi makrofag dalam imunitas yang diperantarai sel (Abbas *et al.*, 2007)

Terkait dengan peran makrofag sebagai penyaji antigen (APC), makrofagpun mengekspresikan MHC kelas II pada permukaannya. Makrofag bersama-sama dengan MHC kelas II menyajikan antigen kepada sel T, ekspresi MHC II meningkat bila makrofag diaktivasi (Abbas and Lichtman, 2011).

Nitrit oksid berperan penting dalam fisiologi dan patologi sistem kekebalan tubuh. Tingkat jumlah NO yang sesuai yang berasal dari iNOS membantu dalam

pertahanan yang efektif terhadap serangan mikroba. Sebaliknya, ketidakmampuan untuk menghasilkan NO berpengaruh pada kerentanan terhadap infeksi (Karpuzoglu and Ahmed, 2006). Nitrit oksid (NO) merupakan faktor sitotoksik esensial dalam membunuh agen patogen dan tumorisidal (Coleman, 2001; Hajri *et al.*, 1998). Pengukuran tingkat nitrit oksid yang baik dan banyak digunakan yakni dengan reagen Griess (Sherman *et al.*, 1993).

#### 4. Sel Dendritik

Sel dendritik berperan penting pada imunitas bawaan terhadap mikroba dan penangkapan antigen serta induksi respon limfosit T terhadap protein antigen (Abbas *et al.*, 2007). Sel dendritik berdiferensiasi dengan cepat ketika menghadapi berbagai rangsangan termasuk mikroba maupun limfosit. Rangsangan tersebut memicu respon bawaan yang terdiri dari sejumlah sitokin dan kemokin. Belum diketahui dengan pasti bagaimana sel dendritik bereaksi dengan cepat dan bagaimana respon bawaan dapat berubah menjadi respon adaptif yang lebih panjang (Steinman, 2007). Sel dendritik merupakan *antigen presenting cells* (APCs) paling efektif untuk inisiasi respon sel T. Hal tersebut disebabkan sel dendritik menempati lokasi yang strategis pada tempat yang biasanya merupakan pintu masuk mikroba dan antigen asing juga pada jaringan yang mungkin merupakan tempat kolonisasi mikroba; sel tersebut mengekspresi reseptor yang memungkinkannya menangkap mikroba dan meresponnya; sel tersebut bermigrasi terutama menuju daerah sel T dari limfa nodi, melalui sirkulasi sel T *naïve*, memburu antigen asing; selain itu sel dendritik *mature* mengekspresi kostimulator kadar tinggi yang diperlukan untuk mengaktivasi limfosit T *naïve* (Abbas *et al.*,

2007). Limfosit B dan T merupakan mediator imunitas, tetapi fungsinya di bawah pengendalian sel dendritik. Sel dendritik di perifer menangkap dan memproses antigen-antigen, mengekspresi molekul ko-stimulator limfosit, bermigrasi ke organ limfoid dan mensekresi sitokin untuk menginisiasi respon imun. Sel tersebut bukan hanya mengaktifkan limfosit tetapi juga mentoleransi sel T terhadap antigen-antigen yang merupakan *self-antigens*, sehingga meminimalkan reaksi autoimun (Banchereau and Steinman, 1998).

## 5. Antibodi

Antibodi merupakan molekul glikoprotein yang terkandung dalam serum dan cairan tubuh lainnya, juga disebut immunoglobulin. Immunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. Molekul ini disintesis oleh sel B dalam 2 bentuk yang berbeda, yaitu sebagai reseptor permukaan (untuk mengikat antigen), dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler. Immunoglobulin terdiri atas molekul-molekul protein yang walaupun satu dengan yang lain memiliki banyak persamaan dalam hal struktur dan sifat biologik, berbeda dalam susunan asam amino yang membentuk molekul sesuai kelas dan fungsinya. Hingga sekarang dikenal 5 kelas utama immunoglobulin dalam serum manusia, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD, dan IgE. Bila antigen pertama kali masuk ke dalam tubuh, terjadilah respon imun primer yang ditandai dengan munculnya IgM beberapa hari setelah pemaparan. Saat antara pemaparan antigen dan munculnya IgM disebut *lag phase*. Bila pemaparan antigen terjadi kedua kali, terjadi respon imun sekunder yang sering disebut juga respon anamnestic atau

*booster*. Baik IgM maupun IgG kadarnya cepat meningkat secara nyata dengan *lag phase* yang pendek. Puncak kadar IgM pada respon sekunder ini umumnya tidak melebihi puncaknya pada respon primer, sebaliknya kadar IgG meningkat jauh lebih tinggi dan berlangsung lebih lama. Perbedaan dalam respon tersebut disebabkan adanya sel B dan sel T *memory* akibat pemaparan yang pertama (Abbas *et al.*, 2007, Male *et al.*, 2006).

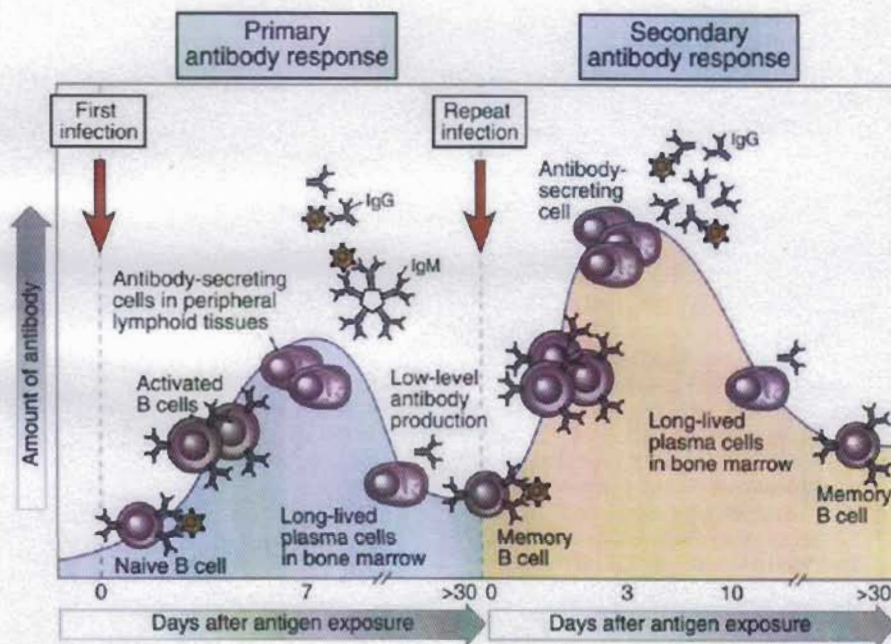
Imunoglobulin G merupakan imunoglobulin utama yang dibentuk atas rangsangan antigen. Diantara semua kelas imunoglobulin, IgG paling mudah berdifusi ke dalam jaringan ekstrasvaskuler dan melakukan aktivitas antibodi di jaringan. IgG yang pada umumnya melapisi mikroorganisme sehingga partikel tersebut lebih mudah difagositosis, disamping itu IgG juga mampu menetralkan toksin dan virus (Abbas *et al.*, 2007). Imunoglobulin terbentuk berdasarkan respon yakni respon antibodi primer dan sekunder.

#### a. Respon primer

Bila suatu individu bertemu dengan antigen untuk pertama kalinya, antibodi terhadap antigen tersebut dapat dideteksi dalam serum selama beberapa hari atau minggu, bergantung pada sifat dan dosis antigen serta cara pemberiannya. Kadar antibodi dalam serum terus naik selama beberapa minggu dan kemudian menurun. Antibodi yang pertama terbentuk yakni IgM, lalu IgG, dan IgA atau keduanya, kadar IgM cenderung lebih cepat menurun dari pada IgG (Abbas *et al.*, 2007).

b. Respon sekunder

Bila suatu individu bertemu dengan antigen yang sama atau yang berhubungan erat dan bereaksi silang untuk kedua kalinya dalam beberapa bulan atau tahun setelah respon primer, respon antibodi lebih cepat dan meningkat ke tingkat yang lebih tinggi dibanding selama respon primer. Perubahan dalam respon ini disebabkan oleh kemampuan bertahan dari sel memori yang peka terhadap antigen setelah respon imun primer. Jumlah IgM yang diproduksi sama dengan jumlah setelah kontak pertama dengan antigen, tetapi IgG yang hasilnya jauh lebih banyak dan cenderung bertahan lama dibanding pada respon primer.



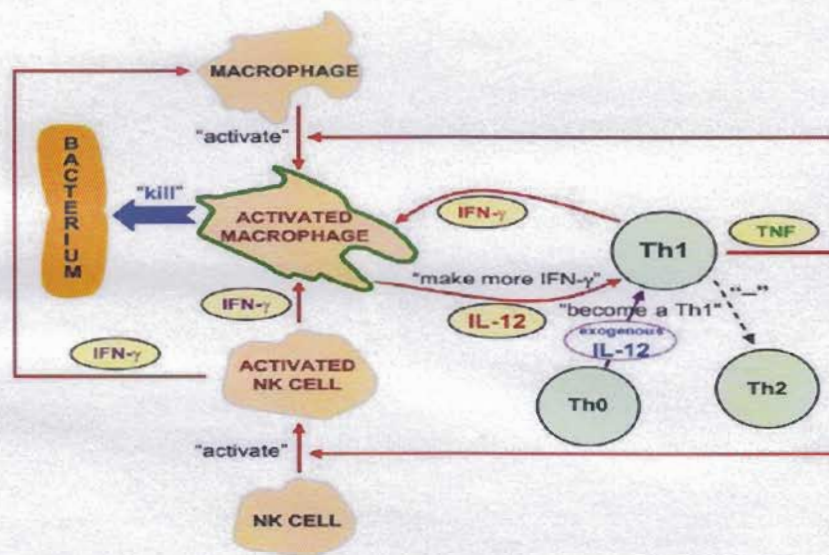
Gambar 6. Respon imun humoral primer dan sekunder (Abbas *et al.*, 2007).

Fase lag dari respon imun primer, yang ditandai dengan munculnya IgM, biasanya muncul pada 5-10 hari setelah masuknya antigen, sedangkan IgG mencapai puncaknya pada hari ke-10 sampai ke-14. Ketika terjadi pengulangan masuknya antigen, lag fase muncul biasanya pada hari ke-1 sampai ke-3 setelah

infeksi ulangan, kadar IgG meningkat jauh lebih tinggi dan berlangsung lebih lama (Abbas *et al.*, 2007; Male *et al.*, 2006).

## 6. Sitokin

Sitokin adalah protein yang disekresi oleh sel-sel imunitas bawaan dan adaptif yang memperantarai dan mengatur fungsi dari sel-sel tersebut. Banyak sitokin yang telah diidentifikasi, baik struktur maupun fungsinya, beberapa diantaranya merupakan mediator utama yang meningkatkan reaksi imunologik yang melibatkan makrofag, sel dendritik, limfosit dan sel-sel lain, jadi berfungsi sebagai imunoregulator spesifik maupun non spesifik.



Gambar 7. Jalur sinyal IL-12 ( Hamza *et al.*, 2010)

Interleukin 12 (IL-12) merupakan sitokin pro-inflamasi diproduksi oleh makrofag, merupakan penginduksi yang poten sel T dan sel NK untuk produksi IFN- $\gamma$  dan IL-12, sebagai faktor diferensiasi sel T dan meningkatkan spesialisasi sel T tersebut dalam memproduksi IFN- $\gamma$ , menghasilkan sel seperti sel T yang membantu respon imun sel fagosit, serta meningkatkan fungsi sitolitik sel NK dan

sel T CD8<sup>+</sup> teraktivasi (Gambar 7) (Abbas *et al.*, 2007; Hamza *et al.*, 2010). Interleukin 12 digolongkan dalam mediator respon imun bawaan karena ia menghubungkan aktivasi makrofag atas rangsangan mikroba dengan perkembangan fungsi sel efektor dan sel NK. Pada saat yang sama, IL-12 merupakan mediator yang penting antara imunitas bawaan dan imunitas spesifik adaptif, dan meningkatkan respon imun spesifik yang mampu melindungi individu terhadap produk bakteri dan virus (Abbas *et al.*, 2007; Male *et al.*, 1996). Jalur aktivasi IL-12 dapat dilihat pada Gambar 7.

Interleukin 10 (IL-10) merupakan sitokin anti-inflamasi produk dari subpopulasi limfosit yakni Th2, dua fungsi utamanya yakni menghambat produksi beberapa jenis sitokin (TNF, IL-1, *chemokine*, IL-12), dan menghambat fungsi makrofag dan sel dendritik dalam membantu aktivasi sel T, sehingga bersifat immunosupresi. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag, dan mengurangi ekspresi ko-stimulator. Interleukin 10 akan menghambat reaksi inflamasi non-spesifik maupun spesifik yang diperantarai sel T (Male *et al.*, 1996).

### **G. Imunitas terhadap bakteri intraseluler**

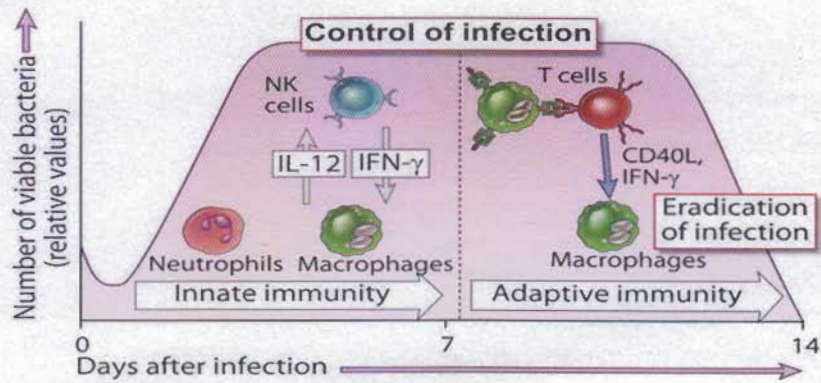
Komponen respon imun terhadap bakteri ekstraseluler dan bakteri intraseluler sering bereaksi dengan cara yang berbeda. *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler fakultatif, yang salah satu cirinya mampu hidup dan bahkan berkembang biak dalam fagosit. Bakteri tersebut dapat bersembunyi sehingga tidak dapat dijangkau oleh antibodi dalam sirkulasi, maka untuk menyingkirkannya diperlukan



mekanisme respon imun yang diperantarai sel (Abbas *et al.*, 2007). Peran penting sistem imun bawaan pada awal pengontrolan infeksi *L. monocytogenes* yang memiliki banyak aspek yakni pengenalan adanya patogen, pertahanan terhadap mikroorganisme, dan perintah agar terjadi respon imun adaptif (Delbridge and O’Riordan, 2007). Sistem imun adaptif spesifik terhadap *L. monocytogenes* melanjutkan respon dari sistem imun bawaan (Medzhitov, 2001). Gambar 8 memperlihatkan pengendalian infeksi pada imunitas bawaan dan imunitas adaptif karena infeksi bakteri intraseluler. Sistem imun bawaan maupun adaptif sangat krusial untuk mengenali dan mengeliminasi patogen tersebut dari inang (Zenewicz and Shen, 2007; Abbas *et al.*, 2007).

*Listeria monocytogenes* telah banyak digunakan sebagai model untuk mempelajari imunitas bawaan dan adaptif (Mackaness, 1962; Godfrey *et al.*, 1983; Zenewicz and Shen, 2007). *Listeria monocytogenes* merupakan mikroorganisme intraseluler fakultatif, akan menginduksi respon imun bawaan dan adaptif. Pada inang mamalia, *L. monocytogenes* akan segera ditangkap oleh fagosit seperti makrofag dan sel dendritik (Lecuit *et al.*, 1997). Respon imun bawaan terhadap bakteri intraseluler dilaksanakan oleh fagosit dan sel-sel NK, interaksi antara sel-sel tersebut diperantarai oleh sitokin (IL-12 dan IFN- $\gamma$ ), sedangkan respon imun adaptif terhadap bakteri tersebut merupakan imunitas yang diperantarai sel, dimana sel T mengaktivasi fagosit untuk mengeliminasi bakteri (Abbas *et al.*, 2007; Unanue, 1997). Dalam penelitian ini respon imun hewan uji diinduksi dengan *L. monocytogenes*, pengukuran respon imun dilakukan pada respon imun seluler dan respon imun humoralnya. Miettinen *et al.*, (1990) mempelajari respon antibodi terhadap *L. monocytogenes* dengan hewan uji

kambing. Walaupun binatang uji lain seperti *guinea pigs* kadang digunakan untuk mempelajari respon imun terhadap *L. monocytogenes*, mencit terbukti paling bermanfaat sebagai model untuk studi imunologikal (Zenewicz and Shen, 2007).



Gambar 8. Imunitas bawaan dan adaptif terhadap bakteri intraseluler (Unanue, 1997)

Bakteri intraseluler mengaktifkan sel NK dengan cara menginduksi ekspresi ligan pengaktif sel NK pada permukaan sel terinfeksi, atau stimulasi sel dendritik dan produksi IL-12 oleh makrofag yang merupakan sitokin pengaktif makrofag yang kuat. Sel NK memproduksi IFN-γ yang pada gilirannya mengaktifkan makrofag dan meningkatkan kemampuan makrofag untuk membunuh bakteri yang ditelannya (Abbas *et al.*, 2007).

Reaksi yang terjadi untuk melawan bakteri intraseluler yakni reaksi pembunuhan bakteri intraseluler yang difagositosis oleh makrofag teraktivasi dan reaksi lisis sel yang terinfeksi oleh sel T CD8<sup>+</sup>. Protein bakteri intraseluler dapat merangsang sel T CD4<sup>+</sup> (melalui kompleks antigen-MHC kelas II) maupun CD8<sup>+</sup> (melalui kompleks antigen-MHC kelas I). Bakteri intraseluler menginduksi perkembangan sel T menjadi fenotip sel Th1, karena bakteri ini merangsang produksi IL-12 oleh makrofag dan produksi IFN-γ oleh sel NK; kedua jenis sitokin ini meningkatkan perkembangan sel Th1. Di lain pihak, sel Th1 juga memproduksi IFN-

$\gamma$  yang mengaktifkan makrofag untuk memproduksi ROI dan enzim-enzim yang dapat membunuh bakteri. IFN- $\gamma$  juga merangsang produksi isotipe antibodi, misalnya IgG2, yang mengaktifkan komplement dan melapisi (opsonisasi) bakteri, dengan demikian meningkatkan fungsi makrofag. Selain itu, Th1 memproduksi limfotoksin dan TNF yang menginduksi inflamasi lokal. Apabila bakteri intraseluler tetap hidup dalam sel dan melepaskan antigennya ke dalam sitoplasma, ia merangsang sel Tc (CD8<sup>+</sup>).

## H. Imunomodulator Berasal dari Tanaman

Imunomodulator juga dikenal sebagai *biological response modifiers* yakni substansi biologis maupun sintetik yang dapat merangsang/menstimulasi, menekan atau mengatur/memodulasi segala aspek dari sistem imun adaptif maupun bawaan. Imunomodulator yang menekan respon imun disebut immunosupresan, sedangkan yang meningkatkan resistensi tubuh terhadap infeksi disebut immunostimulan (Robbers *et al.*, 1991; Archana *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2012). Immunostimulator dapat digolongkan dalam 2 kategori yakni immunostimulator spesifik dan non spesifik. Immunostimulan spesifik adalah senyawa yang memberikan atau mempunyai spesifisitas antigenik dalam respon imun, misalnya vaksin atau antigen lain. Immunostimulan non spesifik adalah senyawa yang berkelakuan secara tidak spesifik atau tidak bersifat antigenik, tetapi dapat meningkatkan respon imun dari antigen lain atau menstimulasi komponen sistem imun tanpa spesifikasi antigenik. Vaksin merupakan substansi immunostimulan yang paling sering digunakan manusia. Vaksin digunakan untuk merangsang perlindungan respon imun terhadap antigen dari patogen yang spesifik. Adjuvan merupakan tipe immunostimulan lain, bersifat non

spesifik. Pemberian adjuvant bersama dengan vaksin membantu untuk menghasilkan respon perlindungan yang lebih kuat terhadap antigen dalam vaksin, memberikan tingkat perlindungan yang lebih baik terhadap patogen (Diasio and LoBuglio, 1996).

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Banyak penelitian tentang imunomodulator dari bahan alam dan tinjauan terhadap hasil-hasil penelitian tersebut. Sagrawat and Khan (2007) menyimpulkan bahwa penelitian secara eksperimental dan klinikal terhadap tanaman membuktikan adanya aktivitas imunomodulator, dari sekitar 250.000 tanaman tinggi, kurang dari 1% tanaman yang telah diskriming aktivitas farmakologisnya dan sangat sedikit yang telah diuji aktivitas imunomodulatornya. Aktivitas imunomodulator dari ekstrak tanaman, senyawa turunan, formula tanaman obat, dan imunomodulator yang telah dipatenkan telah ditinjau oleh Alamgir and Uddin (2010). Tanaman yang memiliki aktivitas imunomodulator pada umumnya memiliki aktivitas merangsang imunitas spesifik dan non spesifik. (Wagner and Proksh, 1985). Beberapa diantara tanaman tersebut merangsang imunitas humoral maupun seluler, sedang yang lainnya hanya mengaktifkan komponen seluler dari sistem imun, misalnya fungsi fagositosis tanpa berpengaruh pada imunitas humoral maupun seluler (Bafna and Misrha, 2004). Banyak tanaman yang bersifat imunostimulator dan hanya beberapa tanaman yang telah diskriming aktivitas imunostimulannya, sehingga tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis (Kumar *et al.*, 2011). Imunomodulasi menggunakan tanaman obat dapat menyediakan alternatif kemoterapi konvensional untuk berbagai penyakit khususnya ketika mekanisme pertahanan tubuh

penderita harus diaktifkan karena kondisi respon imunnya terganggu atau ketika digunakan imunosupresan secara selektif pada kondisi penyakit autoimun.

Tanaman obat dapat menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru yang mampu menjadi target reseptor yang spesifik. Beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan akan tetapi tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga tampaknya di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai. Tanaman yang akan diteliti dapat dipilih dari :

1. Tanaman yang namanya telah ada pada *textbooks* sistem pengobatan (misalnya China, India)
2. Seleksi alamiah berupa tanaman yang namanya ada dalam naskah kuno dan sampai sekarang masih digunakan
3. Tanaman yang faktanya digunakan sampai sekarang meskipun tidak disebut pada dokumentasi yang telah ada
4. Tanaman yang namanya diberikan oleh peneliti, misionaris, penulis, dan herbalis, dan
5. Tanaman yang telah diteliti secara eksperimental atau klinikal baik yang sudah maupun belum dipublikasikan (Mukherjee, 2002).

Aktivitas imunomodulator ekstrak metanol *P. betle* telah diuji secara *in vitro* dan *in vivo*. Secara *in vitro* *P. betle* menunjukkan supresi proliferasi limfosit, reseptor interferon (INF)- $\gamma$  dan produksi NO. Uji *in vivo* terhadap respon humoral dan seluler menunjukkan *P. betle* menekan proliferasi limfosit, menurunkan titer antibodi serta meningkatkan supresi inflamasi (Kanjwani *et al.*, 2008). Aktivitas imunomodulator

dari *P. longum* dan piperin mungkin disebabkan kombinasi aksi respon imun humoral dan respon imun yang diperantarai sel. Mekanisme aksi yang pasti memerlukan studi lebih lanjut (Sunila and Kuttan, 2004). Hidroksikavikol, senyawa yang diisolasi dari ekstrak air daun *P. betle*, dilaporkan memodulasi sistem imun dengan peningkatan sitokin anti-inflamasi (Th2) dan menghambat sitokin pro-inflamasi (Th1) (Pandey *et al.*, 2010).

### I. Keterangan Empiris

Secara *in vivo* ekstrak DPc meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag akan tetapi tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013). Uji titer IgG dari ekstrak n-heksana DPc pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan efek immunosupresan pada dosis 10 mg/kgBB, dan efek immunostimulan pada dosis 100 mg/kg BB (Wahyudi, 2010), sedangkan ekstrak etanol DPc tidak berpengaruh baik pada dosis 10, 100, dan 300 mg/kgBB (Wiweko, 2010). Isolasi senyawa yang bersifat immunomodulator dari DPc menghasilkan 2 neolignan (**1** dan **2**). Secara *in vitro*, kedua senyawa tersebut meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada dosis 5 µg/ml, dan kemampuan

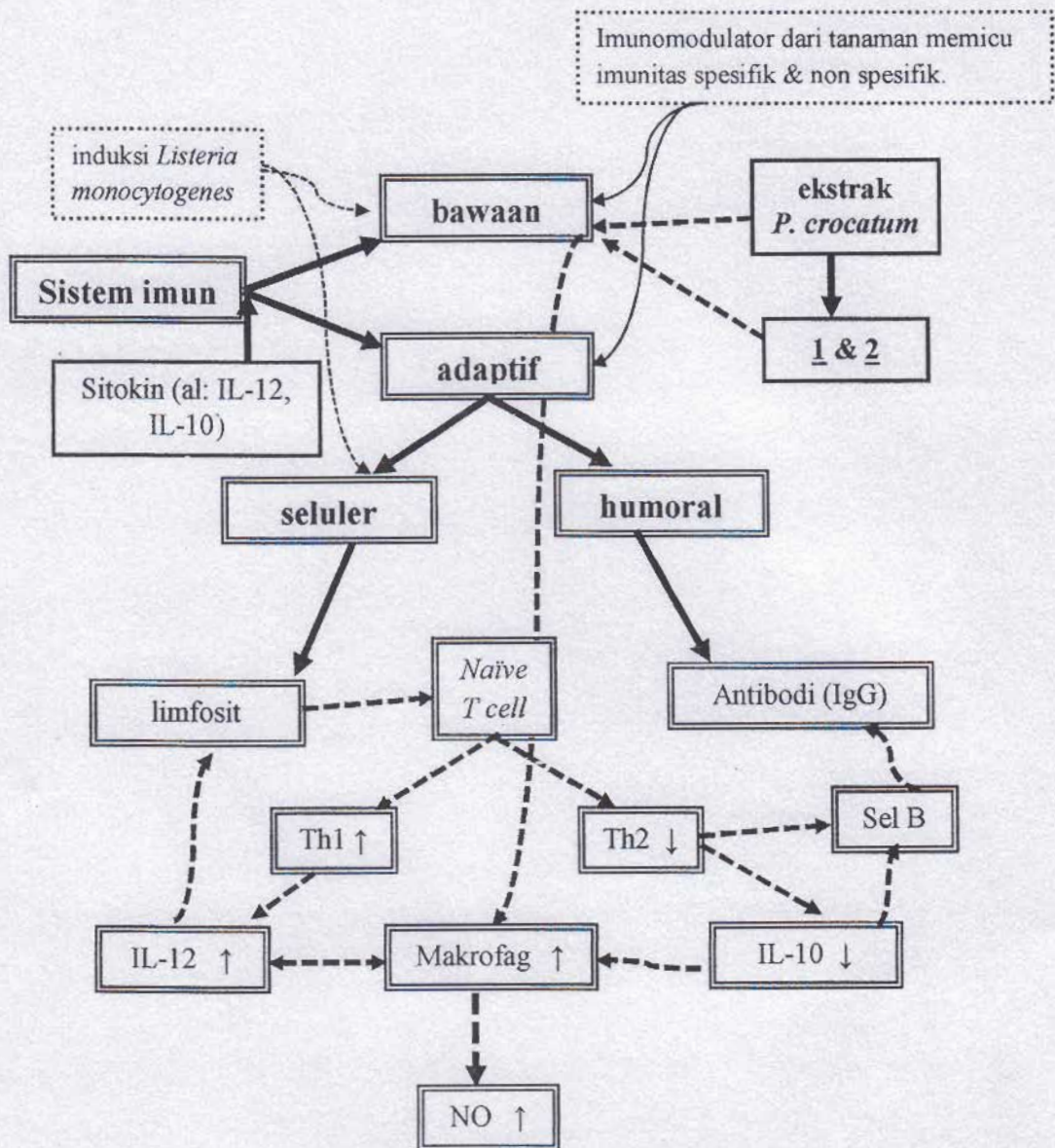
Berdasarkan pola produksi sitokinnya, IL-12 merupakan salah satu sitokin utama yang disekresi sel Th1, sedangkan IL-10 disekresi sel Th2 (Mosmann and Coffman, 1989). Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efekturnya setelah sel tersebut diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. Makrofag yang teraktivasi merupakan sumber utama produksi IL-12, sitokin immunoregulator kunci pada infeksi

bakteri dan virus, sebaliknya IL-10 menghentikan respon makrofag yang teraktivasi sehingga menghambat produksi IL-12 (Abbas *et al.*, 2007, Hamza *et al.*, 2010).

Uji secara *in vivo* 1 dan 2 terhadap aktivitas fagositosis makrofag maupun parameter respon imun yang lain belum pernah dilakukan. Hasil uji *in vitro* tidak selalu berhubungan dengan hasil uji *in vivo*, oleh karena itu perlu dilakukan konfirmasi dengan uji secara *in vivo* karena beberapa sel yang bekerjasama atau sistem-sistem mediator yang tidak ada pada uji *in vitro* justru yang bertanggung jawab pada efek tertentu yang diukur pada uji *in vivo* (Wagner, 1999). Hal tersebut juga dinyatakan oleh Kanjwani *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa obat-obatan maupun ekstrak yang secara *in vitro* menunjukkan aktivitas, dapat menunjukkan non aktif ketika diuji secara *in vivo*.

Karena merupakan organ untuk metabolisme dan ekskresi obat, maka pada uji toksisitas, pemeriksaan hati dan ginjal seharusnya dilakukan (*World Health Organization*, 2007). Ekstrak etanol daun *P. crocatum* menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal berupa kongesti, degenerasi, dan nekrosis (Nugraha, 2010). Pemeriksaan histopatologis organ hati dan ginjal tikus yang diinduksi dengan virus hepatitis B dan mendapat asupan 300 mg/kgBB ekstrak DPc menunjukkan bahwa perlakuan dengan ekstrak DPc tidak menyebabkan kerusakan pada ginjal maupun hati (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010). Studi sitotoksik neolignan menunjukkan bahwa paling tidak satu gugus OH bebas sangat penting untuk menginduksi terjadinya sitotoksitas (Kong *et al.*, 2005).

Kerangka konsep berpikir pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Kerangka konsep berpikir





## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Bahan

Bahan penelitian berupa ekstrak metanol DPc. Tanaman sirih merah diambil di daerah Tawangmangu, Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Mei 2010. Determinasi tanaman dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. 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. Uji aktivitas fagositosis makrofag dan uji proliferasi sel limfosit menggunakan bahan yakni kloroform, *Free Hank's Balanced Sal solution*, *Medium Roswell Park Memoriam Institute* (RPMI), etanol 70%, akuabides, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), akuades steril, Glutamin, Penisilin, Sterptomisin, *Fetal Bovine Serum* (FBS). Uji aktivitas fagositosis makrofag dengan perhitungan partikel lateks menggunakan sel makrofag yang dikultur, lateks beads diameter 3  $\mu\text{m}$ , metanol absolut, *coverslips* bulat, cat Giemsa 20%, sedangkan untuk uji proliferasi limfosit menggunakan limfosit yang dikultur, Tris Buffered Ammonium Chlorid, phytohaemagglutination, HCL-isopropanol 0,04 M, dan MTT. Penetapan kadar NO menggunakan senyawa standar nitrit, reagen merah netral, serta larutan Gries A dan Gries B. Bahan untuk pembuatan preparat histopatologis berupa formalin 10%, alkohol, xylol, parafin, dan cat hematoksilin-eosin. Penetapan kadar titer IgG, kadar IL-12, dan kadar IL-10 berturut-turut menggunakan Mouse IgG ELISA E-90G Lot # 14 (ICL), Mouse IL-12 Platinum ELISA (eBioscience), dan Mouse IL-10 Platinum ELISA (eBioscience).

Hewan uji berupa mencit BALB/c jantan berumur 8 minggu diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, bakteri *L. monocytogenes* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM. Kelaikan etik diproses dan mendapat persetujuan dari Komisi *Ethical Clearance* untuk Penelitian Praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM (Keterangan kelaikan etik No. 068/KEC-LPPT/VII/2012).

## **B. 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). Alat untuk uji fagositosis makrofag, uji proliferasi limfosit, dan uji NO yakni spuit injeksi 1 ml, 3 ml, dan 10 ml, sonde, pipa kapiler, tabung eppendorf, neraca elektronik (KERN ABT 220 SDM), alat sentrifus (SORVALL-LEGEND RT) inkubator CO<sub>2</sub> 5% 37°C, lempeng mikro (*microplate*) 24 sumuran (Nunc), lempeng mikro 96 sumuran (Nunc), *coverslip plastik bulat* (Thermanox) diameter 13 mm, alat sentrifugasi, *ultrasonic processor* (*Sonic Vibra Cell AK-01003*), *Laminar Air Flow Hood*, haemositometer, mikroskop (Olympus DP 20), optilab (Advance- High Quality Progressive CMOS Colour Image Sensor), *microplate reader* (Benchmark BIO-RAD). Pembuatan preparat histopatologis menggunakan mikrotom (Shandon MT 00223), alat pengecat (Shandon Varistain 24-4K), *slide warmer* (Sakura PS-M), gelas obyek, dan *tissue processor automatic* (Sakura Tissue TEK II Model 4634).

## C. Jalannya Penelitian

### 1. Ekstraksi dan fraksinasi ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

#### a. Pembuatan ekstrak metanolik daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Daun *P. crocatum* segar setelah dicuci di bawah air mengalir hingga bebas kotoran, kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50°C sampai kering (*kemrisik*, mudah diremukkan dengan tangan). Daun kering dibuat serbuk, ditimbang, didapatkan 1,9 kg serbuk yang kemudian dimasukkan ke dalam maserator. Ditambahkan 3,8 liter metanol ke dalam maserator sampai semua serbuk terendam, kemudian dibiarkan semalam disertai pengadukan. Maserat dipisahkan dan ditampung sedangkan ampas dimaserasi 2 kali lagi dengan pelarut yang sama masing-masing sebanyak 3,8 liter. Maserat dari 3 kali maserasi dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanolik DPc kental.

#### b. Fraksinasi ekstrak metanolik DPc.

Fraksinasi awal dilakukan secara partisi menggunakan pelarut metanol 60%. Sebanyak 10 ml metanol 60% ditambahkan pada 2 gram ekstrak, dicampur menggunakan *vortex mixer* kemudian disentrifus sehingga didapat fraksi larut metanol 60% (FTL) dan fraksi tak larut metanol 60% (FL). Ekstrak dan kedua fraksi diuji aktivitas imunomodulasi secara *in vitro* dengan uji aktivitas fagositosis makrofag menggunakan latex beads. Fraksi yang memiliki aktivitas imunomodulasi difraksinasi lebih lanjut dengan metode KCV (Coll and Bowden, 1986).

Sebanyak 10 gram silika gel 60 ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam cawan porselen berisi 2 gram FTL yang ditetesi eter sedikit demi sedikit sehingga diperoleh campuran yang homogen dan kering (*free flowing*). Pembuatan kolom dilakukan dengan memasukkan sebanyak 50 gram silika gel sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* sambil divakum untuk memperoleh massa fase diam yang kompak dan padat. Serbuk ekstrak *free flowing* dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* di atas fase diam dengan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum. Bagian atas ditutup dengan 2 lembar kertas saring sebesar diameter kolom. Fraksinasi dilakukan dengan menuang pelarut secara perlahan-lahan pada permukaan kertas saring sambil divakum. Pelarut yang digunakan berturut-turut 180 ml n-heksana, 120 ml n-heksana:etil asetat (9:1), 120 ml n-heksana:etil asetat (8:2), 70 ml n-heksana:etil asetat (7:3), 90 ml n-heksana:etil asetat (6:4), 60 ml n-heksana:etil asetat (5:5), 60 ml n-heksana:etil asetat (4:6), 90 ml n-heksana:etil asetat (3:7), 120 ml n-heksana:etil asetat (2:8), 120 ml n-heksana:etil asetat (1:9), dan 120 ml etil asetat. Hasil fraksinasi ditampung dalam cawan porselen, setelah kering fraksi-fraksi yang didapat ditimbang, kandungan senyawa didalamnya diperiksa dengan metode KLT.

## **2. Uji aktivitas fagositosis makrofag ekstrak dan fraksi secara *in vitro***

### **a. Isolasi dan kultur makrofag peritoneal**

Mencit sebanyak 8 ekor dikorbankan dengan narkose menggunakan kloroform. Seluruh tubuh mencit dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibawa ke dalam *laminary flow hood* dan diletakkan dalam posisi terlentang.

Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI 1640 dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal dikeluarkan/diaspirasi dari rongga peritoneum dengan menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Aspirat yang didapat disentrifus pada 1200 RPM 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet (mengandung FBS 10%) pada *pellet* yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200 $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel). Diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplet ditambahkan 1 ml/sumuran dan diinkubasi lagi selama dua jam. Sel dicuci dengan RPMI dua kali kemudian ditambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, kemudian inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

**b. Uji aktivitas fagositosis**

*Latex beads* diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml. Media diambil dengan cara menyedot media sehingga tinggal makrofag dalam *coverslips*. Pada tutup *plate* diberi identitas sesuai bahan uji yang akan dimasukkan dalam sumur yang bersangkutan. Pada sumur ditambahkan masing-masing 1 ml bahan uji dalam media RPMI komplet, yakni

ekstrak metanol *Piper crocatum* kadar 75 µg/ml dan 150 µg/ml, kontrol positif (Produk-X® 100 µg/ml), kontrol media, dan kontrol pelarut (DMSO 0,15%), secara *triplo* (3 *coverslip*) kemudian diinkubasi selama 4 jam. Setelah 4 jam, suspensi *latex beads* ditambahkan dalam PBS, dimana *latex beads* dengan diameter 0.3 µm sebanyak 400 µl dengan kepadatan *latex beads* dalam  $2,5 \times 10^7$  /ml, kemudian inkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 60 menit. Media diambil dengan cara disedot dan dicuci dengan PBS tiga kali untuk menghilangkan *latex beads* yang tidak terfagositosis, kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih (4-5 kali, akuades menjadi jernih) diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Makrofag yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan cara diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x, masing-masing pada 2 bidang pandang untuk setiap *coverslip* (Wijayanti, 1996; Wijayanti, 1999; Shancez *et al.*, 2008).

### 3. Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Isolat 1 dan 2, yang secara *in vitro* mampu meningkatkan fagositosis makrofag, dapat diisolasi dari ekstrak etanol DPc (Kustiawan, 2012). Monitoring secara KLT dengan standar berupa fraksi berisi 1 dan 2, menunjukkan kedua senyawa tersebut terdapat dalam ekstrak metanol DPc. Pengumpulan 1 dan 2 dalam jumlah yang cukup untuk dapat digunakan pada uji *in vivo*, dilakukan dengan modifikasi metode isolasi yang digunakan Kustiawan (2012). Modifikasi berupa

penggantian jenis dan jumlah pelarut pada kromatografi cair vakum. Kustiawan (2012) menggunakan gradient pelarut n-heksana : etil asetat yakni berturut-turut n-heksana (100%, 50 ml), n-heksana : etil asetat (10:1, 50 ml), n-heksana : etil asetat (10:2, 50 ml), n-heksana : etil asetat (10:3, 50 ml), n-heksana : etil asetat (10:5, 50 ml), dan etil asetat (100%, 50 ml). Penelitian ini berturut-turut menggunakan 50 ml n-heksana, 50 ml kloroform, 50 ml kloroform, 50 ml etil asetat, dan 100 ml metanol.

a. Fraksinasi ekstrak metanol

Sebanyak 10 gram silika gel 60 ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam cawan porselen berisi 2 gram ekstrak yang ditetesi eter sedikit demi sedikit sehingga diperoleh campuran yang homogen dan kering (*free flowing*). Pembuatan kolom dilakukan dengan memasukkan sebanyak 15 gram silika gel sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* sambil divakum untuk memperoleh massa fase diam yang kompak dan padat. Serbuk ekstrak *free flowing* dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* di atas fase diam dengan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum. Bagian atas ditutup dengan 2 lembar kertas saring sebesar diameter kolom. Fraksinasi dilakukan dengan menuang pelarut secara perlahan-lahan pada permukaan kertas saring sambil divakum. 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. Hasil fraksinasi ditampung dalam cawan porselen, setelah kering fraksi-fraksi yang didapat



ditimbang, kandungan senyawa didalam masing-masing fraksi diperiksa dengan metode KLT (Coll and Bowden, 1986).

b. Isolasi senyawa 1 dan 2

Kedua senyawa yang diisolasi adalah senyawa yang meredam UV 254 nm dengan warna biru ungu, 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), 1 mempunyai Rf 0,7 dan 2 mempunyai Rf 0,3. Kedua senyawa tersebut terdapat pada fraksi III dan IV hasil pemisahan secara KCV dari ekstrak metanolik DPc. Fraksi dari ekstrak metanolik DPc dilarutkan dalam kloroform:metanol (1:1) kemudian ditotolkan pada lempeng KLT-P (*preparative TLC plate*), lempeng dieluasi dalam bejana berisi fase gerak yakni kloroform : etil asetat (9:1) sampai fase geraknya mencapai 1 cm di bawah ujung lempeng KLT. Lempeng diangkat dari bejana, ditunggu kering kemudian dilihat di bawah UV 254 nm, bercak yang meredam ditandai dengan jarum, untuk kemudian dikerok. Hasil kerokan dikumpulkan, dilarutkan dengan kloroform:metanol (1:1) kemudian disaring, diuapkan, hingga didapat isolat berupa kristal. Deteksi kebenaran dan kemurnian isolat dilakukan dengan KLT dan ko-KLT menggunakan standar pembanding berisi 1 dan 2, hasil isolasi yang dilakukan Kustiawan (2012).

**4. Penelitian pendahuluan efek imunomodulator secara *in vivo***

a. Perlakuan pada mencit

Mencit BALB/c jantan berat sekitar 20-30 gram sebanyak 18 ekor diaklimatisasi selama seminggu kemudian dibagi menjadi 6 kelompok masing-

masing terdiri dari 3 mencit. Kelompok I, III, dan V diberi perlakuan dengan 1 ml CMCNa 1 %, kelompok II, IV, dan VI diberi perlakuan dengan 0,75 ml suspensi 2 dalam CMCNa 1 % dengan dosis 10 mg/kgBB, masing-masing diberikan setiap hari selama 14 hari secara per oral. Pada hari ke-15 (hari ke nol infeksi) semua mencit diambil darahnya sebanyak 0,75 ml dari *plexus infra orbitalis* (hari ke-0) kemudian diinfeksi dengan 0.2 ml  $5 \times 10^3$  cfu/ml *L. monocytogenes* secara *intra peritoneal*. Pada hari ke-3 setelah diinfeksi *L. monocytogenes*, semua mencit diambil darahnya sebanyak 0,75 ml dari *plexus infra orbitalis* (hari ke-3), mencit kelompok I dan II dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan uji NO, kemudian limfanya untuk uji proliferasi limfosit. Selanjutnya pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes* hal yang sama dilakukan untuk mencit kel III dan IV (hari ke-10), sedangkan hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* untuk mencit kel V dan VI (hari ke-21).

b. Isolasi dan kultur makrofag peritoneal mencit

Mencit dikorbankan, seluruh tubuh mencit dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibawa ke dalam *laminary flow hood* dan diletakkan dalam posisi terlentang. Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 ml medium RPMI 1640 dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal dikeluarkan/diaspirasi dari rongga peritoneum dengan menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh

dari usus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Aspirat yang didapat disentrifus pada 1200 RPM 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet (mengandung FBS 10%) pada *pellet* yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplet sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200  $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel). Inkubasi dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplet ditambahkan 1 ml/sumuran dan diinkubasi lagi selama dua jam. Sel dicuci dengan RPMI dua kali kemudian ditambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, kemudian inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam (Wijayanti, 1996; Wijanyanti, 1999).

c. Uji aktivitas fagositosis makrofag

*Latex beads* diresuspensikan di dalam PBS sehingga didapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml. Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2x dengan medium RPMI, kemudian ditambahkan suspensi lateks 200  $\mu$ l/sumuran, diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3 kali, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih (4-5 kali, akuades menjadi jernih) diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Makrofag yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan cara diperiksa

menggunakan alat optilab dan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Wijayanti, 1996; Wijayanti, 1999) masing-masing pada 2 bidang pandang untuk setiap *coverslip*. Aktivitas fagositosis makrofag ditetapkan dengan parameter persen fagositosis, indeks fagositosis, dan efisiensi fagositosis (Shancez *et al.*, 2008).

d. Penetapan kadar nitrit oksid

Tabung reaksi berisi 487,5  $\mu$ l PBS dan 9 tabung masing-masing berisi 250  $\mu$ l PBS disiapkan. Pada tabung 1 ditambahkan 12,5  $\mu$ l larutan standar nitrit dari *stock* standar nitrit 2000  $\mu$ M. Setelah disentrifus, dari tabung tersebut kemudian diambil 250  $\mu$ l, dimasukkan ke tabung 2 kemudian disentrifus, dari tabung 2 diambil 250  $\mu$ l lagi dan seterusnya dimasukkan ke tabung berikutnya sampai tabung ke-10. Larutan standar nitrit dari masing-masing tingkat pengenceran standar nitrit dimasukkan ke dalam lempeng mikro 96 sumuran secara duplo masing-masing 100  $\mu$ l, demikian juga kultur makrofag yang telah diinkubasi semalam (butir a), kemudian ditambahkan 100  $\mu$ l Reagen Griess yang terdiri dari Griess A dan Griess B (1:1) dalam setiap sumur, diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit kemudian *optical density* dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm (Amano and Noda, 1995).

e. Isolasi dan kultur limfosit limpa

Selubung peritoneum dibuka, setelah dilakukan isolasi makrofag kemudian limpa diangkat dan diletakkan pada cawan petri steril diameter 50 mm yang telah diisi 5 ml medium RPMI 1640, kemudian medium disemprotkan ke dalam limpa untuk mendapatkan suspensi sel tunggal. Setelah itu dimasukkan

ke dalam tabung sentrifus 10 ml untuk disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Pelet yang didapat, diresuspensikan dalam 2 ml *Tris Buffered Ammonium Chlorid* untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur menggunakan pipet dan dikocok, kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. Sebanyak 1 ml *phosphate-buffered saline* (PBS) ditambahkan pada dasar tabung menggunakan pipet. Suspensi tersebut disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit, dan supernatannya dibuang. Pelet dicuci dengan RPMI 2x dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang didapat diresuspensikan pada 4 ml medium komplit. Suspensi sel dikultur pada cawan petri diameter 50 mm dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% 37°C selama 2 jam. Supernatannya yang berisi sel-sel limfosit diambil dengan menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung sentrifus. Supernatan kemudian disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan limfosit diresuspensikan dengan 1 ml medium komplet. Sel dihitung menggunakan haemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan *trypan blue* sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan 10<sup>6</sup> sel/ml (Wahyuniari, 2006).

f. Uji proliferasi limfosit

Limfosit dikultur pada *microplate* 96 dengan volume 100 µl/sumuran. Tiap-tiap kelompok dengan replikasi 3 kali. *Phytohemagglutinin* (PHA) ditambahkan dengan konsentrasi akhir 50 µg/ml, sebanyak 10 µl/sumuran, kemudian diinkubasi pada 37°C. Selanjutnya ditambahkan MTT pada masing-masing sumuran dengan konsentrasi 5 mg/ml sebanyak 10 µl, dan diinkubasi

pada 37°C, CO<sub>2</sub> 5% selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambah HCl-isopropanol 0,04 M sebanyak 100 µl/sumuran. Hasilnya dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm (Mosmann, 1983; Wahyuniari, 2006).

g. Penetapan kadar IgG.

Semua reagen diletakkan di suhu ruangan sebelum digunakan. Masing-masing sebanyak 100 µl dari standar 1 (9,375 ng/ml), standar 2 (18,75 ng/ml), standar 3 (75 ng/ml), standar 4 (150 ng/ml), dan sampel diambil secara duplo, dimasukkan dalam sumuran lempeng mikro. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 60 menit. Selama inkubasi, lempeng mikro ditutup dengan penutup yang sudah disediakan. Setelah cairan dalam sumuran diaspirasi, diisi penuh dengan *Wash Solution*, kemudian diaspirasi lagi dan diulang sampai 3 kali atau 4 kali total pencucian. Sebanyak 100 µl *Enzyme Antibodi Conjugate* ditambahkan pada setiap sumuran. Inkubasi dilakukan pada suhu ruangan selama 30 menit. Setelah itu sumuran dicuci 4 kali lagi seperti sebelumnya. Sebanyak 100 µl *TMB Substrate Solution* ditambahkan pada tiap sumuran, diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan *Stop Solution* pada tiap sumuran. Absorbansi ditetapkan pada panjang gelombang 450 nm (*Immunology Consultants Laboratory, Inc. manual*)

h. Penetapan kadar IL-12

Pada sumuran *microplate* ditambahkan 400 µl Wash Buffer, didiamkan selama 10-15 detik, kemudian diaspirasi. Pencucian tersebut diulangi sekali lagi, kemudian sumuran dikosongkan dengan menuang dan menghentakkan *microplate* ke kertas tisu untuk mengeluarkan cairan akan tetapi tidak boleh

terlalu kering. Sebanyak 100  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) ditambahkan secara duplo ke sumuran standar. Pada sumuran A1 dan A2 dimasukkan 100  $\mu$ l larutan standar yang sudah disiapkan. Isi sumuran A1 maupun A2 diaspirasi agar tercampur dengan baik kemudian diambil 100  $\mu$ l, dimasukkan berturut-turut ke sumuran B1 dan B2. Pengerjaan tersebut dilakukan secara hati-hati sehingga tidak menggores permukaan dalam sumuran. Penyiapan standar dengan cara tersebut dilanjutkan sebanyak 5 kali berturut-turut untuk membuat 2 baris larutan standar interleukin 12 (IL-12) dengan rentang konsentrasi 2000 sampai 31,3 pg/ml. Sebanyak 100  $\mu$ l isi dari *microwell* terakhir (G1, G2) dibuang. Sebanyak 100  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) dimasukkan pada sumuran blanko secara duplo, dan 50  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) pada sumuran sampel. Sebanyak 50  $\mu$ l dari setiap sampel ditambahkan pada sumuran sampel secara duplo. Pada setiap sumuran ditambahkan 50  $\mu$ l Biotin-Conjugate yang sudah disiapkan, kemudian *microwell* ditutup dengan *adhesive film*, diletakkan diatas *shaker* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 2 jam dengan pengadukan 400 rpm. Setelah inkubasi selesai, *adhesive film* dilepas, isi sumuran dikosongkan, kemudian *microwell* dicuci sebanyak 5 kali dengan cara yang sama dengan pencucian sebelumnya. Setelah pencucian, pada *microwell* ditambahkan 100  $\mu$ l Larutan *Streptavidin-HRP* yang telah disiapkan pada semua sumuran, termasuk sumuran blanko, kemudian ditutup dengan *adhesive film*, diletakkan diatas *shaker* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 1 jam dengan pengadukan 400 rpm. Setelah inkubasi selesai, *adhesive film* dilepas, isi sumuran dikosongkan, kemudian *microwell* dicuci sebanyak 3 kali dengan cara yang sama dengan pencucian sebelumnya.

Setelah pencucian, pada semua sumuran *microwell* ditambahkan 100  $\mu$ l Larutan *TMB Substrat*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit, tanpa terkena cahaya secara langsung. Perubahan warna yang terjadi dimonitor, reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ l *Stop Solution* ketika standar IL-12 kadar tertinggi sudah menunjukkan perubahan warna menjadi biru tua. Absorbansi dari tiap sumuran dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm (*eBioscience mouse Il-12 Platinum ELISA manual*).

i. Penetapan kadar IL-10

Pada sumuran *microplate* ditambahkan 400  $\mu$ l *Wash Buffer*, didiamkan selama 10-15 detik, kemudian diaspirasi. Pencucian tersebut diulangi sekali lagi, kemudian sumuran dikosongkan dengan menuang dan menghentakkan *microplate* ke kertas tisu untuk mengeluarkan cairan akan tetapi tidak boleh terlalu kering. Sebanyak 100  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) ditambahkan secara duplo ke sumuran standar. Pada sumuran A1 dan A2 dimasukkan 100  $\mu$ l larutan standar yang sudah disiapkan. Isi sumuran A1 maupun A2 diaspirasi agar tercampur dengan baik kemudian diambil 100  $\mu$ l, dimasukkan berturut-turut ke sumuran B1 dan B2. Pengerjaan tersebut dilakukan secara hati-hati sehingga tidak menggores permukaan dalam sumuran. Penyiapan standar dengan cara tersebut dilanjutkan sebanyak 3 kali berturut-turut untuk membuat 2 baris larutan standar interleukin 10 (IL-10) dengan rentang konsentrasi 1000 sampai 15,6 pg/ml. Sebanyak 100  $\mu$ l isi dari *microwell* terakhir (G1, G2) dibuang. Sebanyak 100  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) dimasukkan pada sumuran blanko secara duplo, dan 50  $\mu$ l *Assay Buffer* (1x) pada sumuran sampel. Sebanyak 50  $\mu$ l dari setiap sampel



ditambahkan pada sumuran sampel secara duplo. Pada setiap sumuran ditambahkan 50  $\mu$ l Biotin-Conjugate yang sudah disiapkan, kemudian *microwell* ditutup dengan *adhesive film*, diletakkan diatas *shaker* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 1 jam dengan pengadukan 400 rpm. Setelah inkubasi selesai, *adhesive film* dilepas, isi sumuran dikosongkan, kemudian *microwell* dicuci sebanyak 4 kali dengan cara yang sama dengan pencucian sebelumnya. Setelah pencucian, pada *microwell* ditambahkan 100  $\mu$ l Larutan *Streptavidin-HRP* yang telah disiapkan pada semua sumuran, termasuk sumuran blanko, kemudian ditutup dengan *adhesive film*, diletakkan diatas *shaker* dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 1 jam dengan pengadukan 400 rpm. Setelah inkubasi selesai, *adhesive film* dilepas, isi sumuran dikosongkan, kemudian *microwell* dicuci sebanyak 4 kali dengan cara yang sama dengan pencucian sebelumnya. Setelah pencucian, pada semua sumuran *microwell* ditambahkan 100  $\mu$ l Larutan *TMB Substrat*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 10 menit, tanpa terkena cahaya secara langsung. Perubahan warna yang terjadi dimonitor, reaksi dihentikan dengan menambahkan 100  $\mu$ l *Stop Solution* ketika standar IL-10 kadar tertinggi sudah menunjukkan perubahan warna menjadi biru tua. Absorbansi dari tiap sumuran dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm (*eBioscience mouse Il-10 Platinum ELISA manual*).

## 5. Penelitian utama efek imunomodulator secara *in vivo*

### a. Perlakuan pada mencit

Mencit BALB/c jantan berat sekitar 20-30 gram sebanyak 54 ekor diaklimatisasi selama seminggu kemudian dibagi menjadi 9 kelompok masing-masing terdiri dari 6 mencit. Kelompok 1, diberi perlakuan dengan 2.5 mg/kgBB 1, Kelompok 2, diberi perlakuan dengan 5 mg/kgBB 1, kelompok 3, diberi perlakuan dengan 10 mg/kgBB 1, kelompok 4, diberi perlakuan dengan 2.5 mg/kgBB 2, kelompok 5, diberi perlakuan dengan 5 mg/kgBB 2, kelompok 6, diberi perlakuan dengan 10 mg/kgBB 2, per oral selama 14 hari, kelompok 7, tidak diberi perlakuan dengan obat maupun pelarut sebagai kelompok kontrol normal, kelompok 8, diberi perlakuan dengan 0,75 ml CMCNa 1 % per oral sebagai kelompok kontrol pelarut, dan kelompok 9, diberi perlakuan dengan 100 mg/kgBB Product-X<sup>®</sup> (Imboost<sup>®</sup>) per oral sebagai kelompok kontrol positif. Pada hari ke-15, sebelum dilakukan infeksi, dari semua mencit infeksi darah melalui *plexus infra orbitalis* sebanyak 0,5 ml (hari ke-0), kemudian 3 mencit dari masing-masing kelompok dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO, kemudian limpa-nya untuk uji proliferasi limfosit, pada 6 mencit yang lain disuntikkan 0,2 ml *L. monocytogenes* berisi  $5 \times 10^3$  cfu/ml secara intraperitoneal. Pada hari ke-10 setelah diinfeksi *L. monocytogenes*, dari semua mencit infeksi darah melalui *plexus infra orbitalis* sebanyak 0,5 ml (hari ke-10), kemudian 3 mencit dari masing-masing kelompok dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum

untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO, kemudian limpa-nya untuk uji proliferasi limfosit, 3 mencit yang lain disuntikkan 0,2 ml *L. monocytogenes* berisi  $5 \times 10^3$  cfu/ml secara intraperitoneal. Selanjutnya pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* yang pertama 3 mencit dari setiap kelompok dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO, kemudian limpa-nya untuk uji proliferasi limfosit (hari ke-21).

- b. Uji aktivitas fagositosis makrofag, penetapan kadar NO, uji proliferasi limfosit, penetapan kadar IgG, penetapan kadar IL-12, dan penetapan kadar IL-10.

Pengujian selanjutnya berupa uji aktivitas fagositosis makrofag, penetapan kadar NO, uji proliferasi limfosit, penetapan kadar IgG, penetapan kadar IL-12, dan penetapan kadar IL-10 dilakukan dengan cara yang sama dengan cara pada penelitian pendahuluan.

- c. Pemeriksaan histopatologis hati dan ginjal mencit

Setelah mencit diambil cairan peritoneal dan limpa-nya, kemudian ginjal dan hati diambil dimasukkan dalam cairan formalin 10% untuk dibuat preparat histopatologis. Pada sayatan/jaringan ginjal dan hati dilakukan fiksasi, dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi parafin. Jaringan yang sudah selesai diproses kemudian dikeluarkan dan segera dimasukkan ke dalam cetakan blok yang sebelumnya sudah diisi parafin cair kemudian etiket ditempelkan di pinggirnya, setelah keras ( $\pm 20$  menit), cetakan dilepas dan diberi etiket permanen. Setelah blok parafin dingin kemudian dijepitkan pada mikrotom, dipotong dengan kemiringan sekitar  $30^\circ$  terhadap blok parafin setebal sekitar  $2,5 \mu$ , hasil potongan yang berupa pita

dimasukkan ke dalam *waterbath* berisi air hangat, kemudian diambil dengan gelas benda diberi etiket, dibiarkan sekitar 5 menit, diinkubasi pada *hot plate* suhu 50°C selama 15 menit, kemudian dilakukan pengecatan *hematoxylin-eosin* (HE) dan diperiksa menggunakan mikroskop dan optilab (Lynch *et al.*, 1969).

#### **D. Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas pada uji *in vivo* yakni 1 dan 2
2. Variabel tergantung pada uji *in vivo* yakni aktivitas imunomodulator berupa aktivitas fagositosis makrofag; aktivitas produksi NO; aktivitas proliferasi limfosit; aktivitas produksi IgG; kadar IL-12; kadar IL-10; dan gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit.
3. Variabel terkontrol : jenis kelamin, umur, dan berat badan mencit; faktor lingkungan laboratorium pemeliharaan mencit, asupan makanan dan minuman; induksi respon imun menggunakan *L. monocytogenes*; dan waktu pengujian (hari ke-0, ke-10, dan ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*).

#### **E. Definisi Operasional Variabel Penelitian**

Definisi operasional variabel penelitian ini yakni:

1. Ekstrak adalah hasil maserasi daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. (DPc) menggunakan pelarut metanol
2. Fraksi adalah hasil fraksinasi ekstrak metanol DPc

3. Isolat adalah 1 dan 2, senyawa hasil isolasi dari DPc, berupa senyawa murni secara KLT sesuai isolat 1 dan 2 pada standar fraksi
4. 1 adalah senyawa 1 hasil isolasi dari DPc, dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif, eluasi dengan fase gerak kloroform:etil asetat (9:1) mempunyai Rf 0,7, meredam pada deteksi UV 254 nm, tidak berwarna pada deteksi dengan UV 366, dan berwarna coklat pada deteksi dengan reagen serium (IV) sulfat dan pemanasan.
5. 2 adalah senyawa 2 hasil isolasi dari DPc, dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif, eluasi dengan fase gerak kloroform:etil asetat (9:1) mempunyai Rf 0,3, meredam pada deteksi UV 254 nm, tidak berwarna pada deteksi dengan UV 366, dan berwarna coklat pada deteksi dengan reagen serium (IV) sulfat dan pemanasan.
6. Uji *in vitro* adalah uji efek imunomodulator, bahan uji berupa ekstrak dan fraksi diinkubasi bersama kultur makrofag dan direaksikan dengan lateks pada *coverslip* (di luar tubuh mencit).
7. Uji *in vivo* adalah uji efek imunomodulator, bahan uji berupa 1 dan 2 diberikan secara oral pada mencit. Kultur makrofag yang diambil dari mencit tersebut, kemudian direaksikan dengan lateks pada *coverslip* (di luar tubuh mencit).
8. Aktivitas fagositosis makrofag meliputi persen fagositosis (PF), indeks fagositosis (IF), dan efisiensi fagositosis (EF).
9. Persen fagositosis adalah nilai berupa persen sel yang mem-fagosit minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag pada 3 *coverslip* yang mem-fagosit minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag pada 3 *coverslip* dikalikan 100%.

10. Indeks fagositosis adalah nilai berupa jumlah lateks yang di-fagosit oleh 100 makrofag yakni 100 dibagi jumlah makrofag pada 3 *coverslip* dikalikan jumlah lateks yang di-fagosit makrofag pada 3 *coverslip*.
11. Efisiensi fagositosis adalah nilai berupa rasio antara indeks fagositosis dan persen fagositosis.
12. Aktivitas produksi nitrit oksid merupakan aktivitas mencit yang diukur dari produksi NO yang ditetapkan dari nilai *optical density* (OD) kultur makrofag, diperoleh dari perbandingan nilai OD kelompok perlakuan dengan 1 maupun 2 dengan OD kelompok kontrol, diukur dengan ELISA reader pada  $\lambda$  540 nm. Perhitungan konsentrasi NO dalam sampel dibandingkan dengan nitrit standar.
13. Aktivitas proliferasi limfosit adalah aktivitas mencit yang diukur dari jumlah limfosit yang berproliferasi, diperoleh dari perbandingan nilai OD limfosit kelompok perlakuan dengan 1 maupun 2 dengan OD limfosit kelompok kontrol, diukur dengan ELISA reader pada  $\lambda$  540 nm.
14. Aktivitas produksi IgG adalah aktivitas mencit yang diukur dari titer IgG berupa OD yang diperoleh dari perbandingan nilai OD IgG kelompok perlakuan 1 maupun 2 dengan OD IgG kelompok kontrol, diukur dengan ELISA reader pada  $\lambda$  450 nm. Perhitungan konsentrasi titer IgG dalam sampel dibandingkan dengan titer IgG standar.
15. Aktivitas produksi IL-12 adalah aktivitas mencit yang diukur dari produksi IL-12 berupa OD yang diperoleh dari perbandingan nilai OD IL-12 kelompok perlakuan 1 maupun 2 dengan OD IL-12 kelompok kontrol, diukur dengan ELISA reader

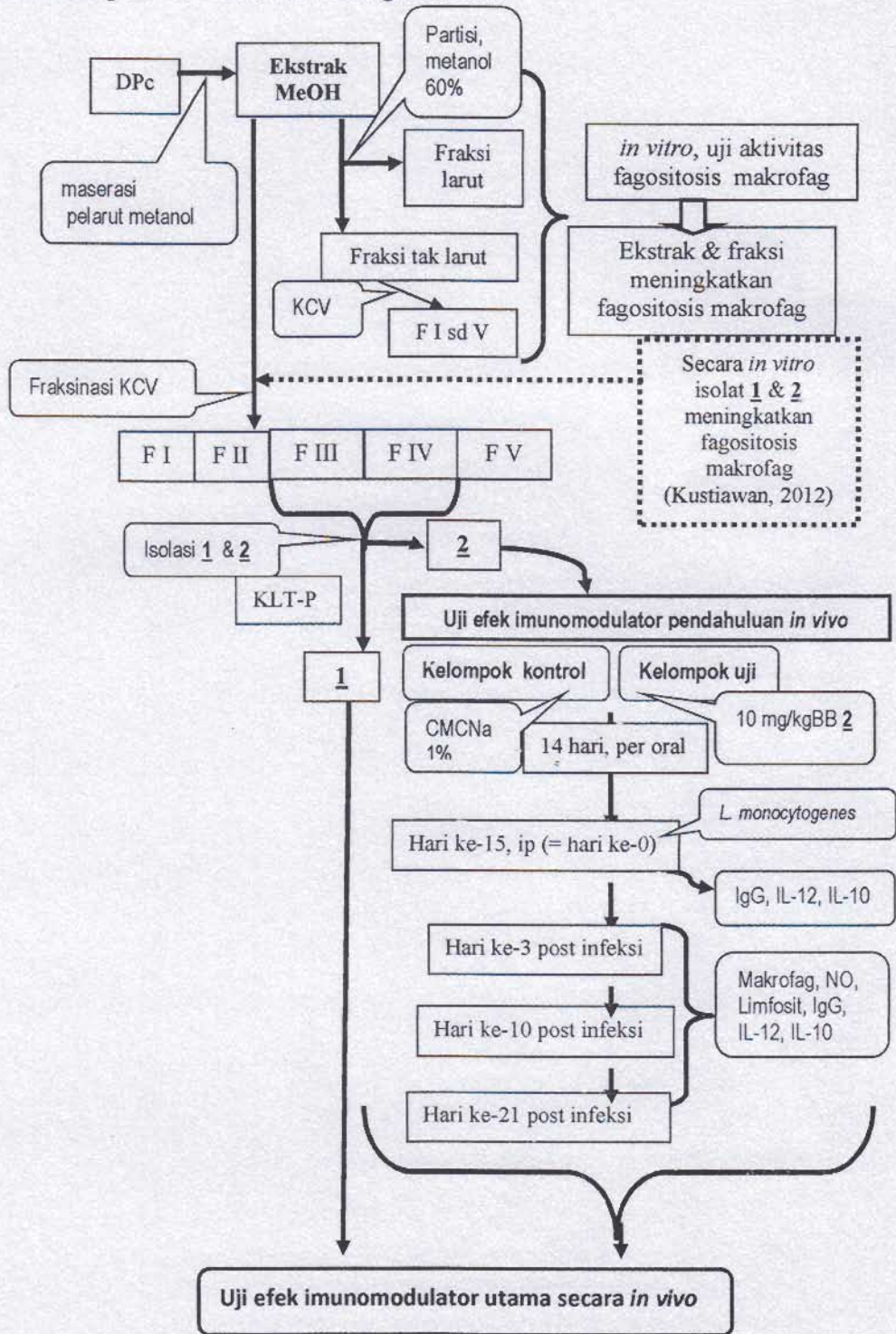
pada  $\lambda$  450 nm. Perhitungan konsentrasi IL-12 dalam sampel dibandingkan dengan IL-12 standar.

16. Aktivitas produksi IL-10 adalah aktivitas mencit yang diukur dari produksi IL-10 berupa OD yang diperoleh dari perbandingan nilai OD IL-10 kelompok perlakuan 1 maupun 2 dengan OD IL-10 kelompok kontrol, diukur dengan ELISA reader pada  $\lambda$  450 nm. Perhitungan konsentrasi IL-10 dalam sampel dibandingkan dengan IL-10 standar.
17. Gambaran histopatologis hati dan ginjal adalah deskripsi gambar mikroskopis pada preparat dari jaringan hati dan ginjal mencit yang dibuat dengan pewarnaan hematoksilin-eosin.

## **F. Analisis Data**

Analisis data parameter fagositosis makrofag dan proliferasi limfosit berupa uji anova satu jalan, Tukey, dan korelasi Pearson menggunakan program SPSS 19, sedangkan untuk aktivitas produksi NO, IgG, IL-12 dan IL-10 juga digunakan regresi linear. Hasil pemeriksaan mikroskopik gambaran histopatologis hati dan ginjal pada mencit dianalisis secara deskriptif dengan cara membandingkan dengan gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit yang tidak diberi perlakuan dengan 1 dan 2.

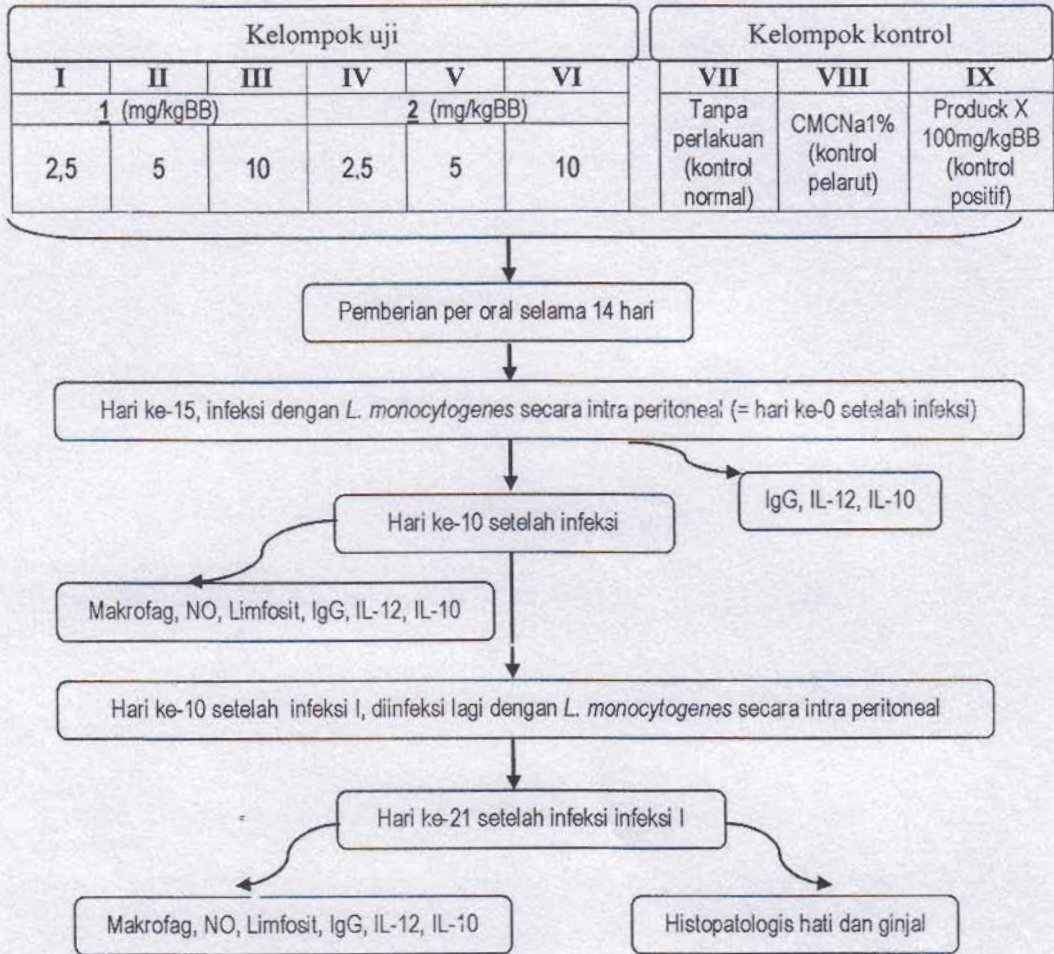
Bagan/skema penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 10a. Bagan/skema isolasi 1 dan 2 serta uji pendahuluan efek imunomodulator isolat



**Uji efek imunomodulator utama secara *in vivo***



**Gambar 10. b. Bagan/skema uji utama efek imunomodulator 1 dan 2**



## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Penelitian ini menggunakan daun sirih merah yang telah dideterminasi dengan nama ilmiah *Piper crocatum* Ruiz & Pav. (Surat keterangan No.: BF/284/Ident/Det/VIII/2011).

Metode maserasi dengan pelarut metanol digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang terkandung dalam daun *Piper crocatum* (DPc). Ekstraksi dilakukan terhadap serbuk yang berasal dari pengeringan DPc segar. Pengeringan dilakukan untuk mencegah perubahan yang bersifat fisik, kimiawi, maupun mikrobial karena keberadaan media air pada tanaman (List and Schmidt, 1989). Maserasi terhadap 1,9 kg serbuk DPc yang berasal dari pengeringan 8,26 kg DPc segar menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap DPc segar sebesar 23 %, rendemen ekstrak terhadap DPc segar sebesar 2,7 %, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk DPc sebesar 11,8 %. Rendemen tersebut relatif lebih tinggi dibandingkan ekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut n-heksana maupun etanol (Wahyudi, 2010; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013; Aprianto, 2010). Maserasi tidak menghasilkan ekstraksi yang komplit, dan jenis pelarut yang digunakan sangat menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi (Samuelsson, 1999). Hasil ekstraksi terhadap DPc menunjukkan bahwa maserasi menggunakan pelarut yang sama dapat menghasilkan rendemen yang berbeda, hal ini mungkin disebabkan tempat tumbuh bahan tanaman serta teknis pelaksanaan maserasi yang berbeda, sehingga hasil ekstraksi berbeda (Wahyudi, 2010; Indriyani, 2011;

Ardianto, 2013; Aprianto, 2010; Wiweko, 2010; Tirta, 2010; Yuristiyani, 2012; Werdani, 2012; Kurniawan, 2011).

Pandey *et al.* (2010) melaporkan bahwa ekstraksi dengan cara pendidihan dalam 3 L air terhadap 1 kg daun *P. betle* segar menghasilkan 5,06 g ekstrak dan kemudian 2,56 g hidroksikavikol. Rendemen ekstrak air terhadap daun *P. betle* segar sebesar 0,5% dan rendemen hidroksikavikol terhadap ekstrak air *P. betle* segar sebesar 50,1%. Pendidihan dengan air cocok untuk isolasi hidroksikavikol dari *P. betle* segar mengingat rendemen senyawa tersebut relatif tinggi. Metode maserasi lebih aman digunakan untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang rusak karena pemanasan. Sunila and Kuttan (2004) mengekstraksi 100 g serbuk kering buah *Piper longum* dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol, dan mendapatkan 26 % ekstrak metanol. Peneliti lain juga menggunakan metode maserasi dan pelarut metanol untuk uji aktivitas imunomodulator tanaman dari marga *Piper* (Kanjwani *et al.*, 2008; Wicaksono *et al.*, 2009; Konishi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010).

Pemisahan senyawa dalam ekstrak diawali dengan cara partisi menggunakan metanol 60%, sehingga diperoleh fraksi larut (FL) dan fraksi tak larut (FTL). Ekstrak dan kedua fraksi diuji aktivitas imunomodulatornya (Gambar 21), pemisahan senyawa dari fraksi didasarkan pada hasil uji ini. Fraksinasi terhadap FTL dengan metode KCV menghasilkan 11 fraksi. Berdasar kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi tersebut digabung menjadi 5 fraksi. Jumlah fraksi yang terbanyak berturut-turut adalah fraksi III, fraksi IV, fraksi II, dan fraksi V, fraksi I. Tiga kali fraksinasi dari masing-masing 2 gram FTL, berturut-turut menghasilkan 0,41 g; 0,49 g, dan 0,49 g fraksi II (F-II), rendemen F-II terhadap FTL sebesar 23,17%.

**Tabel 1. Penggabungan fraksi berdasar hasil uji KLT fraksi-fraksi hasil KCV ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat**

Pelarut		Fraksi awal	Jumlah (g)	Fraksi sesudah penggabungan
Jenis	Volume (ml)			
n-heksana	180	1	0,14	
n-heksana:etilasetat (9:1)	120	2	0,08	Fraksi I
n-heksana:etilasetat (8:2)	120	3	0,41	Fraksi II
n-heksana:etilasetat (7:3)	70	4	0,27	
n-heksana:etilasetat (6:4)	90	5	0,13	Fraksi III
n-heksana:etilasetat (5:5)	60	6	0,08	
n-heksana:etilasetat (4:6)	60	7	0,14	Fraksi IV
n-heksana:etilasetat (3:7)	90	8	0,17	
n-heksana:etilasetat (2:8)	120	9	0,10	
n-heksana:etilasetat (1:9)	120	10	0,08	Fraksi V
Etil asetat	120	11	0,11	

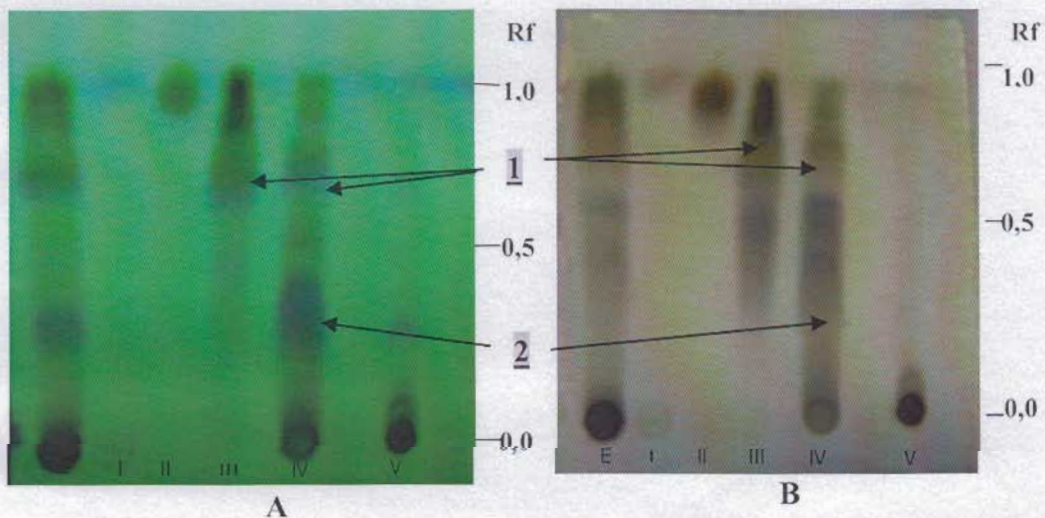
Hasil uji *in vitro* pengaruh kelima fraksi tersebut terhadap aktivitas fagositosis makrofag menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi dihasilkan oleh fraksi II (Gambar 21), akan tetapi pada penelitian selanjutnya fraksi ini belum dilanjutkan untuk dilakukan isolasi senyawa karena kemudian penulis mendapatkan informasi bahwa telah dilakukan isolasi senyawa dari ekstrak etanol DPc yang dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* (Kustiawan, 2012).

Secara *in vitro*, dilaporkan bahwa isolat 1 dan 2 dari ekstrak etanol DPc, mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Kustiawan, 2012). Informasi tersebut ditindaklanjuti dengan mencari cara agar dapat mengisolasi kedua senyawa tersebut secara efisien sehingga dapat mengumpulkan jumlah isolat yang cukup untuk uji *in vivo*. Profil KLT ekstrak dan fraksi standar yang berisi 1 dan 2 dengan deteksi UV 254 nm; UV 366 nm, serta serum sulfat yang dilanjutkan pemanasan menunjukkan bahwa kedua senyawa terdeteksi dalam ekstrak metanol DPc, sehingga diupayakan isolasi dari ekstrak metanol tersebut melalui modifikasi metode isolasi yang telah dilakukan Kustiawan (2012). Modifikasi metode isolasi tersebut berupa

proses isolasi 1 dan 2 yang langsung dilakukan terhadap fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol dengan metode KCV menggunakan pelarut berturut-turut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan metanol untuk mendapatkan fraksi I, II, III, IV, dan V. Pemisahan dengan KCV terhadap 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan berat total fraksi 1,78 gram. Hasil fraksinasi tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, etil asetat, dan metanol untuk isolasi 1 dan 2

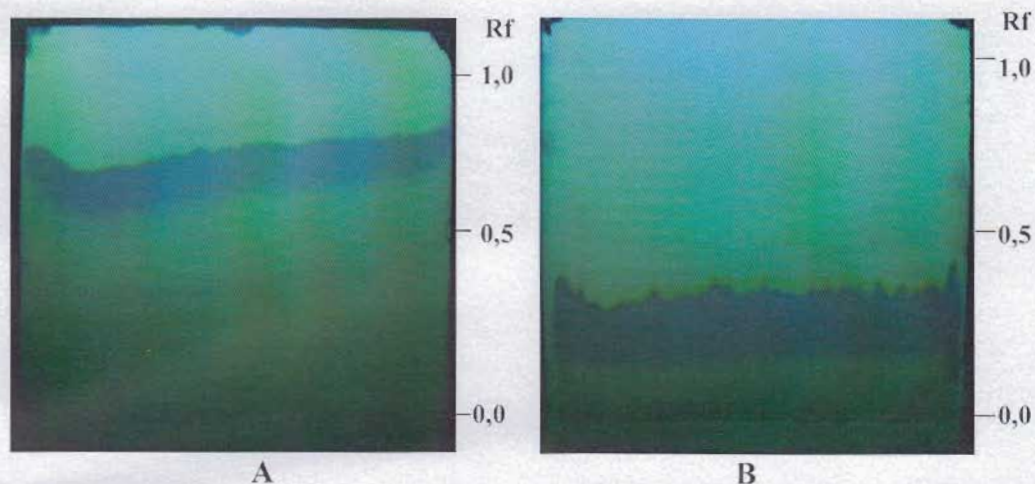
Pelarut		Fraksi	Jumlah (g)
Jenis	Volume (ml)		
n-heksana	50	I	0,08
kloroform	50	II	0,10
kloroform	50	III	0,32
etil asetat	50	IV	0,30
metanol	100	V	0,98



Gambar 11. Kromatogram Lapis Tipis dari ekstrak dan 5 (I,II,III,IV,V) fraksi hasil KCV dengan fase gerak  $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$  (9:1) (A), penampak bercak UV 254 nm (B), penampak bercak serum (IV) sulfat dan pemanasan

Profil KLT menunjukkan 1 dan 2 terdapat dalam fraksi III dan IV hasil KCV tersebut dari hasil fraksinasi ekstrak metanol DPc (Gambar 11). Isolasi 1 dan 2 dari fraksi III dan IV menggunakan KLT Preparatif, dengan fase gerak kloroform:etilasetat (9:1), bercak yang meredam pada UV 254 nm, berwarna biru ungu, diberi tanda

dengan ujung jarum kemudian dikerok, dilarutkan dalam kloroform:metanol (1:1) (Gambar 12).

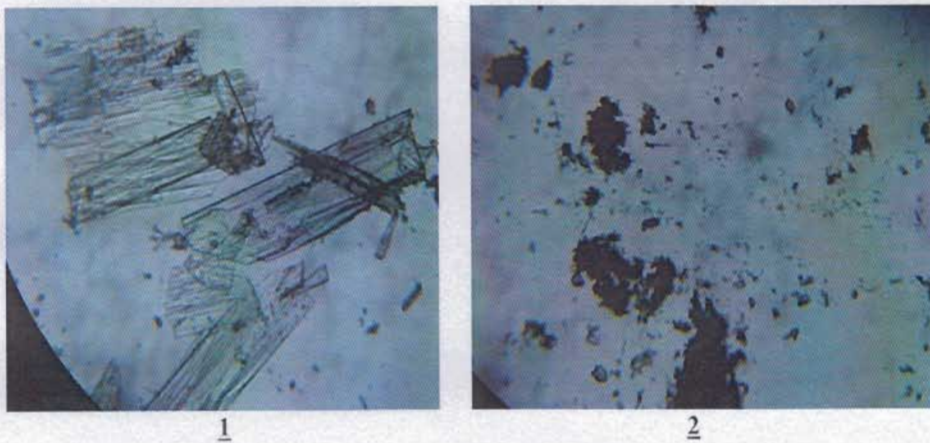


Gambar 12. Kromatogram Lapis Tipis Preparatif dengan fase gerak  $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$  (9:1) dan penampak bercak UV 254 nm (A), isolat 1 (B), isolat 2

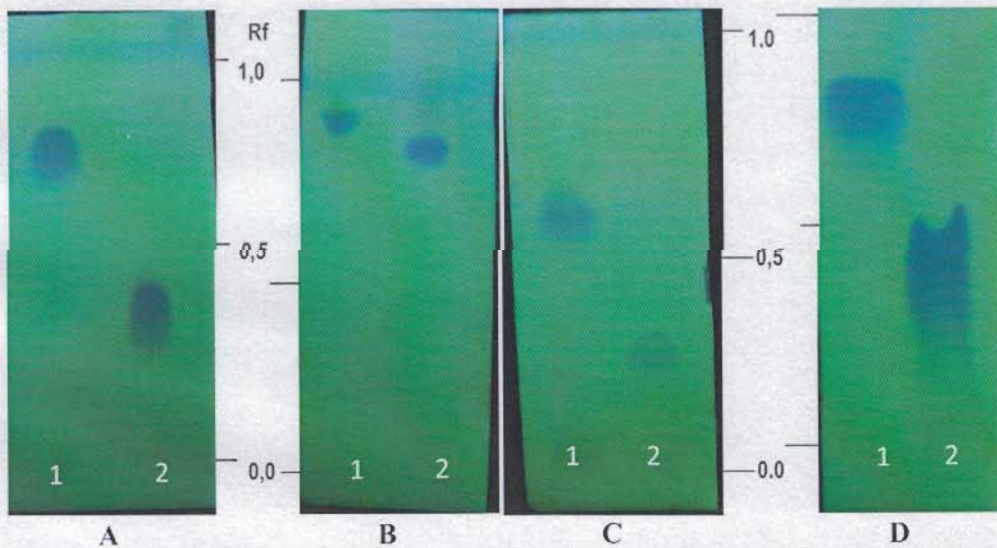
Isolasi senyawa imunomodulator dengan metode KLT preparatif dari 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan 12,0 mg 1 dan 12,1 mg 2 yang murni secara KLT. Rendemen 1 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,57 %, dan rendemen 2 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,57 %. Isolasi 1 dan 2 dari ekstrak metanol DPc menghasilkan isolat yang lebih banyak dibandingkan metode yang sama untuk mengisolasi neolignan dialil-katekol, neotaiwanensols A, dan neotaiwanensols B dari ekstrak metanol akar *P. taiwanense* (Chen *et al.* 2013). Banyaknya kadar 1 dan 2 juga tampak dari kromatogram KLT, bercak 1 dan 2 tampak besar dan warna biru pada deteksi dengan spektrofotometer UV menunjukkan warna dengan intensitas yang relatif kuat. Isolat 1 berupa kristal berwarna putih, dan 2 berupa serbuk putih agak kekuningan (Gambar 13).

Senyawa 1 dan 2 yang diisolasi tersebut berpendar warna biru ungu di bawah sinar UV 254 nm, tidak tampak di bawah sinar UV 366 nm, berwarna coklat pada

deteksi dengan serium (IV) sulfat dan pemanasan. Isolat 1 dan 2 berturut-turut mempunyai harga Rf 0,7 dan 0,3 pada fase gerak kloroform : etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0,9 dan 0,8 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1), dan Rf 0,6 dan 0,3 pada fase gerak heksan : aseton (3:1), dan Rf 0,7 dan 0,4 pada fase gerak kloroform : etil asetat (9:2).

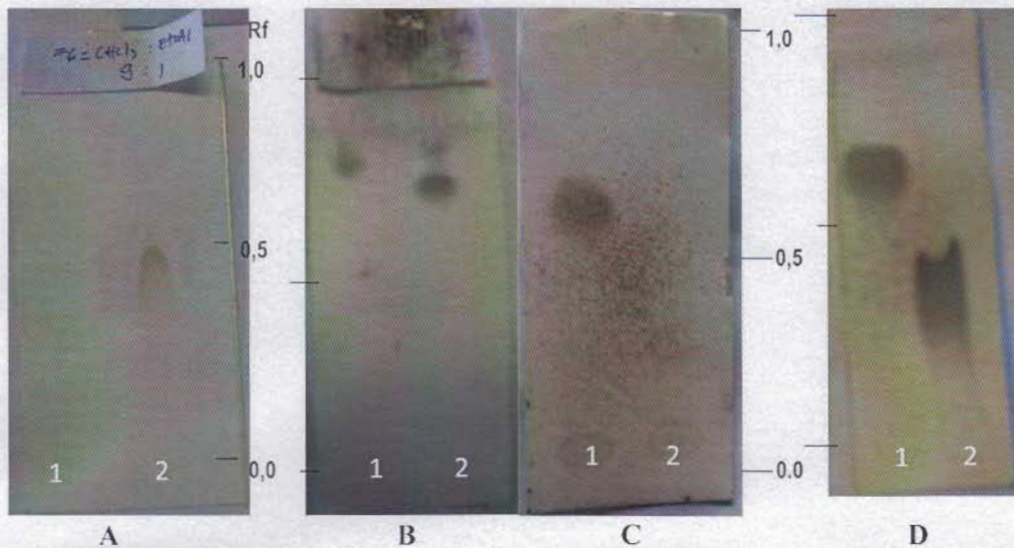


Gambar 13. Kristal isolat 1 dan serbuk isolat 2 dilihat di bawah mikroskop s



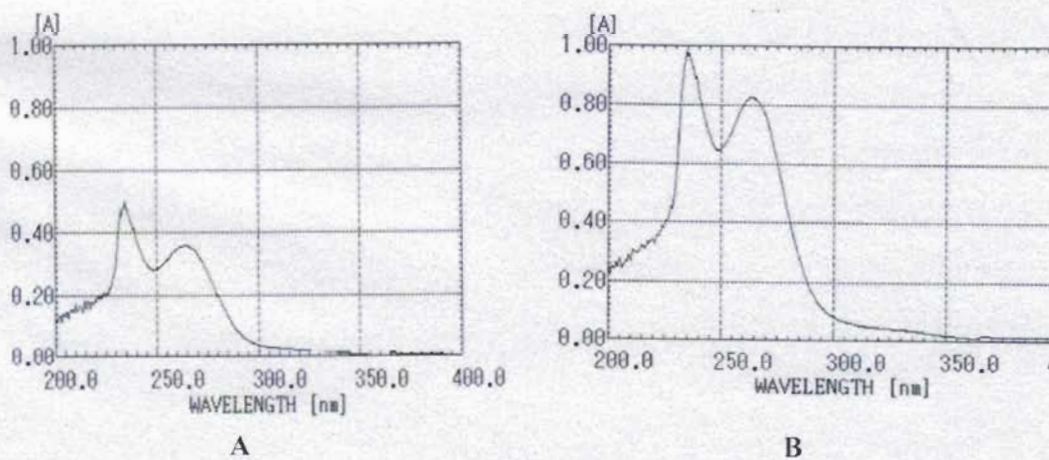
Gambar 14. Kromatogram Lapis Tipis isolat 1 dan 2 dengan penampak bercak UV 254 nm menggunakan 4 sistem fase gerak (A), CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (9:1), (B), CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (1:9), (C), Heksan: EtOAc (3:1), dan (D), Heksan:Aseton (3:1)





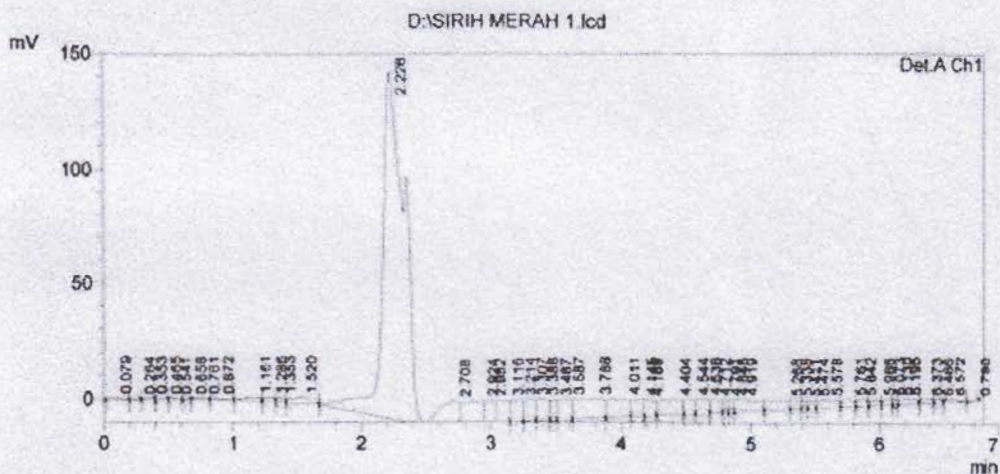
Gambar 15. Kromatogram Lapis Tipis isolat 1 dan 2 dengan penampak bercak serum (IV) sulfat dilanjutkan pemanasan menggunakan 4 sistem fase gerak (A),  $\text{CHCl}_3$ :EtOAc (9:1), (B),  $\text{CHCl}_3$ :EtOAc (1:9) (C) Heksan:EtOAc (3:1), dan (D), Heksan:Aseton (3:1)

Kemurnian senyawa yang terisolasi sebaiknya selalu dicek dengan minimal 4 sistem KLT menggunakan fase gerak berbeda polaritasnya (Houghton and Raman, 1998). Pemeriksaan kemurnian isolat 1 dan 2 dilakukan dengan menggunakan 4 sistem fase gerak pada KLT. Keempat kromatogram menunjukkan adanya bercak tunggal, sehingga kedua isolat dapat dinyatakan murni secara KLT (Gambar 14 dan 15).

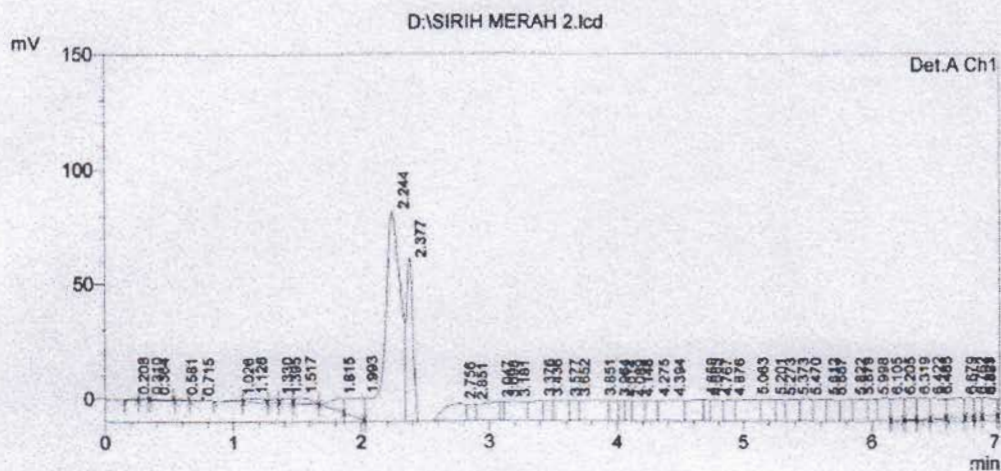


Gambar 16. Spektrogram UV isolat dengan pelarut kloroform (A), 1 (B), 2

Deteksi dengan spektroskopi UV menunjukkan puncak serapan dari 1 dan 2 sama yakni pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 234,5 nm dan 264,5 nm (Gambar 16). Deteksi kemurnian 1 dan 2 dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC) menggunakan fase diam C18 (merek Knauer, panjang 250 x 4,6 mm, kromasil 100-5, tipe kolom vertex), fase gerak metanol : air (30:70), *flow rate* 1 ml/menit, tekanan 210 psi, dilakukan pada panjang gelombang 234,5 nm selama 60 menit. Hasil deteksi tersebut menunjukkan bahwa injeksi 1 menghasilkan kromatogram dengan puncak yang keluar pada menit ke 2,226 dengan area sebesar 54,64 %, dan injeksi 2 menghasilkan kromatogram dengan puncak yang keluar pada menit ke 2,244 dengan area sebesar 15,71 %, dan pada menit ke 2,2377 dengan area sebesar 5,64 %. Puncak-puncak yang muncul belum merupakan puncak tunggal. Puncak kromatogram 1 menunjukkan adanya percabangan titik puncak, dan kromatogram 2 juga terdapat 2 puncak (Gambar 17 dan 18). Hal ini disebabkan masih adanya senyawa lain yang sulit terpisahkan dari isolat, salah satu kemungkinan adalah terdapatnya isomer senyawa.

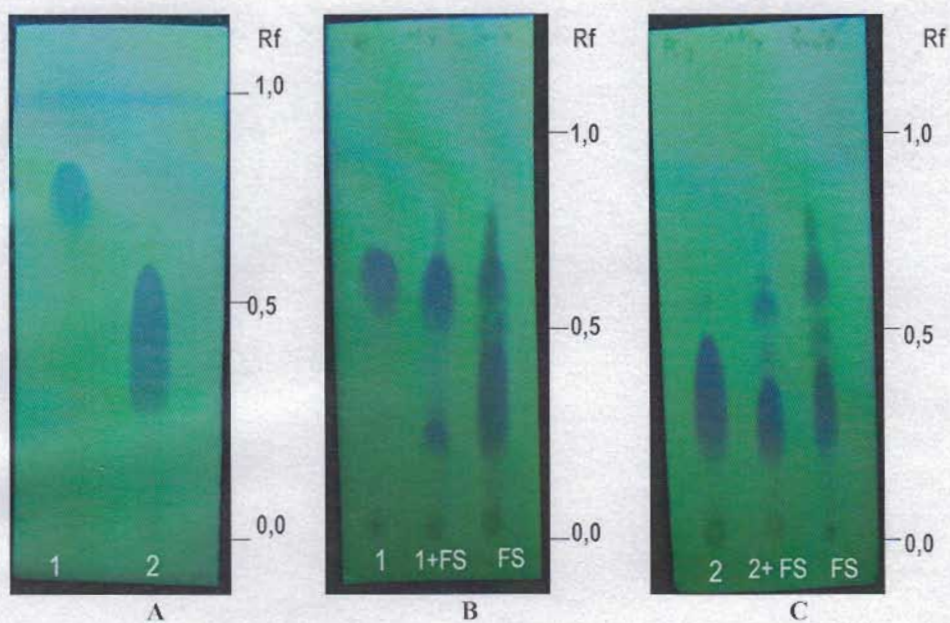


Gambar 17. Kromatogram HPLC 1 pada  $\lambda$  234,5 nm

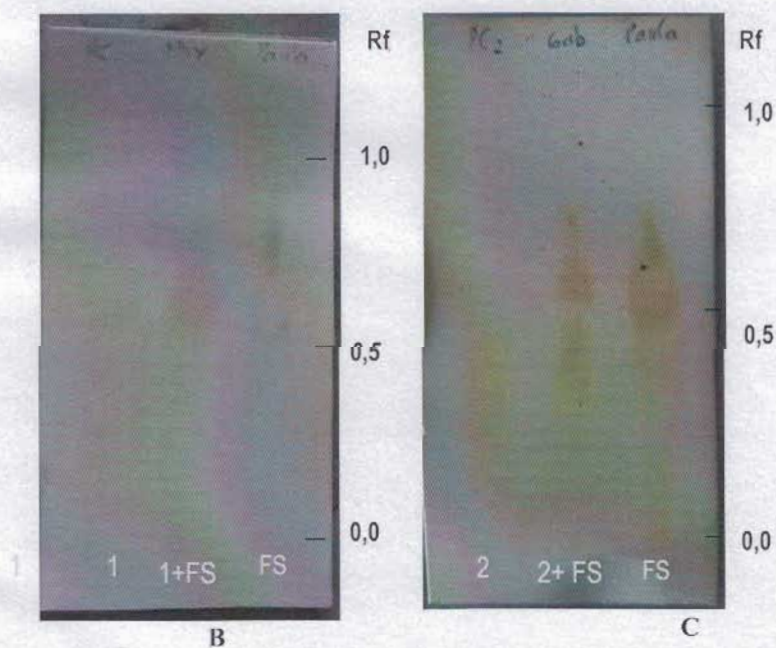


Gambar 18. Kromatogram HPLC 2 pada  $\lambda$  234,5 nm

Berdasar struktur senyawa neolignan tersebut, bisa dimungkinkan adanya 4 macam isomer senyawa sehingga sulit dipisahkan dengan KLT. 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 pengaturannya. Stereoisomer adalah senyawa yang memiliki formula dan pengaturannya yang sama tetapi pengaturannya berbeda (Chang, 1987). Isomer memiliki masa yang sama sehingga sulit mengenalinya bila digunakan analisis spektrometri massa saja, sedangkan HPLC memisahkan berbagai senyawa, tetapi hanya sedikit informasi tentang kemungkinan jenis senyawa. Metode *chiral HPLC* berhasil memisahkan 4 stereoisomer lignan dari *Lobelia chinensis* (Yang *et al.*, 2013), metode tersebut juga digunakan untuk memisahkan enantiomer neolignan licarin A (Pereira *et al.*, 2011).

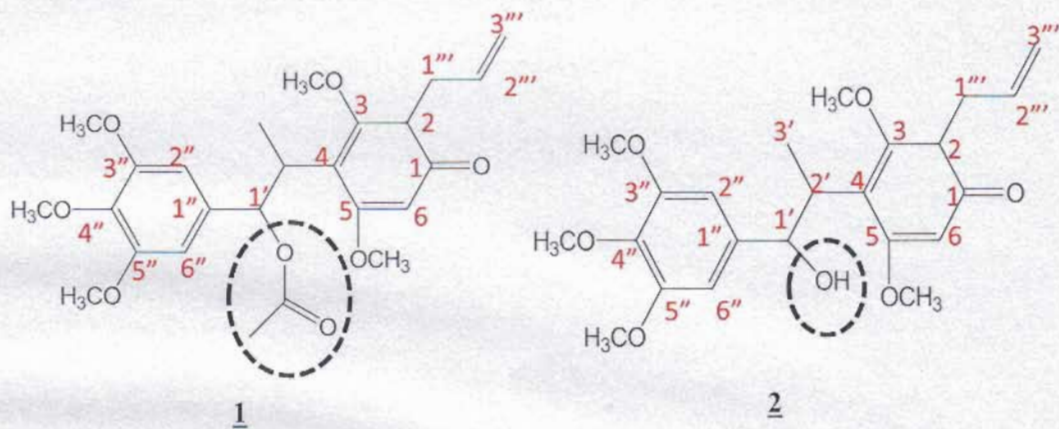


Gambar 19. Kromatogram Lapis Tipis senyawa dengan fase gerak  $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$  (9:1) dan penampak bercak UV 254 nm (A), Bercak tunggal (1) 1 dan (2) 2, (B), Ko-kromatografi 1 dan fraksi standar (FS), (C), Ko-kromatografi 2 dan fraksi standar (FS)



Gambar 20. Kromatogram Lapis Tipis senyawa dengan fase gerak  $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$  (9:1) dan penampak bercak serum sulfat dilanjutkan pemanasan (B), Ko-kromatografi 1 dan fraksi standar (FS), (C), Ko-kromatografi 2 dan fraksi standar (FS)

Senyawa 1 dan 2 hasil isolasi dari ekstrak metanol DPc mempunyai profil KLT yang sama dengan senyawa 1 dan 2 dari ekstrak etanol DPc hasil isolasi Kustiawan (2012), hal ini dibuktikan dengan metode ko-kromatografi. Beberapa penelitian menggunakan metode ko-kromatografi lapis tipis tersebut untuk menegaskan kesamaan suatu senyawa dengan acuan senyawa standar sebagai pembanding (Kanaki *et al.*, 2008; Washid and Argal, 2011; Prabu *et al.*, 2011). Tampak bahwa penggabungan 1 pada fraksi standar tidak menimbulkan adanya bercak baru, demikian juga untuk 2, sehingga dapat disimpulkan isolat 1 dan 2 sama dengan isolat 1 dan 2 dalam fraksi standar (Kustiawan, 2012) (Gambar 19 dan 20).



Gambar 21. Perbedaan struktur kimia 1 dan 2

*Systematic name* 1 adalah (senyawa 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3'', 4'', 5''-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone) dan 2 adalah senyawa 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3'', 4'', 5''-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone (Kustiawan, 2012). Kedua isolat tersebut merupakan senyawa neolignan, keberadaan gugus asetil (OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>) pada C<sub>1</sub>' membedakan 1 dari 2 yang mempunyai gugus hidroksil (OH) yang berturut-turut

mempunyai berat molekul sekitar 460 dan 418 (Kustiawan, 2012) (Gambar 21). Letak bercak 1 pada kromatogram lapis tipis lebih tinggi dibanding 2 karena dengan fase gerak non polar, 1 yang lebih non polar dibanding 2 akan terbawa dan berhenti pada posisi yang lebih tinggi dibanding 2. Asetilasi menurunkan kepolaran suatu senyawa, perhitungan metode log P dengan program MarvinSketch 5.2.5.1 terhadap kedua senyawa tersebut menunjukkan bahwa 2 lebih polar dibanding 1 dengan nilai Log P berturut-turut 1,95 dan 2,39. Hasil uji aktivitas imunomodulator 1 dan 2 menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki aktivitas fagositosis makrofag, proliferasi limfosit, yang tidak berbeda bermakna. Pada penelitian ini perbedaan kepolaran kedua senyawa tersebut tidak berpengaruh pada efek imunomodulator. Hal ini berbeda dengan aktivitas antimikobakterial neolignan pada *P. regnellii*, polaritas yang lebih rendah menunjukkan efek inhibisi mikobakterial yang lebih besar (Scodro *et al.*, 2013).

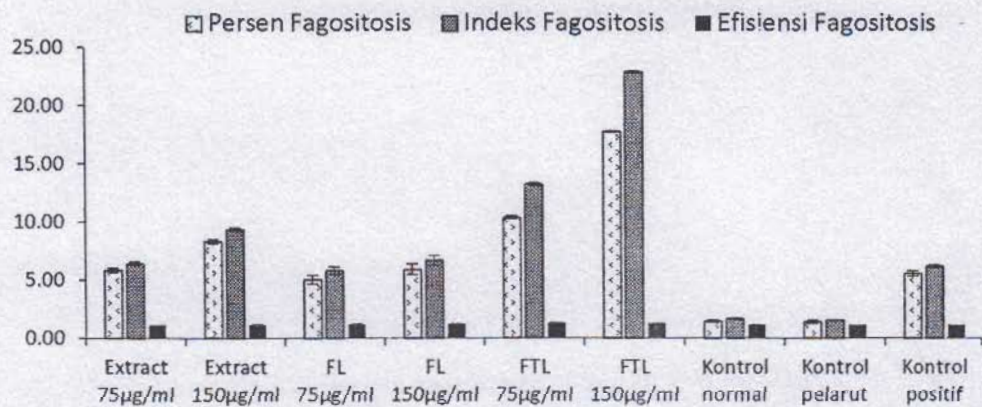
Rendemen 1 maupun 2 dari ekstrak metanol DPc relatif tinggi. Selain dari rendemen, tingginya kadar 1 maupun 2 juga tampak pada kromatogram KLT. Ukuran bercak 1 dan 2 relatif besar dan intensitas warna redaman bercak pada deteksi dengan spektrofotometer UV 254 nm sangat kuat. Proses, peralatan, dan cara deteksi 1 dan 2 yang cukup sederhana, memungkinkan kedua senyawa tersebut dimanfaatkan sebagai senyawa identitas/penanda (*chemical marker*) bagi DPc. Menurut *The European Medicines Agency* (EMA), senyawa penanda 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. Kuantitas senyawa penanda dapat menjadi indikator kualitas obat herbal.

Terdapat 8 klasifikasi senyawa penanda yakni (1) *therapeutic components*, (2) *bioactive component*, (3) *synergistic components*, (4) *characteristic components*, (5) *main components*, (6) *correlative components*, (7) *toxic components*, dan (8) *general components used with fingerprint spectrum* (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. Pemahaman tentang senyawa penanda dan metode analisis khusus untuk senyawa tersebut akan memfasilitasi industri obat herbal untuk memeriksa adanya pemalsuan, sehingga dapat meningkatkan standar produk obatnya (Daniel, 2006). Profil bercak 1 dan 2 berbeda dengan bercak senyawa penanda pada beberapa spesies dari marga *Piper* (Rai *et al.*, 2012; Nitin *et al.*, 2012). 1 dan 2 dapat dijadikan senyawa penanda yakni *therapeutic components* bagi *P. crocatum*. Senyawa penanda dapat dimanfaatkan untuk identifikasi adanya pemalsuan, diferensiasi obat herbal yang dapat berasal dari beberapa sumber, penetapan waktu panen terbaik, konfirmasi tempat tumbuh terbaik, evaluasi kualitas obat herbal, penetapan metode pengolahan bahan obat, uji stabilitas produk obat, diagnosis intoksikasi obat herbal, dan senyawa penuntun bagi penemuan obat baru (Li *et al.*, 2008).

## **B. Hasil Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag secara *In Vitro***

Hasil uji secara *in vitro* aktivitas fagositosis makrofag dari ekstrak dan fraksi hasil pemisahan ekstrak secara partisi (Gambar 22), menunjukkan perbedaan bermakna pada parameter persen fagositosis (PF) dan indeks fagositosis (IF), tetapi tidak bermakna untuk parameter EF baik pada uji ekstrak metanol DPc maupun pada

uji fraksi-fraksi hasil KCV, sehingga uji Tukey dilakukan hanya untuk parameter EF dan IF. Fraksi tak larut metanol 60% dari ekstrak metanol DPc menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag lebih besar dibandingkan ekstrak metanol DPc, FL, kontrol media, kontrol pelarut, maupun kontrol positif oleh karena itu fraksinasi lebih lanjut dilakukan terhadap FTL. Secara *in vitro*, respon imun non spesifik berupa aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diberi perlakuan dengan FTL lebih kuat dibanding perlakuan dengan 100 µg/ml Imboost®. Uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan FTL 150 µg/ml menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag yang tertinggi dan berbeda bermakna dibandingkan perlakuan dengan FTL 75 µg/ml, FL 75 µg/ml FL 150 µg/ml, kontrol media, kontrol pelarut (DMSO 0,15%), maupun kontrol positif, oleh karena itu uji aktivitas fagositosis fraksi-fraksi dari FTL diuji pada kadar 150 µg/ml.



Gambar 22. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

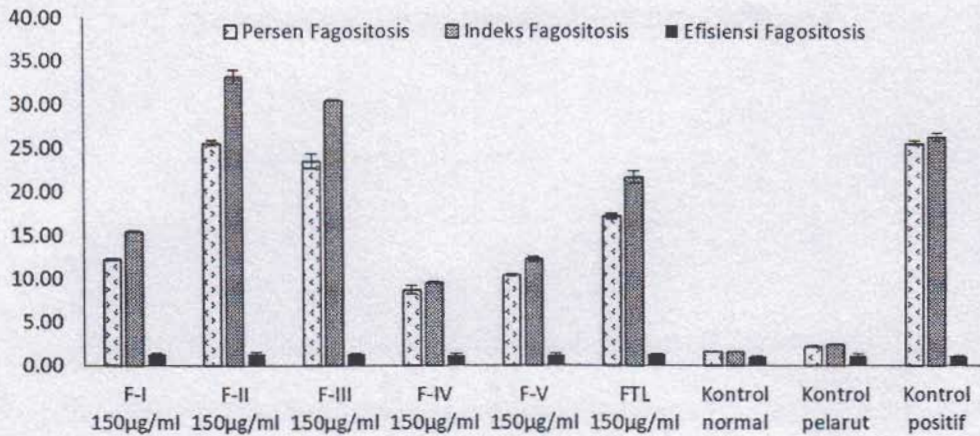
Kontrol positif berupa Imboost® merupakan produk komersial yang mengandung ekstrak *Echinacea* dan Zinc picolinate. Kemampuan ekstrak *Echinacea* dalam meningkatkan fagositosis dilaporkan oleh Bauer (1999). Zinc juga induktor



respon imun dengan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Sing *et al.*, 1994; Mazumder *et al.*, 2012). Kenaikan dosis ekstrak, FL maupun FTL menjadi 2 kali lipat, tidak menunjukkan adanya kenaikan yang sebanding baik untuk parameter PF maupun IF.

Fraksinasi dari FTL dengan metode KCV menghasilkan 11 fraksi. Berdasar kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi tersebut digabung menjadi 5 fraksi. Jumlah fraksi yang terbanyak berturut-turut adalah fraksi III, fraksi IV, fraksi II, fraksi V, fraksi I. Dari tiga kali fraksinasi masing-masing sebanyak 2 gram FTL, berturut-turut menghasilkan 0.41 g, 0.49 g, dan 0.49 g fraksi II (F-II), atau rendemen F-II terhadap FTL sebesar 23.17%. Hasil uji fagositosis makrofag secara *in vitro* terhadap F-I sampai F-V pada dosis 150 µg/ml menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag tertinggi pada perlakuan dengan F-II, oleh karena itu F-II merupakan fraksi yang paling potensial dilanjutkan untuk isolasi senyawa imunomodulator.

Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi-fraksi hasil KCV ekstrak metanol DPc (Gambar 23) menunjukkan bahwa perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/ml menyebabkan PF yang berbeda bermakna terhadap kontrol media dan kontrol pelarut akan tetapi tidak bermakna terhadap kontrol positif. Hal ini menunjukkan perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/ml dan Imboost® menyebabkan PF yang sama. Perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/ml menunjukkan nilai IF yang lebih tinggi secara bermakna dibanding perlakuan dengan kontrol positif, hal ini



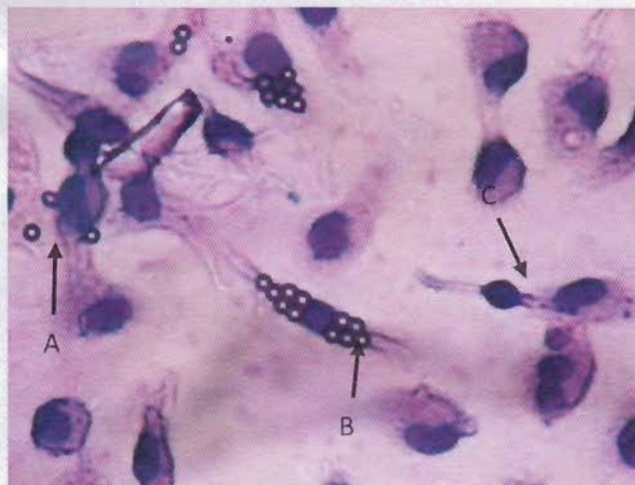
Gambar 23. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi-fraksi hasil KCV pada dosis 150µg/ml

menunjukkan bahwa F-II dosis 150 µg/ml mengaktifkan sejumlah makrofag yang sama banyak tetapi lebih banyak jumlah lateks yang difagositasi dibandingkan perlakuan dengan Imboost®. Secara *in vitro*, pengaruh terhadap respon imun non spesifik dari 150 µg/ml F-II dosis lebih kuat dibanding 100 µg/ml Imboost®.

### C. Hasil Penelitian Pendahuluan Efek Imunomodulator Isolat

Pada penelitian pendahuluan digunakan bahan uji berupa senyawa **2** dengan dosis 10 mg/kgBB. Penentuan dosis didasarkan pada konversi perhitungan dosis pemakaian daun sirih merah sebagai obat tradisional (Lampiran 3). Makrofag peritoneal mencit BALB/c yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes* mampu memfagositasi *latex beads*. Fagositosis mencakup proses penempelan dan ingesti partikel eksogen ke dalam sitoplasma, dimulai dari penempelan partikel pada permukaan sel, munculnya pseudopodia yang dapat memanjang untuk meraih dan memasukkan partikel ke dalam sitoplasma (Ito *et al.*, 1981). *Latex beads* kemungkinan memiliki muatan negatif ringan, rangsangan untuk semua peristiwa

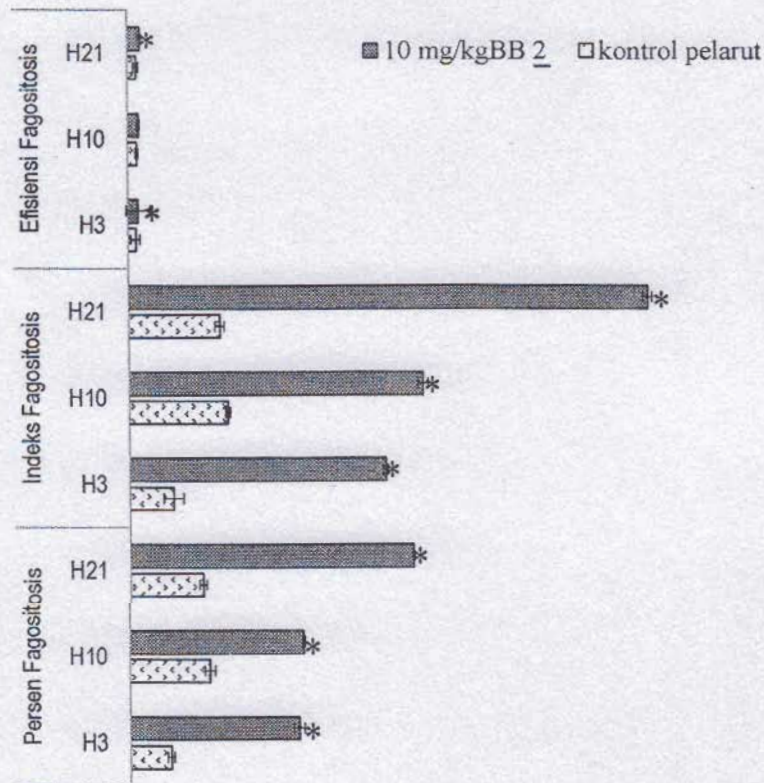
fagositosis kemungkinan karena kontak kimiawi antara partikel lateks dengan amuba. *Latex beads* bersifat inert, jika terakumulasi pada permukaan mikroba, kemungkinan akan mensekresi substansi yang berfungsi mengikat partikel lateks pada sel mikroba (Korn and Weisman, 1967). Secara berurutan *latex beads* akan terikat pada *haemocyte surface active* dari suatu reseptor yang belum diketahui, kemudian pada *focal adhesion kinase* (FAK), dan *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Lamprou *et al.*, 2007). Fagositosis terjadi ketika lateks mulai menempel pada bagian permukaan sel makrofag kemudian masuk ke dalam sitoplasma sel makrofag, kemudian latex beads berada di dalam makrofag (Gambar 24).



**Gambar 24.** Fagositosis lateks oleh makrofag peritoneal mencit setelah diinfeksi dengan *L. monocytogenes* perbesaran 400x (A), makrofag memfagositasi lateks (B), makrofag tidak memfagositasi lateks (C), lateks tidak difagositasi makrofag

Pada uji dengan menggunakan *Listeria* sebagai inductor respon imun, makrofag yang teraktivasi dapat diamati paling awal dua hari setelah infeksi dan mencapai puncak pada hari ke-4 setelah infeksi (Buchmeier and Scriber, 1985). Pada penelitian ini aktivitas makrofag diamati mulai hari ke-3 setelah infeksi. Hasil uji efek imunomodulator pendahuluan berupa aktivitas fagositosis makrofag mencit yang

diberi perlakuan dengan 2 dosis 10 mg/kgBB secara *in vivo* (Gambar 25) menunjukkan bahwa parameter PF mencit kelompok yang diberi perlakuan dengan 2 lebih tinggi dan berbeda bermakna terhadap kontrol. Perbedaan tersebut terjadi pada hari ke-3, ke-10, dan ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Peningkatan PF kelompok perlakuan dengan 2 pada hari ke-3 dan hari ke-10 berbeda tapi tidak bermakna, hal ini terjadi aktivitas makrofag yang merupakan respon imun non spesifik akan muncul segera setelah adanya paparan benda asing dalam hal ini *L. monocytogenes* pada tubuh mencit.



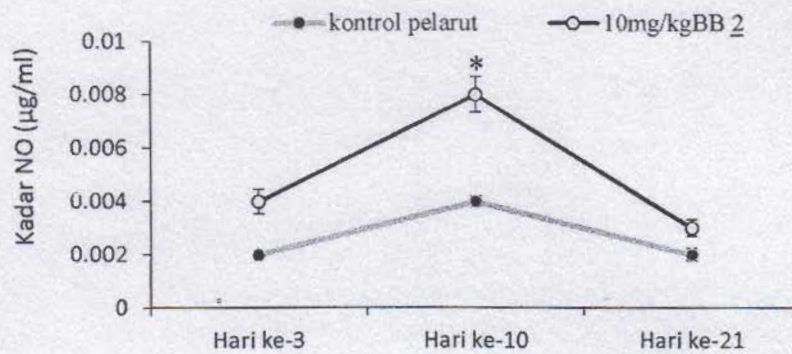
**Gambar 25.** Aktivitas fagositosis makrofag setelah mencit diinfeksi *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean±SD, \*menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Parameter IF menggambarkan jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag, mencit kelompok yang diberi perlakuan dengan 2 menunjukkan IF yang lebih tinggi yang berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Perbedaan tersebut terjadi pada hari ke-3, ke-10, dan ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Pada hari ke-3 jumlah *L. monocytogenes* sudah mencapai puncaknya, banyaknya jumlah mikroba tersebut mampu memacu aktivitas makrofag mencit yang diberi perlakuan dengan 2 sehingga pada hari ke-3 makrofag tersebut mampu memfagositasi lateks dengan jumlah yang meningkat dibandingkan jumlah lateks yang difagositasi oleh makrofag mencit yang hanya diberi perlakuan dengan pelarut. Perbedaan jumlah lateks yang difagositasi oleh makrofag tersebut terjadi pada hari ke-3, hari ke-10, maupun hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Peningkatan IF kelompok perlakuan dengan 2 pada hari ke-3 dan hari ke-10 berbeda tapi tidak bermakna, hal ini kemungkinan terjadi karena hari ke-3 sampai hari ke-10 jumlah *L. monocytogenes* sama pada jumlah puncaknya sehingga respon makrofag juga sama. Seperti pada parameter PF, perbedaan bermakna parameter IF juga terjadi antara hari ke-3 dengan hari ke-21 serta hari ke-10 dengan hari ke-21. Peningkatan PF dari hari ke-3 ke hari ke-21 hampir mencapai 100%, peningkatan IF mencapai lebih dari 100 %.

Efisiensi fagositosis merupakan rasio antara PF dan IF, pada hari ke-3 dan hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*, perlakuan dengan 2 menunjukkan perbedaan EF yang bermakna dibanding perlakuan dengan pelarut. Efisiensi fagositosis pada hari ke-10 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* tidak

menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol, kemungkinan karena jumlah *L. monocytogenes* sudah mulai terjadi penurunan sehingga aktivitas makrofag tidak dapat optimal, oleh karena itu pada penelitian selanjutnya dilakukan infeksi kedua dengan *L. monocytogenes* pada hari ke-10.

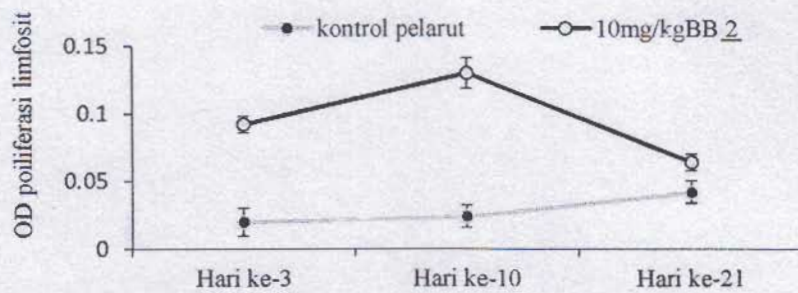
Uji aktivitas produksi NO menunjukkan terjadi perbedaan bermakna pada hari ke-10, antara produksi NO mencit kelompok perlakuan 2 terhadap kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan 2 meningkatkan aktivitas produksi NO pada mencit yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes*.



Gambar 26. Produksi NO setelah mencit diinfeksi *L. monocytogenes*

Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi NO (Abbas *et al.*, 2007), pada penelitian ini terjadi peningkatan produksi NO pada hari ke-10. Pada hari ke-21 mengalami penurunan, sehingga seperti pada hari ke-3 produksi NO menjadi tidak berbeda bermakna terhadap kontrol. Menurut Konishi *et al.* (2005), makrofag yang diaktivasi dengan lipopolisakarida dan interferon- $\gamma$  dan mendapat perlakuan neolignan dari *P. futokadsura* tidak meningkatkan produksi NO bahkan memiliki aktivitas inhibisi produksi NO. Jeong *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa neolignan dapat menghambat produksi NO.

Uji aktivitas proliferasi limfosit juga menunjukkan penurunan kadar sel pada hari ke-10 untuk kelompok perlakuan dengan 2, dan tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas dengan kontrol. Obat-obatan maupun ekstrak yang secara *in vitro* menunjukkan aktivitas, dapat menunjukkan non aktif ketika diuji secara *in vivo*. Hal ini dapat terjadi ketika beberapa sel yang bekerjasama atau mediator sistem yang tidak yang tidak tersedia pada sistem sel *in vitro* merupakan sel yang bertanggungjawab pada efek secara *in vivo* (Wagner, 1999; Kanjwani *et al.*, 2008).

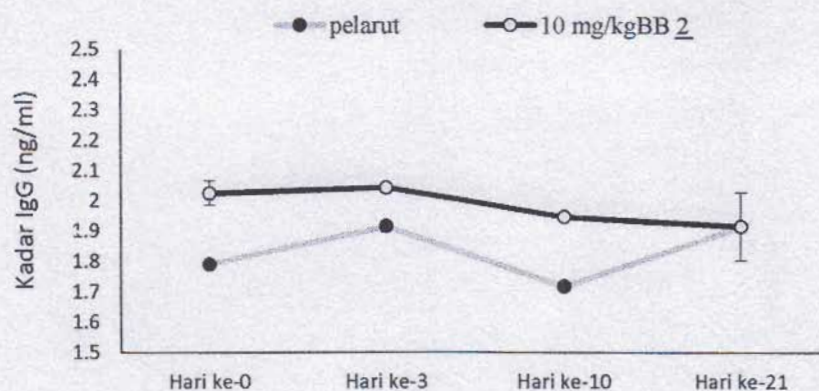


**Gambar 27. Proliferasi limfosit setelah mencit diinfeksi *L. monocytogenes***

Uji proliferasi limfosit secara *in vivo* dan *in vitro* dari DPc smenunjukkan perbedaan hasil. Secara *in vitro*, ekstrak DPc menurunkan proliferasi limfosit (Yuristiyani, 2012). Secara *in vivo*, 2 dalam penelitian ini tidak menunjukkan efek pada proliferasi limfosit, demikian juga ekstrak DPc (Apriyanto, 2011 dan Indriyani 2011). Hal tersebut mengindikasikan bahwa pada uji proliferasi limfosit ini, sel-sel yang bekerjasama atau menjadi mediator sistem yang diukur pada uji *in vivo* berbeda dengan pada uji *in vitro*.

Kadar titer IgG mencit menunjukkan kenaikan sampai puncaknya pada hari ketiga kemudian terjadi penurunan, dan kadar yang sama antara kontrol dan perlakuan dengan 2 terjadi pada hari ke-21. Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar titer

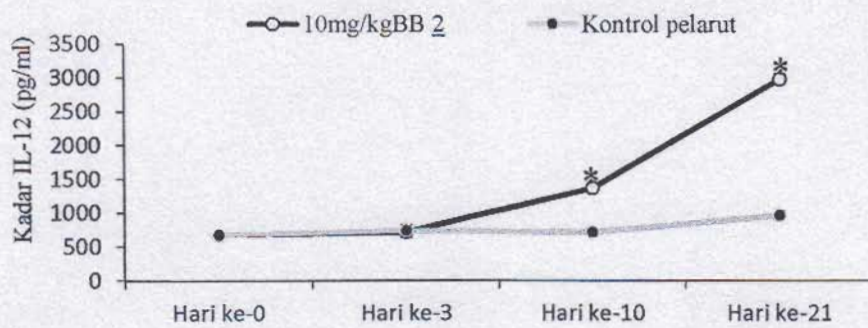
IgG mencit kelompok perlakuan dengan 2 dengan kontrol, perlakuan dengan 2 tidak berpengaruh pada titer IgG. Hal ini kemungkinan karena induksi respon imun dilakukan dengan *L. monocytogenes* yang merupakan bakteri intraseluler, imunitas terhadap bakteri tersebut diperantarai sel (Abbas *et al.*, 2007), imunitas humoral yakni titer IgG tidak terinduksi.



**Gambar 28.** Kadar Titer IgG setelah mencit diinfeksi *L. monocytogenes*

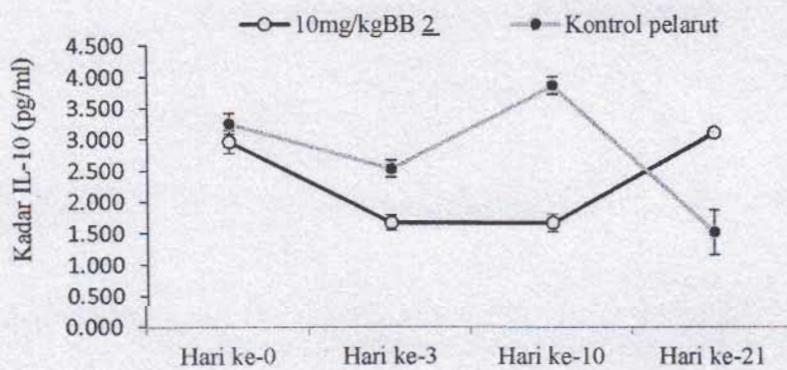
Kadar IL-12 meningkat mulai hari ketiga, peningkatan terjadi sampai hari ke-21, dengan perbedaan bermakna antara mencit kelompok perlakuan dengan 2 dengan kontrol terjadi pada hari ke-10 dan ke-21. Hal ini mungkin disebabkan pada hari ke-10 jumlah patogen sudah optimal mengaktifasi makrofag untuk menginduksi produksi IL-12 karena menurut Unanue (1997), kurva jumlah *L. monocytogenes* yang hidup pada mencit setelah 0-14 hari diinfeksi dengan *L. monocytogenes* menunjukkan sedikit penurunan kemudian naik dan pada hari ketiga sampai hari ke-10 mencapai puncaknya.





**Gambar 29.** Kadar Interleukin 12 setelah mencit diinduksi *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean $\pm$ SD, \*menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Kadar IL-10 menurun dan kemudian mulai meningkat pada hari ketiga, pada kelompok kontrol terjadi penurunan kadar IL-10 pada hari ke-10. Pada hari ke-21 peningkatan aktivitas makrofag, produksi NO, dan produksi IL-12 semakin tinggi, akan tetapi produksi IL-10 tidak berbeda bermakna terhadap kontrol, hal ini mengindikasikan bahwa 2 mempengaruhi sistem imun melalui modulasi sel Th1, sehingga sitokin yang terbentuk bukan IL-10.



**Gambar 30.** Kadar Interleukin 10 setelah mencit diinduksi *L. monocytogenes*.

Interleukin 10 merupakan sitokin anti-inflamasi produk dari sub populasi limfosit yakni T *helper* (Th)2 yang fungsi utamanya menekan produksi beberapa jenis sitokin termasuk IL-12, serta menghambat aktivasi makrofag (Copuer *et al.*, 2008,

Male *et al.*, 2006). Liu *et al.* (2010) juga melaporkan senyawa yang juga mengaktivasi proliferasi makrofag, mampu meningkatkan pelepasan IL-12 tetapi menurunkan pelepasan IL-10.

Berdasar hasil penelitian pendahuluan tersebut, kemudian dilakukan penelitian utama sebagai berikut:

1. Volume pelarut (CMCNa 1 %) dikurangi dari 1 ml perkali asupan menjadi 0,75 ml, karena terjadi fluktuasi berat badan mencit, yang kemungkinan terjadi karena mencit minum banyak pelarut. Untuk uji selanjutnya digunakan volume pelarut 0,75 ml.
2. Karena pada hari ke-10 hasil uji NO dan uji proliferasi limfosit terjadi *trend* penurunan yang kemungkinan disebabkan berkurangnya sel bakteri *L. monocytogenes*, maka hari ke-10 kembali dilakukan induksi ulang dengan 0,2 ml  $5 \times 10^3$  cfu/ml *L. monocytogenes* secara *intra peritoneal*
3. Pengambilan darah dari *plexus infra orbitalis* maksimal 0,5 ml, karena ketika diambil lebih dari 0,5 ml, dapat terjadi kematian mencit.
4. Dosis isolat diturunkan menjadi 5 dan 2,5 mg/kgBB; dosis 10 mg/kgBB tetap diuji karena ada perbedaan teknis penelitian utama dengan penelitian pendahuluan
5. Pengukuran aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO, proliferasi limfosit pada hari ke-10 dan hari ke-21 setelah infeksi *L. monoctoygenes* yang pertama.

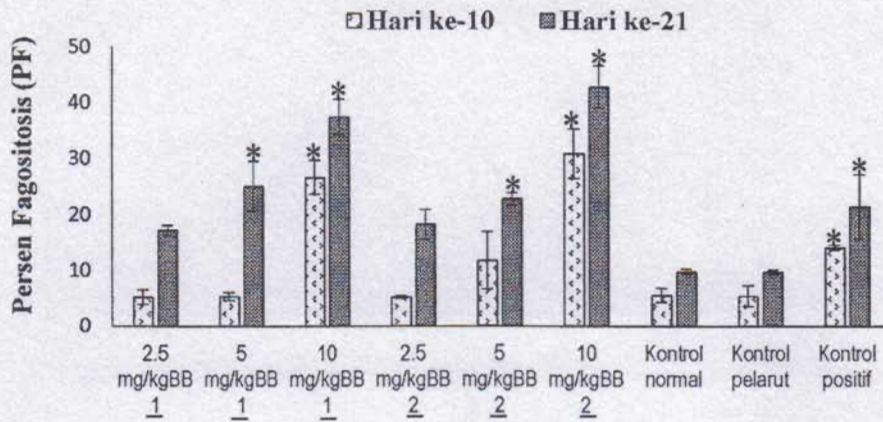
## D. Hasil Penelitian Utama Efek Imunomodulator 1 dan 2

### 1. Aktivitas fagositosis makrofag

Uji aktivitas fagositosis makrofag menunjukkan bahwa 1 maupun 2 mempunyai aktivitas imunostimulan. Persen fagositosis menggambarkan aktivitas makrofag dan IF menggambarkan kapasitas makrofag yang aktif, dalam menanggulangi terjadinya serangan benda asing. Pada dosis 2,5 mg/kgBB baik 1 maupun 2 belum menunjukkan aktivitas yang signifikan, perbedaan PF secara bermakna terjadi pada dosis 5 dan 10 mg/kgBB hal ini juga terjadi untuk parameter IF.

Persen Fagositosis pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*, baik untuk perlakuan dengan 1 maupun 2 dosis 5 mg/kgBB menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut. Pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes*, tampaknya perlu dosis 1 dan 2 yang relatif lebih tinggi untuk dapat mengaktifkan makrofag, pada perlakuan dengan 1 maupun 2 dosis 5 mg/kgBB belum menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol. Perbedaan bermakna terjadi pada perlakuan dengan dosis 10 mg/kgBB baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*.

Reinfeksi dengan *L. monocytogenes* tidak menunjukkan perbedaan PF, pada penelitian pendahuluan dengan sekali infeksi *L. monocytogenes*, pada hari ke-10 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* perlakuan dengan dosis 10 mg/kgBB 2 juga menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol. Hal ini terjadi mungkin karena makrofag merupakan sel pada respon imun non spesifik, sehingga pengulangan infeksi tidak menunjukkan pengaruh terhadap aktivitas makrofag.



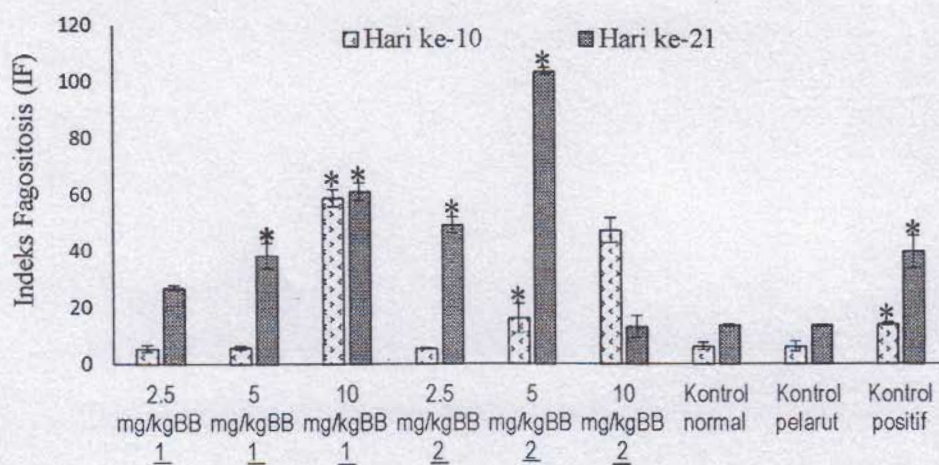
Gambar 31. Efek 1 dan 2 terhadap persentase fagositosis makrofag mencit setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean $\pm$ SD, \* menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Kontrol positif berbeda bermakna dengan kontrol normal dan kontrol pelarut, dan tidak berbeda bermakna dengan 1 maupun 2, hal ini menunjukkan bahwa potensi PF 1 maupun 2 pada dosis 10 mg/kgBB sebanding dengan potensi PF 100 mg/kgBB Imboost<sup>®</sup>.

Indeks fagositosis pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*, baik untuk perlakuan dengan 1 maupun 2 dosis 5 mg/kgBB menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut. Seperti pada PF, untuk dapat meningkatkan IF pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes*, mungkin perlu dosis 1 dan 2 yang relatif lebih tinggi karena pada dosis tersebut 1 maupun 2 dosis 5 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol. Perbedaan bermakna terjadi pada perlakuan dengan dosis 10 mg/kgBB baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Reinfeksi dengan *L. monocytogenes* tidak menunjukkan perbedaan IF, pada penelitian pendahuluan dengan sekali infeksi *L. monocytogenes*, pada hari ke-10

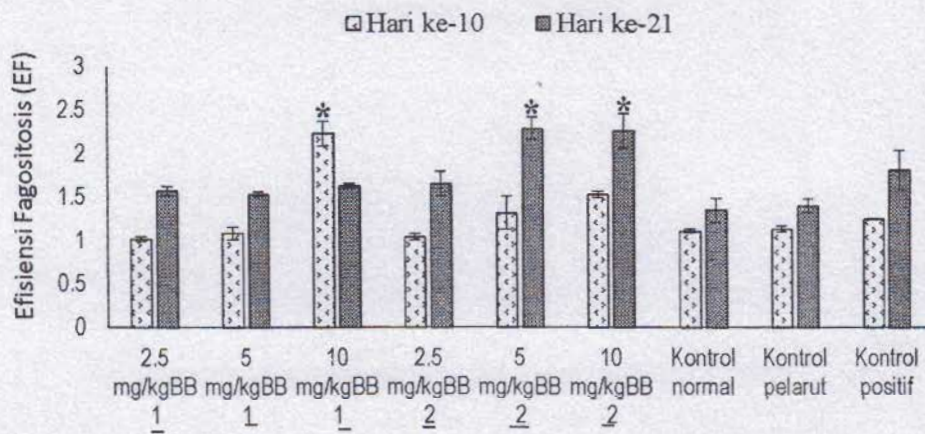
setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* perlakuan dengan dosis 10 mg/kgBB 2 juga menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol.

Perlakuan dengan kontrol positif (Imboost®) menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol (normal dan kontrol) untuk parameter PF, akan tetapi tidak bermakna perbedaannya pada parameter IF. Indeks fagositosis menggambarkan kapasitas makrofag yang aktif dalam menanggulangi terjadinya serangan benda asing. Imboost® tidak menyebabkan perbedaan tingkat aktivitas makrofag dalam melawan serangan benda asing. Pada parameter IF, kontrol positif tidak berbeda bermakna dengan kontrol, baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21, hal ini menunjukkan bahwa potensi IF 1 maupun 2 pada dosis 10 mg/kgBB lebih tinggi dibanding dengan potensi IF Imboost®.



Gambar 32. Efek 1 dan 2 terhadap indeks fagositosis makrofag mencit setelah diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean±SD, \*menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Efisiensi fagositosis perlakuan dengan 2 mulai dosis 5 mg/kgBB berbeda bermakna terhadap kontrol normal dan kontrol pelarut, sedangkan 1 belum menunjukkan perbedaan EF yang bermakna. Efisiensi fagositosis merupakan rasio antara IF dan PF. Penelitian ini menunjukkan bahwa 2 memiliki tingkat EF lebih besar dibandingkan 1. Hasil uji statistik untuk parameter EF menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara perlakuan dengan 1 maupun 2 dengan kontrol positif (Imboost<sup>®</sup>, berisi *Echinaceae* dan zinc picolinate). Beberapa penelitian telah melaporkan efek imunomodulator ekstrak *Echinacea* (Burger *et al*, 1997; Bauer, 1999; Benson *et al.*, 2010). Secara *in vivo* ekstrak *Echinacea* mampu meningkatkan PF dan IF makrofag (Goel *et al.*, 2002), dan kombinasi dengan zinc pada pemberian *Glycyrrhiza glabra* L. juga menyebabkan potensiasi aktivitas fagositosis makrofag (Mazumder *et al.*, 2012).



**Gambar 33.** Efek 1 dan 2 terhadap efisiensi fagositosis makrofag mencit setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean±SD, \*menunjukkan adanya perbedaan bermakna (P<0,05) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa potensi imunostimulan 1 maupun 2 pada dosis 10 mg/kgBB setara dengan 100 mg/kgBB Imboost®. Pada penelitian ini aktivitas fagositosis terjadi pada jumlah makrofag yang teraktifkan maupun pada tingkat aktivitas setiap unit makrofag. Analisis statistik dengan uji korelasi Pearson menunjukkan adanya perbedaan bermakna berkorelasi positif antara persen PF dan IF. Selain meningkatkan jumlah makrofag teraktivasi dalam tubuh mencit, pemberian senyawa uji juga meningkatkan kapasitas individual makrofag untuk fagositosis agen (lateks)

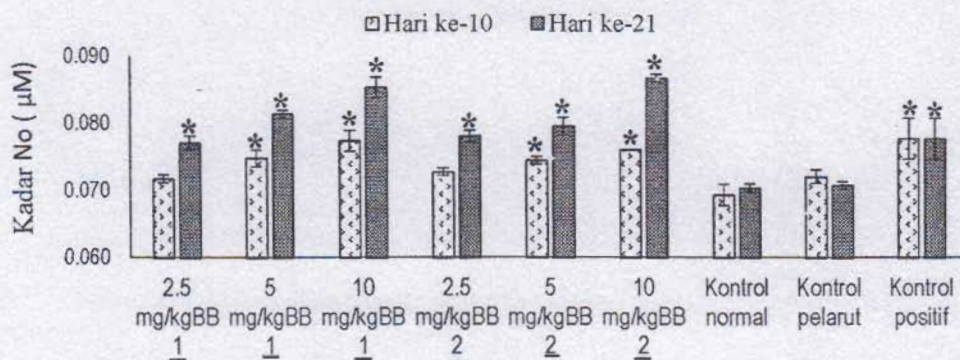
Isolasi senyawa dari 2,12 gram ekstrak metanol DPc diperoleh 12,0 mg 1 dan 12,1 mg 2, sehingga untuk 1 dosis 5 mg/kgBB setara dengan 876 mg/kgBB ekstrak, dan untuk 2 dosis 5 mg/kgBB setara dengan 883 mg/kgBB ekstrak. Perlakuan pada dosis 2,5 mg/kgBB baik 1 maupun 2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibanding kontrol, untuk 1 dosis tersebut setara dengan 442 mg/kgBB ekstrak dan untuk 2 setara dengan 438 mg/kgBB ekstrak. Menurut Apriyanto (2011) dan Indriyani (2011) baik ekstrak etanol maupun ekstrak n-heksana *P. crocatum* pada dosis 100 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa tunggal (1 maupun 2) kurang aktif dibanding ekstrak *P. crocatum*. Ekstrak yang aktivitasnya lebih tinggi dibanding senyawa tunggal dapat terjadi karena adanya efek aditif atau sinergi antara dua atau lebih senyawa dalam ekstrak. Deharo and 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. Pada penelitian ini bercak 1 maupun 2 pada profil KLT tampak relatif besar dan kuat, dibandingkan bercak pada ekstrak tidak terdeteksi adanya perubahan warna. Lebih lanjut uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi hasil pemisahan ekstrak DPc menunjukkan bahwa pada dosis yang sama dengan ekstrak, aktivitas fraksi lebih tinggi sehingga kemungkinan kegagalan mengisolasi senyawa aktif dari ekstrak aktif karena labilnya atau ketidakstabilan senyawa aktif tersebut adalah sangat kecil. Aktivitas senyawa ditentukan oleh struktur senyawa, studi pada teh hijau membuktikan bahwa *epigallo-cathecin gallate*, *epigallocatechin*, *epicatechingallate*, dan *strichnin* mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, tetapi tidak untuk *epicatechin* dan *catechin* (Monobe *et al.*, 2010). Modifikasi struktur kimia dengan gugus asetil dan karboksimetil, menjadi molekul derivat polisakarida mengubah aktivitas imunomodulasi polisakarida secara bermakna (Chen *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diberi perlakuan dengan 1 maupun 2 menunjukkan pola pengaruh aktivitas fagositosis makrofag yang sama, hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus asetil dari gugus hidroksil, pada struktur kimia 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas fagositosis makrofag. Makrofag adalah sel yang bertanggung jawab terhadap respon imun bawaan yang juga berfungsi menginduksi respon imun adaptif, maka hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 dan 2 dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulan khususnya untuk meningkatkan kapasitas dan aktivitas respon imun bawaan.



## 2. Aktivitas produksi nitrit oksid

Pada hari ke 10 mencit yang diberi perlakuan dengan 2,5 mg/kgBB 1 maupun 2,5 mg/kgBB 2 menunjukkan aktivitas produksi NO yang berbeda tidak bermakna dengan kelompok kontrol. Pada hari ke-21, mulai dosis 2,5 mg/kgBB berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut (Gambar 34). Hal ini kemungkinan karena pada hari ke-21, induksi dengan *L. monocytogenes* dan pemberian 2,5 mg/kgBB 1 maupun 2,5 mg/kgBB 2 mampu mengaktivasi produksi NO oleh makrofag. Menurut (Goel *et al.*, 2002) tanpa induksi, NO diproduksi pada tingkat yang dapat dideteksi, dan induksi dengan LPS mengakibatkan kenaikan produksi NO yang bermakna.



Gambar 34. Efek 1 dan 2 terhadap produksi NO setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean±SD, \*menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

Aktivitas produksi NO mencit yang diberi perlakuan dengan kontrol positif berbeda bermakna dengan mencit kelompok kontrol baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21, hal ini menunjukkan bahwa potensi produksi NO mencit yang diberi

perlakuan dengan 1 maupun 2 pada dosis 5 mg/kgBB setara dengan aktivitas produksi NO mencit yang diberi perlakuan dengan Imboost<sup>®</sup> dosis 100 mg/kgBB. Goel *et al.* (2002) telah melaporkan kemampuan ekstrak *Echinacea* untuk meningkatkan produksi NO secara *in vitro* pada hari ke-4 setelah tikus diinduksi dengan lipopolisakarida (LPS).

Dapat dinyatakan bahwa peningkatan aktivitas produksi NO dari mencit yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 pada dosis 2,5; 5 dan mg/kgBB, dan tidak ada efek inhibisi produksi NO. Penelitian lain menemukan bahwa neolignan dapat merupakan inhibitor, tidak menghambat maupun dapat meningkatkan produksi NO. Sebanyak 7 dari 9 neolignan yang diisolasi dari *P. kadsura* memiliki aktivitas antineuroinflamatori dengan menekan pelepasan NO pada BV2 sel yang diaktivasi dengan lipopolisakarida, sedangkan 2 lainnya tidak memiliki aktivitas inhibisi. Neolignan dari *P. futokadsura* memiliki aktivitas inhibisi produksi NO pada *a murine macrophage-like cell line* (RAW 264,7) yang diaktivasi dengan lipopolisakarida dan interferon- $\gamma$  (Konishi *et al.*, 2005). Neris *et al.* (2013) melaporkan bahwa neolignan licarin A tidak berpengaruh pada produksi NO. Aktivitas produksi NO mencit kelompok perlakuan 1 dan 2 menunjukkan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus asetil dari gugus hidroksi pada struktur kimia 1 dan 2 tidak menyebabkan perbedaan aktivitas produksi NO. Inhibisi produksi NO oleh neolignan kemungkinan lebih dipengaruhi oleh ikatan linier dari pada ikatan siklik neolignan (Kim *et al.*, 2010). Pemanjangan rantai karbon menurunkan hambatan produksi NO, dan peningkatan jumlah atom oksigen pada posisi substitusi, menurunkan aktivitas. Ketika atom oksigen dan panjang

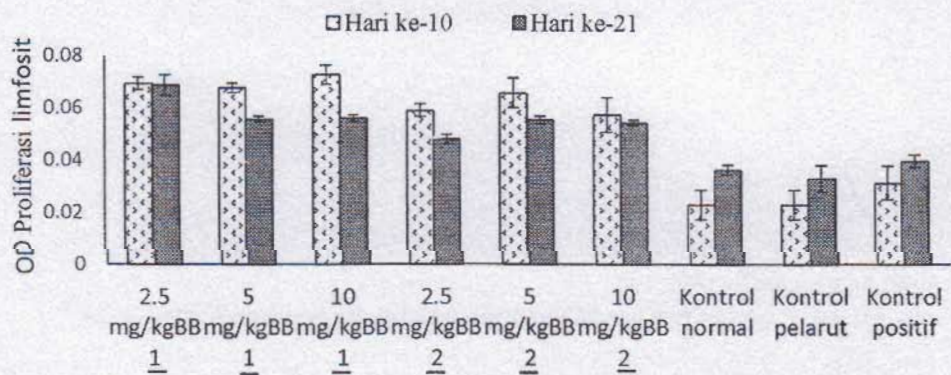
rantai karbon linear meningkat, terjadi pengurangan hambatan produksi NO (Liu *et al.*, 2013).

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; Laskin and Pendino., 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 1 dan 2 relatif tinggi, akan tetapi tidak menyebabkan produksi NO yang berlebihan. Hal ini mungkin disebabkan kedua senyawa tersebut dapat menjaga fungsi sel-sel imun dengan melindunginya dari dampak aktivitas fagositosis makrofag yang berlebihan. Menurut Victor *et al.* (2003), proses stress oksidatif diinduksi endotoksin, makrofag peritoneal menunjukkan peningkatan perlekatan dan fungsi fagositosis serta penurunan kemotaksis. Perubahan tersebut diiringi dengan produksi anion superoksida dan pelepasan TNF $\alpha$  yang tinggi. Dengan demikian, kesetimbangan oksidan-antioksidan merupakan hal kritis pada fungsi sel imun karena hal tersebut menjaga integritas seluler dan mengontrol transduksi sinyal serta ekspresi gen-gen. Ekstrak DPc memiliki aktivitas antioksidan (Suratmo, 2008), kemungkinan 1 dan 2 merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut.

Kemampuan antioksidatif tersebut dapat terjadi melalui penangkapan kelebihan radikal bebas yang dilepaskan makrofag, sehingga tidak berdampak merugikan bagi fungsi sistem imun .

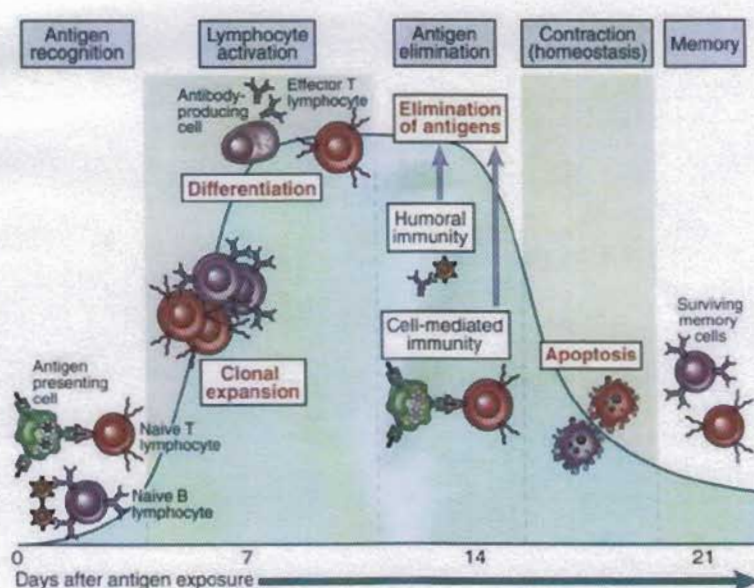
### 3. Aktivitas proliferasi limfosit

Semakin besar dosis 1 dan 2, OD proliferasi limfosit cenderung semakin rendah, jumlah limfosit makin sedikit. Meskipun secara statistik jumlah limfosit kelompok yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 tidak berbeda bermakna ( $P>0,05$ ) dengan kontrol normal dan kontrol pelarut, akan tetapi kedua kelompok menunjukkan pola perubahan jumlah limfosit. Kelompok perlakuan dengan 1 dan 2 menunjukkan pola penurunan jumlah limfosit dari hari ke-10 ke hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*, sedangkan kelompok kontrol menunjukkan pola peningkatan (Gambar 35). Pada penelitian ini jumlah limfosit pada hari ke-21 dari kelompok kontrol meningkat dibanding hari ke-10, demikian juga pada kontrol positif. Kemungkinan karena proses apoptosis terjadi setelah hari ke 21 sehingga jumlah



Gambar 35. Efek 1 dan 2 terhadap proliferasi limfosit setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean $\pm$ SD dari 3 replikasi, perlakuan dengan 1 dan 2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut

limfosit masih tinggi. Respon imun adaptif terdiri dari 3 fase yakni pengenalan antigen, aktivasi limfosit, dan eliminasi antigen (fase efektor). Durasi masing-masing fase dapat bervariasi pada respon imun yang berbeda (Gambar 36) (Abbas *et al.*, 2007). Penurunan jumlah limfosit pada hari ke-21 terjadi pada semua kelompok yang mendapat perlakuan dengan 1 dan 2. Hal ini mengindikasikan bahwa terjadi penekanan produksi limfosit karena perlakuan 1 dan 2.



Gambar 36. Fase-fase respon imun adaptif (Abbas *et al.*, 2007)

Analisis statistik jumlah limfosit pada hari ke-10 maupun hari ke-21 dari kelompok perlakuan 1 dan 2 tidak berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol, sehingga diduga pemberian senyawa tersebut tidak berpengaruh pada aktivitas proliferasi limfosit mencit. Perlakuan dengan kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol normal maupun kontrol pelarut. Hal tersebut mengindikasikan bahwa dalam penelitian ini, aktivitas proliferasi limfosit dari 1 maupun 2 setara dengan Imboost<sup>®</sup>. Apriyanto (2011) dan Indriyani (2011) juga melaporkan bahwa ekstrak DPc tidak menunjukkan efek pada proliferasi limfosit.

Kanjwani *et al.* (2008) memperlihatkan aktivitas immunosupresan pada respon seluler maupun humoral dari ekstrak metanol *Piper betle* L. Menurut Yuristiyani (2012) uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak DPC menekan proliferasi limfosit. Beberapa penelitian tentang aktivitas proliferasi limfosit dari *Echinacea* menunjukkan hasil yang bertentangan. Dilaporkan bahwa efek *Echinacea* terhadap proliferasi limfosit sangat kecil, akan tetapi penelitian lain menunjukkan efek peningkatan proliferasi limfosit yang bermakna (Percival, 2000; South and Exon, 2001; Luettig *et al.*, 1989; Morazzoni *et al.*, 2005). Hal tersebut terjadi kemungkinan karena pengaruh *Echinacea* terhadap proliferasi sel secara tidak langsung, misalnya *Echinacea* merangsang makrofag, dan kemudian terjadi rangsangan pada limfosit (Mishima *et al.*, 2004). Secara *in vivo* kombinasi dengan zinc pada pemberian *Glycyrrhiza glabra* L. juga menyebabkan peningkatan jumlah leukosit (Mazumder *et al.*, 2012).

Gugus OH aromatik pada licarin A dan acuminatin, neolignan dari *Machilus thunbergii*, kemungkinan berperan penting pada aktivitas inhibisi sel kanker A549 (*human lung carcinoma*) dan MCF-7 (*human breast adenocarcinoma*) (Lee *et al.*, 2004). Tsai *et al.* (1998) melaporkan bahwa gugus profenil pada C-1' dari neolignan yang berasal dari *Persea obovatifolia* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih baik pada sel kanker P-388, KB16, A549 dan HT-29, dibandingkan gugus formil pada C-1'. Perlakuan dengan 1 maupun 2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna aktivitas proliferasi limfosit, hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dari gugus OH pada

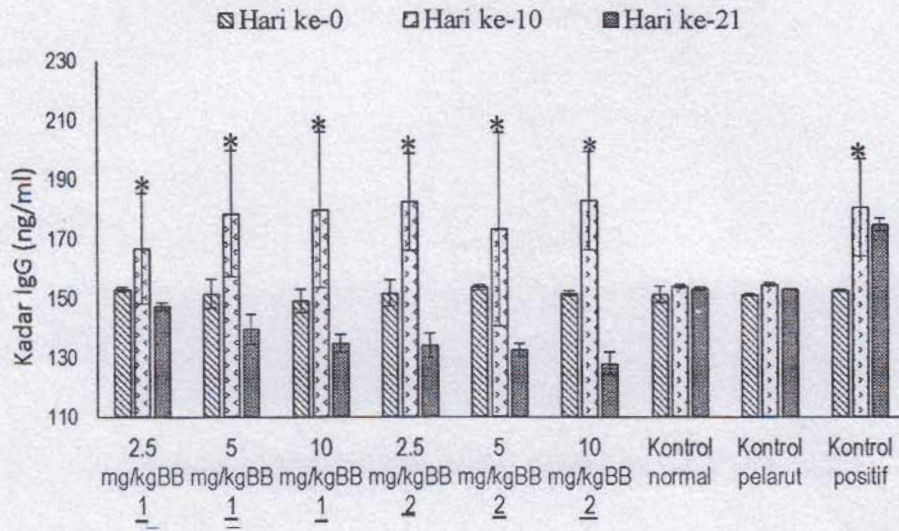
struktur senyawa 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas proliferasi limfosit mencit.

#### 4. Aktivitas produksi imunoglobulin G

Sel B dan antibodi memegang peranan minor, tetapi bermakna selama infeksi *L. monocytogenes* (Zenewicz and Shen, 2007). Terjadinya kenaikan level antibodi IgG dalam serum kambing yang diinfeksi *L. monocytogenes* secara oral mulai hari ke-6 setelah infeksi dan puncaknya dicapai pada hari ke-14 sampai 15 setelah infeksi (Miettinen *et al.*, 1990). Titer IgG susu sapi yang diinfeksi bakteri *L. monocytogenes* naik secara signifikan pada minggu ke-3 (Bourry and Poutrel, 1996). Pada penelitian ini pengukuran titer IgG mencit dilakukan pada hari ke-0, hari ke-10, dan hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Pada kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut titer IgG pada ketiga hari pengukuran tersebut tidak menunjukkan perbedaan bermakna, hal ini menunjukkan bahwa infeksi *L. monocytogenes* tidak menyebabkan perubahan titer IgG pada mencit kelompok kontrol. *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler, respon imun adaptif terhadap bakteri tersebut merupakan imunitas yang diperantai sel (Abbas *et al.*, 2007), sehingga imunitas humoral dalam penelitian ini yakni titer IgG pada kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut tidak menunjukkan perbedaan pada hari ke-0, ke-10 maupun ke-21.

Titer IgG mencit yang diberi perlakuan dengan 1, 2, maupun kontrol positif (Imboost®) menunjukkan pola yang sama bila dibandingkan dengan kelompok kontrol pelarut dan kontrol normal (Gambar 37). Pada hari ke-0 dan pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*, titer IgG tidak menunjukkan perbedaan

bermakna antara mencit yang diberi perlakuan dengan 1, 2 maupun Imboost<sup>®</sup> terhadap kontrol normal dan kontrol pelarut.



**Gambar 37.** Efek 1 dan 2 terhadap titer IgG pada mencit setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Nilai adalah mean $\pm$ SD dari 3 replikasi, \* menandakan terdapat bermakna ( $P < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut

Pada hari ke-0 terjadi karena respon imun mencit belum ditantang dengan infeksi. Perbedaan bermakna titer IgG terjadi pada hari ke-10, akan tetapi nilai standar deviasi relatif sangat tinggi dibandingkan pada hasil pengukuran hari ke-0 dan hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Mempertimbangkan nilai standar deviasi tersebut dan laporan bahwa ekstrak *Echinacea* tidak menunjukkan efek terhadap titer IgG (Dennis, 1999), maka dapat dinyatakan bahwa perlakuan dengan 1, 2 maupun Imboost<sup>®</sup> tidak menyebabkan kenaikan titer IgG pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes*.

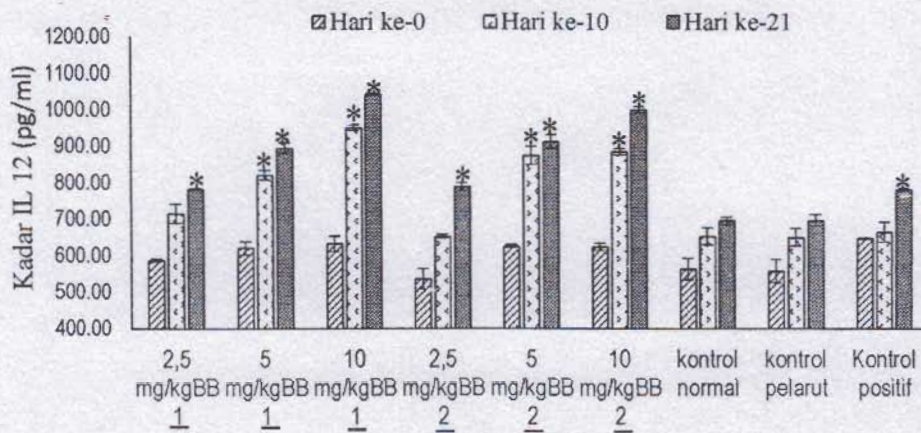
Fase lag dari respon imun primer, yang ditandai dengan munculnya IgM, biasanya muncul pada 5-10 hari setelah masuknya antigen, sedangkan IgG



mencapai puncaknya pada hari ke-10 sampai ke-14. Ketika terjadi pengulangan masuknya antigen, lag fase muncul biasanya pada hari ke-1 sampai ke-3 setelah infeksi ulangan, kadar IgG meningkat jauh lebih tinggi dan berlangsung lebih lama (Abbas *et al.*, 2007; Male *et al.*, 2006). Pada penelitian ini diukur titer IgG pada hari ke-21 (hari ke-11 setelah infeksi ulangan). Kemungkinan titer IgG dapat mengalami kenaikan pada hari pengukuran lebih dari hari ke-21.

### 5. Aktivitas produksi interleukin 12

Produksi IL-12 mencit meningkat dengan meningkatnya dosis baik pada mencit yang diberi perlakuan dengan 1 maupun 2 (Gambar 38). Pada hari ke-0 dimana mencit belum diinfeksi dengan *L. monocytogenes*, kadar IL-12 tidak ada perbedaan bermakna pada semua kelompok perlakuan karena respon imun mencit belum ditantang dengan *L. monocytogenes*.



**Gambar 38.** Efek 1 dan 2 terhadap kadar IL-12 setelah induksi dengan *L. monocytogenes* pada mencit BALB/c. Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, \* menandakan terdapat perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut

Pada hari ke-10 perlakuan dengan 1 dan 2 dosis 2,5 mg/kgBB maupun kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut, perbedaan bermakna baru terjadi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes* perlakuan dengan baik 1 maupun 2 dosis 5 dan 10 mg/kgBB menunjukkan produksi IL-12 berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut.

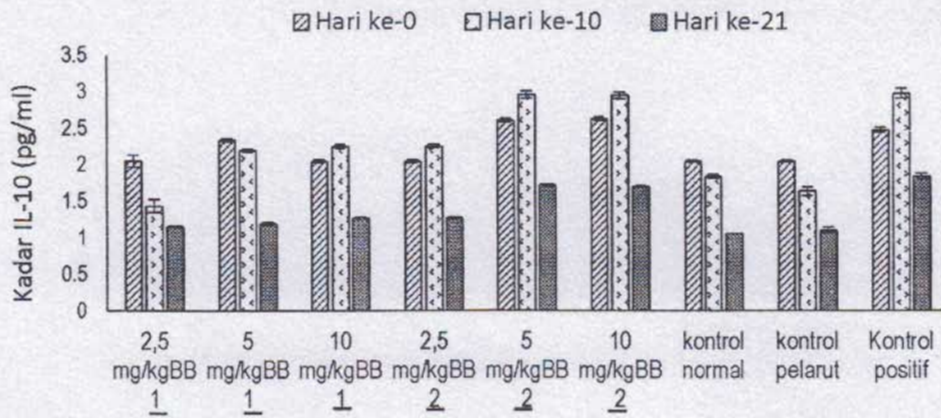
Interleukin 12 dan NO diproduksi oleh makrofag (Abbas *et al.*, 2007, Male *et al.*, 2006), Golab *et al.* (2000) menyatakan bahwa IL-12 tidak berpengaruh pada produksi NO. Hasil penelitian ini menunjukkan tingkat aktivitas produksi IL-12 sebanding dengan tingkat aktivitas produksi NO mencit yang diberi perlakuan dengan 1 maupun 2 dosis 5 dan 10 mg/kgBB. Menurut Unanue (1997), kurva jumlah *L. monocytogenes* yang hidup pada mencit setelah 0-14 hari diinfeksi dengan *L. monocytogenes* menunjukkan sedikit penurunan kemudian naik dan pada hari ketiga sampai hari ke-10 mencapai puncaknya, sehingga jumlah *L. monocytogenes* pada penelitian ini sudah optimal mengaktivasi makrofag untuk menginduksi produksi IL-12. Pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* perlakuan dengan baik 1 maupun 2 dosis 2,5, 5 dan 10 mg/kgBB serta kontrol positif menunjukkan produksi IL-12 berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut. Hal ini menunjukkan bahwa efek terhadap produksi IL-12 dari 1 dan 2 pada dosis 2,5 mg/kgBB setara dengan Imboost®. Penelitian lain juga melaporkan aktivitas ekstrak *Echinacea* dalam meningkatkan produksi IL-12 (Senchina *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2004).

Aktivitas produksi IL-12 mencit kelompok perlakuan 1 dan 2 menunjukkan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus asetil dari gugus hidroksi pada struktur kimia senyawa 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas produksi IL-12. Interleukin 12 merupakan sitokin pro inflamasi yang berperan sebagai mediator respon imun bawaan juga mediator penting antara imunitas bawaan dan imunitas spesifik didapat. Sitokin ini sangat penting pada awal aktivitas seluler yang menghasilkan respon imun yang diperantarai sel, merupakan sitokin kunci pada respon imun tipe T *helper* (Th)1 (Abbas *et al.*, 2007; Hamza *et al.*, 2010).

Perlakuan dengan 1 dan 2 mampu meningkatkan produksi IL-12, hal ini menunjukkan bahwa 1 dan 2 dapat dimanfaatkan sebagai senyawa imunomodulator khususnya meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

#### 6. Aktivitas produksi interleukin 10

Pada semua mencit dengan perlakuan baik 1 maupun 2 dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kgBB serta kontrol positif, aktivitas produksi IL-10 tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut (Gambar 39). Produksi IL-10 tidak dapat terdeteksi pada respon terhadap infeksi primer dan sekunder *L. monocytogenes* (Daugelat *et al.*, 1994), sehingga dapat dinyatakan bahwa 1 dan 2 tidak menunjukkan pengaruh terhadap produksi IL-10 yang berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol. Studi yang lain melaporkan bahwa neolignan mampu *down-regulate* IL-10 secara *in vitro* pada infeksi *Leishmania* (Neris *et al.*, 2013). Hasil penelitian ini juga mengindikasikan bahwa aktivitas produksi IL-10 1 dan 2 setara dengan Imboost®.



Gambar 39. Efek 1 dan 2 terhadap kadar IL-10 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* pada mencit. Nilai adalah mean±SD dari 3 replikasi, perlakuan dengan 1 dan 2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( $P<0,05$ ) terhadap kelompok kontrol normal maupun kontrol pelarut

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Echinacea* meningkatkan produksi IL-10 (Burger *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 2004; Senchina *et al.*, 2005), akan tetapi efeknya terlalu kecil sehingga secara fisiologis tidak relevan. Extract *Echinacea* dapat meningkatkan produksi IL-10, *unknown* konstituen kemungkinan yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut (McCann *et al.*, 2007).

Mekanisme aksi sebagai imunostimulan dari beberapa tanaman obat masih belum jelas (Gertsch *et al.*, 2011), sebagian tanaman obat dapat merangsang sistem imun sedangkan sebagian lainnya menekan respon imun, berbagai metabolit sekunder menunjukkan variasi yang besar dalam aktivitas imunomodulatornya (Kumar *et al.*, 2012).

Interleukin 10 merupakan sitokin anti-inflamasi produk dari sub populasi limfosit yakni T *helper* (Th)2 yang fungsi utamanya menekan produksi beberapa jenis sitokin termasuk IL-12, serta menghambat aktivasi makrofag (Copuer *et al.*, 2008; Male *et al.*, 2006). Studi farmakodinamik mengindikasikan bahwa modulasi

Th1/Th2 merupakan mekanisme aksi yang mungkin untuk terapi sitokin pada berbagai kondisi penyakit (Lissoni *et al.*, 2002; Tabata *et al.*, 1997). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 dan 2 merupakan senyawa yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag, produksi NO, dan IL-12. Namun demikian senyawa tersebut tidak menunjukkan pengaruh perubahan yang bermakna pada proliferasi limfosit dan produksi IL-10. Limfosit yang teraktivasi oleh IL-12 akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2 (Abbas *et al.*, 2007). Perlakuan dengan 1 dan 2 mampu meningkatkan produksi IL-12, akan tetapi tidak mempengaruhi proliferasi limfosit. Diduga 1 dan 2 mengganggu ikatan antara reseptor IL-12 pada limfosit dengan sitokin IL-12, sehingga meskipun kadar IL-12 tinggi, jumlah limfosit tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Hal tersebut diperkuat dengan data bahwa kadar IL-10 tidak dipengaruhi, kemungkinan karena proliferasi limfosit menjadi sel Th2 juga tidak dipengaruhi.

Hidroksikavikol, senyawa yang diisolasi dari ekstrak air daun *P. betle*, dilaporkan memodulasi sistem imun dengan peningkatan sitokin anti-inflamasi (Th2) dan menghambat sitokin pro-inflamasi (Th1) (Pandey *et al.*, 2010). Serupa dengan penelitian ini yakni aktivitas derivat proanthocyanidin A-1 dari *Rhododendron spiciferum*, yang juga mengaktivasi proliferasi makrofag, mampu meningkatkan pelepasan IL-12 dan sitokin Th1 lainnya, menurunkan pelepasan IL-10 dan sitokin Th2 lainnya serta mengatur *Th1/Th2 arms* dari sistem imun (Liu *et al.*, 2010).

Perkembangan limfosit dipengaruhi oleh beberapa sitokin, di antaranya yakni IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, dan IL-12. Interleukin 7 menginduksi awal

perkembangan sel B dan sel T. Interleukin 2 terutama diproduksi oleh limfosit T CD4<sup>+</sup>, berperan memicu proliferasi dan diferensiasi limfosit T, limfosit B, dan sel NK. Interleukin 4 merupakan pemicu utama untuk produksi antibodi IgE dan perkembangan sel Th2 dari sel T naïve CD4<sup>+</sup>. Interleukin 6 memicu pertumbuhan limfosit B yang telah terdiferensiasi menjadi produsen antibodi. Interleukin 12 sangat penting untuk inisiasi rangkaian respon yang melibatkan makrofag, sel NK dan limfosit T. Pelepasan IL-12 memicu sel NK dan sel T untuk memproduksi IFN- $\gamma$ , yang kemudian mengaktivasi makrofag untuk memfagositasi mikroba. Bersama dengan IFN- $\gamma$ , IL-12 memicu diferensiasi sel Th CD4<sup>+</sup> menjadi sel Th1 yang memproduksi IFN- $\gamma$  (Abbas *et al.*, 2007).

#### 7. Pengaruh 1 dan 2 terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal

Pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa pemberian 1 dan 2 tidak berpengaruh pada gambaran histopatologis ginjal. Pemberian 1 tidak menunjukkan pengaruh pada gambaran histopatologis hati, akan tetapi 2 menyebabkan kerusakan (Gambar 40). Pada penelitian ini pemberian 2 dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis ringan pada hati, dosis 5 mg/kgBB 2 menyebabkan degenerasi hidropis sedang, degenerasi hidropis dengan nekrosis *centrolobulus*, inflamasi dan koagulasi. Pemberian 2 dengan dosis 10 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis menyebar (*diffuse*) pada semua mencit. Suatu obat akan lebih dipilih untuk digunakan pada terapi apabila efek merugikan pada gambaran histopatologisnya rendah (Ataman *et al.*, 2006).

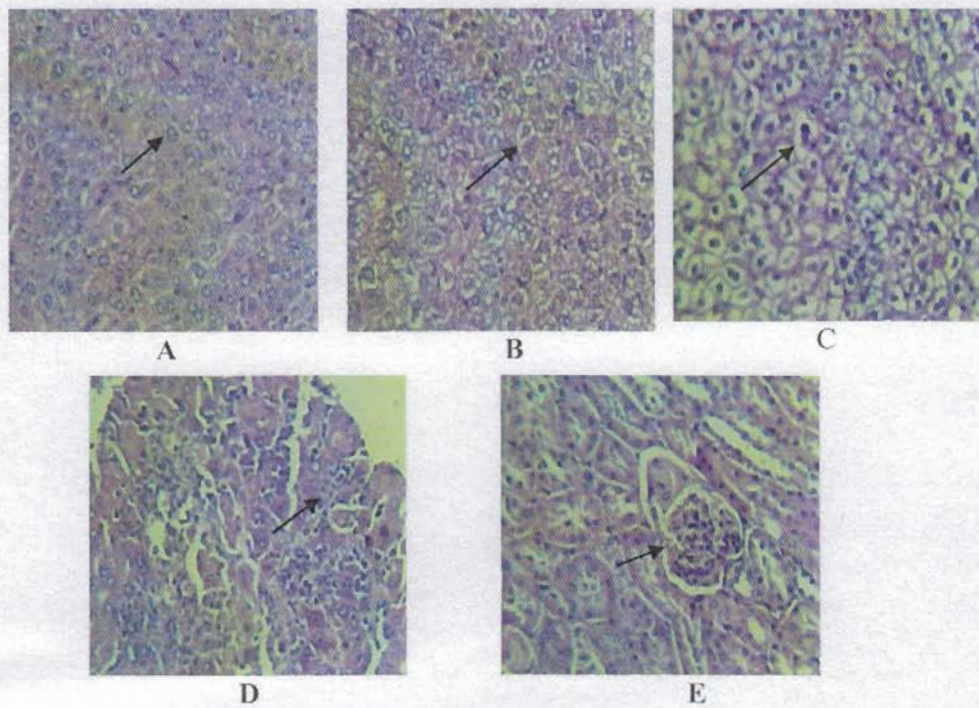
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kenaikan kadar 1 tidak menunjukkan perbedaan efek pada gambaran histopatologis hati dan ginjal. Meskipun tidak

berpengaruh pada ginjal akan tetapi kenaikan dosis 2 menyebabkan efek kerusakan yang meningkat pada hati. Menurut Pepato *et al.* (2010) peningkatan konsentrasi senyawa aktif dalam ekstrak tanaman tidak selalu bermanfaat, bahkan dapat memicu terjadinya efek biologis yang merugikan, hasil penelitian ini mendukung pernyataan tersebut. Kenaikan konsentrasi senyawa 1 meningkatkan efek imunostimulan tanpa menimbulkan efek merugikan pada hati maupun ginjal, tetapi kenaikan konsentrasi 2 menyebabkan peningkatan derajat kerusakan hati.

**Tabel 3.** Efek perlakuan dengan 1 dan 2 terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal pada hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*

Perlakuan	Jumlah mencit	Efek pada liver	Efek pada ginjal
2.5 mg/kgBB <u>1</u>	3	100% mencit normal	100% mencit normal
5 mg/kgBB <u>1</u>	3	100% mencit normal	100% mencit normal
10 mg/kgBB <u>1</u>	3	67 % mencit normal, 33% mencit degenerasi hidropis sedang	100% mencit normal
2.5 mg/kgBB <u>2</u>	3	67 % mencit degenarasi hidropis sedang, 33% mencit normal	100% mencit normal
5 mg/kgBB <u>2</u>	3	67 % mencit degenarasi hidropis sedang, 33% mencit degenarasi hidropis sedang, degenarasi hidropis dengan nekrosis <i>centrolobulus</i> , inflamasi dan koagulasi	100% mencit normal
10 mg/kgBB <u>2</u>	3	67 % mencit degenerasi hidropis difus, 33% mencit degenerasi hidropis <i>difuse</i> dengan nekrosis local	100% mencit normal
Kontrol normal	3	100% mencit: normal	100% mencit normal
Kontrol pelarut	3	100% mencit: normal	100% mencit normal
<i>Kontrol positif</i>	3	67 % mencit normal, 33% mencit degenerasi hidropis sedang	100% mencit normal

Degenerasi hidropis adalah keadaan dimana terjadi peningkatan jumlah air di dalam sel yang menyebabkan sitoplasma dan organel sel lemak membengkak dan bervakuola. Secara mikroskopis, degenerasi hidropis terjadi ketika tampak adanya vakuola berbatas tidak jelas di dalam sitoplasma.



Gambar 40. Efek perlakuan dengan 1 dan 2 terhadap gambaran histopatologis hati (A,B,C,D) dan ginjal (E) mencit pada hari ke-21 setelah induksi dengan *L. monocytogenes*, dengan pewarnaan HE, perbesaran 400X (A), hepatosit pada hati normal (B), hepatosit yang mengalami degenerasi hidropis sedang (C), hepatosit yang mengalami degenerasi hidropis difus (D), hepatosit yang mengalami nekrosis (E), glomerulus pada ginjal normal

Degenerasi hidropis merupakan perubahan yang bersifat *reversible*, sehingga apabila paparan bahan toksik dihentikan, sel yang mengalami kerusakan akan kembali normal. Nekrosis terjadi karena proses degenerasi yang melanjut sebagai perubahan pada sel yang bersifat *irreversible* yang menyebabkan kematian sel. Kerusakan berupa nekrosis bersifat *irreversible* sehingga hepatosit tidak dapat kembali ke bentuk normal. Degenerasi hidropis dapat terjadi karena hipoksia, virus, bakteri, senyawa toksik, radikal bebas, kerusakan akibat iskemik hati, terutama pada lokas sentrolobulus hepatosit.



Kerusakan mitokondria sel hepatosit menyebabkan penghentian produksi ATP, sehingga pasokan energi pada sel tersebut berkurang. Hal ini mengakibatkan fungsi pompa natrium untuk meningkatkan tekanan osmosis dalam sel mengalami kegagalan, kemudian terjadi perubahan permeabilitas selektif pada membran seluler yang menyebabkan masuknya molekul air dari luar ke dalam sitoplasma. Masuknya air ke dalam sitoplasma menyebabkan sel membengkak, tampak pucat, dan lebih berat. Secara mikroskopis, pada sel tersebut tampak vakuola dalam sitoplasma dan dinding selnya tidak berbatas dengan jelas (Thomson *et al.*, 1995; Dancygier and Schirmacer, 2010).

Isolat 2 menyebabkan kelainan pada hati tetapi tidak pada ginjal, hal ini mungkin disebabkan karena hati merupakan organ yang memproses metabolisme obat (1 maupun 2) setelah obat tersebut diabsorpsi oleh usus. Proses selanjutnya yakni detoksifikasi dan konjugasi menjadi bentuk terlarut atau bentuk terionisasi sehingga dapat dieksresikan oleh ginjal. Pemberian 2 kemungkinan mempengaruhi hati dan menimbulkan perubahan patologis. Nugraha (2010) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun *P. crocatum* menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal ayam, kemungkinan penyebab perubahan patologis pada hati tersebut adalah 2. Penyebab perubahan patologis pada organ ginjal kemungkinan merupakan senyawa selain 1 dan 2 yang terdapat dalam ekstrak daun *P. crocatum*.

Dosis 10 mg/kgBB 2 menyebabkan degenerasi hidropis menyebar (*diffuse*) dengan nekrosis lokal. Dosis 2 sebesar 2,5 mg/kgBB setara dengan dosis ekstrak sebesar 438 mg/kgBB, karena menyebabkan kerusakan hati maka pemakaian ekstrak dengan dosis dalam jangka waktu lama tidak dianjurkan. Pemakaian dosis

tersebut sebaiknya berkala yakni hanya pada saat pasien membutuhkan imunostimulan, dengan monitoring kondisi klinis hati pasien. Wiweko (2010) dan Wahyudi (2010) melaporkan bahwa ekstrak etanol maupun ekstrak heksana dari DPc pada dosis 300 mg/kgBB tidak menyebabkan kerusakan pada ginjal dan hati, sehingga dosis ekstrak sebesar 300 mg/kgBB merupakan dosis yang dianjurkan untuk pengobatan menggunakan DPc.

Studi histopatologis terhadap spesies *Piper* yang lain juga melaporkan tentang adanya efek hepatotoksik. Perlakuan dengan ekstrak etanol *P. guineense* pada dosis 20 mg/kgBB menyebabkan induksi hepatotoksik pada tikus (Obeye *et al.*, 2007; Umoh *et al.*, 2013). Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa efek pada gambaran histopatologis pemberian 1 setara dengan Imboost<sup>®</sup>. Isolat 1 maupun kontrol positif tidak menunjukkan efek pada gambaran histopatologis ginjal maupun hati. Seperti pada penelitian ini, ketidaktoksikan ekstrak *Echinacea purpurea* pada ginjal dan hati juga dilaporkan oleh Gerami *et al.* (2008).

Hasil isolasi 1 dan 2 dalam penelitian ini secara uji kemurnian KLT menunjukkan bercak tunggal dalam berbagai fase gerak (deteksi dengan UV<sub>254</sub>) tetapi deteksi dengan menggunakan pereaksi serium \]sulfat terlihat adanya bercak diatas bercak isolat 2. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 2 belum murni. Jika isolat 1 dan 2 murni maka pengaruh gambaran histopatologi dapat digambarkan sebagai berikut. Isolat 1 dan 2 merupakan neolignan yang strukturnya mirip dengan perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> pada 1 dan gugus OH pada 2 (Kustiawan, 2012). Penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dengan gugus OH pada atom C<sub>1'</sub> pada 1 dan 2 menyebabkan efek yang berbeda pada hati mencit. Meskipun

tidak menyebabkan efek kerusakan pada ginjal akan tetapi gugus OH pada atom karbon C<sub>1</sub> 2 tampaknya merupakan penyebab kerusakan pada hati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kong *et al.* (2005) bahwa keberadaan paling tidak satu gugus OH bebas sangat penting untuk menginduksi terjadinya sitotoksitas. Perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dan OH pada neolignan dari *Piper regnelii* juga merupakan penentu perbedaan aktivitas inhibisi terhadap pertumbuhan *Trypanosoma cruzi*. Setelah metilasi, eupomatenoid-5, eupomatenoid-6, dan conocarpan menunjukkan aktivitas yang lebih rendah, sehingga tampaknya kehilangan gugus OH pada neolignan tersebut menurunkan aktivitasnya (Luize *et al.*, 2006).

Proantosianidin A-1 menunjukkan efek yang mirip dengan 1 yakni peningkatan aktivitas fagositosis makrofag maupun produksi IL-12, dan menekan produksi IL-10 akan tetapi belum ada laporan tentang efek hitopatologisnya pada ginjal dan hati. Licarin A, merupakan neolignan yang menunjukkan efek supresan pada produksi IL-10, dan pemeriksaan toksisitasnya, menunjukkan arsitektur histologis hati dan ginjal maupun fungsi biokimiawi yang normal. Licarin A juga memiliki gugus OH akan tetapi pada atom karbon C<sub>4</sub>' (Leon-Diaz *et al.*, 2013).

Asetilasi pada polisakarida dari *Ganoderma atrum* mampu meningkatkan kapasitas fagositosis makrofag dan sekresi TNF (Chen *et al.*, 2014). Perbedaan aktivitas senyawa karena keberadaan OH pada neolignan yang digantikan oleh CH<sub>3</sub> terjadi pada obovaten dan perseal D. Perseal D memiliki 3 OH yakni pada C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>, dan C<sub>4</sub>. Struktur obovaten sama dengan perseal D, akan tetapi hanya memiliki 2 OH, karena OH pada C<sub>5</sub> digantikan CH<sub>3</sub>. Obovaten menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dibanding perseal D, terhadap sel kanker P-388, KB16,

A549 dan HT (Tsai *et al.*, 1998). Gambar struktur perseal D, obovaten, proantosian A-1, dan licarin A terdapat pada Lampiran 3.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 yang tidak memiliki gugus OH pada C<sub>1'</sub> tidak menyebabkan efek perubahan gambaran histopatologis pada ginjal dan hati. Isolat 2 yang memiliki gugus OH pada C<sub>1'</sub> aman bagi ginjal akan tetapi menyebabkan perubahan gambaran histopatologis pada hati.



## BAB V

### PEMBAHASAN UMUM

Maserasi terhadap 1,9 kg serbuk daun *Piper crocatum* (DPc) yang berasal dari pengeringan 8,26 kg DPc segar menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap DPc segar sebesar 23 %, rendemen ekstrak terhadap DPc segar sebesar 2,7 %, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk DPc sebesar 11,8 %. Rendemen tersebut relatif lebih tinggi dibandingkan ekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut n-heksana maupun etanol (Wahyudi, 2010; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013; Aprianto, 2010) Hasil ekstraksi terhadap DPc menunjukkan bahwa maserasi menggunakan pelarut yang sama dapat menghasilkan rendemen yang berbeda, hal ini mungkin disebabkan tempat tumbuh tanaman dan teknis pelaksanaan maserasi yang berbeda, sehingga hasil ekstraksi berbeda (Wahyudi, 2010; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013; Aprianto, 2010; Wiweko, 2010; Tirta, 2010; Yuristiyani, 2012; Werdani, 2012; Kurniawan, 2011).

Digunakan 2 macam komposisi pelarut pada kromatografi cair vakum (KCV) untuk mendapatkan fraksi yang berisi senyawa 1 dan 2. Fraksinasi terhadap 2 gram ekstrak metanol DPc menggunakan gradisen pelarut, berturut-turut n-heksana, n-heksana:etil asetat (9:1), n- heksana:etil asetat (8:2), n-heksana:etil asetat (7:3), n heksana:etil asetat (6:4), n heksana:etil asetat (5:5), n heksana:etil asetat (4:6), n heksana:etil asetat (3:7), n heksana:etil asetat (2:8), n heksana:etil asetat (1:9), dan etil asetat menghasilkan 11 fraksi. Berdasarkan kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi tersebut digabung menjadi 5 fraksi, dan berat total fraksi 1,71 g. Fraksinasi yang kedua dengan menggunakan pelarut 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. Pemisahan dengan KCV terhadap 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan berat total fraksi 1,78 gram. Kedua macam komposisi pelarut menghasilkan rendemen fraksi yang hampir sama. Untuk mendapatkan senyawa 1 dan 2 komposisi pelarut pada fraksinasi kedua lebih baik karena senyawa 1 dan 2 yang tampak pada profil KLT langsung dapat dideteksi pada 2 fraksi dari 5 fraksi yang dihasilkan. Proses isolasi dengan KLT preparatif bisa dilakukan langsung terhadap kedua fraksi tersebut, sehingga lebih efisien waktu dan biaya.

Isolasi senyawa imunomodulator dengan metode KLT preparatif dari 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan 12,0 mg isolat 1 dan 12,1 mg isolat 2 yang murni secara KLT, atau rendemen isolat 1 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,57 %, demikian juga isolat 2 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,57 %. Banyaknya kadar isolat 1 dan 2 juga tampak dari kromatogram KLT, bercak isolat 1 dan 2 tampak besar dan warna biru pada deteksi dengan spektrofotometer UV menunjukkan warna dengan intensitas yang relatif kuat.

Isolat 1 dan 2 yang diisolasi tersebut berpendar warna biru ungu dibawah sinar UV 254 nm, tidak tampak dibawah sinar UV 366 nm, berwarna coklat pada deteksi dengan serium (IV) sulfat dan pemanasan. Isolat 1 dan 2 berturut-turut mempunyai harga Rf 0,7 dan 0,3 pada fase gerak kloroform:etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0,9 dan 0,8 pada fase gerak heksan:etil asetat (3:1), dan Rf 0,6 dan 0,3 pada fase gerak heksan:aseton (3:1), dan Rf 0,7 dan 0,4 pada fase gerak kloroform:etil asetat (9:2). Kedua neolignan yang telah diisolasi dari DPc mempunyai struktur kimia yang mirip. Senyawa 1 memiliki gugus asetil ( $OC_2H_3$ ), berbeda dari senyawa 2 yang

memiliki gugus hidroksil (OH) (Kustiawan, 2012). Keberadaan gugus  $OC_2H_3$  pada  $C_1'$  membedakan 1 dari 2 yang mempunyai gugus OH. Letak bercak isolat 1 pada kromatogram lapis tipis (KLT) lebih tinggi dibanding 2 karena dengan fase gerak non polar, 1 yang lebih non polar dibanding 2 akan terbawa dan berhenti pada posisi yang lebih tinggi dibanding 2. Hasil uji aktivitas imunomodulator 1 dan 2 menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki efek imunomodulator yang mirip. Pada penelitian ini perbedaan kepolaran kedua senyawa tersebut tidak berpengaruh pada efek imunomodulator. Hal ini berbeda dengan aktivitas antimikobakterial neolignan pada *P. regnellii*, polaritas yang lebih rendah menunjukkan efek inhibisi mikobakterial yang lebih besar (Scodro *et al.*, 2013).

Rendemen isolat 1 maupun 2 dari ekstrak metanol DPc relatif tinggi. Selain dari rendemen, tingginya kadar 1 maupun 2 juga tampak pada kromatogram KLT. Ukuran bercak isolat 1 dan 2 relatif besar dan intensitas warna redaman bercak pada deteksi dengan spektrofotometer UV 254 nm sangat kuat. Proses, peralatan, dan cara deteksi isolat 1 dan 2 yang cukup sederhana, memungkinkan kedua senyawa tersebut dimanfaatkan sebagai senyawa identitas/penanda (*chemical marker*) bagi daun *P. crocatum*. Menurut *The European Medicines Agency* (EMA), senyawa penanda 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. Kuantitas senyawa penanda dapat menjadi indikator kualitas obat herbal. Terdapat 8 klasifikasi senyawa penanda yakni (1) *therapeutic components*, (2) *bioactive component*, (3) *synergistic*



*components*, (4) *characteristic components*, (5) *main components*, (6) *correlative components*, (7) *toxic components*, dan (8) *general components used with fingerprint spectrum* (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. Pemahaman tentang senyawa penanda dan metode analisis khusus untuk senyawa tersebut akan memfasilitasi industri obat herbal untuk memeriksa adanya pemalsuan, sehingga dapat meningkatkan standar produk obatnya (Daniel, 2006). Senyawa 1 dan 2 dapat dijadikan senyawa penanda yakni *therapeutic components* bagi *P. crocatum*. Senyawa penanda dapat dimanfaatkan untuk identifikasi adanya pemalsuan, diferensiasi obat herbal yang dapat berasal dari beberapa sumber, penetapan waktu panen terbaik, konfirmasi tempat tumbuh terbaik, evaluasi kualitas obat herbal, penetapan metode pengolahan bahan obat, uji stabilitas produk obat, diagnosis intoksikasi obat herbal, dan senyawa penuntun bagi penemuan obat baru (Li *et al.*, 2008).

Kontrol positif yakni Imboost<sup>®</sup> merupakan produk komersial yang mengandung ekstrak *Echinace purpurea* dan zinc picolinate, beberapa penelitian telah melaporkan efek imunomodulator ekstrak *Echinacea purpurea* (Burger *et al.*, 1997; Bauer, 1999; Goel *et al.*, 2002; Benson *et al.*, 2010), dan zinc (Singh *et al.*, 1994, Matzumder *et al.*, 2012)). Aktivitas fagositosis makrofag dari *E. purpurea* secara *in vitro* juga telah dilaporkan (Wildfeuer dan Mayerhofer, 1994). Hasil uji secara *in vitro* aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit dari ekstrak dan fraksi hasil pemisahan ekstrak secara partisi menunjukkan bahwa perlakuan dengan 75 µg/ml

ekstrak maupun 75 µg/ml fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol DPc menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag yang lebih tinggi dibanding 100 µg/ml Imboost®.

Hasil uji efek imunomodulator mencit yang diberi perlakuan dengan 2 dosis 10 mg/kgBB secara *in vivo* berbeda bermakna terhadap kontrol pada hari ke-3, ke-10, dan ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-3 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* aktivitas fagositosis makrofag meningkat. Kelompok yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag yang lebih tinggi dibanding kontrol, sehingga dapat dinyatakan bahwa kedua senyawa tersebut meningkatkan respon imun non spesifik mencit yakni aktivitas fagositosis makrofag.

Uji aktivitas produksi nitrit oksid (NO) menunjukkan terjadi peningkatan yang berbeda bermakna antara produksi NO mencit kelompok perlakuan 2 terhadap kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan 2 mempengaruhi aktivitas produksi NO pada mencit yang diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi NO (Abbas *et al.*, 2007), dalam penelitian ini mencit yang diberi perlakuan dengan 2 mengalami kenaikan aktivitas makrofag, sehingga produksi NO juga meningkat.

Secara *in vitro* ekstrak etanol DPc menurunkan proliferasi limfosit (Yuristiyani (2012). Sebaliknya, secara *in vivo* ekstrak DPc tidak menunjukkan efek pada proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011). Uji *in vivo* 2 juga menunjukkan bahwa senyawa yang diisolasi dari DPc tersebut tidak menunjukkan efek pada proliferasi limfosit. Kemungkinan sel-sel yang bekerjasama atau mejadi mediator sistem yang diukur pada uji *in vitro* berbeda dengan pada uji *in vivo*.

Kadar titer IgG mencit menunjukkan kenaikan sampai puncaknya pada hari ketiga kemudian terjadi penurunan, dan kadar yang sama antara kontrol dan perlakuan dengan 2 terjadi pada hari ke-21. Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar titer IgG mencit kelompok perlakuan dengan 2 dengan kontrol, sehingga perlakuan dengan 2 tidak berpengaruh pada titer IgG.

Kadar IL-12 meningkat mulai hari ketiga, peningkatan terjadi sampai hari ke-21, dengan perbedaan bermakna antara mencit kelompok perlakuan dengan 2 dengan kontrol terjadi pada hari ke-10 dan ke-21. Hal ini mungkin disebabkan pada hari ke-10 jumlah patogen sudah optimal mengaktifasi makrofag untuk menginduksi produksi IL-12 karena menurut Unanue (1997), kurva jumlah *L. monocytogenes* yang hidup pada mencit setelah 0-14 hari diinfeksi dengan *L. monocytogenes* menunjukkan sedikit penurunan kemudian naik dan pada hari ketiga sampai hari ke-10 mencapai puncaknya.

Pada kelompok perlakuan dengan 2, kadar IL-10 menurun mulai hari ke-0 sampai hari ke-3 dan kemudian mulai meningkat pada hari ke-10, sedangkan pada kelompok kontrol terjadi penurunan kadar IL-10 pada hari ke-10. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara mencit kelompok perlakuan dengan 2 dengan kontrol. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada hari ke-10 2 mampu meningkatkan aktivitas makrofag, aktivitas produksi NO, dan produksi IL-12. Pada hari ke-21 juga terjadi peningkatan aktivitas makrofag, produksi NO, dan produksi IL-12 semakin tinggi, akan tetapi produksi IL-10 tidak berbeda bermakna terhadap kontrol, hal ini mengindikasikan bahwa 2 mempengaruhi sistem imun melalui modulasi sel Th1, dan sitokin yang terbentuk bukan IL-10. Interleukin 10 merupakan sitokin anti-inflamasi

produk dari sub populasi limfosit yakni T *helper* (Th)<sub>2</sub> yang fungsi utamanya menekan produksi beberapa jenis sitokin termasuk IL-12, serta menghambat aktivasi makrofag (Copuer *et al.*, 2008, Male *et al.*, 2006). Liu *et al.* (2010) juga melaporkan senyawa yang juga mengaktivasi proliferasi makrofag, mampu meningkatkan pelepasan IL-12 tetapi menurunkan pelepasan IL-10.

Berdasar hasil penelitian pendahuluan tersebut, untuk penelitian utama efek imunomodulator digunakan volume pelarut (CMCNa 1 %) 0,75 ml perkali asupan. Pemberian 1 ml mungkin penyebab terjadinya fluktuasi berat badan mencit, akan tetapi juga dipertimbangkan kelarutan senyawa uji dalam pelarut yang digunakan. Pada hari ke-10 hasil uji NO dan proliferasi limfosit, terjadi *trend* penurunan yang kemungkinan disebabkan berkurangnya sel bakteri *L. monocytogenes*, maka hari ke-10 kembali dilakukan induksi ulang dengan 0,2 ml  $5 \times 10^3$  cfu/ml *L. monocytogenes* secara *intra peritoneal*. Pengambilan darah dari *plexus infra orbitalis* maksimal 0,5 ml, karena ketika diambil lebih dari 0,5 ml, mencit kemudian ada yang mati. Pengukuran aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO, proliferasi limfosit pada hari ke-10 dan hari ke-21 setelah infeksi *L. monoctoygenes* yang pertama.

Uji aktivitas fagositosis makrofag menunjukkan bahwa 1 dan 2 mempunyai aktivitas imunostimulan. Reinfeksi dengan *L. monocytogenes* tidak menunjukkan perbedaan PF maupun IF, pada penelitian pendahuluan dengan sekali infeksi *L. monocytogenes*, pada hari ke-10 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* perlakuan dengan dosis 10 mg/kgBB 2 juga menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol. Hal ini terjadi karena makrofag merupakan komponen respon imun non spesifik, teraktivasi oleh adanya antigen, dalam hal ini *L. monocytogenes*, dan akan

menghancurkan bakteri tersebut secara non spesifik dengan proses fagositosis, pengulangan infeksi tidak akan berpengaruh pada respon imun non spesifik.

Kontrol positif berbeda bermakna dengan kontrol normal dan kontrol pelarut, baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21, hal ini menunjukkan bahwa potensi PF 1 maupun 2 pada dosis 10 mg/kgBB sebanding dengan potensi PF dosis 100mg/kgBB Imboost<sup>®</sup>. Perlakuan dengan kontrol positif menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol untuk parameter PF, akan tetapi tidak bermakna perbedaannya pada parameter IF.

Penelitian ini menunjukkan bahwa 2 memiliki tingkat EF lebih besar dibandingkan 1. Hasil uji statistik untuk parameter EF menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara perlakuan dengan 1 maupun 2 dengan Imboost<sup>®</sup>. Imboost<sup>®</sup> berisi ekstrak *Echinacea* dan zinc picolinate. Secara *in vivo* telah dilaporkan bahwa ekstrak *Echinacea* mampu meningkatkan PF dan IF makrofag (Goel *et al.*, 2002). Kombinasi zinc pada pemberian *Glycyrrhiza glabra* L. juga menyebabkan potensiasi aktivitas fagositosis makrofag (Mazumder *et al.*, 2012). Secara *in vivo*, potensi imunostimulan 1 maupun 2 pada dosis 10 mg/kgBB setara dengan 100 mg/kgBB Imboost<sup>®</sup>. Aktivitas fagositosis dapat terjadi pada jumlah makrofag yang teraktifkan maupun pada tingkat aktivitas pada setiap unit makrofag. Analisis statistik dengan uji korelasi Pearson menunjukkan adanya perbedaan signifikan berkorelasi positif antara persen PF dan IF. Ini berarti pemberian senyawa uji tidak saja meningkatkan jumlah makrofag teraktivasi dalam tubuh mencit coba tetapi juga meningkatkan individual makrofag untuk fagositosis agen (lateks).

Isolasi senyawa dari 2,12 gram ekstrak metanol DPc diperoleh 12,0 mg isolat 1 dan 12,1 mg isolat 2, sehingga untuk 1 dosis 5 mg/kgBB setara dengan 876 mg/kgBB ekstrak, dan untuk 2 dosis 5 mg/kgBB setara dengan 883 mg/kgBB ekstrak. Perlakuan 1 maupun 2 pada dosis 2,5 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibanding kontrol, untuk 1 dosis tersebut setara dengan 442 mg/kgBB ekstrak dan untuk 2 setara dengan 438 mg/kgBB ekstrak. Ekstrak etanol maupun ekstrak n-heksana *P. crocatum* pada dosis 100 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011), hal ini mengindikasikan bahwa isolat (1 dan 2) kurang aktif dibanding ekstrak DPc. Ekstrak yang aktivitasnya lebih tinggi dibanding senyawa tunggal dapat terjadi karena adanya efek aditif atau sinergi antara dua atau lebih senyawa dalam ekstrak. Bercak isolat 1 maupun 2 pada profil KLT tampak realtif besar dan kuat, dan tidak terdeteksi adanya perubahan warna bercak dari ekstrak ke isolat. Lebih lanjut uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi hasil pemisahan ekstrak DPc menunjukkan bahwa pada dosis yang sama, aktivitas fraksi lebih tinggi dari ekstrak, sehingga sangat kecil kemungkinan terjadinya kegagalan mengisolasi senyawa aktif dari ekstrak aktif karena labilnya atau ketidakstabilan senyawa aktif tersebut.

Pada penelitian ini, aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 menunjukkan pengaruh aktivitas fagositosis makrofag dengan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus asetil ( $\text{OC}_2\text{H}_3$ ) dari gugus hidroksil (OH) pada struktur kimia 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas fagositosis makrofag. Makrofag adalah sel yang bertanggung jawab terhadap respon imun bawaan yang juga berfungsi menginduksi respon imun

adaptif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 dan 2 dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulan untuk meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Pada hari ke-10, mencit yang diberi perlakuan dengan 2,5 mg/kgBB 1 maupun 2,5 mg/kgBB 2 menunjukkan aktivitas produksi NO yang berbeda tidak bermakna dengan kelompok kontrol. Pada hari ke-21, mulai dosis 2,5 mg/kgBB berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol normal dan kontrol pelarut. Hal ini kemungkinan karena pada hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes* aktivasi makrofag karena perlakuan dengan 1 maupun 2 sudah optimal sehingga produksi NO oleh makrofag meningkat secara bermakna dibanding mencit kelompok kontrol. Aktivitas produksi NO mencit yang diberi perlakuan dengan kontrol positif (Imboost®) berbeda bermakna dengan mencit kelompok kontrol baik pada hari ke-10 maupun hari ke-21, hal ini menunjukkan bahwa potensi produksi NO 1 maupun 2 pada dosis 5 mg/kgBB sebanding dengan Imboost®. Goel *et al.* (2002) telah melaporkan kemampuan ekstrak *Echinacea* untuk meningkatkan produksi NO secara *in vivo*.

Hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan aktivitas produksi NO dari mencit yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 pada dosis 5 mg/kgBB, sedangkan pada dosis 2,5 mg/kgBB tidak menunjukkan efek inhibisi. Penelitian lain melaporkan bahwa neolignan dapat merupakan inhibitor, tidak menginhibisi maupun dapat meningkatkan produksi NO. Aktivitas produksi NO mencit kelompok perlakuan 1 dan 2 menunjukkan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dari gugus OH pada struktur kimia 1 dan 2 tidak menyebabkan perbedaan aktivitas produksi NO.

Aktivitas fagositosis makrofag karena perlakuan dengan 1 dan 2 relatif tinggi, akan tetapi tidak menyebabkan produksi NO yang berlebihan. Hal ini mungkin disebabkan kedua senyawa tersebut dapat menjaga fungsi sel-sel imun dengan melindunginya dari dampak aktivitas fagositosis makrofag yang berlebihan. Menurut Victor *et al.* (2003), proses stress oksidatif diinduksi endotoksin, makrofag peritoneal menunjukkan peningkatan perlekatan dan fungsi fagositosis serta penurunan kemotaksis. Perubahan tersebut diiringi dengan produksi anion superoksida dan pelepasan TNF $\alpha$  yang tinggi. Dengan demikian, kesetimbangan oksidan-antioksidan merupakan hal kritis pada fungsi sel imun karena hal tersebut menjaga integritas seluler dan mengontrol transduksi sinyal serta ekspresi gen-gen. Ekstrak DPc memiliki aktivitas antioksidan (Suratmo, 2008), kemungkinan 1 dan 2 merupakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Kemampuan antioksidatif tersebut dapat terjadi melalui penangkapan kelebihan radikal bebas yang dilepaskan makrofag, sehingga tidak berdampak merugikan bagi fungsi sistem imun.

Semakin besar dosis 1 dan 2, jumlah limfosit makin sedikit. Meskipun secara statistik jumlah limfosit kelompok yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 tidak berbeda bermakna ( $P > 0,05$ ) dengan kontrol normal dan kontrol pelarut, akan tetapi kedua kelompok menunjukkan pola perubahan jumlah limfosit. Kelompok perlakuan dengan 1 dan 2 menunjukkan pola penurunan jumlah limfosit dari hari ke-10 ke hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*, sedangkan kelompok kontrol menunjukkan pola peningkatan. Analisis statistik jumlah limfosit pada hari ke-10 maupun hari ke-21 dari kelompok perlakuan 1 dan 2 tidak berbeda bermakna terhadap kelompok kontrol, sehingga diduga pemberian senyawa tersebut tidak berpengaruh



pada aktivitas proliferasi limfosit mencit. Perlakuan dengan kontrol positif (Imboost®) tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kontrol normal maupun kontrol pelarut. Hal tersebut mengindikasikan bahwa dalam penelitian ini, aktivitas proliferasi limfosit dari 1 maupun 2 setara dengan Imboost®. Apriyanto (2011) dan Indriyani (2011) juga melaporkan bahwa ekstrak DPc tidak menunjukkan efek pada proliferasi limfosit. Menurut Yuristiyani (2012) uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak DPc menurunkan proliferasi limfosit. Beberapa penelitian tentang aktivitas proliferasi limfosit dari *Echinacea* menunjukkan hasil yang bertentangan. Dilaporkan bahwa efek *Echinacea* terhadap proliferasi limfosit sangat kecil, akan tetapi penelitian lain menunjukkan efek peningkatan proliferasi limfosit yang bermakna (Percival, 2000; South and Exon, 2001; Luettig *et al.*, 1989; Morazzoni *et al.*, 2005). Hal tersebut terjadi kemungkinan karena pengaruh *Echinacea* terhadap proliferasi sel secara tidak langsung, misalnya *Echinacea* merangsang makrofag, dan kemudian terjadi rangsangan pada limfosit (Mishima *et al.*, 2004). Secara *in vivo* kombinasi dengan zinc pada pemberian *Glycyrrhiza glabra* L. juga menyebabkan peningkatan jumlah leukosit (Mazumder *et al.*, 2012). Perlakuan dengan 1 maupun 2 tidak menunjukkan perbedaan bermakna aktivitas proliferasi limfosit, hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dari gugus OH pada struktur senyawa 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas proliferasi limfosit mencit.

Titer IgG mencit yang diberi perlakuan dengan 1, 2, maupun kontrol positif menunjukkan pola yang sama bila dibandingkan dengan kelompok kontrol pelarut dan kontrol normal. Pada penelitian ini titer IgG hari ke-10 menunjukkan perbedaan bermakna pada semua kelompok, akan tetapi nilai standar deviasi relatif tinggi

dibandingkan pada hasil pengukuran hari ke-0 dan hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*. Mempertimbangkan nilai standar deviasi tersebut dan laporan bahwa ekstrak *Echinacea* tidak menunjukkan efek terhadap titer IgG (Dennis, 1999), maka dapat dinyatakan bahwa perlakuan dengan 1, 2 maupun Imboost® tidak menyebabkan kenaikan titer IgG pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler, respon imun adaptif terhadap bakteri tersebut merupakan imunitas yang diperantai sel (Abbas *et al.*, 2007). Hal ini mungkin merupakan penyebab tidak terdeteksinya respon imun humoral yakni titer IgG dalam penelitian ini.

Produksi IL-12 mencit meningkat dengan meningkatnya dosis baik pada mencit yang diberi perlakuan dengan 1 maupun 2. Hal ini menunjukkan bahwa efek senyawa tersebut tergantung dosis. Efek terhadap produksi IL-12 dari 1 dan 2 pada dosis 2,5 mg/kgBB setara dengan Imboost®. Penelitian lain juga melaporkan aktivitas ekstrak *Echinacea* dalam meningkatkan produksi IL-12 (Senchina *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2004). Aktivitas produksi IL-12 mencit kelompok perlakuan 1 dan 2 menunjukkan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dari gugus OH pada struktur kimia senyawa 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas produksi IL-12. Interleukin 12 merupakan sitokin pro inflamasi yang diproduksi oleh makrofag dan dendritik dan berperan sebagai mediator respon imun bawaan juga mediator penting antara imunitas bawaan dan imunitas spesifik didapat. Sitokin ini sangat penting pada awal aktivitas seluler yang menghasilkan respon imun yang diperantarai sel, merupakan sitokin kunci pada respon imun tipe T helper (Th)1 (Abbas *et al.*, 2007; Hamza *et al.*, 2010). Limfosit yang teraktivasi oleh

IL-12 akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2 (Abbas *et al.*, 2007). Perlakuan dengan 1 dan 2 mampu meningkatkan produksi IL-12, akan tetapi tidak mempengaruhi proliferasi limfosit. Diduga 1 dan 2 mengganggu ikatan antara reseptor IL-12 pada limfosit dengan sitokin IL-12, sehingga meskipun kadar IL-12 tinggi, jumlah limfosit tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Hal tersebut diperkuat hasil uji 1 dan 2 yang tidak menunjukkan pengaruh bermakna pada produksi IL-10, kemungkinan karena proliferasi limfosit menjadi sel Th2 yang memproduksi IL-10 juga tidak dipengaruhi.

Perlakuan dengan 1 dan 2 pada dosis 2,5, 5, dan 10 mg/kgBB serta Imboost® tidak berpengaruh terhadap produksi IL-10. Pada studi yang lain, neolignan mampu *down-regulate* IL-10 secara *in vitro* pada infeksi *Leishmania* (Neris *et al.*, (2013). Hasil penelitian ini juga mengindikasikan bahwa aktivitas produksi IL-10 1 dan 2 setara dengan Imboost®. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Echinacea* meningkatkan produksi IL-10 (Burger *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 2004; Senchina *et al.*, 2005), akan tetapi efeknya terlalu kecil sehingga secara fisiologis tidak relevan. Extract *Echinacea* dapat meningkatkan produksi IL-10, *unknown* konstituen kemungkinan yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut (McCann *et al.*, 2007).

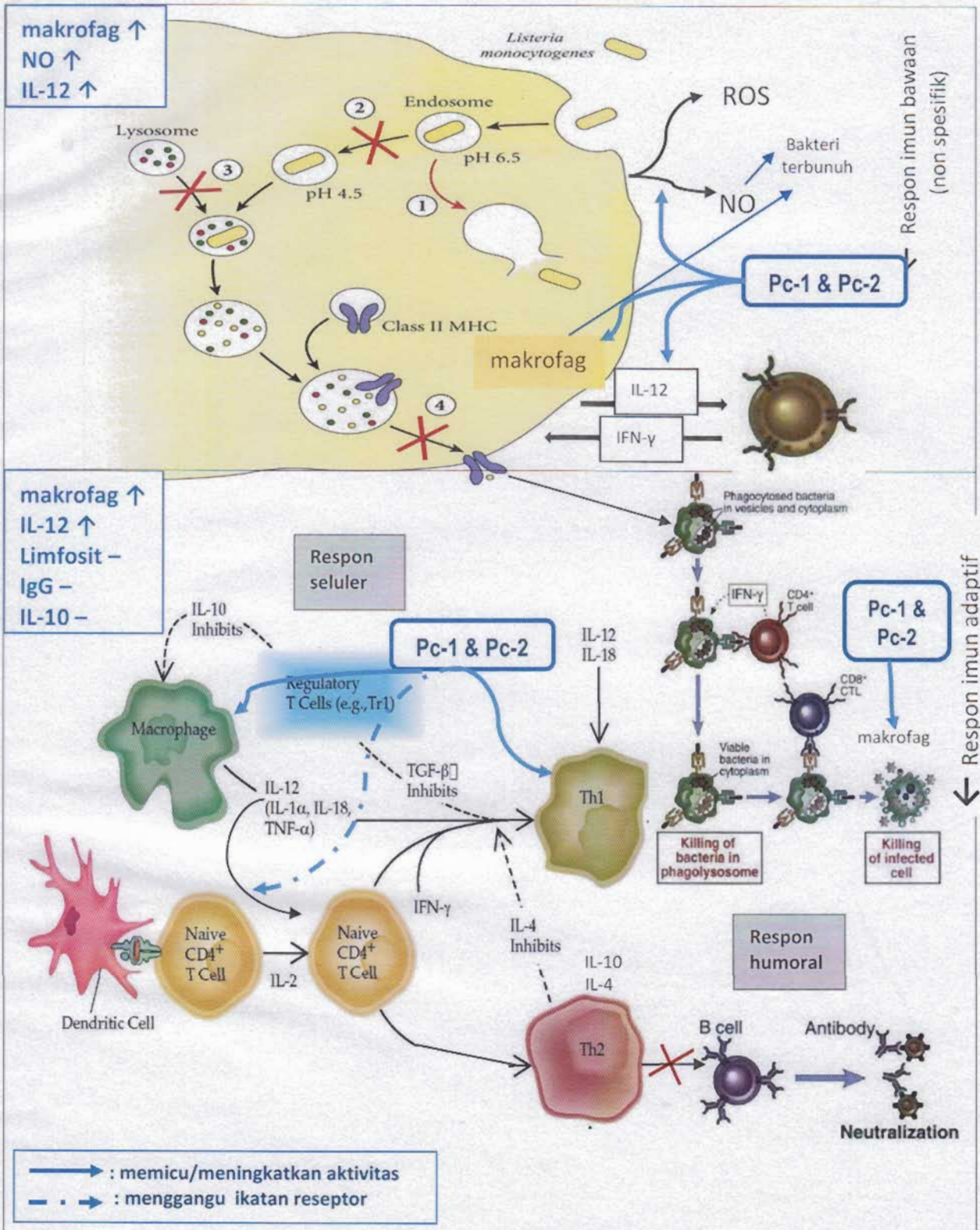
Mekanisme aksi sebagai imunostimulan dari beberapa tanaman obat masih belum jelas (Gertsch *et al.*, 2011). Sebagian tanaman obat dapat merangsang sistem imun sedangkan sebagian lainnya menekan respon imun, berbagai metabolit sekunder menunjukkan variasi yang besar dalam aktivitas imunomodulatornya (Kumar *et al.*, 2012). Interleukin 10 merupakan sitokin anti-inflamasi produk dari sub populasi

limfosit yakni Th2 yang fungsi utamanya menekan produksi beberapa jenis sitokin termasuk IL-12, serta menghambat aktivasi makrofag (Copuer *et al.*, 2008, Male *et al.*, 2006). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 dan 2 merupakan senyawa yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag, produksi NO, dan produksi IL-12. Namun demikian 1 dan 2 tidak berpengaruh pada proliferasi limfosit, titer IgG, dan produksi IL-10. Hal ini mengindikasikan bahwa 1 dan 2 mempengaruhi sistem imun dengan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO dan IL-12. Meskipun produksi IL-12 tinggi tetapi proliferasi limfosit tidak dipengaruhi, diduga 1 dan 2 mengganggu ikatan IL-12 dengan reseptor IL-12 pada limfosit. Kemungkinan mekanisme aksi sebagai imunomodulator dari 1 dan 2 dapat dilihat pada Gambar 41.

Pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa perlakuan dengan 1 tidak berpengaruh pada gambaran histopatologis hati dan ginjal. Perlakuan dengan 2 tidak menunjukkan perubahan gambaran histopatologis ginjal, akan tetapi menyebabkan perubahan pada hati berupa degenerasi hidropik dan nekrosis. Kenaikan dosis 2 cenderung menyebabkan derajat kerusakan hati yang semakin berat. Perlakuan dengan 2 dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan perubahan gambaran histopatologis hati berupa degenerasi hidropis ringan, dosis 5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis sedang, degenarasi hidropis dengan nekrosis *centrolobulus*, inflamasi dan koagulasi, dan dosis 10 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis menyebar (*difuse*) disertai nekrosis lokal. Dosis 2 sebesar 2,5 mg/kgBB setara dengan dosis ekstrak sebesar 438 mg/kgBB, karena menyebabkan degenerasi hidropis pada hati pemakaian 2 maupun ekstrak pada dosis tersebut dalam jangka waktu lama tidak dianjurkan. Degenerasi hidropis merupakan kelainan yang bersifat *reversible*, maka

apabila 2 maupun ekstrak pada dosis tersebut akan digunakan dalam pengobatan dianjurkan untuk digunakan secara berkala, pada waktu kondisi pasien membutuhkan imunostimulan. Pengobatan dalam jangka lama dapat dilakukan, akan tetapi perlu monitoring kondisi klinis organ hati pasien. Ekstrak etanol maupun ekstrak heksana dari DPc pada dosis 300 mg/kgBB tidak menyebabkan kerusakan pada ginjal dan hati (Wiweko, 2010 dan Wahyudi, 2010), sehingga dosis ekstrak sebesar 300 mg/kgBB dapat dianjurkan untuk pengobatan menggunakan DPc. Perlakuan dengan 1 setara dengan Imboost<sup>®</sup>, 1 maupun ekstrak *Echinacea* tidak menunjukkan pengaruh terhadap gambaran histopatologis hati dan ginjal. Seperti hasil penelitian ini, pengaruh pada gambaran histopatologis tak bermakna dari ekstrak *Echinacea purpurea* pada ginjal dan hati juga dilaporkan oleh Gerami *et al.* (2008).

Isolat 1 dan 2 merupakan neolignan yang strukturnya mirip, kedua senyawa memiliki perbedaan yakni terdapat gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> pada 1 dan gugus OH pada 2 (Kustiawan, 2012), penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dan OH pada C<sub>1'</sub> pada kedua senyawa tersebut menyebabkan efek yang berbeda pada gambaran histopatologis hati mencit. Meskipun tidak menyebabkan efek kerusakan pada ginjal akan tetapi gugus OH pada C<sub>1'</sub> 2 tampaknya merupakan penyebab perubahan gambaran histopatologis pada hati mencit. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 1 yang memiliki gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> pada C<sub>1'</sub> tidak menyebabkan perubahan gambaran histopatologis pada ginjal dan hati, 2 yang memiliki gugus OH pada C<sub>1'</sub> tidak menyebabkan perubahan gambaran histopatologis pada ginjal akan tetapi pada dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropik dan pada dosis 5 mg/kgBB menyebabkan nekrosis hati mencit.



Gambar 41. Kemungkinan mekanisme aksi imunomodulator dari 1 dan 2 yang diisolasi dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum*, Ruiz & Pav.



## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Secara *in vivo*, isolat 1 dan 2 yang diisolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) berpengaruh terhadap respon imun berupa peningkatan aktivitas fagositosis makrofag, produksi nitrit oksid, dan interleukin 12; tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit dan titer immunoglobulin G. Kemungkinan isolat 1 dan 2 berperan sebagai imunomodulator dengan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.
2. Pemberian isolat 1 tidak berpengaruh pada gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit. Pemberian isolat 2 tidak berpengaruh pada gambaran histopatologis ginjal akan tetapi pada dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropis dan pada dosis 5 mg/kgBB menyebabkan nekrosis hati mencit.

#### B. Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk meneliti lebih lanjut yakni :

1. Pemberian isolat 1 dan 2 secara per oral, sehingga perlu diteliti tentang pengaruh isolat 1 dan 2 terhadap respon imun mukosa khususnya gastrointestinal.



2. Pemberian isolat 1 dan 2 menyebabkan kadar interleukin 12 tinggi akan tetapi proliferasi limfosit tidak dipengaruhi, sehingga perlu diteliti pengaruh isolat 1 dan 2 terhadap ekspresi reseptor IL-12 pada limfosit.
3. Isolasi 1 dan 2 belum menunjukkan puncak tunggal pada kromatogram HPLC, sehingga perlu diteliti tentang penggunaan HPLC preparatif untuk isolasi 1 dan 2.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S., 2007, *Cellular and Molecular Immunology*, 6<sup>th</sup> Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H., 2011, *Basic Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed., Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Agrawal, S., 2009, *Advances in Medicinal Plants*, Oxford Book Company, Jaypur, pp 7-10.
- Alamgir, M. and Uddin, S.K., 2010, Recent Advances on The Ethnomedicinal Plants as Immunomodulatory Agents, *Ethnomedicine*, 3, 227-244.
- Alfarabi, M., 2010, Kajian Antidiabetogenik Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) *in vitro*, Thesis, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ali, S.E., Hanna, L.S., and Khattab, H.M., 2003, Hematological and Histopathological Chages in Female Albino Rats After Gamma Irradiation and/or *Piper nigrum* Treatment, *Isotope and Radiation Research*, 35(3): 581-592.
- 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.
- Amonkar, A.J., Nagabhusan, M., D'Sousa, A.V., and Bhide, S.V. 1986, Hydroxychavicol: A New Phenolic Antimutagen from Betel Leaf, *Food Chemical Toxicology*, 24: 1321-1324.
- Apriyanto, S., 2011, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lamk) terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Fagositosis Makrofag pada Tikus yang diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Archana, Jatawa S., Paul R., and Tiwari A., 2011, Indian Medicinal Platns: A Rich Source of Natural Immuno-Modulator, *International Journal of Pharmacology*, 7 (2): 198-205.
- Ardianto, N.H., 2013, Aktivitas Imunomodulator Fraksi n-heksana Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap Fagositosis Makrofag dan Proliferasi Limfosit Tikus, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Ataman, J.E., Idu, M., Odia, E.A., Omogbai, E.K.I., Amaechina, F., Akhigbe, A.O. and Ebite, L.E., 2006, Histopathologic Effect of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. On Wistar Rats, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(3): 477-482.
- Bafna, A.R. and Misrha, S.H., 2004. Immunomodulatory Activity of Methanol Extracts of Flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn., *Ars Pharmaceutica*, 45: 281-291.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M., 1998, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*, 392: 245-252.
- Bauer, R., 1999, 'Chemistry, analysis and immunological investigation of *Echinaceae* phytopharmaceuticals', in Wagner, H., Immunomodulatory Agents from Plants, Birkhauser, Boston, pp. 41-88.
- Bendich, A., 1993, Physiological role of antioxidant in the immune system, *Journal of Dairy Sciences*, 76: 2789-2794.
- Benevides, P.J.C., Sartorelli, P., and Kato, M.J., 1999, Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*, *Phytochemistry*, 52: 339-343.
- Benson, J.M., Pokrony, A.J., Rhule, A., Wenner, C.A., Kandhi, V., Cech, N.B., and Shepherd, D.M., 2010, *Echinacea purpurea* Extracts Modulate Murine Dendritic Cells Fate and Function, *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1170-1177.
- Bourry, A. and Poutrel, B., 1996, Bovine Mastitis Caused by *Listeria monocytogenes* Kinetics of Antibody Responses in Serum and Milk After Experimental Infection, *Journal of Dairy Sciences*, 79(12): 2189-2195.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants*, 2<sup>nd</sup> edition, Intercept Ltd, Paris, pp. 279-282.
- Brunner, G., 1994, *Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical CO<sub>2</sub> Fluids and Application to Separation Processes*, Springer, New York, pp.387.
- Buchmeier, N.A. and Schreiber, R.D., 1985, Requirement of endogenous interferon-production for resolution *Listeria monocytogenes* infection, *Immunology*, 82: 7404-7408.
- Burger, R.A., Torres, R.P., Warren, R.P., Caldwell, V.D., and Hughes, B.G., 1997, *Echinacea* induced cytokine production by human macrophages, *International Journal of Immunopharmacology*, 19: 371-379.

- Cannel, R.J.P., 1998, *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey, pp.2-5, 261-276.
- Celada, A. and Nathan, C., 1994, Macrophage activation revisited, *Immunology Today*, 15: 100-102.
- Chang, R., 1987, *Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed, Random House, Inc., New York, p.926-927.
- Chang, M.C., Uang, B.J., Tsai, C.Y., Lin, B.R., Lee, C.S., Chen, Y.J., *et al.*, 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.
- Chang, M.N., Han, G.Q., Arison, B.H., Springer, J.P., Hwang, S.B., and Shen, T.Y., 1985, Neolignans from *Piper futokadsura*, *Phytochemistry*, 24: 2079-2082.
- Chauhan, K., Parmer, L., Solanki, R., Kagathara, V., Madat, D., Patel, T., 2010, Effect of *Piper longum* linn on histopathological and biochemical changes in isoproterenol induced myocardial infarction in rats, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1 (3) : 759-766.
- Chauret, D.C., Bernard, C.B., Amason, J.T., Durst, J.T., Krishnamurty, H.G., Sanchez-vindas, *et al.*, 1996, Insecticidal neolignans from *Piper decurrens*, *Journal of Natural Products*, 59(2): 152-155.
- Chen S., Huang, H.Y., Cheng, M.J., Ishikawa, T., Peng, C.F., Chang, H.S., *et al.*, 2013, Neolignans and Phenylpropanoids from The Roots of *Piper taiwanense* and Their Antiplatelet and Antitubercular Activities, *Phytochemistry*, 93: 203-209.
- Chen, Y., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C, and Xie, M., 2014, Acetylation and carboxymethylation of polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities, *Food Chemistry*, 156:279-288.
- Coleman, J.W., 2001, Nitric oxide in immunity and inflammation, *International Immunopharmacology*, 1 : 1397-1406.
- Coll, J.C. and Bowden, B.F., 1986, The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49: 934-936.
- Copuer, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M., 2008, IL-10: The master regulator of immunity to infection, *Journal of Immunology*, 180: 5771-5777.
- Dancygier, H. and Schirmacer, P., 2010, 'Pathophysiology and Morphology of Liver Injury', in Dancygier, H., *Clinical Hepatology*, Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 169-203.

- Daniel, M., 2006, *Medicinal Plants Chemistry and Properties*, Enfield, Science publishers, New Hampshire, pp: 3-4.
- Daugelat, S., Ladel, C.H., Schoel, B., and Kaufmann, S.H.E., 1994, Antigen-Specific T-Cell Responses during Primary and Secondary *Listeria monocytogenes* Infection, *Infection and Immunity*, May: 1881-1888.
- 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.
- Delbridge, L.M. and O'Riordan, M.X., 2007, Innate recognition of intracellular bacteria, *Current Opinion in Immunology*, 19:10-16.
- Dennis, J.W., 1999, The Effect of *Echinacea purpurea* on Stimulating IgM (Primary) and IgG (Secondary) Immune Response in Male CD1 Mice, *Cantaurus*, 7: 9-11.
- Diasio, R.B. and LoBuglio, A.F., 1996, 'Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants' in Hardman, J.G., Limbird, L.E., Goodman and Gilman's: *The Pharmacological Basic of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> ed., New York, McGraw-Hill Companies Inc, pp 1291-1307.
- Duan, S., Zhang, P., and Yu, P., 2010, Neolignans and Lignan from *Piper wallichii*, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 35 (2): 180-182.
- Erviana, R., 2011, Pengaruh Golongan Senyawa Aktif Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan Aktivitas Enzim Glukosiltransferase, Tesis, Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Fahn, A., 1979, *Secretory Tissues in Plants*, Academic Press, San Fransisco, pp.1-5.
- Farr, A.G., Dorf, M.E., and Unanue, R., 1997, Secretion of Mediators Following T Lymphocyte Macrophage Interaction is Regulated by The Major Histocompatibility Complex, *Immunology*, 74 (8): 3542-3546.
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S., dan Nuri, 2011, Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Tikus Putih, *Majalah Obat Tradisional*, 16.
- Fried, B. and Sherma, J., 1994, *Thin-layer chromatography: techniques and applications*, 3<sup>rd</sup> ed. revised and expanded, Chromatographic science series 66, Marcel Dekker, Inc. New York, USA. p.451.

- Ganjar, I.G. dan A. Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Gerami, R., Fallah, V., Habibian, S., Nourani, H., and Abdi A., 2008, Effects of *Echinacea purpurea* on Liver and Kidney of Rat and Mouse, *1<sup>st</sup> International Congress of Veterinary Pharmacology & Pharmaceutical Sciences*, October 4-5, Teheran Iran.
- Gertsch, J., Viveros-Paredes, J.M., and Taylor, P., 2011, Plant immunostimulants-Scientific paradigm or myth?, *Journal of Ethnopharmacology*, 136:385-391.
- Godfrey, R. W., Horton, P. G., and Wilder, M. S., 1983, Time course of antilisterial activity by immunologically activated murine peritoneal macrophages, *Infection and Immunity*, 39: 532-539.
- Goel, V., Chang, C., Slama, J.V., Barton, R., Bauer, R., Gahler, R., and Basu, T.K., 2002, *Echinacea* stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 487-492.
- Golab, J., Zagodzón, R., Stokłosal, T., Kaminński, R., Kozar, K., and Jakobisiak, M., 2000, Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-8 – a bridge too far?, *Immunology Letters*, 72: 153-157.
- Green, T.P., Galinis, D.L., and Wiemer, D.F., 1991, Three Neolignans from The Roots of *Piper capense*, *Phytochemistry*, 30(5): 1649-1652.
- Gritter, R.J., Bobbitt, J.N., and Schwarting, A.E., 1985, Pengantar Kromatografi, diterjemahkan dari Bahasa Inggris oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Hajri, A., Metzger, E., Vallat, F., Coffy, S., Flatter, E., Evrad, S., Marescaux, and J., Aprahamian, M., 1998, Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: *in vivo* and *in vitro* studies, *British Journal of Cancer*, 78 (7):841-849.
- Hamza, T, Barnett, J.B., and Li, B., 2010, Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 11:789-849.
- Heinrich, M., Barnes, J, Gibbons, S., and Williamson, E.M., 2004, *Pharmacognosy and Phytotherapy*, Churchill Livingstone, Toronto.
- Houghton, P.J. and Raman, A., 1998, *Laboratory Handbook for the Fractionatio of Natural Extracts*, Chapman & Hall, London.

- Huang, X., Zhou, C., Li, F., Lou, L., Li, D., Ikejima, T., Peng, Y., and Song, S., 2013, The cytotoxicity of 8-O-4'neolignans from the seeds of *Crataegus pinnatifida*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 5599-5604.
- Hwang, S.A., Dasgupta, A., and Actor, J.K., 2004, Cytokine Production by Non-adherent Mouse Splenocyte Cultures to *Echinacea* Extracts, *Clinica Chimica Acta*, 343: 161-166.
- Indriyani, L.W., 2011. Uji Aktivitas imunomodulator ekstrak n-heksana daun sirih merah (*Piper crocatum* Lamk) terhadap aktivitas fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ito, T., Ueda, M.J., Okada, T.S., and Ohnishi, S., 1981, Phagocytosis by macrophages, the dissociation of the attachment and ingestion steps, *Journal Cell Science*, 51: 189-201.
- Jaijoy, K., Vannasiri, S., Piyabhan, P., Lerdvuthisopon, N., Boonraeng, S., Khonsung, P., et al., 2011, Acute and subchronic toxicity study of the water extract from the fruits of *Piper chaba* Hunter in rats, *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 3 (4): 29-35.
- 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.
- Jayathirtha, M.G. and Mishra, S.H., 2004, Preliminary Immunomodulatory Activities of Methanol Extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*, *Phytomedicine*, 11: 361-365.
- Jensen, S., Hansen, J., and Boll, P.M., 1993, Lignan and neolignans from *Piperaceae*. *Phytochemistry*, 33: 523-530.
- Jeong, E.J., Cho, J.H., Sung, S.H., Kim, S.Y., and Kim, Y.C., 2011, Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells by lignans isolated from *Euonymus alatus* leaves and twigs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011.21:2283-2286.
- Joshi, N., Garg, H.S., and Bhakuni, D.S., 1990, Chemical constituents of *Piper schmidtii*: structure of a new neolignan schmiditin, *Journal of Natural Product*, 53 (2): 479-482.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., and Donoghue, M.J., 2002, *Plant Systematics a Phylogenetic Approach*, Sinauer, Sunderland, Mass.



- Kanaki, N., Dave, M., Padh, H., and Rajani, M., 2008, A rapid method for isolation of piperine from the fruits of *Piper nigrum* Linn., *Journal of Natural Medicines*, 62 (3): 281-283.
- Kanjwani, D.G., Marathe, T.P., Chipunkar, S.V., and Fan Sathaye, S.S., 2008, Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of *Piper betel*, *Scandinavian Journal of Immunology*, 65: 589-593.
- Karpuzoglu, E. and Almed, S.A., 2006, Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implication for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis, *Nitric Oxide*, 15: 177-186.
- Kim, K.H., Choi, J.W., Ha, S.K., Kim, S.Y., and Lee, K.R., 2010, Neolignan from *Piper kadsura* and their anti-neuroinflammatory activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 409-412.
- Kirtikar, K.R., and Basu, B.D., 1993. *Indian Medicinal Plants*, Vol III, International Book Publisher, Dehradun, pp. 828.
- Kong, Z., Tzeng, S., and Liu, Y., 2005, Cytotoxic neolignans: an SAR study, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 163-166.
- Konishi, T., Konoshima, T., Daikonya, A., and Kitanakam S., 2005, Neolignans from *Piper futokadsura* and their inhibition of nitric oxide production, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53 (1): 121-124.
- Korn, E.D. and Weisman, R.A., 1967, Phagocytosis of Latex Beads by *Acanthamoeba*, *Biochemistry*, 6: 485-497.
- Kumar, S., Gupta, P., Sharma, S., and Kumar, D., 2011, A Review on Immunostimulatory Plants, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9, 1-18.
- Kumar, D., Arya, V., Kaur, R., Bhat, Z.A., Gupta, V.K., and Kumar, V., 2012, A Review of Immunomodulators in The Indian Traditional Health Care System, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 45: 165-184.
- Kuo, Y., Yang, N., Chou, C., Lin, L., and Tsai, W., 2000, Regulation of Cell Proliferation, Gene Expression, Production of Cytokines, and Cell Cycle Progression in Primary Human T Lymphocytes by Piperlactam S Isolated from *Piper kadsura*, *Molecular Pharmacology*, 58 (5): 1057-1066.
- Kuo, Y., Lin, L., Yang, N., Tsai, W., Lin, A., Lee, M., and Chou, C., 2002, Some Immunomodulatory Principles Isolated from *Piper kadsura*, *Journal Chinese Medicine*, 13 (3): 159-170.

- Kurniawan, M.D., 2011, Efek Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Fraksi Larut dan Tidak Larut Kloroform Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap Sel T47D dan Myeloma secara *In Vitro*, *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Kustiawan, P.M., 2012, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Immunostimulan Non Spesifik *In Vitro* dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), *Thesis*, M.Sc., Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Laksmi, B.S. and Naidu, K.C., 2010. Comparative morphoanatomy of *Piper betle* L. cultivars in India. *Annals of Biological Research*, 2: 128-134.
- Lamprou, I., Mamali, I., Dallas, K., Fertakis, V., Lampropoulou, M, and Marmaras, V.J., 2007. Distinc signaling pathways Promote Phagocytosis of Bacteria, Latex Beads and Lipopolysaccharide in Medfly Haemocytes, *Immunology*, 121: 314-327.
- Laskin, D.L., and Pendino, K.J., 1995, Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury, *Annual Review Pharmacology Toxicology*, 35: 655-677.
- Lecuit, M., Ohayom, H., Braun, I, Mengaud, J., and Cossart, P., 1997, Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization, *Infection Immunology*, 65: 5309-5319.
- Lee-Chen, S.F, Chem, C.L., Ho, L.Y., Hsu, P.C., Chang, J.T., Sun, C.M., Chi, C.W., and Liu, T.Y., 1996, Role of Oxidative DNA Damage in Hydroxychavicol-induced Genotoxicity, *Mutagenesis*, 11: 519-23.
- Lee, J., Seo, E., Jang, D.S., Ha, T.j., Kim, J., Nam, J., Bae, G., Lee, Y.M., Yang, M.S., and Kim, J.S., 2009, Two New Stereoisomer of Neolignan and Lignan from the Flower Buds *Magnolia fargesii*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 3: 298-301.
- Lee, J.S., Kim, J., Yu, Y.U., and Kim, Y.C., 2004, Inhibition of Phospholipase C 1 and Cancer Cell Proliferation by Lignans and Flavans from *Machilus thunbergii*, *Archives of Pharmacal Research*, 27 (10): 1043-1047.
- Lemos, C.O.T., Garcia, V.A.S., Goncalves, R.M., Leal, I.C.R., Siqueira, V.L.D., Filho, L.C., and Cabral, V.F., 2012, Supercritical extraction of neolignans from *Piper regnellii* var. *pallenscens*, *The Journal of Supercritical Fluids*, 71:64-70.

- Leon-Diaz, R., Meckes-Fischer, M., Valdovinos-Martines, L., Campos, M.G., Hernandez-Pando, R., and Jimenez-Arellanes, M.A., 2013, Antitubercular Activity and the Subacute Toxicity of (-)- Licarin A in BALB/c Mice: A Neolignan Isolated from *Aristolochia taliscana*, *Archives of Medical Research*, 44: 99-104.
- 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.
- Liao, Y., Chiang, Y., Tsai, T., Lee, R., Chan, Y., and Hsia, C., 1999, Contact leukomelanosis induced by the leaves of *Piper betle* L. (Piperaceae): A clinical and histopathologic survey, *Journal of The American of Dermatology*, 40 (4): 583-589.
- Lin, L.C., Shen, Y.C., and Tsai, T.H., 2006, Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*, *Journal of Natural Products*, 69:842-844.
- Lissoni, P., Malugani, F., and Malysheva, O., 2002, Neuroimmunotherapy of untreatable metastatic solid tumors with subcutaneous low-dose, interleukin-2, melatonin and naltrexane, modulation of interleukin-2-induces antitumor immunity by blocking th eopioid system. *Neuroendocrinol Lett*, 23: 341-344.
- List, P.H. and Schmidt, P.C., 1989, *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press, INC, Florida.
- Liu, S.X., Jin, H.Z., Shan, L., Zeng, H.W., Chen, B.Y., Sun, Q.Y., and Zhang, W.D., 2013, Inhibitory effect of 4,4'-dihydroxy- $\alpha$ -truxillic derivates on NO production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macropages and exploration of structure-activity relationships, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23: 2207-2211.
- Liu, Y.Z., Cao, Y.G., Ye, J.Q., Wang, W.G., Song, K.J., Wang, X.L., Wang, C.H., Li, R.T., and Deng, X.M., 2010, Immunomodulatory effects of proanthocyanidin A-1 derived in vitro from *Rhododendron spiciferum*, *Fitoterapia*, 81: 108-114.
- Luettic, B., Steinmuller, C., Gifford, G.E., Wagner, H., and Lohmann-Matthes, M.L., 1989, Macrophage Activation bt The Polysaccharide Arabinogalactan Isolated from Plant Cell Cultures of *Echinacea purpurea*, *Journal of National Cancer Institute*, 81: 669-675.
- Luize, P.S., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D., Cortez, D.A.G., and Nakamura, C.V., 2006, Activity of Neolignans Isolated from *Piper regnelii* (Miq.) C.DC. var *pallescens* (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*, *Biological and Pharmmmaceutical Bulletin*, 29 (10): 2126-2130.

- Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D., Spare, P.D., and Inwood, M.J.A., 1969, *Medical Laboratory Technic and Clinical Pathology*, 2<sup>nd</sup> ed., Sanders Company WB, Toronto, pp.987-1231.
- Mackness, G.B., 1962, Cellular resistance to infection, *Journal of Experimental Medicine*, 116: 381-406.
- Ma, Y., Han, G.Q., Li, C.L., Cheng, J.R., Arison, B.H., and Hwang, S.B., 1991, Neolignans from *Piper polysyphorum* C.DC, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 26 (5): 345-350.
- MacRae, W.D. and Towers, G.H.N., 1984, Biological activities of lignans, *Phytochemistry*, 23: 1207-1220.
- Male, D., Cooke, A., Owen, M., Trawsdale, J., and Champion, B., 1996, Cytokines and Chemokines, in *Advanced Immunology*, 3<sup>rd</sup> ed., London Mosby Co, pp.10.1-10.14.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., and Roitt, I.M., 2006, *Immunology*, 7<sup>th</sup> ed., Elsevier Ltd, pp.128,163-170, 221.
- Malhotra, S., Koul, S.K., Taneja, S.C., Pushpangadan, P., and Dhar, K.L., 1990, A Neolignan from *Piper sumatranum*, *Phytochemistry*, 29 (8): 2733-2734.
- Marcál, F.J.B., Cortez, D.A.G., Nakamura, T.U., Nakamura, B.P., and Dias Filho, 2010, Activity of The Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Molecules*, 15 : 2060-2069.
- Maxwell, A., Dabideen, D., Reynolds, W.F., and McLean, S., 1999, Neolignans from *Piper aequale*, *Phytochemistry*, 50 (3): 499-504.
- Mazumder, P.M., Pattayak, S., Parvani, H., Sasmal, D., and Rathinavelusamy, P., 2012, Evaluation of Immunomodulatory Activity of *Glycyrrhiza glabra* L. Roots in Combination with Zinc, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S15-S20.
- McCann, D.A., Solco, A., Liu, Y., Macaluso, F., Murphy, P.A., Kohut, M.L., and Senchina, D.S., 2007, Cytokine and Interferon-Modulating Properties of *Echinacea* spp. Root Tinctures Stored at -20°C for 20 Years, *Journal Interferon Cytokine Research*, 27 (5): 425-436.
- McHugh, M., and Krukonis, V., 1994, *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, Butterworths, Stoneham, p.512.

- Medzhitov, R., 2001, Tool-like Receptors and Innate Immunity, *Nature Reviews Immunology*, 1: 135-145.
- Meireles, M.A.A., 2009, *Extracting Bioactive compounds for Food Products; Theory and Applications*, CRC Press, New York, pp.
- Miettinen, A., Husu, J., and Tuomi, J., 1990, Serum Antibody, Response to *Listeria monocytogenes*, Listerial Excretion, and Clinical Characteristics in Experimental Infected Goats, *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 340-343.
- Mishima, S., Saito, K., Maruyama, H., Inuoue, M., Yamashita, T., and Ishida, T. *et al.*, 2004, Antioxidant and Immuno-enhancing Effects of *Echinacea purpurea*, *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1004-1009.
- Monobe, M., Ema, K., Tokuda, Y., and Maeda-Yamamoto, M., 2010, Enhancement of Phagocytic Activity of Macrophage-like Cells by Pyrogallol-type Green Tea Polyphenols Through Caspase Signaling Pathways, *Cytotechnology*, 62 (3): 201-203.
- Morazzoni, P., Cristoni, A., Di Pierro, F., Avanzini, C., Ravarino, D., Stornello, S., Zucca, M., and Musso, T., 2005, *In Vitro* and *In Vivo* Immune Stimulating Effects of a New Standardized *Echinacea angustifolia* Root Extract, *Fitoterapia*, 76: 401-411.
- Mosmann, T.R., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxic Assays, *Journal of Immunology Methods*, 65: 55-63.
- Mosmann, T.R. and Coffinan, R.L., 1989, TH1 and TH2 cells: Different Patterns of Cytokine Secretion Lead to Different Functional Properties, *Annual Review of Immunology*, 7:145-173.
- Mukherjee, P.K., 2002, *Quality Control of Herbal Drugs, An Approach to Evaluation of Botanical*, 1<sup>st</sup> Ed. Business Horizons Pharmaceutical Publishers, New Delhi, p.86.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and J O'Shea, J., 2012, Helper T cell diversity and plasticity, *Current Opinion in Immunology*, 24: 297-302.
- Nalini, N., Sabitha, K., Viswanatham, P., and Menon, V.P., 1998, Influence of spices on the bacterial (enzyme) activity in experimental colon cancer, *Journal of Ethnopharmacology*, 62(1): 15-24.

- Neris, P.L.N., Caldas, J.P.A., Rodrigues, Y.K.S., Amorim, F.M.A., Leite, J.A., Rodrigues-Mascarenhas, S., *et al.*, 2013, Neolignan Licarin A presents effects against *Leishmania (Leishmania)* major associated with immunomodulation in vitro, *Experimental Parasitology*, 135: 307-313.
- Nitin, U.J., Vivek, P., and Remadevi, R., 2012, A Comparative Phytochemical Screening of Root and Stem of *Piper longum* Linn, *International Journal of Research Ayurvedic Pharmacy*, 3 (1): 67-69.
- Novelli, G.P., Angiolini, P., Livi, P., and Paternostro, E., 1989, Oxygen derived free radicals in the pathogenesis of experimental shock, *Resuscitation*, 18: 195-205.
- Nugraha, A.B., 2010, Gambaran Histopatologis Organ Hati dan Ginjal Ayam Broiler Setelah Pemberian Ekstrak Sirih Merah dan Diuji Tantang Virus *Avian influenza* H5N1, *Skripsi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nugroho, L.H., Sinta, G.N., dan Lestari, R.R.P., 2008. Korelasi antara Karakter Anatomi dengan Kandungan Nikotin pada Delapan Varietas Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), disampaikan pada Seminar Nasional Biodiversitas Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, di Universitas Airlangga Surabaya, 14 Juli 2008.
- Nwozo, S.O., Ajagbe, A.A., and Oyinloye, B.E., 2012, Hepatoprotective effect of *Piper guineense* aqueous extract against ethanol-induced toxicity in male rats, *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 2 (1): 71-76.
- Obeye, O.A., Emore, B.U., Emaibe, B.U., and Igbigbi, P.S., 2007, Histopathological Effect of *Piper guineense* Extract on Wistar Rats, *Journal of Biological Sciences*, 7 (8): 1484-1487.
- Pandey, A., Bani, S., Dutt, P., and Suri, K.A., 2010, Modulation of Th1/Th2 cytokines and inflammatory mediators by hydroxychavicol in adjuvant induced arthritic tissues, *Cytokine*, 49: 114-121.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., *et al.*, 1997, Phytochemistry of Genus *Piper*, *Phytochemistry*, 46: 597-673.
- Pepato, M.T., Folgado, V.B.B., Kettelhut, I.C., and Brunetti, I.L., 2001, Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 389-395.
- Percival, S.S., 2000, Use of *Echinacea* in Medicine, *Biochemical Pharmacology*, 60: 155-158.

- Pereira, A.C., Magalhaes, L.G., Januario, A.H., Pauletti, P.M., Cunha, W.R., Bastos, J.K., Nanayakkara, D.N.P., and Silva, M.L.A., 2011, Enantiomeric resolution of ( )-licarin A by high performance liquid-chromatography using a chiral stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1218: 7051-7054.
- Prabu, K., Karar, P.K., Hemalatha, S., and Ponnudurai, K., 2011, Isolation of chlorogenic acid from the stems of *Viburnum coriaceum* Blume, *Pelagia Research Library*, 2 (4): 87-92.
- Prabu, S.M., Muthumani, M., and Shagirtha, K., 2012, Protective effect of *Piper betle* leaf extract against cadmium-induced oxidative stress and hepatic dysfunction in rats, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 229-239.
- Prasad, A. K., Tyagi, O.D., Wengel, J., Boll, P.M., Olsen, C.E., Bisht, K.S., *et al.*, 1994, Lignans and Neolignans from stems and Fruits of *Piper wightii*, *Tetrahedron*, 50 (7): 2231-2240.
- Prasad, A. K., Tyagi, O.D., Wengel, J., Boll, P.M., Olsen, C.E., Bisht, K.S., *et al.*, 1995, Neolignans and a lignan from *Piper clarkii*, *Phytochemistry*, 39 (3): 655-658.
- Rachmawaty, F.J., Hisyam, B., Soesatyo, M.H., dan Wibawa, T., 2013, Potensi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Antimikobakterium, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 11 (1): 60-65.
- Rai, N., Yaadav, S., Verma, A.K., Tiwan, L., and Sharma, R.Kr., 2012, Quality Specifications on *Piper nigrum* L. – A Spice and Herbal Drug of Indian Commerce, *International Journal of Advanced Food Science and Technology*, 1 (1): 1-11.
- Reverchon, E. and Marrone, C., 2001, Modeling and Simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of vegetable oils, *Journal Supercritical Fluids*, 19:161-175.
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., and Tyler, V.E., 1996, *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Williams & Wilkins, Maryland USA, pp.10,137.
- Roitt, I.M., 1997, *Roitt's Essential Immunology*, Blackwell Science, Oxford, pp.22-38.
- Roshan, N. and Savitri, P., 2013, Review on Chemical Constituents and Parts of Plants as Immunomodulators, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*, 4 (1): 76-89.
- Safitri, M. and Fahma, F., 2008, Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia, *Hayati, Journal of Bioscience*, 15.

- Sagrawat, H. and Khan, M.Y., 2007, Immunomodulatory Plants: A Phytopharmacological Review, *Pharmacognocoy Review*, 1:248-260.
- Samuelsson, G., 1999, *Drugs of Natural Origin*, 4<sup>th</sup> 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.
- Satpute, K.L., Jadhav, M.M., Karodi, R.S., Katare, Y.S., Patil, M.J., Rub, R., and Bafna, A.R., 2009, Immunomodulatory Activity of Fruits of *Randia dumetorum* Lamk, *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1 (Agustus): 1-5.
- Schepetkin, I.A., Faulkner, C.L., Nelson-Overton, L.K., Wiley, J.A., and Quinn, M.T., 2005, Macrophage Immunomodulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Juniperus scopolorum*, *International Immunopharmacology*, 5: 1783-1799.
- Schodro, R.B.L., Pires, C.T.A., Carrara, V.S., Lemos, C.O.T., Cardoso-Filho, L., Souzaf, V.A., *et al.*, 2013, Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*, *Phytomedicine*, 20: 600-604.
- Senchina, D.S., McCann, D.A., Asp, J.M., Johnson, J.A., Cunnick, J.E., Kaiser, M.S., and Kohut, M.L., 2005, Changes in Immunomodulatory Properties of *Echinacea spp.* Root Infusions and Tinctures Stored at 4 C for Four Days. *Clinica Chimica Acta*, 355: 67-82.
- Shen, W. and Louie, S.G., 2005, *Immunology for Pharmacy Students*, Harwood Academic publisher, Amsterdam.
- Sherman, M.P., Aeberhard, E.E., Wong, V.Z., Griscavage, J.M., and Ignarro, L.J., 1993, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 191: 1301-1308.
- Singh, A., Failla, M.L., and Deuster, P.A., 1994, Exercise-induced changes in immune function: effects of zinc supplementation, *Journal of Applied Physiologi*, 76 (6): 2298-2303.
- Singh, S.K., Prasad, A.K., Olsen, C.E., Jha, A., Jain, S.C., Parmar, V.S., and Wengel, J., 1996, Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*, *Phytochemistry*, 43 (6): 1355-1360.

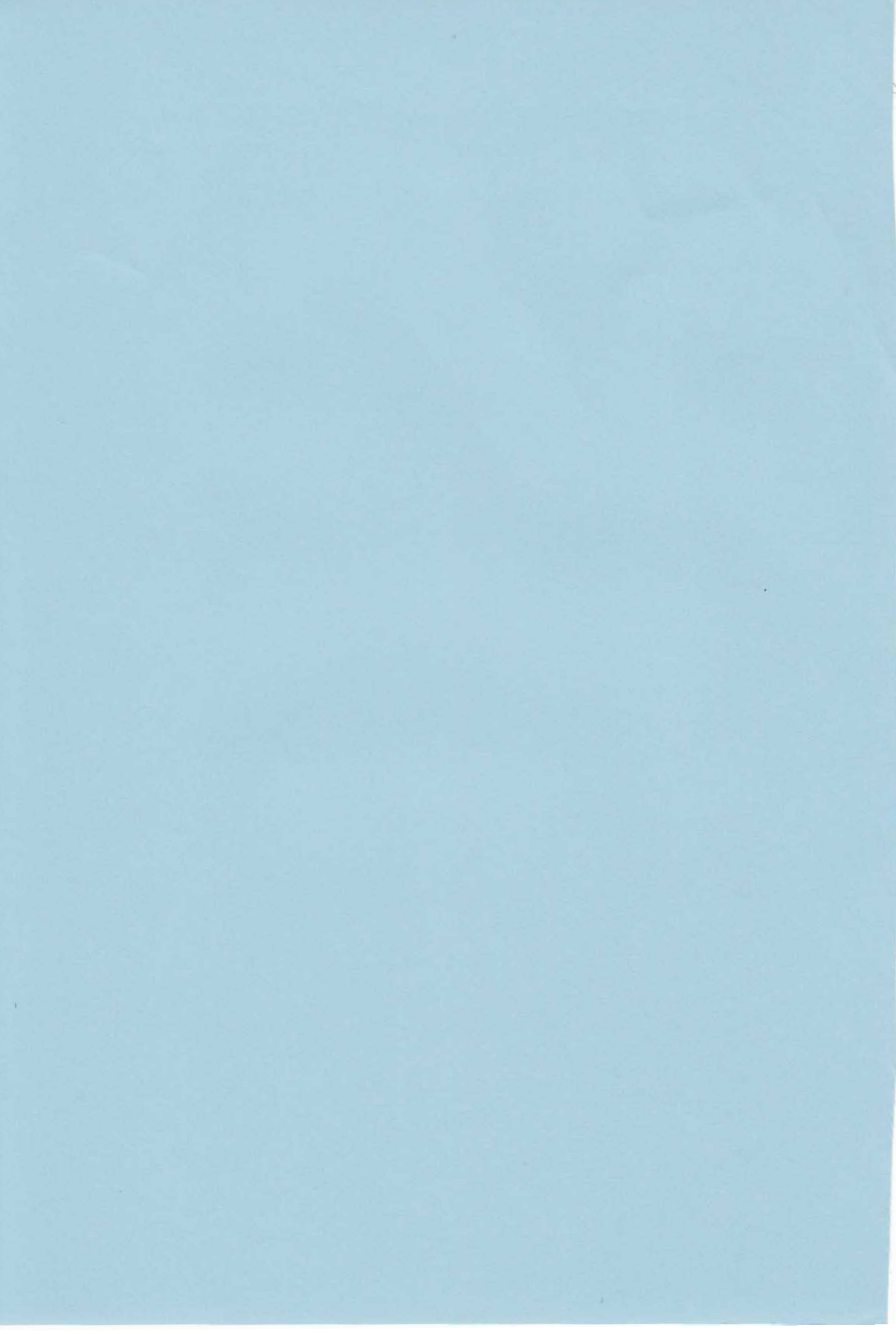


- Singh, M., Shakya, S., Soni, V.K., Dangi, A., Kumas, N., and Bhattacharya, S.M., 2009, The n-hexane and Chloroform Fractions of *Piper betle* L. Trigger Different Arms of Immune Responses in BALB/c Mice and Exhibit Antifilarial activity Against Human Lymphatic Filarid *Brugia malayi*, *International Immunopharmacology*, 9: 716-28.
- Sofowora, A., 1993, *Medicinal Plants and Traditional Medicines in Africa*, Chichester John Wiley and Sons, New York, pp. 97-145.
- South, E.H., and Exon, J.H., 2001, Multiple Immune Function in Rats Fed Echonacea extracts, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 23: 411-421.
- Souza, L.A., Moscheta, I.S., and Oliveira, J.H.G., 2004, Comparative Morphology and Anatomy of The Leaf and Stem of *Peperomia dahlestedtii* C.Dc., *Ottonia martiana* Miq and *Piper diospyrium* Kunth. (*Piperaceae*), *Gayana Bot.* 61 (1):6-17.
- Steinman, R.M., 2007, Dendritic cells: versatile controllers of the immune system, *Nature Medicine*, 13 (10): 7-11.
- Sulistiyani, N., Sasongko, H., Hertanti, M., dan Lana, L.M., 2007, Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* serta Identifikasi Komponen Kimianya, *Media Farmasi*, 6, 33-39, Yogyakarta.
- Sunila, E.S. and Kuttan, G., 2004, Immunomodulatory and Antitumor Activity of *Piper longum* Linn. and Piperine, *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 339-346.
- Sunila, E.S. and Kuttan, G., 2006, *Piper longum* inhibits VEGF and Proinflammatory Cytokines and Tumor-Induced Angiogenesis in C57BL/6 Mice, *International Immunopharmacology*, 6: 733-741.
- Suratmo, 2008, Aktivitas Antioksidan dan antikanker Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*), *Tesis*, M.Si., Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Sutikno, Nugroho, L.H., Yuliati, I.R., dan Priyono, Y., 2011, Anatomi dan Profil Minyak Atsiri Akar, Batang dan Daun Sepuluh Spesies Genus *Piper* Koleksi Kebun Raya Bogor. *Laporan Penelitian*. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hal. 12.
- Tabata, N., Tagami, H., and Terui, T., 1997, Dehydroepiandrosterone may be one of the regulators of cytokine production in atopic dermatitis. *Archives for Dermatological Research*, 289: 410-414.

- Thomson, R.G., McGavin, M.D., and Carlton, W., 1995, *Thomson's special Veterinary Pathology*, 2<sup>nd</sup> ed., London.
- Tirta, A.K., 2010, Efek Sitotoksik dan Induksi Apoptosis Fraksi Larut dan Tidak Larut Kloroform Ekstrak Etanolik daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap sel Hela dan VERO secara *In Vitro*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Tripathi, A.S., Chitra, V., Sheikh, N.W., Mohale, D.S., and Dewani, A.P., 2010, Immunomodulatory Activity of The Methanol Extract of *Amorphophallus campanulatus* (Araceae) Tuber, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (5): 451-454.
- Tripathy, G. and Pradhan, D., 2013, Evaluation of In-vitro Anti-proliferative Activity and In-vivo Immunomodulatory Activity of *Beta vulgaris*, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6 (1): 127-130.
- Tyagi, O.D., Jensen, S., Boll, P.M., Sharma, N.K., Bisht, K.S., and Parmar, V.S., 1993, Lignans and Neolignans from *Piper schmidtii*, *Phytochemistry*, 32(2): 445-448.
- Tzai, I., Hsieh, C., and Duh, C., 1998, Additional Cytotoxic Neolignans from *Persea obovatifolia*, *Phytochemistry*, 48 (8): 1371-1375.
- Umoh, I., Oyebadejo, S., Bassey, E., and Nnah, U., 2013, Chronic Consumption of Combined Extracts of *Abelmoschus esculentus* and *Piper guineense* Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats: Histopathological Study, *International Journal Pharmaceutic Biomedical Sciences*, 4 (2): 73-77.
- Unanue, E.R., 1997, Studies in listeriosis show on the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response, *Immunological Reviews*, 158:11-25.
- Victor, V.M., Rocha, M., and Fuente, M.D., 2003, Regulation of macrophage function by the antioxidant *N*-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin, *International Immunopharmacology*, 3: 97-106.
- Vlietinck, A.J., and Apers, S., 2001, 'Biological Screening Methods in The Search for Pharmacologically Active Natural Products', in Tringali, C., *Bioactive Compounds from Natural Sources*, Taylor & Francis, London.
- Voigt, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Diterjemahkan oleh Soendani N. S., UGM Press, Yogyakarta.

- Wagner, H., and Prosch, A., 1985, 'Immunostimulatory Drugs of Fungi and Higher Plants', in Farnsworth, N., and Wagner, H., *Economic and Medicinal Plant Research*, Vol.1, Academic Press, London, pp 83-85.
- Wagner, H., Kraus, S., and Jurcic, K., 1999, 'Search for Potent Immunomodulatory Agents from Plants and Other Sources', in Wagner, H., *Immunomodulatory Agents form Plants*, Birkhauser Verlag, Basel, pp 11-15.
- Wagner, H. and Blatt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed., Springer-Verlag, Tokyo, p. 384.
- Wahyudi, Y., 2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak n-heksana Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk.) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G pada Tikus Terinduksi Vaksin Hepatitis B dan Uji Histopatologisnya, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wahyuniari, I.A.I., 2006, Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) pada Respon Imun Seluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenes*, *Tesis*, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Washid, K. and Argal, A., 2011, Chromatographic Screening of the Ethanolic Extracts of *Zizyphs xylopyrus* (Retz.) Wild., *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 2 (3): 625-628.
- Werdani, S., 2012, Pengaruh Fraksi n-heksana Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In Vivo* terhadap Fagositosis Makrofag, Proliferasi Sel TCD4<sup>+</sup> dan TCD8<sup>+</sup> serta Titer Antibodi Tikus yang diinduksi *Phytohaemagglutinin*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Arung, E.T., Kusuma, I.W., Yulia, D., Pancaputra, A.N., and Sandra, F., 2009, Antiproliferative Effect of Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells *In Vitro*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8: 345-352.
- Wijayanti, M.A., 1996, Peranan Makrofag dalam Imunitas terhadap Infeksi Malaria: Kajian Kemampuan Fagositosis dan Sekresi Reactive Oxygen Intermediates Makrofag Peritoneum Mencit yang Diimmunisasi dan Tidak Diimmunisasi *In Vitro*, *Tesis*, Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wijayanti, M.A., 1999, Kemampuan Fgaositosis Makrofag Peritoneum Mencit yang Diimmunisasi selama Infeksi *P. berghei*, *Berkala Ilmu Kedokteran*, 31 (4): 213-218.

- Wildfeuer, A. and Mayerhofer, D., 1994, The Effects of Plant Preparations on Cellular Functions in Body Defense, *Arzneim-Forsch*, 44: 361-366.
- Wirotasangthong, M., Inagaki, N., Tanaka, H., Thanakijcharoenpath, W., and Nagai, H., 2008, Inhibitory Effects of *Piper betle* on Production of allergic Mediators by Bone Marrow-derived Mast Cells and Lung Epithelial Cells, *International Immunopharmacology*, 8: 453-457.
- Wiweko, O.D., 2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G dan Histopatologis Tikus yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- World Health Organization, 2000, *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Geneva.
- Yang, S., Li, C., Wang, S., Zhao, L., Hou, Z., Lou, H., and Ren, D., 2013, Chiral separation of two diastereomeric pairs of enantiomer of novel alkaloid-lignan hybrids from *Lobelia chinensis* and determination of the tentative absolute configuration, *Journal of Chromatography A*, 1311: 134-139.
- Yuristiyani, D.D., 2012. Potensi fraksi tak larut n-heksana ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *in vitro* sebagai imunomodulator terhadap fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit tikus yang diinduksi phytohemagglutinin, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Zenewicz, L.A. and Shen, H., 2007, Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview, *Microbes and Infection*, 9: 1208-1215.





**BAGIAN BIOLOGI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA**

Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281  
Telp. , 0274.542738, 0274.649.2568 Fax. +274-543120

**SURAT SURAT KETERANGAN**

No.: BF/28y/ Ident/Det/VIII/2011

Kepada Yth. :  
**Sdri/Sdr. Yustina Sri Hartini**  
**No. 10/306420/PFA/00049**  
**Fakultas Farmasi UGM**  
**Di Yogyakarta**

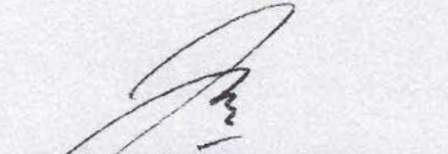
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi sampel tanaman yang Saudara kirimkan ke Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

No.Pendaft.	Jenis	Suku
663	<i>Piper crocatum</i> Ruiz. & Pav.	Piperaceae

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 5 Agustus 2011  
Ketua Bagian Biologi Farmasi  
Fakultas Farmasi UGM

  
Prof. Dr. Wahyono, SU., Apt.  
NIP. 195007011977021001

Lampiran 1. Surat keterangan hasil identifikasi/determinasi tanaman sirih merah



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU  
KOMISI ETHICAL CLEARANCE UNTUK PENELITIAN PRAKLINIK

---

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK**  
(*Ethical Clearance*)

Nomor: 068/KEC-LPPT/VII/2012

Komisi *Ethical Clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, setelah mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan bahwa penelitian:

- Judul penelitian : Uji Daya Imunomodulator Ekstrak Metalonik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)
- Peneliti Utama : Yustina Sri Hartini
- Asal Instansi : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma
- Lokasi Penelitian : 1. Laboratorium Farmakologi FK UGM  
2. Laboratorium Parasitologi FK UGM

Telah dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk dilaksanakan penelitian tersebut pada hewan uji mencit. Komisi *Ethical Clearance* mempunyai hak untuk melakukan pemantauan selama penelitian berlangsung.

Yogyakarta, 19 Juli 2012  
Komisi *Ethical Clearance*  
Ketua,



Prof. Dr. drh. Siti Isrina Oktavia Salasia

### Lampiran 3

#### Perhitungan dosis 2 berdasar dosis pemakaian daun sirih merah secara tradisional

1. Pemakaian daun sirih merah secara tradisional :

Daun sirih merah segar sebanyak 3 – 10 lembar dididihkan/diseduh dengan air panas hingga volume akhir menjadi 1 gelas air minum, kemudian diminum 3 kali sehari 1 sendok makan.

2. Penimbangan 10 lembar daun sirih merah yang diambil secara acak, didapatkan:

Daun ke-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Berat (g)	1,49	1,28	1,74	1,80	1,95	2,13	1,58	2,52	2,24	2,94

Berat total 10 daun : 19,67 gram, rata-rata berat 1 daun : 1,967 gram

3. Pemakaian 3 sampai 10 lembar daun dalam 1 gelas air minum = 5,901 sampai 19,67 gram daun / 250 ml air. Diminum 3 kali sehari 1 sendok makan = 3 x sehari @ 15 ml. Berat badan orang dewasa = 60 kg.

Sekali minum = (5,901 sampai 19,67) x 15/250

= 0,354 sampai 11,802 g/60kg berat badan

Rendemen ekstrak terhadap daun *P. crocatum* segar 2,7 %.

Sekali minum : 0,354 sampai 11,802 g daun segar setara dengan 0,009558 sampai 0,318654 g ekstrak/60 kgBB = 0,0053109 g/kgBB

Rendemen Pc2-2 dalam ekstrak 0,571 %.

2 dalam dosis sekali minum: 0,571 % x (0,0001593 sampai 0,0053109 g) = 0,9 sampai 30,3 g/kgBB.

Berat mencit BALB/c antara 25-35 g, diasumsikan 30 g, km faktor human adult : 37, km *factor mouse* : 3 (Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N., 2007, Dosen translation from animal to human studies, *The FASEB Journal*, Vol. 22, March 2007, p. 659-661), maka dosis menjadi:

Dosis sekali minum 2: 0,9 g/kgBB menjadi: animal dose x 3/37 = 11,1 mg/kgBB, kemudian pada uji pendahuluan digunakan dosis 10 mg/kgBB





DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
**LABORATORIUM PATOLOGI**  
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
 UNIVERSITAS GADJAH MADA

Jl. Fauna, Karangmalang, Yogyakarta 55281, Tlp. (0274) 9061103, 560862 Fax. 560861

No : 083/PA/IV/2014  
 Hal : Hasil Histopatologi  
 No. Protokol :-

Yth. Sdr. Yustina Sri Hartini  
 Di Fakultas Farmasi  
 Universitas Gadjah Mada  
 Yogyakarta

Berikut disampaikan hasil pembacaan preparat histopatologi organ hati dan ginjal tikus dengan pengecatan Hematoksilin dan Eosin.

Perlakuan	Kode	Organ	
		Hati	Ginjal
2,5 mg/KgBB 1	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	TAP	TAP
5,0 mg/KgBB 1	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	TAP	TAP
10 mg/KgBB 1	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	DH sedang	TAP
2,5 mg/KgBB 2	1	TAP	TAP
	2	DH sedang	TAP
	3	DH sedang	TAP
5,0 mg/KgBB 2	1	DH sedang	TAP
	2	DH sedang	TAP
	3	DH, FNCCL,R	TAP
10 mg/KgBB 2	1	DH sedang	TAP
	2	DH sedang	TAP
	3	DH difuse, FN	TAP
Kontrol normal	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	TAP	TAP
Kontrol pelarut	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	TAP	TAP
Kontrol positif	1	TAP	TAP
	2	TAP	TAP
	3	DH sedang	TAP

Keterangan

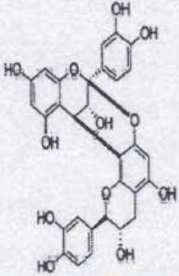
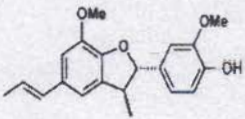
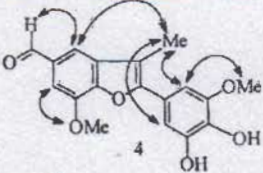
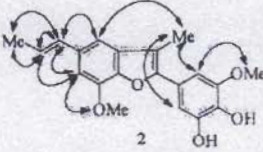
TAP	:	Tidak ada perubahan
DH	:	Degenerasi hidropik, ditandai adanya kebengkakan hepatosit dengan sitoplasma berwarna pudar/dop dengan vakuola-vakuola
FNCCL	:	Foki nekrotik sentrolobuler, adanya foki (satu area) di sekitar vena sentralis yang ditandai hepatositnya mengalami nekrosis (kematian sel) Nekrosis ditandai inti sel menjadi piknotik.
FN	:	Foki nekrotik, ditandai adanya foki (satu area) yang hepatositnya mengalami nekrosis (kematian sel) Nekrosis ditandai inti sel menjadi piknotik.
R	:	Radang, ditandai adanya infiltrasi sel radang (limfosit) di parenkim

Demikian hasil yang bisa kami sampaikan, atas kerjasamanya kami ucapkan terima kasih

Yogyakarta, 12 April 2013  
 u.b. Ketua Bagian Patologi

drh. Sugiyono, M.Sc.  
 NIP. 197801312009121002

**Lampiran 5**  
**Struktur senyawa proantosianidin A-1, licarin A, perseal D, dan obovaten**

Struktur senyawa	Nama senyawa (asal tumbuhan)	Aktivitas			
	<p>Proantosianidin A-1            (<i>Rhododendrum spiciferum</i>)</p>	Stimulan aktivitas makrofag	Upregulasi IL-12	Downregulasi IL-10	Tak ada laporan efek terhadap hati dan ginjal mencit
	<p>Licarin A            (<i>Aristolochia taliscana</i>)</p>	Tak ada laporan efek terhadap makrofag	Tak ada laporan efek terhadap IL-12	Downregulasi IL-10	ginjal dan hati mencit normal
	<p>Perseal D            (<i>Persea obovatifolia</i>)</p>	Sitotoksik terhadap sel P-388, KB16, A549, dan HT-29			
	<p>Obovaten            (<i>Persea obovatifolia</i>)</p>	Sitotoksitas terhadap sel P-388, KB16, A549, dan HT-29, lebih baik dari pada Perseal D			

## Lampiran 6

Hasil analisis perbedaan antar kelompok pada uji fagositosis makrofag perlakuan 1 dan 2 dengan one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19

I = perlakuan dengan	J = perlakuan dengan	Antara kelompok I dan J terdapat perbedaan bermakna (B) atau tidak bermakna (TB)					
		Hari ke-10 setelah infeksi <i>L. monocytogenes</i>			Hari ke-21 setelah infeksi <i>L. monocytogenes</i>		
		PF	IF	EF	PF	IF	EF
2,5 mg/kgBB <u>1</u>	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	B	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB	TB	TB	TB	TB
5 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB	B	B	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB	B	B	TB
Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB	TB	TB	B	TB	
10 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	B	TB	B	B
	Tanpa perlakuan	B	B	B	B	B	TB
	CMC Na 1%	B	B	B	B	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	B	B	B	TB	TB
2,5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB	TB	TB	TB	TB
5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	B	B
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	B
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	TB	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB	B	B	TB
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB	B	B	B

	CMC Na 1%	TB	TB	TB	B	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB	TB	TB	TB
10 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	B
	5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	B
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	B	TB	B	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B	B	B	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB	B	B	TB
	Tanpa perlakuan	B	B	TB	B	B	B
	CMC Na 1%	B	B	TB	B	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	B	TB	B	B	TB
		2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB
Tanpa perlakuan (kontrol normal)	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	B	B	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB	B	B	B
	CMC Na 1%	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB	TB	B	B	TB
CMCNa 1 % (kontrol pelarut)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	B	B	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB	TB	B	B	TB
Imboost 100 mg/kgBB (kontrol positif)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	B	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	B	TB	TB	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B	B	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	TB	TB	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB	B	B	TB
	Tanpa perlakuan	B	TB	TB	B	B	TB
	CMC Na 1%	B	TB	TB	B	B	TB

Keterangan : PF : Persen Fagositosis  
IF : Indeks Fagositosis  
EF : Efisiensi Fagositosis  
B : Berbeda bermakna (P<0,05)  
TB : Berbeda tidak bermakna

## Lampiran 7

Hasil analisis perbedaan antar kelompok pada uji produksi NO perlakuan 1 dan 2 dengan one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19

I = perlakuan dengan	J = perlakuan dengan	Antara kelompok I dan J terdapat perbedaan bermakna (B) atau tidak bermakna (TB)	
		Hari ke-10	Hari ke-21
		setelah infeksi <i>L. monocytogenes</i>	
2,5 mg/kgBB <u>1</u>	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	B
	CMC Na 1%	TB	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB
5 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B
	Tanpa perlakuan	B	B
	CMC Na 1%	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B
10 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	Tanpa perlakuan	B	B
	CMC Na 1%	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B
2,5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1B</u>	B	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B
	Tanpa perlakuan	B	B
	CMC Na 1%	TB	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	TB
5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB
	Tanpa perlakuan	B	B
	CMC Na 1%	B	B

	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB
10 mg/kgBB 2	2,5 mg/kgBB 1	B	B
	5 mg/kgBB 1	TB	B
	10 mg/kgBB 1	TB	TB
	2,5 mg/kgBB 2	B	B
	5 mg/kgBB 2	TB	B
	Tanpa perlakuan	B	B
	CMC Na 1%	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B
Tanpa perlakuan (kontrol normal)	2,5 mg/kgBB 1	TB	B
	5 mg/kgBB 1	B	B
	10 mg/kgBB 1	B	B
	2,5 mg/kgBB 2	B	B
	5 mg/kgBB 2	B	B
	10 mg/kgBB 2	B	B
	CMC Na 1%	TB	TB
CMCNa 1 % (kontrol pelarut)	Imboost® 100 mg/kgBB	B	B
	2,5 mg/kgBB 1	TB	B
	5 mg/kgBB 1	B	B
	10 mg/kgBB 1	B	B
	2,5 mg/kgBB 2	TB	B
	5 mg/kgBB 2	B	B
	10 mg/kgBB 2	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB
Imboost® 100 mg/kgBB (kontrol positif)	Imboost® 100 mg/kgBB	B	B
	2,5 mg/kgBB 1	B	TB
	5 mg/kgBB 1	TB	B
	10 mg/kgBB 1	TB	B
	2,5 mg/kgBB 2	B	TB
	5 mg/kgBB 2	TB	TB
	10 mg/kgBB 2	TB	B
	Tanpa perlakuan	B	B
CMC Na 1%	B	B	

Keterangan : B : Berbeda bermakna (P<0,05)

TB : Berbeda tidak bermakna

## Lampiran 8

Hasil analisis perbedaan antar kelompok pada Uji Titer IgG perlakuan 1 dan 2 dengan one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19

I = perlakuan dengan	J = perlakuan dengan	Antara kelompok I dan J terdapat perbedaan bermakna (B) atau tidak bermakna (TB)		
		Hari ke-0	Hari ke-10	Hari ke-21
		setelah infeksi <i>L. monocytogenes</i>		
2,5 mg/kgBB <u>1</u>	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	TB
5 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
10 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
2,5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB

	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	TB
10 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
Tanpa perlakuan (kontrol normal)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	TB
CMCNa 1 % (kontrol pelarut)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	TB
Imboost® 100 mg/kgBB (kontrol positif)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB

Keterangan : B : Berbeda bermakna (P<0,05)  
TB : Berbeda tidak bermakna



## Lampiran 9

Hasil analisis perbedaan antar kelompok perlakuan pada Uji IL- 12 1 dan 2 dengan one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan program SPSS 19

I = perlakuan dengan	J = perlakuan dengan	Antara kelompok I dan J terdapat perbedaan bermakna (B) atau tidak bermakna (TB)		
		Hari ke-0	Hari ke-10	Hari ke-21
		Setelah infeksi <i>L. monocytogenes</i> )		
2,5 mg/kgBB <u>1</u>	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
5 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	TB
10 mg/kgBB <u>1</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	B
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	TB	B	B
	CMC Na 1%	TB	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	B
2,5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	B	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	B	B	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB
	CMC Na 1%	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	B	B	TB
5 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	Tanpa perlakuan	B	B	TB

	CMC Na 1%	B	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	B	TB
10 mg/kgBB <u>2</u>	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	B
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	TB	B
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	Tanpa perlakuan	B	B	B
	CMC Na 1%	B	B	B
	Imboost® 100 mg/kgBB	TB	TB	B
Tanpa perlakuan (kontrol normal)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B
	CMC Na 1%	TB	B	TB
	Imboost® 100 mg/kgB	TB	B	TB
CMCNa 1 % (kontrol pelarut)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	TB	TB
	Imboost® 100 mg/kgB	TB	B	TB
Imboost® 100 mg/kgB (kontrol positif)	2,5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	5 mg/kgBB <u>1</u>	TB	TB	TB
	10 mg/kgBB <u>1</u>	TB	B	B
	2,5 mg/kgBB <u>2</u>	B	B	TB
	5 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	TB
	10 mg/kgBB <u>2</u>	TB	B	B
	Tanpa perlakuan	TB	B	TB
	CMC Na 1%	TB	B	TB

Keterangan : B : Berbeda bermakna (P<0,05)

TB : Berbeda tidak bermakna

## RINGKASAN

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) atau DPc banyak digunakan sebagai obat tradisional. Penelitian secara *in vivo* menunjukkan bahwa ekstrak DPc meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, tetapi tidak berpengaruh terhadap proliferasi limfosit (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013). Uji titer imunoglobulin G (IgG) dari ekstrak n-heksana DPc pada tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan adanya efek immunosupresan pada dosis 10 mg/kg berat badan (BB), dan efek immunostimulan pada dosis 100 mg/kgBB (Wahyudi, 2010). Ekstrak etanol DPc tidak berpengaruh terhadap titer IgG baik pada dosis 10, 100, dan 300 mg/kgBB (Wiweko, 2010). Secara *in vitro*, senyawa hasil isolasi (**1** dan **2**) dari DPc pada dosis 5 µg/ml dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Kedua isolat diidentifikasi sebagai neolignan yakni **1** adalah 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3, 5-dienone dan **2** adalah 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone (Kustiawan, 2012).

Respon imun dikelompokkan menjadi respon imun bawaan yang bersifat non spesifik dan respon imun adaptif atau spesifik. Respon imun spesifik terdiri dari respon imun seluler dan humoral. *Listeria monocytogenes* merupakan bakteri intraseluler fakultatif, akan menginduksi respon imun bawaan dan adaptif (Abbas *et al.*, 2007). 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. Makrofag yang teraktivasi merupakan sumber utama produksi interleukin 12 (IL-12), sitokin imunoregulator kunci pada infeksi bakteri dan virus, sebaliknya interleukin 10 (IL-10) menghentikan respon makrofag yang teraktivasi sehingga menghambat produksi IL-12 (Abbas *et al.*, 2007, Hamza *et al.*, 2010).

Hati dan ginjal merupakan organ untuk metabolisme dan ekskresi obat, potensial untuk dipengaruhi oleh bahan-bahan toksik. Ekstrak etanol DPc menyebabkan perubahan patologis pada organ hati dan ginjal (Nugraha, 2010). Pada dosis 300 mg/kgBB, ekstrak n-heksana maupun ekstrak etanol DPc tidak

menyebabkan kerusakan pada ginjal maupun hati tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010).

Penelitian ini bertujuan menetapkan efek imunomodulator 1 dan 2 secara *in vivo* dengan mengukur respon imun seluler dan humoral pada mencit yang respon imunnya diinduksi dengan *Listeria monocytogenes*. Respon imun seluler ditetapkan melalui pengukuran aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO, dan proliferasi limfosit, sedangkan respon imun humoral ditetapkan dengan pengukuran titer IgG. Lebih lanjut dalam penelitian ini ditetapkan pengaruh perlakuan dengan 1 dan 2 terhadap produksi IL-12 dan IL-10. Pengaruh perlakuan terhadap hati dan ginjal diperiksa melalui pemeriksaan gambaran histopatologis hati dan ginjal mencit.

Aktivitas fagositosis makrofag dari ekstrak, fraksi larut dan tak larut metanol 60% diuji secara *in vitro* menggunakan *latex beads*. Fraksi yang memiliki aktivitas imunomodulasi difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV), dengan *gradient* pelarut n-heksana dan etil. Fraksi paling aktif belum dilanjutkan pada tahap isolasi senyawa karena kemudian Kustiawan (2012) melaporkan bahwa 1 dan 2 yang diisolasi dari ekstrak etanol DPc, secara *in vitro* mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Informasi tersebut ditindaklanjuti dengan mencari cara efisien untuk mengumpulkan sejumlah isolat yang cukup untuk uji *in vivo* dari ekstrak metanol DPc. Pengumpulan 1 dan 2 tersebut menggunakan modifikasi metode isolasi yang digunakan Kustiawan (2012). Modifikasi metode berupa perubahan jenis dan jumlah fase gerak pada fraksinasi ekstrak metanol DPc. Fraksinasi ekstrak metanol DPc dengan metode KCV berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan metanol. Isolat 1 dan 2 terdapat pada fraksi III dan IV dari 5 fraksi hasil pemisahan ekstrak metanol DPc secara KCV. Isolasi kedua senyawa dilanjutkan dengan pemurnian dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif.

Pengujian efek imunomodulator terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama, dilakukan secara *in vivo* menggunakan mencit BALB/c yang respon imunnya diinduksi dengan bakteri *Listeria monocytogenes*. Pada penelitian utama senyawa uji adalah 1 dan 2 dengan dosis 2,5; 5; dan 10 mg/kgBB, dengan tiga kelompok kontrol. Mencit kelompok kontrol normal tidak diberi perlakuan, kelompok

kontrol negatif diberi perlakuan dengan *carboximethyl cellulosa natrium* (CMCNa) 1%, kontrol positif diberi perlakuan dengan 100 mg/kgBB Imboost® (berisi ekstrak *Echinacea* dan zinc picolinate). Pemberian bahan uji secara peroral selama 14 hari, pada hari ke-15 (hari ke-0), semua mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Infeksi ulang pada hari ke -10 setelah infeksi pertama. Pada hari ke-10 setelah infeksi pertama, cairan peritoneal mencit diambil untuk pengukuran aktivitas fagositosis makrofag dan produksi NO, sedangkan limfosit diambil dari limpa untuk pengukuran proliferasi limfosit. Uji aktivitas fagositosis menggunakan *lateks beads*. Aktivitas fagositosis makrofag diukur dengan 3 parameter yakni Persen Fagositosis (PF), Indeks Fagositosis (IF), dan Efisiensi Fagositosis (EF) (Sanchez *et al.*, 2008). Produksi NO diukur setelah reaksi NO dengan reagen Griess, kadar NO dihitung dengan membandingkan *optical density* (OD) bahan uji terhadap OD standar nitrit. Uji proliferasi limfosit menggunakan metode *3-[4,5-(dimethylthiazol-2-yl)]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*] (MTT). Pengukuran titer IgG, IL-12, dan IL-10 berturut-turut menggunakan *mouse IgG elisa kit*, *mouse IL-12 Platinum ELISA kit*, dan *mouse IL-10 Platinum ELISA kit*. Efek perlakuan dengan 1 dan 2 terhadap gambaran histopatologis hewan uji diperiksa pada preparat hati dan ginjal mencit yang dibuat dengan pengecatan hematosilin-eosin, kemudian dilakukan pengamatan mikroskopis. Data hasil uji efek imunomodulator dianalisis dengan one way ANOVA dilanjutkan uji Tukey menggunakan SPSS 19. Data hasil pemeriksaan gambaran histopatologis hati dan ginjal dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Maserasi terhadap DPc menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam. Rendemen serbuk terhadap DPc segar sebesar 23 %, rendemen ekstrak terhadap DPc segar sebesar 2,7 %, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk DPc sebesar 11,8 %. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* menunjukkan bahwa perlakuan 150 µg/ml fraksi tak larut (FTL) metanol 60% menghasilkan aktivitas fagositosis makrofag yang tertinggi. Berdasarkan kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi hasil KCV FTL digabung menjadi 5 fraksi (FI sampai FV). Perlakuan dengan FII dosis 150 µg/ml menyebabkan PF yang sama, tetapi lebih tinggi pada IF, dibandingkan perlakuan dengan Imboost®.

Profil KLT ekstrak dan fraksi standar yang berisi 1 dan 2 dengan deteksi UV 254 nm, UV 366 nm, serta reagen serium (IV) sulfat yang dilanjutkan pemanasan menunjukkan bahwa 1 dan 2 terdeteksi dalam ekstrak metanol DPc. Pemisahan dengan KCV terhadap 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan 5 fraksi (F-I, F-II, F-III, F-IV, dan F-V) dengan berat fraksi total 1,78 gram. Profil KLT 5 fraksi hasil KCV tersebut menunjukkan 1 dan 2 terdapat pada F-III dan F-IV, sehingga isolasi 1 dan 2 dilakukan terhadap kedua fraksi tersebut. Isolasi 1 dan 2 dengan KLT preparatif dari 2,12 gram ekstrak metanol DPc menghasilkan rendemen isolat 1 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,566 %, sedangkan rendemen isolat 2 terhadap ekstrak metanol DPc sebesar 0,571 %. Idealnya kemurnian senyawa ditunjukkan oleh adanya puncak tunggal pada kromatogram *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil analisis HPLC pada  $\lambda$  234,5 nm dari 1 dan 2 yang murni secara KLT, menunjukkan bahwa terdapat puncak kromatogram yang belum tunggal, sehingga pembahasan tentang kedua senyawa pada penelitian ini merujuk pada senyawa yang murni secara KLT. Senyawa 1 dan 2 hasil isolasi dari ekstrak metanol DPc mempunyai profil KLT yang sama dengan 1 dan 2 dari ekstrak etanol DPc (Kustiawan, 2012), hal ini dibuktikan dengan metode ko-kromatografi lapis tipis dengan sistem KLT dan deteksi yang sama dengan Kustiawan (2012). Senyawa 1 dan 2 dapat dijadikan senyawa penanda (*marker*), yang merupakan *therapeutic components* bagi DPc.

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa 2 pada dosis 10 mg/kgBB mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, mempengaruhi aktivitas produksi NO dan IL-12, namun pengaruh pada proliferasi limfosit, titer IgG, dan IL-10 tidak berbeda bermakna dengan kontrol pelarut. Pada hari ke-10 hasil uji NO dan proliferasi limfosit terjadi *trend* penurunan yang kemungkinan disebabkan berkurangnya sel bakteri *L. monocytogenes*, maka untuk penelitian selanjutnya (utama) pada hari ke-10 dilakukan infeksi ulang.

Hasil penelitian utama menunjukkan bahwa 1 dan 2 meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada dosis 5 mg/kgBB. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag oleh 1 dan 2 pada dosis 10 mg/kgBB setara dengan dosis 100 mg/kgBB Imboost®. Senyawa 1 dan 2 pada dosis 2,5; 5 dan 10 mg/kgBB meningkatkan

produksi NO. Aktivitas produksi NO mencit kelompok perlakuan 1 dan 2 menunjukkan pola yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus  $OC_2H_3$  dari gugus OH pada struktur kimia 1 dan 2 tidak menyebabkan perbedaan aktivitas produksi NO. Analisis statistik jumlah limfosit mencit kelompok perlakuan dengan 1, 2, maupun Imboost® terhadap kontrol perlakuan dan kontrol pelarut menunjukkan tidak berbeda bermakna. Diduga pemberian 1 dan 2 tidak berpengaruh pada aktivitas proliferasi limfosit, atau pengaruh kedua senyawa terhadap proliferasi sel secara tidak langsung. Pada penelitian ini titer IgG mencit yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* (hari ke-11 setelah infeksi ulang) menunjukkan perbedaan tidak bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Kemungkinan *Listeria monocytogenes* menginduksi imunitas seluler, dan tidak menginduksi respon imun humoral sehingga dalam penelitian ini produksi titer IgG tidak naik. Produksi IL-12 meningkat dengan meningkatnya dosis 1 dan 2. Efek 1 dan 2 pada dosis 2,5 mg/kgBB terhadap produksi IL-12, setara dengan Imboost®. Aktivitas produksi IL-12 mencit kelompok perlakuan 1 menunjukkan pola yang sama dengan 2. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus  $OC_2H_3$  dari gugus OH pada struktur kimia 1 dan 2 tidak menyebabkan perbedaan aktivitas produksi IL-12. Produksi IL-10 pada mencit tidak terpengaruh oleh perlakuan dengan 1 dan 2. Kemungkinan aktivitas produksi IL-10 dari 1 dan 2 setara dengan 100 mg/kg BB Imboost®.

Hasil uji efek imunomodulator menunjukkan bahwa 1 dan 2 meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO dan IL-12. Pengaruh 1 dan 2 terhadap proliferasi limfosit, titer IgG, dan produksi IL-10 tidak berbeda bermakna terhadap kontrol. Perlakuan dengan 1 dan 2 mampu meningkatkan produksi IL-12, akan tetapi tidak mempengaruhi proliferasi limfosit. Kemungkinan 1 dan 2 mengganggu ikatan antara reseptor IL-12 pada limfosit dengan sitokin IL-12. Kesimpulan tersebut diperkuat dengan data bahwa kadar IL-10 tidak dipengaruhi, kemungkinan karena proliferasi limfosit menjadi sel Th2 juga tidak dipengaruhi sehingga produksi IL-10 oleh sel Th2 tidak dipengaruhi.

Aktivitas fagositosis makrofag karena perlakuan dengan 1 dan 2 pada dosis 2,5 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan kontrol normal

dan kontrol pelarut. Dosis 2,5 mg/kgBB 1 setara dengan 442 mg/kgBB ekstrak, dan untuk 2 setara dengan 438 mg/kgBB ekstrak. Ekstrak DPc pada dosis 100 mg/kgBB dan 300 mg/kgBB mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011), hal ini mengindikasikan bahwa 1 dan 2 kurang aktif dibanding ekstrak DPc. Pada penelitian ini, profil aktivitas imunomodulator mencit yang diberi perlakuan dengan 1 dan 2 dapat dikatakan sama. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dari OH pada struktur kimia 1 dan 2 tidak berpengaruh pada perbedaan aktivitas imunomodulator.

Pengamatan mikroskopik pada ginjal dan hati menunjukkan bahwa perlakuan dengan 1 dan 2 tidak berpengaruh pada gambaran histopatologis ginjal. Perubahan histopatologis hati terjadi karena perlakuan dengan 2, dan kenaikan dosis 2 cenderung menyebabkan derajat kerusakan hati yang semakin berat. Perlakuan dengan dosis 2,5 mg/kgBB 2 yang setara dengan dosis ekstrak sebesar 438 mg/kgBB, menyebabkan degenerasi hidropik ringan pada hati, oleh karena itu pemakaian ekstrak dengan dosis tersebut dalam jangka waktu lama tidak dianjurkan. Pengobatan dengan dosis tersebut sebaiknya hanya digunakan ketika pasien membutuhkan imunostimulan dengan monitoring kondisi klinis hati pasien. Isolat 1 maupun Imboost® (mengandung ekstrak *Echinacea* & zinc picolinat) tidak menunjukkan efek perubahan gambaran histopatologis pada ginjal dan hati. Penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan gugus OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> dan OH pada 1 dan 2 menyebabkan efek yang berbeda pada gambaran histopatologis hati, kemungkinan gugus OH pada 2 merupakan penyebab perubahan pada gambaran histopatologis hati.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat 1 dan 2 merupakan imunomodulator, meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag, produksi NO, dan IL-12. Pengaruh 1 dan 2 terhadap proliferasi limfosit, titer IgG, dan produksi IL-10 tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Kemungkinan mekanisme aksi isolat 1 dan 2 melalui peningkatan aktivitas fagositosis makrofag. Pada dosis 2,5; 5; dan 10 mg/kgBB, isolat 1 tidak menyebabkan perubahan gambaran histopatologis pada ginjal dan hati. Isolat 2 tidak menyebabkan perubahan gambaran histopatologis pada ginjal akan tetapi pada dosis 2,5 mg/kgBB menyebabkan degenerasi hidropik dan pada dosis 5 dan 10 mg/kgBB menyebabkan nekrosis hati.



## SUMMARY

Red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) leave is widely used as a traditional medicine in Indonesia. *In vivo* researches on the immunomodulatory activity of red betel leaf suggested that the extract of red betel leaf induced macrophage phagocytic activity, however it had no effect on lymphocyte proliferation (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011; Ardianto, 2013). Immunoglobulin G (IgG) titre test of red betel leaf n-hexane extract on rats induced hepatitis B vaccine showed immunosuppressive effects at the dose of 10 mg/kg body weight (BW), whereas the dose of 100 mg/kgBW showed immunostimulatory effects (Wahyudi, 2010). On the contrary the ethanol extract of the same leaf had no effect at the doses of 10, 100, and 300 mg/kgBW (Wiweko, 2010). *In vitro* study showed that at the dose of 5 µg/ml isolated compound (**1** and **2**) from red betel leave increased macrophage phagocytic activity. Both **1** and **2** were identified as neolignans, **1** was 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3, 5-dienone and **2** was 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone (Kustiawan, 2012).

The immune responses are grouped into the innate and adaptive immune response which is non specific and specific response respectively. Specific immune response consists of cellular and humoral immune responses. Animal immune response can be induced by bacterial infection. *Listeria monocytogenes* is a facultative intracellular bacterium, which is able to induces innate and adaptive immune responses (Abbas *et al.*, 2007). One of activated macrophages effector function to kill microbes phagocytosed, shown by the production of reactive oxygen species, nitric oxide (NO), and lysosomal enzymes. Activated macrophages are the main source of interleukin 12 (IL-12) production, which is cytokine immunoregulator key on bacterial and viral infection, whereas interleukin 10 (IL-10) stop the response of activated macrophage resulted in the inhibition of IL-12 production (Abbas *et al.*, 2007, Hamza *et al.*, 2010).

The liver and kidneys are the organs used for metabolism and excretion of drugs. Therefore both organs are potential to be affected by toxic substances. Previous research showed that the ethanol extract caused pathological changes in liver and

kidneys (Nugraha, 2010). Other studies reported that the dose of 300 mg/kgBW n-hexane and ethanol extracts of red betel leaf did not damage the kidneys and liver of mice induced by hepatitis B vaccine (Wahyudi, 2010; Wiweko, 2010).

This study aim to know the *in vivo* immunomodulatory effect of 1 dan 2 by determining its cellular and humoral immune responses. The cellular immune response was determined by macrophage phagocytic activity test, NO production, and lymphocyte proliferation, whereas the humoral immune response determined by measuring IgG titre. Moreover, the study was also determined the effects of 1 and 2 on the IL-12 and IL-10 production. In this study, histopathologic features of mice liver and kidneys effect due to the treatment with 1 and 2 were microscopically.

Macrophage phagocytic activity of the extract, soluble fraction and non soluble fraction were *in vitro* examined using latex beads. Fractions which have immunomodulating activity further fractionated by the method of vacuum column chromatography, with a gradient solvent of n-hexane and ethyl. The most active fraction was not continued for isolation the immunomodulatory compound, because Kustiawan (2012) told that 1 and 2 isolated from the ethanol extract of the red betel leaf were able to improve the *in vitro* macrophage phagocytic activity. Based on that information, the research was done by finding an efficient way to collect a sufficient number of 1 and 2 for *in vivo* testing. The collection of 1 and 2 isolated from the methanol extract of red betel leaf was conducted using a modified isolation method of Kustiawan (2012). Modification was done on the kind and volume of solvent. Fractionation of the red betel leaf methanol extract was done by vacuum column chromatography using n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and methanol as solvents. Compound 1 and 2 were found in the fraction third and fourth from five fraction in total. The experiment was continued by purification of 1 and 2 using preparative TLC method.

Immunomodulatory effects testing consists of a preliminary study and a main study conducted *in vivo* using BALB/c mice which its immune response was induced by bacteria *Listeria monocytogenes*. In the main study, tested compounds were 1 and 2 with the dose of 2.5; 5; and 10 mg/kgBW. There were three control groups in the experiment. Those were control group of normal untreated mice, negative control

group treated with carboxymethyl cellulose sodium 1%, and the positive control treated with 100 mg/kg body weight Imboost® (contains extracts of Echinacea and zinc picolinate). Oral administration of the test material was done for 14 days. In the day of 15 (day 0), all mice were infected with *L. monocytogenes*. Reinfection was done in the day ten after the first infection. In the day ten after first infection, peritoneal fluid of mice were taken. The fluid were used for measurement of macrophage phagocytic activity and nitric oxide production. Lymphocyte was taken from spleen used for the measurement of lymphocyte proliferation. Moreover macrophage phagocytic activity assay was done using latex beads. The assay was measured by three parameters, namely Phagocytosis Percentage (PP), Phagocytosis Index (PI), and Phagocytosis Efficiency (PE) (Sanchez *et al.*, 2008). Nitric oxide production was measured after the reaction of NO with Griess reagent. The NO concentration is calculated by comparing the optical density of tested materials against nitrite standards. Lymphocyte proliferation test was done using 3-[4,5-(dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) method. Measurement of IgG titre, IL-12, and IL-10 were done using mouse IgG elisa kit, mouse IL-12 ELISA kit Platinum, and Platinum mouse IL-10 ELISA kit respectively. The effect of **1** and **2** were examined using histopathological slide of mice liver and kidney prepared using hematoxylin-eosin staining, continued by microscopic observation. The data of immunomodulatory effects test were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test using SPSS 19. Histopathological features examination of liver and kidney tissues were analyzed descriptively by comparing the treatment group with the control group.

The maceration on red betel leaf extract resulted a black thick mass. The fresh red betel leaf yielded powder in amount of 23%, while the fresh red betel leaf yielded extract in amount of 2.7%. Moreover the powder yielded extract in amount of 11.8%. The results of *in vitro* macrophage phagocytic activity test showed that the treatment of 150 ug/ml non soluble fraction caused the highest macrophage phagocytic activity. Based on the similarity of thin layer chromatography (TLC) profiles, fractions resulted from vacuum column chromatography (VLC) were combined to be five fractions.

Treatment with fraction two at the dose of 150 mg/ml resulted in the same PP, but higher PI compared to treatment with Imboost®.

Thin Layer Chromatography profile of both extract and standard fraction containing 1 and 2 showed that both compounds were detected in the red betel leaf methanol extract. Separation on 2.12 grams of red betel leaf methanol extract using vacuum column chromatography yielded five fractions with the total weight of 1.78 grams. Isolation of 1 and 2 from 2.12 grams of the red betel leaf methanol extract using TLC-Preparative resulted 1 with the yield of 0.566%, while the yield of 2 was 0.571%. High Performance Liquid Chromatography detection at  $\lambda$  234.5 nm of pure 1 and 2 resulted from TLC, indicated that the peak of each compound was not single yet, therefore this analysis refer to the pure TLC compound. Isolate 1 and 2 resulted from this research had the same TLC profile with those of Kustiawan (2012). It was proved by co-TLC method using the same methode and detection with Kustiawan (2012). The 1 and 2 can be used as a marker compound, which is a therapeutic components for red betel.

Preliminary observations indicated that the compound 2 at a dose of 10 mg/kg body weight able to increase the macrophage phagocytic activity, which are significantly different with control. Treatment with 2 at the dose of 10 mg/kg body weight had effect on the NO and IL-12 production, but had no effect on lymphocyte proliferation, IgG titre, and IL-10 production. On the tenth day, the results of NO test and lymphocyte proliferation showed the trend of decreation which was may be due to the reduction of *L. monocytogenes* number. Therefore, in the following research, the reinfection was done in the day tenth.

The main research show that 1 and 2 at the dose of 5 mg/kgBW increase the macrophage phagocytic activity. The macrophage phagocytic activity effect of 1 and 2 at the dose of 10 mg/kgBW is equivalent to a dose of 100 mg/kgBW Imboost®. Compound 1 and 2 at a dose of 2.5; 5 and 10 mg/kgBW, increased the NO production. Nitric oxide production activity of mice treated with 1 and 2 showed the same pattern. This result indicated that the differences of OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> group from OH group at the 1 and 2 chemical structure did not cause the differences of NO production activity. Statistical analysis of mice lymphocytes number treated with 1, 2, and Imboost®

(positive control) compare to normal and solvent control showed there were no significantly difference. Allegedly, the administration of 1 and 2 to mice have no effect on lymphocyte proliferation activity, or the effects of both compound on cell prolifertaion occurred indirectly. The IgG titre of mice treated with 1 and 2 at the day of 21<sup>st</sup> after the infection with *L. monocytogenes* (day 11 after re-infection) showed no significantly difference compared to the control group. *Listeria monocytogenes* which is an intracellular bacterium induced cellular immunity, but did not induce a humoral immune response, so that the IgG titre production did not increase in this study. The increase of IL-12 production in mice concomitant with the increase of 1 and 2 doses treatment. The effects of 1 and 2 at a dose of 2.5 mg/kgBW on the IL-12 production, equivalent to those of 100 mg/kg body weight Imboost<sup>®</sup>. The production of IL-10 in mice were not affected by the treatment of 1 and 2. The results of this study also showed that the IL-10 production due to 1 and 2 treatment equivalent to those of Imboost<sup>®</sup>.

The immunomodulatory test show that 1 and 2 increased the macrophages phagocytic activity, NO production and IL-12 production, but lymphocyte proliferation, IgG titre, and IL-10 production. The lymphocyte proliferation should activate by IL-12, but in this study 1 and 2 were not affect to lymphocyte proliferation. Maybe 1 and 2 interfere the bonding of IL-12 on limphocytes IL-12 receptor. This conclusion was supported by the unaffected production of IL-10 which produce by Th2 cells. Th2 cell may not affected by 1 and 2 so the IL-10 production was not affected too.

The treatment of 1 and 2 at a dose of 2.5 mg/kgBW showed no significant difference compared to control. Two and a half mg/kg body weight 1 and 2 equivalent to 442 mg/kgBW and 438 mg/kgBW extract respectively. Dose of 100 and 300 mg/kg BW red betel leaf extract were able to increased the macrophage phagocytic activity (Apriyanto, 2011; Indriyani, 2011). This result indicated that 1 and 2 is less active than the red betel leaf extract. In this study, the profile of immunomodulatory activity of mice treated with 1 and 2 were same each other. This result indicated that the differences of OC<sub>2</sub>H<sub>3</sub> group from OH group at the both chemical structure had no effect on the differences in immunomodulatory activity.

Microscopic observation of the kidneys and liver showed that treatment with 1 and 2 effected liver structure but had no effect on the kidneys histopathological features. The liver damage occurs due to the treatment with 2. The increase 2 doses tend to increased the damage of liver. The treatment with a dose of 2.5 mg/kgBW 2 equivalent to dose of 438 mg/kgBW red betel leaf extract, causing liver damage in the form of mild hydropic degeneration. Therefore, the use of the extract at the mentioned dose for long time was not recommended. Treatment with 2 or the extract at these doses should only be used when a patient requires immunostimulant, with careful monitoring of the patient's liver clinical condition. Isolate 1 and Echinacea extract showed no effect on the kidneys and liver histopathological features. This study shows that the differences between  $OC_2H_3$  and OH groups on both compounds caused different histopathological features effects on the mice liver. It seems that the OH group caused liver damage.

The results of this study showed that 1 and 2 were immunomodulator, i.e., increase macrophage phagocytic activity, NO and IL-12 production. The effect of 1 and 2 on lymphocyte proliferation, IgG titre and IL-10 production was no significantly difference with control. The mechanism action of 1 and 2 possibility occurred through increase macrophage phagocytic activity. At the doses of 2,5; 5; and 10 mg/kgBW, 2 did not cause histopathological features changes on the kidney but at the dose of 2.5 mg/kgBW caused hydropic degeneration and at the dose of 5 mg/kgBW caused necrosis of the mice liver.

## NASKAH PUBLIKASI

### PUBLIKASI PADA SEMINAR :

#### Nasional :

Publikasi ke-1 : Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In Vitro*

(Seminar 'Pemberdayaan pasien daam self management diabetes mellitus untuk meningkatkan kualitas hidup', Yogyakarta, 10 Desember 2011)

Publikasi ke-2 : Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Senyawa Kode Pc-2 dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz. & Pav.) Secara *In Vivo*

(Seminar 'Pengendalian, Pelestarian, Penelitian dan Pengembangan serta Pemanfaatan Tumbuhan Obat Indonesia', Palembang 14-15 Maret 2013)

#### Internasional :

Publikasi ke-3 : *In Vivo* Immunomodulatory Effect of Two Compounds Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) on BALB/c Mice Infected with *Listeria monocytogenes*

(Seminar 'The 3<sup>rd</sup> International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences', Yogyakarta, 18-19 Juni 2013)

Publikasi ke-4 : *In vivo* immunomodulatory and histopathologically effect of two compounds isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

(Seminar '6<sup>th</sup> Asian Association of School of Pharmacy Conferences', Singapura, 14-17 November 2013)

Publikasi ke-7 : The Effect of Pc-1 and Pc-2 Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Leave on Mice Antibody Titre

(Seminar 'The 46<sup>th</sup> Meeting on National Working Group on Indonesia Medicinal Plants', Tawangmangu Jawa Tengah, 4-6 Juni 2014)

### PUBLIKASI PADA JURNAL :

#### Jurnal nasional terakreditasi :

Publikasi ke-5 : Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *In*

(Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, Vol. 11, No. 2, September 2013, Website: [jifi.ffup.org](http://jifi.ffup.org))

#### Jurnal internasional :

Publikasi ke-6 : *In-vivo* Immunomodulatory Effect and Histopathological Features of Mice Liver and Kidney Two Neolignans Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

(Tropical Journal of Pharmaceutical Research, website: <http://www.tjpr.org>, accepted April 28, 2014)

## PUBLIKASI 1

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah  
(*Piper crocatum* ruiz & pav.) Secara *In Vitro*



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

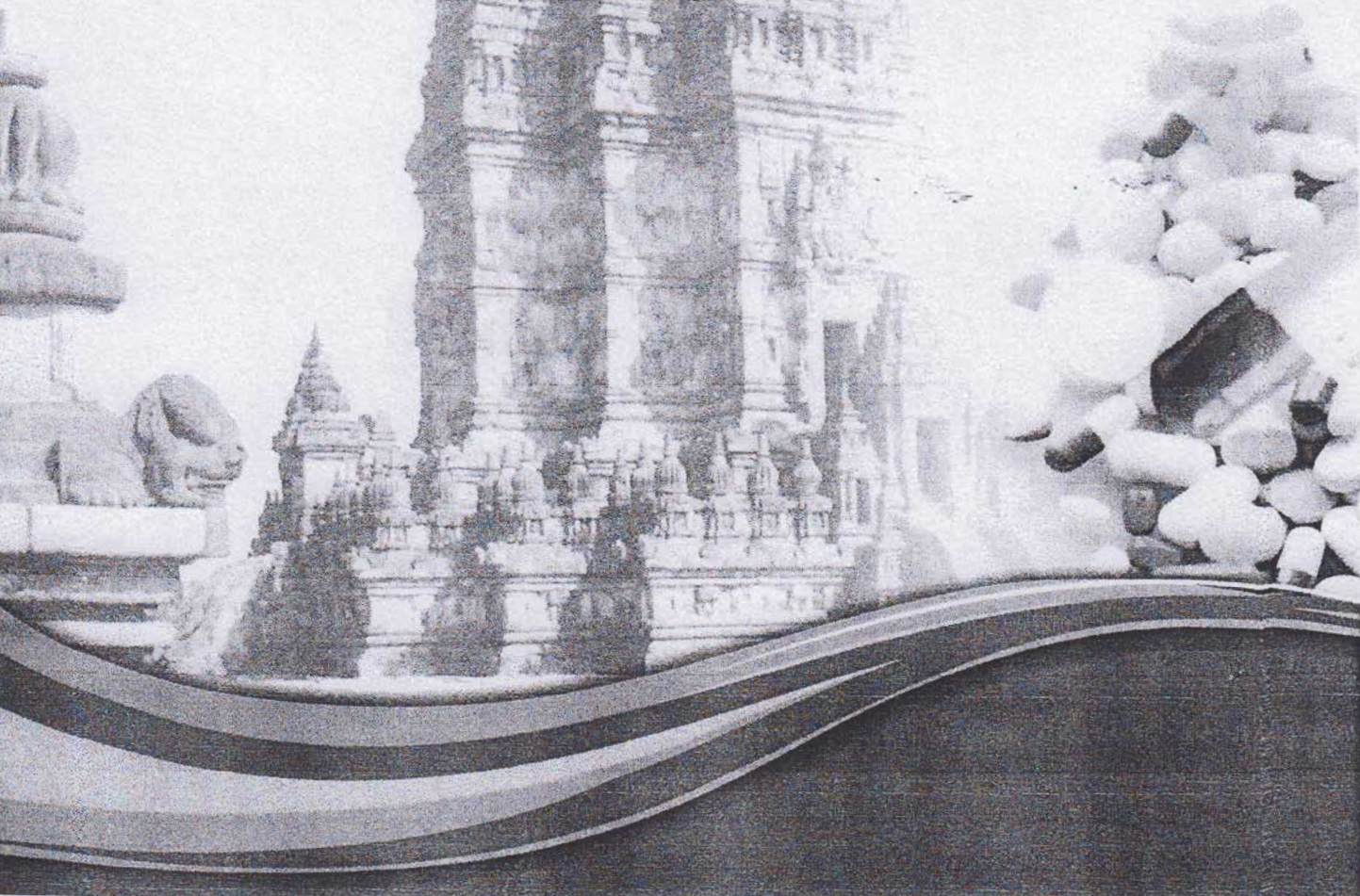
PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA





**PROSIDING**  
**SEMINAR NASIONAL FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS SANATA DHARMA**  
**YOGYAKARTA**  
**Desember-2011**

**Pemberdayaan Pasien Dalam**  
***Self Management* Diabetes Mellitus**  
**Untuk Meningkatkan Kualitas Hidup**



**PROSIDING  
SEMINAR NASIONAL**

**PEMBERDAYAAN PASIEN DALAM  
*SELF MANAGEMENT* DIABETES MELITUS  
UNTUK MENINGKATKAN KUALITAS HIDUP  
DESEMBER 2011**

**Tim Editor:  
Fenty  
Maria Wisnu Donowati  
Phebe Hendra**

**DITERBITKAN OLEH :  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SANATA DHARMA YOGYAKARTA**

**ISBN : 978-602-9187-16-8**

## DAFTAR ISI

Kata Pengantar	i
Daftar Isi	ii
Pengaruh Asam Sitrat dan Natrium Bikarbonat dalam Granul Effervescent Ekstrak Teh Hijau ( <i>Camelia sinensis</i> L.) dengan Metode Granulasi Kering Oleh: <u>Agatha Budi Susiana Lestari</u> , Vincencius Hendra Setya Nugraha	1
Pengaruh Penggunaan Isofluran terhadap Perubahan Kadar Malondialdehyde dan Rasio Ekstraksi Oksigen pada Pasien Paska Kraniotomi Oleh: <u>Ni Made Dwi Sandhiutami</u> , I Wayan Sumardika	10
Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah ( <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) secara <i>in vitro</i> Oleh: <u>Yustina Sri Hartini</u> , Subagus Wahyuono, Ag. Yuswanto, Sitarina Widyarini	20
Pengaruh Emisi Timbale dari Kendaraan Bermotor terhadap Kadar Timbale dalam Buah Pepaya ( <i>Carica papaya</i> L.) Oleh: <u>M.M. Yetty Tjandrawati</u> , Vivi Elvira, Liana Wulan Boentoro	29
Evaluasi Ketaatan Penggunaan Obat Pasien Rawat Jalan di Rumah Sakit Swasta yang Dilengkapi Alat Bantu Ketaatan Oleh: <u>Rita Suhadi</u> , Maria Wisnu Donowati, Luciana Kuswibawati	41
Efek Kombinasi Antrakinon dan Musilago Daun Senna ( <i>Cassia angustifolia</i> Vahl) terhadap Aktivitas Laksatif Oleh: <u>Ana Mardiyarningsih</u> , Suwidjiyo Pramono, Ika Puspitasari	53
Efek Libido Fraksi Larut dan Tidak Larut Etil Asetat dari Ekstrak Etanol Akar Senggari ( <i>Melastoma polyanthum</i> Bl) pada Tikus Jantan Oleh: Ipang Djunarko	64

# UJI AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG EKSTRAK METANOLIK DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* RUIZ & PAV.) SECARA *IN VITRO*

Yustina Sri Hartini<sup>1)</sup>, Subagus Wahyuono<sup>2)</sup>, Sitarina Widyarini<sup>3)</sup>, Ag. Yuswanto<sup>2)</sup>

1) Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

2) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

3) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

## Abstract

Plants can be the resources of immunomodulatory agents. Some researchs showed that high capacity antioxidant increase the immune response, and numerous classical cytotoxic drugs can be converted into immunostimulants when applied in very low concentrations. *Piper crocatum* Ruiz & pav. (sirih merah) leaf have been reported as antioxidant and anticancer. This research aim to know the imunomodulatory effect of methanolic extract of *Piper crocatum* Ruiz & pav. leaf. In order to isolate the immunomodulatory agent, this beginning bioassay guided isolation research using mice peritoneum macrophage phagocytic activity on latex beads.

The result showed that methanolic extract of *Piper crocatum* Ruiz & pav. leaf on 75µg/ml can stimulate macrophage phagocytic equal to positive control that contain 100µg/ml Echinace extract. Therefore, *Piper crocatum* Ruiz & pav. leaf can be resource on explore immunomodulatory agent from natural products.

**Keywords:** *Piper crocatum*, metanolic extract, immunomodulatory, macrophage phagocytic

## Pendahuluan

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Pengobatan alami merupakan bahan kajian dan sumber penting untuk mendapatkan senyawa obat baru (Alamgir dan Uddin, 2010). Baru sejumlah kecil tanaman yang telah diskining aktivitas imunostimulannya, dari skining tersebut terbukti bahwa beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan akan tetapi tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai (Kumar *et al.*, 2011). Menurut Wagner *et al.* (1988) studi imunologikal secara *in vitro* menunjukkan bahwa banyak obat sitotoksik seperti *vincristine*, *methotrexate*, *taxol*, atau *podophyllotoxin* menjadi imunostimulan ketika digunakan pada konsentrasi yang sangat rendah. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa antioksidan dengan kapasitas tinggi pada sistem *in vitro*

juga dapat meningkatkan fungsi imun (Sklavos *et al.*, 2008). Tanaman sirih merah mempunyai banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, berpotensi menyembuhkan berbagai jenis penyakit (Manoi, 2007). Berbagai penelitian terkait sirih merah telah dilakukan (Safitri dan Rahma, 2008; Sulistiyani *et al.*, 2007, Fitriyani *et al.*, 2011); terkait dengan imunomodulator telah diteliti tentang ekstrak metanolik daun sirih merah yang memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara (T47D) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 44,25 ppm (Wicaksono *et al.*, 2009). Suratmo (2008) melaporkan bahwa fraksi ekstrak etanolik daun sirih merah berpotensi sebagai antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 33,44 ppm, dan sebagai antikanker terhadap sel *HeLa* dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1197,43 ppm. Menurut Wahyudi (2010) uji terhadap tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B menunjukkan adanya efek immunosupresan dari ekstrak n-heksan sirih merah pada dosis 10 mg/kgBB, dan efek immunostimulan pada dosis 100 mg/kg BB.

Penelitian ini adalah awal dari penelitian yang bertujuan mencari dan menetapkan struktur kimia senyawa dalam daun sirih yang memiliki daya imunomodulator dengan cara *bioassay guided isolation*. Menurut Ponkshe dan Indap (2002), metode fagositosis adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk skrining bahan aktif yang mempengaruhi respon imun. Pada penelitian ini *bioassay* (uji aktivitas farmakologi berupa daya imunomodulator) untuk skrining awal digunakan metode uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro*.

## Metode Penelitian

### A. Bahan dan Alat

Bahan utama berupa daun sirih merah yang dikumpulkan dari daerah Tawangmangu. Determinasi tanaman dilakukan pada Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Madjah Mada Yogyakarta. Bahan lain adalah metanol, media RPMI, *fetal bovine serum* (FBS), Penisilin-streptomisin, Fungisone, Dimetilsulfoksida (DMSO), Produk-1®, Produk-2®, *Phosphate-buffered saline* (PBS), media RPMI 1640, kloroform, alkohol 70%, medium RPMI, suspensi lateks diameter 0,3  $\mu$ m, cat Giemsa 10%, *tryptan blue*. Hewan uji : mencit BALB/C jantan dengan berat 25-35 g (berumur 8 minggu).

Alat yang digunakan meliputi maserator, *Rotary evaporator*, cawan porselen, *water bath*, oven, eksikator, spuit 10 ml, gunting, penjepit, *falcon*, *eppendorf*, *vortex mixer*, *sentrifuge*, *plate 24 well* (sumur), *coverslips* bulat diameter 13 mm, inkubator, *laminar air flow*, mikroskop, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, *haemositometer*, *cellcounter*.

## B. Cara Penelitian

### 1. Ekstraksi

Daun sirih merah dicuci di bawah air mengalir hingga bebas kotoran, kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50°C sampai kering (*kemrisik*, mudah diremukkan dengan tangan). Daun kering dibuat serbuk, ditimbang, dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan metanol ke dalam maserator sampai semua serbuk terendam, kemudian dibiarkan semalam disertai pengadukan. 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 metanolik kental.

### 2. Uji Fagositosis Makrofag

#### a. Isolasi dan kultur sel makrofag peritoneal

Mencit sebanyak 8 ekor dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Seluruh tubuh mencit dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dibawa ke dalam *laminary flow hood* dan diletakkan dalam posisi terlentang. Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10ml medium RPMI 1640 dingin ke dalam rongga peritoneum, tunggu  $\pm 3$  menit sambil ditekan-tekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal dikeluarkan/diaspirasi dari rongga peritoneum dengan menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Aspirat yang didapat disentrifus pada 1200 RPM 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet (mengandung FBS 10%) pada pellet yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan

hemositometer kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada *microplate* 24 well yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200 $\mu$ l ( $5 \times 10^5$  sel). Diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplit ditambahkan 1 ml/sumuran dan diinkubasi lagi selama dua jam. Sel dicuci dengan RPMI dua kali kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran, kemudian inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

b. Uji aktivitas fagositosis

*Latex beads* diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$ /ml. Media diambil dengan cara menyedot media sehingga tinggal makrofag dalam *coverslips*. Pada tutup *plate* diberi identitas sesuai bahan uji yang akan dimasukkan dalam sumur yang bersangkutan. Pada sumur ditambahkan masing-masing 1 ml bahan uji dalam media RPMI komplit, yakni ekstrak metanol *Piper crocatum* kadar 75  $\mu$ g/ml dan 150  $\mu$ g/ml, kontrol positif (Produk-1® 100  $\mu$ g/ml), kontrol media, dan kontrol pelarut (DMSO 0,15%), kemudian diinkubasi selama 4 jam. Setelah 4 jam, suspensi *latex beads* ditambahkan dalam PBS, dimana *latex beads* dengan diameter 0,3  $\mu$ m sebanyak 400  $\mu$ l dengan kepadatan *latex beads* dalam  $2,5 \times 10^7$ /ml, kemudian inkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 60 menit. Media diambil dengan cara disedot dan dicuci dengan PBS tiga kali untuk menghilangkan *latex beads* yang tidak terfagositosis, kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih (4-5 kali, akuades menjadi jernih) diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Makrofag yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan cara diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Leijh *et al.* dalam Weir, 1986, Wijanarko, 2005; Wahyuni, 2006).

## Hasil dan Pembahasan

Bahan tanaman yang dikenal dengan nama sirih merah tersebut merupakan spesies dengan nama ilmiah *Piper crocatum* Ruiz & Pav.



Gambar 1. *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol terhadap 1,9 kg serbuk daun sirih merah yang berasal dari pengeringan 8,26 kg daun basah menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap daun basah sebesar 23%, rendemen ekstrak terhadap daun basah sebesar 2,7%, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 11,8%. Pada penelitian Wahyudi (2010), ekstraksi daun sirih merah menggunakan n-heksana sebagai pelarut, maserasi dilakukan sekali selama 2 hari dengan pemanasan 60°C, didapatkan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 4,89%, sedangkan Wiweko (2010) yang menggunakan pelarut etanol mendapatkan rendemen sebesar 24%. Meskipun menurut Samuelsson (1999) maserasi tidak menghasilkan ekstraksi yang komplit, akan tetapi banyak penelitian memilih menggunakan metode ini karena maserasi merupakan prosedur sederhana untuk mendapatkan ekstrak, cocok untuk skala kecil maupun industrial, pengulangan proses perendaman merupakan upaya untuk mendapatkan sebanyak mungkin senyawa yang terekstraksi. Pemilihan jenis dan jumlah pelarut juga sangat menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi, hal ini sesuai dengan pernyataan Samuelsson (1999) yakni bahwa senyawa dalam tanaman biasanya berada di dalam sel, pelarut harus dapat berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan molekul senyawa yang diinginkan kemudian dengan arah berlawanan melewati dinding sel dan bercampur dengan cairan di sekelilingnya. Kesetimbangan akan terjadi antara senyawa terlarut di dalam sel dengan pelarut di sekitar jaringan tanaman, dimana kecepatan

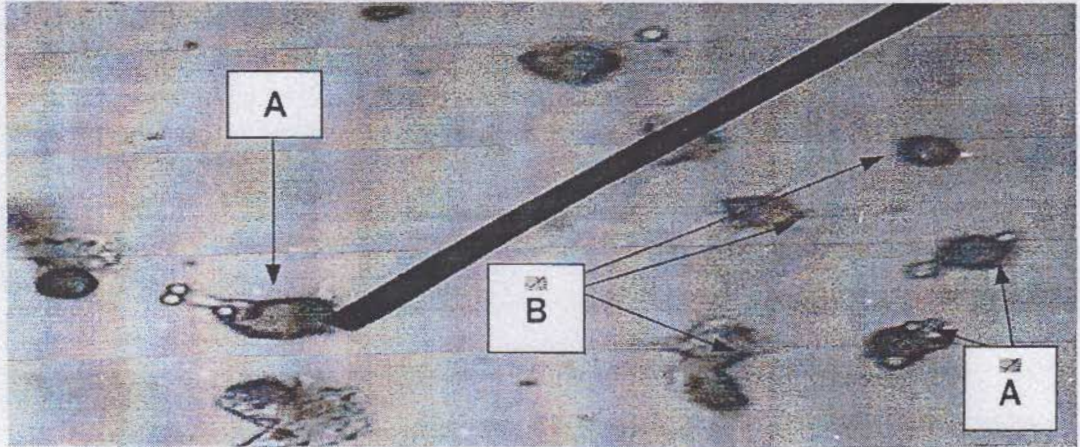


ksetimbangan tersebut dipengaruhi oleh suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan dari pelarut. Penelitian ini dilakukan pada suhu kamar, karena diharapkan senyawa yang tidak tahan pemanasan tidak rusak oleh adanya pemanasan, efektivitas ekstraksi juga dioptimalkan dengan pengadukan.

Meskipun mirip akan tetapi terdapat perbedaan anatomi antara daun sirih dan daun sirih merah. Diatas *vascular bundle* pada *P. betle* dijumpai adanya sel-sel kolenkim sedangkan pada *P. crocatum* tidak dijumpai. Irisan melintang daun ke dua spesies sirih diatas teramati adanya saluran yang dihasilkan dari robekkan-robekkan sel, saluran tersebut berfungsi sebagai saluran minyak. Selain itu juga terdapat adanya sel-sel sekretori, sehingga kemungkinan bagian daun bisa digunakan sebagai bahan obat (Nugroho *et al.*, dalam proses publikasi). Ekstrak metanol daun sirih (*Piper betle*) telah dilaporkan memiliki daya imunomodulator (Kanjwani *et al.*, 2007), daun sirih merah merupakan tanaman dalam genus yang sama dengan *Piper betle* yakni *Piperaceae*, oleh karena itu digunakan pelarut metanol dengan harapan senyawa yang terekstraksi memiliki aktivitas yang sejenis.

Makrofag merupakan sel fagositik utama yang menghadapi serangan patogen melalui mekanisme fagositosis, berperan penting baik pada respon imun bawaan maupun respon imun adaptif. Kemampuan fagositosis makrofag dapat diukur dari kemampuannya dalam memfagositosis partikel lateks secara *in vitro*. Aktivitas fagositosis makrofag sebanding dengan prosentase makrofag yang memfagositosis partikel lateks, semakin banyak jumlah makrofag yang memfagositosis partikel lateks, semakin kuat aktivitas makrofag. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun sirih merah meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Pada penelitian dilakukan uji dengan dosis ekstrak sirih merah 75µg/ml dan 150µg/ml, sedangkan dosis kontrol positif yakni Produk-1® dan Produk-2® masing-masing 100 µg/ml, dilakukan replikasi 3 kali, juga untuk kelompok kontrol media dan kontrol pelarut. Ekstrak daun sirih merah pada dosis 75µg/ml menunjukkan % fagositosis makrofag sebesar 5,8±1,6 sedang pada dosis 150µg/ml menunjukkan % fagositosis sebesar 6,76±1,9. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah produk imunomodulator yang beredar di masyarakat, berasal dari 2 pabrik yang berbeda, keduanya megandung ekstrak *Echinacea*

250 mg, aktivitas fagositosis kontrol positif pada dosis  $100\mu\text{g/ml}$  untuk Produk-1® sebesar  $5,1\pm 0,9$  sedangkan Produk-2® sebesar  $2,8\pm 2,0$ . Pada kontrol media, sumur uji hanya diberi media saja, % fagositosis sebesar 0,15%; untuk kontrol media sebesar  $3,1\pm 0,6$  sedangkan untuk kontrol pelarut diberi DMSO, % fagositosis sebesar  $1,6\pm 0,6$ .



Gambar 2. Makrofag yang memakan (fagosit) latex beads dilihat pada mikroskop perbesaran 400x

Keterangan : A. Makrofag yang memakan lateks; B. Makrofag yang tidak memakan lateks

Aktivitas fagositosis Produk-2® lebih kecil dibandingkan kontrol media, hal ini disebabkan proses preparasi sampel yang kurang baik, Produk-2® sukar larut dalam media komplit. Produk-1® maupun Produk-2® masing-masing mengandung ekstrak Echinacea 250 mg, Produk-1® dapat larut dalam media komplit, kemungkinan bahan tambahan pada Produk-2® mengakibatkan ketidaklarutan produk tersebut pada media yang digunakan. Aktivitas fagositosis makrofag yang mendapat perlakuan dengan ekstrak daun sirih merah baik pada dosis  $75\mu\text{g/ml}$  maupun  $150\mu\text{g/ml}$  cukup tinggi dan setara dengan ekstrak Echinacea dosis  $100\mu\text{g/ml}$ . Kemampuan ekstrak Echinacea dalam meningkatkan fagositosis telah dilaporkan oleh Bauer (dalam Wagner, 1999), kemungkinan ekstrak daun sirih merah juga memiliki mekanisme aksi yang sama dengan ekstrak Echinacea. Kenaikan dosis ekstrak daun sirih merah menjadi 2 kali lipat, tidak menunjukkan adanya kenaikan % fagositosis yang sebanding. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis terhadap aktivitas fagositosis juga mekanisme aksi senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Penelitian tentang peningkatan aktivitas fagositosis makrofag karena pemberian ekstrak daun sirih merah ini merupakan penelitian awal dari *bioassay guided*

*isolation* senyawa imunomodulator dari daun sirih merah, menurut Wagner *et al.* (1999) hasil uji daya imunomodulator secara *in vitro* tidak ada korelasi dengan uji *in vivo*, maka perlu juga diteliti lebih lanjut secara *in vivo*.

## Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa,

1. Uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun sirih merah mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag
2. Daun sirih merah dapat menjadi sumber pada pencarian senyawa imunomodulator dari bahan alam

## Daftar Pustaka

- Alamgir, M., dan Uddin, S.K., 2010, Recent Advances on The Ethnomedicinal Plants as Immunomodulatory Agents, *Ethnomedicine*, 3, 227-244.
- Bauer, R., Chemistry, 1999, Analysis and Immunological Investigations of Echinacea Phytopharmaceuticals, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S., dan Nuri, Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Tikus Putih, 2011, *Majalah Obat Tradisional*, 16,
- 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*, 67, 589-593.
- Kumar, S., Gupta, P., Sharma, S., dan Kumar, D., 2011, A Review on Immunostimulatory Plants, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9, 1-18.
- Leijh, P.C.J., Furth, R.V., dan Van Zwet, T.L., 1986, In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes, dalam *Cellular Immunology* (Weir, D.M., ed.), Blackwell Scientific Publications, Fourth Ed, Oxford
- Manoi, F., 2007, Sirih Merah sebagai Tanaman Obat Multi Fungsi, *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*, 13, 2-6.
- Nugroho, L.H., Sutikno, Indah, R., Yosep, P., Inggit, P.A., dan Isti, M., dalam proses publikasi, *Karakter Anatomi dan Fitokimia Berbagai Aksesori Piper Koleksi Kebun Raya Bogor*

- Ponkshe, C.A. dan Indap, M. M., 2002, In Vivo and In Vitro Evaluation for Immunomodulatory Activity of Three Marine Animal Extracts with Reference to Phagocytosis, *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 1399-140
- Safitri, M. dan Fahma, F. , 2008, Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia, *Hayati, Journal of Bioscience*, 15,
- Samuelsson, G., 1999, *Drugs of Natural Origin*, 4<sup>th</sup> Edition, Swedish Pharmaceutical Press, Sweden, B.K.
- Sklavos, M.M., Tse, H.T., dan Piganelli, J.D., 2008, Redox Modulation Inhibits CD8 T Cell Effector Function. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1477-1486
- Suratmo, 2008, Aktivitas Antioksidan dan antikanker Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*), *Tesis*, Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Wagner, H., Kraus, S., dan Jurcic, K., 1999, Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Wahyudi, Y., 2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrakn-heksana Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk.) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G pada Tikus Terinduksi Vaksin Hepatitis B dan Uji Histopatologinya,, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wahyuniari, I.A.I., 2006, Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamp) pada Respon Imun Seluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenes*, *Tesis*, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Arung, E.T., Kusuma, I.W., Yulia, D., Pancaputra, A.N., dan Sandra, F., 2009, Antiproliferative Effect of Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In Vitro, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 345-352.
- Wijanarko, H., 2005, Aktivitas Phalerin Hasil Isolasi dari Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) sebagai Pemacu Fagositosis Makrofag dan Antiradikal *in Vitro*, *Thesis*, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wiweko, O.D., 2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk) terhadap Peningkatan Titer Immunoglobulin G dan Histopatologi Tikus yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

## PUBLIKASI 2

Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Senyawa Kode Pc-2 dari Daun Sirih  
Merah (*Piper crocatum* Ruiz. & Pav.) Secara *In Vivo*



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA



# PROSIDING SEMINAR NASIONAL TUMBUHAN OBAT INDONESIA KE-44

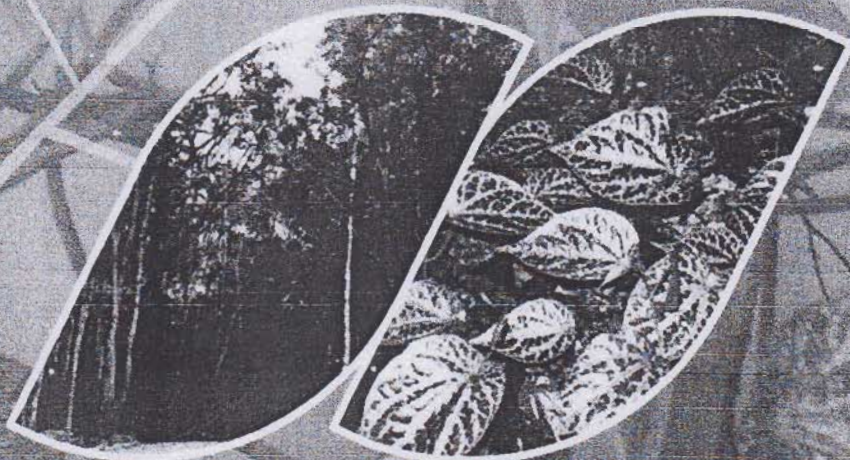
Palembang, 14-16 Maret 2013

Tema :

“Penggalian, Pelestarian, Pemanfaatan, Dan Pengembangan Tumbuhan Obat Indonesia Untuk Peningkatan Kesehatan Masyarakat “

Subtema :

“ Dari Tumbuhan Obat, Menjadi Fitofarmaka dan Bahan Obat Moderen Untuk Meningkatkan Kesehatan Masyarakat “



*Malaleuca cajuputi*  
(Gelam)

*Piper crocatum*  
(Sirih Merah)

## DAFTAR ISI

Kata Pengantar	iii
Sambutan Ketua Panitia	iv
Sambutan Ketua Sekjend Pokjanas TOI	v
Sambutan Ketua STIFI Bhakti Pertiwi	ix
Sambutan Ketua Yayasan STIFI Bhakti Pertiwi	x
Daftar Isi	xii
<b>Abstrak Materi Pembicara</b>	
Kebijakan Pemerintah Dalam Pengadaan Bahan Baku Obat Alam Dra. Maura Linda Sitanggung, Ph.D, Apt (Direktur Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan)	xxi
Peran Teknologi Menuju Kemandirian Pengadaan Bahan Obat Alam Dr. Ir. Listyani Wijayanti (Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi BPPT)	xxii
Fitokimia Tumbuhan Macaranga Indonesia dan Sifat Sitotoksiknya Terhadap Sel P-388 Prof Dr. Yana Maolana Syah, M.Si (Dosen Peneliti Institut Teknologi Bandung)	xxiii
<i>Evidence Based Medicine</i> Untuk Jamu Melalui Penelitian Berbasis Pelayanan Dr. Danang Ardiyanto (Praktisi Pengguna Obat Tradisional Klinik Herbal Tawangmangu)	xxiv
Potensi Gambir ( <i>Uncaria gambir</i> ) Sebagai Bahan Baku Obat, Kosmetika, dan Minuman Kesehatan Prof. Dr. Amri Bachtiar, MS, DESS, Apt (Dosen Peneliti UNAND Padang)	xxv
Review Brotowali ( <i>Tinospora crispa</i> ) Prof. Dr. rer.nat. Adek Zambrud Adnan, MS, Apt (Dosen Peneliti UNAND Padang)	xxvi
Hama dan Penyakit Tanaman Obat Beserta Penanganannya Dr. Ir. Yulia, M.Si (Dosen Peneliti Fakultas Pertanian UNSRI)	xxvii
<b>Makalah Presentasi</b>	
MP-01 Khasiat Ekstrak Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> ) dan Temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> ) Terhadap Peningkatan Jumlah Sel $t_h$ $cd4^+$ Mencit ddy yang Diinduksi BCG i.p Elrade Rofaani, Tarwadi, Sri Hartini, Sriningsih, Fifit Juniarti dan Churiyah	1
MP-02 Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Isolat Senyawa Dari Daun Sirih Merah ( <i>Piper crocatum</i> ruiz & pav.) Secara <i>Semi in-vivo</i> Yustina Sri Hartini, Subagus Wahyuono, Sitarina Widyarini dan Ag. Yuswanto	9

## Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Senyawa Kode Pc-2 dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In-vivo*

Yustina Sri Hartini<sup>1</sup>, Subagus Wahyuono<sup>2</sup>, Sitarina Widayari<sup>3</sup>, Ag. Yuswanto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, <sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, <sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada

Kampus III USD Paingan Maguwoharjo Depok Sleman Yogyakarta

\*Penulis korespondensi: Yustina Sri Hartini, e-mail: [yustinahartini@usd.ac.id](mailto:yustinahartini@usd.ac.id)

### Abstrak

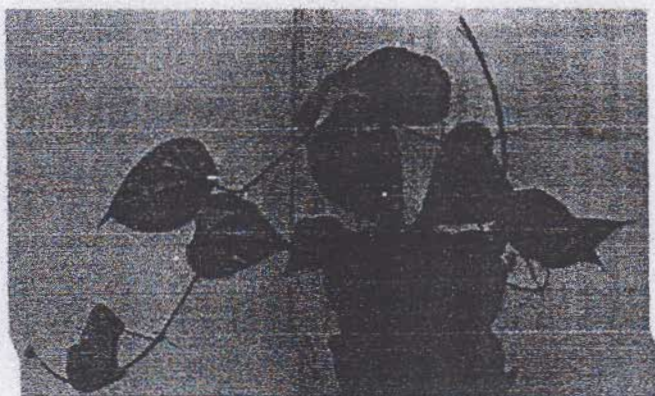
Penelitian terkait aplikasi imunostimulan sebagai aktivator sistem imun hasilnya tidak meyakinkan dan perlu pencarian imunostimulan baru dari sumber baru. Secara empiris daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, banyak tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dilaporkan memiliki aktivitas imunostimulan. Telah dilakukan isolasi senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah dan pengujian aktivitas fagositosis makrofag secara *in-vivo*. Ekstrak metanolik daun sirih merah diperoleh secara maserasi, difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum, dan senyawa kode Pc-2 diisolasi dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif. Kandungan senyawa dalam ekstrak, fraksi, dan isolat dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Pengujian aktivitas fagositosis makrofag menggunakan mencit BALB/c dan induksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes*. Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam persen fagositosis (PF), indeks fagositosis (IF), dan efektivitas fagositosis (EF). Hasil penelitian menunjukkan bahwa mencit yang diberi perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgBB baik pada hari ke-3, ke-10, maupun ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*, mempunyai PF, IF, dan EF yang lebih besar secara bermakna dibandingkan pada mencit kelompok kontrol; aktivitas fagositosis makrofag terbesar terjadi pada hari ke-21 setelah infeksi dengan *L. monocytogenes*; dan tidak ada korelasi antara PF dengan IF.

Kata kunci : fagositosis makrofag, *in-vivo*, isolat, *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

### Pengantar

Sistem imun merupakan lini pertama pertahanan tubuh manusia, melindunginya dari penyakit dan mengobatinya apabila telah terjadi penyakit (Buhner, 1999). Tubuh manusia secara terus menerus terpejan oleh berbagai faktor yang berdampak pada melemahnya fungsi sistem imun dan meningkatkan immunosupresi. Penelitian terkait aplikasi imunostimulan sebagai aktivator sistem imun hasilnya tidak meyakinkan dan perlu pencarian imunostimulan baru dari sumber baru (Wagner *et al.*, 1999). Beberapa keterbatasan immunostimulan yang ada adalah waktu paruhnya yang singkat serta imunitas yang dihasilkan hanya bersifat parsial, dan tidak stabil, selain itu toksisitas senyawa cukup tinggi terutama pada penggunaan kronis (Iwo, 2006). Secara empiris daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit, banyak tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dilaporkan memiliki aktivitas imunostimulan (Bafna dan Misra, 2004). Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan satu dari 3000 lebih spesies dalam genus *Piper*. Tanaman dalam family Piperaceae ini tumbuh merambat, menyukai tempat teduh sehingga dapat tumbuh subur di daerah pegunungan. Keindahan daun sirih merah yang berwarna merah keperakan dan mengkilap menyebabkan tanaman ini banyak





Gambar 1. Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) (dokumen pribadi)

digunakan sebagai tanaman hias. Akhir-akhir ini daun sirih merah banyak digunakan sebagai obat tradisional, menurut Manoi (2007) sirih merah mempunyai banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, berpotensi menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Berbagai penelitian terkait aktivitas sirih merah sudah dilaporkan oleh Sulistyani *et al.* (2007), Agustanti, L. (2008), Suratmo (2008), Safitri dan Rahma (2008), Juliantina *et al.* (2009), Wicaksono *et al.* (2009), Alfarabi *et al.* (2010), Dhewayanti (2010), Sundari (2010), Wiweko (2010), Wahyudi (2010), Sustri *et al.* (2011), Setyowati (2011), Apriyanto (2011), Zubier *et al.* (2010), Fitriyani *et al.* (2011), Yulianti *et al.* (2011), dan Pangabdian (2012). Dari beberapa penelitian tersebut, belum ada laporan penelitian tentang uji aktivitas fagositosis secara *in-vivo* dari senyawa yang diisolasi dari daun sirih merah.

Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman (Wagner *et al.*, 1999). Baru sejumlah kecil tanaman yang telah diskriminasi aktivitas imunostimulannya, dari skrining tersebut terbukti bahwa beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan akan tetapi tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai (Kumar *et al.*, 2011). Hartini *et al.* (2011) melaporkan bahwa uji secara *in-vitro* menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diberi perlakuan dengan 75 µg/ml ekstrak metanolik daun sirih merah lebih tinggi secara bermakna dibanding mencit kelompok kontrol dan setara dengan produk obat yang mengandung ekstrak Echinacea 100 µg/ml (obat merek dagang X). Lebih lanjut Kustiawan (2012) melaporkan bahwa dengan uji yang sejenis, 2 senyawa dari ekstrak etanolik daun sirih merah yakni isolat 1 yakni 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl) propoan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone dan isolat 2 yakni 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone masing-masing pada 5 µg/ml memiliki aktivitas yang sebanding dengan produk obat yang mengandung ekstrak Echinacea (obat merek dagang X).

Fagositosis adalah proses dimana sel-sel terlibat dalam penelanan partikel-partikel patogen, dan karena kapasitas sel-sel tersebut maka patogen dapat dimatikan dan dimusnahkan (Desjardins dan Griffiths, 2003). Fagositosis merupakan salah satu hal terpenting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap serangan mikroorganisme. Melalui fagositosis, penyerangan intra-seluler, dan digesti, sel-sel fagosit akan memusnahkan mikroorganisme tersebut (Leijh *et al.*, 1986) Makrofag merupakan sel

fagosit yang memegang peranan penting pada sistem pertahanan tubuh manusia, baik sistem imun alamiah maupun adaptif (Abbas *et al.*, 2007). Makrofag dapat menelan sejumlah besar partikel tanpa menyebabkan kerusakan sel (Cannon dan Swanson, 1992). Suatu sistem yang menggunakan *latex beads* merupakan model fagositosis yang banyak digunakan hingga analisis fagosom berkembang sebagaimana kemajuan terkini (Desjardins dan Griffiths, 2003). *Lysteria monocytogenes* telah digunakan secara luas sebagai model dalam eksperimen mempelajari respon imun terhadap infeksi bakteri intraseluler (Fehr *et al.*, 1997). Menurut Wagner *et al.*, (1999), hasil uji *in-vitro* tidak selalu berkorelasi dengan uji *in vivo*, maka diperlukan konfirmasi dengan uji secara *in-vivo*. Hasil penelitian ini melaporkan tentang aktivitas fagositosis dari makrofag peritoneal mencit secara *in-vivo* yang diberi perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah.

### Bahan dan Metode

#### Bahan

Bahan tumbuhan berupa daun sirih merah (*Piper crocatum*) diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Mei 2010. Determinasi tanaman dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bahan untuk isolasi senyawa kode Pc-2 yakni ekstrak metanolik daun sirih merah, kloroform pa, n-heksana pa, etil asetat pa, metanol pa, dan silica gel 60. Bahan untuk uji fagositosis makrofag yakni kloroform, *Free Hank's Balanced Sal solution (CMFF-HBSS)*, *Medium Roswell Park Memoriam Institute (RPMI)*, etanol 70%, akuabides, *Phosphate Buffer Saline (PBS)*, akuades steril, metanol absolut, *coverslips* bulat, *latex beads* diameter 3 $\mu$ m, Giemsa 20%, Glutamin, Penisilin, Sterptomisin, *Fetal Bovine Serum (FBS)*. Mencit BALB/c diperoleh dari Laboratorium Farmakologi sedang bakteri *Lysteria monocytogenes* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM. Kelaikan etik diproses dan mendapat persetujuan dari komisi *ethical clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.

#### Alat

Alat untuk isolasi senyawa kode Pc-2 yakni *sintered glass*, *magnetic stirrer*, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi lapis tipis preparative (KLTP). Alat untuk uji fagositosis makrofag yakni spuit injeksi 1 ml, 3 ml, dan 10 ml, sonde, pipa kapiler, tabung eppendorf, neraca elektronik, inkubator CO<sub>2</sub> 5% 37°C, lempeng mikro 24 sumuran, *coverslip*, alat sentrifugasi, *ultrasonic processor*, *Laminar Air Flow Hood*, haemositometer, *inverted microscope*, dan optilab.

#### Metode

*Isolasi senyawa kode Pc-2.*

Isolasi senyawa kode Pc-2 dilakukan dari ekstrak metanolik daun sirih merah, ekstrak tersebut diperoleh secara maserasi (Hartini *et al.*, 2011). Ekstrak difraksinasi dengan metode KCV (*vacuum liquid chromatography/VLC*) (Coll dan Bowden, 1986) berturut-turut dengan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan terakhir metanol sehingga didapat 5 fraksi. Senyawa yang diisolasi adalah senyawa berwarna ungu dengan penanda bercak yang meredam UV 254 nm, tak tampak pada UV 366, dan berwarna coklat pada deteksi dengan serium sulfat, dengan fase gerak kloroform : etil asetat (9:1) mempunyai R<sub>f</sub> 0.25, senyawa tersebut terdapat pada fraksi III dan Fraksi IV hasil pemisahan secara KVC dari ekstrak metanolik daun sirih merah. Fraksi dilarutkan

dalam kloroform : metanol (1:1) kemudian ditotolkan pada lempeng KLTP (*preparative TLC plate*) dari totalan fraksi tampak kering, lempeng diekuasi dalam bejana berisi fase gerak yakni kloroform : etil asetat (9:1) sampai fase geraknya mencapai 1 cm di bawah ujung lempeng. Lempeng diangkat dari bejana, ditunggu kering kemudian dilihat di bawah UV254 nm, bercak yang meredam ditandai dengan jarum, untuk kemudian dikerok. Hasil kerokan dikumpulkan, dilarutkan dengan kloroform:metanol (1:1) kemudian disaring, diuapkan, hingga didapat isolat berupa kristal. Deteksi kebenaran dan kemurnian isolat dilakukan dengan KLT menggunakan standar senyawa isolat 2 hasil isolasi Kustiawan.

*Uji aktivitas fagositosis makrofag mencit yang diberi perlakuan senyawa Pc-2.*

Mencit BALB/c jantan berat sekitar 20-30 gram sebanyak 18 ekor diaklimatisasi selama seminggu kemudian dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 3 mencit. Kelompok I, III, dan V diberi perlakuan dengan 0,75 ml CMC Na 1%, kelompok II, IV, dan VI diberi perlakuan dengan 0,75 ml suspensi senyawa Pc-2 dalam CMC Na 1% dengan dosis 10 mg/kgbb, masing-masing diberikan setiap hari selama 14 hari secara peroral. Pada hari ke-15 (hari ke nol infeksi) semua mencit diinfeksi dengan 0,2 ml  $5 \times 10^3$  cfu/ml *Lysteria monocytogenes* secara intra peritoneal. Pada hari ke-3 setelah diinfeksi *L. monocytogenes*, mencit kel I dan II dikorbankan, diambil makrofag peritoneal dari cairan peritoneum untuk uji aktivitas fagositosis makrofag. Selanjutnya pada hari ke-10 setelah infeksi *L. monocytogenes* untuk mencit kel III dan IV, sedangkan hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes* untuk mencit kel V dan VI.

Isolasi dan kultur sel makrofag. Mencit dikorbankan dengan cara dimasukkan *chamber* berisi kloroform, setelah tampak tak bergerak mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritonealnya dengan alkohol 70%. Disuntikkan 10 ml media RPMI dingin ke rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil rongga peritoneumnya ditekan-gulingkan secara perlahan. Cairan peritoneum dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara diaspirasi dengan jarum suntik, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke tabung sentrifus. Aspirat disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 1 ml medium komplit dan ditentukan viabilitasnya dengan *tryptan blue* kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$  /ml. Suspensi sel yang telah dihitung diukur pada sumuran *microplate* 24 yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 µl ( $5 \times 10^5$  sel). Diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium RPMI komplit 1ml/sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam. Sel dicuci dua kali menggunakan media RPMI kemudian ditambahkan medium komplit 1 ml/sumuran dan inkubasi selama 24 jam. Sel makrofag siap untuk diuji aktivitasnya (Wijayanti, 1996).

Uji aktivitas fagositosis. Digunakan *latex beads* diameter 3 µm, yang diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$  /ml. Makrofag yang sudah dikultur sehari sebelumnya dicuci 2 x dengan RPMI. Suspensi lateks ditambahkan 200 µl ( $5 \times 10^6$ )/sumuran atau kepadatan lateks dalam 1 ml =  $2,5 \times 10^7$ , dan diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci 3 kali menggunakan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis, dikeringkan pada suhu ruangan, dan difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik kemudian metanol dibuang, ditunggu sampai kering. Setelah kering, *coverslip* dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit, dicuci dengan akuades, dikeringkan pada suhu ruangan, dan diangkat dari sumuran kultur. Aktivitas sel yang memfagositosis partikel lateks dihitung dengan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400x.

Masing-masing suspensi makrofag yang diperiksa dilakukan replikasi 3 kali (3 coverslip), dan dari setiap coverslip dihitung sejumlah 100 makrofag, rata-rata dan standard deviasi dihitung dari 3 coverslip (Wahyuniari, 2006; Derre and Isberg, 2004).

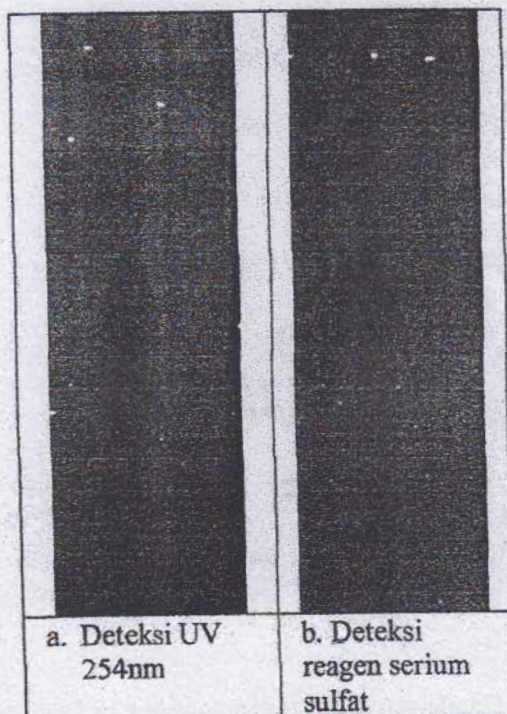
**Analisis data**

Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam 3 parameter yakni indeks fagositosis (IF), persen fagositosis (PF), dan efisiensi fagositosis (EF) (Sanchez *et al.*, 2008). Indeks fagositosis adalah jumlah lateks yang dimakan oleh 100 makrofag yakni 100 dibagi jumlah makrofag dalam 3 coverslip dikalikan jumlah lateks yang dimakan makrofag dalam 3 coverslip. Persen fagositosis adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag dalam 3 coverslip yang makan minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag dalam 3 coverslip dikalikan 100%. Efisiensi fagositosis adalah rasio antara indeks fagositosis dan persen fagositosis. Analisis statistik menggunakan uji anova satu jalan, uji Tukey, dan uji korelasi Pearson.

**Hasil dan Pembahasan**

**Hasil**

Determinasi tanaman menunjukkan nama ilmiah tanaman yang diteliti adalah *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol terhadap 1,9 kg serbuk daun sirih merah yang berasal dari pengeringan 8,26 kg daun basah menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap daun basah sebesar 23%, rendemen ekstrak terhadap daun basah sebesar 2,7%, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 11,8% (Hartini *et al.*, 2011). Isolasi senyawa kode Pc-2 dari 2.12 gram ekstrak metanolik daun sirih merah menghasilkan 12,1 mg isolat yang murni secara KLT, atau rendemen senyawa Pc-2 terhadap ekstrak metanolik daun sirih merah sebesar 0.57%.

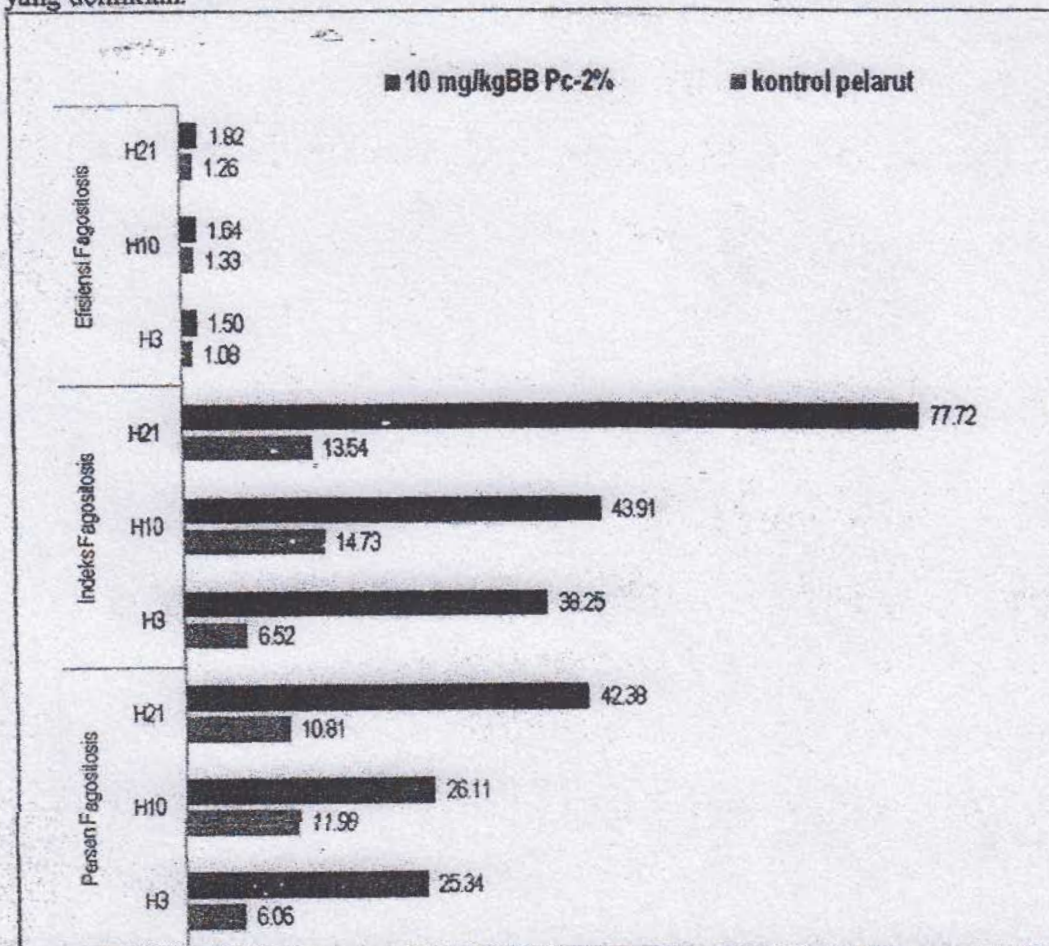


Gambar 2. Kromatogram lapis tipis isolat senyawa Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

#### Deteksi UV 254nm

Senyawa kode Pc-2 yang diisolasi tersebut berwarna ungu pada UV 254, tak tampak pada UV 366, berwarna coklat pada deteksi dengan serium sulfat serta mempunyai harga Rf 0.25 pada gerak kloroform : etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0.25 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1), dan Rf 0.19 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1). mempunyai Rf 0.75 TLC, dan tampak bercak tunggal pada ketiga kromatogram KLT tersebut. Senyawa kode Pc-2 hasil isolasi dari ekstrak metanolik daun sirih merah sama dengan isolat 2 yang diisolasi oleh Kustiawan (2012).

Uji aktivitas fagositosis secara *in-vivo* menunjukkan bahwa persen fagositosis (PF) maupun indeks fagositosis (IF) kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 meningkat dari hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 setelah infeksi dengan *Lysteria monocytogenes*, sedangkan pada kelompok kontrol pada hari ke-21 terjadi penurunan. Efisiensi fagositosis (EF) yang merupakan rasio antara PF dan IF juga mempunyai pola yang demikian.



Gambar 3. Aktivitas fagositosis makrofag pada hari ke-3, ke-10, dan ke-21 setelah mencit diinduksi *L. monocytogenes*

#### Pembahasan

Senyawa kode Pc-2 hasil isolasi dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz Pav.) merupakan senyawa murni secara KLT, dan menurut Kustiawan (2012) senyawa tersebut adalah *2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone*.

Pemberian senyawa kode Pc-2 dengan dosis 10 mg/kgbb pada mencit BALB/c jantan selama 14 hari mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit baik pada hari ke-3, hari ke-10, maupun hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes*. Uji statistik dari data hasil uji fagositosis kelompok perlakuan 10 mg/kgBB senyawa Pc-2 maupun kelompok kontrol menunjukkan distribusi data homogen, dan hasil uji anova satu jalan yang dilanjutkan ke uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan bermakna PF, IF, maupun EF kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tersebut.

Persen fagositosis (PF) adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* yang makan minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan 100%. Jumlah makrofag yang terdapat dalam 3 *coverslip* yang terhitung yakni antara 226 sampai 601 sel. Jumlah makrofag yang makan lateks pada mencit kelompok perlakuan lebih tinggi dari mencit kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Indeks fagositosis (IF) adalah jumlah lateks yang dimakan oleh 100 makrofag yakni 100 dibagi jumlah makrofag dalam 3 *coverslip* dikalikan jumlah lateks yang dimakan makrofag dalam 3 *coverslip* pandang. Jumlah lateks yang dimakan per makrofag antara 1 sampai 11 lateks. Jumlah lateks yang dimakan per makrofag pada mencit kelompok perlakuan lebih tinggi dari mencit kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*. Peningkatan tajam PF dan IF karena pemberian senyawa Pc-2 terjadi pada hari ke-21, sedangkan kelompok kontrol justru menunjukkan penurunan PF dan IF, hal ini terjadi mungkin disebabkan mencit pada kelompok kontrol kurang mampu menanggulangi patogen tersebut sehingga terjadi penurunan PF maupun IF, sedangkan perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 justru mampu mengaktifasi makrofag untuk memakan lateks baik dalam hal jumlah sel makrofag yang memakan lateks maupun jumlah lateks yang dimakan oleh makrofag yang bersangkutan, sehingga PF dan IF meningkat tajam.

Efisiensi fagositosis adalah rasio antara indeks fagositosis dan persen fagositosis. Indeks fagositosis maupun persen fagositosis kelompok perlakuan lebih tinggi dari kelompok kontrol, dan terjadi peningkatan dari hari ke-3, hari ke-10, dan tertinggi pada hari ke-21 setelah infeksi *L. monocytogenes*, hal ini menunjukkan bahwa pemberian senyawa kode Pc-2 mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Peningkatan aktivitas fagositosis terjadi bukan hanya pada jumlah sel makrofag yang aktif tetapi juga pada tingkat aktivitas fagositosis tiap sel makrofag yang bersangkutan.



# PROCEEDING

## THE 3<sup>rd</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHARMACY AND ADVANCED PHARMACEUTICAL SCIENCES

Book 1:  
Pharmaceutical Science & Technology

Faculty of Pharmacy  
Universitas Gadjah Mada  
Yogyakarta, June 18-19, 2013



Universiteit Utrecht

CYBERJAYA UNIVERSITY  
COLLEGE of MEDICAL SCIENCES



Gambar 4. Fagositosis lateks oleh makrofag peritoneal mencit setelah diinfeksi dengan *L. monocytogenes*

Uji Tukey pada aktivitas fagositosis kelompok kontrol yakni kelompok I, III, dan V pada hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 menunjukkan perbedaan tidak bermakna baik pada parameter IF, PF maupun EF. Pemberian pelarut yakni CMC Na 1% tidak menyebabkan perubahan aktivitas fagositosis makrofag mencit pada hari ke-3, hari ke-10, dan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*.

Hasil uji statistik untuk kelompok perlakuan untuk parameter PF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II, IV, dan VI. Hal ini menunjukkan bahwa PF akibat pemberian senyawa Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menyebabkan jumlah sel makrofag yang aktif memakan lateks berbeda baik pada hari ke-3, hari ke-10, maupun pada hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Untuk parameter IF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II dan kelompok VI, serta antara kelompok IV dan kelompok VI, yang berarti bahwa perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menyebabkan sel makrofag memakan lateks dengan jumlah yang berbeda pada hari ke-3 dengan hari ke-21, dan pada hari ke-10 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Tidak terdapat perbedaan jumlah lateks yang dimakan sel makrofag pada hari ke-3 dengan hari ke-10 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Untuk parameter EF, uji Tukey kelompok perlakuan dengan senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok II dan VI untuk parameter EF. Hal ini menunjukkan ada perbedaan rasio IF dengan PF akibat pemberian senyawa kode Pc-2 dosis 10 mg/kgbb pada hari ke-3 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*. Tidak terdapat perbedaan EF pada hari ke-3 dengan hari ke-10, maupun hari ke-10 dengan hari ke-21 setelah mencit diinfeksi dengan *L. monocytogenes*.

Uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa ada korelasi antara IF dengan EF, juga antara PF dengan EF, sedangkan antara IF dengan PF tidak ada korelasi. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel makrofag yang aktif memakan lateks tidak ada hubungannya dengan jumlah lateks yang dimakan oleh sel makrofag.



### Kesimpulan

1. Senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan senyawa murni secara KLT berupa kristal berwarna putih meredam dan berwarna ungu pada deteksi dengan UV 254, tidak berwarna pada UV 366, berwarna coklat pada deteksi dengan reagen serum sulfat, mempunyai harga Rf 0.25 pada fase gerak kloroform : etil asetat (9:1), mempunyai Rf 0.19 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1), dan Rf 0.75 pada fase gerak heksan : etil asetat (3:1).
2. Senyawa kode Pc-2 dari ekstrak metanolik daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada dosis 10 mg/kgbb mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diinduksi dengan bakteri *Lysteria monocytogenes* baik pada parameter indeks fagositosis, persen fagositosis maupun efisiensi fagositosisnya.
3. Tidak ada korelasi antara indeks fagositosis dan persen fagositosis makrofag peritoneal mencit yang diberi perlakuan dengan 10 mg/kgbb senyawa kode Pc-2 dan diinduksi dengan *Lysteria monocytogenes*.

### Daftar Pustaka

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*, 6<sup>th</sup> Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia
2. Agustanti, L. 2008. Potensi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Aktivator Enzim Glukosa Oksidase, *Skripsi*, Prodi Biokimia, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
3. Alfarabi, M., Bintang M., Suryani, Safitri, M. 2010. The Comparative Ability of Antioxidant of Piper crocatum in Inhibiting Fatty Acid Oxidation and Free Radical Scavenging. *Hayati- Journal of Biosciences*. 17,4,201-204.
4. Apriyanto, S. 2011. Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lamk) terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Fagositosis Makrofag pada Tikus yang diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
5. Bafna A.R. dan Misrha S.H. 2004. Immunomodulatory activity of methanol extracts of flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn. *Ars Pharm*. 45 (3): 281-291.
6. Cannon G.J. dan Swanson J.A. 1992. The Macrophage Capacity for Phagocytosis. *Journal of Cell Science*. 101:907-913.
7. Coll, J.C. dan Bowden, B.F. 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures. *Journal of Natural Products*. 49, 934-936.
8. Dhewayanti, I.N. 2010. Efektivitas Infusa daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Skripsi*. Fak. Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya.
9. Derre, I. dan Isberg, R.R. 2004. Macrophages from Mice with the Restrictive Lgn1 Allele Exhibit Multifactorial Resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun*. 72(11): 6221-6229.
10. Desjardins M. dan Griffiths G. 2003. Phagocytosis : latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:498-503.
11. Fehr T., Schoedon G., Odermatt B., Holtschke T., Schneemann M., Bachmann M.F., Mak T.W., Horak I., dan Zinkernagel R.M. 1997. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J Exp Med*. 1997 Mar 3;185(5):921-31.

12. Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S., dan Nuri, Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Tikus Putih, 2011. *Majalah Obat Tradisional*. 16.
13. Hartini, Y.S., Wahyuono, S., Widayarni, S., dan Yuswanto, A. 2011. Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz & pav.) Secara *In Vitro*, *Prosiding*, ISBN 9786029187168. Seminar Nasional Pemberdayaan Pasien dalam Self Management Diabetes Melitus untuk Meningkatkan Kualitas Hidup. Fakultas Farmasi Univ. Sanata Dharma, Yogyakarta.
14. Iwo M.M., Fidrianny I., dan Martadiputra A. 2008. Kajian Efek Imunomodulator Ekstrak Air Herba Tapak Dara (*Chararanthus roseus* L..G.Don) pada mencit ddY. *Prosiding Kongres Ilmiah XVI ISFI 2008*. Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. Jakarta. Hal: 167-171.
15. Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh,T., dan Bowo TE.T. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *JKKI* Vol.1 No. 1 April 2009. Universitas Islam Indonesia Yogyakarta
16. Kumar, S., Gupta, P., Sharma, S., dan Kumar, D. 2011. A Review on Immunostimulatory Plants, *Journal of Chinese Integrative Medicine*. 9, 1-18.
17. Kustiawan, P.M., Wahyuono, S., dan Yuswanto, A., 2012, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Immunostimulan Non Spesifik *In Vitro* dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Thesis*. Program Pascasarjana Fakultas Farmasi UGM
18. Leijh, P.C.J., Furth, R.V., dan Van Zwet, T.L. 1986. *In Vitro* Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes, dalam *Cellular Immunology* (Weir, D.M., ed.). Blackwell Scientific Publications, Fourth Ed, Oxford.
19. Manoi, F. 2007. Sirih Merah sebagai Tanaman Obat Multi Fungsi, *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*.13, 2-6.
20. Pangabdian S. 2012. The effective concentration of red betel leaf (*Piper crocatum*) infusion as root canal irrigant solution. *Media Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. Volume : 45 - No. 1 - 2012-03-01
21. Safitri, M. dan Fahma, F. 2008. Potency of *Piper crocatum* Decoction as an Antihyperglycemia. *Hayati, Journal of Bioscience*. 15,
22. Sanchez, S., Paredes, S.D., Sanchez, C.L.,Barriga, C., Reiter, R.J., and Rodriquez, A.B. 2008. Tryptophan Administration in rats Enhances Phagocytic Function and Reduces Oxidative Metabolism. *Neuro Endocrinol Lett*. Dec; 29 (6): 1026-1032.
23. Setyowati, N.S. 2011. Studi komparatif komponen kimia penyusun minyak atsiri daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), sirih hijau (*Piper betle* L.), lada (*Piper nigrum* L.) dan kemukus (*Piper cubeba* L.). Skripsi.
24. Sulistyani, N., Sasongko, H., Hertanti, M., dan Lana, L.M. 2007. Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* serta Identifikasi Komponen Kimiannya. *Media Farmasi*. 6, 33-39, Yogyakarta.
25. Sundari, H. 2010. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Skripsi*. Prodi Farmasi FMIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
26. Suratmo. 2008. Aktivitas Antioksidan dan antikanker Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Tesis*. Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

27. Sustri L., Aryani, N., dan Lukistyowati, I. 2011. Sensitivitas Larutan Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Pertumbuhan *Edwardsiella tarda*. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau.
28. Wagner, H., Kraus, S., dan Jurcic, K. 1999. Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
29. Wagner, H., Kraus, S., dan Jurcic, K. 1999. Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, dalam *Immunomodulatory Agents from Plants*, (Wagner, H., ed.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
30. Wahyudi, Y..2010, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrakn-heksana Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk.) terhadap Peningkatan Titer Imunoglobulin G pada Tikus Terinduksi Vaksin Hepatitis B dan Uji Histopatologinya. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
31. Wahyuniari, I.A.I. 2006. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamp) pada Respon Imun Seluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenes*. *Tesis*. Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
32. Wardhana, P.W. 2011. Efek Antihiperlipidemik Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret.
33. Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Arung, E.T., Kusuma, I.W., Yulia, D., Pancaputra, A.N., dan Sandra, F. 2009. Antiproliferative Effect of Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In Vitro, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8:345-352.
34. Wijayanti, M.A., Supriyono, dan Fitri, L.K. 1999. Sekresi Tumor Necrosis Factor dan Reactive Oxygen Intermediate oleh Makrofag Peritoneum Mencit yang distimulasi dengan Antigen Telarut *Plasmodium falciparum*. *Berkala Ilmiah Kedokteran*. 31, 23-27.
35. Wiweko, O.D. 2010. Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lmk) terhadap Peningkatan Titer Imunoglobulin G dan Histopatologi Tikus yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. *Skripsi*. Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
36. Yulianti, E., Rahayu, T., Mercuriani, I.S., 2011. Potensi Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Sebagai Antikanker. *Skripsi*. Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta
37. Zubier, F., Bramono, K., Widaty, S., Nilasari, H., Louisa, M., dan Rosana, Y. 2010. Efikasi Sabun Ekstrak Sirih Merah dalam Mengurangi Gejala Keputihan Fisiologis. *Majalah Kedokteran Indonesia*. Volume: 60, Nomor: 1, Januari 2010.

## PUBLIKASI 3

In Vivo Immunomodulatory Effect of Two Compounds Isolated from Red  
Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) on BALB/c Mice Infected with  
*Listeria monocytogenes*



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL FLAVONOID CONTENT IN SOME ETHANOLIC BITTER MELON ( <i>Momordica charantia</i> L.) FRUIT EXTRACTS <i>Joko Tri Wibowo, Suparmi, Eva Ratna Sari</i>	130 – 134
IN VIVO IMMUNOMODULATORY EFFECT OF TWO COMPOUNDS ISOLATED FROM RED BETEL ( <i>PIPER CROCATUM</i> RUIZ & PAV.) ON BABL/C MICE INFECTED WITH <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> <i>Yustina Sri Hartini, Subagus Wahyuono, Sitarina Widyarini, Ag. Yuswanto</i>	135 – 141
ANTIOXIDANT CAPACITY OF STEM BARK EXTRACT OF <i>ANTIDESMA NEUROCARPUM</i> MIQ (EUPHORBIACEAE FAMILY) USING 2,2'-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL (DPPH) RADICAL SCAVENGING METHOD <i>Rosmalena, Surya Dwira, Zakiah Ulfah, Berna Elya, Tiah Rachmatiah</i>	142 – 148
THE COST ANALYSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA SURVEILLANCE PROGRAM IN THAILAND <i>Pannapa Sangmala, Usa Chaikledkaew, Tawesak Tanwandee</i>	149 – 153
SYNTHESIS OF 2,5-BIS-(4-NITROBENZYLIDENE)CYCLOPENTANONE VIA CLAISEN SCHMIDT CONDENSATION REACTION <i>Fransiska Ayuningtyas Widyastani, Maywan Hariono</i>	154 – 159
THE INFLUENCE OF GINGER VARIETIES, COMPARISONS OF HERBS-SOLVENT MATERIALS AND TECHNIQUE OF DRYING HERBS TO THE QUANTITY OF SEDIMENTS FROM GINGER RHIZOME ESSENTIAL OILS ( <i>Zingiberis Officinale</i> ) <i>Septiana Laksmi Ramayani, Sri Widyastuti and Eufrasia Astrid</i>	160 – 164
VITAMIN D: BEYOND THE BONE <i>Annette d'Arqom, M.D.</i>	165 – 170
TOXICITY TEST OF SOURSOP LEAVES ( <i>ANNONA MURICATA</i> L.) ETHANOL EXTRACT AND FRACTIONS USING BSLT (BRINE SHRIMP LETHALITY TEST) METHODE <i>Lia Marlani, Yoppi Iskandar, Jon Fiter Irawan</i>	171 – 174
SELF-NANOEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM PREPARATION FOR CURCUMIN ANALOGUES GAMAVUTON-0 AND PENTAGAMAVUNON-0 <i>Erna Wulandari, Nurul Rahma Fitriani, Hilda Ismail, Ronny Martien</i>	175 – 180
LOCALLY SOURCED MAIZE HUSK CELLULOSE AS COMPRESSED TABLET EXCIPIENT <i>Quadri W. G., Bakre Lateef G and Bamiro O.A</i>	181 – 187
OPTIMIZATION OF HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY CONDITION FOR THE MULTIRESIDUE ANALYSIS OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES IN VEGETABLES <i>Setyo Prihatiningtyas, Riesta Primaharinastiti</i>	188 – 194
PRELIMINARY <i>IN VITRO</i> ANTI-CANCER ACTIVITIES ON ISONICOTINIC ACID HYDRAZIDE DERIVATIVES <i>Naveen Kumar H.S, Thaigarajan Parumosivam, Mohd.Zaini Asmawi, Pazilah Ibrahim, Amirin Sadikun</i>	195 – 203

## ***In vivo* immunomodulatory effect of two compounds isolated from red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) on BABL/c mice infected with *Listeria monocytogenes***

Yustina Sri Hartini\*, Subagus Wahyuono\*\*, Sitarina Widayari\*\*\*, Ag. Yuswanto\*\*

\*Faculty of Pharmacy Sanata Dharma University, \*\*Faculty of Pharmacy Gadjah Mada University, \*\*\*Faculty of Veterinary Medicine Gadjah Mada University

Corresponding author: [yustinahartini@usd.ac.id](mailto:yustinahartini@usd.ac.id)

### **ABSTRACT**

As related research applications as an activator immunostimulatory immune system results are inconclusive, therefore required new immunostimulatory search of new source. Empirically red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) leaf is widely used as a traditional medicine to treat a variety of diseases, many plants used as traditional medicines reported to have immunomodulatory activity. Immunomodulatory activity study on Balb/c mice with *Listeria monocytogenes* infection of 2 compounds (code Pc-1 and Pc-2) isolated from the methanolic extract of red betel leaf have been done. The assessment of immunomodulatory activity were carried out by macrophage phagocytic assay, nitric oxide assay, and lymphocytes proliferation assay. Phagocytic activity assay showed that both Pc-1 and Pc-2 increases the activity and capacity of macrophage. At *in vivo* dose of 5 and 10 mg/kgBW, they had significantly enhanced phagocytic activity compare to control group, and no significant difference between Pc-1 and Pc-2 ( $P < 0.05$ ). Nitric oxide assay at dose of 2.5, 5, and 10 mg/kgBW of both Pc-1 and Pc-2 showed significantly difference compare to control group, but on lymphocyte proliferation assay they showed no significant difference ( $P < 0.05$ ).

Key words : *Piper crocatum* Ruiz & Pav, compound, immunomodulatory, *in vivo*

### **INTRODUCTION**

The immune system is the first line of defense of the human body, protecting it from disease and treat it if it occurs (Buhner, 1999). The human body continuously exposure by a variety of factors that result in lower immune function and increasing immunosuppression system. Research related to the application as an activator immunostimulatory immune system results are inconclusive and need a new immunostimulatory search of new sources (Wagner *et al.*, 1999). Empirically red betel leaf is widely used as a traditional medicine to treat a variety of diseases, many plants used as traditional medicines reported to have immunostimulatory activity (Bafna and Misrha, 2004). Red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) is used as a medicinal plant for various diseases. Kustiawan (2012) isolated 2 compounds of the methanolic extract of red betel leaf. The compound 1 (Pc-1) is 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3",4",5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone and compound 2 (Pc-2) is 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3",4",5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl) -3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone, and *in vitro* test of the two compounds showed immunostimulatory activity. According to Wagner *et al.* (1999), *in vitro* assay results do not always correlate with *in vivo* tests, it is necessary to confirm the *in vivo* test. This study reports the results of immunomodulatory effects *in vivo* test ie: macrophage phagocytosis, nitric oxide production, and lymphocyte proliferation mice treated with Pc-1 and Pc-2.

### **MATERIALS AND METHODS**

#### **1. Plant material :**

The fresh leaves of red betel were collected from Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Central of Java, Indonesia on

May 2010. Plant species was determined at department of Biology Pharmacy Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University (GMU), Yogyakarta, Indonesia.

## 2. Animals and microorganisms:

Male Balb/c mice 8 weeks old weighing about 20-25 g obtained from Pharmacology Laboratory while *Listeria monocytogenes* obtained from Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine GMU were used for the experiments. All procedures were approved by The Ethical Clearance Commission for pre-clinically research of Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu GMU. Balb/c mice were divided into nine groups. Group A, received 2.5 mg/kgBW Pc-1, Group B, received 5 mg/kgBW Pc-1, Group C, received 10 mg/kgBW Pc-1, Group D, received 2.5 mg/kgBW Pc-2, Group E, received 5 mg/kgBW Pc-2, Group F, received 10 mg/kgBW Pc-2, per oral for 14 days, Group G, didn't received drugs as normal control, Group H, received 0.75 ml of 1% sodium carboxy methyl cellulose per oral as solvent control, and Group I, received 100 mg/kgBW Produk-X® per oral as positive control. On 15<sup>th</sup> day (=day 0) 0.2 ml *L. monocytogenes* containing  $5 \times 10^3$  cfu/ml are injected *intraperitoneally* (ip) to all mice. On day 10, three mice of each group were used to obtain 10<sup>th</sup> day data, while 3 mice left of all group are injected ip again with 0.2 ml *L. monocytogenes*. These mice are sacrificed on day 21 to obtain 21<sup>th</sup> day data.

## 3. Chemicals:

Medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Sigma R-6504), fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL 10082147), 1mM sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Sigma S-5761), mM L-Glutamin 100,  $\mu\text{g}$  penisilin, dan 0.5 mg streptomisin (Gibco 15140-122), fungison (Gibco 15295-017), *Phosphate-buffered saline* (PBS), chloroform (Merck K 23788209709), methanol (Merck K 2538245), latex beads (Sigma LB-30) diameter 0,3 $\mu\text{m}$ , Giemsa 10%, *tryphan blue*, Product-X® (kaplet Imboost Force PT Kimia Farma).

## 4. Methods:

### 4.1. Compounds isolation.

Red betel leaf methanolic extract was fractionated by the method of vacuum liquid chromatography (VLC) (Coll and Bowden, 1986) successively with n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and methanol so that the final fraction obtained 5. Isolated compounds (Pc-1 and Pc-2) are compounds with a purple marker spots that reduce  $\text{UV}_{254}$ , no color at  $\text{UV}_{366}$  nm, and brown on the detection of cerium sulfate, with a mobile phase of chloroform: ethyl acetate (9:1). The Pc-1 (Rf 0.25) and Pc-2 (Rf 0.7) contained in fraction III and fraction IV results VLC separation of methanolic extract of red betel leaf. Fraction was dissolved in chloroform: methanol (1:1) and then spotted on preparative TLC plate. Plate was eluted in a vessel that contains the mobile phase chloroform: ethyl acetate (9:1), then see under  $\text{UV}_{254}$  nm. The spots marked with a needle, scraped, collected, diluted with chloroform: methanol (1:1) and then filtered, evaporated, until the isolates obtained in the form of crystals.

### 4.2. Phagocytosis assay

Latex beads was suspended in PBS so that concentrations obtained  $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ . Medium taken so stay macrophages in coverslips. At each well was added 1ml of test material in complete RPMI medium in triplo (3 coverslips) and then incubated. After 4 hours incubation, suspension of latex beads added to PBS, where latex beads at a density of 400 mL latex beads in  $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ , then incubated in a  $\text{CO}_2$  incubator for 60 minutes. Media collected, dried, painted with 20% Giemsa for 30 minutes, then washed with distilled water thoroughly removed from the culture wells and dried at room temperature (Leich et al., 1986; Wahyuniari, 2006, Derre and Isberg, 2004), each at 2 field of view for each coverslip.

### 4.3. Assay for nitrite determination by Griess reaction

A total of 100  $\mu\text{L}$  each macrophage cell cultures that have been incubated overnight, put in wells in duplicate, also the nitric oxide standard with 20  $\mu\text{M}$  concentration range up to 0.078  $\mu\text{M}$ . Each wells was added 100  $\mu\text{L}$  solution Gries (new made by mixing reagents Gries A: Gries B = 1:1). Incubated for 10 minutes, then read with elisa reader at a wavelength of 550 nm (Cheng et al., 2008)

### 4.4. Lymphocytes proliferation assay with MTT Assay.

Lymphocytes were cultured in microplate 96 with a volume of 100 ml/pitting. Each group with 3x replication. Added phytohaemagglutinin (PHA) at a final concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$ , 10 ml/wells, and then incubated at 37°C. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) is then added to each wells with a concentration of 5 mg/ml, 10 mL, and incubated at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  for 4 hours. The reaction was stopped by adding 0.04 M HCl-isopropanol as much as 100 ml/pitting. The result is read by ELISA reader at a wavelength of 550 nm (Wahyuniari, 2006).

### 5. Data Analysis :

Phagocytostic activity was measured by the latex-bead phagocytosis index (PI), the phagocytosis percentage (PP), and the phagocytosis efficiency (PE) (Sanchez et al., 2008). Expressed values are mean SD using one way anova, Tukey test, and Pearson correlation.

## RESULT AND DISCUSSION

### 1. Isolation of compounds

Isolation of compound 1 (code Pc-1) and compound 2 (Pc-2 code) from 2.12 grams of red betel leaf methanolic extract produced 12.0 mg of Pc-1 and Pc-2 12.1 mg pure in TLC. Compound Pc-1 and Pc-2 is colored purple isolated on UV 254, UV invisible at 366, brown colour on detection with cerium sulfate as well as having Rf 0.25 at the price movement of chloroform: ethyl acetate (9:1), Pc-1 having Rf 0.6 and Rf Pc-2 has a 0.25; the mobile phase hexane: acetone (3:1), Pc-1 had Rf 0.5 and Pc-2 has Rf 0.19; the mobile phase hexane: ethyl acetate (3:1). Pc-1 had Rf 0.9 and Rf Pc-2 has a 0.8. Detection by TLC on Pc-1 and Pc-2 using 3 mobile phase systems showed a single spot on their TLC chromatogram. Compound Pc-1 and Pc-2 isolated from methanolic extract of red betel leaves is the same with Kustiawan's compound 1 and 2.

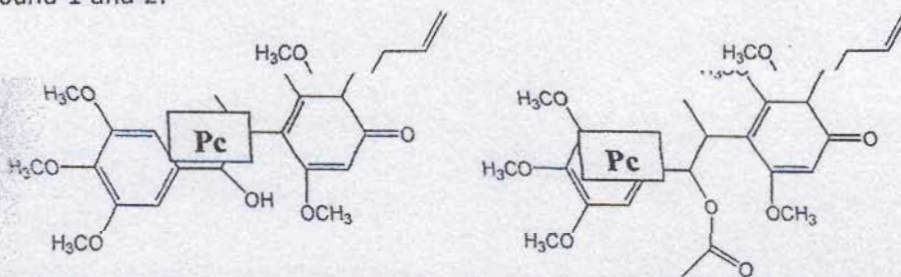


Figure 1. The two compounds (Pc-1 and Pc-2) from red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

### 2. Phagocytic activity

Both compounds were isolated from the leaves of red betel (*P. crocatum* Ruiz & Pav.) able to increase the phagocytic activity and capacity of peritoneal macrophages of mice infected with *L. monocytogenes*. Figure 2 shows the activity of



macrophages in phagocytic latex beads, whereas figure 3 shows the capacity of macrophages. The phagocytosis efficiency which is the ratio between the capacity of the activity is shown in figure 4. Compounds Pc-1 and Pc-2 showed the same pattern of effects on macrophage phagocytic activity and capacity. At a dose of 10 mg/kgBW both Pc-1 and Pc-2 is able to increase the activity of macrophages and capacity both on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day. At a dose of 5 mg/kgBW both Pc-1 and Pc-2 showed significant difference on 21<sup>th</sup> day, it means that 5 mg/kgBW is the minimal dose of Pc-1 and Pc-2 to increase activity and capacity of macrophage. The positive control group treated with product containing 250 mg of Echinacea extract, the ability of echinacea extract in enhancing phagocytosis has been reported by Bauer (1999). On the 10<sup>th</sup> day, treated with 5 mg/kgBW and 2.5 mg/kgBW both Pc-1 and Pc-2 showed no significant differences for the three control groups. At a dose of 10 mg/kgBW both Pc-1 shows significant differences dose of 10 mg/kgBW both Pc-2 on phagocytic index parameter on the 21<sup>th</sup> day, but not significant at the 10<sup>th</sup> day or phagocytic parameters percent. At a dose of 10 mg/kgBW Pc-2 macrophage phagocytic capacity is greater than Pc-1. For phagocytosis efficiency parameter, Pc-2 at a dose of 5 mg/kgBW or 10 mg/kgBW showed a significant difference on the 21<sup>th</sup> day, whereas Pc-1 only at a dose of 10 mg/kgBW. Pearson correlation analysis showed that there is a positive close significant correlation between phagocytic percentage and phagocytic indeks ( $P > 0.01$ ). In this research 2.12 g *P. crocatum* Ruiz & Pav. methanolic extract contains 12,0 mg Pc-1 and 12.1 mg Pc-2, therefore the dose of 5mg/kgBW Pc-2 equal to 876mg/kgBW extract while the dose of 5mg/kgBW Pc-1 equal to 883mg/kgBW extract. At the dose of 2.5 mg/kgBW both Pc-1 and Pc-2 showed no significant difference compare to the control group, it dose equal to 438mg/kgBW Pc2 and 442 mg/kgBW Pc1. Since Apriyanto (2011) and Indriyani (2011) reported that extract of *P. crocatum* Ruiz & Pav. at dose of 100mg/kgBW and 300 mg/kgBW increase phagocytic activity, it indicated that *in vivo* phagocytic assay showed single compound less active than extract.

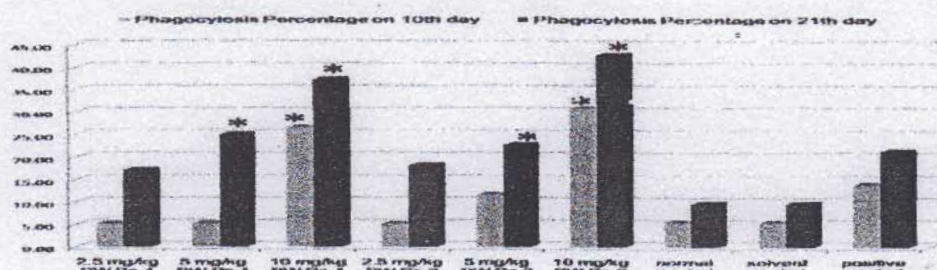


Figure 2. The effect of Pc-1 and Pc-2 on macrophage percentage phagocytosis on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day. Values are the mean  $\pm$  SD of three replicates, \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) vs normal control and solvent control.

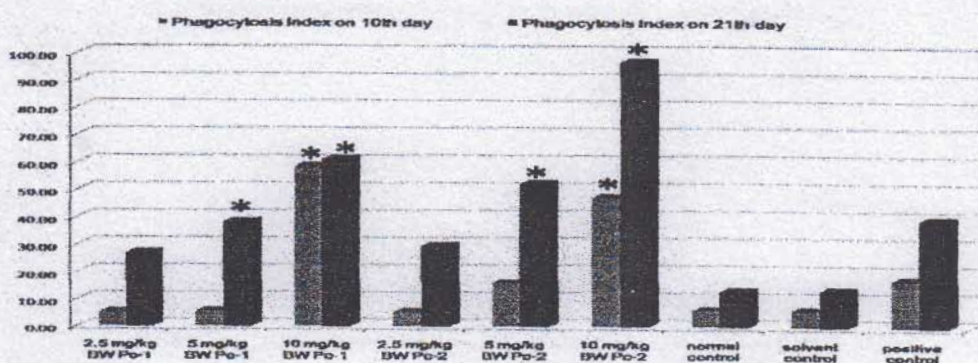


Figure 3. The effect of Pc-1 and Pc-2 on macrophage index phagocytosis on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day. Values are the mean±SD of three replicates, \* indicates statistically significant differences (P<0.05) vs normal control and solvent control

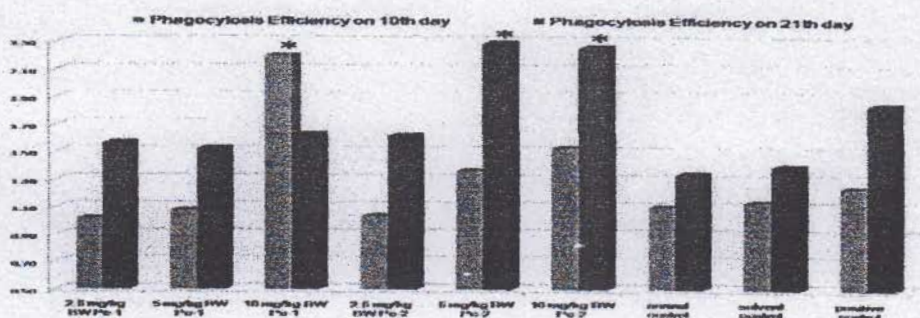


Figure 4. The effect of Pc-1 and Pc-2 on macrophage efficiency phagocytosis on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day. Values are the mean±SD of three replicates, \* indicates statistically significant differences (P<0.05) vs normal control and solvent control.

### 3. Nitrite production

Treatment with compound code Pc-1 and Pc-2 at a dose of 5 or 10 mg/kgBW showed a significant difference in nitrite production compare to treatment with normal control, solvent control and positive control on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day, whereas at a dose of 2.5 mg/kgBW showed significant differences to the three control groups on the 21<sup>th</sup> day.

### 4. Lymphocytes proliferations

Lymphocyte proliferation assay showed no significant difference among Pc-1 and Pc-2, respectively at doses of 2.5, 5, and 10 mg/kgBW compare to solvent control and medium control group (P<0.05). There was no effect of both Pc-1 and Pc-2 on the lymphocytes proliferation of mice BALB/c, Apriyanto (2011) and Indriyani (2011) also reported that extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. did'n effect on lymphocyte proliferation. Figure 5 showed that increases of doses tend to reduce the lymphocytes proliferation, it seem that *P. crocatum* Ruiz & Pav have immunosuppression activity, because Kanjwani *et al.* (2008) reported that methanolic extract of *Piper betle* L.; other species on the same genus of *P. crocatum* Ruiz & Pav.; gave immunosupressan on cellular and humoral response, moreover

Yuristiyani (2012) found that *in vitro* assay showed it suppresses the lymphocytes proliferation.

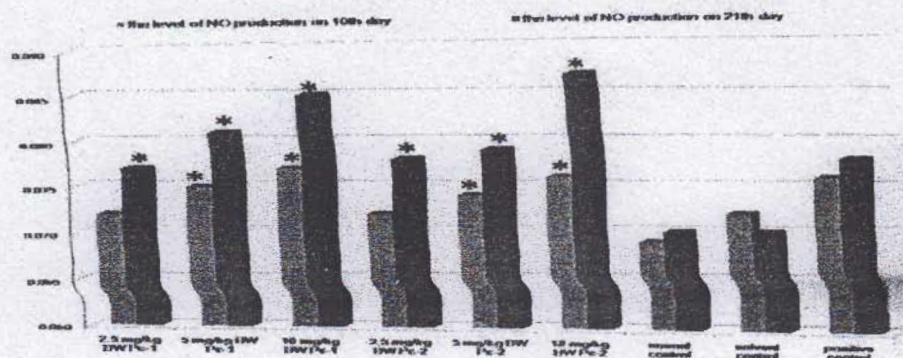


Figure 5. The effect of Pc-1 and Pc-2 on NO production on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup>. Values are the mean±SD of three replicates, \* indicates statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) vs normal control and solvent control.

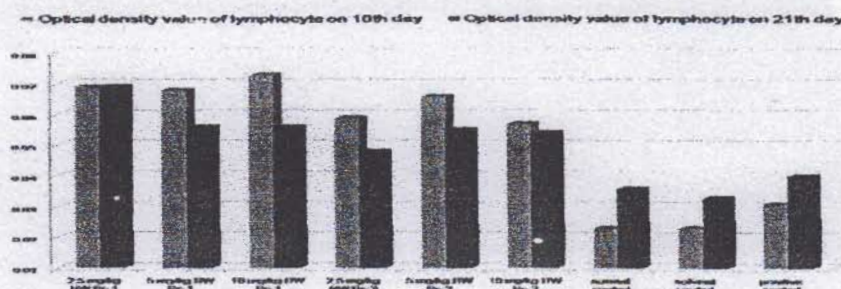


Figure 6. The effect of Pc-1 and Pc-2 on lymphocytes proliferation on 10<sup>th</sup> day and 21<sup>th</sup> day. Values are the mean±SD of three replicates, Pc-1 and Pc-2 do not indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) vs normal control and solvent control.

## CONCLUSION

Both compound 1 (Pc-1) and compound 2 (Pc-2) from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. increase the activity and capacity of macrophage. At *in vivo* dose of 5 and 10 mg/kgBW, they had significantly enhanced phagocytic activity compare to control group, and no significant difference between Pc-1 and Pc-2 ( $P < 0.05$ ). At dose of 2.5, 5, and 10 mg/kgBW, both Pc-1 and Pc-2 increase nitric oxide production, but didn't effect on lymphocyte proliferation.

## REFERENCES

Apriyanto, S., 2011, Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Lamk) terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Fagositosis Makrofag pada Tikus yang diinduksi Vaksin Hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Bauer R. Chemistry, Analysis and Immunological Investigations of Echinacea Phytopharmaceuticals, In: Wagner H, editor. *Immunomodulatory Agents from Plants*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, 1999. p. 41-89.
- Bafna A.R. dan Misra S.H. 2004. Immunomodulatory activity of methanol extracts of flower-heads of *Sphaeranthus indicus* Linn. *Ars Pharm.* 45 (3): 281-291.
- Buhner, S.H., 1999. *Herbal Antibiotics, Natural Alternatives for Treating Drug-Resistant Bacteria*, Storey Publishing, North Adams.
- Coll, J.C. and Bowden B.F., 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to The Separation of Terpene Mixtures. *J Nat Prod.* 49: 934-936.
- Derre I, Isberg RR. Macrophages from Mice with the Restrictive Lgn1 Allele Exhibit Multifactorial Resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 2004.72(11):6221-6229.
- Cheng A., Wan, F., Wang, J, jin Z., and Xu X., 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *International Immunopharmacology*, 8:43-50.
- Indriyani, L.W., 2011. Uji Aktivitas imunomodulator ekstrak n-heksana daun sirih merah (P c Lamk) terhadap aktivitas fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit tikus yang diinduksi vaksin hepatitis B, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Kanjwani, D.G., Marathe, T.P., Chipunkar, S.V., fan Sathaye, S.S., 2008, Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of Piper betel, *Scand J of Imm*, 67, 589-593.
- Kustiawan, P.M., Wahyuono, S., dan Yuswanto, A., 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Immunostimulan Non Spesifik In Vitro dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Thesis*. Program Pascasarjana Fakultas Farmasi UGM
- Leijh PCJ, Furth RV, Van Zwet TL. In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes. dalam *Cellular Immunology* (Weir, D.M., ed.). Blackwell Scientific Publications. Fourth Ed. Oxford. 1986. P. 46.3-46.6.
- Sanchez S, Paredes SD, Sanchez CL, Barriga C, Reiter RJ, Rodriguez AB. 2008. Tryptophan Administration in rats Enhances Phagocytic Function and Reduces Oxidative Metabolism. *Neuro Endocrinol Lett.* 29(6):1026-1032.
- Wagner H, Kraus S, and Jurcic K., 1999. Search for Potent Immunostimulating Agents from Plants and Other Natural Sources, In: Wagner H, editor. *Immunomodulatory Agents from Plants*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag, p. 1-40.
- Wahyuniari IAI. 2006. Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk) pada Respon Imun Seluler Setelah Infeksi *Listeria monocytogenes*. *Tesis*. Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. p. 24-26.
- Yuristiyani, D.D., 2012. Potensi fraksi tak larut n-heksana ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *in vitro* sebagai imunomodulator terhadap fagositosis makrofag dan proliferasi sel limfosit tikus yang diinduksi phytohemagglutinin, *Skripsi*, Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

**PUBLIKASI 4**

In vivo immunomodulatory and histopathologically effect of two compounds  
isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA

PROCEEDINGS ● ● ●

**6<sup>th</sup>**

**Asian Association of  
Schools of Pharmacy  
Conference**

*Integrating Science, Technology and Practice  
for Sustained Excellence in Pharmacy Education*



NOVEMBER 14 - 17, 2013

SHAW FOUNDATION ALUMNI HOUSE

NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE

Asian Association of  
Schools of Pharmacy  
(AASP)



GEA-NUS Pharmaceutical  
Processing Research  
Laboratory

**14:30-15:00**  
**OP-PC-4**  
**Concurrent Session: Pharmacy Practice/Education**  
**Date/Time** Saturday, 16 November 2013 / 14:30-16:00 hrs  
**Venue** Auditorium  
**Chair(s)** Thengungal Kochupappay RAVI,  
*Sri Ramakrishna Institute of Paramedical Sciences, India*

**14:30-15:00**  
**OP-PP-4-1**  
**Implementation of Core Set of Clinical Pharmacy and Experiential Education for Schools of Pharmacy in Korea**  
 Jung Mi OH, *Seoul National University, Korea*

**15:00-15:15**  
**OP-PP-4-2**  
**Efficacy of Smoking Cessation Training: A Program Based on Application of Practice with Real Smoker in Undergraduate Pharmacy Students**  
 Chuanchom THANANITHISAK, *Naresuan University, Thailand*

**15:15-15:30**  
**OP-PP-4-3**  
**Adverse Drug Reactions (ADRs) from First Line Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) Among South Indian HIV/AIDS Patients**  
 Adusumilli P KUMAR, *JSS University, India*

**15:30-15:45**  
**OP-PP-4-4**  
**Development of an Integrated Model of Teaching Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Pharmacotherapeutics: Bridging the Gap Between Basic and Clinical Sciences in Pharmacy Education**  
 Mohammed ISLAM, *West Coast University, USA*

**15:45-16:00**  
**OP-PP-4-5**  
**A Prospective Study on the Self-Medication Practices in a Rural Community in Northern Philippines**  
 Mark Ryan LANGIT, *Saint Louis University, Philippines*

**16:00-16:30**  
**PC-4**  
**Concurrent Session: Pharmaceutical Chemistry/Drug Discovery**  
**Date/Time** Saturday, 16 November 2013 / 14:30-16:00 hrs  
**Venue** Seminar Room 1  
**Chair(s)** Subagus WAHYUONO, *Gadjah Mada University, Indonesia*

**14:30-15:00**  
**OP-PP-4-6**  
**Chemical and Biological Activity Studies of Sumatran Plants: Genus Garcinia**  
 DACHIRYANUS, *Andalas University, Indonesia*

**15:00-15:15**  
**OP-PC-4-1**  
**Identification of Novel and Potential Small Molecule Inhibitors of Dengue Virus Protease**  
 B N SINHA, *Birla Institute of Technology, India*

**15:15-15:30**  
**OP-PC-4-2**  
**In-Vivo Immunomodulatory and Histopathological Effect of Two Compounds Isolated from Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav)**  
 Yustina Sri HARTINI, *Samata Dharma University, Indonesia*

**15:30-15:45**  
**OP-PC-4-3**  
**Determination of the Wound Healing Properties of *Ficus elastica* (Indian Rubber Tree) Leaf Extract in Male Sprague-Dawley Rats: Circular Excision and Linear Incision Model**  
 Diana Mae TAMAYO, *University of Santo Tomas, Philippines*

**15:45-16:00**  
**OP-PC-4-4**  
**Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Stem Bark Extract of the *Ventilago***  
 Shweta KUMAR, *Technocrats Institute of Technology, India*

**16:00-16:30**  
**Tea Break**

**16:30-16:45**  
**Session** Award Presentation & Closing Ceremony  
**Date/Time** Saturday, 16 November 2013 / 16:30-17:00 hrs  
**Venue** Auditorium

**16:30-16:45**  
**Best Poster Awards Presentation Ceremony**

**16:45-17:00**  
**Closing Remarks by Conference Co-Chairperson**  
 Zhi Hui LOH, *National University of Singapore, Singapore*

**17:00**  
**End of Conference**

Date: 16 November 2013

Chair: Subagus WAHYUONO, Gadjah Mada University, Indonesia

15:00-15:15 hrs

PC-4-1

### IDENTIFICATION OF NOVEL AND POTENTIAL SMALL MOLECULE INHIBITORS OF DENGUE VIRUS PROTEASE

T Ajay Kumar, J Venkatesan and B N Sinha

Department of Pharmaceutical Sciences,

Birla Institute of Technology, Mesra,

Ranchi- 835 215, Jharkhand, India.

#### Introduction

Dengue is among the most widespread mosquito-borne disease, which is rapidly spreading throughout the globe where the mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are found. Dengue infection is caused by dengue virus (DENV) belonging to the family Flaviviridae and is one of the major emerging pathogen for which neither a vaccine nor any antiviral therapy has yet been successfully developed. The non-structural protein NS2B-NS3 protease is considered as a promising target for the development of anti-dengue agents. In this study we have identified a few hits for NS2B-NS3 protease inhibitors through high throughput virtual screening (HTVS) followed by synthesis of their analogues and testing their antiviral activity.

#### Experimental

The need of antiviral agents for DENV infection and the success of virtual screening against many therapeutically valuable targets guided us to carry out HTVS against dengue protease. X-Ray crystal structure of dengue virus NS2B-NS3 protease (PDB CODE: 2FOM) was downloaded from [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Grid was constructed around catalytic residues HIS51, ARG55 and SER155 of NS2B-NS3 PROTEASE. HTVS of ZINC12 has been carried out using the Open eye tools besides Schrodinger LLC and Auto Dock software packages. Open eye filter

and their analogues were synthesized and screened for their anti-DENV activity.

15:15-15:30 hrs

PC-4-2

### IN-VIVO IMMUNOMODULATORY AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECT OF TWO COMPOUNDS ISOLATED FROM RED BETEL (PIPER CROCATUM RUIZ & PAV.)

Y S Hartini<sup>1</sup>, S Wahyuno<sup>2</sup>, S Widayanti<sup>3</sup> and A Yuswanto<sup>2</sup><sup>1</sup>Faculty of Pharmacy Samata Dharma University,<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy Gadjah Mada University,<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine Gadjah Mada University.

#### Introduction

Red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) leaves have been used traditionally by Indonesian People to maintain their health. Previous study of the leaves indicated that the leaves displayed immunomodulatory activity *in vitro* (macrophage phagocytosis test). Two principal active substances were isolated from the MeOH Extract, identified as a noliignan (Pc-1) compound and its deacetyl derivative (Pc-2). This recent study we report histopathological effect and *in vivo* immunomodulatory effect on mice treated with Pc-1 and Pc-2.

#### Experimental

Assessment of immunomodulatory activity were carried out by macrophage phagocytic assay, nitric oxide assay, and lymphocytes proliferation assay. The material preparation was done by staining with hematoxylin-eosin, and the histopathological effects were investigated in liver and kidney of BALB/c mice induced by *Lysteria monocytogenes*.

#### Results & Discussion

At the dose of 5 and 10 mg/kgBW, both Pc-1 and Pc-2 increased activity and number of macrophages produced. Increasing of nitric oxide production due to Pc-1 and Pc-2 (2.5, 5, and, 10 mg/kgBW) was also observed even

though there was not lymphocyte proliferation effect observed. Histopathological study of these two compounds did not show any abnormal histopathology on liver and kidney upon Pc-1 treatment. But there was a liver damage was observed upon Pc-2 treatment although the kidney was still remained normal. Considering of this result and the structure similarity of these two compounds (Pc-1 and Pc-2), an interesting presumption can be brought up that the -OH functional group (Pc-2) was responsible for the toxicity causing liver damage.

#### Conclusion

The Pc-1 and Pc-2 isolated from the leaves of *P. crocatum* Ruiz & Pav. are able to increase the macrophages phagocytic and nitric oxide production activity as well, but lymphocytes proliferation effect is not observed. There is no histopathological effect on kidney observed due to both compounds, but histopathological effects on liver is observed due to Pc-2 treatment, not for Pc-1. Presumably, the -OH group on Pc-2 is responsible for the liver damage.

15:30-15:45 hrs

PC-4-3

### DETERMINATION OF THE WOUND HEALING PROPERTIES OF FICUS ELASTICA (INDIAN RUBBER TREE) LEAF EXTRACT IN MALE SPRAGUE-DAWLEY RATS: CIRCULAR EXCISION AND LINEAR INCISION MODEL

Yssa Armeena T Agapito,  
Maria Aibel Canaco, Kristine Mari M Cruz,  
Patricia Joyce C de la Pasion,  
Dominique I Dela Cruz, Helsa Abigail King,  
Diana Mae S Tamayo and  
Andrea Q CarigmaFaculty of Pharmacy, University of Santo Tomas,  
España Boulevard, Manila Philippines.

#### Introduction

*Ficus elastica* has been known to exhibit antibacterial and anti-inflammatory properties that may aid in the wound healing process. Wounds are of major concern to patients and



**PUBLIKASI 5**

Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih  
Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara *In Vitro*



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA



# JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

Volume 11. Nomor 2. September 2013

## DAFTAR ISI | CONTENTS

- 97 SANTI PURNA SARI, ABDUL MUN'IM, DINI KUSUMANINGTYAS  
Aktivitas Gastroprotektif Kombinasi Ekstrak Kulit Batang Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Linn.) pada Tikus Putih yang Diinduksi Asetosal
- 102 BANU AJI WIJAYANTO, DHADHANG WAHYU KURNIAWAN, ISKANDAR SOBRI  
Formulasi dan Efektivitas Gel Antiseptik Tangan Minyak Atsiri Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd.)
- 108 YUSTINA SRI HARTINI, SUBAGUS WAHYUONO, SITARINA WIDYARINI, AGUSTINUS YUSWANTO  
Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In Vitro*
- 116 MARTALENA RAMLI, BASUKI HIDAYAT, SRI AGUSWARINI, KARYADI, CAHYA NOVA ARDIYATNO, MUHAMMAD SUBIJR, TTIS SEKAR HUMANI, RIEN RITAWIDYA, ABDUL MUTALIB, JOHAN MASJHUR  
Preclinical Study of <sup>177</sup>Lu-DOTA-Trastuzumab, a Potential Radiopharmaceutical for Therapy of Breast Cancer Positive HER-2
- 123 IKA PUSPITA SARI, ARIEF NURROCHMAD, IRFAN MURIS SETIAWAN, SARDJIMAN  
Kurkumin Analog, PGV-0 dan GVT-0 Menghambat Absorpsi Kolesterol dengan Penghambatan Aktivitas Enzim Lipase
- 127 DEWI PUSPITA, RIZKI AYU AMALIA, AMARILA MALIK  
Respon Galur *Leuconostoc mesenteroides* dan *Weissella confusa* terhadap pH Kondisi Pertumbuhan Menggunakan Antibiotik sebagai Indikator
- 134 ENDANG LUKITANINGSIH, ANNY A. MUSTIKAWATY, BAMBANG SULISTYO ARI SUDARMANTO  
*Homology Modeling* dan *Molecular Docking* Senyawa Aktif dari Bengkoang (*Pachyrrhizus erosus*) sebagai Inhibitor Tirosinase pada *Homo sapiens*
- 142 ROS SUMARNY, LESTARI RAHAYU, NI MADE DWI SANDHIUTAMI, LIBERT MORY  
Efek Stimulansia Infus Lada Hitam (*Piperis nigri fructus*) pada Mencit
- 147 TTIN YULINERY, NOVIK NURHIDAYAT  
Aktivitas Antimikroba dan Analisis Gen Plantarisin F dari Isolat *Lactobacillus* Asal Buah-buahan Tropis
- 156 KAMILIA MUSTIKASARI, MARDI SANTOSO  
3,3'-Di(5,7-dibromoindol-3-il)-indolin-2-on: Sintesis dan Uji Sitotoksik terhadap Sel Kanker Kolon WiDr
- 160 TITIK SUNARNI, RINI PRASTIWI, MARDIYONO, YUDI RINANTO  
Kombinasi Ekstrak Eranol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai Hepatoprotektif selama Pengobatan Tuberkulosis
- 167 MARIA ULFAH, EDIATI SASMITO, TRIANA HERTIANI  
Immunomodulatory Compound from *Myrmecodia pendens* Merr & Perry
- 175 SITI SA'DIAH, LATIFAH KOSIM DARUSMAN, WULAN TRIWAHYUNI, IRMANIDA BATUBARA  
Efektivitas Krim Anti Jerawat Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) terhadap *Propionibacterium acnes* pada Kulit Kelinci
- 182 YUSI ANGGRIANI, AGUSDINI BANUN, ERLIANA  
Evaluasi Penggunaan Antibiotika di Ruang HCU dan Ruang ICU Rumah Sakit Kanker "Dharmas" Februari – Maret 2012
- 191 LEONARDUS BROTO SUGENG KARDONO, LIANDHAJANI, NINA ARTANTI, YETI MULYATI ISKANDAR, SITI MASRUH BROTO SUTARYO  
Development of Papaya Latex, Papaya Extract (*Carica papaya* L.) and Yam Bean Tube Extract (*Pachyrrhizus erosus* (L.) Urb.) for Skin Lightening Lotion Based on Tyrosinase Inhibition and Antioxidant Activities
- 197 SRI HARTATI, MEGAWATI, NINA ARTANTI, MELYAWATI L., M. HANAFI  
Identifikasi Senyawa dari Ekstrak Air Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)
- 202 TENI ERNAWATI, DILA FAIRUSI  
Sintesis Fenil Sinamat dan 4-Fenilkroman-2-on dan Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

## Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Secara *In Vitro*

### (Phagocytic Macrophage Activity of Fractions from Methanolic Leaf Extract of Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) *In Vitro*)

YUSTINA SRI HARTINI<sup>1,2\*</sup>, SUBAGUS WAHYUONO<sup>2</sup>, SITARINA WIDYARINI<sup>3</sup>,  
AGUSTINUS YUSWANTO<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 25 Mei 2012, Disetujui 11 April 2013

**Abstrak:** Senyawa imunomodulator dapat diperoleh dari tanaman. Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara tradisional digunakan untuk pengobatan berbagai macam penyakit termasuk untuk meningkatkan daya tahan tubuh. Penelitian ini bertujuan menguji daya imunomodulator ekstrak metanol daun sirih merah dan fraksi-fraksinya, dengan metode fagositosis makrofag secara *in vitro*. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirih merah pada dosis 75µg/mL mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang setara dengan produk-X<sup>®</sup> 100µg/mL yang mengandung ekstrak *Echinacea*. Dari 5 fraksi hasil pemisahan menggunakan fase gerak *n*-heksana:etil asetat secara kromatografi cair vakum, fraksi II merupakan fraksi paling aktif. Fraksi II mengandung alkaloid dan terpenoid, sedangkan ekstrak metanol selain kedua golongan senyawa tersebut juga mengandung minyak atsiri dan flavonoid. Kemungkinan senyawa dalam daun sirih merah yang bertanggung jawab terhadap aktivitas fagositosis makrofag merupakan golongan alkaloid dan/atau terpenoid.

**Kata kunci:** sirih merah, *Piper crocatum* Ruiz & Pav., fraksi, ekstrak metanol, fagositosis makrofag, imunomodulator.

**Abstract:** Plants can be sources of immunomodulatory agents. *Piper crocatum* Ruiz & Pav. (red betel) leaves have been used to heal many diseases, especially to increase endurance. The aim of this research was to investigate the immunomodulatory effect of methanolic leaf extracts of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. and its fractions by *in vitro* phagocytic macrophage activity test. The result showed that methanolic extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. 75µg/mL could stimulate phagocytic macrophage activity equal to 100µg/mL product-X<sup>®</sup> that contained *Echinacea* extract. Separation of the extract by vacuum liquid chromatography using gradient solvent *n*-hexane - ethyl acetate yielded 5 fractions. The second fraction showed the highest activity. It contained alkaloid and terpenoid, while the extract also contained flavonoid and essential oil. Alkaloid and/or terpenoid could be the compound in the leaves of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. that responsible increasing phagocytic macrophage activity.

**Keywords:** red betel, *Piper crocatum* Ruiz & Pav., fractions, methanolic extract, phagocytic macrophage, immunomodulator.

\* Penulis korespondensi, Hp. 08122968364  
e-mail: yustinahartini@usd.ac.id

## PENDAHULUAN

SISTEM imun merupakan lini pertama pertahanan tubuh manusia, melindungi tubuh dari penyakit dan mengobatinya apabila telah terjadi penyakit. Alam telah menyediakan banyak sumber obat sejak dahulu kala, dan berbagai senyawa sintetik pun dibuat berdasar model senyawa dari bahan alam. Senyawa-senyawa yang dapat memodulasi sistem imun dapat diperoleh dari tanaman<sup>(1,2)</sup>. Pengobatan alami merupakan bahan kajian dan sumber penting untuk mendapatkan senyawa obat baru<sup>(3)</sup>. Baru sejumlah kecil tanaman yang telah diskriminasi aktivitas imunostimulannya. Dari skrining tersebut terbukti bahwa beberapa tanaman obat memiliki aktivitas imunostimulan, namun tidak cukup bukti untuk kemudian dapat digunakan dalam praktik klinis, sehingga di masa mendatang penelitian tentang imunostimulator dari tanaman obat sangat bernilai<sup>(4)</sup>. Ekstrak metanol *Piper betle* L. adalah kandidat baru untuk aktivitas immunosupresif<sup>(5)</sup> demikian juga ekstrak metanol *Piper longum*<sup>(6)</sup>. Beberapa senyawa sejenis terdapat dalam beberapa spesies dalam marga *Piper*<sup>(7)</sup>.

Tanaman sirih merah mempunyai banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, berpotensi menyembuhkan berbagai jenis penyakit<sup>(8)</sup>. Ekstrak metanol daun sirih merah memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker payudara (T47D) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 44,25 bpj<sup>(9)</sup>. Fraksi ekstrak etanol daun sirih merah berpotensi sebagai antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 33,44 bpj, dan sebagai antikanker terhadap sel *HeLa* dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1197,43 bpj<sup>(10)</sup>. Penelitian ini adalah awal dari penelitian yang bertujuan mencari dan menetapkan struktur kimia senyawa dalam daun sirih yang memiliki daya imunomodulator dengan cara *bioassay guided isolation*. Menurut Ponkshe dan Indap<sup>(11)</sup>, metode fagositosis adalah salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk skrining bahan aktif yang mempengaruhi respon imun. Pada penelitian ini *bioassay* (uji aktivitas imunomodulator) untuk skrining awal digunakan metode uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan utama berupa daun sirih merah diambil di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Karanganyar Jawa Tengah pada bulan Mei 2010. Determinasi tanaman dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bahan lain adalah media *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 (Sigma),

*fetal bovine serum* (FBS) (Gibco BRL), natrium bikarbonat ( $NaHCO_3$ ) (Sigma), L-Glutamin, penisilin, dan streptomisin (Gibco), fungison (Gibco), Dimetilsulfoksida (DMSO), *phosphate-buffered saline* (PBS), kloroform (Merck), metanol (Merck), *latex beads* (Sigma) diameter 0,3 $\mu$ m, cat Giemsa 10%, *tryphan blue*, dan Produk-X<sup>®</sup> (kaplet Imboost Force PT Kimia Farma). Hewan uji mencit BALB/c jantan dengan berat 25-35 g (berumur 8 minggu). Kelaikan etik diproses dan mendapat persetujuan dari komisi *ethical clearance* untuk penelitian praklinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.

**Alat.** Timbangan analitik (Sartorius), blender (Retsch bv), maserator (Siemens Schuckert yang dimodifikasi), *rotary evaporator* (Janke and Kunkel Ika Labortechnik), *water bath* (Labeco), oven (Mettler), *vortex mixer* (Janke and Kunkel Ika Labortechnik), sentrifus (Hettich FBA 88), *microplate 24 well* (Iwaki), *coverslips* bulat diameter 13 mm (Nalge Nunc International), inkubator  $CO_2$  (Heraeus), *laminar air flow* (Nuair), mikroskop cahaya (Olympus), kamera digital (Nikon Coolpix L19), hemositometer (Newbauer).

**METODE. Ekstraksi.** Daun sirih merah dicuci di bawah air mengalir hingga bebas kotoran, kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50°C sampai kering. Daun kering dibuat serbuk, ditimbang, dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan metanol ke dalam maserator sampai semua serbuk terendam, kemudian dibiarkan semalam disertai pengadukan. 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 kental.

**Fraksinasi ekstrak metanol daun sirih merah.** Fraksinasi awal dilakukan secara partisi menggunakan pelarut metanol 60%. Sebanyak 10 mL metanol 60% ditambahkan pada 2 gram ekstrak, dicampur menggunakan *vortex mixer* kemudian disentrifus sehingga didapat fraksi larut metanol 60% (FTL) dan fraksi tak larut metanol 60% (FL). Kedua fraksi diuji aktivitas imunomodulasi secara *in vitro* dengan uji aktivitas fagositosis makrofag dengan *latex beads*. Fraksi yang memiliki aktivitas imunomodulasi difraksinasi lebih lanjut dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) / *vacuum liquid chromatography*<sup>(12)</sup>. Sebanyak 10 gram silika gel 60 ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam cawan porselen berisi 2 gram FTL yang ditetesi eter sedikit demi sedikit sehingga diperoleh campuran yang homogen dan kering (*free flowing*). Pembuatan kolom dilakukan dengan memasukkan

sebanyak 50 gram silika gel sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* sambil divakum untuk memperoleh massa fase diam yang kompak dan padat. Serbuk ekstrak *free flowing* dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam *sintered glass Buchner* di atas fase diam dengan permukaan atas diusahakan rata sambil divakum. Bagian atas ditutup dengan 2 lembar kertas saring sebesar diameter kolom. Fraksinasi dilakukan dengan menuang pelarut secara perlahan-lahan pada permukaan kertas saring sambil divakum. Pelarut yang digunakan berturut-turut *n*-heksana, *n*-heksana - etil asetat (9:1), *n*-heksana - etil asetat (8:2), *n*-heksana - etil asetat (7:3), *n*-heksana - etil asetat (6:4), *n*-heksana - etil asetat (5:5), *n*-heksana - etil asetat (4:6), *n*-heksana - etil asetat (3:7), *n*-heksana - etil asetat (2:8), *n*-heksana - etil asetat (1:9), dan etil asetat. Hasil fraksinasi ditampung dalam cawan porselen, setelah kering fraksi-fraksi yang didapat ditimbang, kandungan senyawa didalamnya diperiksa dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

#### Isolasi dan kultur sel makrofag peritoneal.

Mencit sebanyak 8 ekor dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Seluruh tubuh mencit dibersihkan dengan akohol 70%. Kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneum dengan alkohol 70%, kemudian disuntikkan 10 mL medium RPMI 1640 ke dalam rongga peritoneum, ditunggu sekitar 3 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan-lahan. Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diambil dengan spuit injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Aspirat yang didapat disentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, ditambahkan 3 mL medium RPMI komplit (mengandung FBS 10%) pada pellet yang didapat. Jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI komplit sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan  $2,5 \times 10^6$  /mL. Suspensi sel yang telah dihitung dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran 200  $\mu$ L ( $5 \times 10^5$  sel). Diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit. Medium RPMI komplit ditambahkan 1 mL/sumuran dan diinkubasi lagi selama dua jam. Sel dicuci dengan RPMI dua kali kemudian ditambahkan medium komplit 1 mL/sumuran, kemudian inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

**Uji aktivitas fagositosis.** *Latex beads* diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi  $2,5 \times 10^7$  /mL. Media diambil dengan cara menyedot media sehingga tinggal makrofag dalam *coverslips*. Pada tutup *plate* diberi identitas sesuai

bahan uji yang akan dimasukkan dalam sumur yang bersangkutan. Pada sumur ditambahkan masing-masing 1 mL bahan uji dalam media RPMI komplit, yakni ekstrak metanol *Piper crocatum* kadar 75  $\mu$ g/mL dan 150  $\mu$ g/mL, kontrol positif (Produk-X® 100  $\mu$ g/mL), kontrol media, dan kontrol pelarut (DMSO 0,15%), secara *triplo* (3 *coverslip*) kemudian diinkubasi selama 4 jam. Setelah 4 jam, suspensi latex beads ditambahkan dalam PBS, dimana latex beads dengan diameter 0.3  $\mu$ m sebanyak 400  $\mu$ L dengan kepadatan latex beads dalam  $2,5 \times 10^7$  /mL, kemudian inkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 60 menit. Media diambil dengan cara disedot dan dicuci dengan PBS tiga kali untuk menghilangkan latex beads yang tidak terfagositosis, kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Selanjutnya metanol dibuang dan ditunggu hingga kering kemudian dicat dengan Giemsa 20% selama 30 menit, kemudian dicuci dengan akuades sampai bersih (4-5 kali, akuades menjadi jernih) diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu ruangan. Makrofag yang memfagositosis partikel latex dihitung dengan cara diperiksa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x<sup>(13,14,15,16)</sup>, masing-masing pada 2 bidang pandang untuk setiap *coverslip*.

#### Skrining fitokimia ekstrak dan fraksi aktif.

Skrining fitokimia dilakukan secara uji tabung<sup>(17)</sup> serta KLT<sup>(18)</sup> digunakan untuk uji kualitatif terhadap ekstrak dan fraksi aktif.

**Identifikasi flavonoid.** Ekstrak dilarutkan dalam metanol 50% panas, kemudian ditambahkan logam Mg dan HCl pekat (45 tetes). Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

**Identifikasi tanin.** Ekstrak metanol (0.5-1 mL) dilarutkan dalam air (1-2 mL) kemudian ditambahkan larutan besi III klorida (FeCl<sub>3</sub>) (kuning cerah, 2-3 tetes). Timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol. Secara KLT dengan silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam, *n*-butanol - asam asetat - air (4:1:5 v/v/v) sebagai fase gerak, adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> menunjukkan adanya tanin.

**Identifikasi alkaloid.** Ekstrak metanol (20 mL) ditambah asam hidroklorida 10% (5-10 mL) kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung, 1 tabung ditetesi 2-3 tetes reagen Mayer's atau Bertrand's, 1 tabung sebagai pembanding. Endapan berwarna kuning keputihan menunjukkan keberadaan alkaloid. Secara KLT dengan silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam,

n-heksana-dietilamin (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau kuning pada sinar UV 365 nm setelah kromatogram disemprot dengan pereaksi Dragendrof.

**Identifikasi saponin.** Ekstrak diletakkan dalam tabung reaksi dan ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 5 menit. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin. Kemudian ekstrak ditambah 0,5 mL asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 1-2 mL asam sulfat, akan terbentuk 2 lapisan, cincin berwarna coklat kemerahan atau coklat ungu. Secara KLT dengan silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam, n-butanol - asam asetat - air (4:1:5 v/v/v) sebagai fase gerak, adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot pereaksi Lieberman Burchard.

**Identifikasi sterol dan triterpenoid.** Pada ekstrak ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform dan dengan pipet sebanyak 1-2 mL asam sulfat, akan terbentuk 2 lapisan, bila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan kedua larutan menunjukkan adanya triterpenoid, warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol. Secara KLT dengan silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam, n-heksana - etil asetat (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat, pada sinar tampak setelah kromatogram disemprot dengan serum sulfat kemudian dipanaskan 110°C menunjukkan adanya terpenoid.

**Identifikasi kumarin.** Ekstrak dibagi 2 tabung, pada tabung 1 ditambah 0,5 mL larutan ammonia 10%, tabung 2 untuk pembanding. Terjadinya warna biru atau hijau yang berfluoresensi pada lampu UV, menunjukkan keberadaan kumarin. Secara KLT dengan silika gel GF<sub>254</sub> sebagai fase diam, etil asetat - toluena (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya kumarin ditunjukkan dengan terbentuknya pendar biru pada sinar UV 265 nm setelah kromatogram disemprot dengan kalium hidroksida.

**Identifikasi adanya flavonoid.** Ekstrak dilarutkan dalam metanol 50% (1-2 mL), dengan pemanasan kemudian ditambahkan logam Mg dan 5-6 tetes asam hidroklorida, larutan akan menjadi merah untuk flavonol dan oranye untuk flavanon. Secara KLT dengan selulose sebagai fase diam, etil asetat : toluena (9:1 v/v) sebagai fase gerak, adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning pada sinar tampak, pemataman pada sinar UV 254 nm, dan warna hitam, kuning, biru atau hijau pada sinar UV 365 nm setelah kromatogram diuji amonia.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan tanaman yang dikenal dengan nama sirih merah tersebut merupakan spesies dengan nama ilmiah *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol terhadap 1,9 kg serbuk daun sirih merah yang berasal dari pengeringan 8,26 kg daun basah menghasilkan ekstrak berupa massa kental berwarna hitam sebanyak 224,03 g. Rendemen serbuk terhadap daun basah sebesar 23%, rendemen ekstrak terhadap daun basah sebesar 2,7%, dan rendemen ekstrak terhadap serbuk sebesar 11,8%. Meskipun maserasi tidak menghasilkan ekstraksi yang komplit<sup>(19)</sup>, akan tetapi banyak penelitian memilih menggunakan metode ini karena maserasi merupakan prosedur sederhana untuk mendapatkan ekstrak, cocok untuk skala kecil maupun industrial, pengulangan proses perendaman merupakan upaya untuk mendapatkan sebanyak mungkin senyawa yang terekstraksi. Pemilihan jenis dan jumlah pelarut juga sangat menentukan jenis dan jumlah senyawa yang terekstraksi, hal ini sesuai dengan pernyataan Samuelsson<sup>(19)</sup> yakni bahwa senyawa dalam tanaman biasanya berada di dalam sel, pelarut harus dapat berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan molekul senyawa yang diinginkan kemudian dengan arah berlawanan melewati dinding sel dan bercampur dengan cairan di sekelilingnya. Keseimbangan akan terjadi antara senyawa terlarut di dalam sel dengan pelarut di sekitar jaringan tanaman, dimana kecepatan keseimbangan tersebut dipengaruhi oleh suhu, pH, ukuran partikel, dan gerakan dari pelarut. Penelitian ini dilakukan pada suhu kamar, karena diharapkan senyawa yang tidak tahan pemanasan tidak rusak oleh adanya pemanasan, efektivitas ekstraksi juga dioptimalkan dengan pengadukan.

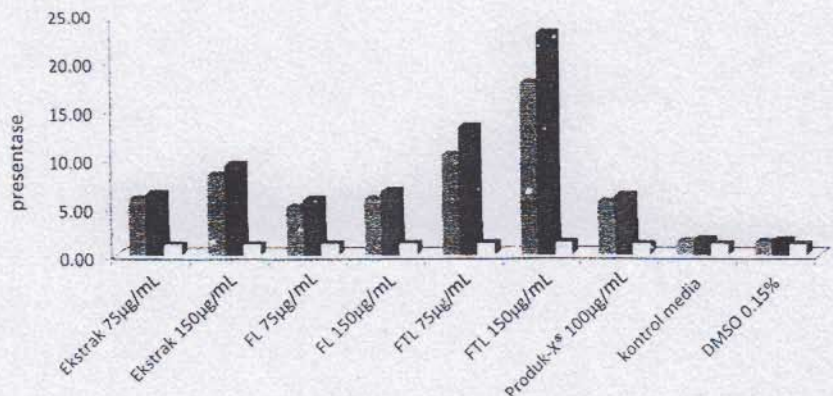
Anatomi daun sirih (*Piper betle*) dan daun sirih merah mirip, sedikit perbedaan yakni pada bagian atas vascular bundle *P. betle* dijumpai adanya sel-sel kolenkim sedangkan pada *P. crocatum* tidak dijumpai. Irisan melintang daun ke dua spesies sirih di atas teramati adanya saluran yang dihasilkan dari robekan-robekan sel, saluran tersebut berfungsi sebagai saluran minyak, selain itu juga terdapat sel-sel sekretori, sehingga kedua daun tersebut dapat digunakan sebagai bahan obat<sup>(20)</sup>. Ekstrak metanol *Piper betle* dilaporkan memiliki daya imunomodulator<sup>(5)</sup>, daun sirih merah merupakan tanaman dalam genus yang sama yakni Piperaceae, oleh karena itu digunakan metanol sebagai pelarut dengan harapan senyawa yang terekstraksi memiliki aktivitas yang sejenis.

Makrofag merupakan sel fagositik utama yang berperan menangkal serangan patogen melalui mekanisme fagositosis, berperan penting baik pada respon imun bawaan maupun respon imun adaptif. Kemampuan fagositosis makrofag dapat diukur dari kemampuannya dalam memfagositosis partikel lateks. Aktivitas fagositosis dinyatakan dalam 3 parameter yakni Persen Fagositosis (PF), Indeks fagositosis (IF), dan Efisiensi Fagositosis (EF)<sup>(21)</sup>. Persen fagositosis adalah persen sel yang makan minimal 1 lateks yakni jumlah makrofag pada 2 bidang pandang yang makan minimal 1 lateks dibagi jumlah makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan 100%. IF adalah jumlah lateks yang dimakan oleh makrofag pada 2 bidang pandang dikalikan 100 dibagi jumlah makrofag pada 2 bidang pandang, dan EF adalah rasio antara IF dan PF. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit dan analisis varian satu jalan menunjukkan perbedaan signifikan pada parameter PF dan IF, tetapi tidak signifikan untuk parameter EF baik pada uji ekstrak metanol daun sirih merah maupun pada uji fraksi-fraksi hasil KCV, sehingga uji Tukey dilakukan hanya untuk parameter EF dan IF. Fraksi tak larut metanol 60% dari ekstrak metanol daun sirih merah (FTL) menunjukkan aktivitas fagositosis makrofag lebih besar dibandingkan ekstrak metanol daun sirih merah, fraksi larut metanol 60% dari ekstrak metanol daun sirih merah (FL), kontrol media, kontrol pelarut, maupun kontrol positif oleh karena itu fraksinasi lebih lanjut dilakukan terhadap FTL. Uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan FTL 150 µg/mL menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag yang berbeda secara signifikan dibandingkan perlakuan dengan FTL 75 µg/mL, FL 75 µg/mL FL 150 µg/mL, kontrol media, kontrol pelarut (DMSO 0.15%), maupun kontrol positif (produk-X<sup>®</sup> 100 µg/mL). Oleh karena itu uji aktivitas

fagositosis fraksi-fraksi dari FTL diuji pada kadar 150 µg/mL. Produk-X<sup>®</sup> merupakan produk komersial yang mengandung 250 mg ekstrak *Echinacea*, kemampuan ekstrak *Echinacea* dalam meningkatkan fagositosis telah dilaporkan oleh Bauer<sup>(2)</sup>. Kenaikan dosis ekstrak, FL maupun FTL menjadi 2 kali lipat, tidak menunjukkan adanya kenaikan yang sebanding baik untuk parameter PF maupun IF.

Fraksinasi dari FTL dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) menghasilkan 11 fraksi. Berdasar kemiripan profil KLT, fraksi-fraksi tersebut digabung menjadi 5 fraksi. Jumlah fraksi yang terbanyak berturut-turut adalah fraksi III, fraksi IV, fraksi II, fraksi V, fraksi I. Dari tiga kali fraksinasi masing-masing sebanyak 2 gram FTL, berturut-turut menghasilkan 0,41 g, 0,49 g, dan 0,49 g fraksi II (F-II), atau rendemen F-II terhadap FTL sebesar 23.17%.

Hasil uji fagositosis makrofag secara *in vitro* terhadap F-I sampai F-V pada dosis 150 µg/mL menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag tertinggi pada perlakuan dengan F-II. Oleh karena itu F-II merupakan fraksi yang paling potensial dilanjutkan untuk isolasi senyawa imunomodulator. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL menyebabkan aktivitas fagositosis makrofag untuk parameter PF yang berbeda secara signifikan dengan kontrol media dan kontrol pelarut akan tetapi tidak signifikan dengan perlakuan kontrol positif (produk-X<sup>®</sup> 150 µg/mL). Hal ini menunjukkan bahwa uji fagositosis makrofag secara *in vitro* menggunakan mencit BALB/c, perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL dan produk-X<sup>®</sup> 150 µg/mL menyebabkan PF yang sama. Untuk parameter IF, perlakuan dengan F-II dosis 150 µg/mL menunjukkan nilai yang lebih tinggi secara signifikan dibanding perlakuan dengan produk-X<sup>®</sup> 150 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa F-II dosis



Gambar 1. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Keterangan: ■: persen fagositosis, ■: indeks fagositosis, □: efisiensi fagositosis, Ekstrak: ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav, FL : ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. yang larut dalam metanol 60%, FTL: ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. yang tidak larut dalam metanol 60%.

Tabel 1. Penggabungan fraksi berdasar hasil uji KLT fraksi-fraksi hasil KCV ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav.

Jenis	Pelarut		Fraksi awal	Jumlah (g)	Fraksi sesudah penggabungan
		Volume (mL)			
<i>n</i> -heksana		180	1	0,14	
<i>n</i> -heksana:etilasetat (9:1)		120	2	0,08	Fraksi I
<i>n</i> -heksana:etilasetat (8:2)		120	3	0,41	Fraksi II
<i>n</i> -heksana:etilasetat (7:3)		70	4	0,27	
<i>n</i> -heksana:etilasetat (6:4)		90	5	0,13	Fraksi III
<i>n</i> -heksana:etilasetat (5:5)		60	6	0,08	
<i>n</i> -heksana:etilasetat (4:6)		60	7	0,14	Fraksi IV
<i>n</i> -heksana:etilasetat (3:7)		90	8	0,17	
<i>n</i> -heksana:etilasetat (2:8)		120	9	0,10	
<i>n</i> -heksana:etilasetat (1:9)		120	10	0,08	Fraksi V
Etil asetat		120	11	0,11	

150 µg/mL mengaktifkan sejumlah makrofag yang sama banyak tetapi lebih banyak jumlah *latex* yang dimakan dibandingkan perlakuan dengan produk-X® dosis 150 µg/mL.

Skrining fitokimia berupa uji tabung serta uji kualitatif secara KLT dari ekstrak dan fraksi II menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun sirih merah mengandung minyak atsiri, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, sedangkan fraksi II mengandung alkaloid dan terpenoid. Uji tabung merupakan cara uji sederhana terhadap keberadaan metabolit sekunder pada bahan uji. Uji awal ini dipertegas dengan uji kualitatif secara KLT. Hasil uji tabung keberadaan alkaloid dan flavonoid tidak terdeteksi akan tetapi terdeteksi dengan uji secara KLT. Hasil ini serupa baik pada ekstrak maupun fraksi, maka disimpulkan bahwa alkaloid dan flavonoid terdeteksi baik pada ekstrak maupun fraksi II. Fraksi II merupakan fraksi paling tinggi aktivitas imunomodulasinya, kemungkinan alkaloid dan atau terpenoid merupakan metabolit sekunder yang bertanggung jawab terhadap peningkatan aktivitas fagositosis makrofag.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh dosis terhadap aktivitas fagositosis juga jenis serta mekanisme aksi senyawa yang bertanggung

Tabel 2. Hasil uji tabung dan uji KLT terhadap ekstrak dan fraksi II.

Jenis skrining	Ekstrak		Fraksi II	
	Uji tabung	Uji KLT	Uji tabung	Uji KLT
Minyak atsiri	+	Tidak dilakukan	-	Tidak dilakukan
Tanin	+	-	-	-
Alkaloid	-	+	-	+
Saponin	-	-	-	-
Terpenoid	-	+	-	+
Kumarin	-	-	-	-
Flavonoid	-	+	-	-

Keterangan: + = metabolit sekunder terdeteksi, - = metabolit sekunder tidak terdeteksi.



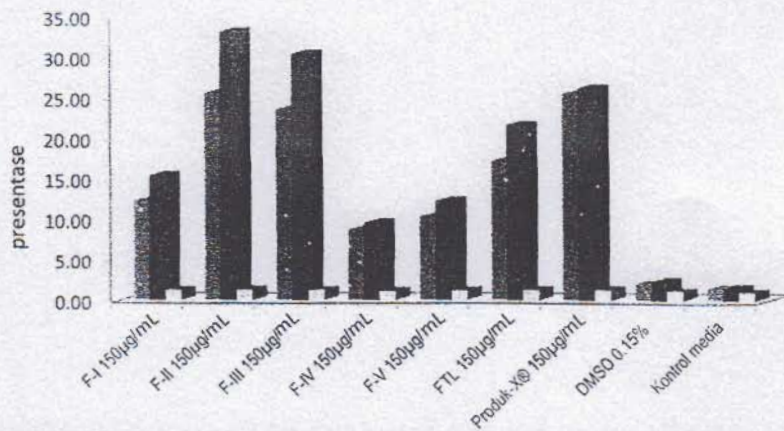
Gambar 2. Kromatogram dari kiri ke kanan FTL, Fraksi (F)-I, F-II, F-III, F-IV, dan F-V hasil kromatografi cair vakum, fase diam silika gel GF<sub>254</sub>, fase gerak *n*-heksana : etil asetat (5:1), deteksi UV 366 nm.

jawab terhadap aktivitas tersebut. Penelitian tentang peningkatan aktivitas fagositosis makrofag karena pemberian ekstrak daun sirih merah ini merupakan penelitian awal dari *bioassay guided isolation* senyawa imunomodulator dari daun sirih merah. Hasil uji daya imunomodulator secara *in vitro* tidak ada korelasi dengan uji *in vivo*<sup>(1)</sup>, maka perlu juga diteliti lebih lanjut secara *in vivo*.

## SIMPULAN

Uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa fraksi hasil kromatografi cair vakum dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Fraksi II hasil kromatografi cair vakum dari fraksi tak larut metanol





Gambar 3. Hasil uji aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* dari fraksi-fraksi hasil KCV pada dosis 150 µg/mL. Keterangan: ■: persen fagositosis, ■: indeks fagositosis, □: efisiensi fagositosis.

60 % merupakan fraksi paling potensial untuk isolasi senyawa imunomodulator dari ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Ekstrak metanol daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav. mengandung minyak atsiri, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, sedangkan fraksi II hasil pemisahan secara kromatografi kolom vakum mengandung alkaloid dan terpenoid.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Wagner H, Kraus S, Jurcic K. Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources, In: Wagner H, editor. Immunomodulatory agents from plants. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999. 1-40.
- Wagner H, Kraus S, Jurcic K. Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals. In: Wagner H, editor. Immunomodulatory agents from plants. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999. 41-89.
- Alamgir M and Uddin SK. Recent advances on the ethnomedicinal plants as immunomodulatory agents. *Ethnomedicine*. 2010. 3:227-44.
- Kumar S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Integrative Medicine*. 2011. 9:1-18.
- Kanjwani DG, Marathe TP, Chipunkar SV, Fan Sathaye SS. Evaluation of immunomodulatory activity of metanolic extract of *Piper betel*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2008. 67: 589-93.
- Sunila ES and Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. 90:339-46.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, et al. Phytochemistry of genus *Piper*. *Phytochemistry*. 1997. 46:597-673.
- Manoi F. Sirih Merah sebagai tanaman obat multi fungsi. *Warta Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan*. 2007. 13:2-6.
- Wicaksono BD, Handoko YA, Arung ET, Kusuma IW, Yulia D, Pancaputra AN, et al. Antiproliferative effect of metanol extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav leaves on human breast (T47D) cells *in vitro*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009. 8:345-52.
- Suratmo. Aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) [tesis]. Yogyakarta: Prodi Ilmu Kimia Program Pascasarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada; 2008.
- Ponkshe CA and Indap MM. *In vivo* and *in vitro* evaluation for immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2002. 40:1399-400.
- Coll JC and Bowden BF. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J Nat Prod*. 1986. 49:934-36.
- Leijh PCJ, Furth RV, Van Zwet TL. *In vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir DM, editor. Cellular immunology. 4<sup>th</sup> Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986.
- Wijanarko H. Aktivitas phalerin hasil isolasi dari daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) sebagai pemacu fagositosis makrofag dan antitardikal *in vitro* [tesis]. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada; 2005.
- Wahyuniari IAI. Pengaruh pemberian minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamp) pada respon imun seluler setelah infeksi *Listeria monocytogenes* [tesis]. Yogyakarta: Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada; 2006.
- Derre I, Isberg RR. Macrophages from mice with the restrictive Icn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun*. 2004. 72(11):6221-9.
- Ciulei J. Methodology for analysis of vegetables and drugs. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy; 1981. 11-26.
- Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. Plant drug analysis, A thin layer chromatography atlas. Berlin Heidelberg: Springer; 1984. 346-9, 42-4.

19. Samuelsson G. *Drugs of natural origin*. 4<sup>th</sup> Ed. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press; 1999.
20. Sutikno, Nugroho LH, Yuliati IR, Priyono Y. *Anatomi dan profil minyak atsiri akar, batang dan daun sepuluh spesies genus piper koleksi Kebun Raya Bogor*. [laporan Penelitian]. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada; 2011.
21. Sanchez S, Paredes SD, Sanchez CL, Barriga C, Reiter RJ, Rodriguez AB. Tryptophan administration in rats enhances phagocytic function and reduces oxidative metabolism. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008. 29(6):1026-32.

**PUBLIKASI 6**

In-vivo Immunomodulatory Effect and Histopathological Features of  
Mice Liver and Kidney Two Neolignans Isolated from Red Betel  
(*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA

**PUBLIKASI 7**

The Effect of Crocatidin and Deacetyl Crocatidin Isolated from Red Betel  
(*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Leave on Mice Antibody Titre



oleh:

Yustina Sri Hartini  
10/306420/SFA/00049

PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS GADJAH MADA  
YOGYAKARTA



c/o Faculty of Pharmacy  
University of Benin  
Benin City 300001, Nigeria

Email: [editor@tjpr.org](mailto:editor@tjpr.org)  
Tel: +234-(0)8181266737  
Fax: +27865213270  
<http://www.tjpr.org>

July 2, 2014

Dr Yustina Sri Hartini  
Faculty of Pharmacy  
Sanata Dharma University  
Paiangan Maguwoharjo Depok Sleman Yogyakarta, Indonesia

Dear Dr Hartini:

**RE: MANUSCRIPT TITLED "IN-VIVO IMMUNOMODULATORY EFFECT AND HISTOPATHOLOGICAL FEATURES OF MICE LIVER AND KIDNEY GIVEN TWO NEOLIGNANS ISOLATED FROM RED BETEL (PIPER CROCATUM RUIZ & PAV.)"**

Your manuscript sent to TJPR has been duly reviewed and recommended for publication subject to your satisfactorily attending to the issues raised by the reviewer. The review comments are annotated directly on the reviewed manuscript which is attached here.

Please act promptly and let me have the revised manuscript as an email attachment as soon as possible. **Indicate clearly, in an itemized format in a separate document, how the issues raised by the reviewers were addressed.** Also revise your manuscript in line with the corrections (including punctuations, etc) indicated in red font and the comments annotated directly on your reviewed manuscript. **Ensure you leave the review 'Comments' on the right margin intact.** To assist you in this regard, do **exactly** the following:

**Open the reviewed manuscript we sent to you. On the menu bar, click on 'Tools'/'Review' and then 'Track changes'. On the next menu bar below, look for a tab where you have 'Accept' or a 'good' (✓) sign or symbol. Click on the drop arrow beside it, and click on the option 'Accept all changes in Document'. This will change all the red fonts in the reviewed manuscript to black and automatically incorporate all the corrections we directly effected on the reviewed manuscript. Note that before you do this, first save a copy of the reviewed manuscript under a different file name as you will need it to help you effect other revisions required. Further revisions required should be made on the copy from which you have removed the annotations as described above. Leave your own revisions in red font.**

**Note** that failure to revise your manuscript **exactly** as indicated above may result in a delay in its publication and, possibly, rejection.

We look forward to hearing from you soon.

Sincerely,

Professor AO Okhamafe



# CERTIFICATE

This is to certify that

**YUSTINA SRI HARTINI**

has participated in

The 46th Symposium of National Working Group of Indonesia Medicinal Plant  
International Symposium on Medicinal Plant and Traditional Medicine  
Theme: Indonesia Traditional Medicine for Human Welfare  
4 - 6 June 2014, Tawangmangu, Indonesia, as:

**ORAL PRESENTER**

Secretary General,  
National Working Group of Indonesia Medicinal Plant

Indah Yuning Prapti, MPH

Director General,  
National Institute of Health Research and Development,  
Ministry of Health Republic of Indonesia

Prof. dr. Tjandra Yoga Aditama, Sp.P(K)., DTM&H., MARS., DTCE.





Tawangmangu, May 20, 2014

Mrs Yustina Sri Hartini  
Faculty of Pharmacy, Sanata Dharma University  
[yustinahartini@yahoo.com](mailto:yustinahartini@yahoo.com)

Subject: Letter of Acceptance for Oral Presentation

Dear Mrs Yustina Sri Hartini,


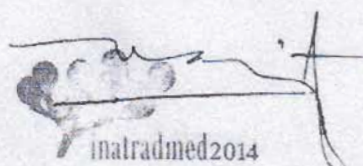
We are pleased to inform you that your submitted abstract has been accepted to be presented in International Symposium on Medicinal Plant and Traditional Medicine "Indonesia Traditional Medicine for Human Welfare".

Abstract Title : THE EFFECT OF CROCATIN AND DEASETIL CROCATIN ISOLATED FROM RED BETEL (*Piper crocatum* Ruiz & pav.) LEAVE ON MICE ANTIBODY TITRE  
Authors : Yustina Sri Hartini, Subagus Wahyuono, Sitarina Widyarini, and Agustinus Yusranto

We also invite you to submit your full paper for ISBN Proceeding. If you want to send a full-paper, please send it before May 30<sup>th</sup>, 2014.

The committee would like to thank you for your participation and look forward to seeing you in Tawangmangu.

Sincerely yours,

Nagiot Cansalony Tambunan  
Chairman