

LAPORAN AKHIR  
PROGRAM PENELITIAN  
DIPA FARMASI UNAND



UJI AKTIVITAS IMUNOMODULATOR EKSTRAK ETANOL  
DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) TERHADAP MENYIT  
PUTIH JANTAN DENGAN METODA *CARBON CLEARANCE*

OLEH

Dr. Yufri Aldi, M.Si, Apt  
Atikah Riani

(KETUA)  
(Anggota)

FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG


2014

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Terhadap Mencit Putih Jantan Dengan Metoda Carbon Clearance
2. Bidang Ilmu : Farmasi
3. Ketua Peneliti :  
Nama Lengkap : Dr. Yufri Aldi, M.Si., Apt
  - a. Jenis Kelamin : Laki-Laki
  - b. NIP : 196511231991031002
  - c. Disiplin ilmu : Imunologi dan Serologi
  - d. Pangkat/Golongan : Lektor Kepala/IV-b
  - e. Jabatan : Ketua Prodi Apoteker
  - f. Fakultas/Jurusan : Farmasi
  - g. Alamat : Kampus limau Manis, Padang
  - h. Telepon/Faks/E-mail :
  - i. Alamat Rumah : Komp. Villa Bukit Berlindo Blok B 8 Gunung Pangilun
  - j. Telepon/Faks/E-mail : 0751-7859624
4. Mata kuliah yang Diampu : Imunologi dan Serologi
5. Penelitian Terakhir : -
6. Anggota Peneliti : Atikah Riani
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Biota Sumatera
8. Sumber Dana : DIPA Fakultas Farmasi
9. No. Kontrak : 001/H.16.11/PL-1/DM-DIPA/VI/2014
10. Tanggal Kontrak : 30 Mei 2014
8. Jumlah Biaya : Rp. 5.000.000,-

Padang, 20 November 2014

Ketua Peneliti,

  
Dr. Yufri Aldi, M.Si., Apt  
NIP. 196511231991031002



Mengetahui  
Dekan Fakultas Farmasi

  
Dr. Helmi Arifin, MS, Apt  
NIP. 195411221985031002

## RINGKASAN

Penelitian tentang uji aktivitas imunomodulator ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) telah dilakukan pada mencit putih jantan dengan metoda *carbon clearance*. Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) merupakan salah satu keanekaragaman hayati Indonesia yang mempunyai khasiat sebagai imunomodulator, sejak lama telah digunakan masyarakat untuk mempertahankan sistem imun tubuh. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metoda *carbon clearance* untuk mengukur aktivitas sel-sel fagosit dalam membunuh organisme patogen yang masuk kedalam tubuh. Dosis uji ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang digunakan 10mg/KgBB; 30mg/KgBB; 100mg/KgBB dan Na CMC 0,5% sebagai kontrol negatif yang diberikan secara oral selama enam hari. Setelah enam hari karbon diinjeksikan secara intravena pada mencit putih jantan dengan menghitung jumlah bersihan karbon yang masih tertinggal. Jika nilai indeks fagositosis (IF)  $< 1$  mempunyai aktivitas immunosupresan dan jika IF  $> 1$  mempunyai aktivitas immunostimulan. Semakin tinggi dosis ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diberikan semakin meningkatkan aktivitas fagositosis yang dihasilkan, dapat dilihat dari nilai indeks fagositosis, bobot limfa relatif, dan jumlah sel limfosit. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) mempunyai kemampuan aktivitas imunomodulator yaitu sebagai immunostimulan.

## PRAKATA

Alhamdulillah, penulis telah berhasil menyelesaikan beberapa tahap penelitian DIPA Farmasi Unand ini, sehingga dapat dibuat laporan kemajuannya sebagaimana tertulis di bawah ini.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui aktivitas imunomodulator ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) terhadap mencit putih jantan dengan Metoda *Carbon Clearance*. Dengan adanya hasil penelitian ini diharapkan bisa meningkatkan penggunaan daun sirih merah dari penggunaan tradisional menjadi sediaan fitofarmaka, sehingga nantinya bisa dijadikan salah satu obat alternatif untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh.

Akhirnya, dengan segala kekurangan, peneliti berharap kiranya ada saran-saran untuk penyempurnaan penelitian ini.

Padang, November 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

### PENDAHULUAN

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	28
BAB 4 METODE PENELITIAN	29
BAB 5 HASIL YANG DICAPAI	40
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN-LAMPIRAN	58

## BAB I PENDAHULUAN

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk melindungi dan mempertahankan keutuhan tubuh. Dikatakan pula bahwa imunomodulator terutama dibutuhkan untuk kondisi dimana sistem imun akan mempengaruhi pasien dan penyebaran penyakit, seperti kasus adjuvan yang melibatkan infeksi bakteri, fungi atau virus (Tjandrawinata, 2005).

Sistem imun terdiri dari dua respon imun yaitu respon imun non-spesifik adalah respon imun alamiah yang telah ada sejak lahir dan respon imun spesifik adalah respon imun buatan atau adaptif seperti vaksin (Baratawidjaja, 2009).

Setiap manusia mempunyai sistem pertahanan tubuh yang lengkap untuk menghadapi serangan organisme patogen. Akan tetapi, munculnya manifestasi penyakit pada seorang individu tidak hanya dipengaruhi oleh organisme patogen tersebut. Proses munculnya manifestasi penyakit dipengaruhi oleh sistem pertahanan tubuh yang lemah. Ketika sistem pertahanan tubuh berfungsi secara maksimal, paparan unsur patogen tidak sampai menimbulkan penyakit. Namun, dengan melemahnya imunitas tubuh, paparan ringan dapat menimbulkan penyakit, terlebih jika terjadi serangan agen infeksi yang ganas (Kresno, 2007).

Dalam upaya meningkatkan sistem imunitas tersebut, masyarakat masih banyak memanfaatkan obat-obatan tradisional yang berasal dari tanaman karena tidak mempunyai efek samping seperti bahan kimia atau sintesis (Sumaryono, 2002). Perkembangan penggunaan obat-obatan tradisional khususnya dari tumbuh-tumbuhan untuk membantu meningkatkan derajat kesehatan masyarakat

sudah cukup meluas. Secara empiris masyarakat memanfaatkan tumbuhan tersebut sebagai obat, akan tetapi masyarakat masih belum banyak yang mengetahui kandungan zat aktif apa saja yang terkandung di dalam tanaman tersebut dan yang berkhasiat sebagai imunomodulator, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang efek farmakologinya.

Keanekaragaman hayati Indonesia sangat berpotensi dalam penemuan senyawa baru yang berkhasiat sebagai imunomodulator. Salah satunya adalah Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sejak lama telah digunakan masyarakat untuk mempertahankan kekebalan tubuh (Mulyanto, 2003). Kandungan kimia yang terdapat pada tanaman sirih merah mengandung metabolit sekunder yang menyimpan senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, minyak atsiri, saponin, hidroksikaficol, kavicol, kavibetol, karbavakrol, cyanogenic, eugenol, cineole, kadimen, glucoside, isoprenoid, non-protein amino acid, terpenena, dan fenil propada (Amalia, 2002; Mulyanto, 2003; Sudewo, 2010).

Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai imunomodulator. Metoda pengujian yang digunakan untuk mengetahui peningkatan aktivitas imunomodulator tersebut adalah metoda *carbon clearance* dengan mengukur aktivitas sel-sel fagosit untuk membunuh organisme patogen yang masuk kedalam tubuh.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan botani tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Klasifikasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Piperales
Family	: Piperaceae
Genus	: <i>Piper</i>
Spesies	: <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav. (Backer, 1963).
Kerabat Dekat	: Kiseureuh, Sirih, Sirih hutan, Kemekes, Kemukus, Mricot lolot, Lada, Cabe jawa, Cabean, Daun wati (Sudewo, 2010).

#### 2.2 Morfologi tumbuhan sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Daunnya berwarna hijau dengan semburat pink. Daun berbentuk seperti jantung hati, bagian ujung meruncing, mengkilat dan tidak merata, tepinya rata, permukaan mengkilap, tidak berbulu dan bila daunnya dirobek maka akan mengeluarkan lendir, terasa pahit dan aromanya lebih wangi. Panjang daunnya kurang lebih 15 - 20 cm. Warna daun pada bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan, sedangkan bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Batang



berwarna hijau agak kemerahan dan permukaan kulitnya berkerut. Batang bersulur dan beruas dengan jarak buku 5 - 10 cm. Bakal akar tumbuh di setiap buku batang (Sudewo, 2010).

Tanaman sirih merah dapat tumbuh di tempat teduh, berhawa sejuk dengan sinar matahari 60-75%, dapat tumbuh subur dan bagus di daerah pegunungan. Bila tumbuh pada daerah panas, sinar matahari langsung, batangnya cepat mengering. Selain itu, warna merah daunnya akan pudar (Manoi, 2007)

### **2.3 Kandungan kimia dan kegunaan tradisional**

Di dalam daun sirih merah terkandung senyawa-senyawa aktif antara lain alkaloid, flavonoid, polifenolad, tannin, dan minyak atsiri.

1. Alkaloid adalah kelompok besar senyawa organik alami dalam hampir semua jenis organisme berbagai efek farmakologi yang ditimbulkan seperti antikanker, antiinflamasi dan antimikroba. Alkaloid bersifat basa, di alam berada sebagai garam dengan asam-asam organik. Adanya sifat basa ini mempermudah memisahkan ekstrak total alkaloid dari komponen lainnya (Harborne, 1987). Alkaloid berdasarkan jenis cincin heterosiklik nitrogennya diklasifikasikan menjadi lima macam yaitu piroolidin, piperidin, isokuinolin, kuinolin dan indol.
2. Flavonoid adalah kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Harborne, 1987).

3. Saponin adalah glikosida yang membentuk busa dalam air. Apabila dihidrolisis dengan asam akan menghasilkan gula dan saponin yang sesuai, saponin merupakan senyawa kimia aktif permukaan yang dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987).
4. Polifenolad merupakan senyawa fenol yang memiliki gugus -OH. Senyawa polifenol ini adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih efektif dibandingkan vitamin E.
5. Tannin adalah senyawa fenol yang terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Menurut batasannya, tannin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Dalam industri, tannin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung silang protein (Harborne, 1987).
6. Minyak atsiri, Menurut Achmad dalam Fitriani (1999) sejak dahulu orang mengetahui bahwa bunga, daun dan akar dari berbagai tumbuhan mengandung bahan yang mudah menguap dan berbau wangi yang disebut minyak atsiri. Minyak atsiri pada sirih merah ini berfungsi sebagai antiradang dan antiseptik.

Kegunaan sirih merah di lingkungan masyarakat dalam menyembuhkan Beberapa penyakit seperti, diabetes melitus, jantung koroner, TBC (tuberkulosis), asam urat, kanker payudara, kanker darah (leukemia), ambeien, penyakit ginjal,

impotensi, eksim atau eksema atau dermatitis, gatal-gatal, luka bernanah yang sulit sembuh, karies gigi, batuk, radang pada mata, radang pada gusi dan telinga, radang prostat, hepatitis, hipertensi, keputihan kronis, demam berdarah dengue (DBD), penambah nafsu makan, penyakit kelamin (gonorrhea, sifilis, herpes, hingga HIV/AIDS), sebagai obat kumur dan luar, dan manfaat bagi kecantikan (lulur, masker, penuaan dini, penghalus kulit, dan lain-lain) (Amalia, 2002).

#### **2.4 Distribusi dan cara budidaya daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)**

Sirih merah merupakan tanaman yang diketahui tumbuh di berbagai daerah di Indonesia, seperti di lingkungan Keraton Yogyakarta dan di lereng Merapi sebelah timur, serta di Papua dan Jawa Barat. Sirih merah bisa tumbuh dengan baik di tempat yang teduh dan tidak terlalu banyak terkena sinar matahari. Jika terkena sinar matahari langsung secara terus-menerus warna merah daunnya bisa menjadi pudar dan kurang menarik (Sudewo, 2010).

Daun sirih merah yang memenuhi syarat untuk dipanen adalah daun yang sudah berumur lebih dari satu bulan. Pada umur ini ketebalan dan lebar daun sudah memenuhi syarat untuk dipanen. Jika umurnya kurang dari satu bulan, daun sirih merah masih tipis, cepat layu dan aromanya belum kuat. Kandungan zat kimianya pun belum maksimal, sehingga daya penyembuhannya tidak sebaik daun yang sudah berumur satu bulan atau lebih. Waktu yang tepat memetik atau memanen daun sebaiknya dilakukan pada pagi hari sampai dengan jam 11.00 (Sudewo, 2010).

## 2.5 Imunologi

### 2.5.1 Pengertian Sistem Imun

Sistem imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk mempertahankan tubuh sebagai pelindung terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan.

Imunitas atau kekebalan adalah pertahanan tubuh terhadap senyawa makromolekul ataupun mikroorganisme asing yang masuk ke dalam tubuh. Zat asing yang masuk tersebut dapat berupa debu, serangga, polen, virus, bakteri, protozoa, ataupun parasit lainnya. Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam pertahanan tubuh disebut sistem imun. Reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap benda asing atau antigen yang masuk ke dalam tubuh disebut respon imun. Respon imun mencakup semua mekanisme fisiologis dalam mengenal benda-benda asing, untuk kemudian disisihkan dan dimetabolisme dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri. Tidak semua mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan infeksi, karena sistem kekebalan tubuh pada umumnya mampu mengeliminasi mikroorganisme sebelum berkembang menjadi penyakit (Baratawidjaja, 2009; Radji, 2010).

Untuk melaksanakan fungsi imunitas, didalam tubuh terdapat suatu sistem yang disebut sistem limforetikular. Sistem ini merupakan jaringan atau kumpulan sel yang letaknya tersebar di seluruh tubuh, misalnya di dalam sumsum tulang, kelenjar limfe, limpa, thymus, sistem saluran nafas, saluran cerna dan organ-organ lain. Jaringan ini dapat membedakan zat asing dengan zat yang berasal dari tubuh

sendiri. Jaringan ini terdiri dari bermacam-macam sel yang dapat menunjukkan respon terhadap suatu rangsangan. Rangsangan terhadap sel-sel tersebut terjadi apabila kedalam tubuh masuk suatu zat yang oleh sel atau jaringan dianggap asing (Kresno, 2007).

Bila sistem imun terpapar zat yang dianggap benda asing, maka ada dua jenis respon imun yang mungkin terjadi yaitu respon imun non-spesifik dan respon imun spesifik. Respon imun non-spesifik (*innate immunity*) tidak ditujukan terhadap zat asing tertentu dan dapat memberikan respon imun langsung walaupun zat asing tersebut tidak pernah terpapar sebelumnya. Sedangkan respon imun spesifik (*adaptive immunity*) merupakan respon imun yang timbul terhadap zat asing tertentu yang telah dikenal karena telah terpapar sebelumnya (Mackinnon, 1999; Baratawidjaja, 2009).

## **2.5.2 Jenis-jenis Sistem Imun**

### **2.5.2.1 Sistem Imun non-spesifik**

Imunitas non-spesifik ditemukan pada individu sehat yang siap mencegah mikroba memasuki tubuh, lalu dengan cepat menyingkirkannya. Sistem ini disebut non-spesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Mekanismenya tidak menunjukkan spesifisitas terhadap antigen tertentu dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial. Respon imun seperti ini merupakan lini pertama pertahanan terhadap berbagai faktor yang mengancam tubuh, termasuk bakteri, virus, jamur, iritan

kimia dan cedera jaringan yang menyertai trauma mekanis atau luka bakar (Mackinnon, 1999).

### **2.5.2.2 Sistem Imun Spesifik**

Berbeda dengan sistem imun non-spesifik, sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali terpapar dengan tubuh akan segera dikenali oleh sistem imun spesifik sehingga terjadi sensitisasi sel-sel imun. Bila sistem imun tersebut terpapar kembali dengan benda asing yang sama, maka benda asing tersebut akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan (Baratawidjaja, 2009).

## **2.5.3 Respon Imun**

### **2.5.3.1 Respon Imun non-Spesifik**

Komponen-komponen utama dalam respon imun non-Spesifik dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

#### **1.1 Pertahanan anatomik**

##### **a. Faktor fisik**

Lapisan luar dan lapisan epitel internal kulit dari tubuh kita, pergerakan intestinal dan silia yang terdapat pada saluran pernafasan merupakan barier fisik yang sulit untuk ditembus oleh sebagian besar zat yang dapat menginfeksi tubuh (Kindt, 2007).

**b. Faktor kimia**

Lisozim dan fosfolipase yang terdapat pada air mata, saliva dan sekret hidung mampu melisiskan dinding sel bakteri dan merusak membran sel bakteri. Asam lemak yang terdapat pada keringat, serta cairan lambung yang terdiri dari HCl, enzim dan lendir yang bersifat asam (pH 1,2 - 3,0) dapat merusak sebagian besar bakteri dan toksinnya. Suasana kulit yang sedikit asam (pH 3-5) juga akan menghalangi pertumbuhan mikroba patogen (Kindt, 2007).

**c. Faktor biologis**

Adanya flora normal pada kulit dan saluran pencernaan dapat mencegah kolonisasi oleh bakteri patogen dengan cara mensekresikan senyawa toksik ataupun bersaing dengan bakteri patogen dalam memanfaatkan nutrisi yang ada (Kindt, 2007).

## 1.2 Pertahanan Fisiologis

Peningkatan temperatur tubuh akibat serangan mikroba menunjukkan kemampuannya dalam merespon zat asing. Beberapa mediator kimia seperti lisozim, interferon, dan komplemen juga sangat berperan saat tubuh terinfeksi mikroba (Radji, 2010).

## 1.3 Pertahanan selular

Sel fagosit (neutrofil, monosit, eosinofil, makrofag), sel NK, sel dendritik, dan sel mast berperan dalam sistem imun non-spesifik selular (Radji, 2010).

#### 1.4 Pertahanan humoral

Ada beberapa bahan yang berperan dalam pertahanan tubuh secara humoral, yaitu :

a) Komplemen

Komplemen berperan sebagai opsonin yang meningkatkan fagositosis, sebagai faktor kemotaktik, serta menimbulkan destruksi / lisis pada bakteri (Baratawidjaja, 2009).

b) Protein fase akut

Selama fase akut infeksi, terjadi perubahan pada kadar beberapa protein dalam serum yang disebut *Acute Phase Response Protein (APRP)* (Baratawidjaja, 2009).

c) Mediator asal fosfolipid

Mediator asal fosfolipid ini berupa prostaglandin dan leukotrien (Baratawidjaja, 2009).

d) Sitokin

Selama infeksi, bakteri mengaktifkan makrofag dan sel lain untuk memproduksi sitokin IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  (Baratawidjaja, 2009).

e) Interferon

Suatu glikoprotein yang dihasilkan oleh berbagai sel tubuh yang mengandung nukleus sebagai respon imun terhadap infeksi virus. Interferon dapat menghambat replikasi dari virus di dalam sel hospes (Baratawidjaja, 2009).



f) C-Reactive Protein (CRP)

C-Reactive Protein (CRP) merupakan protein yang kadarnya cepat meningkat setelah infeksi atau inflamasi akut. CRP dibentuk oleh tubuh pada saat infeksi. Peranannya adalah sebagai opsonin dan dapat mengaktifkan komplemen, dengan bantuan  $Ca^{+2}$  dapat mengikat berbagai molekul yang terdapat pada bakteri dan jamur (Baratawidjaja, 2009).

g) Sistem koagulasi

Sistem ini berperan dalam meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan bekerja sebagai zat kemotaksis untuk merangsang sel-sel fagosit (Baratawidjaja, 2009).

Proses fagositosis adalah mekanisme utama dalam respon imun nonspesifik. Dalam kerjanya, sel fagosit juga berinteraksi dengan komplemen dan sistem imun spesifik. Penghancuran mikroba terjadi dalam beberapa tingkat yaitu: kemotaksis, penangkapan, penelanan, pencernaan, pemusnahan, hingga pengeluaran dari dalam tubuh (Pinchuk, 2002).

### 2.5.3.2 Respon Imun Spesifik

Ada empat ciri-ciri respon imun spesifik yang membedakannya dengan respon imun non-spesifik yaitu :

1) Spesifisitas

Respon imun akan bereaksi seluruhnya dengan antigen yang identik atau antigen yang sama dengan antigen terdahulu yang merangsang respon imun (Baratawidjaja, 2009).

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1 TUJUAN PENELITIAN**

Untuk mengetahui Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap Mencit Putih Jantan dengan Metoda *Carbon Clearance*

#### **3.2. MANFAAT PENELITIAN**

Penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan sebagai sumber informasi baru tentang khasiat imunomodulator dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*).

- d. Karakterisasi sampel
- e. Ekstraksi sampel
- f. Penyiapan hewan percobaan
- g. Penyediaan sekian uji
- h. Penentuan dosis uji
- i. Pengujian aktivitas ekstrak yang didapatkan terhadap mencit putih jantan

#### **4.1.1. Alat dan Bahan**

##### **4.1.1.1. Alat**

Alat yang digunakan adalah plat tetes, corong, pipet tetes, vertis sorong, mikrotir dan stempel, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, rak tabung, kapas, rotary evaporator, gelas ukur, timbangan hewan, spatel, oral sonde, timbangan analitik, kaca objek, cawan penguap, kruz, oven, desikator, neraca listrik, spuit berukuran 5 ml, kandang mencit, mikropipet, sepe rangkaian alat Papan, spakam, sarungsteril L.V. Vis, mikroskop.

## BAB IV METODA PENELITIAN

### 4.1 Metodologi Penelitian

Metode penelitian ini bersifat eksperimental. Rancangan percobaan yang dilakukan adalah :

- a. Pengambilan sampel
- b. Identifikasi sampel
- c. Skrining kandungan kimia
- d. Karakterisasi sampel
- e. Ekstraksi sampel
- f. Penyiapan hewan percobaan
- g. Penyiapan sediaan uji
- h. Penentuan dosis uji
- i. Pengujian aktivitas ekstrak yang didapatkan terhadap mencit putih jantan

#### 4.1.1 Alat dan Bahan

##### 4.1.1.1 Alat

Alat yang digunakan adalah plat tetes, corong, pipet tetes, kertas saring, mortir dan stemper, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, rak tabung, kapas, *rotary evaporator*, gelas ukur, timbangan hewan, spatel, oral sonde, timbangan analitik, kaca objek, cawan penguap, kruz, oven, desikator, neraca listrik, spuit berukuran 5 ml, kandang mencit, mikropipet, seperangkat alat bedah, spektrofotometer UV-Vis, mikroskop.

#### 4.1.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol kental daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), pereaksi Mayer,  $\text{FeCl}_3$ , logam magnesium, asam klorida pekat, asam sulfat pekat, asam sulfat 2N, asetat anhidrat, pasir netral, amonia, air suling, asam asetat anhidrat, larutan giemsa, minyak emersi, etanol (96%), aquadest, etil asetat, n-heksan, methanol, plat silica gel F 254, tinta cina, heparin, larutan NaCl fisiologis 0,9%, Na CMC 0,5%, asam asetat 1%, tween 80 1%, EDTA dan mencit putih jantan dengan berat 20-30 gram.

#### 4.1.2 Prosedur Kerja

##### 4.1.2.1 Pengambilan sampel

Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) sebanyak 1 kg diperoleh dari Pariaman, Sumatera Barat.

##### 4.1.2.2 Identifikasi sampel

Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium ANDA, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas Padang.

##### 4.1.2.3 Skrining Kandungan Kimia

###### 1. Skrining Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan metode *Culvenor-Fitzgerald*, yaitu sebanyak 2 gram daun segar sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dirajang halus, digerus dalam lumpang dengan bantuan pasir netral dan 10 mL kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ). Tambahkan 10 mL larutan kloroform-amoniak 0,05 N, lalu gerus dan

saring ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 mL asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 2 N, kocok sampai terjadi pemisahan. Ambil lapisan asam, pindahkan ke tabung reaksi lain, kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih atau endapan putih yang tidak dapat dituang (Culvenor & Fitzgerald, 1963).

## 2. Skrining Steroid, Terpenoid, Saponin, dan Senyawa Fenolik

4.1.2.4 Dilakukan berdasarkan metode Simes dkk. Sampel sebanyak 2 gram daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) segar dipotong kecil, dididihkan dengan 25 mL etanol selama 15 menit, disaring panas dan filtratnya dikeringkan diatas penangas air. Ekstrak kental ditambahkan air suling dan kloroform masing-masing 5 mL, lalu dikocok dan biarkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan air digunakan untuk uji fenolik dan saponin. Uji fenolik dilakukan dengan cara menambahkan beberapa tetes  $FeCl_3$  pada 0,5 mL larutan air, reaksi positif bila terbentuk warna biru kehitaman. Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil 3 mL lapisan air kemudian dikocok kuat dalam tabung reaksi lain, jika terbentuk busa berarti positif adanya saponin. Lapisan kloroform digunakan untuk uji terpenoid dan steroid. Lapisan kloroform dilewatkan melalui arang aktif dalam pipet tetes. Larutannya diteteskan pada plat tetes dan biarkan mengering. Setelah kering tambahkan anhidrida asetat dan asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah berarti positif terpenoid, sedangkan warna biru – hijau atau ungu berarti positif steroid (Simes, 1959).

### **3. Skrining Flavonoid**

Sebanyak 2 gram daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) segar dipotong halus, dimasukkan dalam tabung reaksi, dididihkan dengan 25 mL etanol dan saring selagi panas. Filtrat diuapkan sampai setengahnya, lalu tambahkan serbuk magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat. Terbentuknya warna pink menunjukkan adanya flavonoid (Simes, 1959).

#### **4.1.2.4 Pembuatan Ekstrak**

Timbang 1 Kg simplisia segar dicuci bersih lalu dipotong kecil, kemudian di maserasi dengan EtOH 96 % sebanyak 10 Liter selama 5 hari, diaduk sekali-sekali, kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi lagi. Perlakuan ini dilakukan secara berulang sebanyak tiga kali yang masing-masingnya selama 5 hari, kemudian filtrat didestilasi vakum dan hasil destilat dikentalkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (Departemen Kesehatan RI, 2000).

#### **4.1.2.5 Karakterisasi Ekstrak**

##### **1. Pemeriksaan organoleptis**

Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, rasa, dan bau (Departemen Kesehatan RI, 2008).

##### **2. Penentuan rendemen**

Timbang sampel yang telah dibersihkan (A) kemudian ekstrak yang diperoleh ditimbang kembali (B) (Departemen Kesehatan RI, 2008). Hitung rendemen dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Keterangan: A = berat sampel (g)

B = berat ekstrak yang diperoleh (g)

### 3. Penentuan susut pengeringan

Bertujuan untuk menunjukkan batas maksimal (rentang) senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Kruz porselen dipanaskan di dalam oven 105°C selama 30 menit, kemudian dinginkan dalam desikator dan berat awal ditimbang (A). Masukkan ekstrak sebanyak 1 gram ke dalam kruz tersebut dan timbang kembali (B). Kemudian kruz dimasukkan ke dalam oven, buka tutup kruz dan biarkan tutup tersebut terbuka dalam oven. Panaskan selama 1 jam pada suhu 105°C, dinginkan dalam desikator, kemudian timbang kembali. Ulangi perlakuan di atas hingga diperoleh bobot tetap (Departemen Kesehatan RI, 2008).

Hitung susut pengeringan dengan rumus :

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = Berat kruz kosong (g)

B = Berat kruz + ekstrak (g)

C = Berat kruz + ekstrak telah kering (g)

### 4. Penetapan kadar abu

Bertujuan untuk memberi gambaran kandungan minimal internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Timbang seksama ekstrak 1 gram, dimasukkan ke dalam kruz yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Dipijar perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang.

Jika dengan cara ini arang tidak dapat hilang, maka ditambahkan air panas, disaring melalui kertas saring bebas abu pada kruz yang sama. Filtrat dimasukkan kedalam kruz, diuapkan dan dipijarkan 600<sup>0</sup>C-700<sup>0</sup>C hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b (Departemen Kesehatan RI, 2008).

$$\text{Kadar abu} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W1 = Berat kruz kosong (g)

W2 = Berat kruz kosong + ekstrak (g)

W3 = Berat kruz + abu (setelah di oven) (g)

#### 5. Profil kromatografi lapis tipis ekstrak sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Totolkan larutan uji, biarkan mengering, kemudian masukan lempeng ke dalam chamber yang telah berisi eluen atau fase gerak yaitu n-Heksan : etil asetat dengan perbandingan 4 : 3, totalan jangan sampai terendam. Tutup chamber, biarkan sistem hingga fase gerak merambat sampai batas atas, kemudian keluarkan dan keringkan di udara, dan amati noda dengan sinar UV. Ukur dan catat jarak tiap noda dari titik penotolan. Tentukan harga *R<sub>f</sub>* (Departemen Kesehatan RI, 2008).

#### 4.1.2.6 Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit putih jantan dengan berat 20-30 gram berumur 2-3 bulan yang dikondisikan selama 1 minggu dalam kandang yang baik untuk menyesuaikan lingkungannya.



#### 4.2.2.7 Penentuan Dosis

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Sebanyak 20 ekor mencit secara random menjadi 4 kelompok perlakuan yang terdiri dari 5 ekor yaitu :

1. Kelompok Kontrol negatif (Na CMC)
2. Kelompok ekstrak sirih merah dosis 10 mg/Kg BB,
3. Kelompok ekstrak sirih merah dosis 30 mg/Kg BB,
4. Kelompok ekstrak sirih merah dosis 100 mg/Kg BB.

#### 4.2.2.8 Penyiapan Sediaan Uji

##### 1. Larutan Na CMC 0,5%

Taburkan 500 mg Na CMC dalam 10 mL air panas yang telah dimasukkan kedalam lumpang panas, biarkan selama 15 menit, kemudian gerus hingga menjadi massa yang homogen dan encerkan dengan aquadest hingga volume 100 mL.

##### 2. Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak tanaman disuspensikan dalam Na CMC 0,5%. Contoh, untuk dosis 10 mg/Kg BB dan dibuat larutan dengan konsentrasi 1% sebanyak 10 mL. Ekstrak sebanyak 10 mg dan Na CMC 50 mg, Na CMC ditaburkan ke dalam air panas (20 kalinya) dalam wadah. Biarkan 15 menit sampai mengembang, lalu gerus hingga homogen, kemudian tambahkan 10 mg ekstrak pada wadah gerus homogen. Tambahkan air panas sedikit demi sedikit sampai volume 10 mL. Lakukan hal yang sama untuk semua dosis.

#### 4.2.2.9 Penetapan Kadar Karbon

Tinta cina sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam cawan penguap, dan diuapkan dalam oven pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Pengeringan kemudian dilanjutkan dalam desikator sampai berat konstan.

#### 4.2.2.10 Pembuatan Suspensi Karbon Koloid

Sebanyak 1,6 gram tinta cina yang telah dikeringkan, disuspensikan dengan 25 mL tween 80 1% (b/v) dalam larutan NaCl fisiologis 0,9 % (b/v) hingga diperoleh konsentrasi 64 mg/mL ( 6,4 %).

#### 4.2.2.11 Pembuatan Kurva Baku Karbon

Tinta cina yang telah dikeringkan lalu ditimbang sebanyak 100 mg, didispersikan dalam 100 mL asam asetat sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 2, 3, 4, 5, dan 6 mL lalu dicukupkan dengan asam asetat 1% hingga volume 50 mL, sehingga didapatkan kadar karbon 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Dari masing- masing kadar tersebut dipipet sebanyak 4 mL, selanjutnya ditambahkan darah mencit putih jantan yang diambil dari vena sebanyak 25  $\mu\text{L}$ . Setelah dihomogenkan, ukur kadar absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Plot absorben yang diperoleh dengan kadar karbon digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Sebagai blanko digunakan darah mencit putih jantan dan aquadest saja.

#### 4.2.2.12 Pengujian aktivitas ekstrak

Penghitu Mencit putih jantan dibagi ke dalam empat kelompok yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif yang diberi Na CMC, dan tiga kelompok uji yang diberi tiga variasi dosis yaitu 10 mg/kgBB, 30 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB. Masing-masing kelompok uji diberi suspensi sampel secara oral dengan regimen dosis satu kali sehari selama enam hari berturut turut.

Pada hari ke-7 dilakukan pengambilan darah dan penyuntikan suspensi karbon koloid. Darah diambil melalui ujung vena ekor mencit. Darah ditampung pada plat tetes yang sebelumnya telah ditetesi dengan heparin.

Darah diambil sebanyak 25  $\mu$ L dan dilisis dalam 4 mL asam asetat 1 %. Contoh darah pertama ini dinamakan blanko (menit ke-0). Kemudian suspensi karbon sebanyak 0.1 mL/10 gram BB diberikan secara intravena, lalu darah mencit diambil 25  $\mu$ L pada menit ke-3, 6, 9, 12, dan 15 setelah penyuntikan karbon. Masing masing darah tadi dilisis dalam 4 mL asam asetat 1 %, kemudian diukur absorbannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm.

Penghitungan konstanta fagositosis dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$K = \frac{\log A (n) - \log A (n - 1)}{t (n - 1) - t (n)}$$

Keterangan :

K : Konstanta fagositosis

A : Adsorban pada waktu ke-n

t : waktu (3,6,9,12,15) menit

n : periode pengambilan (1,2,3,4,5)

Penghitungan harga indeks fagositosis menggunakan rumus sebagai berikut :

$$IF \text{ mencit} = \frac{\text{konstanta fagositosis mencit } z}{\text{Konstanta fagositosis rata rata mencit kontrol}}$$

Keterangan :

IF : indeks fagositosis

Mencit z : mencit yang telah diperlakukan dan ditentukan harga konstanta fagositosis

#### 4.2.2.16 Analisis Data

##### 4.2.2.13 Penentuan bobot limfa relatif

Limfa diambil dari mencit putih jantan yang digunakan untuk uji fagositosis. Timbang limfa satu persatu dan hitung bobot relatif limfa.

##### 4.2.2.14 Perhitungan jumlah sel limfosit dengan metoda hapusan darah

Darah segar diteteskan pada kaca objek sebanyak satu tetes, tipiskan, dan ratakan dengan kaca objek lain sehingga diperoleh lapisan darah yang homogen (hapusan darah), lalu keringkan. Setelah kering tetesi dengan metanol sehingga menutupi seluruh hapusan darah, biarkan selama 5 menit. Tambahkan 1 tetes larutan giemsa yang telah diencerkan dalam aqua destilata (1:20), biarkan selama 20 menit. Cuci dengan aqua destilata. Setelah kering, tetesi sedikit minyak emersi, lalu amati di bawah mikroskop. Hitung jumlah limfosit pada perbesaran 400x.

#### 4.2.2.15 Perhitungan jumlah sel leukosit

Darah segar yang telah diberi EDTA dihisap dengan pipet leukosit sampai angka 0,5 kemudian dihisap larutan turk sampai angka 11, selanjutnya dikocok selama 3 menit dengan alat hemocytometer. Dari dalam pipet 1-2 tetes dibuang dan pada kamar hitung haemocytometer diteteskan satu tetes. Biarkan cairan selama 2 menit agar leukosit mengendap. Jumlah sel darah putih dihitung pada keempat sudut kamar hitung.

#### 4.2.2.16 Analisis Data

Data hasil penelitian ini diolah secara statistik dengan menggunakan ANOVA satu arah kemudian dilanjutkan dengan analisis Duncan.

1. Hasil Skriming fitokimia positif alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Lampiran 1; Tabel 1)
2. Dari sampel segar daun sirih merah yang ditimbang sebanyak 200 g diperoleh jumlah hasil analisis sebanyak 31,5 g dan didapat kadar air sebanyak 5,15% (Lampiran 1; Tabel 2)
3. Pada pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol sirih merah didapatkan warna keemasan kekuningan, aroma hitung, kelipatan halus dan rasa pahit (Lampiran 1; Tabel 3)
4. Pada pemeriksaan susut pengeringan diperoleh kadarnya 0,23, 0,43, dan 0,43 dengan kadar air persentase sebesar 6,70% (Lampiran 1; Tabel 4)

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil

#### 5.1.1 Identifikasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Identifikasi tanaman sirih merah telah dilakukan di herbarium ANDA, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas Padang. Hasil identifikasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) (Lampiran 4, Gambar 2).

#### 5.1.2 Karakterisasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

1. Hasil Skrining fitokimia positif alkaloid, flavonoid, saponin dan fenolik (Lampiran 1, Tabel 1)
2. Dari sampel segar daun sirih merah yang ditimbang sebanyak 1 kg diperoleh ekstrak kental sebanyak 51,5 g dan didapatkan nilai rendemen 5,15 % (Lampiran 1, Tabel 2).
3. Pada pemeriksaan organoleptis ekstrak etanol sirih merah didapatkan hasilnya berbentuk ekstrak kental, warna hitam, berbau khas, rasa agak pahit (Lampiran 1, Tabel 3).
4. Pada pemeriksaan susut pengeringan diperoleh kadarnya 6,33; 7,43; dan 6,62 % dengan rata-rata susut pengeringan sebesar 6,79 % (Lampiran 1, Tabel 4).

5. Pada pemeriksaan kadar abu diperoleh 11,12; 12,00; dan 13,11 % dengan rata-rata kadar abu sebesar 12,08 % (Lampiran 1, Tabel 5).
6. Hasil profil kromatografi lapis tipis dari ekstrak etanol daun sirih merah dengan eluennya n-Heksan : etil asetat dengan perbandingan 4 : 3 didapatkan nilai  $R_f$ : 0,5 dan 0,3 (Lampiran 1, Gambar 4)

### 5.1.3 Nilai indeks fagositosis darah, bobot limfa relatif, dan jumlah sel limfosit.

1. Nilai indeks fagositosis rata-rata pada kontrol negatif adalah 0,87958, pada kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kg BB adalah 0,88706; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kg BB adalah 1,25888; dan kelompok uji III yang diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 1,00084 (Lampiran 1, Tabel 9, Gambar 10).
2. Bobot limfa relatif rata-rata pada kontrol negatif adalah 0,6676, pada kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kg BB adalah 0,7101; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kg BB adalah 0,7688; kelompok uji III yang diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 0,8869 (Lampiran 1, Tabel 11, Gambar 11).
3. Rata-rata total Leukosit pada darah mencit pada kontrol negatif adalah 16.540/ $\mu$ L darah, kelompok uji I yang diberi ekstrak 10 mg/kg BB adalah 17.494/ $\mu$ L darah; kelompok uji II yang diberi ekstrak 30 mg/kg BB adalah 15.868/ $\mu$ L darah; kelompok uji III yang diberi ekstrak 100 mg/kg BB adalah 14.548/ $\mu$ L darah (Lampiran 1, Tabel 14)

## 5.2. Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang Uji Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) Terhadap Mencit Putih Jantan Dengan Metoda Carbon Clearance, dimana penelitian dimulai pada tanggal 9 Juni 2014 di Laboratorium Biota Sumatera dan Laboratorium Farmakologi Universitas Andalas.

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan yaitu daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang masih segar. Sampel ini diperoleh dari daerah Pariaman, Sumatera Barat. Identifikasi tanaman telah dilakukan di herbarium ANDA, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas. Tujuan identifikasi adalah untuk mengetahui identitas sampel yang akan digunakan. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dapat diketahui kepastian bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.).

Setelah sampel diidentifikasi, selanjutnya dilakukan skrining kandungan kimia dalam daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dan hasilnya daun sirih merah positif mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenolik dimana untuk uji alkaloid menggunakan metode *Culvenor Fitzgerald* dengan pereaksi Mayer terbentuk kabut putih/endapan putih (Culvenor & Fitzgerald, 1963). Alkaloid berfungsi sebagai detoksifikasi, sumber energi, pelindung bagi tumbuhan dan cadangan glikogen (Djulkarnaini, 1998), untuk uji flavonoid dengan pereaksi serbuk magnesium, lalu ditambahkan satu tetes asam klorida pekat ditandai dengan terbentuknya warna



pink, untuk uji saponin lapisan air diambil dan dikocok sampai terbentuk busa atau buih, dan untuk uji fenolik menggunakan metode Simes dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  terbentuk endapan biru kehitaman (Simes, 1959) (Simes, 1959).

Dalam proses pembuatan ekstrak sampel, yang mana sampel yang digunakan adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang masih segar, daun ini dibersihkan terlebih dahulu dengan air bersih, kemudian dipotong kecil untuk meningkatkan luas permukaan sampel sehingga memudahkan pelarut untuk berpenetrasi kedalam membran sel dan mempermudah proses penarikan zat-zat aktif yang terkandung didalamnya (Depkes RI, 2000).

Sampel yang telah dipotong kecil dan dicuci tersebut diekstraksi dengan cara maserasi. Cara maserasi ini dipilih karena dapat digunakan untuk ekstraksi sampel dalam jumlah banyak, tidak memerlukan perlakuan khusus, pengerjaannya mudah, sederhana dan tidak memerlukan pemanasan sehingga baik untuk simplisia yang mengandung zat aktif yang tahan atau tidak tahan terhadap pemanasan (Djamal, 1988). Sampel dimaserasi selama lima hari dengan tiga kali pengulangan dimana selang lima hari tersebut sampel maserasi selalu diaduk. Pengadukan dilakukan untuk menghindari terjadinya kejenuhan pelarut dan juga agar pelarut dapat terdistribusi secara merata. Proses maserasi dilakukan di tempat yang terlindung cahaya agar terhindar dari kemungkinan terjadinya degradasi struktur senyawa yang kurang stabil karena cahaya (Depkes RI, 2000). Pelarut organik yang digunakan dalam proses maserasi yaitu etanol karena etanol merupakan pelarut universal yang mampu melarutkan senyawa-senyawa polar, semipolar, dan non-polar serta mampu untuk mengendapkan protein dan

menghambat kerja enzim sehingga dapat terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Harborne, 1987). Etanol yang digunakan yaitu etanol 96% dimana dengan sedikitnya kandungan air dari etanol 96%, penetrasi pelarut ke dalam sel sampel lebih mudah, terutama karena sampel yang digunakan adalah sampel segar (Depkes RI, 2000).

Ekstrak etanol yang didapat kemudian diuapkan dengan destilasi vakum dengan tujuan untuk mengurangi tekanan udara pada permukaan sehingga menurunkan tekanan uap pelarut yang mana akan menurunkan titik didih pelarut tersebut. Hal ini dapat mengurangi kemungkinan terurainya zat aktif yang tidak tahan pemanasan yang terdapat dalam ekstrak. Proses ini dilanjutkan dengan penguapan pelarut yang masih tersisa menggunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental (Agoes, 2007).

Ekstrak kental etanol daun sirih merah yang diperoleh sebanyak 51,5 gram dengan rendemen 5,15%. Pemeriksaan rendemen bertujuan untuk mengetahui persentase ekstrak yang didapat dari sampel awal. Setelah pemeriksaan rendemen, kemudian dilakukan karakterisasi ekstrak spesifik dan non-spesifik. Karakterisasi ekstrak spesifik yang dilakukan meliputi organoleptis (bentuk, warna, bau dan rasa) dan profil kromatografi lapis tipis; karakterisasi ekstrak non-spesifik yang dilakukan meliputi susut pengeringan dan kadar abu total. Organoleptis ekstrak kental daun sirih merah yaitu berwarna hitam, rasa pahit, dan berbau khas. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui bentuk, rasa, bau dan warna ekstrak untuk memudahkan dalam mengenali ekstrak secara sederhana.

(*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) diuapkan dengan destilasi vakum dalam 1 ml. methanol

Karakterisasi bertujuan untuk mengamati atau mengukur sifat-sifat atau ciri dari ekstrak yang diperoleh.

Dari hasil pemeriksaan karakterisasi ekstrak secara non-spesifik, diketahui bahwa susut pengeringan ekstrak etanol daun sirih merah sebesar 6,79% dimana hasil yang didapat sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia yaitu untuk nilai susut pengeringan tidak lebih dari 10%. Pemeriksaan susut pengeringan menunjukkan jumlah bagian yang mudah menguap serta air yang hilang selama pemanasan dan untuk memberi batasan maksimal (rentang) banyaknya senyawa yang hilang pada proses pengeringan dalam ekstrak tersebut. Kadar abu ekstrak kental etanol daun sirih merah 12,08 % dimana hasil yang didapat sesuai dengan literatur yaitu Materia Medika Indonesia tercatat bahwa syarat kadar abu untuk ekstrak sirih merah tidak lebih dari 14%. Penentuan kadar abu ini menjelaskan bahwa kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai akhir terbentuknya ekstrak.

Dari hasil pemeriksaan profil kromatografi lapis tipis yang telah dilakukan terhadap ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). Eluen atau fase gerak yang digunakan adalah n-Heksan yang bersifat non-polar dan etil asetat yang bersifat polar dengan perbandingan 4 : 3, dimana n-Heksan dipipet sebanyak 4 mL dan etil asetat dipipet sebanyak 3 mL kemudian dimasukkan kedalam chamber dan ditutup. Alasan memilih n-Heksan dan etil asetat sebagai fase gerak karena hanya pelarut ini yang cocok dijadikan sebagai fase gerak dari ekstrak etanol yang dihasilkan. Larutan uji dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) ditimbang sebanyak 20 mg dalam 1 mL methanol

pa. Kemudian larutan uji ditotolkan pada plat silica gel di bagian tengah batas bawah. Jarak batas atas dengan batas bawah adalah 5 cm, dan jarak untuk eluen atau fase gerak dengan batas bawah adalah 0,5 cm. Setelah ditotolkan plat silica dimasukkan kedalam chamber yang telah berisi eluen atau fase gerak, lalu tutup dan tunggu eluen bergerak sampai tanda batas atas, kemudian dikeluarkan dan dikeringkan dan setelah kering dapat diukur dibawah sinar UV, sehingga dapat dilihat noda yang terbentuk dan tandai. Jarak noda yang terbentuk ada dua noda yaitu pada jarak 1,5 cm dengan nilai  $R_f$  0,3 dan pada jarak 2,0 cm dengan nilai  $R_f$  0,5. Nilai  $R_f$  dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Bila identifikasi nilai  $R_f$  memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Sedangkan, bila nilai  $R_f$ -nya berbeda, senyawa tersebut dapat dikatakan merupakan senyawa yang berbeda (Lipsy, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang dibuat dalam tiga variasi dosis berdasarkan faktor kelipatan (logaritma) yaitu 10 mg/kgBB, 30 mg/kgBB, 100 mg/kgBB terhadap mencit putih jantan dengan menggunakan metoda carbon clearance (Thompson, 1985). Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan. Alasan pemilihan hewan percobaannya mencit putih jantan karena mencit mempunyai fisiologis yang mirip dengan manusia dan mudah untuk diperlakukan. Hal ini juga disebabkan karena sistem imun mencit jantan tidak dipengaruhi oleh hormon esterogen seperti halnya pada mencit betina (Baratawidjaya, 2009). Sebelum diberi perlakuan, mencit-mencit ini

diaklimatisasikan selama tujuh hari tujuannya agar mencit dapat beradaptasi terhadap lingkungan percobaan.

Pada proses pembuatan sediaan uji, sediaan dibuat dalam bentuk suspensi dimana ekstrak etanol daun sirih merah tersebut dilarutkan dalam larutan Na CMC 0,5 % disebabkan karena ekstrak etanol daun sirih merah ini tidak larut sempurna didalam air. Oleh karena itu, dibutuhkan zat pensuspensi agar kelarutan dan homogenitasnya meningkat. Na CMC 0,5 % digunakan sebagai zat pensuspensi karena sifatnya inert, menghasilkan larutan stabil, tidak mengiritasi, dan tidak toksik (Wade, 1994).

Suspensi ekstrak dibuat berdasarkan dosis yang telah ditetapkan, kemudian diberikan secara oral kepada mencit selama enam hari berturut-turut untuk memberikan kesempatan bagi sampel dalam meningkatkan respon imun non-spesifik dan respon imun spesifik. Uji respon imun non spesifik dilakukan dengan metoda *carbon clearance*.

Metoda *Carbon Clearance* merupakan pengujian kemampuan fagositosis dengan menggunakan karbon sebagai marker yang diberikan secara intravena. Kemudian *Carbon Clearance* dilihat tiap menit ke-3, 6, 9, 12, 15. Karbon yang digunakan adalah tinta cina yang telah dikeringkan. Hal ini karena ukuran partikelnya lebih kecil dan lebih stabil, sehingga tidak menyebabkan penyumbatan pada pembuluh darah dan paru-paru. Karbon akan berkurang jumlahnya dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama neutrofil, monosit, makrofag dan eosinofil (Baratawidjaya, 2009).

Pada uji penetapan kadar dapat diketahui bahwa kadar Karbon tinta cina yang digunakan yaitu 36,66%. Pembuatan suspensi carbon dilakukan dengan cara penambahan tween 80 1%, dengan konsentrasi 6,4 % dan menggunakan NaCl fisiologis sebagai pelarut. Penggunaan NaCl fisiologis bertujuan agar kondisi sediaan suspensi karbon sama dengan kondisi tubuh mencit. Karbon sebagai benda asing akan segera difagosit oleh sel leukosit khususnya sel neutrofil dan makrofag (Altman, 1984; Kresno, 2007).

Efek fagositosis dengan Metoda *Carbon Clearance* ini dapat dilihat berdasarkan suatu kurva baku antara kadar carbon dalam darah (konsentrasi karbon) dengan nilai adsorban. Nilai adsorban diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Spektrofotometer UV-Vis yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis cahaya tunggal, dimana sinyal pelarut dihilangkan terlebih dahulu dengan mengukur pelarut tanpa sampel, setelah itu larutan sampel dapat diukur (Dachriyanus, 2004). Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi serapan dan konsentrasi karbon yaitu  $y = 0,0029x + 0,265$ ,  $R = 0,9368$ .

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan terhadap nilai absorban terlihat bahwa terjadinya penurunan nilai absorban pada semua kelompok dosis ekstrak etanol sirih merah dibanding kelompok kontrol negatif. Penurunan nilai absorban yang terbesar adalah terjadi pada dosis 10 mg/kgBB, lalu setelah itu dosis 100 mg/kgBB dan kemudian dosis 30 mg/kgBB. Semakin menurunnya nilai adsorban berarti konsentrasi karbon yang tinggal dalam darah mencit semakin sedikit. Hal ini memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas

fagositosis pada masing-masing kelompok variasi dosis. Hasil lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1, Tabel 7, Gambar 8.

Dari hasil nilai adsorban yang diperoleh tersebut dapat dihitung nilai konstanta fagositosis dari masing-masing dosis ekstrak (Lampiran 1, Tabel 8, Gambar 9). Konstanta fagositosis merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kecepatan fagositosis, semakin besar harga konstanta fagositosis maka semakin tinggi kecepatan bersihan karbon. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh ekstrak yang diuji yaitu ekstrak etanol daun sirih merah terhadap kecepatan eliminasi karbon dari dalam darah. Rata-rata nilai konstanta fagositosis yang didapatkan berdasarkan hasil perhitungan nilai absorban yaitu pada kontrol negatif 0,0264972, pada dosis 10 mg/kg BB 0,0235048, pada dosis 30 mg/kg BB 0,0333562, pada dosis 100 mg/kg BB 0,0265188. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1, Tabel 8.

Nilai indeks fagositosis dapat dihitung setelah diketahuinya nilai konstanta fagositosis. Semakin besar nilai konstanta dan nilai indeks fagositosis yang dihasilkan berarti semakin cepat sel fagositik yang melakukan proses fagositosis. Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan, didapatkan nilai rata-rata indeks fagositosis menunjukkan aktivitas fagositosis sel-sel fagositik terhadap partikel karbon yang dijadikan sebagai marker akibat pengaruh dari pemberian ekstrak daun sirih merah. Apabila nilai rata-rata indeks fagositosis lebih besar dari satu ( $IF > 1$ ) menunjukkan zat uji tersebut mempunyai aktivitas imunomodulator yaitu imunostimulan (Wirawan & Silman, 1996; Nurliyani, Wayan & Zuheid, 2005; Kresno, 2007). Rata-rata nilai indeks fagositosis yang didapatkan berdasarkan

hasil perhitungan nilai konstanta yaitu pada kontrol negatif 0,87958, pada dosis 10 mg/kg BB 0,88706, pada dosis 30 mg/kg BB 1,25888, pada dosis 100 mg/kg BB 1,00084 (Lampiran 1, Tabel 9). Dan hasil dari nilai rata-rata indeks fagoitosis yang menunjukkan zat uji bersifat imunomodulator sebagai imunostimulan yaitu terlihat pada dosis 30 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB. Pada uji statistik nilai indeks fagositosis dengan menggunakan ANOVA satu arah dosis uji tidak berbeda nyata dibanding kontrol negatif ( $P > 0,05$ ). Data statistiknya dapat dilihat pada Lampiran 3, Tabel 10.

Setelah itu mencit dibedah dan diambil limfanya lalu ditimbang, penimbangan bobot limfa dilakukan untuk melihat uji respon imun spesifik. Hal ini dapat dilihat dari kenaikan nilai bobot limfa relatif dari tiap perlakuan dengan dosis yang berbeda. Hasil menunjukkan bahwa pada kontrol negatif bobot limfa relatifnya 0,6676 g, pada dosis 10 mg/kg BB 0,7101 g, pada dosis 30 mg/kg BB 0,7688 g, pada dosis 100 mg/kg BB 0,8869 g. Hal ini berarti semakin meningkatnya bobot limfa maka semakin tinggi sel fagositik yang dihasilkan dalam pembentukan antibodi. Berdasarkan bobot limfa yang telah dihasilkan didapatkan bahwa peningkatan bobot limfa yang optimal terjadi pada kelompok dosis 100 mg/kgBB. Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1, Tabel 11.

Setelah dilakukan analisa statistik ternyata peningkatan nilai bobot limfa tersebut tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol negatif ( $P > 0,05$ ). Diketahui bahwa Limfa merupakan organ limfoid sekunder yang mengandung sel limfosit B dan limfosit T yang berperan pada proses respon imun spesifik. Selain itu, pada limfa juga terdapat sel dendritik dan makrofag yang berperan sebagai



APC (*Antigen Presenting Cell*) yang berfungsi menyajikan antigen kepada sel limfoid. Peningkatan sel-sel imun tersebut berkorelasi dengan bobot limfa. Kenaikan bobot limfa relatif ini menunjukkan bahwa adanya efek ekstrak etanol sirih merah terhadap aktivitas imunostimulan (Tjay & Rahardja, 2002; Kresno, 2007).

Pada penghitungan jumlah sel leukosit dengan metoda hapusan darah menggunakan larutan giemsa sebagai pewarna, kemudian menggunakan minyak emersi sebagai penjelas bentuk sel limfosit. Jumlah sel limfosit rata-rata pada kontrol negatif 23,00, pada dosis 10 mg/kg BB 22,00, pada dosis 30 mg/kg BB 24,00, pada dosis 100 mg/kg BB 26,00. Sel limfosit juga dapat dijadikan sebagai parameter uji untuk melihat aktivitas ekstrak etanol sirih merah terhadap mencit putih jantan. Peningkatan jumlah sel limfosit pada limfa berarti juga terjadi peningkatan pada respon imun spesifik. Sel limfosit terdiri dari sel limfosit B dan sel limfosit T. Sel limfosit B akan mengalami proliferasi dan diferensiasi membentuk sel plasma dan sel memori. Sel plasma inilah yang membentuk antibodi yang terbentuk setelah kontak dengan antigen. Untuk membentuk antibodi, sel plasma perlu melakukan kerja sama dengan sel limfosit T (sel T-helper) (Mutschler, 1991; Kresno, 2007). Sedangkan pada perhitungan jumlah total sel leukosit didapatkan nilainya menurun dibandingkan terhadap nilai fagositosis yang cenderung meningkat, hal ini bisa dikatakan bahwa semakin meningkat jumlah nilai fagositosis akan menyebabkan jumlah total leukosit menurun.

Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan dan ditinjau dari beberapa parameter uji yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diperoleh mempunyai

kemampuan aktivitas imunomodulator yaitu sebagai imunostimulan. Namun, juga ditemukan penelitian tentang daun sirih merah ini yang juga membahas tentang aktivitas imunomodulator dan hasilnya sirih merah ini juga mempunyai kemampuan aktivitas sebagai immunosupresan. Maka dapat diambil kesimpulan secara keseluruhan bahwa ekstrak daun sirih merah mempunyai aktivitas sebagai imunomodulator dimana dapat meningkatkan dan menurunkan fungsi dari sistem imun tubuh.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diberikan pada mencit putih jantan selama enam hari mempunyai kemampuan aktivitas imunomodulator yaitu sebagai imunostimulan. Semakin tinggi dosis ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diberikan, meningkatkan aktivitas fagositosis dilihat dari nilai indeks fagositosis, bobot limfa relatif, dan jumlah sel limfosit.

### 6.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya dapat mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang memiliki aktivitas imunomodulator terhadap mencit putih jantan.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

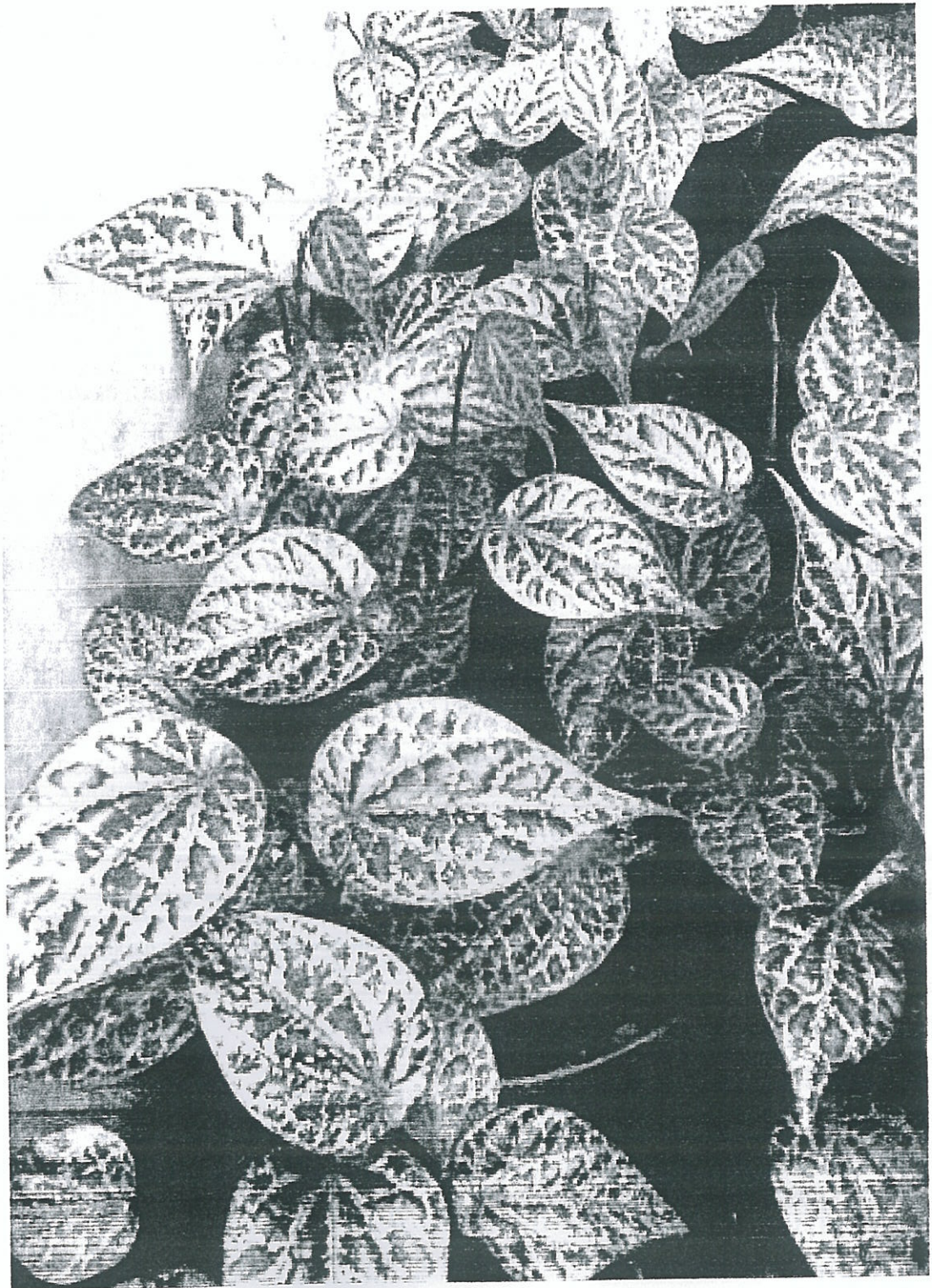
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pober, J.S. 1997. Cellular and Molecular Immunology (3<sup>rd</sup> ed). Philadelphia : Wb. Saunders. Co. 36-81
- Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB.
- Altman, I.J. 1984. *Clinical Alergy And Immunology* (1<sup>st</sup> ed). Boston: G.K. Hallmedical Publisher.
- Amalia, E. & Fitri, N. 2002. *Tata Cara Praktis Budidaya Tanaman Obat dan Pembuatan Obat Tradisional*. Yogyakarta: PJ Sekar Kedhaton.
- Atlas, R.M. 1984. Phagocytosis In Microbiology Fundamentals and Application, New York: Macmillan Company. 476-88.
- Backer, C.A. & Den B.V.1963. Flora of Java. *Published under The auspices of the rijksherbarium*. Leyden. 167
- Baratawidjaja, K.G. 2009. *Imunologi Dasar*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bellanti, J.A. 1993. *Immunologi III*. Washington: Georgetown University School of Medicine. D.C.
- Block, K.I., & M.N. Mead. 2003. Immune system effects of Echinacea, Ginseng and Astragalus: *A review. Integrative cancer therapies*. 2 (3): 247 – 267.
- Culvenor, C.C.J. & J.S. Fitzgerald. 1993. A field Method for Alkaloid Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* 52 (3), 303-304.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Andalas University Press.
- Departemen Kesehatan, R.I. 1977. *Materia Medika Indonesia Jilid 1-6*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan, R.I. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat* (Edisi 1). Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.

- Departemen Kesehatan, R.I. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia* (Edisi 1). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Djamal, R. 1988. *Prinsip-Prinsip Dasar Bekerja Dalam Kimia Bahan Alam*. Padang : FMIPA, Universitas Andalas.
- Djauzi, S. 2003. *Perkembangan Imunomodulator*. Simposium Peranan Echinacea sebagai imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri.
- Djulkarnain, H.B. 1998. *Pohon Obat Keluarga*. Jakarta: Intisari.
- Fitriyani, R. 1999. Minyak Atsiri, Pati, Vitamin dan Mineral pada Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L). (*Skripsi*). Banjarmasin.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : penuntun cara modern menganalisis tumbuhan* (Edisi 2). Penerjemah: Kosasih, Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Hartini, Y.S. 2014. Efek Imunomodulator Dua Senyawa Neolignan Hasil Isolasi Dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.): Kajian Imunitas Seluler dan Humoral. (*Disertasi*). Yogyakarta: UGM.
- Hartini, Y.S., Subagus, W., Sitarina, W. & AG, Yuswanto. 2013. Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) secara In Vitro. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 11 (2).
- Kagaya, K., Miyakawa Y., Watanabe K., & Fukazawa Y. 1992. Antigenic role of stress-induced catalase of salmonella typhimurium in cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* 60 (5): 1820-5.
- Kindt, T.J. 2007. *Kuby Immunology*. New York: WH Freeman Companies.
- Kresno, S.B. 2007. *Imunologi Diagnosa dan Prosedur Laboratorium* (Edisi 4). Jakarta: Universitas Indonesia.
- Lipsy, P. 2010. *Thin Layer Chromatography Characterization of the Active Ingredients in Excedrin and Anacin*. USA: Department of Chemistry and Chemical Biology, Stevens Institute of Technology.
- Mackinnon, L.T. 1999. *Advances in Exercise Immunology*. United States: Human Kinetics.

- Manoi, F. 2007. Sirih Merah Sebagai Tanaman Multi Fungsi. *Warta Puslitbangbun*. 13 (2).
- Mulyanto. 2003. *Khasiat dan Manfaat Daun Sirih: Obat Mujarab Dari Masa Ke Masa*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Mutschler, E. 1991. *Dinamika Obat Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi* (Edisi 5). Penerjemah: M. B. Widiyantodan A. S. Ranti. Bandung: Penerbit ITB.
- Neil, S. 1998. *Noni Nature's Amazing Healer*. Woodland Publ. *Pleasant Grove, Utah*. Diakses 1 Mei 2010.
- Nurliyani, Wayan, T.A., & Zuheid, N. 2005. Respon Antibodi dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit yang Diberi Protein Susu Kuda Pasteurisasi dan Fermentasi. *Media Kedokteran Hewan*. 21 (2) : 51-57.
- Parslow TG. 1997. *The Immune Respon in Medical Immunology* (9<sup>th</sup> ed). New Jerse : *Prentice Hall*. 63-72
- Pinchuk, G. 2002. *Immunology*. New York USA : The McGraw Hill Companie.
- Radji, M. 2010. *Imunologi dan Virologi* (Edisi 1). Jakarta: PT. ISFI.
- Robinovitch, M. 1995. Proffesional and non-Proffesional Phagocytes an Introduction. *Trends In Cell Biology*. 5 : 85-87.
- Sharma HL, Sharma K.K. 2007. *Principals of Pharmacology*. (1<sup>st</sup> Ed). *Paras Medical Publishers*. New Delhi. 428-453.
- Simes, J.J.H., J.G. Tracey, L.J., Webb, & W.J. Dunstand. 1959. An Australian Phytochemical Survey III: Saponins in Eastern Autralian Floweing Plants. *Bulletin No. 281*. Melbourne: Australia. 5 – 8 CSIRO.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi*. Bandung : Penerbit Angkasa Bandung.
- Sudewo, B. 2010. *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah Revisi* (Edisi 2). Jakarta: Agromedia Pustaka.

- Sumaryono, W. 2002. Penelitian Obat Tradisional Indonesia dan Strategi peningkatannya. *Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI*. Surabaya. 1 – 8.
- Susilowati, H. 2009. Produksi NO dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Setelah Stimulasi dengan Lipopolisakarida. *Majalah Kedokteran Universitas Gajah Mada*. 92-8
- Thompson, E.B. 1985. *Drug Bioscreening Fundamental of Drug Evaluation Technique in Pharmacology*. New York : Graceway Publishing Company.
- Tizard, I. R. 2000. *Immunology: An Introduction* (6<sup>th</sup> ed). New York: Saunders College Publishing. 98 – 161.
- Tjandrawinata, R.R., S. Maat, & D. Noviarny. 2005. Effect of standardized Phyllanthus niruri extract on changes in immunologic parameters: correlation between preclinical and clinical studies. *Medika XXXI*. (6): 367- 371
- Tjay, T.H. 2002. *Obat-Obat Penting : Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya Edisi*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Wicaksono, B.D., Yohana, A.H., Enos, T.A., Irawan, W.K., Dina, Y., Aldrin, N.P, & Ferry, S. 2009. Antiproliferative Effect of the Methanol Extract of *Piper crocatum* Ruiz & Pav Leaves on Human Breast (T47D) Cells In-vitro. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8 (4): 345-352
- Wade, A. & Weller, P. 1986. *Handbook Of Pharmaceutical Excipient* (2<sup>nd</sup> ed). London: The Pharmaceutical Press.
- Wirawan, S. & Erwin, S. 1996. *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Sederhana* (Edisi 2). Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Lampiran 1. Identifikasi tanaman Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)



Gambar 1. Tumbuhan Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)



Lampiran 1. (lanjutan)



## HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar  
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. \*811  
e-mail: [herbariumandaunand@gmail.com](mailto:herbariumandaunand@gmail.com); [nas\\_herb@yahoo.com](mailto:nas_herb@yahoo.com)

Nomor : 214/K-ID/ANDA/VIII/2014  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth.  
Atikah Riani  
Di  
Padang

Dengan hormat,  
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Atikah Riani  
NIM : 1011014043  
Instansi : Farmasi UNAND

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

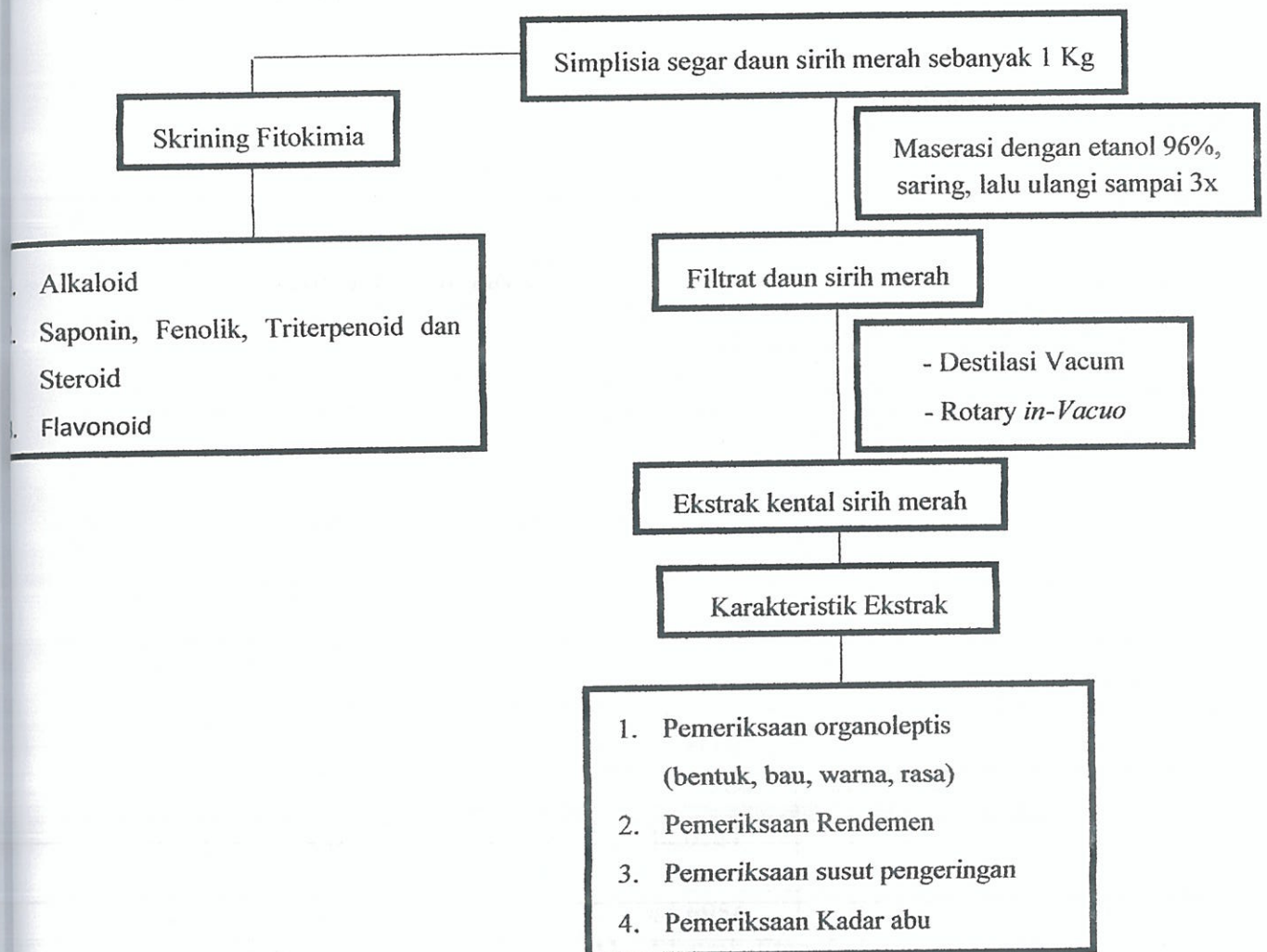
No	Famili	Spesies
1	Piperaceae	<i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 11 Agustus 2014  
Kepala  
  
Dr. Nurhanas, M.Si  
NIP. 196908141995122001

Gambar 2. Hasil Identifikasi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) di herbarium ANDA Universitas Andalas

Lampiran 2. Proses Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dan karakterisasinya



Gambar 3. Skema proses Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Lampiran 3. Karakterisasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) dengan pelarut etanol 96%

Sampel segar (g)	Ekstrak yang diperoleh (g)	Rendemen (%)
1 kg	51,5 g	5,15%

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Organoleptis Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

No.	Pemeriksaan Organoleptis	Pengamatan
1	Bentuk	Ekstrak kental
2	Warna	Hitam
3	Bau	Khas
4	Rasa	Pahit

Tabel 3. Hasil Perhitungan Susut Pengerinan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

Berat krus kosong(g)	Berat Krus kosong +sampel(g)	Berat sampel(g)	Krus+sampel setelah dioven(g)	Berat sampel setelah dioven(g)	Susut pengeringan(%)
37,0717	38,0757	1,004	38,0121	0,9404	6,33
30,819	31,828	1,009	31,753	0,934	7,43
43,7536	44,7566	1,003	44,6954	0,9418	6,62

Tabel 4. Hasil Perhitungan Kadar Abu Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

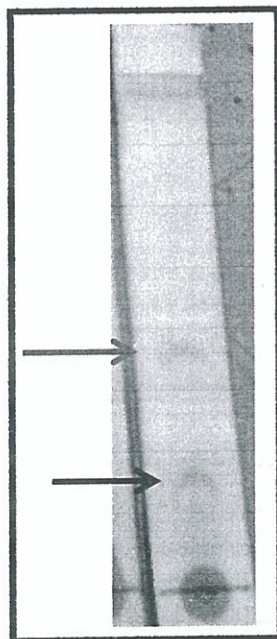
Berat krus kosong(g)	Berat Krus kosong +sampel(g)	Berat sampel(g)	Krus+sampel setelah di furnace(g)	Berat sampel setelah di furnace(g)	Kadar abu (%)
37,0680	38,07	1,002	37,1794	0,1114	11,12
43,7512	44,7512	1,000	43,8712	0,12	12
30,8095	31,8125	1,003	30,9341	0,1246	13,11

Lampiran 3. (lanjutan)

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia Daun Tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)

No.	Pemeriksaan	Hasil
1	Alkaloid	+
2	Flavonoid	+
3	Saponin	+
4	Fenolik	+
5	Triterpenoid	-
6	Steroid	-

Keterangan : Tidak bereaksi (-)  
Bereaksi (+)



Fase gerak : n-Heksan : Etil asetat (4:3)

Fase diam : plat silica gel

Larutan uji: 2% ekstrak dalam Metanol pa.

Nilai  $R_f$ : 1. 0,3

2. 0,5

Gambar 4. Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.)