



INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG

SEKOLAH FARMASI

Gedung Yusuf Panigoro (Labtek VII), Jl. Ganesa No. 10, Bandung - 40132, Telp: +6222 2514316,
Fax +6222 2504852, e-mail: farmasi@fa.itb.ac.id.

Nomor : 2671/IT1.C10.1/TU.08/2023

Bandung, 7 Juli 2023

Lamp. : 1 (satu) berkas

Hal : Undangan Penilaian Disertasi

Program Studi Doktor Sekolah Farmasi ITB

Kepada Yth.

Prof. Dr. apt. Heni Rachmawati

(KPPS Sekolah Farmasi - ITB)

Dr. apt. Maria Immaculata Iwo

(Promotor)

Dr. rer. nat. apt. Rachmat Mauludin

(Ko-Promotor)

Prof. Dr. apt. Elfahmi

(Ko-Promotor)

Prof. Dr. apt. Irda Fidrianny

(Penguji dari Sekolah Farmasi - ITB)

Dr. apt. Kusnandar Anggadiredja

(Penguji dari Sekolah Farmasi - ITB)

Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si

(Penguji dari Fakultas Farmasi-UHAMKA)

Kami sampaikan bahwa Penilaian Disertasi Mahasiswa Program Doktor Sekolah Farmasi atas nama :

Lusi Putri Dwita NIM. 30720304

akan diselenggarakan pada :

Hari : Senin

Tanggal : 10 Juli 2023

Waktu : 13.00 – 15.30 WIB

Metode Pelaksanaan : Daring via Zoom

Link Zoom : <https://bit.ly/PenilaianDisertasiLusi>

(Meeting ID: 958 1394 4038, Passcode: 455658)

Kami mohon kehadiran Bapak/Ibu sebagai penguji mahasiswa yang bersangkutan. Sebagai kelengkapan pelaksanaan Penilaian Disertasi Program Doktor tersebut kami kirimkan Soft file Form Penilaian.

Demi kelancaran pelaksanaan Penilaian Disertasi, kami mohon Bapak/Ibu sudah *standby* 10 menit sebelum acara dimulai. Atas perhatian dan kerjasamanya, kami ucapkan terima kasih.

a.n Dekan

Wakil Dekan Bidang Akademik,



Prof. Dr. apt. Elfahmi., S.Si., M.Si

NIP. 196904251998021002

Tembusan :

1. KPPS SF-ITB
2. Dekan SF-ITB
3. Ketua Program Studi Magister & Doktor SF-ITB
4. Yang bersangkutan



Accreditation in Engineering, Computer
Sciences, Natural Sciences, Mathematics

Lembaga Akreditasi Mandiri
Pendidikan Tinggi Kesehatan Indonesia





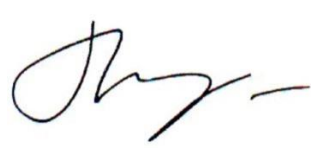
INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG

SEKOLAH FARMASI

Gedung Yusuf Panigoro (Labtek VII), Jl. Ganesa No. 10, Bandung - 40132, Telp: +6222 2514316,
Fax +6222 2504852, e-mail: farmasi@fa.itb.ac.id.

FORM#308.1

FORMULIR PENILAIAN DISERTASI DARI PENILAI

Judul Disertasi: Efek Neuroprotektif Ekstrak Buah <i>Piper Cubeba</i> L.F (Piperaceae) pada Model Hewan Stroke Iskemik					
Nama Mahasiswa : Lusi Putri Dwita			NIM : 30720304		
Nama Ketua Tim Pembimbing: Dr. apt. Maria Immaculata Iwo					
Nama Anggota Pembimbing I: Dr. rer. nat. apt. Rachmat Mauludin					
Nama Anggota Pembimbing II: Prof. Dr. apt. Elfahmi					
No	Detail Penilaian (lingkari yang sesuai, skor maksimum adalah 5)				
1	Kebaruan dan Kualitas Topik Penelitian Topik penelitian yang dipilih memiliki nilai kebaruan sangat tinggi, baik dari sudut pandang keilmuan ataupun relevansi pada penerapannya dan memiliki kualitas serta orisinalitas yang terukur	1	2	3	4
2	Kejelasan Pemaparan Latar Belakang Masalah Permasalahan kimia dinyatakan dengan sangat jelas dan terkait erat dengan latar belakang yang disusun berdasarkan data literatur yang komprehensif dan mutakhir.	1	2	3	4
3	Kejelasan Pemaparan Hipotesis/Tujuan Pernyataan hipotesis atau tujuan atau target yang diinginkan dinyatakan dengan sangat baik,	1	2	3	4
4	Kejelasan Pemaparan Metode/Teorema yang akan Digunakan Pemilihan metode/teorema tepat dan sesuai dengan topik penelitian yang dipilih, keruntutan dalam pemaparan metode/teorema yang dipilih	1	2	3	4
5	Format Penulisan Disertasi Kajian literatur dituliskan rinci dengan analisis yang komprehensif dan kritis, kesesuaian format/layout, penggunaan tata bahasa baku, kejelasan informasi gambar dan tabel, keruntutan penulisan referensi dan daftar pustaka	1	2	3	4
Nilai Rata-rata : 4,6 (jumlah total dibagi 5)					
		Tanggal penilaian: 10 Juli 2023  Dr.apt. Hadi Sunaryo, M.Si Penilai			

**EFEK NEUROPROTEKTIF EKSTRAK BUAH *Piper cubeba*
L.f. (Piperaceae) PADA HEWAN STROKE ISKEMIK**

DISERTASI

Oleh
LUSI PUTRI DWITA
NIM: 30720304
(Program Studi Doktor Farmasi)



INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
2023

ABSTRAK

EFEK NEUROPROTEKTIF EKSTRAK BUAH *Piper cubeba* L.f. (Piperaceae) PADA HEWAN STROKE ISKEMIK

Oleh

Lusi Putri Dwita

NIM: 30720304

(Program Studi Doktor Farmasi)

Neuroproteksi merupakan upaya perlindungan neuron untuk mengurangi kerusakan saraf pada kondisi seperti Parkinson, cedera otak traumatis dan stroke iskemik. Beberapa mekanisme bahan alam yang telah diketahui sebagai neuroprotektor adalah melalui supresi stres oksidatif dan menekan neuroinflamasi yang merupakan penyebab utama gangguan neurologis. Tanaman yang diduga berpotensi memiliki efek tersebut adalah kemukus (*Piper cubeba* L. f). Tujuan penelitian ini adalah menemukan kandidat agen neuroprotektif potensial yang dapat digunakan pada gangguan neurologis, salah satunya stroke iskemik. Penelitian diawali dengan pembuatan bahan uji yang terdiri dari ekstrak etanol 70% (PC70), ekstrak etanol 96% (PC96), fraksi lignan (DCM) dan minyak atsiri (PO) *P. cubeba*. Selanjutnya dilakukan standarisasi mutu ekstrak. Analisis kandungan senyawa kimia ekstrak dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT), *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Pengujian farmakologi diawali dengan uji aktivitas antioksidan pada otak tikus, kemudian bahan uji dengan aktivitas terbaik dilanjutkan ke uji neuroprotektif pada hewan dengan gangguan kognitif. Hasil terbaik dari uji ini kemudian diformulasikan menjadi nanoemulsi, setelah itu diujikan aktivitasnya terhadap antioksidan di otak. Dua rute pemberian bahan uji yang digunakan yaitu secara **oral** dan intranasal untuk memilih rute pemberian terbaik. Terakhir dilakukan uji aktivitas neuroproteksi nanoemulsi pada hewan stroke iskemik. Pada penelitian awal, aktivitas antioksidan *P. cubeba* ditentukan berdasarkan aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT), konsentrasi nitrit oksida (NO), dan penghambatan peroksidasi lipid. Hasil uji efek antioksidan pada otak tikus menunjukkan semua kelompok uji (PC96, PC70, DCM dan PO) berpotensi menghambat lipid peroksidase secara signifikan. Aktivitas katalase pada semua kelompok menunjukkan peningkatan secara signifikan ($p < 0,05$) kecuali pada kelompok PC70. Berdasarkan kadar NO, semua kelompok uji (PC96, PC70, DCM dan PO) menunjukkan kadar NO yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$), dimana **kadar terendah terlihat pada kelompok yang mendapatkan DCM**. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat **disimpulkan aktivitas antioksidan terbaik ditunjukkan oleh PC96 dan DCM** sehingga dipilih untuk dilanjutkan pada uji fungsi kognitif pada tikus. Uji kedua dilakukan pada hewan yang diinduksi gangguan kognitif menggunakan *Electroconvulsive Shock* (ECS). Hewan diberikan zat uji selama 14 hari p.o kemudian diberikan induksi dengan ECS 200 mA 0,5

detik setiap hari selama 5 hari, dan selama induksi hewan tetap diberikan zat uji. Pada hari ke 20 fungsi kognitif hewan diuji dengan *Morris Water Maze* (MWM), dan hari ke 21 dilakukan pengambilan otak untuk uji lipid peroksidase, SOD, CAT, TNF- α dan IL-1 β . Hasil uji MWM menunjukkan PC96 dan DCM dapat meningkatkan fungsi kognitif secara signifikan ($p < 0,05$) ditandai dengan penurunan *escape time* hingga 70% lebih baik dibandingkan kontrol ECS terutama pada hari kedua dan ketiga uji MWM. Pada model hewan gangguan kognitif dengan ECS, PC96 menghambat lipid peroksidase dan meningkatkan aktivitas CAT di hipotalamus maupun di serebral korteks, sedangkan peningkatan aktivitas SOD hanya terjadi di korteks. Bahan uji DCM hanya meningkatkan aktivitas CAT di hipokampus dan SOD di korteks, namun tidak ada pengaruh terhadap lipid peroksidase. Pemberian PC96 dan DCM pada model ECS juga mampu menurunkan kadar TNF- α dan IL-1 β secara signifikan dibandingkan kontrol ECS dan sebanding terhadap *citicoline*. Berdasarkan keseluruhan data, dapat disimpulkan PC96 dan DCM memiliki efek neuroprotektif pada hewan dengan gangguan kognitif melalui mekanisme penurunan stress oksidatif dan inflamasi pada otak hewan, sehingga keduanya dilanjutkan pada formulasi sediaan nanoemulsi. Hasil uji karakteristik termodinamika nanoemulsi ekstrak (NE) dan fraksi (NF) *P. cubeba* menunjukkan nanoemulsi yang stabil, serta tidak ada perubahan ukuran maupun polidispersity index (PDI) yang bermakna. Berdasarkan hasil yang didapat, maka dapat disimpulkan formula nanoemulsi ekstrak maupun fraksi *P. cubeba* telah memenuhi karakteristik dan stabil secara termodinamik. NE dan NF kemudian diformulasikan menjadi sediaan mukoadesif untuk pemberian intranasal dan didapatkan nanoemulsi-mukoadesif ekstrak (MNE) dan fraksi (MNF). Hasil uji aktivitas katalase otak menunjukkan NE p.o, NF p.o, MNE intranasal dan MNF intranasal, dapat meningkatkan aktivitas katalase di hipokampus maupun prefrontal korteks. Namun hasil terbaik didapatkan pada kelompok NE yang diberikan p.o dan MNE intranasal, sehingga dilanjutkan pada uji neuroprotektif pada hewan stroke iskemik. Pada tahapan akhir penelitian ini, dilakukan pengujian aktivitas neuroproteksi *P. cubeba* pada hewan stroke iskemik menggunakan model intraluminal *transient Middle Cerebral Artery Occlusion* (tMCAO). Kelompok uji terdiri dari nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* dosis 100 mg/kg (PCN 100) dan 200 mg/kg (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* dosis 200mg/kg (PCE200), PCN yang diberikan secara intranasal (PCI), kontrol MCAO dan kelompok sham. Zat uji diberikan selama 14 hari, dan hari ke 15 diberikan satu jam sebelum induksi tMCAO. Pengamatan dilakukan 24 jam setelah oklusi. Hasil penelitian menunjukkan induksi tMCAO dengan oklusi 1 jam menyebabkan gangguan neurologi ringan hingga sedang. Pemberian PCN maupun PCE dapat menyebabkan penurunan keparahan gangguan neurologi menjadi gangguan ringan. Hasil pewarnaan otak dengan 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) menunjukkan infark yang signifikan pada kontrol MCAO dibandingkan kelompok PCN dan PCE. Hasil pengujian homogenat otak menunjukkan PCN maupun PCE dapat menghambat lipid peroksidase, meningkatkan aktivitas katalase dan glutathione. Begitu juga dengan sitokin inflamasi di otak, PCN dan PCE dapat menurunkan konsentrasi TNF- α dan IL-1 β . Namun hanya PCN100 yang menunjukkan peningkatan sitokin antiinflamasi (IL-10) secara signifikan dibandingkan kelompok lainnya. Oleh karena itu dapat disimpulkan PCN maupun PCE menunjukkan aktivitas neuroprotektif pada hewan yang diinduksi tMCAO dengan aktivitas terbaik

ditunjukkan oleh PCN. Berdasarkan keseluruhan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa nanoemulsi *P. cubeba* menunjukkan potensi sebagai kandidat agen neuroprotektif dengan mengurangi dampak cedera reperfusi stroke iskemik, terutama melalui mekanisme antioksidan dan antiinflamasi di otak.

Kata kunci: *P. cubeba*, nanoemulsi, neuroproteksi, stroke iskemik, antioksidan, antiinflamasi.

ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF *Piper cubeba* L.f. (Piperaceae) FRUIT EXTRACT IN ISCHEMIC STROKE ANIMALS

By

Lusi Putri Dwita

NIM: 30720304

(Doctoral Program in Pharmacy)

Neuroprotection is an approach to prevent nerve damage in conditions such as Parkinson's, traumatic brain injury, and ischemic stroke. Several natural ingredients have been shown to have neuroprotector activity, which could work through antioxidant and anti-inflammatory. One of the natural ingredients that have the potential to be developed as a neuroprotector is *Piper cubeba*, known as kemukus. This study aimed to find potential candidates for neuroprotective agents that can be used in neurological disorders, one of which is ischemic stroke. The study began with the preparation of test materials consisting of 70% ethanol extract (PC70), 96% ethanol extract (PC96), lignan fraction (DCM), and essential oil (PO) of *P. cubeba*. Furthermore, standardization of extract quality was carried out. Analysis of the chemical compound content of the PC96 and DCM was carried out by thin-layer chromatography (TLC), liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS), and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The pharmacological study begins with an antioxidant activity tests in rat brains. The material with the best brain antioxidant activity was used for neuroprotective tests in animals with cognitive impairment. PC96 and DCM were then formulated into a nanoemulsion, after which it was tested for catalase activity in the brain. Two routes of administration of the nanoemulsion were used, namely intranasal and oral. Finally, the neuroprotective activity test of nanoemulsion was performed on ischemic stroke animals. In the initial study, the tests substances were given seven days p.o. Then the antioxidant activity was determined based on the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), the concentration of nitric oxide (NO), and the inhibition of lipid peroxidation in normal rats. The results of the antioxidant effect test on rat brains showed that all test groups (PC96, PC70, DCM, and PO) could inhibit lipid peroxidase significantly. Catalase activity in all groups showed a significant increase ($p < 0.05$) except for the PC70 group. Based on NO levels, all test groups (PC96, PC70, DCM, and PO) showed significantly lower NO levels ($p < 0.05$), where the lowest levels were seen in the group that received DCM. Based on the results of this study, PC96 and DCM showed the best antioxidant activity, so they were selected for the next study. The second test was conducted on animals with cognitive impairment using Electroconvulsive Shock (ECS). Animals were given the test substance for 14 days p.o., then given induction with ECS 200 mA 0.5 seconds every day for five days, and during induction, the animals were still

given the test substance. On the 20th day, the animals cognitive function was tested with Morris Water Maze (MWM), and on the 21st day the brains were taken lipid peroxidase, SOD, CAT, TNF- α and IL-1 β tests. The results of the MWM test showed that PC96 and DCM could improve cognitive function significantly ($p < 0.05$) marked by a decrease in escape time of up to 70% better than the ECS control, especially on the second and third day of the MWM test. PC96 inhibits lipid peroxidase and increases CAT activity in the hypothalamus and cerebral cortex, whereas the increase in SOD activity only occurs in the cortex. The DCM group only increased CAT activity in the hippocampus and SOD in the cortex but did not affect lipid peroxidase. Administration of PC96 and DCM in the ECS model also significantly reduced TNF- α and IL-1 β levels compared to ECS controls and was comparable to citicoline. Based on all the data, it can be concluded that PC96 and DCM have a neuroprotective effect on animals with a cognitive impairment through the mechanism of reducing oxidative and inflammatory stress in the animal's brain so both test substances were continued for the formulation of nanoemulsion. The results of the thermodynamic characteristics test of the nanoemulsion extract (NE) and the (NF) fraction of *P. cubeba* showed a stable nanoemulsion, and there were no significant changes in size or polydispersity index (PDI). Based on the results obtained, it can be concluded that the extract nanoemulsion formula and the *P. cubeba* fraction have fulfilled the characteristics and are thermodynamically stable. NE and NF were then formulated into mucoadhesive preparations for intranasal administration, and nanoemulsion-mucoadhesive extract (MNE) and fraction (MNF) were obtained. Test results of brain catalase activity showed that NE p.o, NF p.o, intranasal MNE, and intranasal MNF could increase catalase activity in the hippocampus and prefrontal cortex. However, the best results were obtained in the NE group, which was given p.o and intranasal MNE, so it was continued in neuroprotective test in ischemic stroke animals. In the final stages of this study, the neuroprotective activity of *P. cubeba* was tested in ischemic stroke animals using the intraluminal transient Middle Cerebral Artery Occlusion (tMCAO) model. The test group consisted of 96% *P. cubeba* ethanol extract nanoemulsion doses of 100 mg/kg (PCN 100) and 200 mg/kg (PCN200), 96% *P. cubeba* ethanol extract doses of 200 mg/kg (PCE200), PCN administered intranasally (PCI), MCAO control and sham groups. The test substance was given for 14 days, and on the 15th day, it was given one hour before tMCAO induction. Observations were made 24 hours after occlusion. The results showed that tMCAO induction with 1-hour occlusion caused mild to moderate neurological disorders. The results showed that PCN and PCE could reduce the severity of neurological disorders to mild disorders. The results of brain staining with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) showed significant infarction in the MCAO control compared to the PCN and PCE groups. Brain homogenate testing results showed that both PCN and PCE could inhibit lipid peroxidase, increasing catalase and glutathione activity. PCN and PCE could also reduce the concentration of TNF- α and IL-1 β . However, only PCN100 showed a significant increase in anti-inflammatory cytokine (IL-10) compared to the other groups. Therefore, it can be concluded that both PCN and PCE showed neuroprotective activity in tMCAO-induced animals, with the best activity shown by PCN. Based on the study's overall results, it can be concluded that *P. cubeba* nanoemulsion shows potential as a candidate for the neuroprotective agent by reducing the impact of ischemic stroke

reperfusion injury, especially through antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in the brain.

Keywords: *P. cubeba, nanoemulsion, neuroprotection, ischemic stroke, antioxidant, anti-inflammatory.*

**EFEK NEUROPROTEKTIF EKSTRAK BUAH *Piper cubeba*
L.f. (Piperaceae) PADA HEWAN STROKE ISKEMIK**

Oleh
Lusi Putri Dwita
NIM: 30720304
(Program Studi Doktor Farmasi)

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui
Tim Pembimbing

Tanggal

Menyetujui
Tim Pembimbing

Tanggal

Ketua

(Dr. apt. Maria Immaculata Iwo, M.Si.)

Anggota

Anggota

(Dr. rer. Nat. apt. Rachmat Mauludin)

(Prof. Dr. apt. Elfahmi M.Si.)

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	iv
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
Bab I Pendahuluan	13
I. 1 Latar Belakang	13
I. 2 Perumusan Masalah	16
I. 3 Tujuan Penelitian	16
I. 4 Hipotesis Penelitian	17
I. 5 Manfaat Penelitian	17
Bab II Tinjauan Pustaka	18
II. 1 <i>Piper cubeba</i>	18
II. 2 Neuroproteksi	19
II. 3 Stroke Iskemik	20
II. 4 Model Hewan Stroke Iskemik	23
II. 5 Nanokarier sebagai Neuroprotektor	25
Bab III Metode Penelitian	28
III. 1 Bahan	28
III. 2 Alat	28
III. 3 Hewan Uji	28
III. 4 Ekstraksi <i>Piper cubeba</i>	28
III. 5 Fraksinasi Lignan <i>Piper cubeba</i>	29
III. 6 Ekstraksi Minyak Atsiri <i>Piper cubeba</i> (PCEO)	29
III. 7 Pemeriksaan Mutu Ekstrak	29
III. 7. 1. Pemeriksaan organoleptik	29
III. 7. 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak	29
III. 7. 3. Susut Pengerangan	30
III. 7. 4. Kadar Air	30
III. 7. 5. Uji Kadar Abu Total	30
III. 7. 6. Kadar Abu Larut Asam	30
III. 7. 7. Kadar Sari Larut Etanol	31
III. 7. 8. Penapisan Fitokimia Ekstrak	31
III. 7. 9. Penetapan Kadar Flavonoid	31
III. 7. 10. Penetapan Kadar Fenol	32
III. 8 Analisis Senyawa Kimia Ekstrak	32
III.8. 1 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	32
III.8. 2 Analisa <i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> (LC-MS) .	32
III.8. 3 Analisis <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS) ..	32
III. 9 Formulasi dan Evaluasi Sediaan Nano	33
III.9.1 Pemilihan eksipien	33
III.9.2 Pemilihan perbandingan surfaktan-kosurfaktan (S_{mix})	33
III.9.3 Pembuatan nanoemulsi <i>P. cubeba</i>	33
III.9.4 Pembuatan nanoemulsi mukoadesif <i>P. cubeba</i>	33
III.9.1 Uji Ukuran partikel, <i>Polydispersity Index</i> (PDI), dan Zeta	
potensial	34
III.9.2 <i>Robustness to dilution</i>	34
III.9.3 Uji Viskositas	34
III.9.4 Uji pH	34
III.9.5 Karakteristik stabilitas termodinamik	34

III.9.6	(Transmission Electron Microscopy) TEM analysis.....	35
III. 10	Penetapan dosis	35
III. 11	Uji Aktivitas Farmakologi	35
III.11. 1	Uji Aktivitas Antioksidan Otak <i>P. cubeba</i>	35
III.11. 2	Uji Aktivitas Neuroprotektif <i>P. cubeba</i> pada Hewan dengan Gangguan Kognitif.....	36
III.11. 3	Uji aktivitas antioksidan nanoemulsi	37
III.11. 4	Uji Aktivitas <i>P. cubeba</i> pada tikus stroke iskemik	37
III. 12	Parameter Uji Farmakologi.....	38
III.12. 1	<i>Morris water maze</i> (MWM)	38
III.12. 2	Induksi stroke sskemik dengan metode <i>transient Middle Cerebral Artery Occlusion</i> (tMCAO)	39
III.12. 3	Penilaian Defisiensi Neurologis.....	40
III.12. 4	<i>Corner Test</i>	41
III.12. 5	Evaluasi ukuran infark	41
III.12. 6	Pembuatan homogenat otak.....	42
III.12. 7	Pemeriksaan TNF- α , IL-1 β , dan IL-10.....	42
III.12. 8	Pengukuran SOD Otak.....	42
III.12. 9	Pengukuran MDA Otak.....	42
III.12. 10	Uji aktivitas katalase	43
III.12. 11	Uji kadar glutation	43
III.12. 12	Pengukuran NO (<i>Nitric oxide</i>) Otak	43
III. 13	Uji Statistik	43
Bab IV	Hasil dan Pembahasan.....	44
IV.1	Hasil ekstraksi <i>Piper cubeba</i>	44
IV.2	Hasil Penapisan Fitokimia <i>P. cubeba</i>	44
IV.3	Standardisasi Mutu ekstrak dan fraksi <i>Piper cubeba</i>	44
IV.4	Kadar Fenol dan Flavonoid.....	45
IV.5	Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	46
IV.6	Hasil Analisis <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> (LC-MS) ekstrak etanol 96% <i>P. cubeba</i>	47
IV.7	Hasil Analisis <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS).....	48
IV.8	Aktivitas Antioksidan Otak <i>Piper cubeba</i>	49
IV.9	Efek <i>Piper cubeba</i> terhadap fungsi kognitif	52
IV.10	Formulasi sediaan nanoemulsi <i>P. cubeba</i>	60
IV.11	Efek Nanoemulsi <i>P. cubeba</i> pada tikus stroke iskemik.....	67
Bab V	Kesimpulan.....	78
	DAFTAR PUSTAKA	79

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Penelitian	89
Lampiran B. Skema Uji Antioksidan Otak <i>P. cubeba</i>	90
Lampiran C. Skema Uji Neuroprotektif <i>P. cubeba</i> pada Tikus Gangguan Kognitif	91
Lampiran D. Skema Uji Neuroprotetif pada Tikus Stroke Iskemik.....	92
Lampiran E. Kode Etik Penetian	93
Lampiran F. Determinasi Tanaman Uji.....	94
Lampiran G. <i>Certificate of Analysis Cubebin</i>	95
Lampiran H. Sertifikat Strains Tikus Wistar	96

DAFTAR GAMBAR

Gambar II. 1	Stres Oksidatif dan Inflamasi otak setelah stroke iskemik.....	21
Gambar II. 2	Bagan model hewan stroke iskemik	24
Gambar III. 1	Skema uji skrining fitokimia	31
Gambar III. 2	<i>Timeline</i> pengujian fungsi kognitif <i>P. cubeba</i>	37
Gambar III. 3	Gambaran uji Morris water maze (MWM)	39
Gambar III. 4	Ilustrasi prosedur induksi tMCAO	40
Gambar IV. 1	Hasil KLT	46
Gambar IV. 2	<i>Overlay</i> komatogram LC-MS	47
Gambar IV. 3	LC-MS/MS.....	48
Gambar IV. 4	Aktivitas antioksidan otak <i>P. cubeba</i>	50
Gambar IV. 5	Asumsi mekanisme aksi <i>Piper cubeba</i> sebagai antioksidan di otak.	52
Gambar IV. 6	Hasil rata-rata escape time tikus pada uji MWM	54
Gambar IV. 7	Hasil uji <i>probe</i>	54
Gambar IV. 8	Hasil uji antioksidan otak tikus yang diinduksi ECS).	55
Gambar IV. 9	Hasil uji antiinflamasi otak tikus yang diinduksi ECS	56
Gambar IV. 10	Diagram <i>pseudo ternary phase</i>	61
Gambar IV. 11	Diagram <i>pseudo ternary phase</i> S_{mix}	61
Gambar IV. 12	Gambar TEM	64
Gambar IV. 13	Efek nanoemulsi <i>P. cubeba</i> pada aktivitas katalase (CAT)	66
Gambar IV. 14	Skor neurologis hewan.....	67
Gambar IV. 15	Hasil corner test.....	68
Gambar IV. 16	Foto otak representatif dengan perwarnaan TTC.	69
Gambar IV. 17	Hasil uji lipid peroksidasi O.....	70
Gambar IV. 18	Hasil uji aktivitas katalase (CAT).	71
Gambar IV. 19	Hasil uji kadar glutathion tereduksi (GSH) AO.	71
Gambar IV. 20	Hasil uji kadar TNF- α	73
Gambar IV. 21	Hasil uji kadar IL-1 β	73
Gambar IV. 22	Hasil uji kadar IL-10	74
Gambar IV. 23	Ilustrasi mekanisme neuroproteksi <i>P. cubeba</i> pada stroke iskemik	75

DAFTAR TABEL

Tabel III. 1 <i>Modified Neurological Severity Score</i> (mNSS)	40
Tabel IV. 1 Rendemen ekstrak, fraksi dan minyak atsiri <i>P. cubeba</i>	44
Tabel IV. 2 Hasil skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi <i>P. cubeba</i>	44
Tabel IV. 3 Hasil standardisasi mutu ekstrak dan fraksi <i>P. cubeba</i>	45
Tabel IV. 4 Hasil uji kadar fenol dan flavonoid ekstrak dan fraksi <i>P. cubeba</i>	45
Tabel IV. 5 Hasil analisis <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS) ..	48
Tabel IV. 6 Formula, diameter dan PDI nanoemulsi ekstrak etanol 96% <i>P. cubeba</i> (PC).....	61
Tabel IV. 7 Formula, diameter dan PDI nanoemulsi Fraksi Lignan <i>P. cubeba</i> (DCM).....	62
Tabel IV. 8 Hasil uji stabilitas termodinamika nanoemulsi ekstrak etanol 96% <i>P. cubeba</i> (PC).....	63
Tabel IV. 9 Hasil uji stabilitas termodinamika nanoemulsi fraksi lignan <i>P. cubeba</i> (DCM).....	63
Tabel IV. 10 Zetapotensial, pH dan Viskositas	64

Bab I Pendahuluan

I. 1 Latar Belakang

Neuroproteksi merupakan strategi untuk melindungi otak dari cedera baik akut (misalnya stroke atau trauma) dan gangguan kronis (misalnya penyakit Alzheimer dan penyakit Parkinson) (Kumar and Khanum, 2012). Beberapa mekanisme kerja neuroprotektor yang telah diketahui diantaranya melalui inhibisi eksitasi glutamate, modulasi polarisasi mikroglia, antioksidan dan anti-inflamasi (Paul and Candelario-jalil, 2021). Penelitian menunjukkan bahwa respons inflamasi kronis neuroglia memainkan peran penting dalam patologi di saraf pusat (Perry et al., 2010), sehingga menjadi target menarik untuk pengembangan neuroproteksi, salah satunya pada stroke iskemik.

Stroke merupakan penyebab kematian kedua dan penyebab kecacatan ketiga di dunia (Johnson et al., 2016) dan menempati urutan pertama di antara semua gangguan neurologis (Shekhar et al., 2018). Data dari riskesdas didapatkan penderita stroke di Indonesia mencapai lebih dari 2.5 juta penduduk (Kemenkes RI, 2018). Diantara kasus stroke, 85% lebih merupakan stroke iskemik (Wells et al., 2017). Stroke iskemik terjadi ketika aliran darah ke otak terganggu sehingga menyebabkan penurunan nutrisi dan oksigen ke otak. Saat ini *Recombinant tissue plasminogen activator* (tPA) merupakan satu-satunya pilihan terapi yang dapat digunakan untuk stroke iskemik akut. tPA bekerja sebagai trombolitik untuk mengembalikan aliran darah ke otak (reperfusi). Hasil penelitian di Indonesia menunjukkan terapi ini hanya dapat diterapkan pada kurang dari 6,9% pasien. Penyebab utamanya adalah keterlambatan datang ke rumah sakit, dimana obat ini hanya efektif jika digunakan kurang dari 4,5 jam setelah stroke (Situmeang et al., 2023). Oleh karena itu diperlukan terapi tambahan, salah satunya menggunakan neuroprotektor, terutama untuk mengurangi dampak cedera reperfusi pasca stroke iskemik.

Pemulihan perfusi ke otak setelah iskemik penting untuk mengurangi kerusakan otak, tapi sering kali terganggu akibat adanya inflamasi, stress oksidatif dan

apoptosis sel yang mengakibatkan kematian sel saraf (Shichita et al., 2012). Reperfusi setelah stroke iskemik dapat menyebabkan peningkatan inflamasi dan stres oksidatif di otak sehingga pada akhirnya meningkatkan ukuran lesi dan juga memperburuk kerusakan sawar darah dan menyebabkan edema otak.

Hasil penelitian menunjukkan inflamasi berperan besar dalam menyebabkan kerusakan neuron setelah reperfusi pada stroke iskemik (Ahmad and Graham, 2010). Respon inflamasi setelah stroke iskemik akut adalah fenomena yang telah dipelajari secara luas. Adanya sel nekrotik dan peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS) akibat iskemia dapat menyebabkan peradangan saraf (Kim et al., 2016). Salah satu dampak inflamasi pada otak dapat mengakibatkan kerusakan sel otak dan berujung pada kecacatan (Umarova et al., 2019). Tujuan utama terapi menggunakan neuroprotektor adalah untuk menyelamatkan area penumbra sehingga mencegah gangguan neurologis yang lebih parah (Nozohouri et al., 2020). Pengembangan agen neuroprotektif, salah satunya melalui mekanisme anti-inflamasi dan antioksidan, dapat berpotensi menurunkan mortalitas dan kecacatan pada pasien stroke iskemik (Shekhar et al., 2018). Penelitian efek neuroprotektif telah banyak dilakukan menggunakan bahan sintetik maupun bahan alam, namun hingga saat ini belum ada agen neuroprotektif yang lolos uji klinis (Paul and Candelario-jalil, 2021), sehingga pencarian dan pengembangan neuroprotektor merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Salah satu tanaman yang berpotensi memiliki efek neuroprotektif adalah *Piper cubeba*. Tanaman ini termasuk dalam genus piper, dikenal dengan nama kemukus di Indonesia.

Secara empiris masyarakat telah menggunakan air rebusan buah *P. cubeba* untuk meredakan sakit kepala (Abolhasanzadeh et al., 2017) dan memperkuat memori setelah stroke (Adams et al., 2007). Penelitian menunjukkan efek *P. cubeba* sebagai antiinflamasi dan antioksidan yang merupakan mekanisme utama neuroprotektor, terutama bagian buah. Ekstrak buah *P. cubeba* menunjukkan potensi sebagai anti-inflamasi pada berbagai model hewan (E.-M. Choi and Hwang, 2003; E. M. Choi and Hwang, 2005; V. A. de Souza et al., 2005). Secara invitro, *P. cubeba* menunjukkan aktivitas inhibisi *Cyclooxygenase* (COX)-1, COX-2 dan 5-

Lipoxygenase (LOX) (Yam et al., 2008), termasuk juga inhibisi aktivasi *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) serta menghambat *Tumor necrosis factor* (TNF)- α dan *Interleukin* (IL)-1 β (Deme et al., 2019; Qomaladewi et al., 2019). *P. cubeba* juga menunjukkan efek antioksidan yang kuat (Alminderej et al., 2020; Andriana et al., 2019; Nahak and Sahu, 2011).

Spesies lain dari genus yang sama seperti *P. longum* dan *P. nigrum* telah terbukti dapat digunakan sebagai neuroprotektor pada model hewan alzheimer (Ahmed et al., 2013; Noumedem et al., 2014) maupun hewan stroke iskemik (Hua et al., 2019; Wang et al., 2017; Yiwei Zhang et al., 2020). Namun demikian penelitian *P. cubeba* sebagai neuroprotektor belum banyak dilakukan. Meskipun demikian penelitian menunjukkan kemampuan antioksidan *P. cubeba* lebih baik dibandingkan *P. nigrum* (Choi and Hwang, 2005).

Di antara senyawa kandungan *P. cubeba*, lignan merupakan salah satu komponen yang berpotensi memiliki aktivitas pelindung saraf. Lignan adalah metabolit sekunder dari dimerisasi oksidatif fenilpropanoid dan telah dipelajari untuk berbagai aktivitas biologis (Barker, 2019). Banyak penelitian telah mengkonfirmasi efek neuroprotektif dari ekstrak kaya lignan atau lignan, seperti lignan dari *Eucommia ulmoides* (Han et al., 2022), lignan dari *Crataegus pinnatifida* (Xin et al., 2022), dan lignan dari *Pteris laeta* (Yan Zhang et al., 2022). Lignan dari *P. cubeba* juga telah banyak diteliti, diantaranya cubebin dan hinokinin menunjukkan aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan edema dan sebagai analgesik (Godoy de Lima, Barros, and da Silva Laurentiz, 2018). Cubebin dari *P. cubeba* juga menunjukkan potensi sebagai neuroprotektan dan meningkatkan memori pada mencit yang diinduksi skopolamin (Somani et al., 2017)

Penelitian yang telah ada menunjukkan ekstrak dan lignan dari *P. cubeba* memiliki potensi sebagai neuroprotektor, dan aplikasi efek ini terhadap hewan model stroke iskemik belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas *P. cubeba* dalam mengurangi dampak cedera reperfusi pasca stroke iskemik. Meskipun uji praklinis menunjukkan banyak

kandidat potensial, hasil uji klinis neuroprotektor belum menunjukkan hasil yang menjanjikan. Diantara penyebab kegagalan ini diantaranya, ketersediaan hayati obat di otak terbatas dan waktu pemberian agen neuroprotektif yang terlambat pada manusia. Salah satu solusi untuk masalah ini adalah pemberian neuroprotektor dalam bentuk sediaan nano (Naqvi et al., 2020), sehingga pada penelitian juga dilakukan pengembangan sediaan nanoemulsi *P. cubeba* dan diujikan pada hewan stroke iskemik. Induksi stroke dilakukan dengan metode tMCAO (*transient middle cerebral artery occlusion*) pada tikus dengan parameter pengamatan meliputi uji fungsi neurologis, volume infark, serta mekanisme antioksidan dan antiinflamasi.

I. 2 Perumusan Masalah

Kecacatan setelah stroke secara langsung berhubungan dengan kejadian cedera reperfusi pada pasien pasca stroke. Salah satu pendekatan terapi yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak cedera reperfusi setelah stroke adalah melalui neuroprotektor. Hasil penelitian terbaru menunjukkan terapi neuroprotektor menggunakan antiradang dan antioksidan pada model hewan stroke iskemik menunjukkan penurunan kerusakan penumbra pada otak. Salah satu bahan alam yang berpotensi memiliki efek tersebut adalah *P. cubeba*. Meskipun telah banyak penelitian *P. cubeba* sebagai antiinflamasi dan antioksidan, aplikasi efek ini terhadap hewan model stroke iskemik belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas *P. cubeba* sebagai neuroprotektif dalam mengurangi dampak cedera reperfusi di otak pasca stroke iskemik.

I. 3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan neuroprotektif dari bahan alam yaitu buah *P. cubeba* melalui:

- Pengujian aktivitas antioksidan *P. cubeba* di otak dalam bentuk ekstrak, fraksi lignan dan minyak atsiri.
- Pengujian aktivitas neuroproteksi *P. cubeba* pada hewan dengan gangguan kognitif
- Pembuatan sediaan nanoemulsi *P. cubeba* dan uji antioksidan otak
- Pembuatan hewan model stroke iskemik dengan tMCAO

- Pengujian aktivitas neuroproteksi *P. cubeba* pada model hewan stroke iskemik.

I. 4 Hipotesis Penelitian

Hipotesa penelitian ini adalah *P. cubeba* memiliki aktivitas neuroprotektif yang dapat mencegah kerusakan pada otak hewan yang diinduksi stroke iskemik yang ditunjukkan melalui mekanisme antiinflamasi dan antioksidan.

I. 5 Manfaat Penelitian

Perkembangan berbagai pilihan terapi untuk mengurangi cedera reperfusi pasca stroke iskemik menunjukkan harapan besar untuk mencegah kecacatan. Hal ini menjadi alasan pentingnya penelitian pencarian kandidat obat yang dapat digunakan sebagai neuroprotektor dengan mengurangi dampak stress oksidatif dan inflamasi pada otak. Hasil pengujian ini juga akan membuka peluang pengujian dan penerapan penggunaan *P. cubeba* pada penyakit neurodegeneratif lainnya.

Bab II Tinjauan Pustaka

II. 1 *Piper cubeba*

Kemukus termasuk divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, ordo Piperales, famili Piperaceae, genus Piper L., spesies *Piper cubeba* L. f. Buah kemukus berbentuk hampir bulat, bertangkai, permukaan luar berwarna coklat tua, berkerut keras, mengandung minyak atsiri tidak kurang dari 0.75% v/b atau kubebin tidak kurang dari 0.1% (*Farmakope Herbal Indonesia*, 2017). Tanaman ini, terutama bagian buah, telah diteliti memiliki aktivitas farmakologi diantaranya antioksidan, anti-inflamasi, analgesik, antimikroba dan antiparasit (Abdul-jalil and Nasser, 2020).

Aktivitas antiinflamasi buah *P. cubeba* telah diteliti menggunakan ekstrak etanol, ekstrak methanol, ekstrak air, fraksi, minyak atsiri, bahkan isolatnya baik secara in-vitro maupun in-vivo. Ekstrak *P. cubeba* menunjukkan hambatan udem (28 %) pada mencit yang diinduksi karagenan pada dosis 150 mg/kg dan tidak menunjukkan gejala toksik hingga dosis 2000 mg/kg BB mencit (Perazzo et al., 2013a). Ekstrak 96% bebas lemak *P. cubeba* menghambat aktivitas siklooksigenase (COX-1 dan COX-2) dan 5-lipoksigenase (Yam et al., 2008). (–)-O-benzyl cubebin, turunan dari cubebin dapat menghambat udem yang diinduksi prostaglandin sebesar 66%, dan hasil uji in-silico menunjukkan senyawa ini memiliki ikatan yang stabil dengan enzim siklooksigenase (COX) (Lima et al., 2017). Minyak atsiri *P. cubeba* juga menunjukkan potensi dalam menghambat TNF- α dan IL-1 β , serta menurunkan ekspresi iNOS dan COX-2 secara signifikan, terutama dalam bentuk sediaan nanoemulsi pada dosis 40 mg/kg BB tikus (Shakeel et al., 2015).

Hasil uji in-vitro menunjukkan potensi antioksidan minyak atsiri *P. cubeba* lebih baik dibandingkan *P. nigrum*, dimana hasil uji DPPH menunjukkan **IC50** *P. cubeba* 0.82 mg/mL dan *P. nigrum* 1.15 mg/mL (Andriana et al., 2019). Uji antioksidan penelitian lain menunjukkan hasil 106.00 ± 0.11 μ g/mL pada uji *ferric*

reducing/antioxidant power (FRAP) ($106.00 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$) dan IC_{50} $315.00 \pm 2.08 \mu\text{g/mL}$ pada uji *β -carotene bleaching* (Alminderej et al., 2020).

Ekstrak etanol *P. cubeba* menunjukkan total fenol sekitar $123 \mu\text{g/g}$, lebih tinggi dibandingkan *P. nigrum* ($62.3 \mu\text{g/g}$), dan hasil skrining menunjukkan positif alkaloid, glikosida, steroid, flavonoid, tannin, dan antrakuinon (Nahak and Sahu, 2011). *P. cubeba* juga mengandung resin 7,5%, gum 8%, minyak lemak 1% dan minyak 18%. Lignan dari buah *P. cubeba* seperti cubebin, hinokinin, clusin, dihydrocubebin, cubebinolide, cubebinone dan 5-methoxyhinokinin, sedangkan minyak atsirinya terdiri dari sabinene, δ -4 carene, 1-4 cineole, sesquiterpenes seperti l-cadinene (Daniel, 2006). Cubebin, hinokinin, dan yatein merupakan lignan yang dominan ditemukan pada buah *P. cubeba* (Elfahmi et al., 2007). Berdasarkan penelitian, cubebin merupakan salah satu isolat *P. cubeba* yang banyak dieksplorasi, termasuk sebagai neuroprotektor pada model hewan amnesia (Somani et al., 2017). Lignan lain dari *P. cubeba*, (+)-medioresinol dan aschantin sebagai inhibitor LOX dan anti-agregasi platelet, magnosalin dan heterotropin sebagai antioxidant, serta kadsurin A dan piperenone sebagai neuroprotektan (Fan et al., 2023)

II. 2 Neuroproteksi

Neuroproteksi secara khusus didefinisikan sebagai perlindungan neuron dan merupakan strategi yang digunakan untuk melindungi otak pada kondisi seperti Parkinson, cedera otak traumatis dan stroke iskemik (Goenka et al., 2019). Pengobatan neuroprotektif merupakan terapi yang menghambat cedera otak selama atau setelah terpapar iskemia pada proses seluler (Ovbiagele et al., 2003). Sedangkan neuroprotektan atau neuroprotektor mengacu pada obat yang mampu mengurangi cedera otak iskemik dengan melawan peristiwa molekuler yang merugikan di otak namun tidak termasuk meningkatkan aliran darah otak (Paul and Candelario-jalil, 2021). Neuroproteksi juga digunakan untuk istilah “sitoproteksi,” terutama bila diterapkan pada pengobatan stroke di mana neuron, dan sel glial memerlukan perlindungan setelah peristiwa iskemik (Lapchak and Araujo, 2007).

Saat ini telah banyak dikembangkan agen neuroprotektif namun belum ada yang berhasil melewati fase uji klinis. Pendekatan baru banyak beralih pada bahan alam dengan multimekanisme. Beberapa mekanisme bahan alam yang telah diketahui sebagai neuroprotektor adalah melalui supresi stres oksidatif, menekan neuroinflamasi, modulasi polarisasi mikroglia, dan regulasi metabolisme, dan menjaga integritas sawar darah otak (Tao et al., 2020).

Studi terbaru mengidentifikasi peradangan saraf sebagai penentu utama prognosis stroke, dan menunjukkan bahwa menghambat respons inflamasi setelah stroke akut dapat mencegah cedera otak dan oleh karena itu meningkatkan fungsi neurologis jangka Panjang. Senyawa natural memiliki potensi tinggi untuk melindungi otak dari cedera reperfusi iskemik dengan mengurangi peradangan saraf selama tahap stroke akut (Tao et al., 2020). Mediator inflamasi memainkan peran penting dalam perkembangan kerusakan otak pasca iskemik, sehingga jalur inflamasi pasca stroke menjadi target potensial untuk agen neuroprotektif (Paul and Candelario-jalil, 2021).

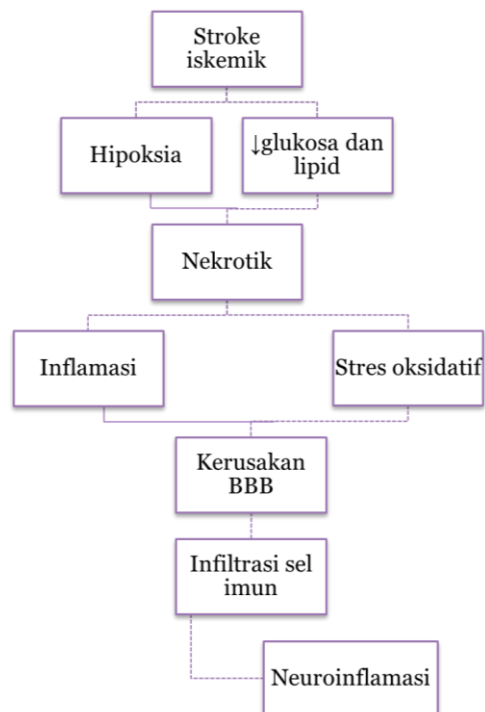
II. 3 Stroke Iskemik

Stroke merupakan kematian sel otak mendadak karena kekurangan oksigen akibat penurunan aliran darah ke otak yang disebabkan sumbatan maupun pecahnya pembuluh darah arteri menuju otak (WHO). Stroke merupakan penyebab kematian kedua dan penyebab kecacatan ketiga di dunia, serta penyebab utama demensia dan depresi. Stroke dibagi menjadi stroke iskemik dan stroke hemoragik, dimana secara global kasus stroke iskemik lebih tinggi (87%) dibanding stroke hemoragik (13%) (Wells et al., 2017).

Stroke iskemik dapat disebabkan oleh embolus, yaitu masa yang berpindah dari arteri intra ataupun ekstrakranial. Sumber embolus dapat berupa bekuan darah dari jantung atau kolesterol dari arteri karotid atau arteri basilar. Embolus dari jantung misalnya, dapat berpindah melalui aorta ke sirkulasi serebral, dan terjebak di arteri serebral, menurunkan aliran darah ke otak, sehingga menyebabkan iskemia. Kolesterol juga dapat terseposit di arteri basilar, di *internal carotid artery* (ICA) atau di *middle carotid artery* (MCA) dan membentuk *carotid atherosclerotic*

plaques. Plak tersebut pecah dan terekspos kolagen. Selanjutnya terjadi agregasi platelet dan terbentuk trombus yang menyumbat di pembuluh serebral (Lee, 2018). Pembuluh darah yang mengalami sumbatan menjadi *ischemic core* dan area sekitarnya disebut penumbra. Aliran darah pada *ischemic core* <2%, dengan penurunan pasokan glukosa dan oksigen sehingga mengakibatkan nekrosis dalam beberapa menit. Sedangkan area penumbra masih mendapat pasokan glukosa dan oksigen dari arteri kolateral sehingga dapat bertahan beberapa jam. Pencegahan perluasan penumbra seringkali dijadikan target pengobatan neuroprotektif (Shekhar et al., 2018).

Kematian sel setelah iskemik menyebabkan peningkatan *Reactive oxygen species* (ROS) yang di produksi sel nekrotik. Stres oksidatif menginduksi pelepasan *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang memicu reaksi inflamasi melalui aktivasi mikrogila, yang pada akhirnya mengaktifasi *Matrix metalloproteinase* (MMP)-9 dan menyebabkan kerusakan *Blood brain barrier* (BBB). Pada akhirnya mengakibatkan lebih banyak sel imun yang berinfiltrasi ke otak dan menyebabkan inflamasi kronis (Gambar II.1).



Gambar II. 1 Stres Oksidatif dan Inflamasi otak setelah stroke iskemik

Sitokin merupakan protein yang disekresikan oleh sel untuk meregulasi dan mempengaruhi respon imun. Di antara sel yang dapat mengeluarkan sitokin: neutrofil, makrofag, sel T, sel B, sel *Natural killer* (NK), monosit, sel endotel, dan sel epitel. Sel yang berbeda dapat menghasilkan sitokin yang sama, dan sitokin yang berbeda dapat menghasilkan efek yang sama. Pada kondisi stroke, mikroglia, astrosit, sel endotel dan sel saraf mensekresikan sitokin pro-inflamasi maupun anti-inflamasi. Rilis sitokin pro-inflamasi dapat mengakibatkan aktivasi sel imun dan produksi sitokin lebih lanjut. Pengeluaran sitokin ini berhubungan langsung dengan ukuran infark dan dapat memperburuk kondisi klinis. Di antara sitokin yang telah diteliti berhubungan erat dengan kondisi stroke adalah *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *Interleukin* (IL)1- β , dan IL-10. Sitokin-sitokin ini telah dijadikan target terapi dan biomarker untuk prognosis stroke (Balch et al., 2020).

Sebagian besar sel di otak mengekspresikan *tumor necrosis factor receptor* (TNFR)1 yang dapat memunculkan sinyal untuk kematian dan kelangsungan hidup sel dengan merekrut protein adaptor lain. Perekrutan protein adaptor seperti *caspase-8* yang menyebabkan apoptosis. TNF- α ditemukan pada mikroglia otak pasien stroke iskemik tiga hari setelah stroke. Sitokin ini juga meningkat di *cerebrospinal fluid* (CSF) dan plasma dalam 24 jam setelah stroke (Doll et al., 2014).

Selama iskemia akut, terjadi juga peningkatan pelepasan IL1- β . Peningkatan IL1- β dapat menyebabkan peningkatan kalsium intrasel melalui kanal ion reseptor NMDA yang mengakibatkan kematian sel saraf. Selain itu, IL1- β dapat mempotensiasi inflamasi dengan mengaktifkan mikroglia, dan meningkatkan infiltrasi leukosit dengan meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel endotel, serta menyebabkan kerusakan sawar darah otak yang berkontribusi pada peningkatan ukuran infark dan hasil klinis yang buruk (Doll et al., 2014).

Selain sitokin pro-inflamasi terdapat sitokin anti-inflamasi di otak dengan fungsi neuroproteksi. IL-10 adalah sitokin antiinflamasi yang dapat memblokir produksi sitokin pro-inflamasi, sekresi kemokin, dan menghambat presentasi antigen oleh

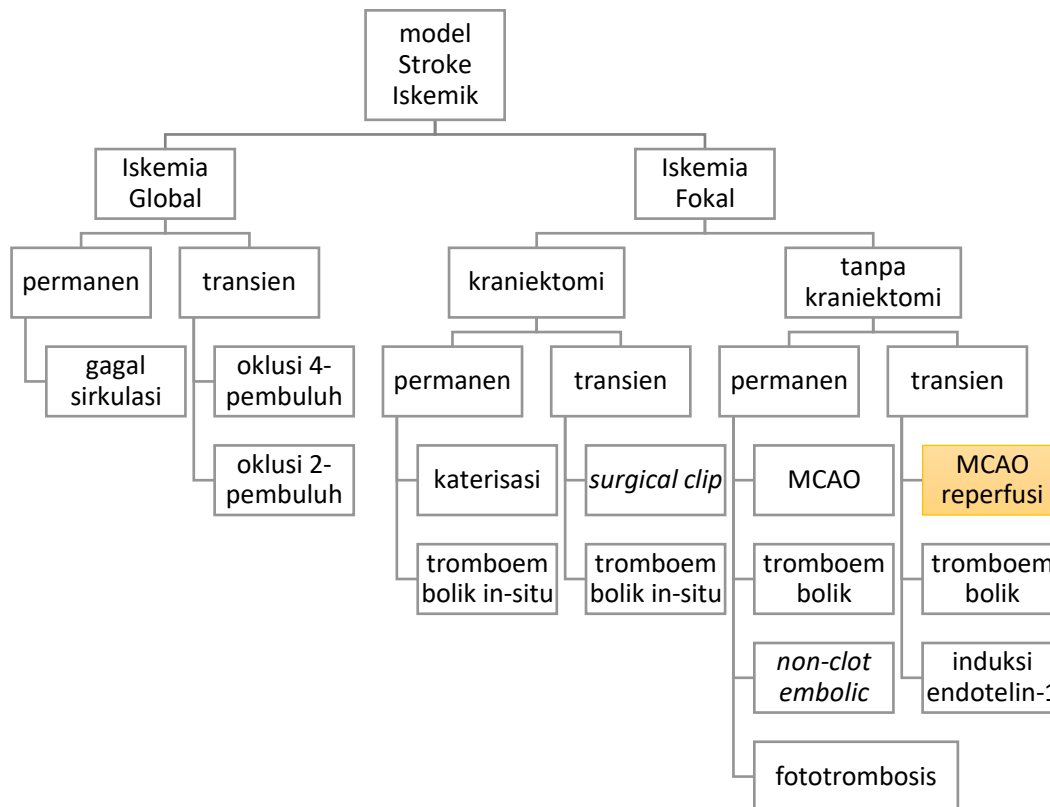
makrofag dan mikroglia. IL-10 juga dapat melawan efek merugikan dari TNF- α dengan menghambat aktivasi jalur sinyal yang diinduksi oleh TNF- α (Doll et al., 2014).

II. 4 Model Hewan Stroke Iskemik

Model hewan stroke telah dilakukan pada banyak spesies hewan, tetapi di antara hewan yang paling umum digunakan adalah hewan kecil, khususnya hewan pengerat. Salah satu kelebihan mencit atau tikus adalah memiliki *Willis circle*, seperti halnya manusia. Namun, satu kelemahan yang pasti adalah morfologi otak hewan pengerat adalah *lissencephalic*, sementara otak manusia *gyrencephalic*.

Seperti terlihat pada Gambar II.2, model hewan untuk stroke iskemik sudah banyak dikembangkan, baik berupa iskemia global maupun fokal. Iskemia global menggambarkan keadaan henti jantung atau tenggelam pada manusia, sedangkan stroke iskemik lebih direpresentasikan oleh model iskemia fokal dimana model permanen menggambarkan stroke hemisferal (trombotik atau embolik tanpa rekanalisasi atau tanpa terapi trombolitik). Sedangkan model *transient focal ischemic*, seperti *Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) dengan reperfusi menggambarkan stroke dengan rekanalisasi spontan atau setelah mendapat terapi trombolitik, yang merupakan mayoritas dari semua stroke.

Reperfusi meniru pemulihan aliran darah pada manusia setelah terjadi lisis spontan dari bekuan tromboemboli. Selama reperfusi, pembentukan nitrit oksida (NO) dan produksi radikal bebas secara khusus berkontribusi pada “cedera reperfusi” terutama berlaku untuk model “iskemia ringan”. Kondisi iskemia fokal bisa didapatkan dengan *craniectomy* maupun *non-craniectomy*. Model *craniectomy* memiliki beberapa kekurangan diantaranya menyebabkan trauma pada tengkorak, perubahan suhu regional otak, peningkatan tekanan intrakranial dan mempengaruhi fungsi *blood brain barrier* (BBB). Oleh karena itu model *non-craniectomy* lebih disukai.



Gambar II. 2 Bagan model hewan stroke iskemik (Graham et al., 2004; Walz, 2016)

Hingga saat ini model *intraluminal suture MCAO* menjadi pilihan utama untuk penelitian neuroprotektor, dikarenakan menyerupai kondisi stroke iskemik pada manusia, menghasilkan area penumbra, *reproducible*, reperfusi dapat dikontrol dan tidak memerlukan *craniectomy* (Kumar et al., 2016). Kekurangan model MCAO dengan reperfusi adalah saat membuka klip atau penarikan filamen intraluminal menyebabkan reperfusi instan pada model hewan, sedangkan pada manusia, pemberian trombolisis atau reperfusi spontan menghasilkan memulihkan aliran darah yang lebih lambat (Walz, 2016).

Middle Cerebral Artery (MCA) dan cabangnya adalah pembuluh darah otak yang paling sering terkena stroke iskemik (70%). Model oklusi MCA dibagi menjadi MCA proksimal (pMCA) dengan oklusi pada pembuluh darah besar menghasilkan iskemia fokal, dan MCA distal dengan oklusi di pembuluh darah kecil (membutuhkan *craniectomy*). Model pMCAO merupakan model yang paling sering digunakan penelitian, dengan cara memasukkan benang pada *internal carotid artery* (ICA) hingga melewati *circle of willis* dan menyumbat secara langsung di

MCA. Benang yang dimasukkan dapat berupa nilon yang dilapisi silikon atau nilon yang ditumpulkan menggunakan panas. Kekurangan dari model ini adalah proses memasukkan nilon dapat merusak endotel pembuluh darah secara langsung. Jika benang dikeluarkan setelah waktu tertentu, maka didapatkan model MCAO dengan reperfusi, sedangkan model MCAO permanen didapatkan dengan cara membiarkan benang di pembuluh darah.

II. 5 Nanokarier sebagai Neuroprotektor

Pendekatan pengobatan stroke salah satunya menggunakan bahan alam. Namun bahan alam memiliki keterbatasan seperti ketersediaan hayati yang rendah, sulit melewati BBB, ketidakstabilannya pada pH fisiologis, metabolisme yang cepat, dan eliminasi sistemik cepat. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan pengantaran yang efektif. Salah satu pendekatan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan bahan alam sebagai neuroprotektor adalah menggunakan sediaan nano. Nanomaterial dapat melewati BBB melalui mekanisme non-invasif (Moradi et al., 2020).

Beberapa nanoformulasi yang telah digunakan untuk bahan alam seperti *Polymeric Nanoparticles (PNPs)*, *Nanocapsules*, *Nanospheres*, *Polymeric Nanogels*, *Nanosuspensions*, *Carbon Nanotubes (CNTs)*, *Nanofiber*, *Polymeric Nanomicelles*, *niosomes* dan *Polymeric Nanoliposomes*, dimana sediaan nano tersebut berhasil meningkatkan aktivitas neuroproteksi, bioavailabilitas, memperbaiki farmakokinetika obat, meningkatkan ambilan dan konsentrasi di otak, memperbaiki memori dan gangguan belajar, serta meningkatkan stabilitas obat (Moradi et al., 2020).

Bentuk nanopartikel ekstrak bahan alam juga telah dimanfaatkan untuk penyakit neurodegeneratif. Sebagai contoh formulasi niosom ekstrak *Ginkgo biloba* terbukti memperbaiki bioavailabilitas pada penggunaan oral, memperbaiki profil farmakokinetika, dan meningkatkan pengantaran obat ke otak (Shinji et al., 2011). Senyawa alam yang telah diformulasikan dalam bentuk nano untuk terapi stroke diantaranya *Solid Lipid Nanoparticle* curcumin (oral) dapat menurunkan sitokin

TNF- α dan IL-1 β , mengurangi stress oksidatif, mencegah kerusakan saraf, menurunkan edema otak dan memperbaiki neurogenesis dan angiogenesis di otak (Moradi et al., 2020; Mutoh et al., 2016; Naqvi et al., 2020).

Idealnya, untuk pengobatan stroke, terapi awal diberikan dalam bentuk sediaan intravena, dan kemudian diubah menjadi formulasi oral segera setelah pasien memiliki kontrol yang memadai. Hal ini disebabkan pemakaian terapi jangka Panjang setelah stroke, yang tujuannya untuk melindungi saraf. Pengembangan obat yang diberikan secara oral dengan karakteristik seperti *nanomedicine* yang diabsorpsi dengan baik akan menjadi pengobatan oral yang ideal untuk mengobati stroke (Mutoh et al., 2016).

Salah satu nanokarier yang banyak dikembangkan sebagai neuroprotektan ada nanoemulsi atau mikroemulsi (Chatterjee et al., 2019), dan banyak diantaranya digunakan secara intranasal. Penggunaan secara intranasal memiliki beberapa keunggulan, termasuk non-invasif, menghindari BBB, eliminasi hati dan gastrointestinal, meningkatkan keamanan, onset cepat dan mengurangi paparan sistemik (Bourganis et al., 2018). Rute intranasal juga menyediakan akses langsung ke otak melalui jalur *olfactory* dan trigeminal. Pada jalur *olfactory*, obat dapat melewati jalur epitel, baik transeluler maupun paraseluler. Obat juga bisa masuk ke otak melalui lamina propria, *cribriform plate* hingga *olfactory bulb*, atau langsung masuk melalui saraf di rongga epitel hidung (Crowe et al., 2018). Jalur mukosa *olfactory* adalah rute terbaik untuk obat yang ditujukan untuk pengiriman sistem saraf pusat (Veronesi et al., 2020).

Penghantaran obat dari hidung ke otak memiliki beberapa keterbatasan, seperti dibersihkan dengan cepat oleh pembersihan mukosiliar, di mana obat berukuran besar dieliminasi lebih cepat. Selain itu, muatan negatif di rongga intranasal memiliki muatan negatif, meningkatkan pembersihan silia obat dengan muatan permukaan negatif. Beberapa strategi telah dikembangkan untuk meningkatkan efektivitas formula obat intranasal dengan target otak, termasuk menambahkan peningkat permiasi seperti surfaktan yang dapat mengurangi gerakan silia. Vasokonstriktor

dapat mengurangi paparan sistemik, dan menambahkan agen mukoadesif dapat mengurangi eliminasi silia (Bourganis et al., 2018). Agen mukoadesif seperti polisakarida yang paling umum untuk sediaan intranasal adalah kitosan. Kitosan termasuk dalam kategori *Generally Safe Material* (GRAS), biokompatibel, biodegradabel, dan secara sementara dapat membuka *tight junction* pada sel epitel dan meningkatkan penghantaran obat intranasal (S. S. Davis and Illum, 2003).

Bab III Metode Penelitian

III. 1 Bahan

Buah *Piper cubeba* , etanol 96%, etanol 70%, *MCAO suture* (Docol), benang bedah silk 5-0 (Mersilk[®]), benang silk bedah 3-0, ketamin, *xylazine*, lidokain gel, spuit, sukrosa, kit ELISA TNF- α (BT Lab), IL-1 β (BT Lab), dan IL-10 (BT Lab), *triphenyl-tetrazolium chloride* (TTC), SOD assay kit (Elabscience), dragendorff, mayer, bouchardat, NaOH, serbuk Mg, NH₃, H₂SO₄, FeCl₃, *Liebermann-Burchard*, Gelatin, *folin ciocalteu*, Asam Tiobarbiturat (TBA) (Merck), Asam Trikloroasetat (TCA) (Merck), KH₂PO₄, NaOH, Tetraetoksipropan (Merck), *Chitosan medium molecular weight* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

III. 2 Alat

Alat bedah, alat distilasi, *vascular clip*, *ELISA reader*, spektrofotometer uv-vis, perangkat corner test, perangkat *Morris Water Maze* (MWM), *Particle size analyzer* (DelsaMax PRO, Beckman Coulter , US), *Tranmission electron microscopy* (TEM) (Jeol JEM-1400), *viscometer* (ViscoQC 300, Anton Paar, Austria), *ultrasonic bath sonicator*, *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS), *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

III. 3 Hewan Uji

Uji antioksidan otak: Tikus jantan galur Wistar 2-3 bulan, berat 180-230 gr didapatkan dari Biofarma, Jl. Kolonel Masturi No. Kav 10, Kertawangi, Kec. Cisarua, Kabupaten Bandung Barat, Jawa Barat. Uji kognitif dan stroke iskemik: Tikus jantan galur Wistar 2-4 bulan, berat 200-270 gram didapatkan dari PT. Kemuning, Ngargoyoso Karanganyar , Jawa tengah. Hasil identifikasi hewan LIPI No. B-23167/IPH.1/KS.02.03/VI/2019. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah, Prof. DR HAMKA (KEPK-UHAMKA), Jakarta, No: 03/21.08/02172.

III. 4 Ekstraksi *Piper cubeba*

Tiga kilogram buah *P. cubeba* kering di haluskan dan di ayak dengan mesh 20. Kemudian serbuk diekstraksi masing-masing 1 kg menggunakan etanol 70% dan 2

kg dengan etanol 96%. Proses Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, dimana serbuk *P. cubeba* direndam dengan pelarut dengan perbandingan 1:10. Selama perendaman dilakukan pengadukan pada 6 jam pertama dan kemudian diaduk sesekali. Setelah 24 jam, serbuk disaring, dan ampasnya di remaserasi sebanyak 4 kali. Maserat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 50 rpm kemudian dikeringkan dengan oven 60°C hingga diperoleh ekstrak kental.

III. 5 Fraksinasi Lignan *Piper cubeba*

Satu kilogram buah *P. cubeba* kering di haluskan dan di ayak dengan mesh 20. Serbuk diekstraksi dengan MeOH 80% (1:10) dengan *ultrasonic bath sonicator* selama 1 jam. Ekstrak kemudian diuapkan hingga alkohol hilang, dan sisa ekstrak air diekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut diklorometan (CH_2Cl_2) dengan perbandingan 1:1. Lapisan diklorometan (dibawah) dipisahkan, dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm kemudian di masukkan ke oven 50°C hingga diperoleh fraksi kental (Elfahmi et al., 2007).

III. 6 Ekstraksi Minyak Atsiri *Piper cubeba* (PCEO)

Serbuk buah *P. cubeba* kering sebanyak 3 kg di hidrodistilasi selama 3 jam. Minyak yang diperoleh ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan lebih lanjut (Andriana et al., 2019).

III. 7 Pemeriksaan Mutu Ekstrak

III. 7. 1. Pemeriksaan organoleptik

Pemeriksaan organoleptik adalah pemeriksaan yang didasarkan pada bentuk, warna, bau, dan rasa.

III. 7. 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak

Persentase rendemen ekstrak dihitung dari jumlah ekstrak yang diperoleh kemudian dibagi dengan jumlah serbuk simplisia yang di ekstraksi dan kemudian dikalikan dengan 100%.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times 100\%$$

III. 7. 3. Susut Pengeringan

Botol timbang dikeringkan pada suhu 105°C selama 30 menit, timbang 1 g ekstrak dan fraksi kental dalam botol timbang. Perlahan-lahan dengan menggoyang, ratakan zat uji. Buka tutup botol timbang dan biarkan tutup dikeringkan dalam oven, keringkan di dalam oven 105°C selama 30 menit atau hingga bobot tetap, pada waktu oven dibuka botol segera ditutup dan dibiarkan dalam desikator sampai suhunya mencapai suhu kamar sebelum ditimbang.

$$\text{Susut pengeringan (\%)} = \frac{(W_1 - W_0) - (W_2 - W_0)}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

W0 = berat botol timbang kosong

W1 = botol timbang + ekstrak

W2 = botol timbang + hasil pengeringan

Penimbangan dinyatakan sudah mencapai bobot konstan jika selisih 2 kali penimbangan setelah dikeringkan tidak lebih dari 0,5 mg.

III. 7. 4. Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode azeotropi (distilasi toluena). Ekstrak yang digunakan sebanyak 10 gram dan dilakukan triplo. Kadar air dihitung dalam % v/b (*Farmakope Herbal Indonesia*, 2017).

III. 7. 5. Uji Kadar Abu Total

2 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara. Krus yang berisi sampel dimasukkan kedalam tanur pada suhu 500-600°C perlahan-lahan hingga arang habis, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (*Farmakope Herbal Indonesia*, 2017).

III. 7. 6. Kadar Abu Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit. Bagian tidak larut asam di saring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan airpanas dan dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap pada

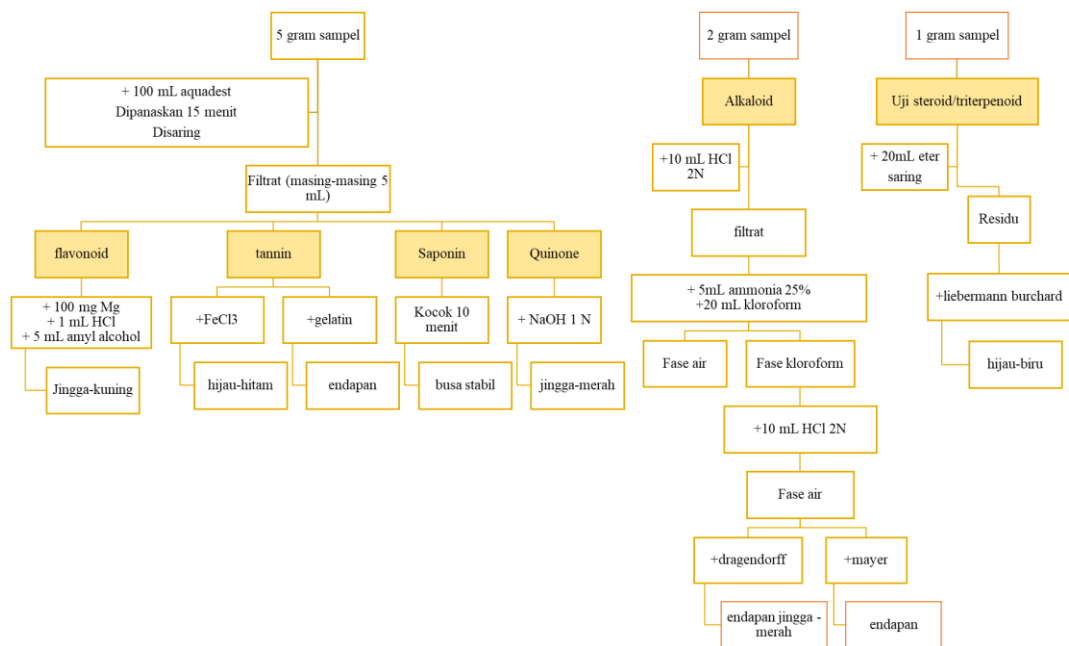
800°C. Kadar abu tidak laru asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (*Farmakope Herbal Indonesia*, 2017)

III. 7. 7. Kadar Sari Larut Etanol

5 gram ekstrak di masukkan dalam labu, ditambahkan 100 mL etanol dan dikocok selama 6 jam pertama, dibiarkan selama 18 jam. Sampel kemudian disaring. Sampel diuapkan dalam cawan pada 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari dihitung dalam % sari larut etanol (*Farmakope Herbal Indonesia*, 2017)

III. 7. 8. Penapisan Fitokimia Ekstrak

Uji kandungan ekstrak meliputi flavonoid, tanin, saponin, quinon, alkaloid dan steroid/triterpenoid dilakukan sesuai bagan dibawah ini.



Gambar III. 1 Skema uji skrining fitokimia

III. 7. 9. Penetapan Kadar Flavonoid

0,5 mL larutan sampel 1000 ppm dan quercetin (sebagai standar) dalam metanol ditambahkan ke dalam 1,5 mL metanol. Kemudian, ditambahkan 2,8 mL aquadest dan 0,1 mL 10% aluminium klorida ($AlCl_3$). Terakhir, 0,1 mL natrium asetat 1 M ditambahkan ke dalam campuran, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, dan diukur pada 415 nm (Chang et al., 2002).

III. 7. 10. Penetapan Kadar Fenol

Kadar fenol ditentukan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Larutan sampel (1000 ppm dalam metanol) dan larutan asam galat (sebagai standar) ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu 10% (1:10). Kemudian, 4 mL natrium karbonat 1 M ditambahkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Sampel dibaca pada 765 nm (Pourmorad et al., 2006).

III. 8 Analisis Senyawa Kimia Ekstrak

III.8. 1 Analisis Komatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis lignan dengan KLT menggunakan silica gel F₂₅₄ dan toluen : aseton pro analisa (7:3) sebagai eluen. Panjang elusi 8 cm di chamber penjenh. Plat disemprot asam sulfat 10 % (v/v dalam methanol) digunakan kemudian dipanaskan (Elfahmi et al., 2007).

III.8. 2 Analisi *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS)

Pengujian dilakukan di MarkHerb, Bandung. Sistem terdiri dari autosampler dan pompa biner (Waters, Milford, MA) yang dilengkapi dengan 10 µL loop. Senyawa dipisahkan pada kolom analitik Acquity BEH C18 (2,1 mm × 50 mm, 1,7 µm. Waters, Milford, MA) pada suhu 40°C. Elusi gradien dicapai dengan menggunakan dua pelarut: 0,1% (v/v) asam format air (A) dan 0,1% (v/v) asetonitril asam format (B) pada laju alir 0,3 mL/menit. Program gradien terdiri dari 10% hingga 20% B selama 2 menit, 40% B selama 5 menit, dan kemudian linier dari 40% hingga 60% B selama 2 menit, diikuti dengan peningkatan 100% B selama 6 menit, dipertahankan selama 2 menit, kemudian kembali ke kondisi awal selama 5 menit dengan volume injeksi sampel 5 µL.

III.8. 3 Analisis *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS)

Pengujian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) Provinsi DKI, Jakarta. Agilent Technologies 7890 Kromatografi Gas digunakan untuk analisis. Instrumen dilengkapi dengan autosampler, detektor selektif massa 5975, sistem data chemstation, dan kolom INNOWAX. Suhu awal adalah 60°C (0 menit), 2°C/menit hingga 150°C (1 menit), dan 20°C/menit hingga 210 °C (10 menit). Suhu

sumber ion 230°C, suhu antarmuka 280°C, suhu injeksi 250°C dan suhu quadrupole 140°C. Volume injeksi 1 mL dan aliran kolom 0,6 mL/menit.

III. 9 Formulasi dan Evaluasi Sediaan Nano

III.9.1 Pemilihan eksipien

Semua eksipien yang digunakan dalam penelitian adalah *pharmaceutical grade*. Pemilihan minyak dengan cara melarutkan ekstrak dengan minyak (1:10) dan diamati secara visual. Minyak yang diuji dalam penelitian ini meliputi minyak bunga matahari, oleum ricini, minyak kelapa murni, minyak zaitun, minyak almond, minyak jagung, asam oleat, dan Capryol 90 (Gattefosse, Saint-Priest, Prancis). Minyak yang dipilih menghasilkan larutan bening tanpa pengendapan. Selanjutnya dipilih surfaktan dengan mencampurkan 15% v/v surfaktan (dalam aquadest) dengan 10 µL minyak terpilih. Campuran tersebut kemudian divortex, dan minyak ditambahkan berulang kali hingga diperoleh cairan keruh. Surfaktan yang menghasilkan larutan Transparan dengan volume minyak terbanyak dipilih. Surfaktan yang diuji meliputi tween 20, tween 60, dan tween 80. Terakhir, konstruksi diagram fasa pseudo-ternary (<https://ternaryplot.netlify.app/>) digunakan untuk memilih ko-surfaktan pada rasio Surfaktan-kosurfaktan (S_{mix}) tetap (1:1). PEG 400 dan propilen glikol diuji sebagai ko-surfaktan dalam penelitian ini (Azeem et al., 2009).

III.9.2 Pemilihan perbandingan surfaktan-kosurfaktan (S_{mix})

Surfaktan dan kosurfaktan terpilih disiapkan dengan perbandingan 1:1, 2:1, 1:2 dan 1:3. Setiap rasio S_{mix} dicampur dengan minyak dalam berbagai variasi dari 1:9 hingga 9:1 (minyak: S_{mix}) untuk membuat *pseudo-ternary phase diagram*.

III.9.3 Pembuatan nanoemulsi *P. cubeba*

Ekstrak *P. cubeba* dicampur dengan minyak hingga homogen dengan *magnetic stirrer* (1000 rpm, 25°C), kemudian ditambahkan S_{mix} . Pengadukan dilanjutkan hingga homogen, dan ditambahkan aquabidest steril secara bertahap. Pengadukan dilanjutkan selama 10 menit.

III.9.4 Pembuatan nanoemulsi mukoadesif *P. cubeba*

Kitosan dengan berat molekul sedang (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) digunakan sebagai agen mukoadhesif. Kitosan dibuat dengan konsentrasi 1% b/v dalam asam asetat (1% v/v). Nanoemulsi dibuat dengan mencampurkan minyak (2,5% v/v) dan ekstrak *P. cubeba* (5% v/v) selama 2 menit dengan *magnetic stirrer* (1000 rpm, 25°C), kemudian ditambahkan S_{mix} dan dilanjutkan pengadukan selama 2 menit. Larutan kitosan kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran sampai homogen, dan terakhir ditambahkan aquabidest steril dan dilanjutkan stirrer selama 10 menit. Konsentrasi akhir kitosan dalam sediaan adalah 0,5% b/v.

III.9.1 Uji Ukuran partikel, *Polydispersity Index* (PDI), dan Zeta potensial

Ukuran partikel, PDI dan zeta potensial diukur menggunakan *Particle size analyzer* (DelsaMax PRO, Beckman Coulter, US). Sampel disiapkan dengan mengencerkan dengan pengenceran yang sesuai.

III.9.2 Robustness to dilution

Nanoemulsi diencerkan dengan aquadest 100, 500 dan 1000 kali. Sampel encer secara visual diperiksa untuk pengendapan dan pemisahan fasa (Kassem et al., 2020).

III.9.3 Uji Viskositas

Viskositas sediaan diuji dengan pengukuran satu titik menggunakan viskometer (ViscoQC 300, Anton Paar, Austria).

III.9.4 Uji pH

pH sediaan ditentukan dengan menggunakan pH meter pada suhu 25°C.

III.9.5 Karakteristik stabilitas termodinamik

Stabilitas termodinamika diuji berdasarkan uji sentrifugal, uji siklus pemanasan-pendinginan (*heating-cooling*), dan uji siklus beku-cair (*freeze-thaw*). Uji sentrifugal dilakukan pada 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 25°C untuk mengamati pemisahan fasa, kekeruhan atau pengendapan. Setelah sentrifugasi, formula yang stabil diuji dengan *heating-cooling cycle* selama tiga siklus, masing-

masing 24 jam pada suhu 40°C dan 4°C. Formula yang stabil kemudian dilanjutkan ke uji *freeze-thaw cycle*. Pengujian dilakukan pada suhu -20°C dan 25°C masing-masing 48 jam, selama tiga siklus. Pengamatan stabilitas meliputi ukuran globul, PDI, pemisahan fasa, kekeruhan dan presipitasi.

III.9.6 (Transmission Electron Microscopy) TEM analysis

Morfologi nanoemulsi ditentukan menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM). Sampel diencerkan dengan aquadest dan diperiksa dengan TEM (Jeol JEM-1400).

III. 10 Penetapan dosis

Ekstrak etanol 90% *P. cubeba* dengan dosis 150 mg/kg BB mencit dapat menurunkan edema hingga 28% pada model *carrageenan-induced edema*, serta data toksisitas menunjukkan **DL50** ekstrak lebih dari 2000 mg/kg BB mencit (Perazzo et al., 2013a). Ekstrak methanol 80% *P. cubeba* pada dosis 200 mg/kg BB tikus secara signifikan meningkatkan SOD dan katalase (Choi and Hwang, 2005). Penelitian lain menggunakan minyak atsiri *P. cubeba* pada dosis 400 mg/kg BB tikus dan sediaan nanoemulsi minyak atsiri *P. cubeba* pada **dosis 40 mg/kg BB tikus** (menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dengan menurunkan MPO, NO, TNF- α dan IL- β (Shakeel et al., 2015). Berdasarkan data tersebut, dilakukan orientasi pada dosis 400 mg/kg dan 200 mg/kg BB tikus.

III. 11 Uji Aktivitas Farmakologi

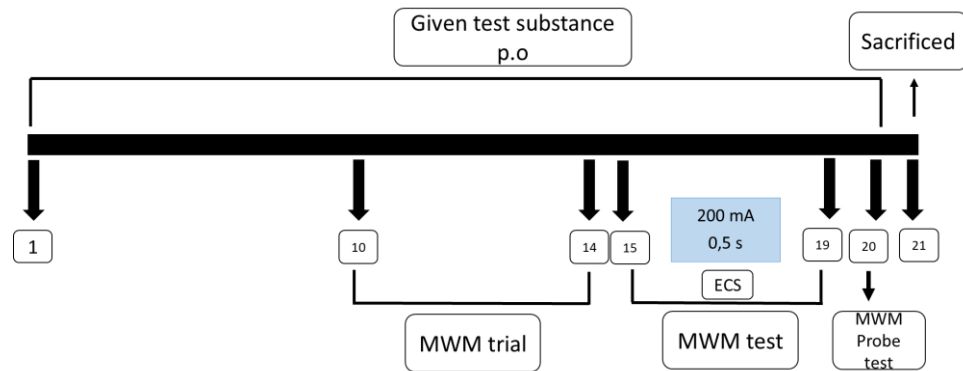
Sesuai dengan algoritma pencarian agen neuroprotektif, penelitian dimulai dengan pengujian antioksidan *P. cubeba* pada otak tikus normal. Selanjutnya dilakukan uji neuroprotektif *P. cubeba* pada hewan dengan gangguan kognitif. Ekstrak terbaik dari uji ini diformulasikan menjadi sediaan nanoemulsi dan diujikan pada hewan normal untuk menentukan aktivitas antioksidan otak sediaan. Sediaan dengan hasil terbaik kemudian diujikan pada hewan yang diinduksi stroke iskemik.

III.11. 1 Uji Aktivitas Antioksidan Otak *P. cubeba*

Masing-masing kelompok uji diberikan zat uji selama 7 hari, tanpa induksi. Pembagian kelompok uji sebagai berikut: Ekstrak etanol 70% *P. cubeba* 400 mg/kg (PC70-400), Ekstrak etanol 96% *P. cubeba* 400 mg/kg (PC96-400), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* 200 mg/kg (PC96-200), fraksi lignan *P. cubeba* 400 mg/kg (DCM-400), fraksi lignan *P. cubeba* 200 mg/kg (DCM-200), minyak atsiri *P. cubeba* 400 mg/kg (PO-400), kontrol normal (N) diberikan pembawa, kontrol positif diberikan Vitamin C 400 mg/kg (Vit-C). Pada hari ke-8 hewan dibedah dan otak hewan diambil. Homogenat otak diuji penghambatan lipid peroksidase, aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD) dan katalase (CAT), serta uji kadar nitrit oksida (NO).

III.11. 2 Uji Aktivitas Neuroprotektif *P. cubeba* pada Hewan dengan Gangguan Kognitif

Uji aktivitas neuroprotektif pada tikus gangguan kognitif yang dilakukan menggunakan *Electroconvulsive shock* (ECS) sebagai penginduksi. Ekstrak etanol 96% *P. cubeba* 200 mg/kg (PC), Fraksi lignan *P. cubeba* 200 mg/kg (DCM), Citicoline 200 mg/kg (C) sebagai kontrol positif, kontrol negatif diinduksi (ECS) dan diberikan pembawa, kontrol normal diberikan pembawa. Zat uji masing-masing diberikan selama 14 hari secara peroral kemudian dilakukan induksi ECS (Gambar III.2). pada hari ke 15 dilakukan induksi ECS dengan kekuatan 200 mA 0,5 detik setiap hari selama 5 hari, dan selama induksi hewan tetap diberikan zat uji. Pada hari ke 20 uji *probe* dengan **Morris Water Maze** (MWM), dan hari ke 21 dilakukan pengambilan otak. Organ otak diambil dan dipisahkan bagian **hipokampus dan korteks**. Masing-masing bagian otak dibuat homogenat dan digunakan untuk uji penghambatan lipid peroksidase, aktivitas SOD dan katalase, uji kadar TNF- α dan IL-1 β .



Gambar III. 2 *Timeline* pengujian fungsi kognitif *P. cubeba* pada hewan yang diinduksi ECS

III.11. 3 Uji aktivitas antioksidan nanoemulsi

Kelompok hewan dibagi menjadi 8 kelompok, masing-masing 5 ekor hewan, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (NE), yang diberikan masing-masing secara oral dan intranasal, nanoemulsi fraksi lignan *P. cubeba* (NF) yang diberikan masing-masing secara oral dan intranasal, nanoemulsi-mukoadesif ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (MNE) yang diberikan secara intranasal, nanoemulsi-mukoadesif fraksi lignan *P. cubeba* (MNF) yang diberikan secara intranasal, kontrol peroral diberikan pembawa nanoemulsi, dan kontrol intranasal diberikan pembawa nanoemulsi-mukoadesif. Masing-masing zat uji diberikan selama 7 hari sesuai rutennya, dan pada hari ke 8 dilakukan pengambilan otak hewan. **Bagian olfactory bulb, prefrontal korteks dan hipokampus otak dipisahkan** dan dibuat homogenat untuk uji aktivitas katalase.

III.11. 4 Uji Aktivitas *P. cubeba* pada tikus stroke iskemik

Total 60 ekor **tikus SD** dibagi masing-masing 10 ekor hewan perkelompok. Kelompok uji terdiri dari nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* dosis 100 mg/kg (PCN 100) dan 200 mg/kg (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* dosis 200mg/kg (PCE200), nanoemulsi-mukoadesif ekstrak etanol 96% *P. cubeba* yang diberikan secara intranasal (PCI), **kontrol MCAO** diberikan pembawa secara oral dan **kelompok sham** diberikan perlakuan sama dengan kontrol MCAO, namun monofilamen segera dikeluarkan (tanpa oklusi). Zat uji diberikan selama 14 hari, dan hari ke 15 diberikan satu jam sebelum induksi *transient Middle Cerebral Artery*

Occlusion (tMCAO). Oklusi dilakukan selama 1 jam dan reperfusi selama 23 jam. 23 jam setelah iskemia dilakukan evaluasi neurologis, menggunakan *modified neurological severity score* (mNSS) dan corner test. 24 jam setelah iskemia, 30 ekor tikus (5 ekor tikus perkelompok) dianastesi dan dilakukan pengambilan organ otak untuk pengukuran area infark. 30 ekor tikus lainnya (5 ekor tikus perkelompok) diambil otak dan dibuat homogenat untuk penentuan aktivitas lipid peroksidase, aktivitas katalase, kadar glutathione, TNF- α , IL-1 β dan IL-10.

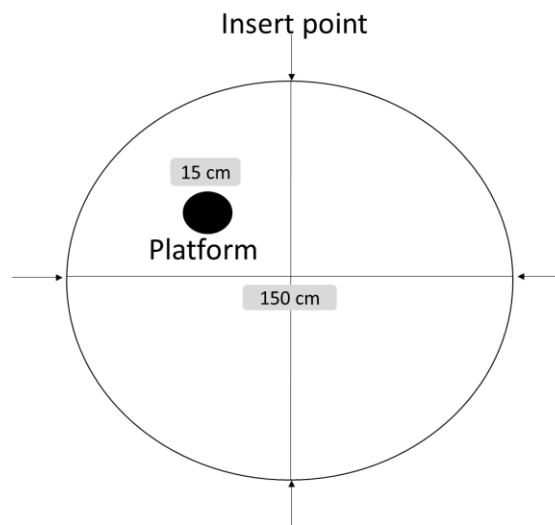
III. 12 Parameter Uji Farmakologi

III.12. 1 *Morris water maze* (MWM)

Tahap pelatihan: pengujian dilakukan menggunakan kolam berdiameter 150 cm, *platform* berdiameter 15 cm, dan tinggi 50 cm. Kolam dibagi menjadi empat kuadran yang sama dengan garis imajiner dan diisi dengan air ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) hingga 2 cm di bawah platform. Platform ditempatkan di salah satu kuadran, di mana posisi platform dan penanda visual (diletakkan di dinding dekat platform) dijaga konstan selama percobaan. Tikus dimasukkan ke kolam dari *insert point* (Gambar III.3), posisi kepala menghadap ke dinding kolam, kepala tikus dijaga tidak masuk dalam air ketika memasukkan ke kolam. Setiap tikus dibiarkan berenang selama 60 detik, dan jika tidak menemukan pijakan dalam waktu tersebut, maka tikus diarahkan ke pijakan dan dibiarkan selama 15 detik. Setiap tikus mendapat empat percobaan dari titik yang berbeda untuk setiap percobaan selama lima hari.

Tahap uji: Prosedur tahap uji sama dengan tahap pelatihan, kecuali air diisi hingga 2 cm di atas platform dan dibuat buram dengan cat putih tidak beracun. Setiap tikus mendapat 4 kali percobaan dari tiap insert point berbeda. Data dicatat *escape time* (waktu yang dibutuhkan untuk mencapai platform), dan tikus dengan *escape time* lebih dari 60 detik dicatat sebagai 60 detik (D'Hooze and De Deyn, 2001). Data disajikan sebagai rata-rata *escape time* dari 4 percobaan dari titik yang berbeda untuk setiap percobaan. Pada hari terakhir dilakukan *probe test* dimana platform dihilangkan, dan waktu tikus pada kuadran platform dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Luo et al., 2014):

$$\text{Time percentage in platform quadrant: } \frac{\text{swimming time in platform quadrant (s)}}{\text{total swimming time (s)}} \times 100\%$$

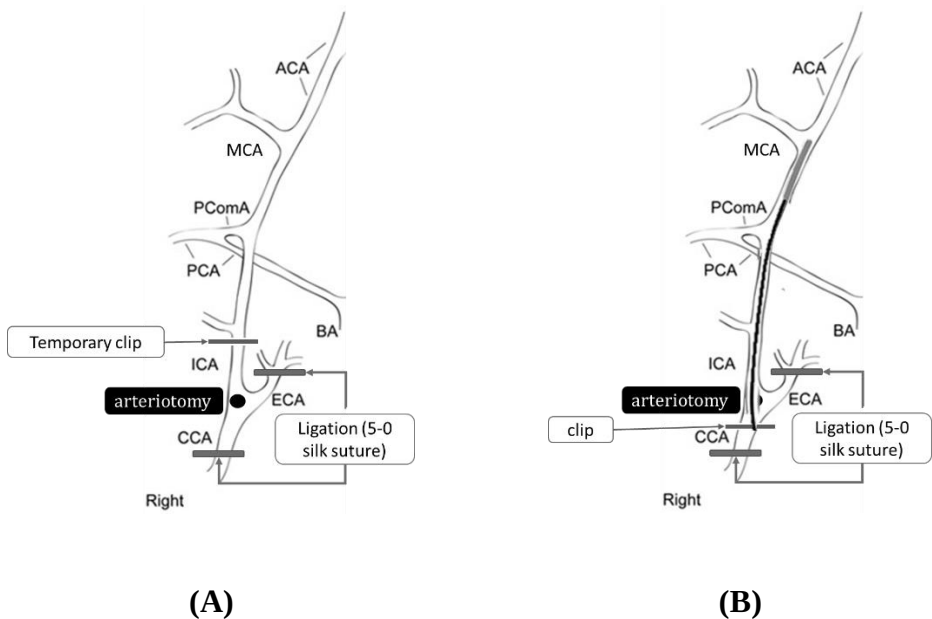


Gambar III. 3 Gambaran uji *Morris water maze* (MWM)

III.12. 2 Induksi stroke iskemik dengan metode *transient Middle Cerebral Artery Occlusion* (tMCAO)

Hewan dianestesi dengan kombinasi ketamin 100mg/kg dan xylazine 10mg/kg. prosedur mengikuti studi yang telah ada (Güzel et al., 2014; Uluç et al., 2010) dengan sedikit modifikasi. Sebelum operasi, diberikan obat tetes mata artifisial pada kedua mata tikus. Bagian leher tikus kemudian dicukur. Bagian leher kemudian di disinfeksi dengan *povidone iodine*, tiga kali usapan, melingkar dari dalam keluar, searah jarum jam, setelah itu diusap dengan alkohol 70% dengan cara yang sama. Prosedur bedah diawali dengan sayatan di bagian *ventral midline* leher tikus. *Common carotid artery* (CCA) sebelah kanan dipisahkan dan diikat longgar menggunakan *5-0 silk suture*, kemudian *external carotid artery* (ECA) dipisahkan dan diikat longgar. Setelah menemukan *internal carotid artery* (ICA), dipasangkan clip, kemudian ikatan di CCA dan ECA di kuatkan (Gambar III.4.A). Setelah itu CCA dilubangi (*arteriotomy*) dekat area percabangan, dan *monofilament suture* (Doccol) dimasukkan dari CCA melewati ICA menuju ke MCA, sekitar 18-20 mm dari percabangan. Saat *monofilament suture* mencapai MCA, dicatat sebagai waktu mulai oklusi (Gambar III.4.B). Luka ditutup kasa steril dan tikus segera di berikan NaCl 0,9% 5 ml secara i.p. Oklusi dilakukan selama 1 jam. 15 menit sebelum *monofilament* dikeluarkan, tikus diberikan anestesi kedua, ketamin 50 mg/kg dan xylazine 5 mg/kg i.p. Setelah *monofilament* dikeluarkan, CCA diligasi didekat

bekas sayatan, kemudian leher ditutup dengan 3-0 silk suture. Untuk mengurangi rasa sakit, bagian luka dioleskan lidocaine gel.



Gambar III. 4 Ilustrasi prosedur induksi tMCAO (A) ligase CCA, ICA dan ECA (B)insertion monofilament melalui CCA

III.12. 3 Penilaian Defisiensi Neurologis

Penilaian defisiensi neurologi pada tikus stroke iskemik dilakukan 23 jam setelah oklusi. Fungsi sensori-motor di evaluasi menggunakan *Modified Neurological Severity Score* (mNSS) (Behrouzifar et al., 2018). Penilaian meliputi Gerakan, sensasi, keseimbangan dan refleks (Table 1).

Tabel III. 1 <i>Modified Neurological Severity Score</i> (mNSS)	
<i>Motor function</i>	<i>Score</i>
<i>Raising the mouse by the tail</i>	
<i>Flexion of the forelimb</i>	1
<i>Flexion of the hindlimb</i>	1
<i>Head moved >10° to vertical axis within 30 s</i>	1
<i>Placing the mouse on the floor</i>	
<i>Inability to walk straight</i>	1
<i>Circling toward the paretic side</i>	2
<i>Falling down to the paretic side</i>	3
<i>Beam balance tests</i>	
<i>Balances with steady posture</i>	0
<i>Grasps side of beam</i>	1
<i>Hugs beam and 1 limb falls down from beam</i>	2
	3

<i>Hugs beam and 2 limbs fall down from beam or spins on beam (>30 s)</i>	4
<i>Attempts to balance on beam but falls off (>20 s)</i>	5
<i>Attempts to balance on beam but falls off (>10 s)</i>	6
<i>Falls off; no attempt to balance or hang on to beam (<10 s)</i>	
<i>Sensory function</i>	
<i>Absence of pinna reflex</i>	1
<i>Corneal reflex</i>	1
<i>1-4 mild injury, 5-9: moderate injury, 10-14: severe injury</i>	

III.12. 4 Corner Test

Setelah induksi stroke, hewan cenderung berbelok ke arah hemisfer yang rusak pada apparatus yang dibuat dengan sudut 30°. Evaluasi dengan *corner test* dilakukan sebelum induksi tMCAO dan 24 jam setelah oklusi. Data berupa jumlah belokan ke sisi ipsilateral (kanan) dalam 10 kali percobaan (Bouët et al., 2007). Data disajikan berupa *laterality index* (LI), dihitung menggunakan formula berikut:

$$LI = \frac{\text{Number of right turns} - \text{Number of left turns}}{\text{Total number of turns}}$$

$$\text{Normalized LI} = \frac{LI \text{ after MCAO} + 2}{LI \text{ before MCAO} + 2}$$

Normalized LI=1 (unchanged performance compared to presurgery)

Normalized LI~2 indicates a tendency to perform more ipsilateral (right)

Normalized LI~0 indicates a tendency to perform contralateral (left) turns

III.12. 5 Evaluasi ukuran infark

24 jam setelah oklusi, hewan dianestesi dan otak hewan diambil dan dipotong menjadi 6 potongan (*coronal sections*) dengan ketebalan 2 mm. Sebelum dipotong, otak dimasukkan ke freezer -20°C selama 20 menit. Wadah dan pisau yang digunakan sebelumnya juga didinginkan di freezer untuk menghindari *adhesion*. Irisan otak kemudian direndam dalam 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma- Aldrich, Germany) 2% di dalam *microplate 24 well* steril dan dimasukkan ke *shaker incubator* 37°C selama 30 menit dalam gelap. Hasil pewarnaan di foto dan area infark dianalisis dengan *software Image J* (<https://imagej.net/ij/index.html>). Ukuran infark dihitung dengan formula berikut (Li et al., 2020):

$$\text{Ukuran infark} = \frac{(\text{area infark})}{\text{area kontralateral} + \text{ipsilateral}} \times 100\%$$

III.12. 6 Pembuatan homogenat otak

Segera setelah diisolasi, otak tikus dibilas dengan *phosphate-buffered saline* (PBS) pH 7,4 dingin dan dikeringkan dengan kertas adsorben. Hipokampus dan korteks serebral diisolasi pada wadah dingin diatas *ice-bath*. Segera, setiap bagian otak dihomogenkan dalam campuran PBS-*phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF) (0,1 M) untuk membuat 10% homogenat, kemudian disentrifuga pada 4°C, 5000 RCF selama 15 menit. Homogenat disimpan pada suhu -20°C hingga pengujian.

III.12. 7 Pemeriksaan TNF- α , IL-1 β , dan IL-10

Kadar sitokin inflammatory homogenat otak, TNF-a, IL-1b dan 1L-10, diuji menggunakan kit *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (BT Lab) sesuai prosedur yang tertera di produk.

III.12. 8 Pengukuran SOD Otak

Sebanyak 20 μ L sampel digunakan untuk menentukan aktivitas SOD total menggunakan kit uji SOD (Elabscience, USA). Sebanyak 20 μ L homogenat otak yang diencerkan (faktor pengenceran 100) digunakan untuk pengujian. Penghambatan SOD 50% setara dengan 1 unit aktivitas SOD (U). Pengujian dilakukan sesuai prosedur yang tertera di produk.

III.12. 9 Pengukuran MDA Otak

Inhibisi lipid peroksidase dinilai melalui kadar MDA yang merupakan produk samping hasil peroksidase lipid. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) *assay*. 0,5 mL sampel ditambahkan 0,5 mL TCA 20% untuk mendenaturasi protein. Setelah itu ditambahkan TBA 0,67% 1 mL, di vortex kemudia di sentrifuga 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan kemudian di panaskan dioven pada suhu 95°C selama 20 menit dan menghasilkan warna pink yang terukur di 532 nm. Sebagai standar digunakan 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP).

III.12. 10 Uji aktivitas katalase

Uji katalase dilakukan sesuai studi yang telah ada dengan modifikasi. 100 mikrolit homogenat otak, dan aquadest pada standar dan blanko, ditambahkan 200 mikrolit hidrogen peroksida (H_2O_2) 10 mM (dibuat segar), kecuali blanko. Campuran di vortex hingga homogen kemudian diinkubasi pada 37 C selama 2 menit. Setelah itu ditambahkan 1,2 mL *working solution* (campuran *Cobalt (II) nitrate hexahydrate*, *graham salt* (NaPO_3)₆ dan *sodium bicarbonate* (1:1:18) dibuat segar). Campuran kemudian di vortex dan diinkubasi pada 25°C selama 10 menit, kemudian diukur pada 450 nm (Hadwan, 2018).

$$\text{Aktivitas katalase} = \frac{2.303}{2} \times \log \frac{\text{abs standar}}{\text{absorbansi uji}}$$

III.12. 11 Uji kadar glutathion

Pengujian mengikuti *Ellman's method* (Ellman, 1959) dengan sedikit modifikasi. 100 mikrolit homogenat otak ditambahkan 100 mikrolit TCA 10 %, 0,5 mL 5,5'-*Dithiobis*(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma-aldrich) 4% (dalam 1% *trisodium citrate*), dan 1 mL phosphate buffer pH 8.4. Campuran disentrifuga selama 5 menit pada 5000 rpm. Supernatan diukur pada 415 nm. *Glutathione reduced* (Biosciences) digunakan sebagai standar.

III.12. 12 Pengukuran nitrit oksida (NO)

NO merupakan senyawa yang tidak stabil dan sulit ditentukan secara langsung. Oleh karena itu, digunakan NaNO_2 standar dalam penelitian ini karena dapat mewakili kadar NO yang sebenarnya (Termin et al., 1992). Prosedur dilakukan dengan sedikit modifikasi. Pertama, 200 μL sampel ditambahkan ke dalam 200 μL 2N KMNO_4 . Setelah 30 menit, ditambahkan 800 μL asam salisilat 5% (v/v) dalam H_2SO_4 (Mallinckrodt, Irlandia) dan didiamkan selama 20 menit. Selanjutnya, 8 N NaOH (Merck, Jerman) ditambahkan ke dalam 10 mL dan disaring. Absorbansi diukur pada 414 nm.

III. 13 Uji Statistik

Semua data diuji normalitas menggunakan *Kolmogorof-Smirnov test* dan homogenitas menggunakan *levene's test*, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA dan dilanjutkan *Tukey's test* (Kobayashi and Pillai, 2013).

Bab IV Hasil dan Pembahasan

IV.1 Hasil ekstraksi *Piper cubeba*

Ekstrak etanol 96% (PC96), ekstrak etanol 70% (PC70) dan fraksi lignan (DCM) *P. cubeba* berbau khas dan berwarna coklat. Ekstrak etanol 96% dan fraksi lignan memiliki konsistensi cair, seperti minyak, sedangkan ekstrak etanol 70% menunjukkan konsistensi yang lebih padat. Minyak atsiri *P. cubeba* (PO) berwarna kuning dan berbau khas. Rendemen masing-masing bahan uji dapat dilihat pada Tabel IV.1.

Tabel IV. 1 Rendemen ekstrak, fraksi dan minyak atsiri *P. cubeba*

Jenis	Rendemen (%)	Persyaratan Pustaka (FHI)
PC96	13,7	$\geq 8,2\%$
PC70	14,89	
DCM	5,25	-
PO	0,2	-

IV.2 Hasil Penapisan Fitokimia *P. cubeba*

Skrining fitokimia menunjukkan bahwa PC96 dan DCM mengandung flavonoid, tanin, kuinon, dan steroid, sedangkan PC70 mengandung senyawa yang sama kecuali steroid (Tabel IV.2).

Tabel IV. 2 Hasil skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi *P. cubeba*

Parameter	Hasil		
	PC 96	PC70	DCM
Flavonoid	+	+	+
Tannin	-	-	-
Saponin	-	-	-
Quinone	+	+	+
Steroid/triterpenoid	+	-	+
Alkaloid	+	-	+

IV.3 Standardisasi Mutu ekstrak dan fraksi *Piper cubeba*

Pengujian standardisasi mutu lengkap hanya dilakukan pada ekstrak 96% *P. cubeba* karena menunjukkan hasil terbaik pada uji farmakologi, sebagai antioksidan

otak. Hasil menunjukkan ekstrak 96% *P. cubeba* sudah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2017 (Tabel IV.3).

Tabel IV. 3 Hasil standardisasi mutu ekstrak dan fraksi *P. cubeba*

Parameter	Hasil			Persyaratan Pustaka (FHI)
	PC 96	PC70	DCM	
Kadar air	0,784±1,1	12,42±0,1	3,59±1	≤10%
Susut pengeringan	1,49±0,04	22,96±6,1	16,89±0,6	-
Kadar abu	0,073±0,01	1,463±0,5	0,542±0,4	≤1,5%
Kadar abu tidak larut asam	-	-	-	≤0,7%
Kadar sari larut etanol	58,51	-	-	-
Kadar minyak atsiri	0,2	-	-	≥ 1,4%
Kadar cubebin				≥0,93%
Cemaran logam berat Pb	Tidak terdeteksi*	-	-	Memenuhi syarat
Cemaran logam berat Cd	Tidak terdeteksi**	-	-	Memenuhi syarat
Total Plat Count (TPC)	<10	-	-	Memenuhi syarat
Cemaran koliform	Negatif	-	-	Memenuhi syarat
Cemaran kapang/khamir	Negatif	-	-	Memenuhi syarat

*analisis menggunakan AAS dengan limit deteksi <0,375 ppm

** analisis menggunakan AAS dengan limit deteksi <0,002 ppm

IV.4 Kadar Fenol dan Flavonoid

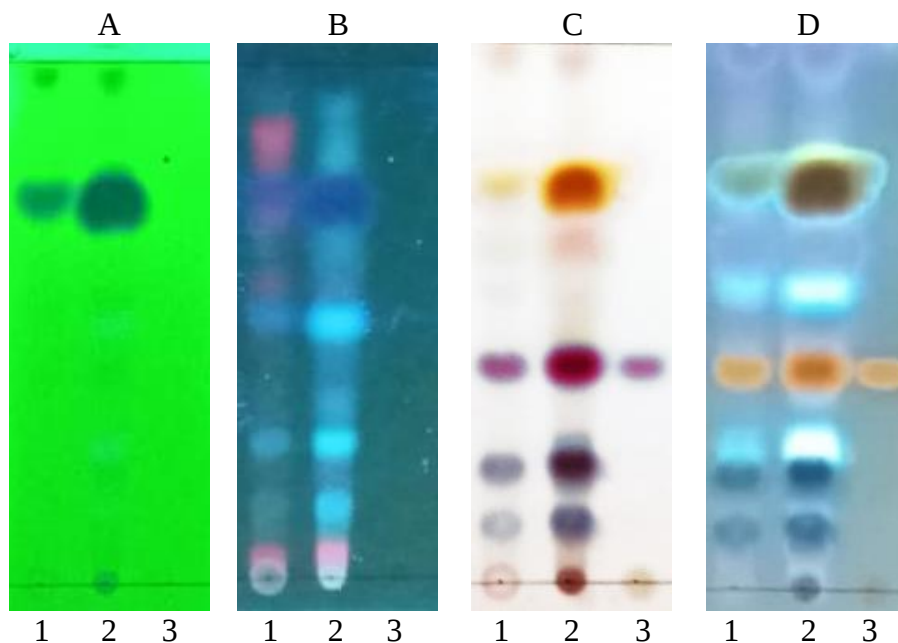
Hasil penelitian menunjukkan bahwa PC70 memiliki kandungan fenol yang lebih tinggi dibandingkan PC96 dan DCM. Sedangkan kandungan flavonoid tertinggi didapatkan dari PC96 (Tabel IV.4).

Tabel IV. 4 Hasil uji kadar fenol dan flavonoid ekstrak dan fraksi *P. cubeba*

Jenis ekstrak	Kadar fenol	Kadar flavonoid
	mg GAE/g ekstrak	mg QE/ g ekstrak
PC96	101,34±1,43	215,02±3,27
PC70	206,99±4,4	146,86±6,43
DCM	134,62±2,83	152,58±15.38

IV.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

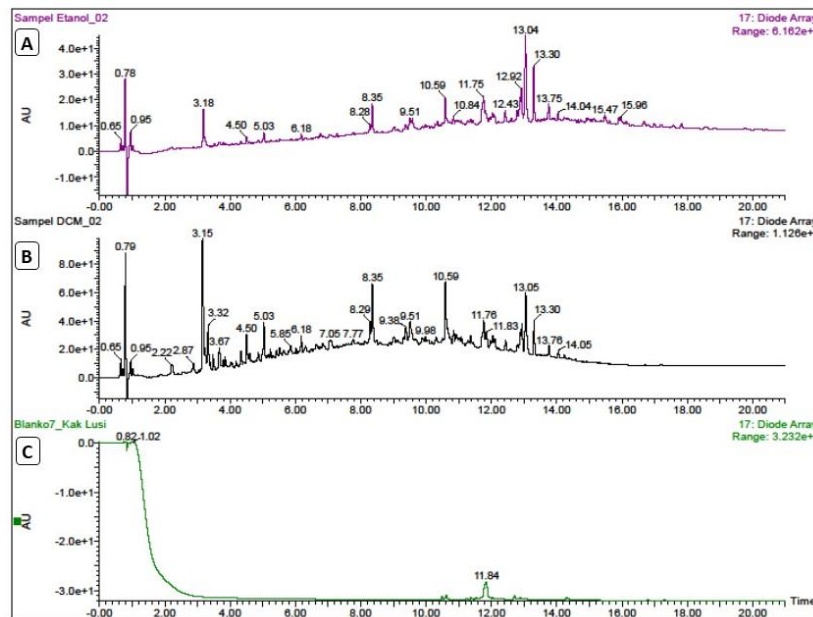
Studi ini mengkonfirmasi keberadaan lignan dalam ekstrak dan fraksi *P. cubeba* dengan KLT, yang merupakan senyawa dominan pada buah *P. cubeba* (Elfahmi et al., 2007). Hasil menunjukkan bercak yang sedikit berbeda antara PC96 dan DCM. Asam sulfat digunakan sebagai penampak bercak yang menghasilkan berbagai pita berwarna yang menunjukkan keberadaan lignan (Willför et al., 2006). Analisis KLT mengkonfirmasi keberadaan lignan, yang ditunjukkan pita berwarna yang terpisah pada PC96 dan DCM (Gambar IV.1). Hasil KLT mengkonfirmasi bahwa PC96 dan DCM mengandung cubebin, salah satu senyawa aktif dan marker *P. cubeba*.



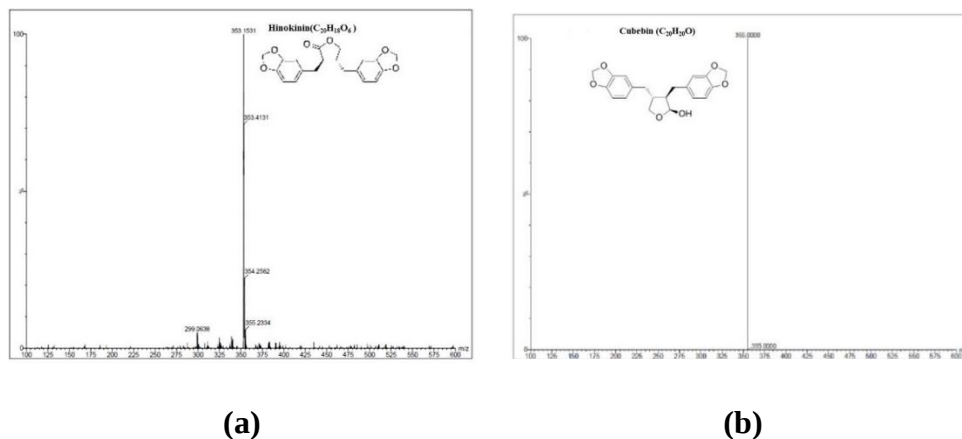
Gambar IV. 1 Hasil KLT ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC96) (1), fraksi lignan *P. cubeba* (DCM) (2), cubebin (3) dengan fasa gerak toluen:aseton (7:3) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pengamatan (A) UV λ 254 nm, (B) UV λ 366 nm, (C) penampak bercak asam sulfat 10% dan dipanaskan, (D) UV λ 366 nm setelah disemprot asam sulfat 10%.

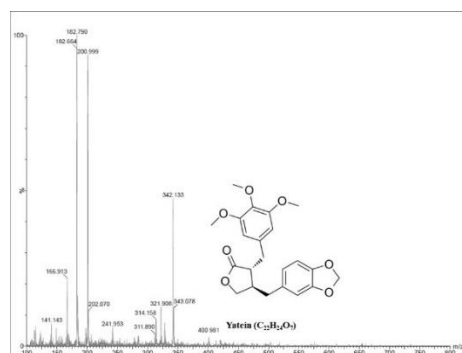
IV.6 Hasil Analisis *Liquid chromatography–mass spectrometry* (LC-MS) *P. cubeba*

Hasil analisis LC-MS menunjukkan kandungan yang beragam pada ekstrak etanol 96% *P. cubeba* dan fraksi lignan *P. cubeba* (Gambar IV.2). Berdasarkan analisis MS ditemukan dugaan cubebin, hinokinin, dan yatein pada fraksi lignan *P. cubeba* (Gambar (IV.3).



Gambar IV. 2 Overlay komatogram LC-MS (A) ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (B) fraksi lignan *P. cubeba* (C) blanko





(c)

Gambar IV. 3 LC-MS/MS dugaan (a) Hinokinin, (b) Cubebin, (c) Yatein pada fraksi lignan *P. cubeba* (DCM).

IV.7 Hasil Analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Analisis GC-MS menunjukkan PC96 dan DCM mengandung variasi lignan. Cubebin, hinokinin dan yatein merupakan lignan yang terkandung dalam *P. cubeba* yang telah diteliti aktivitas farmakologinya, dan ketiganya terdeteksi pada DCM (Tabel 1).

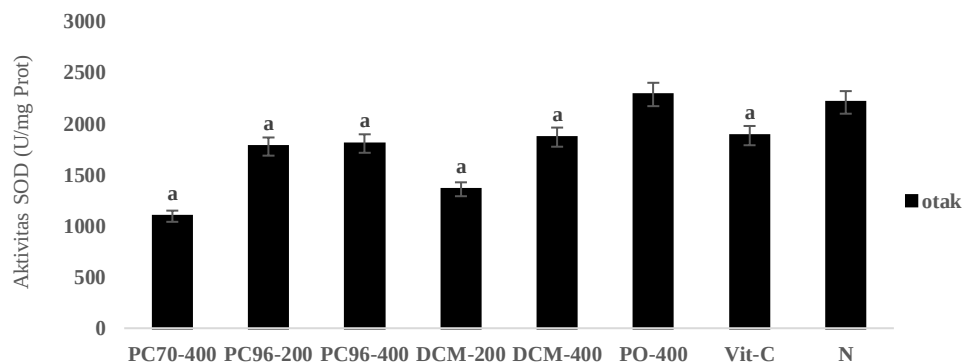
Tabel IV. 5 Hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Nama senyawa	Molecular formula	Waktu retensi	Molecular weight	Area (%)
Ekstrak etanol 96% <i>P. cubeba</i> (PC96)				
(-)- α -Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	19.04	204.2	1.66
α -Copaene	C ₁₅ H ₂₄	20.21	204.2	5.33
β - cubebene	C ₁₅ H ₂₄	20.69	204.2	3.08
(-)-Alloaromadendrene	C ₁₅ H ₂₄	23.57	204.2	2.52
Bicyclogermacrene	C ₁₅ H ₂₄	24.94	204.2	1.4
(-)- α -Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄	25.08	204.2	1.85
Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	26.47	222.3	1.4
Germacrene B	C ₁₅ H ₂₄	26.55	204.35	1.34
Ledol	C ₁₅ H ₂₆ O	27.53	222.3	3.17
Hinokinin	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	43.19	354.3	1.94
Fraksi Lignan <i>P. cubeba</i> (DCM)				
(-)- α -Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	25.2	204.35	3.63
5-Methoxyhinokinin	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	38.9	384.2	6.12
Cubebin	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	39.7	356.2	3.93
Hinokinin	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	41.4	354.3	11.4
Cubebinone	C ₂₃ H ₂₆ O ₈	41.6	430.3	2.73
Clusin	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	43	402.2	1.52
Yatein	C ₂₇ H ₂₈ O ₃	44.2	400.2	3.49

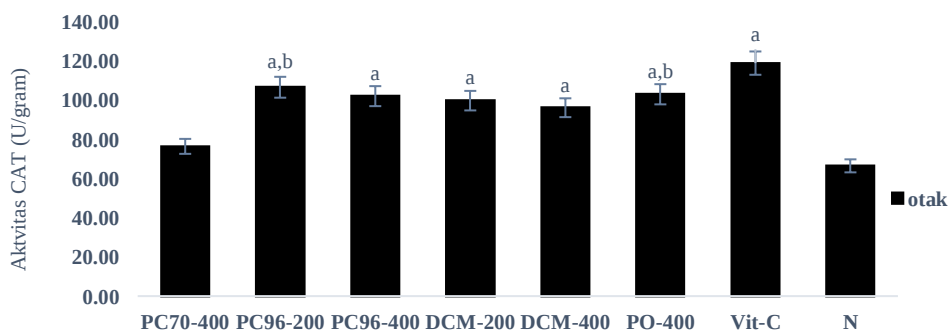
Lignan telah diteliti memiliki berbagai aktivitas farmakologis dan telah dipelajari untuk mengurangi risiko berbagai penyakit kronis. Cubebin dan hinokinin menunjukkan efek antiinflamasi, antibakteri, dan antitumor dalam berbagai penelitian (Godoy de Lima, Barros, da Silva Laurentiz, et al., 2018). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa fraksi diklorometan dari *P. nigrum* dan *P. longum*, spesies piper lain yang mengandung piperine, piperlin, dan hinokinin, memiliki efek neuroprotektif yang signifikan melalui aktivitas antioksidan (Hua et al., 2019; Wang et al., 2017).

IV.8 Aktivitas Antioksidan Otak *Piper cubeba*

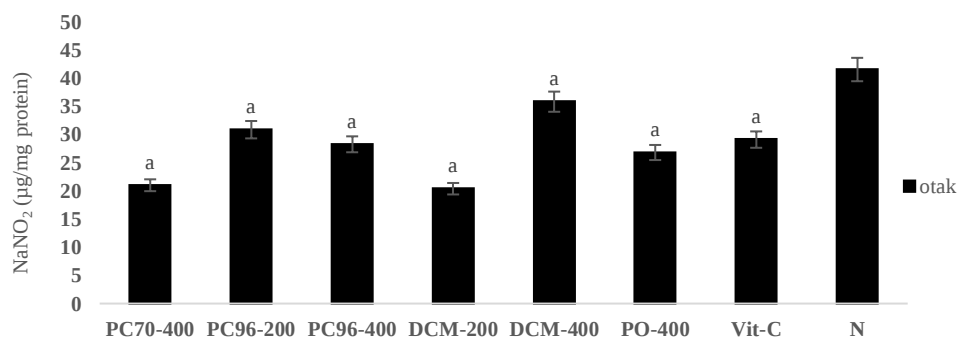
Produk alami telah menunjukkan potensi neuroprotektif melalui mekanisme anti-inflamasi, imunomodulator, dan antioksidan (Mohd Sairazi and Sirajudeen, 2020). Skrining aktivitas antioksidan, terutama di otak, merupakan langkah pertama dalam algoritma penelitian agen neuroprotektif (W. Liu et al., 2016). Aktivitas antioksidan *P. cubeba* ditentukan berdasarkan aktivitas superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT), konsentrasi nitrit oksida (NO), dan penghambatan peroksidasi lipid berdasarkan kadar MDA (Gambar IV.4).



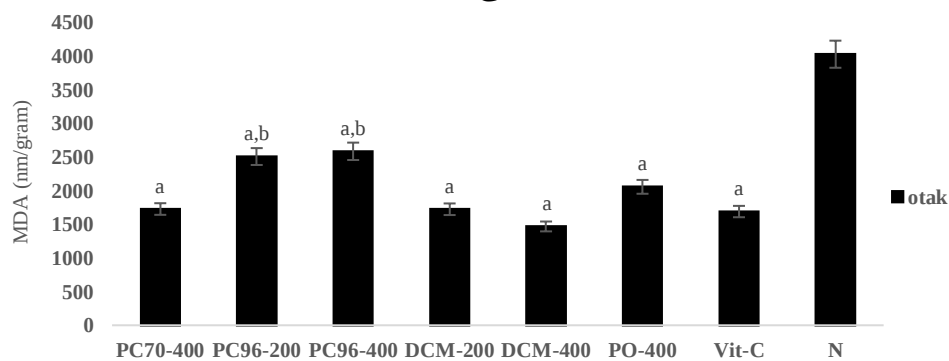
A



B



C



D

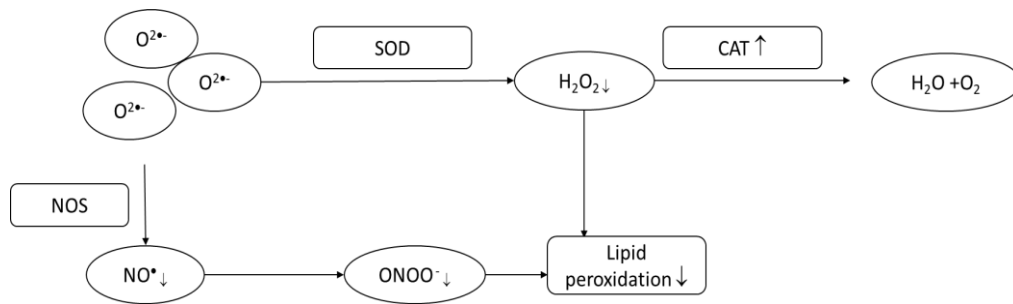
Gambar IV. 4 Aktivitas antioksidan otak ekstrak etanol 70% *P. cubeba* 400 mg/kg (PC70-400), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* 400 mg/kg (PC96-400), dan 200 mg/kg (PC96-200), fraksi lignan *P. cubeba* 400 mg/kg (DCM-400), dan 200 mg/kg (DCM-200), minyak atsiri *P. cubeba* 400 mg/kg (PO-400), kontrol normal (N), Vitamin C 400 mg/kg (Vit-C), berdasarkan (A) aktivitas SOD, (B) aktivitas katalase, (C) kadar NO, dan (D) inhibisi peroksidase. ^a berbeda signifikan terhadap N pada $p < 0.01$, ^b berbeda signifikan terhadap Vit-C pada $p < 0.05$

Pada penelitian ini, kadar SOD lebih rendah dari kontrol setelah pemberian *P. cubeba*, kecuali kelompok PO (Gambar IV.4.A). SOD diekskresikan secara luas di berbagai organ, namun kadarnya ditemukan rendah di otak (S. M. Davis and Pennypacker, 2017). Kadar SOD dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti jenis isoform SOD, lamanya sel terpapar reaksi oksidatif dan proporsi radikal bebas. Sebuah studi tentang aktivitas antioksidan *P. cubeba* pada dosis 200 mg/kg BB tikus menunjukkan peningkatan aktivitas SOD setelah dua minggu pemberian oral (E.-M. M. Choi and Hwang, 2005). Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh *P. cubeba* terhadap aktivitas SOD dengan berbagai dosis dan waktu pemberian. Kelompok Vitamin C juga menunjukkan

aktivitas SOD yang lebih rendah daripada kontrol. Hasil yang sama juga didapatkan dari penelitian lain dimana Vitamin C dapat menghambat SOD di otak tikus (Kao, 2003).

Meskipun ada penurunan pada aktivitas SOD, namun terjadi peningkatan aktivitas CAT setelah pemberian *P. cubeba*. Gambar IV.4.B menunjukkan bahwa *P. cubeba* dapat meningkatkan aktivitas CAT secara signifikan, kecuali untuk kelompok P70. Penelitian ini juga mengkaji konsentrasi NO yang direpresentasikan oleh kadar NaNO_2 (Termin et al., 1992). NO dapat langsung menjadi sumber stres oksidatif, dan NO juga dapat bereaksi dengan ROS menghasilkan oksidan peroksinitrit yang dapat menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan akhirnya merusak DNA (Shirle et al., 2014). Pada penelitian ini, pemberian *P. cubeba* secara signifikan ($p < 0,05$) menekan NO. Hasil ini sejalan dengan uji peroksidase lipid, dimana semua kelompok uji menunjukkan konsentrasi MDA yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,01$) dibandingkan dengan N (Gambar IV.4.D).

Otak merupakan salah satu organ yang rentan terhadap stres oksidatif karena organ ini mengandung lipid yang tinggi, antioksidan enzimatik yang rendah, dan konsumsi oksigen yang tinggi (Prasad et al., 2018). *Reactive oxygen species* (ROS) dapat diproduksi di otak melalui *mitochondrial respiratory chain* (MRC), oksidasi *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NAPDH), dan *xanthine oxidase* (Mittal et al., 2014). Superoksida mitokondria adalah produk sampingan dari pembuatan ATP. Superoksida ini akan diubah oleh superoksida dismutase (SOD) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) sebelum keluar dari mitokondria (Shirle et al., 2014). H_2O_2 selanjutnya bereaksi dengan katalase (CAT) dan diubah menjadi H_2O dan O_2 . ROS juga dapat bereaksi dengan nitrit oksida sintase (NOS) menghasilkan radikal nitrit oksida ($\text{NO}\bullet$), yang selanjutnya bereaksi dengan ROS membentuk radikal peroksinitrit ($\text{ONOO}^\bullet$) (Fernando et al., 2019).



Gambar IV. 5 Asumsi mekanisme aksi *Piper cubeba* sebagai antioksidan di otak↑(meningkat) ↓(menurun).

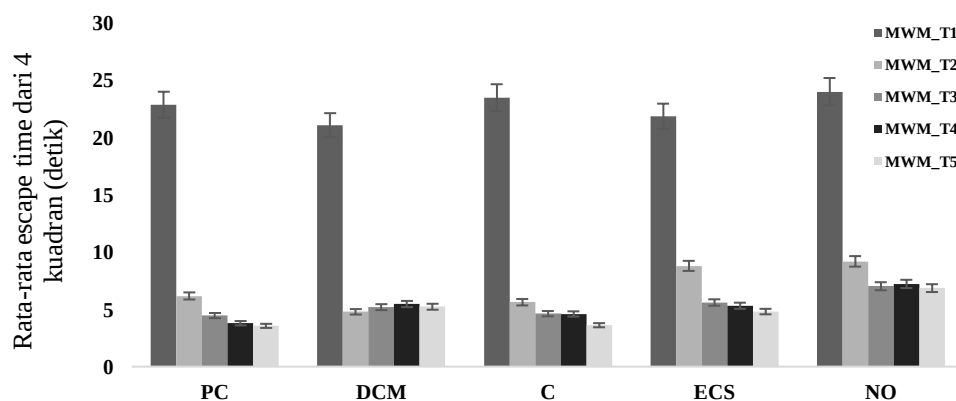
Gambar IV.5 mengilustrasikan keseluruhan mekanisme yang diasumsikan dari *P. cubeba* sebagai antioksidan di otak. Ekstrak dapat meningkatkan aktivitas CAT, mengurangi konsentrasi NO, dan membatasi peroksidasi lipid. *P. cubeba* mengandung beberapa fitokonstituen yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan, seperti terpenoid (minyak atsiri), flavonoid, dan lignan. Polifenol telah diketahui menunjukkan aktivitas antioksidan kuat pada tumbuhan. Polifenol *P. cubeba* termasuk asam galat, asam caffeic, dan asam ferulic (Abdul-jalil and Nasser, 2020). *P. cubeba* juga mengandung lignan seperti cubebin, hinokinin, dan yatein. Cubebin diduga berperan sebagai salah satu komponen aktif, dimana senyawa ini telah terbukti sebagai neuroprotektor pada mencit yang diinduksi skopolamin, salah satunya melalui mekanisme antioksidan (Lima et al., 2017). Penelitian juga menguji aktivitas antioksidan PC96 dan DCM dalam dua dosis (200 dan 400 mg/kg). Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dalam efek antioksidan antara dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg, yang mungkin disebabkan oleh terbatasnya transportasi zat uji ke otak. Studi ini mendasari penelitian lebih lanjut tentang *P. cubeba* sebagai agen neuroprotektif. Berdasarkan hasil penelitian tahap awal ini, pada uji berikutnya diujikan PC96 dan DCM sebagai neuroprotektif pada hewan dengan gangguan kognitif pada dosis 200 mg/kg.

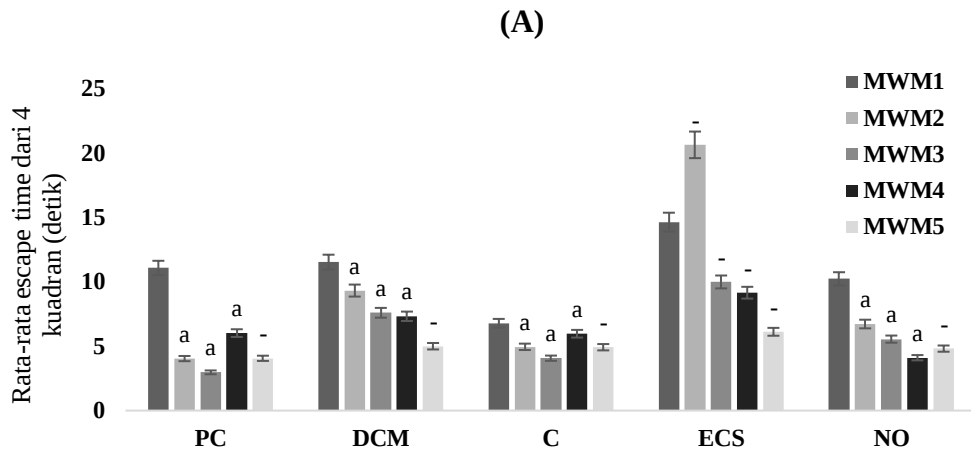
IV.9 Efek *Piper cubeba* terhadap fungsi kognitif

Penelitian tahap kedua dilanjutkan dengan uji neuroprotektif ekstrak etanol 96 % 200 mg/kg BB tikus (PC) dan Fraksi lignan 200 mg/kg BB tikus (DCM) *P. cubeba* pada tikus dengan gangguan kognitif. Gangguan kognitif diinduksi menggunakan *Electroconvulsive Shock* (ECS), yang telah terbukti menyebabkan gangguan di

hipokampus yang mengakibatkan gangguan fungsi kognitif (Busnello et al., 2006). Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa induksi berulang dengan ECS dapat merusak memori spasial dalam uji MWM (Svensson et al., 2017). MWM menilai memori spasial yang mengandalkan isyarat untuk menemukan *platform* untuk menyelamatkan diri. MWM juga dapat menilai plastisitas sinaptik hipokampus (Vorhees and Williams, 2006). Pada penelitian ini, variasi intensitas dan waktu perlakuan ECS diuji sebelum percobaan untuk mendapatkan model hewan dengan gangguan kognitif tanpa kelumpuhan sehingga memori spasial hewan tersebut dapat dinilai dengan menggunakan uji MWM.

Pada fase pelatihan tes MWM, semua kelompok menunjukkan penurunan drastis dalam waktu untuk menemukan platform (*escape time*) dari hari kedua dan terus menurun menjelang akhir fase pelatihan. Tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p>0,05$), menunjukkan keseragaman fungsi kognitif hewan sebelum perlakuan ECS (Gambar IV.6.A). Sedangkan pada fase uji MWM, terlihat bahwa perlakuan ECS mengganggu spasial dan memori tikus, yang ditunjukkan dengan peningkatan *escape time* pada kontrol ECS dibandingkan dengan kontrol NO ($p<0,05$) (Gambar IV.6.B). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol ECS mengalami gangguan kognitif terparah yang ditunjukkan dengan peningkatan *escape time* terutama pada hari kedua setelah induksi ECS. Di sisi lain, kelompok PC dan DCM menunjukkan penurunan *escape time*, sebanding dengan *citicoline* (C). Namun, seiring berjalannya pengujian, *escape time* di semua kelompok mulai membaik.

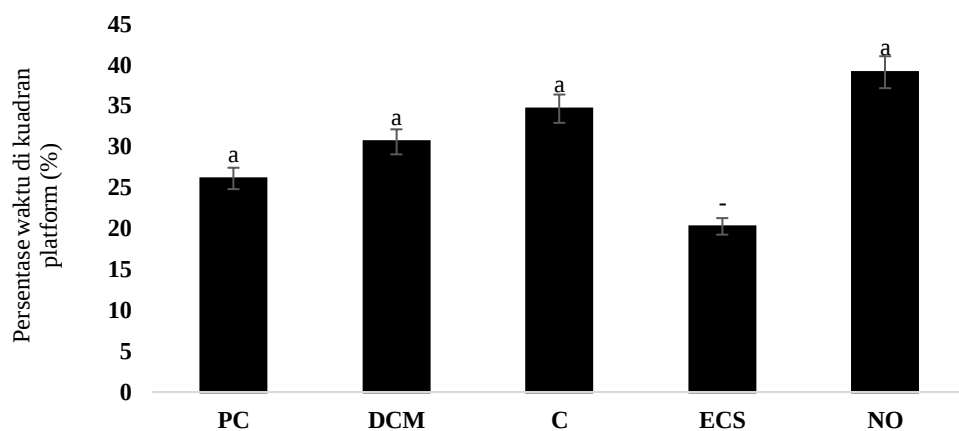




(B)

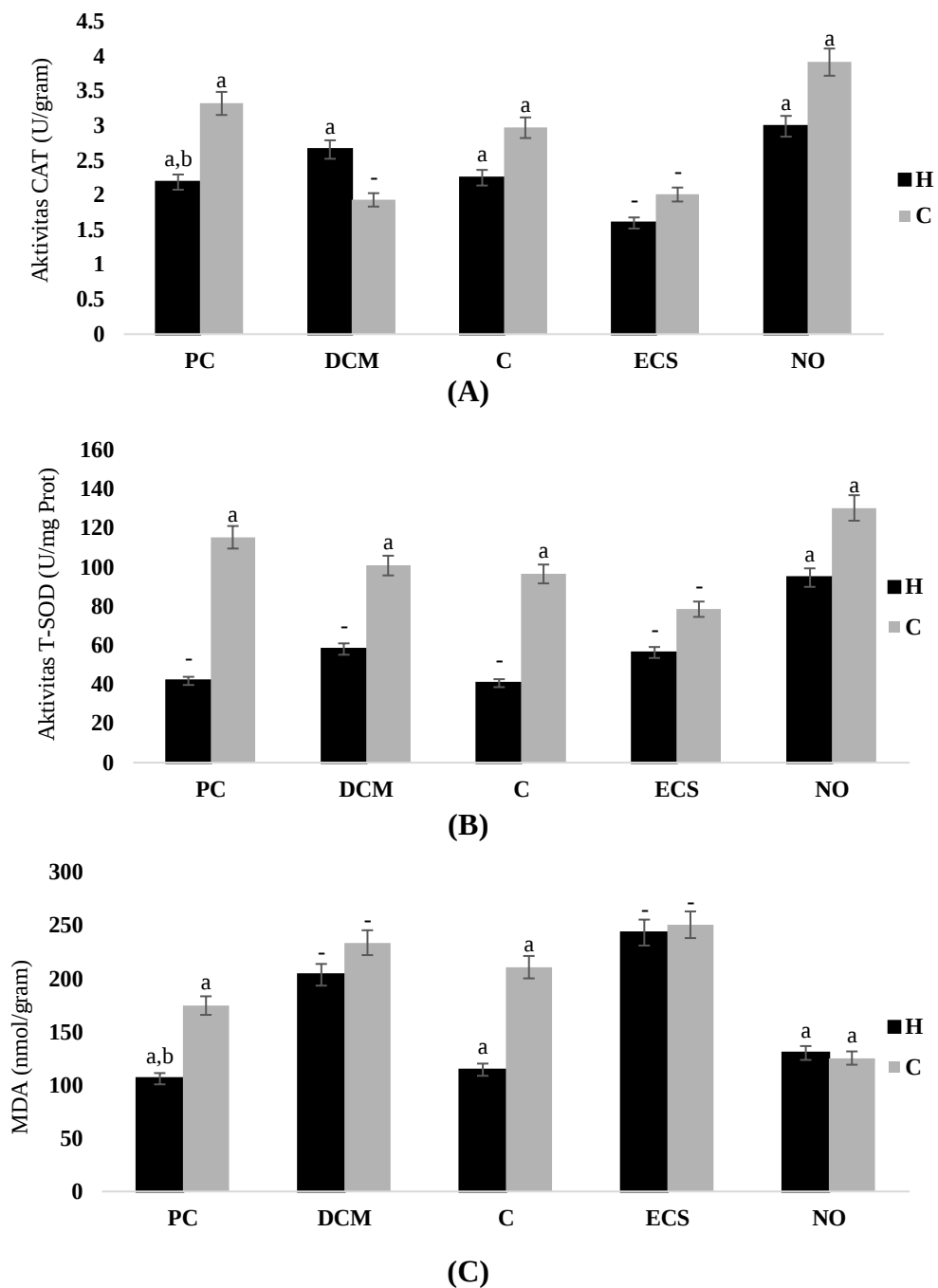
Gambar IV. 6 Hasil rata-rata escape time tikus pada uji MWM (A) Fase latihan (B) Fase Uji, pada kelompok ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), fraksi lignan *P. cubeba* (DCM), citicoline (C), kontrol ECS dan kontrol normal (NO). ^abeda signifikan terhadap ECS ($p < 0,05$)

PC dan DCM dapat secara signifikan mengurangi *escape time* dibandingkan dengan kelompok ECS mulai dari hari pertama fase uji MWM. Terlihat juga bahwa perbedaan *escape time* yang signifikan antara PC dan DCM dengan kelompok ECS terjadi pada hari kedua setelah perlakuan ECS. Meskipun tren data menunjukkan penurunan *escape time*, secara statistik, data hari kelima menunjukkan *escape time* yang sebanding di semua kelompok. Hal ini menunjukkan hilangnya dampak ECS pada hewan uji.



Gambar IV. 7 Hasil uji *probe* pada kelompok ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), fraksi lignan *P. cubeba* (DCM), citicoline (C), kontrol ECS dan kontrol normal (NO). ^abeda signifikan terhadap ECS ($p < 0,05$)

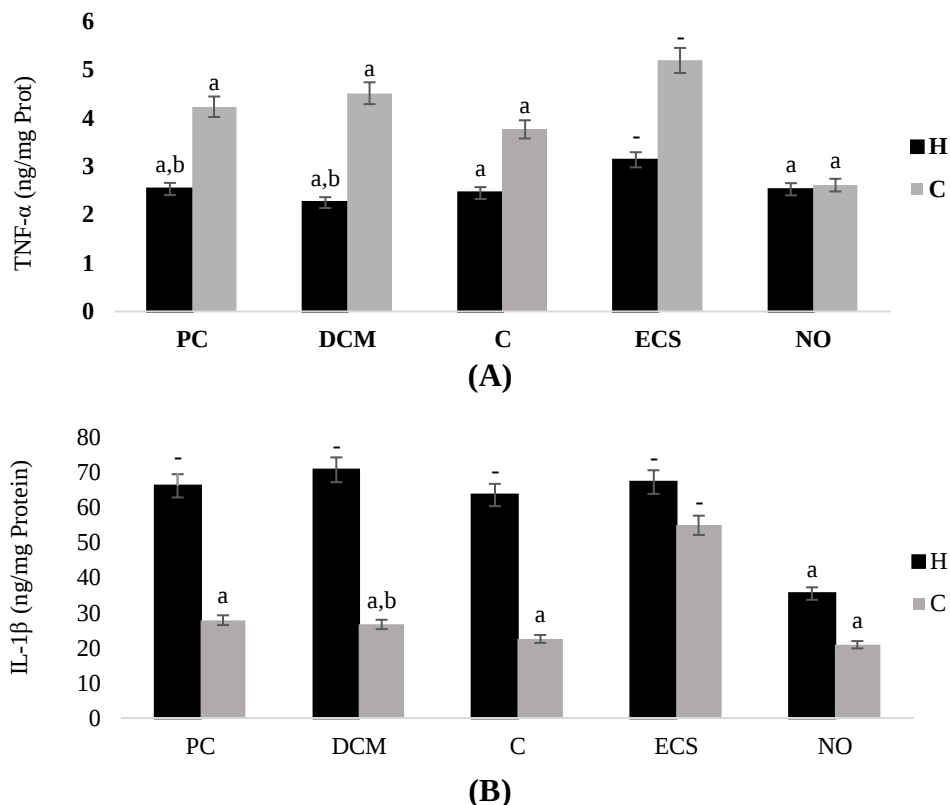
Dalam uji *probe*, kelompok ECS menunjukkan memori spasial yang lebih buruk daripada kelompok lain, dan kelompok *citicoline* menunjukkan hasil terbaik, diikuti oleh kelompok PC dan DCM (Gambar IV.7).



Gambar IV. 8 Hasil uji antioksidan otak tikus yang diinduksi ECS berdasarkan aktivitas (A) katalase (CAT), (B) superoksida dismutase (SOD), dan (C) kadar MDA pada hipokampus (H) dan korteks (C) kelompok

ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), fraksi lignan *P. cubeba* (DCM), citicoline (C), kontrol ECS dan kontrol normal (NO). ^abeda signifikan terhadap ECS ($p < 0,05$), ^bsebanding terhadap *citicoline* ($p > 0,05$).

Gambar IV.8 menunjukkan PC dan DCM dapat meningkatkan aktivitas CAT dihipokampus secara signifikan lebih tinggi daripada kelompok ECS ($p < 0,05$). Namun hanya kelompok PC yang menunjukkan peningkatan aktivitas CAT di korteks serebral. Selain itu, PC dan DCM juga meningkatkan aktivitas SOD di korteks serebral secara signifikan dibandingkan dengan kelompok ECS ($p < 0,05$), meskipun tidak menunjukkan aktivitas di hipokampus. Uji lipid peroksidase menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA pada kontrol ECS. pemberian PC menunjukkan penghambatan lipid peroksidasi pada di hipokampus maupun korteks yang ditunjukkan kada MDA yang rendah, sebanding dengan *citicoline*.



Gambar IV. 9 Hasil uji antiinflamasi otak tikus yang diinduksi ECS berdasarkan kadar (A) TNF- α dan (B) IL-1 β pada kelompok ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), fraksi lignan *P. cubeba* (DCM), citicoline (C), kontrol ECS dan kontrol normal (NO). ^abeda signifikan terhadap ECS ($p < 0,05$), ^bsebanding terhadap *citicoline* ($p > 0,05$).

Kadar TNF- α dan IL-1 β di hipokampus dan korteks meningkat secara signifikan pada kontrol ECS dibandingkan dengan kontrol NO ($p < 0,05$). Level TNF- α dan IL-1 β korteks pada kelompok PC dan DCM secara signifikan lebih rendah daripada kontrol ECS. Namun, PC dan DCM hanya menurunkan kadar IL-1 β di korteks dan tidak di hipokampus. Data juga menunjukkan bahwa pemberian PC dan DCM menekan TNF- α di hipokampus sebanding dengan *citicoline* (Gambar IV.9).

Salah satu pemanfaatan buah *P. cubeba* secara tradisional adalah untuk memperkuat daya ingat, terutama pada kondisi seperti pasca stroke, dimana sebagian besar pasien mengalami gangguan kognitif. Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh *P. cubeba* pada fungsi kognitif, menggunakan model hewan yang diinduksi ECS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *P. cubeba* dapat meringankan gangguan kognitif dengan menghambat peroksidasi lipid, menurunkan kadar TNF- α dan IL-1 β , serta meningkatkan aktivitas SOD dan CAT di hipokampus dan korteks serebral. Temuan ini menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas fungsi kognitif mungkin karena sifat anti-inflamasi dan antioksidan dari *P. cubeba*.

Pada penyakit neurodegeneratif, produksi berlebih spesies oksigen reaktif (ROS) sering dikaitkan dengan peradangan di otak (Lalkovičová and Danielisová, 2016). Salah satu bagian otak yang sering terkena adalah hipokampus. Wilayah otak ini memainkan peran penting dalam memproses ingatan spasial dan temporal, dan disfungsi hipokampus terkait erat dengan penurunan kognitif (Sweatt, 2004). Korteks prefrontal otak juga memainkan peran penting dalam memori kerja (Xiaoyu et al., 2022). Selain itu, penelitian menunjukkan bahwa stres oksidatif kronis akan menurunkan proliferasi sel di korteks serebral (Banasr et al., 2007). ECS mengaktifkan sel mikroglia (sel imun residen di otak), sehingga memicu peradangan saraf dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 (An and Shi, 2020). Peradangan saraf yang berkepanjangan berpotensi menyebabkan kerusakan saraf, yang juga mengaktifkan jalur stres oksidatif, seperti peningkatan O²⁻, ROS, nitrit, dan peroksidasi lipid, yang diduga

merupakan mekanisme yang menyebabkan gangguan memori pada hewan yang diobati dengan ECS.

Studi saat ini menunjukkan bahwa pengobatan ECS meningkatkan stres oksidatif, menghasilkan konsentrasi MDA yang tinggi, aktivitas CAT dan SOD yang rendah di hipokampus tikus dan korteks serebral. Di sisi lain, PC dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas CAT di hipokampus dan korteks. Meski begitu, PC dan DCM hanya memengaruhi aktivitas SOD di korteks tetapi tidak di hipokampus. Sedangkan untuk hasil kadar MDA, hanya kelompok PC yang menunjukkan kemampuan menghambat peroksidasi lipid. Induksi ECS juga menyebabkan peradangan pada hipokampus dan korteks serebral, ditandai dengan peningkatan TNF- α dan IL-1 β . Pemberian PC dan DCM secara signifikan mengurangi tingkat sitokin pro-inflamasi ini, terutama di korteks serebral.

Hasil penelitian ini mengkonfirmasi aktivitas *P. cubeba* sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang dapat diterapkan untuk mengurangi gangguan kognitif. Studi yang telah ada menunjukkan bahwa ekstrak etanol *P. cubeba* dapat mengurangi peradangan yang sebanding dengan obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) (E.-M. Choi and Hwang, 2003; Perazzo et al., 2013b). Penelitian juga menunjukkan bahwa salah satu mekanisme antiinflamasi *P. cubeba* menargetkan jalur penambah rantai cahaya faktor kappa nuklir jalur sel B teraktivasi (NF- κ B) (Qomaladewi et al., 2019). Selain ekstrak etanol, lignan *P. cubeba* juga telah banyak dipelajari sebagai agen antiinflamasi. Misalnya, cubebin dan hinokinin telah diuji untuk menghambat edema pada tikus (Godoy de Lima, Barros, and da Silva Laurentiz, 2018; G. H. B. Souza et al., 2004).

P. cubeba diketahui mengandung variasi lignan, dan masing-masing lignan menunjukkan aktivitas farmakologi (Godoy de Lima, Barros, and da Silva Laurentiz, 2018), sehingga pada penelitian selain ekstrak, juga diujikan fraksi kaya lignan *P. cubeba*. Penelitian ini menunjukkan bahwa efek PC sebanding dengan DCM pada peningkatan fungsi kognitif. Sebagai antioksidan, PC menunjukkan hasil yang lebih baik daripada DCM, namun keduanya menunjukkan efek yang

sebanding sebagai antiinflamasi. Analisis GC-MS menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi *P. cubeba* mengandung berbagai lignan (Tabel IV.5). DCM menunjukkan persentase area cubebin, hinokinin dan yatein yang lebih tinggi daripada PC. Namun demikian, PC menunjukkan variasi kandungan yang lebih banyak dibandingkan DCM. Hinokinin merupakan salah satu lignan yang telah dipelajari memiliki efek farmakologis seperti antioksidan dan antiinflamasi (Lima et al., 2017), yang mungkin menjadi salah satu komponen yang bertanggung jawab untuk menghasilkan efek dalam penelitian ini.

Dalam penelitian ini, *citicoline* digunakan sebagai pembanding. Suplemen ini diketahui memiliki efek neuroprotektif yang komprehensif, yang dapat meningkatkan neurotransmitter seperti asetilkolin, dopamin, dan norepinefrin, serta sirtuin-1 (SIRT1) di otak, dan menghambat peradangan dengan menghalangi pembentukan fosfolipase A dan ROS, mencegah kerusakan saraf. Studi ini mengkonfirmasi efek antioksidan dan anti-inflamasi *citicoline* pada tikus yang diinduksi ECS. Data antiinflamasi juga menunjukkan hasil yang sejalan dengan model studi lain, di mana *citicoline* hanya memengaruhi TNF- α otak tetapi tidak IL-1 β (Bogdanov et al., n.d.). Menariknya, hasil ini sejalan dengan PC dan DCM. Studi sebelumnya mengkonfirmasi efek cubebin dalam menghambat aktivitas *acetylcholinesterase* (AChE) (Somani et al., 2017), yang diasumsikan juga berperan dalam peningkatan kognitif oleh *P. cubeba* dalam penelitian ini. Keterbatasan penelitian ini adalah hanya berfokus pada dua mekanisme utama yang menyebabkan gangguan kognitif, stres oksidatif, dan inflamasi. Meskipun mungkin ada efek yang mungkin terjadi melalui mekanisme lain, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan.

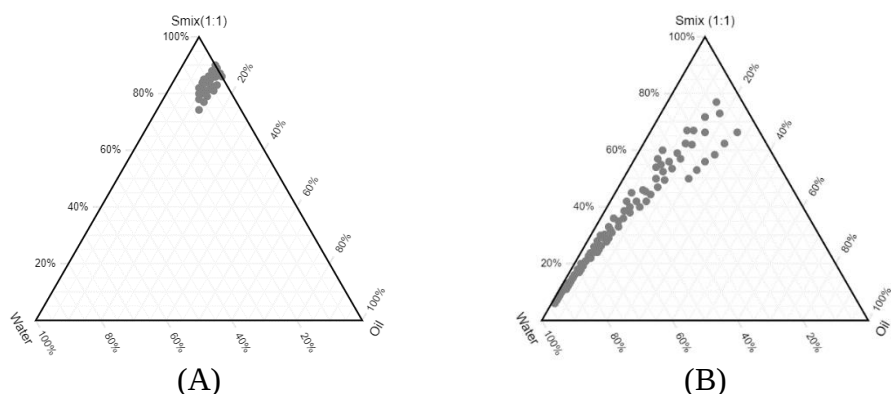
Studi tahapan ini menunjukkan bahwa pemberian *P. cubeba* dapat mengurangi gangguan kognitif pada tikus yang diinduksi oleh ECS. Hasilnya menunjukkan bahwa mekanisme antioksidan dan antiinflamasi memainkan peran penting dalam melindungi daerah hipokampus dan kortikal otak, yang menghasilkan aktivitas peningkatan daya ingat. Meskipun PC lebih unggul dibandingkan DCM dalam beberapa parameter antioksidan, secara keseluruhan kedua bahan uji menunjukkan

aktivitas yang sebanding, sehingga keduanya dilanjutkan pada formulasi sediaan nanoemulsi.

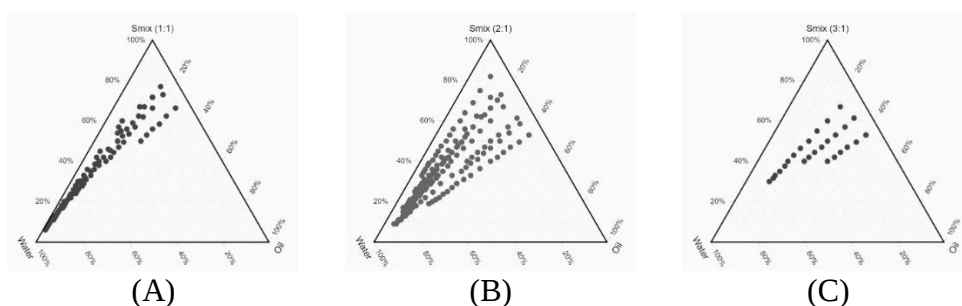
IV.10 Formulasi sediaan nanoemulsi *P. cubeba*

Penggunaan antioksidan pada penyakit seperti Parkinson, penyakit Alzheimer, atau stroke iskemik telah dipelajari secara ekstensif sebagai agen neuroprotektif. Namun, pengobatan penyakit neurodegeneratif seringkali dibatasi oleh ketidakmampuan obat memasuki otak (Mutoh et al., 2016). Beberapa pendekatan telah dilakukan untuk meningkatkan penghantaran obat ke otak, termasuk injeksi intraparenkim, merusak BBB sementara, manipulasi obat, sistem nanocarrier, atau pemberian intranasal (Silva, 2006). Penelitian tahap sebelumnya telah membuktikan kapasitas antioksidan *P. cubeba* di otak (Dwita, Iwo, Mauludin, et al., 2023). Aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi *P. cubeba* juga bermanfaat dalam gangguan kognitif (Dwita, Iwo, Elfahmi, et al., 2023). Pada penelitian ini ekstrak diformulasikan dalam bentuk nanoemulsi dan nanoemulsi mukoadhesif untuk penggunaan intranasal.

Berdasarkan seleksi eksipien, Capryol 90 dipilih sebagai minyak dan Tween 20 sebagai surfaktan. Konstruksi diagram *pseudo ternary phase* menunjukkan bahwa propilen glikol menghasilkan area nanoemulsi yang lebih baik daripada PEG400 sebagai ko-surfaktan (Gambar IV.11). Kemudian pengujian dilanjutkan dengan memvariasikan rasio S_{mix} yang dipilih, yaitu Tween 20 dan propilen glikol. Penambahan jumlah kosurfaktan tidak menghasilkan area nanoemulsi (gambar tidak ditampilkan), sehingga pengujian dilakukan dengan penambahan jumlah surfaktan. Gambar IV.12 menunjukkan rasio S_{mix} 2:1 menghasilkan area nanoemulsi terbesar dan menurun pada rasio 3:1. Oleh karena itu pengujian tidak dilakukan pada rasio yang lebih tinggi, dan S_{mix} 2:1 dipilih untuk digunakan dalam formulasi.



Gambar IV. 10 Diagram *pseudo ternary phase* dari nanoemulsi yang terdiri dari kapriol 90 (minyak), Tween 20 (surfaktan), air dan kosurfaktan: PEG 400 (A) dan Propilen glikol (B).



Gambar IV. 11 Diagram fase terner semu nanoemulsi yang tersusun dari kapriol 90 (minyak), Tween 20 (surfaktan), propilen glikol (kosurfaktan) dan air dengan variasi rasio S_{mix} (A) S_{mix} 1:1, (B) S_{mix} 2:1, (C) S_{mix} 3:1.

Percobaan dilanjutkan dengan memvariasikan konsentrasi S_{mix} , minyak dan ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), dengan hasil seperti pada Tabel IV. 6. Dari 32 formula yang diuji, 13 formula menghasilkan nanoemulsi transparan. Formula transparan diuji ketahanannya terhadap pengenceran (dilusi), dan hanya 9 formula yang tetap stabil. Formula ini kemudian dilanjutkan ke uji diameter globul dan *polydispersity index* (PDI).

Tabel IV. 6 Formula, diameter dan PDI nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC)

No	S_{mix} (2:1)	Minyak	PC	Hasil	Dilusi	Diameter (nm)	PDI
1	10	5	2,5	Keruh	-	-	-
2	20	5	2,5	Keruh	-	-	-
3	25	2,5	2,5	Keruh	-	-	-
4	28	15	2,5	Keruh	-	-	-
5	30	2,5	2,5	Transparan	Transparan	9,63±0,05	0,07±0,026

6	30	5	2,5	Transparan	Transparan	10,83±0,05	0,084±0,011
7	30	7,5	2,5	Keruh	-	-	-
8	30	10	2,5	Keruh	-	-	-
9	30	20	2,5	Keruh	-	-	-
10	35	22	2,5	Keruh	-	-	-
11	35	7,5	2,5	Transparan	Keruh	-	-
12	35	10	2,5	Keruh	-	-	-
13	35	15	2,5	Keruh	-	-	-
14	40	10	2,5	Transparan	Keruh	-	-
15	40	20	2,5	Keruh	-	-	-
16	30	0	2,5	Transparan	Transparan	8,83±0,12	0,069±0,016
17	25	0	2,5	Transparan	Transparan	9±0,24	0,069±0,02
18	20	0	2,5	Transparan	Transparan	9,1±0,01	0,059±0,1
19	10	0	2,5	Transparan	Transparan	10,73±0,76	0,16±0,054
20	7,5	0	2,5	Keruh	-	-	-
21	5	0	2,5	Keruh	-	-	-
22	10	1	2,5	Keruh	-	-	-
23	10	0	5	Keruh	-	-	-
24	15	0	5	Keruh	-	-	-
25	20	0	5	Keruh	-	-	-
26	25	0	5	Transparan	Transparan	10,17±0,05	0,055±0,05
27	25	0	7,5	Keruh	-	-	-
28	30	0	7,5	Transparan	Keruh	-	-
29	30	0	10	Keruh	-	-	-
30	35	0	10	Transparan	Keruh	-	-
31	40	0	7,5	Transparan	Transparan	10,77±0,09	0,075±0,01
32	40	2,5	5	Transparan	Transparan	10±0,08	0,056±0,015
32K	40	2,5	5	Transparan	Transparan	14,9±0,08	0,219±0,007

K: Formula dengan kitosan 0,5%

Formula 5, 6, 16, 17, 18, 19, 26, 31 dan 32 semua menghasilkan ukuran diameter globul dibawah 100 nm sehingga dilanjutkan untuk uji stabilitas termodinamika. Formula yang menghasilkan sediaan transparan pada nanoemulsi PC, disamakan untuk pembuatan nanoemulsi DCM. Dari 12 formula, hanya 3 formula yang tetap transparan setelah dilusi. Ketiga formula ini menghasilkan diameter globul dibawah 100 nm sehingga dilanjutkan ke uji stabilitas termodinamika.

Tabel IV. 7 Formula, diameter dan PDI nanoemulsi Fraksi Lignan *P. cubeba* (DCM)

No	Smix (2:1)	Oil	DCM	Hasil	Dilusi	Diameter (nm)	PDI
----	------------	-----	-----	-------	--------	---------------	-----

1	30	2,5	2,5	Transparan	Transparan	11,37±2,88	0,11±0,02
2	30	5	2,5	Transparan	Transparan	11,2±0,29	0,33±0,31
3	35	7,5	2,5	Transparan	Keruh	-	-
4	40	10	2,5	Transparan	Keruh	-	-
5	35	0	2,5	Keruh	-	-	-
6	30	2,5	5	Transparan	Keruh	-	-
7	30	2,5	7,5	Keruh	-	-	-
8	35	2,5	7,5	Keruh	-	-	-
9	40	2,5	7,5	Transparan	Keruh	-	-
10	40	2,5	10	Keruh	-	-	-
11	40	5	5	Transparan	Keruh	-	-
12	40	2,5	5	Transparan	Transparan	10,9±0,08	0,098±0,012
12K	40	2,5	5	Transparan	Transparan	17,3±0,22	0,205±0,002

K: Formula dengan kitosan 0,5%

Formula 32 pada PC dan formula 12 pada DCM memiliki ukuran globul dan PDI terkecil dengan konsentrasi zat aktif tertinggi. Sehingga formula ini dipilih untuk diformulasikan menjadi nanoemulsi mukoadhesif dengan penambahan kitosan (32K dan 12K) untuk tujuan penggunaan intranasal. Hasil uji stabilitas termodinamika menunjukkan semua formula tetap stabil setelah sentrifugasi, dan tidak ada perubahan signifikan pada diameter globul dan PDI setelah *heating-cooling cycle* dan *Freeze-thaw cycle* (Tabel IV. 8 dan Tabel IV. 9).

Tabel IV. 8 Hasil uji stabilitas termodinamika nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC)

No	sentrifuga	Heating-cooling cycle				Freeze-thaw cycle			
		Diameter (nm)	Std	PDI	Std	Diameter (nm)	Std	PDI	Std
5	Stabil	9,83	0,12	0,049	0,006	10,17	0,05	0,033	0,009
6	Stabil	11,30	0,08	0,114	0,070	11,97	1,01	0,093	0,012
16	Stabil	9,23	0,09	0,058	0,009	8,83	0,52	0,067	0,017
17	Stabil	9,00	0,00	0,053	0,026	9,00	0,24	0,100	0,017
18	Stabil	9,40	0,08	0,074	0,013	9,67	0,21	0,080	0,014
19	Stabil	10,13	0,17	0,064	0,022	55,43	0,54	0,571	0,000
26	Stabil	10,23	0,05	0,048	0,013	10,23	0,12	0,077	0,003
31	Stabil	10,63	0,12	0,076	0,008	10,30	0,08	0,063	0,004
32	Stabil	10,03	0,05	0,061	0,009	9,80	0,08	0,071	0,005
32 K	Stabil	15,03	0,09	0,237	0,024	14,60	0,08	0,219	0,004

Tabel IV. 9 Hasil uji stabilitas termodinamika nanoemulsi fraksi lignan *P. cubeba* (DCM)

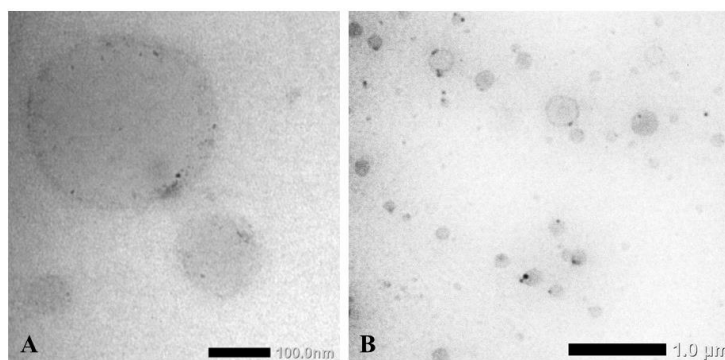
No	sentrifuga	Heating-cooling cycle				Freeze-thaw cycle			
		Diameter (nm)	Std	PDI	Std	Diameter (nm)	Std	PDI	Std
1	Stabil	10,20	0,00	0,064	0,011	11,30	0,14	0,080	0,028
2	Stabil	11,60	0,24	0,090	0,029	11,20	0,14	0,048	0,011
12	Stabil	11,03	0,05	0,067	0,013	10,63	0,05	0,075	0,009
12 K	Stabil	17,07	0,09	0,207	0,017	17,80	0,28	0,201	0,008

Selanjutnya formula 32, 32K dengan zat aktif PC dan 12, 12K dengan zat aktif DCM diujikan pada hewan untuk mengetahui aktivitas antioksidan otak masing-masing formula. Formula 32 ekstrak *P. cubeba* selanjut disebut sebagai nanoemulsi ekstrak (NE), formula 32K menjadi nanoemulsi-mukoadesif ekstrak (MNE), formula 12 fraksi lignan menjadi nanoemulsi fraksi (NF), dan 12K menjadi nanoemulsi-mukoadesif fraksi (MNF). Tabel IV.10 menunjukkan bahwa penambahan kitosan menghasilkan nanoemulsi bermuatan positif. Potensi zeta adalah $-10,76 \pm 0,94$, dan $46,026 \pm 7,6$, sedangkan pH masing-masing adalah 4,17 dan 4,44 untuk NE dan MNE.

Tabel IV. 10 Zetapotensial, pH dan Viskositas

No	Zat aktif	Kode	Zeta potensial (mV)	std	pH	Viscosity (mPa.s)
32	PC	NE	-10,76333333	0,94785	4,17	56,80
32 K	PC	MNE	46,02666667	7,6185	4,44	773,80
12	DCM	NF	-6,99	0,21	4,11	63,74
12 K	DCM	MNF	41,64	0,69	4,53	708,20

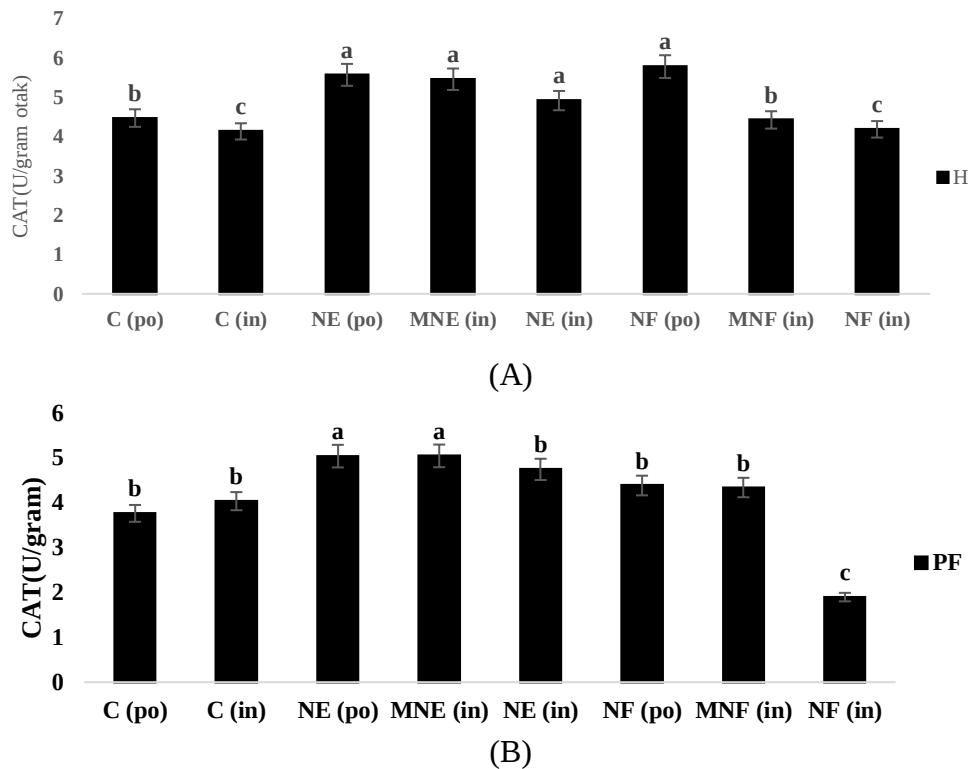
Keterangan: Ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PC), Fraksi lignan *P. cubeba* (DCM), nanoemulsi PC (NE), nanoemulsi-mukoadesif PC (MNE), nanoemulsi DCM (NF), dan nanoemulsi-mukoadesif DCM (MNF).



Gambar IV. 12 Gambar TEM dari NE (A) perbesaran 40.000x (B) perbesaran 5000x

Pemberian intranasal memiliki beberapa keunggulan, diantaranya termasuk non-invasif, menghindari sawar darah otak (BBB), menghindari eliminasi hati dan gastrointestinal, meningkatkan keamanan obat, onset cepat dan mengurangi paparan sistemik (Bourganis et al., 2018). Rute intranasal juga menyediakan akses langsung ke otak melalui jalur olfaktori dan trigeminal. Pada jalur olfaktori, obat dapat melewati jalur epitel, baik transeluler maupun paraseluler. Obat juga dapat masuk ke otak melalui lamina propria, *cribriform plate* hingga *olfactory bulb*, atau langsung masuk melalui saraf di rongga epitel hidung (Crowe et al., 2018). Jalur olfaktori mukosa adalah rute terbaik untuk obat yang ditujukan untuk pengiriman sistem saraf pusat (Veronesi et al., 2020)

Namun demikian, penghantaran obat dari nasal ke otak juga memiliki beberapa keterbatasan, seperti dibersihkan dengan cepat oleh pembersihan mukosiliar, di mana obat berukuran besar dieliminasi lebih cepat. Selain itu, musin di rongga intranasal memiliki muatan negatif, meningkatkan pembersihan silia obat dengan muatan permukaan negatif. Beberapa strategi telah dikembangkan untuk meningkatkan efektivitas formula obat intranasal target otak, termasuk menambahkan surfaktan yang dapat mengurangi gerakan silia. Vasokonstriktor dapat mengurangi paparan sistemik, dan menambahkan agen mukoadesif dapat mengurangi eliminasi silia (Bourganis et al., 2018). Polisakarida pilihan yang paling umum untuk sediaan intranasal adalah kitosan. kitosan termasuk dalam kategori General Safe Material (GRAS), biokompatibel dan biodegradabel, dan secara temporer dapat membuka *tight junction* pada sel epitel dan meningkatkan penghantaran obat intranasal (S. S. Davis and Illum, 2003). Sehingga pada penelitian ini kitosan dipilih sebagai agen mukoadesif dan diujikan untuk penggunaan intranasal sebagai antioksidan otak dengan parameter aktivitas katalase (CAT), dibandingkan terhadap penggunaan nanoemulsi yang diberikan secara peroral (Gambar IV.13).



Gambar IV. 13 Efek nanoemulsi *P. cubeba* pada aktivitas katalase (CAT) (A) hipokampus dan (B) prefrontal korteks. Huruf berbeda menunjukkan perbedaan bermakna pada $p < 0,05$

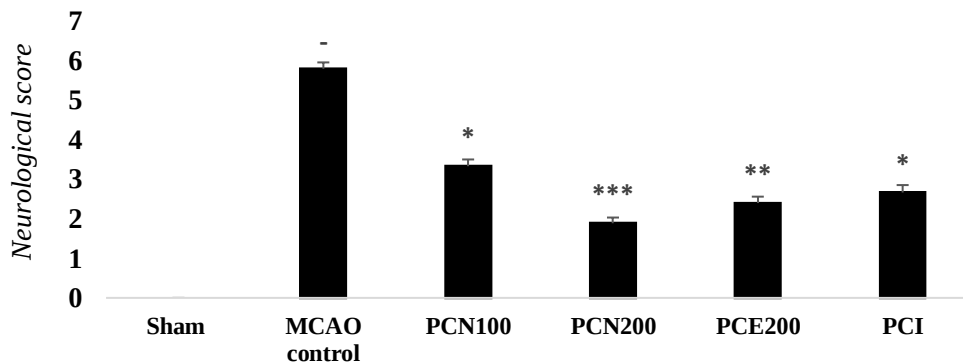
Pengujian aktivitas CAT pada hipokampus menunjukkan peningkatan pada kelompok nanoemulsi ekstrak *P. cubeba* baik yang diberikan secara oral maupun intranasal. NE peroral menghasilkan aktivitas terbaik, sebandingkan dengan MNE dan NE yang diberikan intranasal. hasil yang sebanding juga ditemukan pada kelompok fraksi lignan *P. cubeba*, namun hanya pada NF yang diberikan secara peroral. Sedangkan pada korteks prefrontal NE peroral dan MNE intranasal meningkatkan aktivitas CAT terbaik dibandingkan kelompok lainnya.

CAT adalah antioksidan paling krusial dalam tubuh. Defisiensi CAT ditemukan berhubungan langsung dengan penyakit neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, skizofrenia, dan gangguan bipolar (Nandi et al., 2019). Studi menunjukkan aktivitas CAT berkurang secara signifikan di hipokampus pada tikus tua (Ahn et al., 2016). Hipokampus dan korteks prefrontal sangat terkait dengan fungsi kognitif. Dengan demikian meningkatkan antioksidan di area ini dapat bermanfaat bagi pasien Alzheimer dan stroke iskemik. Area otak ini juga berhubungan dengan penyakit kejiwaan seperti skizofrenia (Sigurdsson and

Duvarci, 2016). Keterbatasan penelitian ini adalah bahwa kadar marker *P. cubeba*, cubebin, belum ditentukan dalam formula atau organ target.

IV.11 Efek Nanoemulsi *P. cubeba* pada tikus stroke iskemik

Pada pengujian antioksidan otak sediaan nanoemulsi *P. cubeba* telah didapatkan hasil terbaik pada nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PCN) dengan pemberian oral. Namun demikian, nanoemulsi-mukoadesif ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PCI) juga menunjukka hasil yang signifikan meskipun tidak sebaik pemberian oral. Oleh karena itu pada tahapan ini kedua kelompok diujikan pada model tikus stroke iskemik dibandingkan juga terhadap ekstrak etanol 96% *P. cubeba* (PCE). Pada penelitian ini *intraluminal suture Middle Cerebral Artery Occlusion* (MCAO) dipilih sebagai metode induksi tikus stroke iskemik, dikarenakan menyerupai kondisi stroke iskemik pada manusia. Model MCAO dengan reperfusi juga telah menjadi standar model hewan untuk pengujian efek neuroprotektif pada stroke akut (P. Liu et al., 2019). Pada penelitian ini dipilih model *transient*, dengan oklusi selama 60 menit, setelah itu dilakukan reperfusi selama 23 jam.

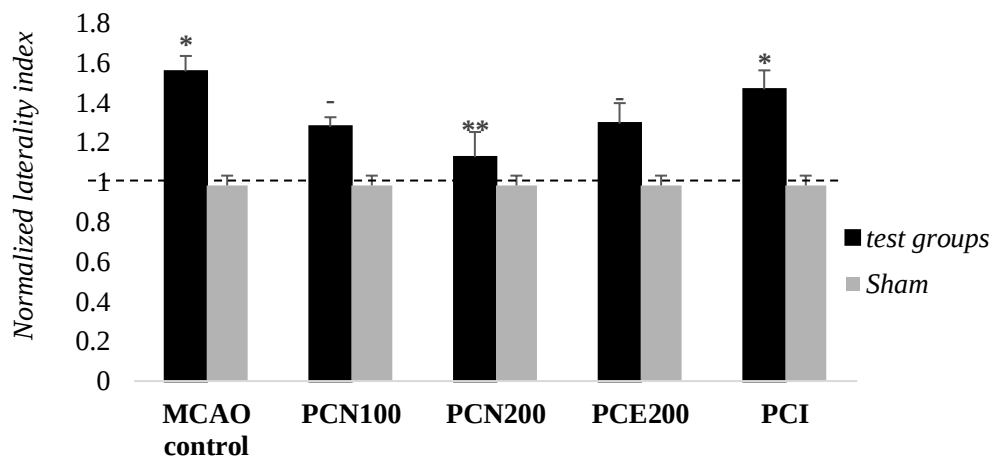


Gambar IV. 14 Skor neurologis hewan 23 jam setelah iskemik kelompok sham, kontrol MCAO , nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI). * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO, *** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

Fungsi neurologis hewan dinilai menggunakan *Modified Neurological Severity Score* (mNSS) 23 jam setelah oklusi. Pengujian ini menilai empat hal diantaranya gerakan, sensasi, keseimbangan dan refleksi. Penelitian menggunakan mNSS mengkategorikan gangguan neurologis menjadi 3, dimana skor 1-4 termasuk cedera

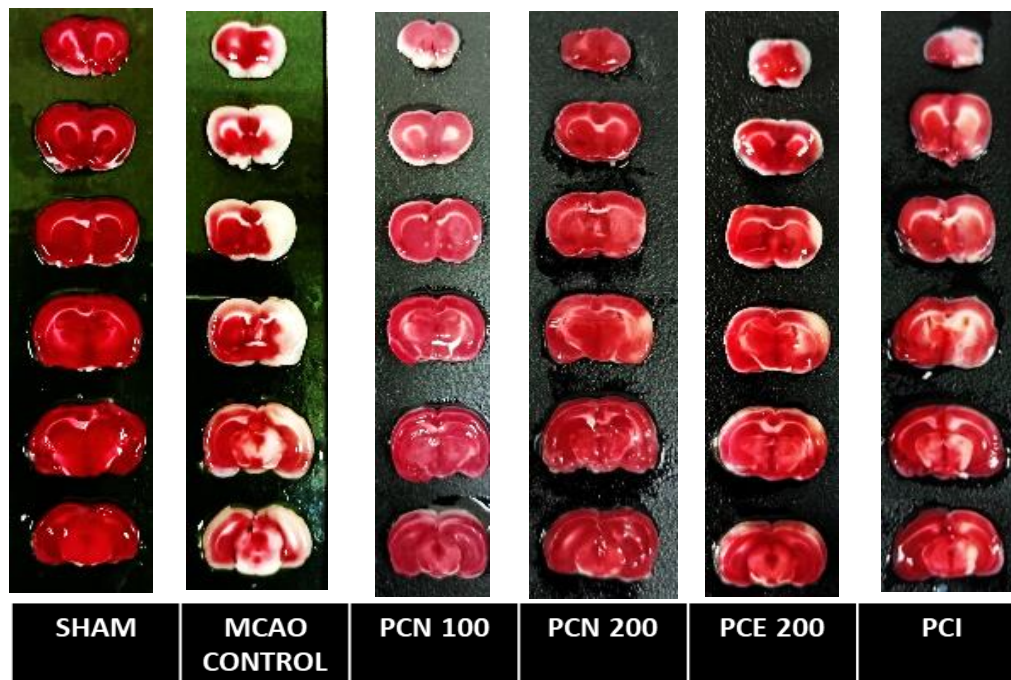
ringan, 5-9 cedera sedang, dan 10-14 cedera berat (Behrouzifar et al., 2018). Pada penelitian ini, tMCAO dengan oklusi selama satu jam mengakibatkan gangguan neurologis sedang pada kelompok kontrol MCAO, dengan skor sekitar 5-6. Tidak ada gangguan neurologis terlihat pada kelompok sham. Sedangkan hewan yang diberikan sediaan uji menunjukkan skor neurologis yang lebih rendah dan termasuk pada kategori cedera ringan (Gambar IV.14). Hal ini menunjukkan pemberian *P. cubeba* baik ekstrak maupun nanoemulsi dapat mengurangi dampak gangguan neurologis akibat stroke iskemik.

Selanjutnya dilakukan *corner test*, dimana hewan dimasukkan dalam aparatus dengan sudut 30°. *Corner test* dapat menilai sensorimotor dan asimetris postural dari tikus yang diinduksi stroke iskemik (Bouët et al., 2007), dimana hewan stroke akan cenderung berbelok pada arah hemisfer yang rusak, pada penelitian ini yaitu kearah kanan. Pada uji ini, didapatkan hasil berupa *normalized laterality index*, dimana nilai 1 menunjukkan tidak ada perbedaan sebelum dan sesudah induksi stroke, nilai mendekati 2 menunjukkan kecenderungan berbelok kearah ipsilateral terhadap kerusakan otak (kanan) dan nilai mendekati 0 menunjukkan kecenderungan berbelok kearah kontralateral (kiri).

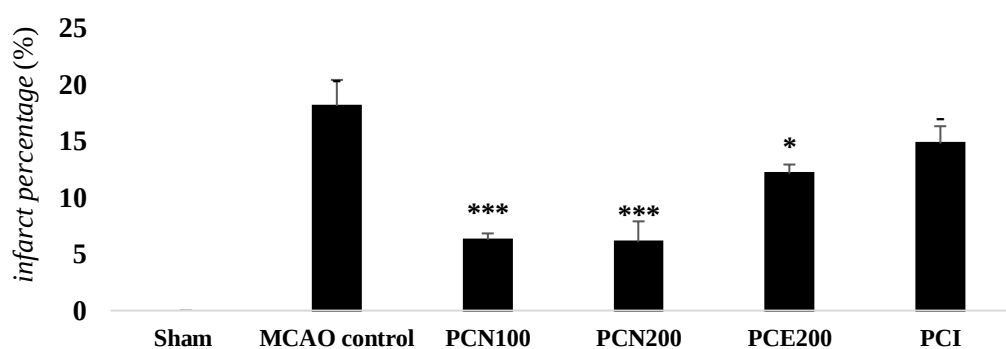


Gambar IV. 15 Hasil corner test yang ditunjukkan dengan normalized laterality index pada kontrol MCAO , nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs Sham, ** $p < 0.05$ vs kontrol MCAO.

Gambar IV.15 menunjukkan semua kelompok uji memiliki skor *normalized LI* lebih besar dari sham. Nilai *LI* lebih besar dari 1 menunjukkan asimetri postural pada tikus dengan kecenderungan berbelok ke arah kanan. Meskipun demikian, kelompok kontrol MCAO menunjukkan nilai tertinggi dibandingkan kelompok PCN, PCE dan PCI. Hasil terbaik ditunjukkan kelompok PCN 200 dengan $p < 0,01$ dibandingkan kontrol MCAO.



(A)



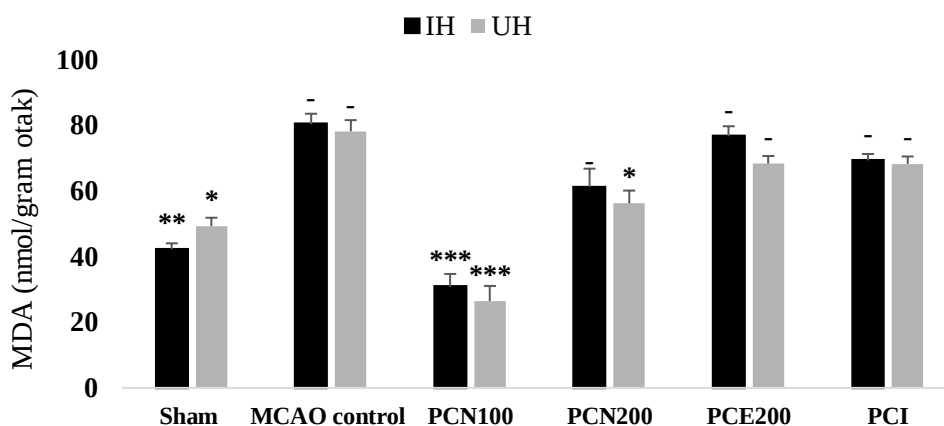
(B)

Gambar IV. 16 (A) Foto otak representatif dengan perwarnaan TTC (B) hasil perhitungan ukuran infark kontrol MCAO, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI),

* $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO, *** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

Gambar IV.16 menunjukkan area infark 24 jam setelah iskemia, dimana area infark kontrol MCAO signifikan lebih besar kelompok lainnya. Pemberian PCN dan PCE dapat menurunkan ukuran infark yang signifikan, terutama pada PCN ($p < 0,001$), dan tidak ada perbedaan pada dosis 100 dan 200 mg/kg.

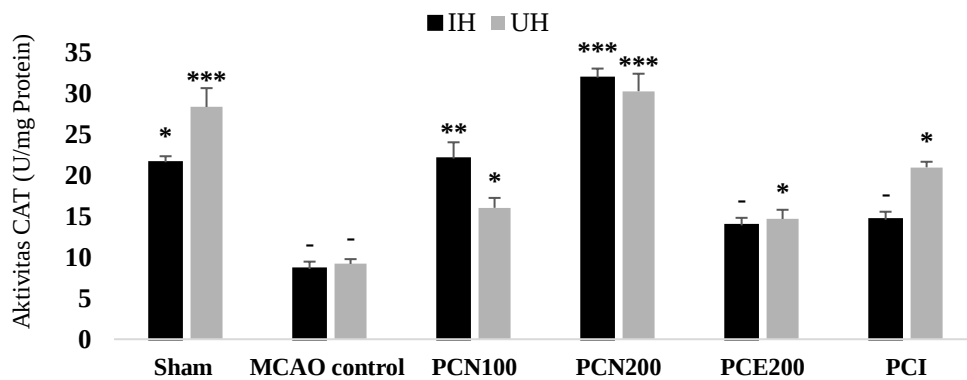
Pada kelompok hewan kedua, otak diambil dan dipisahkan bagian *cerebrum*. Hemisfer otak kemudian dibagi dua, *infarcted hemisphere (IH)* dan *uninfarcted hemisphere (UH)*. Masing-masing kemudian dibuat homogenat dan diujikan. Parameter antioksidan yang diujikan antaranya inhibisi lipid peroksidase, kadar glutathion, dan aktivitas katalase. Inhibisi peroksidasi lipid dinilai berdasarkan kadar MDA, dimana peningkatan kadar MDA menunjukkan aktivitas peroksidasi lipid yang tinggi. Induksi tMCAO menyebabkan peningkatan stres oksidatif yang berdampak pada peningkatan peroksidasi lipid pada kontrol MCAO signifikan dibandingkan sham, baik pada IH maupun UH. Gambar IV. 17 menunjukkan pemberian PCE dan PCI belum mampu menghambat lipid peroksidasi, sedangkan kelompok PCN200 hanya dapat menghambat peroksidasi lipid di area UH. Hasil terbaik ditunjukkan kelompok PCN100, dengan kadar MDA lebih rendah secara signifikan ($p < 0,001$) dibandingkan MCAO kontrol baik pada IH maupun UH.



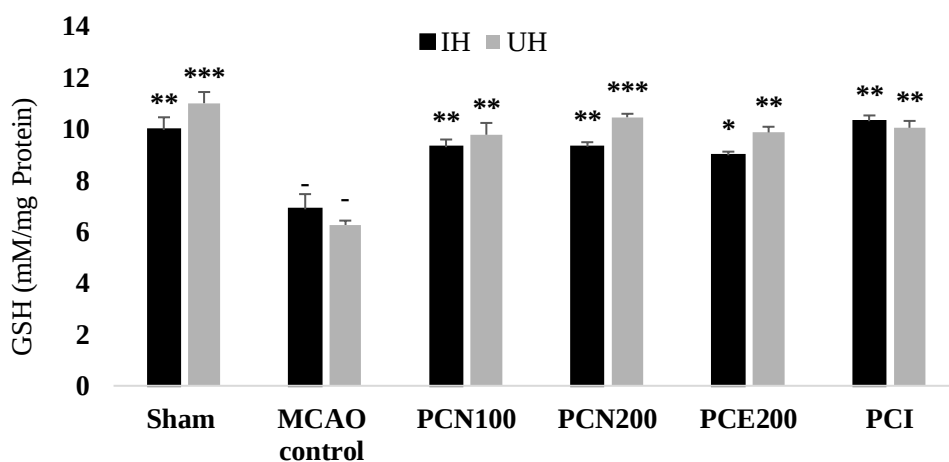
Gambar IV. 17 Hasil uji lipid peroksidasi berdasarkan kadar MDA pada kelompok sham, kontrol MCAO, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak

etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO, *** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

Pada uji aktivitas katalase dan kadar glutation, didapatkan hasil yang linear, dimana kontrol MCAO menunjukkan kadar yang paling rendah dibandingkan kelompok lain. Pada kedua parameter ini, PCN200 menghasilkan hasil terbaik pada IH maupun UH (Gambar IV. 18 dan Gambar IV. 19).



Gambar IV. 18 Hasil uji aktivitas katalase (CAT) pada kelompok sham, kontrol MCAO , nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO, *** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

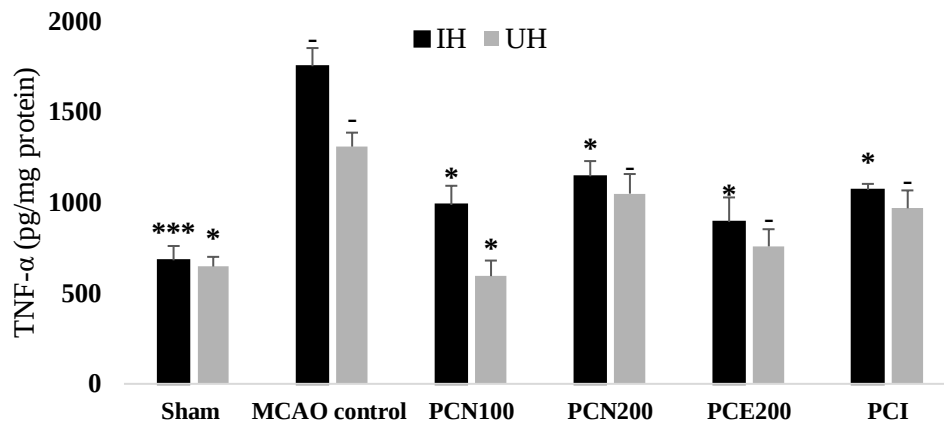


Gambar IV. 19 Hasil uji kadar glutation tereduksi (GSH) pada kelompok sham, kontrol MCAO , nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol

96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham.
* $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO,
*** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

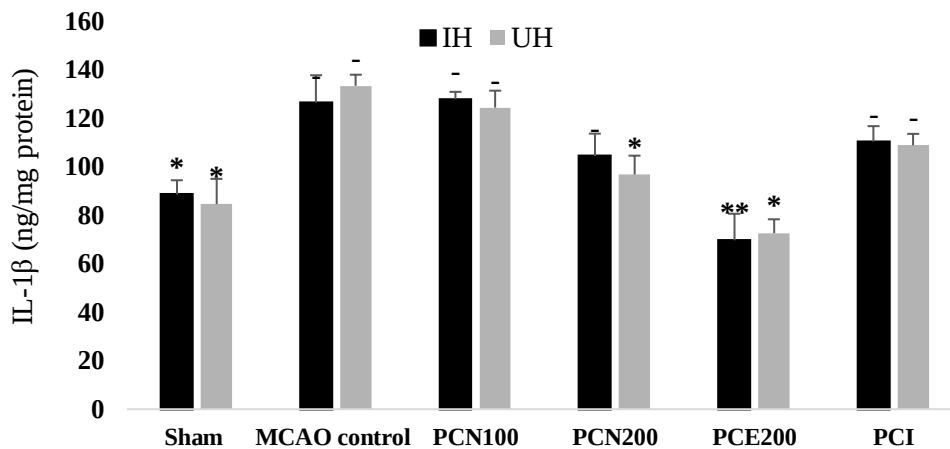
Stres oksidatif merupakan salah satu mekanisme utama penyebab kerusakan saraf setelah stroke iskemik. Stres oksidatif terlibat dalam berbagai mekanisme kerusakan, termasuk aktivasi sel glial, disfungsi mitokondria, misfolding protein, malfungsi proteasome, dan programmed cell death (Andersen, 2004). Aktivitas antioksidan baik di otak maupun di plasma berperan penting dalam melindungi kerusakan saraf pada serangan stroke iskemia akut. Pada awal reperfusi setelah stroke iskemik, antioksidan yang tersedia di plasma dan jaringan dapat menurunkan stres oksidatif sehingga mengurangi dampak cedera reperfusi. GSH merupakan antioksidan non-enzimatik yang dapat menjadi donor proton untuk *glutathione peroxidase* (GSHPx) dan memainkan peran sebagai neuroprotektan. Kekurangan GSH berkaitan dengan banyak penyakit neurodegeneratif dan penelitian pada pasien stroke iskemik menunjukkan penurunan GSH yang signifikan (Zimmermann et al., 2004). Ketidakseimbangan antioksidan dan produksi ROS pada saat stres oksidatif dapat menyebabkan peningkatan ukuran infark pada otak. Pada penelitian ini ditemukan hasil yang linear antara peningkatan antioksidan otak dan ukuran infark, dimana kelompok PCN menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik dan ukuran infark terkecil dibandingkan kelompok lain.

P. cubeba juga menunjukkan aktivitas sebagai anti-inflamasi pada hewan yang diinduksi stroke iskemik. Semua kelompok bahan uji dapat menurunkan kadar TNF- α pada hemisfer infark secara signifikan dibandingkan kontrol MCAO. Namun hanya PCN100 yang dapat secara signifikan menurunkan kadar TNF- α di bagian hemisfer yang tidak infark (Gambar IV. 20).



Gambar IV. 20 Hasil uji kadar TNF- α pada kelompok sham, kontrol MCAO, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, *** $p < 0.001$ vs kontrol MCAO.

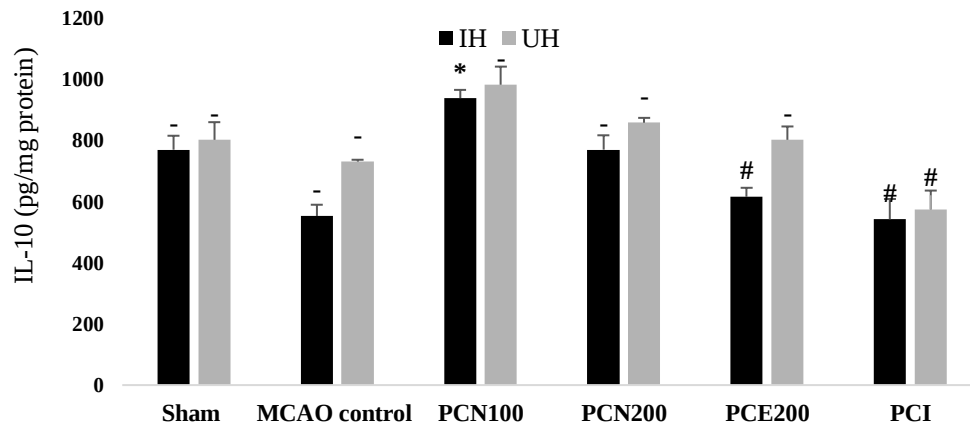
Sedangkan dari parameter IL-1 β dapat dilihat hanya kelompok PCE yang dapat menurunkan kadar IL-1 β di IH maupun UH. PCN200 juga dapat menekan IL-1 β , namun hanya pada area UH (Gambar IV. 21).



Gambar IV. 21 Hasil uji kadar IL-1 β pada kelompok sham, kontrol MCAO, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, ** $p < 0.01$ vs kontrol MCAO.

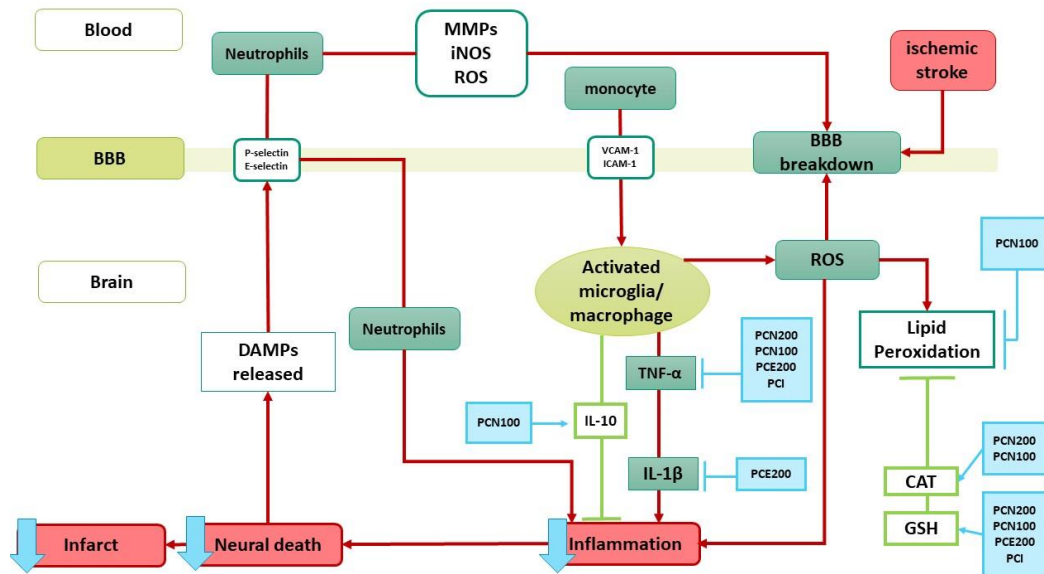
TNF- α dan IL-1 β merupakan dua sitokin pro-inflamasi penting yang berperan dalam kerusakan otak pasca stroke iskemik. TNF- α meningkat mulai dari 3 jam setelah stroke iskemia dan telah dipelajari berkaitan dengan peningkatan rilis

MMP-9 sehingga memperparah kerusakan BBB pasca stroke iskemik. Sedangkan kadar IL-1 β meningkat beberapa jam setelah stroke iskemik. Berdasarkan penelitian peningkatan kadar IL-1 β di plasma dan di otak berkontribusi pada kerusakan BBB.



Gambar IV. 22 Hasil uji kadar IL-10 pada kelompok sham, kontrol MCAO, nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI) dibandingkan terhadap sham. * $p < 0.05$ vs kontrol MCAO, # $p < 0.05$ vs PCN100.

Salah satu sitokin yang mengimbangi aktivitas TNF- α dan IL-1 β adalah IL-10. IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang dapat berperan neuroproteksi dan mengurangi kerusakan otak. IL-10 dapat menurunkan infiltrasi makrofag dan leukosit ke otak, serta berdampak pada penurunan volume infark dan gangguan neurologis pasca stroke iskemik. Pada penelitian ini hanya PCN100 yang dapat meningkatkan kadar IL-10 secara signifikan dibandingkan kontrol MCAO (Gambar IV. 22).



Gambar IV. 23 Ilustrasi mekanisme neuroproteksi *P. cubeba* pada stroke iskemik (→) aktivasi, (□) inhibisi. Nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 100 mg/kg (PCN100) dan 200 (PCN200), ekstrak etanol 96% *P. cubeba* oral dosis 200 (PCE200) dan nanoemulsi ekstrak etanol 96% *P. cubeba* intranasal (PCI)

Gambar IV. 23 menunjukkan mekanisme neuroproteksi *P. cubeba* pada stroke iskemik pada penelitian ini, yaitu melalui jalur utama penyebab kerusakan otak setelah stroke, stres oksidatif dan inflamasi. Setelah onset iskemia, sel-sel inflamasi seperti leukosit dan mikroglia yang diturunkan dari darah diaktifkan dan menumpuk di dalam jaringan otak yang kemudian menyebabkan cedera inflamasi. Penelitian juga menunjukkan bahwa astrosit dapat bertindak sebagai sel inflamasi yang merespons stroke iskemik, dengan mengeluarkan sitokin-sitokin pro-inflamatori. Sitokin diregulasi di otak setelah stroke, dan diekspresikan tidak hanya dalam sel-sel sistem imun, tetapi juga diproduksi oleh sel-sel otak termasuk glia dan neuron. Sitokin yang paling banyak dipelajari terkait dengan inflamasi pada stroke adalah IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 dan *transforming growth factor*- β (TGF- β) (Han dan Yenari, 2003). Di antara sitokin tersebut, IL-1 dan TNF- α memperburuk cedera serebral, namun IL-6, IL-10 dan TGF- β bersifat neuroprotektif. Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan IL-1 β dan TNF- α secara signifikan, serta peningkatan IL-10, terutama pada PCN100.

Penghambatan IL-1 β dan TNF- α *P. cubeba* pada penelitian ini diduga melalui hambatan aktivasi *nuclear factor* (NF)- κ B . Penelitian (Qomaladewi et al., 2019) menunjukkan ekstrak *P. cubeba* dapat menghambat aktivasi NF- κ B secara invitro. NF- κ B merupakan faktor transkripsi gen inflamasi seperti inducible nitric oxide synthase (iNOS), IL dan TNF, yang juga telah dipelajari merupakan salah satu target kerja neuroprotektor pada kasus stroke iskemik (Howell and Bidwell, 2020). Penelitian juga menunjukkan peningkatan IL-10 pada 24 jam setelah stroke dapat menyebabkan down-regulator TNF- α , sehingga menurunkan kadar sitokin inflamasi ini hingga 48 jam setelah stroke (Nayak et al., 2012). Peningkatan IL-10 pada pemberian PCN100 diduga juga berkontribusi dalam penurunan TNF- α pada kelompok ini, sehingga menghasilkan hambatan terbesar dibandingkan kelompok lain.

Penurunan IL-1 β dan TNF- α oleh *P. cubeba* dapat menurunkan inflamasi sel saraf dan pada akhirnya mengurangi kematian sel saraf yang dikonfirmasi data area infark yang menurun signifikan dibandingkan kontrol MCAO. Aktivitas penghambatan sitokin pro-inflamasi ini juga diduga dapat mengurangi produksi *Damage-associated molecular pattern* (DAMP). Pengeluaran DAMPs oleh sel nekrotik dapat menyebabkan kerusakan BBB lebih lanjut dan juga mengaktifasi molekul adesi sehingga lebih banyak sel imun yang masuk ke area iskemik di otak (Shichita et al., 2012).

Selain jalur inflamasi, stres oksidatif juga berperan penting dalam cedera otak setelah stroke. Produksi ROS akibat iskemia menyebabkan aktivasi sel endotel, platelet dan sistem komplemen. Molekul adesi seperti *p-selectin* dan *e-selectin* akan ditransfer ke permukaan membran sel nekrotik dan menghasilkan sinyal proinflamasi (Malone et al., 2019). Produksi ROS dan sitokin pro-inflamasi meningkatkan permeabilitas BBB dan menyebabkan peningkatan infiltrasi leukosit ke area iskemik. Glutathione merupakan antioksidan endogen yang dapat bereaksi dengan ROS dan mencegah stres oksidatif pada neuron. Sedangkan katalase dapat menghambat pembentukan radikal dan merombak H₂O₂ menjadi H₂O. Pada penelitian ini, kadar glutathione dan aktivitas katalase meningkat dengan pemberian *P. cubeba*, sehingga dapat menurunkan ROS dan pada akhirnya mengurangi

kerusakan BBB. Hal ini juga berdampak pada penurunan infiltrasi imun ke otak sehingga secara tidak langsung dapat menurunkan inflamasi di otak.

Penelitian bahan alam sebagai neuroprotektor melalui mekanisme antioksidan dan antiinflamasi juga telah banyak dilakukan menggunakan. Sebagai contoh, ekstrak *Ginkgo biloba* sebagai neuroprotektor pada hewan yang diinduksi tMCAO melalui mekanisme antioksidan dengan meningkatkan SOD, GSH dan menghambat MDA. Ekstrak tanaman lain seperti *Fructus Crataegi* menghasilkan efek neuroproteksi melalui hambatan ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , TNF- α , dan ICAM-1 (Tao et al., 2020).

Kecacatan setelah stroke secara langsung berhubungan dengan kejadian stres oksidatif dan inflamasi otak pasien pasca stroke. Perkembangan berbagai pilihan terapi untuk mengurangi stres oksidatif dan inflamasi pasca stroke iskemik menunjukkan harapan besar untuk mencegah kecatatan. Hal ini menjadi alasan pentingnya penelitian pencarian kandidat obat yang dapat digunakan untuk mengurangi dampak stres oksidatif dan inflamasi pada otak.

Bab V Kesimpulan

- Ekstrak etanol 96% dan fraksi lignan *P. cubeba* menghasilkan aktivitas antioksidan otak yang lebih baik dibandingkan ekstrak etanol 70% dan minyak atsirinya
- Ekstrak dan fraksi lignan *P. cubeba* dapat menghambat gangguan kognitif pada hewan yang diinduksi ECS , melalui peningkatan antioksidan dan antiinflamasi di hipokampus maupun korteks
- Formulasi ekstrak dan fraksi lignan *P. cubeba* mengasilkan sediaan nanoemulsi yang stabil secara termodinamika dan dapat meningkatkan aktivitas katalase di otak dengan aktivitas terbaik ditunjukkan nanoemulsi ekstrak yang digunakan secara oral
- Nanoemulsi ekstrak *P. cubeba* menunjukkan efek neuroproteksi pada hewan stroke iskemik yang ditunjukkan dengan penurunan area infark dan penghambatan inflamasi dan stress oksidatif di hemisfer infark.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-jalil, T. Z., and Nasser, Z. A. (2020): Piper cubeba: Phytochemical and pharmacological review of a routinely used spices., *International Journal of Pharmaceutical Research*, **12**(November), 761–768. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.SP1.119>
- Abolhasanzadeh, Z., Ashrafi, H., Badr, P., and Azadi, A. (2017): Traditional neurotherapeutics approach intended for direct nose to brain delivery, *Journal of Ethnopharmacology*, **209**(January), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.026>
- Adams, M., Gmünder, F., and Hamburger, M. (2007): Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature, *Journal of Ethnopharmacology*, **113**(3), 363–381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.016>
- Ahmad, M., and Graham, S. H. (2010): Inflammation After Stroke : Mechanisms and Therapeutic Approaches, 74–84. <https://doi.org/10.1007/s12975-010-0023-7>
- Ahmed, H. H., Salem, A. M., Sabry, G. M., Husein, A. A., Kotob, S. E., and Al, A. E. T. (2013): Possible Therapeutic Uses of Salvia triloba and Piper nigrum in Alzheimer's Disease–Induced Rats 1, **16**(5), 437–446. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0165>
- Ahn, J. H., Chen, B. H., Shin, B. N., Lee, T. K., Cho, J. H., Kim, I. H., Park, J. H., Lee, J. C., Tae, H. J., Lee, C. H., Won, M. H., Lee, Y. L., Choi, S. Y., and Hong, S. (2016): Comparison of catalase immunoreactivity in the hippocampus between young, adult and aged mice and rats, *Molecular Medicine Reports*, **14**(1), 851–856. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5300>
- Alminderej, F., Bakari, S., Almundarij, T. I., Snoussi, M., Aouadi, K., and Kadri, A. (2020): Antioxidant Activities of a New Chemotype of Piper cubeba L. Fruit Essential Oil (Methyleugenol/Eugenol): In Silico Molecular Docking and ADMET Studies., *Plants (Basel, Switzerland)*, **9**(11). <https://doi.org/10.3390/plants9111534>
- An, X., and Shi, X. (2020): Effects of electroconvulsive shock on neuro-immune responses: Does neuro-damage occur?, *Psychiatry Research*, **292**(March), 113289. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113289>
- Andersen, J. K. (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence?, *Nature Reviews Neuroscience*, **10**(7), S18. <https://doi.org/10.1038/nrn1434>
- Andriana, Y., Xuan, T. D., Quy, T. N., Tran, H.-D., and Le, Q.-T. (2019): Biological Activities and Chemical Constituents of Essential Oils from Piper cubeba Bojer and Piper nigrum L., *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24**(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24101876>
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F. J., Iqbal, Z., Khar, R. K., Aqil, M., and Talegaonkar, S. (2009): Nanoemulsion components screening and selection: A technical note, *AAPS PharmSciTech*, **10**(1), 69–76. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9178-x>
- Balch, M. H. H., Nimjee, S. M., Rink, C., and Hannawi, Y. (2020): Beyond the brain: The systemic pathophysiological response to acute ischemic stroke, *Journal of Stroke*, **22**(2), 159–172. <https://doi.org/10.5853/jos.2019.02978>

- Banasr, M., Valentine, G. W., Li, X., Gourley, S. L., Taylor, J. R., and Duman, R. S. (2007): Chronic Unpredictable Stress Decreases Cell Proliferation in the Cerebral Cortex of the Adult Rat, *Biological Psychiatry*, **62**(5), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.02.006>
- Barker, D. (2019): Lignans, *Molecules*, **24**(7), 2–5. <https://doi.org/10.3390/molecules24071424>
- Behrouzifar, S., Vakili, A., Bandegi, A. R., and Kokhaei, P. (2018): Neuroprotective nature of adipokine resistin in the early stages of focal cerebral ischemia in a stroke mouse model, *Neurochemistry International*, **114**, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.001>
- Bogdanov, P., Sampedro, J., Sol, C., Sim, O., Russo, C., Varela-sende, L., Sim, R., and Hern, C. (n.d.): Effects of Liposomal Formulation of Citicoline in Experimental Diabetes-Induced Retinal Neurodegeneration. <https://doi.org/10.3390/ijms19082458>
- Bouët, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M., and Schumann-Bard, P. (2007): Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse, *Experimental Neurology*, **203**(2), 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.09.006>
- Bourganis, V., Kammona, O., Alexopoulos, A., and Kiparissides, C. (2018): Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **128**(February), 337–362. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.009>
- Busnello, J. V., Leke, R., Oses, J. P., Feier, G., Bruch, R. S., Quevedo, J., Kapczinski, F., Souza, D. O., and Cruz Portela, L. V. (2006): Acute and chronic electroconvulsive shock in rats: Effects on peripheral markers of neuronal injury and glial activity, *Life Sciences*, **78**(26), 3013–3017. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.028>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods, *Journal of Food and Drug Analysis*.
- Chatterjee, B., Gorain, B., Mohananaidu, K., and Sengupta, P. (2019): Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion : Available proof of concept and existing challenges, *International Journal of Pharmaceutics*, **565**(March), 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.032>
- Choi, E.-M., and Hwang, J.-K. (2003): Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, Physalis angulata and Rosa hybrida, *Journal of Ethnopharmacology*, **89**(1), 171–175. [https://doi.org/doi:10.1016/S0378-8741\(03\)00280-0](https://doi.org/doi:10.1016/S0378-8741(03)00280-0)
- Choi, E.-M. M., and Hwang, J.-K. K. (2005): Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats., *Phytotherapy Research : PTR*, **19**(5), 382–386. <https://doi.org/10.1002/ptr.1464>
- Choi, E. M., and Hwang, J. K. (2005): Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats, *Phytotherapy Research*, **19**(5), 382–386. <https://doi.org/10.1002/ptr.1464>
- Clausen, B. H., Clausen, B. H., Wirenfeldt, M., Wirenfeldt, M., Høgedal, S. S., Frich, L. H., Frich, L. H., Nielsen, H. H., Nielsen, H. H., Nielsen, H. H., Schrøder, H. D., Østergaard, K., Finsen, B., Finsen, B., Kristensen, B. W., Kristensen, B. W., Lambertsen, K. L., Lambertsen, K. L., Lambertsen, K. L.,

- and Lambertsen, K. L. (2020): Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke, *Acta Neuropathologica Communications*, **8**(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00957-y>
- Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., and Hsu, W. H. (2018): Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain, *Life Sciences*, **195**(September 2017), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.025>
- D’Hooge, R., and De Deyn, P. P. (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory, *Brain Research Reviews*, **36**(1), 60–90. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4)
- Daniel, M. (Ed.) (2006): *Medicinal Plants Chemistry and Properties* (1st ed.), Science Publishers, Boca Raton, 266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b11003>
- Davis, S. M., and Pennypacker, K. R. (2017): Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke, *Neurochemistry International*, **107**, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.007>
- Davis, S. S., and Illum, L. (2003): Absorption Enhancers for Nasal Drug Delivery, *Clinical Pharmacokinetics*, **42**(13), 1107–1128. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342130-00003>
- de Souza, V. A., da Silva, R., Pereira, A. C., Royo, V. de A., Saraiva, J., Montanheiro, M., de Souza, G. H. B., da Silva Filho, A. A., Grando, M. D., Donate, P. M., Bastos, J. K., Albuquerque, S., and e Silva, M. L. A. (2005): Trypanocidal activity of (–)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**(2), 303–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.10.079>
- Deme, P., Aluganti Narasimhulu, C., and Parthasarathy, S. (2019): Evaluation of Anti-Inflammatory Properties of Herbal Aqueous Extracts and Their Chemical Characterization., *Journal of Medicinal Food*, **22**(8), 861–873. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0009>
- Doll, D. N., Barr, T. L., and Simpkins, J. W. (2014): Aging and Disease Cytokines : Their Role in Stroke and Potential Use as Biomarkers and Therapeutic Targets, **5**(5), 294–306.
- Dwita, L. P., Iwo, M. I., Elfahmi, and Mauludin, R. (2023): Neuroprotective Effect of Piper Cubeba L.F. Through Hippocampal and Cortical Antioxidant and Anti-Inflammatory in (Electroconvulsive Seizure) ECS-Induced Cognitive Impairment Rats. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4356661>
- Dwita, L. P., Iwo, M. I., Mauludin, R., and Elfahmi (2023): Neuroprotective potential of lignan-rich fraction of Piper cubeba L. by improving antioxidant capacity in the rat’s brain, *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, **82**, e266573. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.266573>
- Elfahmi, Ruslan, K., Batterman, S., Bos, R., Kayser, O., Woerdenbag, H. J., and Quax, W. J. (2007): Lignan profile of Piper cubeba, an Indonesian medicinal plant, *Biochemical Systematics and Ecology*, **35**(7), 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2007.01.003>
- Ellman, G. L. (1959): Tissue Sulfhydryl Groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70–77.
- Fan, D., Zhou, C., Chen, C., Li, X., Ma, J., Hu, Y., Li, G., Ruan, J., Wu, A., Li, L., and Gong, X. (2023): Lignans from the genus Piper L. and their pharmacological activities: An updated review, *Fitoterapia*, **165**(October

- 2022), 105403. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105403>
- Farmakope Herbal Indonesia* (2017): (II), Kementerian Kesehatan RI, Jakarta, 217–222.
- Feng, Y., Yang, L., Ma, X., Huang, Z., Zong, X., Citadin, C. T., Lin, H. W., and Zhang, Q. (2023): Photobiomodulation treatment inhibits neurotoxic astrocytic polarization and protects neurons in in vitro and in vivo stroke models, *Neurochemistry International*, **162**(December 2022), 105464. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105464>
- Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J., and Furuta, S. (2019): S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling, *Antioxidants*, **8**(9), 404. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox8090404>
- Godoy de Lima, R., Barros, M. T., and da Silva Laurentiz, R. (2018): Medicinal Attributes of Lignans Extracted from Piper Cubeba: Current Developments., *ChemistryOpen*, **7**(2), 180–191. <https://doi.org/10.1002/open.201700182>
- Godoy de Lima, R., Barros, M. T., da Silva Laurentiz, R., Lima, R. G. De, Barros, T., and Laurentiz, S. (2018): Medicinal Attributes of Lignans Extracted from Piper Cubeba: Current Developments., *ChemistryOpen*, **7**(2), 180–191. <https://doi.org/10.1002/open.201700182>
- Goenka, L., Uppugunduri Satyanarayana, C. R., S, S. K., and George, M. (2019): Neuroprotective agents in Acute Ischemic Stroke—A Reality Check, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **109**(October 2018), 2539–2547. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.041>
- Graham, S. M., McCullough, L. D., and Murphy, S. J. (2004): Overview Animal Models of Ischemic Stroke: Balancing perimental Aims and Animal Care, **54**(5), 486–496.
- Güzel, A., Rölz, R., Nikkhah, G., Kahlert, U. D., and Maciaczyk, J. (2014): A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat: A special emphasis on the methodology, *Experimental and Translational Stroke Medicine*, **6**(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-6>
- Hadwan, M. H. (2018): Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues, *BMC Biochemistry*, **19**(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>
- Han, R., Yu, Y., Zhao, K., Wei, J., Hui, Y., and Gao, J. M. (2022): Lignans from *Eucommia ulmoides* Oliver leaves exhibit neuroprotective effects via activation of the PI3K/Akt/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathways in H₂O₂-treated PC-12 cells, *Phytomedicine*, **101**(April), 154124. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154124>
- Howell, J. A., and Bidwell, G. L. (2020): Targeting the NF- κ B pathway for therapy of ischemic stroke, *Therapeutic Delivery*, **11**(2), 113–123. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0075>
- Hua, S., Wang, B., Chen, R., Zhang, Y. Y., Zhang, Y. Y., Li, T., Dong, L., and Fu, X. (2019): Neuroprotective Effect of Dichloromethane Extraction From *Piper nigrum* L. and *Piper longum* L. on Permanent Focal Cerebral Ischemia Injury in Rats, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, **28**(3), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.11.018>
- Johnson, W., Onuma, O., Owolabi, M., and Sachdev, S. (2016): Stroke: A global response is needed, *Bulletin of the World Health Organization*, **94**(9), 634A–

- 635A. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.181636>
- Kao, P.-F. (2003): Downregulation of Superoxide Dismutase Activity and Gene Expression in Cultured Rat Brain Astrocytes after Incubation with Vitamin C, **117**(111), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000071242>
- Kassem, A. A., El-alim, S. H. A., Mohamed, A., Mohammed, M. A., Hassan, N. S., and El-, S. E. (2020): Improved hepatoprotective activity of Beta vulgaris L . leaf extract loaded self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS): in vitro and in vivo evaluation, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **0**(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1811303>
- Kemenkes RI (2018): Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Indonesia tahun 2018, *Riset Kesehatan Dasar 2018*.
- Kim, J. Y., Park, J., Chang, J. Y., Kim, S., and Lee, J. E. (2016): Inflammation after Ischemic Stroke : The Role of Leukocytes and Glial Cells, **25**(5), 241–251.
- Kobayashi, K., and Pillai, K. S. (2013): *Applied Statistics in Pharmacology*, Taylor & Francis Group.
- Kumar, A., Aakriti, and Gupta, V. (2016): A review on animal models of stroke: An update, *Brain Research Bulletin*, **122**, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.016>
- Kumar, G. P., and Khanum, F. (2012): Neuroprotective potential of phytochemicals, *Pharmacognosy Reviews*, **6**(12), 81–90. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.99898>
- Lalkovičová, M., and Danielisová, V. (2016): Neuroprotection and antioxidants, *Neural Regeneration Research*, **11**(6), 865–874. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.184447>
- Lapchak, P. A., and Araujo, D. M. (2007): Advances in ischemic stroke treatment: Neuroprotective and combination therapies, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, **12**(1), 97–112. <https://doi.org/10.1517/14728214.12.1.97>
- Lee, S.-H. (2018): *Stroke Revisited: Pathophysiology of Stroke From Bench to Bedside*.
- Li, X., Huang, L., Liu, G., Fan, W., Li, B., Liu, R., Wang, Z., Fan, Q., Xiao, W., Li, Y., and Fang, W. (2020): Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF-κB pathway in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, **249**(September 2019), 112365. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112365>
- Lima, T. C., Lucarini, R., Volpe, A. C., de Andrade, C. Q. J. J., Souza, A. M. P. P., Pauletti, P. M., Januário, A. H., Símaro, G. V., Bastos, J. K., Cunha, W. R., Borges, A., da Silva Laurentiz, R., Conforti, V. A., Parreira, R. L. T. T., Borges, C. H. G. G., Caramori, G. F., Andriani, K. F., and e Silva, M. L. A. A. (2017): In vivo and in silico anti-inflammatory mechanism of action of the semisynthetic (–)-cubebin derivatives (–)-hinokinin and (–)-O-benzylcubebin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27**(2), 176–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.081>
- Liu, P., Song, X. C., Yang, X. S., Cao, Q. L., Tang, Y. Y., Liu, X. D., Yang, M., An, W. Q., Dong, B. X., and Song, X. Y. (2019): A preclinical model to assess brain recovery after acute stroke in rats, *Journal of Visualized Experiments*, **2019**(153), 1–7. <https://doi.org/10.3791/60166>
- Liu, W., Ma, H., DaSilva, N. A., Rose, K. N., Johnson, S. L., Zhang, L., Wan, C., Dain, J. A., and Seeram, N. P. (2016): Development of a neuroprotective

- potential algorithm for medicinal plants, *Neurochemistry International*, **100**, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.09.014>
- Luo, J., Min, S., Wei, K., Cao, J., Wang, B., Li, P., Dong, J., and Liu, Y. (2014): Propofol prevents electroconvulsive-shock- induced memory impairment through regulation of hippocampal synaptic plasticity in a rat model of depression, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, **10**, 1847–1859. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/NDT.S67108>
- Malone, K., Amu, S., Moore, A. C., Waeber, C., Salomone, S., and Waeber, C. (2019): Immunomodulatory Therapeutic Strategies in Stroke, **10**(June), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00630>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., and Malik, A. B. (2014): Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxidants and Redox Signaling*, **20**(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Mohd Sairazi, N. S., and Sirajudeen, K. N. S. (2020): Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, 5–7. <https://doi.org/10.1155/2020/6565396>
- Moradi, S. Z., Momtaz, S., Bayrami, Z., Farzaei, M. H., and Abdollahi, M. (2020): Nanoformulations of Herbal Extracts in Treatment of Neurodegenerative Disorders, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00238>
- Mutoh, T., Mutoh, T., Taki, Y., and Ishikawa, T. (2016): Therapeutic potential of natural product-based oral nanomedicines for stroke prevention, *Journal of Medicinal Food*, **19**(6), 521–527. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3644>
- Nahak, G., and Sahu, R. K. (2011): Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8**(1), 153–157.
- Nandi, A., Yan, L., Jana, C. K., and Das, N. (2019): Review Article Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases.
- Naqvi, S., Panghal, A., and Flora, S. J. S. (2020): Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs, *Frontiers in Neuroscience*, **14**(June), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00494>
- Nayak, A. R., Kashyap, R. S., Kabra, D., Purohit, H. J., Taori, G. M., and Dagainawala, H. F. (2012): Time course of inflammatory cytokines in acute ischemic stroke patients and their relation to inter-alfa trypsin inhibitor heavy chain 4 and outcome, *Annals of Indian Academy of Neurology*, **15**(3), 181–185. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.99707>
- Noumedem, A., Kuete, V., and Mihasan, M. (2014): Methanolic Extract of Piper nigrum Fruits Improves Memory Impairment by Decreasing Brain Oxidative Stress in Amyloid Beta (1 – 42) Rat Model of Alzheimer ’ s Disease. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0028-y>
- Nozohouri, S., Sifat, A. E., Vaidya, B., and Abbruscato, T. J. (2020): Novel approaches for the delivery of therapeutics in ischemic stroke, *Drug Discovery Today*, **25**(3), 535–551. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.007>
- Ovbiagele, B., Kidwell, C. S., Starkman, S., and Saver, J. L. (2003): Potential role of neuroprotective agents in the treatment of patients with acute ischemic stroke, *Current Treatment Options in Neurology*, **5**(5), 367–375. <https://doi.org/10.1007/s11940-003-0027-7>

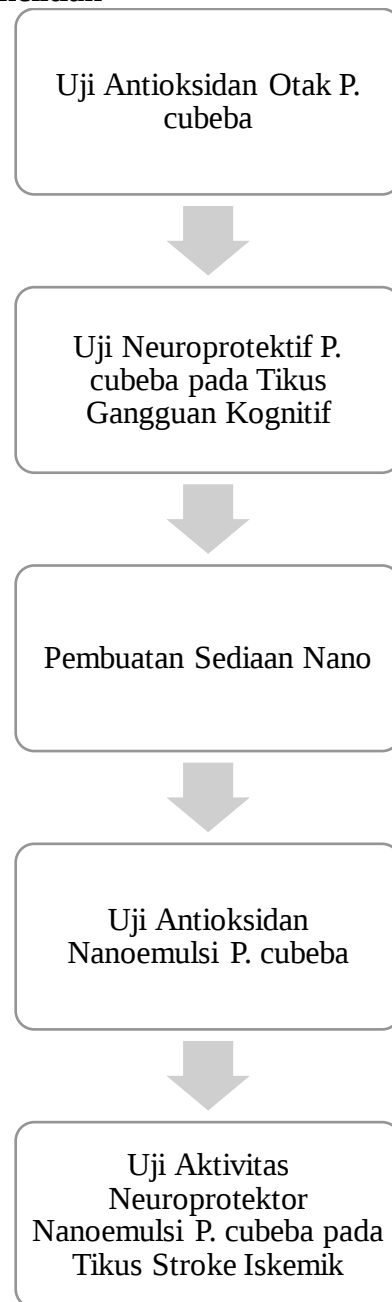
- Paul, S., and Candelario-jalil, E. (2021): Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies, *Experimental Neurology*, **335**(October 2020), 113518. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>
- Perazzo, F. F., Rodrigues, I. V., Maistro, E. L., Souza, S. M., Nanaykkara, N. P. D., Bastos, J. K., Carvalho, J. C. T., and De Souza, G. H. B. (2013a): Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae), *Pharmacognosy Journal*, **5**(1), 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2012.12.001>
- Perazzo, F. F., Rodrigues, I. V., Maistro, E. L., Souza, S. M., Nanaykkara, N. P. D., Bastos, J. K., Carvalho, J. C. T. T., and De Souza, G. H. B. B. (2013b): Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae), *Pharmacognosy Journal*, **5**(1), 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.phcgj.2012.12.001>
- Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., and Holmes, C. (2010): Microglia in neurodegenerative disease, *Nature Reviews Neurology*, **6**(4), 193–201. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.17>
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. ., and Shahabimajd, N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal of Biotechnology Vol.*, retrieved from internet: <http://www.3gpp.org/ftp/Specs/html-info/32744.htm>, **5**(11), 1142–1145.
- Prasad, N., Ramteke, P., Dholia, N., and Yadav, U. C. . (2018): *Chapter 27. Therapeutic Interventions to Block Oxidative Stress-Associated Pathologies, Immunity and Inflammation in Health and Disease*, Elsevier Inc., 339–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00027-5>
- Qomaladewi, N. P., Aziz, N., Kim, M.-Y. Y., and Cho, J. Y. (2019): *Piper cubeba* L. Methanol Extract Has Anti-Inflammatory Activity Targeting Src/Syk via NF- κ B Inhibition, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2019**, 1548125. <https://doi.org/10.1155/2019/1548125>
- Shakeel, F., Shazly, G. A., Raish, M., Ahmad, A., Kalam, M. A., Ali, N., Ansari, M. A., and Elosaily, G. M. (2015): Biological investigation of a supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery system of *Piper cubeba* essential oil, *RSC Advances*, **5**(127), 105206–105217. <https://doi.org/10.1039/c5ra22900f>
- Shekhar, S., Cunningham, M. W., Pabbidi, M. R., Wang, S., Booz, G. W., and Fan, F. (2018): Targeting vascular inflammation in ischemic stroke: Recent developments on novel immunomodulatory approaches, *European Journal of Pharmacology*, **833**(May), 531–544. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.028>
- Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M., and Yoshimura, A. (2012): Post-ischemic inflammation in the brain, *Frontiers in Immunology*, **3**(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00132>
- Shinji, S., Yasukazu, T., Hatsue, W., Kazuo, K., Machiko, I., and Naoki, M. (2011): Analysis of brain cell activation by nanosized particles of Ginkgo biloba extract, *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, retrieved from internet: <http://www.academicjournals.org/ijppb>, **3**(3), 28–33.
- Shirle, R., Ord, E. N. J., and Work, L. M. (2014): Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke, *Antioxidants*, **3**(3), 472–501. <https://doi.org/10.3390/antiox3030472>

- Sigurdsson, T., and Duvarci, S. (2016): Hippocampal-prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease, *Frontiers in Systems Neuroscience*, **9**(JAN2016), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00190>
- Silva, G. A. (2006): Neuroscience nanotechnology: Progress, opportunities and challenges, *Nature Reviews Neuroscience*, **7**(1), 65–74. <https://doi.org/10.1038/nrn1827>
- Situmeang, R. F. V., Pangestu, A., Stevano, R., Tannu, Y., Herlambang, J., and Putri, C. (2023): Reasons withholding intravenous thrombolysis for acute ischemic stroke in an Indonesian Tertiary Center, *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, **59**(1). <https://doi.org/10.1186/s41983-023-00613-x>
- Somani, G. S., Nahire, M. S., Parikh, A. D., Mulik, M. B., Ghumatkar, P. J., Laddha, K. S., and Sathaye, S. (2017): Neuroprotective effect of Cubebin: A dibenzylbutyrolactone lignan on scopolamine-induced amnesia in mice., *The Indian Journal of Medical Research*, **146**(2), 255–259. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_156_14
- Souza, G. H. B., Silva, A. A., Souza, V. A. De, Pereira, A. C., and Royo, V. D. A. (2004): Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-) - O - acetyl , and their preparation from (-) -cubebin, **59**, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2003.07.012>
- Svensson, M., Hallin, T., Broms, J., Ekstrand, J., and Tingström, A. (2017): Spatial memory impairment in Morris water maze after electroconvulsive seizures, *Acta Neuropsychiatrica*, **29**(1), 17–26. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.22>
- Sweatt, J. D. (2004): Hippocampal function in cognition, *Psychopharmacology*, **174**(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1795-9>
- Tao, T., Liu, M., Chen, M., Luo, Y., Wang, C., Xu, T., Jiang, Y., Guo, Y., and Zhang, J. H. (2020): Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective, *Pharmacology and Therapeutics*, **216**. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107695>
- Termin, A., Hoffman, M., and Bing, R. . (1992): A Simplified Method for The Determination of Nitric Oxide in Biological Solution, *Life Sciences*, **51**, 1621–1629. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90625-Y](https://doi.org/doi.org/10.1016/0024-3205(92)90625-Y)
- Uluç, K., Miranpuri, A., Kujoth, G. C., Aktüre, E., and Başkaya, M. K. (2010): Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat, *Journal of Visualized Experiments*, (48), 1–5. <https://doi.org/10.3791/1978>
- Umarova, R. M., Sperber, C., Kaller, C. P., Schmidt, C. S. M., Urbach, H., Klöppel, S., Weiller, C., and Karnath, H. O. (2019): Cognitive reserve impacts on disability and cognitive deficits in acute stroke, *Journal of Neurology*, **266**(10), 2495–2504. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09442-6>
- Veronesi, M. C., Alhamami, M., Miedema, S. B., Yun, Y., Ruiz-Cardozo, M., and Vannier, M. W. (2020): Imaging of intranasal drug delivery to the brain., *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, retrieved from internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32211216> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7076302>, **10**(1), 1–31.
- Vorhees, C. V., and Williams, M. T. (2006): Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory, *Nature Protocols*,

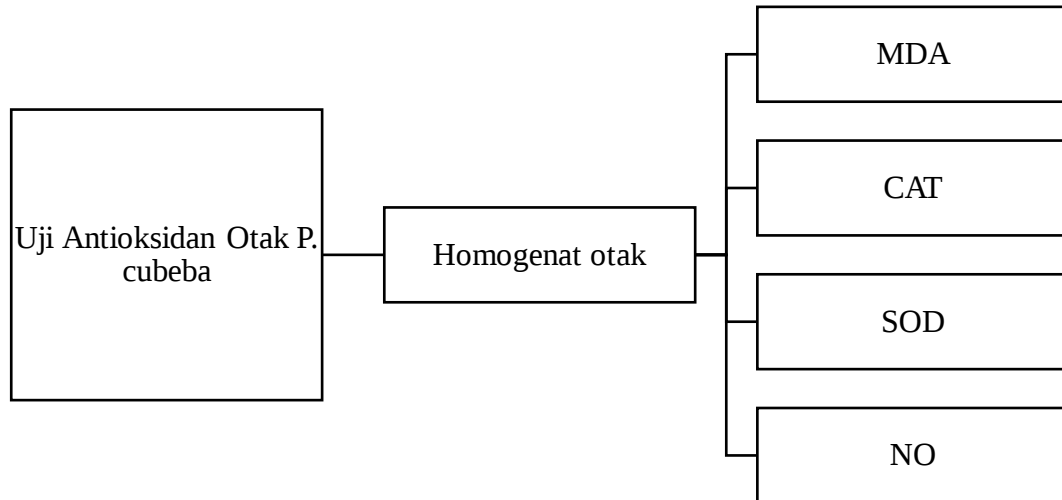
- 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Walz, W. (2016): *Rodent Models of Stroke* (U. Dirnagl, Ed.), Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-5620-3>
- Wang, B., Zhang, Y., Huang, J., Dong, L., Li, T., and Fu, X. (2017): Anti-inflammatory activity and chemical composition of dichloromethane extract from *Piper nigrum* and *P. longum* on permanent focal cerebral ischemia injury in rats, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **27**(3), 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.003>
- Wells, B. G., DiPiro, J. T., Schwinghammer, T. L., and DiPiro, C. V. (2017): *Pharmacotherapy Handbook, Tenth Edition*, McGraw-Hill Companies, 1–8, 787–797.
- Willför, S. M., Smeds, A. I., and Holmbom, B. R. (2006): Chromatographic analysis of lignans, *Journal of Chromatography A*, **1112**(1–2), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.054>
- Xiaoyu, M., Charles, Z., Yenho, C., Francisco, P., and Zheng, L. (2022): Working memory and reward increase the accuracy of animal location encoding in the medial prefrontal cortex, 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/cercor/bhac205>
- Xin, B. S., Zhao, P., Qin, S. Y., Yao, G. D., Huang, X. X., and Song, S. jiang (2022): Lignans with neuroprotective activity from the fruits of *Crataegus pinnatifida*, *Fitoterapia*, **160**(May), 105216. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105216>
- Yam, J., Schaab, A., Kreuter, M., and Drewe, J. (2008): *Piper cubeba* demonstrates anti-estrogenic and anti-inflammatory properties., *Planta Medica*, **74**(2), 142–146. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1034290>
- Zhang, Yan, Li, C. Bin, Xu, H. S., Lin, B. H., Chen, J. C., Zhao, Y. M., Yang, J. X., Zhang, X. F., and Shi, Y. S. (2022): Pterisin sesquiterpenes and lignans from *Pteris laeta* Wall. and their neuroprotective bioactivity, *Journal of Molecular Structure*, **1261**, 132890. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132890>
- Zhang, Yiwei, He, Q., Yang, M., Hua, S., Ma, Q., Guo, L., and Wu, X. (2020): Dichloromethane extraction from *Piper nigrum* L. and *P. longum* L. to mitigate ischemic stroke by activating the AKT / mTOR signaling pathway to suppress autophagy, *Brain Research*, **1749**(August), 147047. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147047>
- Zimmermann, C., Winnefeld, K., Streck, S., Roskos, M., and Haberl, R. L. (2004): Antioxidant Status in Acute Stroke Patients and Patients at Stroke Risk, 157–161. <https://doi.org/10.1159/000077662>

LAMPIRAN

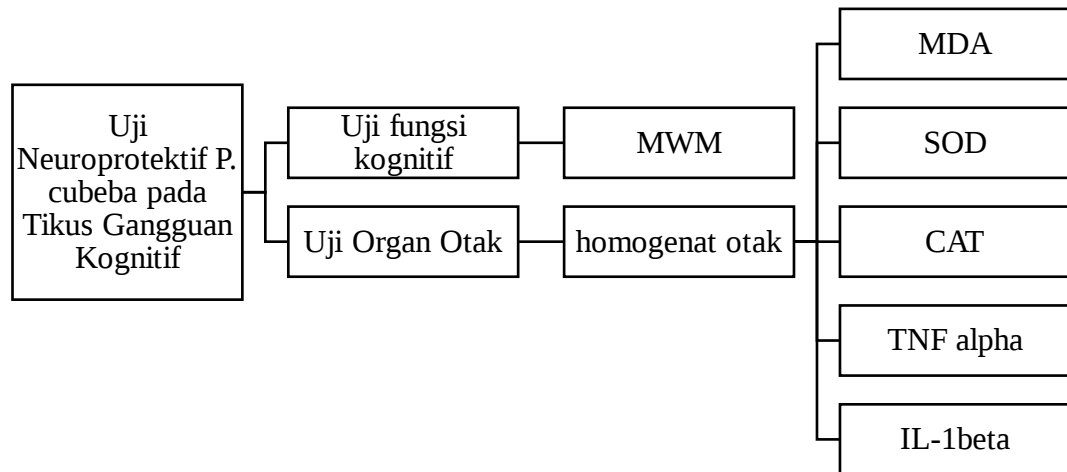
Lampiran A. Skema Penelitian



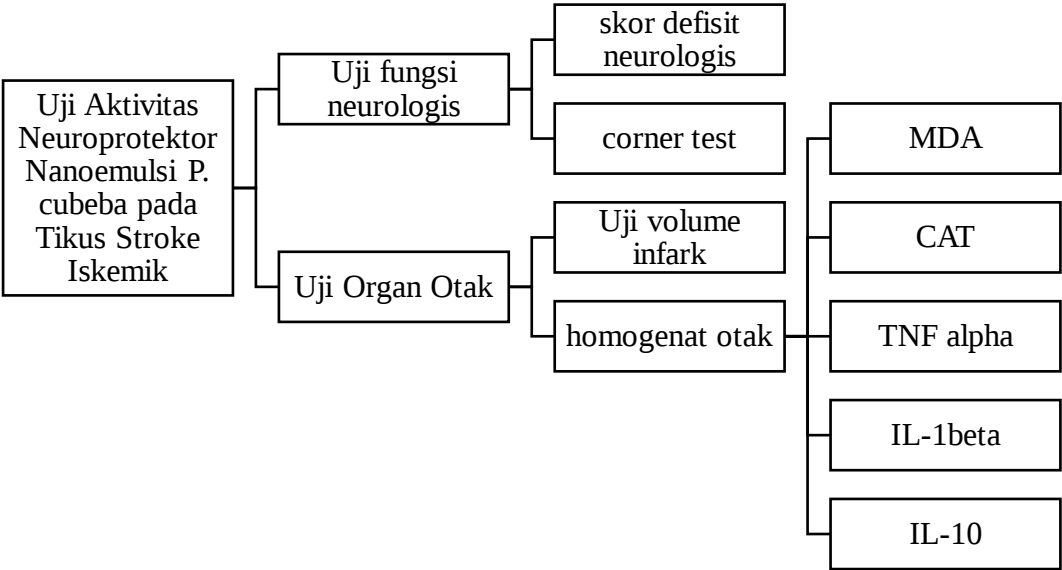
Lampiran B. Skema Uji Antioksidan Otak *P. cubeba*



Lampiran C. Skema Uji Neuroprotektif *P. cubeba* pada Tikus Gangguan Kognitif



Lampiran D. Skema Uji Neuroprotetif pada Tikus Stroke Iskemik



Lampiran E. Kode Etik Penelitian

	Komisi Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA (KEPK – UHAMKA) Jakarta http://www.lemlit.uhamka.ac.id/ Kodefikasi Kelembagaan KEPK: 3175022S http://sim-epk.keppkn.kemkes.go.id/daftar_kepk/	POB-KE.B/008/01.0 Berlaku mulai: 19 Mei 2017 FL/B.06-008/01.0
---	--	---

SURAT PERSETUJUAN ETIK

PERSETUJUAN ETIK

No : 03/21.08/01272

Bismillaahirrohmaanirrohiim

Assalamu'alaikum warohmatullohi wabarokatuh

Yang bertanda tangan di bawah ini, Koordinator Etik Penelitian Kesehatan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA (KEPK-UHAMKA), setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian oleh reviewer yang bersertifikat, memutuskan bahwa protokol penelitian/skripsi/tesis dengan judul :

“UJI NEUROPROTEKTIF BAHAN ALAM PADA TIKUS STROKE ISKEMIK”

Atas nama

Peneliti utama : Lusi Putri Dwita

Peneliti lain : -

Program Studi : S3 FARMASI

Institusi : PROGRAM DOKTOR

INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-UHAMKA dalam bentuk soft copy ke email kepk@uhamka.ac.id. Jika terdapat perubahan protokol dan/atau perpanjangan penelitian, maka peneliti harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Wassalamu'alaikum warohmatullohi wabarokatuh

Jakarta, 11 Agustus 2021
Koordinator Etik Penelitian Kesehatan

UHAMKA



(Dr. Retno Mardhiati, M.Kes)

Lampiran F. Determinasi Tanaman Uji



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 28 April 2021

Nomor : B-525/IV/DI.01/4/2021
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Lusi Putri Dwita**
Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 18
Bandung

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	-	<i>Piper cubeba</i> L.f.	Piperaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Koordinator Program Penelitian Botani

Dr. Himmah Rustiami, S.P., M.Sc.
NIP.197106052000032005



Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI

Dr. Atij Kanti, S.Si, M.Sc
NIP. 196811021994032002

D:\Identifikasi Mahasiswa 2021\Lusi Putri Dwita.docx /Jaenudin-Gede

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Cubebin

[Catalog No.] CFN70261

[CAS No.] 1242843-00-0

[Purity] $\geq 98\%$

[M.E] $C_{20}H_{20}O_6$

[Physical Description] Powder

[Solvent] Chloroform, Dichloromethane, Ethyl Acetate, DMSO, Acetone, etc.

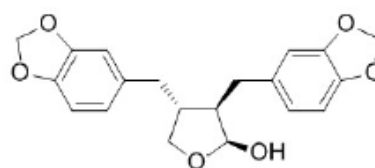
[Weight] 5mg

[Lot No.] CFS201901

[Storage] Protected from air and light, refrigerate or freeze(2-8 °C)

[Intended Use] For laboratory use only

[Shelf Life] 2 years



[Chemical Structure]

[Characterization Data Summary]

Analytical Test	Results
Identification by ^{13}C -NMR, HPLC	Consistent with the above structure
Purity tested	$\geq 98\%$

Authorized Signature:

Date:

www.chemfaces.com

No. 83 Checheng South Rd., Wuhan Economic and Technological Development Zone, Wuhan, Hubei 430056, PRC

Email: manager@chemfaces.com | Tech: service@chemfaces.com | Tel: 0086-27-84237683

Lampiran H. Sertifikat Strains Tikus Wistar

ASLI Your Partner For Health Research

Kemuning 03/013, Ngargoyoso Karanganyar 57793 Jawa Tengah, Indonesia
Phone : +62. 81259551778 Website : www.kemuning.co.id

Certificate Of Strains
Wistar

Peternak Breeder	: CV. Dunia Kaca
Jenis Hewan Type of Animal	: Tikus Putih White Rat
Merek Brand	: Kemuning
Surat Keterangan Domisili Usaha Domicile of Business	: Nomor 470 /40/I/ 2019 Number 470 /40/I/ 2019
Surat Izin Usaha Perdagangan Business Licence	: Nomor 912014331912 Number 912014331912
Surat Keterangan Budidaya Certificate of Cultivation	: Nomor 524 /082.19/I/2019 Number 524 /082.19/I/2019
Nomor Surat Identifikasi Hewan (LIPD) Animal Identification Letter Number (LIPD)	: Nomor B-2316 /IPH.1/KS.02.03/VI/2019 Number B-2316 /IPH.1/KS.02.03/VI/2019
Kode Identifikasi Galur Strains Identification Code	: K-0002 K-0002
Tanggal Identifikasi Date of Identification	: 28 Juni 2019 June 28, 2019

KEMUNING
YOUR PARTNER FOR HEALTH RESEARCH

Perhatian
Attention

Sertifikat yang asli nama pemegangnya tercantum di website kemuning.co.id, dan dilampiri Sertifikat Kesehatan Hewan dari Dinas Peternakan dan Perikanan Kabupaten Karanganyar
The original certificate holder's name is listed on the kemuning.co.id website, and attached with an Animal Health Certificate from the Department of Animal Husbandry and Fisheries of Karanganyar Regency

Identitas pemegang sertifikat
Certificate holder identity



January 05, 2023
Date

Sugino, S.Farm, KEMUNING