

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) adalah salah satu tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Secara empiris sirih merah sering dimanfaatkan untuk mengobati penyakit diabetes melitus, hepatitis, batu ginjal, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, asam urat, hipertensi, jantung koroner, kanker rahim, kanker payudara, ambeien, TBC, obat sakit gigi, sariawan, bau badan, penyakit kelamin, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, maag, kelelahan, nyeri sendi, memperhalus kulit, radang pada telinga, obat batuk, radang pada paru, radang pada tenggorok, radang pada gusi, radang pada payudara, hidung berdarah, dan batuk darah (Manoi, 2007).

Banyaknya khasiat dan penggunaan empiris dari daun sirih merah telah mendorong beberapa peneliti untuk mengetahui efek ilmiah dari tanaman sirih merah. Beberapa penelitian tentang efek farmakologi daun sirih merah sudah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan (Fitriyani *et al.*, 2011) bahwa ekstrak metanol daun sirih merah menunjukkan efek antiinflamasi. Efek antiinflamasi dari ekstrak butanol daun sirih merah dalam menurunkan level TNF- α dan IL-6 pada tikus arterosklerosis (Wahjuni & Astawa, 2016). *Decocta* daun sirih merah dapat menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan (Safitri dan Fahma, 2008). Efek penurunan kadar gula darah dari ekstrak etanol daun sirih merah pada tikus hiperglikemi yang diinduksi aloksan (Wahjuni *et al.*, 2017). Ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai efek

antioksidan (Alfarabi *et al.*, 2010 dan Tonahi *et al.*, 2014). Ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai aktivitas antibakteri (Puspita *et al.*, 2018). Antiproliferatif dari ekstrak metanol daun sirih merah terhadap sel kanker payudara manusia secara invitro menunjukkan efek penghambatan pertumbuhan sel kanker T47D melalui penghambatan fosforilasi p44/p42 (Wicaksono *et al.*, 2009). Efek anti rematoid dari ekstrak sirih merah dalam menurunkan profil CD4⁺ dan CD8⁺ terhadap tikus yang diinduksi radang sendi menunjukkan hasil bahwa ekstrak daun sirih merah pada dosis 200 mg/kgBB berbeda nyata terhadap penurunan CD4⁺ dan tidak berbeda nyata terhadap penurunan CD8⁺ (Maslikah *et al.*, 2019).

Penelitian efek farmakologi telah banyak diteliti dan penelitian isolasi komponen aktif dari daun sirih merah juga sudah banyak dilakukan. Identifikasi komponen fitokimia dari daun sirih merah mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid, tanin-polifenol/fenolik, steroid, terpenoid dan saponin (Puzi, 2015;Azzahra, 2015). Isolasi senyawa antioksidan dari daun sirih merah berupa senyawa neolignan, *1-allyl- 3, 5 – dimethoxy – 7 – methyl – oxo – 6 - (3, 4, 5-trimethoxyphenyl) bicyclo [3,2,1]oct-2-en-8-yl acetate* (Rachmawati dan Ciptati, 2011). Isolasi dua glikosida fenolik *pipericrosida* A dan B dari daun sirih merah dan diuji efek penghambatan epoksida hidroksilase (sEH) larut, dengan IC₅₀, sebesar 58,5 µM (Li *et al.*, 2019). Efek imunomodulator dua senyawa neolignan hasil isolasi dari ekstrak metanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Palv) yang diujikan efeknya terhadap IL-10 dan IL-12 (Hartini, 2014). Aktifitas sitotoksik dan isolasi dua senyawa dari daun sirih merah, diidentifikasi sebagai *β-sitosterol* dan *2- (5', 6' dimethoksi-3', 4' -methylenedioxyphenyl) -6- (3'', 4'', 5''-trimethoxyphenyl) -3,7-dioxabicyclo [3,3,0] oktan* (Emrizal *et al.*, 2014).

Penelitian tentang isolasi dan identifikasi senyawa imunostimulan spesifik *in vitro* dari daun sirih merah, teridentifikasi bahwa isolat 1 adalah 2-allyl-4-(1'-hydroxy-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone dan isolat 2 adalah 2-allyl-4-(1'-acetyl-1'-(3", 4", 5"-trimethoxyphenyl) propan-2'-yl)-3,5-dimethoxycyclohexa-3,5-dienone yang merupakan senyawa neolignan. Isolasi dua *bicyclo* baru [3.2.1] neolignan oktanoid dari tipe guianin dinamakan sebagai (1'R, 2'R, 3'S, 7S, 8R) - Δ^5 ', 8'-2'-acetoxo-3,4,5,3 ', 5'-pentamethoxy-4'-oxo-8.1 ', 7,3'-neolignan (crocatin A) dan (1'R, 2'R, 3'S, 7S, 8R) - Δ^5 ', 8'-2'-hydroxy-3,4,5,3 ', 5'-pentamethoxy-4'-oxo-8.1 ', 7,3'-neolignan (crocatin B), bersama dengan senyawa yang dikenal *pachypodol* dan 1-*triacontanol* diisolasi dari daun sirih merah Indonesia (Arbain *et al.*, 2018).

Inflamasi didefinisikan sebagai reaksi lokal jaringan terhadap infeksi atau cedera dan melibatkan lebih banyak mediator dibandingkan respon imun didapat. Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi dan cedera jaringan. Inflamasi dapat lokal, sistemik, akut dan kronis yang menimbulkan kelainan patologis (Baratawidjaja, 2014). Sel-sel sistem imun nonspesifik seperti neutrofil, sel mast, basofil, eosinofil dan makrofag jaringan berperan dalam inflamasi. Pada inflamasi akut, neutrofil dalam sirkulasi dapat meningkat dengan segera, peningkatan tersebut disebabkan oleh migrasi neutrofil ke sirkulasi yang berasal dari sumsum tulang dan persediaan marginal intravaskuler. Inflamasi akut disebabkan oleh pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel mast, leukosit dan komplemen. Mikroba dapat melepas endotoksin atau eksotoksin, keduanya memacu pelepasan mediator pro-inflamasi. Lipopolisakarida adalah komponen dinding sel bakteri

gram negatif, activator poliklonal system imun, memacu pelepasan berbagai sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α dan TNF- β . Pelepasan mediator inflamasi meningkatkan molekul adhesi baik pada sel inflamasi maupun pada sel endotel. Sel-sel yang masuk ke tempat lesi akan melepas produknya dan meneruskan perjalanan proses inflamasi dan kadang menimbulkan kerusakan jaringan akibat pelepasan oksigen reaktif. IL-1 dan TNF- α , juga endotoksin meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1 pada permukaan sel endotel yang berintegrasi dengan ligannya (Baratawidjaja, 2014; Subowo, 2014). Ditempat infeksi makrofag yang menemukan mikroba melepas sitokin (TNF- α dan IL-1) yang mengaktifkan sel endotel sekitar venul. Makrofag yang teraktivasi juga merupakan sel efektor utama pada pertahanan inang melawan bakteri, melalui produksi *nitric oxide* (NO) yang bersifat sitotoksik untuk parasit. NO merupakan produk utama dan produksi yang dikendalikan oleh *nitric oxide synthase* (NOS) seperti iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). iNOS diinduksi pada makrofag sehingga aktivasi mengarah pada kehancuran organ pada beberapa inflamasi dan penyakit autoimun (Yoon *et al.*, 2009).

Nitric oxide (NO) adalah produk yang dihasilkan oleh makrofag teraktivasi untuk pembunuhan patogen intrasel melalui jalur (*Reactive Nitrogen Intermediates*) RNI. NO merupakan suatu radikal bebas yang disintesis oleh enzim NOS melalui reaksi yang kompleks. Proses produksi *nitric oxide* diawali dari terpajan makrofag oleh lipopolisakarida (LPS) dari bakteri sehingga jalur produksi *reactive nitrogen intermediate* (RNI) terinduksi. Jalur produksi RNI dimulai dari proses perubahan L-arginin menjadi L-citrulin yang membutuhkan

flavin adenine dinucleotidase (FAD), flavin mononucleotidase (FMN), NADP yang terinduksi (NADPH) dan bentuk tereduksi dari biopretin (BH₄) dengan bantuan enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Proses ini menghasilkan molekul NO yang dapat teroksidasi menjadi senyawa RNI seperti dinitrogen trioxide (N₂O₃) dan dinitrogen tetraoxide (N₂O₄). RNI akan berperan pada fase awal dan berikutnya pada aktifitas antibakteri makrofag. *Nitric oxide*, nitrit dan nitrat termasuk dalam kelompok RNI.

Faktor nekrosis tumor- α (*Tumor necrosis factor alpha*, *cachexin*, *cachectin*, *TNF-alpha*, *TNF- α*) merupakan sitokin proinflamasi yang banyak disekresi oleh makrofag dan memiliki banyak peran metabolisme seperti proliferasi sel, differentiasi, apoptosis, metabolisme lipid, dan koagulasi. TNF- α merupakan sitokin utama pada respons inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik (Baratawdjaja, 2014).

IL-1 merupakan sitokin pro-inflamasi yang terlibat dalam nyeri, peradangan dan kondisi autoimun. Studi yang menjelaskan peran kritis IL-1 dalam berbagai keadaan nyeri, termasuk peran kompleks intraseluler, inflammasom, yang mengatur produksi IL-1. Fungsi utama IL-1 sama dengan TNF- α yaitu mediator inflamasi yang merupakan respons terhadap infeksi dan rangsangan lain, dan berperan pada imunitas nonspesifik (Ren and Torres, 2009).

ICAM-1 adalah molekul adhesi pada endotel, perannya pada adhesi sangat kuat antara semua leukosit dan endotel. ICAM-1 dan VCAM-1 adalah molekul adhesi yang meningkat jumlahnya oleh rangsangan inflamasi. Interaksi adhesi diatur oleh ekspresi permukaan sel yaitu molekul adhesi serta

ligan/reseptor-reseptornya. Pengelepasan mediator inflamasi meningkatkan molekul adhesi baik pada sel inflamasi (neutrofil dan monosit) maupun pada sel endotel. Pelepasan IL-1 dan TNF- α , juga endotoksin meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM-1 dan VCAM-1 pada permukaan sel endotel yang berinteraksi dengan ligannya pada permukaan leukosit (ICAM-1 ,mengikat LFA-1, VCAM-1 mengikat VLA-1) (Abbas, 2017 dan Baratawidjaja, 2014).

Daun sirih merah merupakan tanaman yang berpotensi sebagai obat tradisional antiinflamasi, dan telah banyak penelitian tentang isolasi senyawa kimia dari daun sirih merah, dan belum ditemukan adanya penelitian tentang aktifitas senyawa aktif antiinflamasi dari daun sirih merah. NO (*nitric oxide*) merupakan senyawa radikal bebas yang diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi dan sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1, dan ICAM-1. Penghambatan produksi NO, TNF- α , IL-1, dan ICAM-1 merupakan salah satu mekanisme antiinflamasi. Metoda yang digunakan dalam mengetahui kadar sitokin adalah metode **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), merupakan teknik biokimia yang digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. Penggunaan ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu.. Dari hal tersebut dilakukan penelitian untuk menentukan senyawa aktif sebagai antiinflamasi, dengan menguji beberapa fraksi daun sirih merah terhadap penghambatan produksi NO, dan dilanjutkan dengan isolasi senyawa dari fraksi yang paling aktif. Senyawa hasil isolasi dari fraksi yang paling aktif diujikan terhadap penghambatan produksi sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1 dan ICAM-1. Penelitian dilakukan secara invitro menggunakan sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida. Sel RAW 264,7

merupakan suatu *monocyte-machrophage cell line* yang banyak digunakan dalam penelitian tentang sistem imun, karena mirip dengan makrofag yang diproduksi sum-sum tulang belakang (Bergaus *et al.*, 2010). Lipopolisakarida adalah komponen dinding sel bakteri gram negatif, merupakan activator poliklonal sistem imun, yang memacu pelepasan berbagai mediator-mediator inflamasi termasuk *nitric oxide (NO)*, *prostaglandin E2*, histamine, sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α dan TNF- β (Maldonado *et al.*, 2015).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang diatas, dapat dibuat rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak metanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi butanol dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dapat menghambat produksi NO pada sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida?.
2. Apakah pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang disolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi TNF- α pada sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida?.
3. Apakah pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang disolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dapat menghambat produksi sitokin proinflamasi IL-1 β pada sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida?.
4. Apakah pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang disolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dapat menghambat produksi

sitokin proinflamasi ICAM-1 pada sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida?.

5. Apakah golongan senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) ?.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Umum

Mengkaji efek antiinflamasi dari ekstrak metanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan senyawa isolasi dari daun sirih merah terhadap kadar NO dan kadar sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1 dan ICAM-1 pada sel RAW 264,7 yang diinduksi lipopolisakarida

1.3.2 Khusus

1. Mengkaji pengaruh pemberian ekstrak dan fraksi dari daun sirih merah terhadap produksi NO pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS
2. Mengkaji pengaruh pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar sitokin proinflamasi TNF- α pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS
3. Mengkaji pengaruh pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar sitokin proinflamasi IL-1 β pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS
4. Mengkaji pengaruh pemberian senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar sitokin proinflamasi ICAM-1 pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS

5. Mengkarakterisasi senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav)

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang fraksi aktif dari daun sirih merah yang dapat menghambat produksi NO pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS
2. Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas senyawa antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar sitokin proinflamasi TNF- α pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS.
3. Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas senyawa antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar sitokin proinflamasi IL-1 β pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS.
4. Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas senyawa antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah terhadap kadar molekul adesi ICAM-1 pada sel RAW 264,7 yang diinduksi LPS.

Memberikan informasi ilmiah tentang golongan senyawa utama sebagai antiinflamasi yang diisolasi dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav).

