

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BIOAKTIF PROGESTERONE-LIKE EFFECT
EKSTRAK METHANOL DAUN BENALU DUKU**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Prof. Dr. Mochamad Lazuardi, Drh., M.Si 0018125805

Bambang Hermanto, dr., M.S 0018035607

Dr. Eka Pramyrtha Hestianah Drh., M. Kes 0016036406

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

KKC
KK
LP-35/19
Laz
i

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BIOAKTIF PROGESTERONE-LIKE EFFECT
EKSTRAK METHANOL DAUN BENALU DUKU**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

**Prof. Dr. Mochamad Lazuardi, Drh., M.Si 0018125805
Bambang Hermanto, dr., M.S 0018035607
Dr. Eka Pramytha Hestianah Drh., M. Kes 0016036406**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Isolasi dan Identifikasi Bioaktif Progesterone - Like Effect Ekstrak Methanol Daun Benalu Duku

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. drh. MOCHAMMAD LAZUARDI, M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0018125804
 Jabatan Fungsional : Guru Besar
 Program Studi : Sains Veteriner
 Nomor HP : 085648586714
 Alamat surel (e-mail) : lazuardi@fkh.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : BAMBANG HERMANTO
 NIDN : 0018035607
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
 Nama Lengkap : Dr EKA PRAMYRTHA HESTIANAH M.Kes
 NIDN : 0016036406
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 92,032,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 184,064,000

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR




(Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M. Kes)
 NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018
 Ketua,



(Dr. drh. MOCHAMMAD LAZUARDI, M.Si)
 NIP/NIK 195812181987111001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
 NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Eksplorasi daun benalu duku (*Dendrophthoe Pentandra L. Miq*), diketahui mengandung hormon androgenik, penelitian tahun 2017 setiap ekstraksi menggunakan pelarut methanol diketahui mengandung bioaktif *progesteron-like effect*. Hasil eksplorasi lebih lanjut diketahui bahwa kandungan bioaktif yang dimaksudkan yaitu Progesteron dan Dydrogesteron masing-masing antara 0,003 ppm dan 0,298 ppm. Pada penelitian tahun ke 2, fokus utama yaitu kandungan fitoprogesteron dengan teknik isolasi menggunakan kolom analitik Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang telah didaftarkan patent tahun 2017. Namun hasil pemisahan tersebut telah dipublikasikan pada tahun 2018. Hasil isolasi menggunakan teknik tersebut, bobot yang diperoleh tidak terlalu banyak. Namun demikian memiliki keunggulan-keunggulan tertentu salahsatunya yaitu mengurangi gangguan komponen pengotor yang berasal dari matrik ekstrak metanol daun benalu duku. Hasil eksplorasi menggunakan KCKT ekstrak kasar methanol daun benalu duku mengandung progesteron diwilayah waktu tambat 6.121 menit.

Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan titik leleh menunjukkan bahwa isolat fito-progesterone terjadi pada suhu ± 145 °C dimana menurut pustaka terjadi pada suhu 160 °C. Lebih lanjut analisis dose-respon dengan dosis awal 50, 55, 60, 65, 70 dan 75 mg/kg berat badan secara intra kutan di dapat efektif dosis adalah 50 sampai dengan 55 mg/kg berat badan dengan rerata kenaikan kadar progesteron serum darah tikus terjadi kenaikan antara 1 hingga 3 kali kadar normal. Lebihlanjut analisis tingkat toksisitas terhadap ginjal dan hati berdasarkan pemeriksaan nilai SGPT SGOT Kreatinin BUN menunjukkan tidak terjadi kenaikan nilai kimia klinik.



Pada akhir penelitian akan menghasilkan keluaran yaitu (1) publikasi jurnal terindeks scopus, (2) patent yang sudah didaftarkan, (3) buku ajar dalam penerbitan, (4) invited speaker kerjasama pengembangan penelitian ekstrak metanol daun benalu duku sebagai senyawa bioaktif antivirus Avian Influenza dengan Asia University, Taichung - Taiwan.

PRAKATA

Alhamdulillah selalu kita panjatkan kepada Allah SWT yang memberikan berkah kepada kita semua dan juga Sallam dan Sholawat selalu kita curahkan kepada Baginda Rasull beserta keluarga dan sahabat-sahabatnya.

Tepat tanggal 10 November 2018, laporan akhir penelitian tahun ke dua dibuat dan Insha Allah telah mendapatkan hasil yang cukup memuaskan.

Lebihlanjut rasa syukur yang tak berhingga saya bersama tim selalu terucapkan dan tentunya kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian disampaikan rasa terima kasih yang tak berhingga,

Akhir kata ibarat pepatah tidak ada rotan yang tak retak, maka saya beserta tim peneliti menyampaikan apabila ada hal-hal yang kurang berkenan selama penelitian berlangsung, saya bersama tim mohon maaf atas ketidak nyamanan tersebut.

Surabaya, November 2018
a.n Tim Peneliti

Prof. Dr. Moch. Lazuardi, Drh., M.Si

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	: i
HALAMAN PENGESAHAN	: ii
RINGKASAN	: iii
PRAKATA	: v
DAFTAR ISI	: vi
DAFTAR TABEL	: viii
DAFTAR GAMBAR	: ix
DAFTAR LAMPIRAN	: x
BAB 1. PENDAHULUAN	: 1
1. Latar Belakang Masalah	: 1
2. Rumusan Masalah	: 2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	: 4
1. Fito-progesteron	: 4
2. Dose - Respon Pada Tikus	: 6
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	: 8
1. Tujuan Penelitian	: 8
2. Manfaat Penelitian	: 8
BAB 4. METODE PENELITIAN	: 9
1. Rancangan, Materi Penelitian, Lokasi Pengerjaan dan Variabel penelitian	: 9
2. Identifikasi dan Karakterisasi	: 10
3. Uji dose-respon	: 11
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	: 13
1. Hasil Yang Dicapai	: 13
2. Luaran Yang Dicapai	: 17

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	:	18
1. Kesimpulan	:	18
2. Saran	:	18
DAFTAR PUSTAKA	:	19
LAMPIRAN	:	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Hubungan antara dosis-respon peningkatan kadar progesteron antar tikus perlakuan pada pemberian isolate fitoprogesteron 50 mg/kg berta badan	: 15
Tabel 5.2. Hasil pemeriksaan kimia klinik tikus pasca pemberian fito-progesteron	: 16

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1. Rumus molekul pregnane: (8S, 9S, 10S, 13S, 14S dan 17S)- 17 ethyl- 10,13- dimethyl 2,3,4,5,6,7,8,9,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 tetradeca hydroxy-1H-cyclopenta [a] phenanthrene.	: 5
Gambar 4.1. Bagan alir penelitian PTUPT 2018 Isolasi dan identifikasi bioaktif <i>progesterone-like effect</i> ekstrak methanol daun benalu duku	: 9
Gambar 5.1. Isolated fito-progesteron hasil pemisahan menggunakan kolom analitik KCKT	: 12
Gambar 5. 2. Isolate kromatogram fito-progesterone pada waktu tambat 6.121 menit dalam eluen fase mobil Metanol : air (70:30) panjang gel 254 nm, menggunakan kolom ODS C-18	: 12
Gambar 5.3. Kromatogram Certified Reference Material (CRM) progesterone 5 ppm dalam eluen fase mobil metanol air (70:30) dengan waktu tambat 6.107 menit menggunakan KCKT	: 13
Gambar 5.4. Thermal gravimetry-thermal analysis fito-progesteron	: 13
Gambar 5.5 spektogram FT-IR isolate benalu duku pada bilangan gelombang 400 hingga 1000 cm^{-1}	: 14
Gambar 5.6. FT-IR <i>Certified Reference Material</i> progesteron pada bilangan gelombang 500 hingga 1500 cm^{-1}	: 15

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1
PERSONALIA TENAGA PELAKSANA BESERTA KUALIFIKASINYA

Lampiran 2.
Draft article

Lampiran 3.
Pendaftaran HAKI

Lampiran 4.
Draft Buku ajar

Lampiran 5.
Nara sumber seminar kerjasama riset Internasional Asia University - Univ Airlangga

Lampiran 6. Analisis Probit

Lampiran 7. Uji komparasi



BAB 1. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang Masalah

Sumber obat hewan maupun manusia hingga tahun 2016 menunjukkan bahwa 60% adalah bersumber dari proses sintetis sedangkan 40% bersumber dari alami. Sumber alami yang dimaksudkan yaitu tumbuhan, hewani dan mineral alam lainnya. Ditinjau dari dominasi alami sumber-sumber obat hewan tersebut maka sumber dari tumbuhan merupakan sumber yang tertinggi. Benalu duku salahsatu tumbuhan medisinal tropis, diketahui memiliki beberapa khasiat yaitu (1) sebagai antiproliferatif sel mieloma secara *in-vitro* dan *in-vivo* (Nuraini *et al.*, 2000, Roostantia *et al.*, 2000). Serbuk daun benalu duku diketahui mengandung unsur-unsur asam amino L-asparagine, L-Threosin, L-Serin, L-Glutamin, L-Glycine, L-Alanine, L-Cystein, L-Valine, L-Methionine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Tyrosine, L-Phenylalamine, L-Lysine, L-Histidine, L-Arginine, L-Proline, Hydroxyproline. Hydroxylisine (Ratna *et al.*, 2007). Penelitian lebih lanjut diketahui bahwa infusum daun benalu duku mengandung unsur-unsur seperti aneka alkaloid, flavonoid, polifenol, terpenoiddan steroid bebas (Roostantia *et al.*, 2010).

Selanjutnya diketahui bahwa ekstrak methanol daun benalu duku tidak dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kesiapan birahi pada tikus betina dewasa> Kesiapan birahi yang dimaksud adalah putaran siklus estrus yang dimiliki oleh subjek tikus itu sendiri. Hal tersebut disebabkan pemberian ekstrak methanol daun benalu duku secara intra peritoneal menyebabkan penurunan sekresi folicle stimulating hormon (FSH), estrogen dan luteinazing hormon (LH). Lebih lanjut diketahui bahwa hormon progesteron pada tubuh tikus diketahui meningkat dua kali lebih besar

dibanding harga normal tubuh tikus (Lazuardi dan Bambang, 2014). Laporan terakhir tahun 2013, menyatakan bahwa salahsatu khasiat ekstrak methanol daun benalu duku yaitu tidak mengganggu sekresi prolaktin, dan testosteron yang dikeluarkan secara normal di tubuh tikus (Bambang dan Lazuardi, 2013). Manfaat-manfaat khasiat ekstrak methanol daun benalu duku sebagai fito-hormonal seperti uraian di atas, dilakukan eksplorasi lebih lanjut mengenai unsur androgenik diperoleh hasil yaitu mengandung 4 (empat) unsur hormon androgenik yaitu progesterone (30%), medroxy progesterone acetate (66%), megestrol asetate (3%) dan dydrogesterone (1%) (Lazuardi, Bambang, 2016). Diketahui pula bahwa dari ke empat hormon androgenik tersebut dengan nama *progesterone like-effect*, maka dilakukan pemisahan terhadap progesteron dan menghasilkan kadar progesteron $3 \cdot 10^{-3}$ ppm sedangkan dydrogesteron menghasilkan kadar $173 \cdot 10^{-3}$ ppm (Lazuardi, Bambang 2017^a).

Didasarkan uraian tersebut di atas maka akan dilakukan eksplorasi yang lebih mendalam yaitu kandungan progesteron like-effect (khususnya fito progesteron) dan akan dilakukan identifikasi tingkat kemiripan dari struktur baku progesteron yang telah di tetapkan sebagai *Certified Reference Material* (CRM). Adapun teknik pemisahan yang akan dilakukan menggunakan kolom analitik didasarkan proses adsorbsi-partisi dengan perangkat KCKT.

2. Rumusan Masalah

Menggunakan dasar pemikiran seperti pada butir 1., di atas maka akan rumusan masalah yang di tetapkan adalah sampai seberapa jauh tingkat kemiripan fisiko kimia antara fito progesteron hasil pemisahan dari ekstrak kasar daun benalu duku dengan

CRM. Lebih lanjut adalah tingkat kemanfaatan pada tubuh tikus apa ada korelasi positif pemberian isolat fito-progesteron dengan respon peningkatan kadar progesteron dalam tubuh tikus.



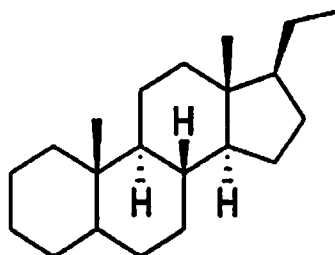
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

1. Fito-progesteron

Dikenal dengan progesterone yang diperoleh hasil pemisahan matrik tanaman dan menjadikan isolat yang memiliki kerja mirip dengan progesteron (*progesterone like-effect*). Dalam catatan temuan hasil pemisahan isolat bioaktif matrik tanaman, tidak begitu mudah dilakukan. Oleh sebab itu selalu diupayakan identifikasi hasil isolat tanaman yang berhasil di isolasi (Brusotti *et al.*, 2014). Beberapa peneliti melakukan pemisahan antara senyawa bioaktif dengan pengotornya menggunakan beberapa tingkatan, dengan catatan semakin tinggi tingkatan pemisahan maka semakin sedikit pula bioaktif yang diperoleh. Awad *et al.*, (2018) menyampaikan bahwa perolehan kembali hasil isoasi dengan tingkatan yang panjang akan menghilangkan penarikan bioaktif hingga 60-70%. Persoalan ke dua yang muncul adalah sulitnya memisahkan bioaktif dari matrik pengikat sekaligus pengganggu kemurnian bioaktif. Makin panjang tingkatan pemisahan yang dilakukan maka akan semakin sedikit unsur pengganggu yang terikat pada bioaktif. Lazuardi dan Bambang (2017^b), mencoba memisahkan bioaktif melalui tingkat metode yang singkat yaitu menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom analitik.

Bioaktif *progesterone like-effect* asal ekstrak kasar methanol daun benalu duku, memungkinkan dilakukan pemisahan dan menghasilkan kadar 3.10^{-3} ppm (Lazuardi dan Bambang, 2017^b). Bioaktif tersebut ternyata memiliki kemiripan dengan kerja progesteron CRM dengan kerja sebagai androgenik *effect*. Secara farmakodinami bioaktif tersebut di diskripsikan komponen yang memiliki struktur inti progesteron

dengan sifat fisiko-kimia seperti halnya unsur-unsur derivat progesteron antara lain, medroksi progesteron asetat, megestrol asetat, dan dydrogesteron (Lazuardi dan Bambang, 2016). Prinsip tersebut pada dasarnya berpangkal terhadap struktur inti bioaktif yang dinamai pregnane. Pregnane adalah steroid dengan unsur carbon terikat pada nomor 1 - 21. Lebih lanjut rumus molekul pregnane adalah seperti gambar 1,1,



Gambar I.1. Rumus molekul pregnane: (8S, 9S, 10S, 13S, 14S dan 17S)- 17 ethyl-10,13- dimethyl 2,3,4,5,6,7,8,9,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 tetradeca hydroxy-1H-cyclopenta [a] phenanthrene.

Bioaktif fito-progesterone memiliki ciri seperti halnya progesterone sintetik yaitu memiliki rumus bangun $C_{21}H_{30}O_2$, dengan masa molar 314, 46 g/mol. Senyawa ini tidak tahan panas dan meleleh pada suhu $126^{\circ}C$, kelarutan log P 4.04. Progesteron sintetik memiliki kelarutan tinggi dalam acetone, dioxane, sulfuric acid dan sedikit larut dalam minyak sayur. Dalam akuabides dalam larut 9.12 mg/L, namun dalam air biasa dapat larut setiap 81 mg/L pada suhu $25^{\circ}C$. Secara fisik sifat fito-progesterone tidak jauh berbeda dengan progesteron sintetik kecuali warna. Pada fito-progesterone

memiliki sifat fisik serbuk ke hijauan sedangkan pada progesteron sintetik memiliki bentuk serbuk keputihan.

2. Dose - Respon Pada Tikus

Uji dose-respon pada tikus hingga publikasi tahun 2018, jarang dilakukan namun penggunaan untuk kultur jaringan kanker selalu dilakukan (Bushra *et al.*, 2013; Lucia *et al.*, 2014). Beberapa publikasi uji coba dosis progesteron untuk tikus dilakukan secara bervariasi mulai 10 mg/kg berat badan hingga 100 mg/kg berat badan (NagaPraveena *et al.*, 2016).

Uji dose-respon untuk khasiat progesterone umumnya ditujukan sebagai target anti cancer, namun target-target lain seperti hipoprogesterone juga pernah dilakukan kendati dalam skala subjek sasaran hewan coba (tikus) (Zhaohui and Peter, 2014; Rachael *et al.*, 2015). Menurut Lazuardi (2010) uji dose-respon pada prinsipnya menggunakan lebih dari 1 jenis dosis. Dengan demikian uji tersebut membutuhkan jumlah dosis yang kelak akan diujikan sejumlah gasal. Dalam paparannya disebutkan bahwa gasal yang dimaksudkan adalah 5 dosis, tujuh dosis, dan sembilan dosis. Adapun ulangan yang dilakukan dapat berjumlah ganji seperti 3, 5 dan tujuh (Lazuardi, 2016).

Uji dosis sangat diperlukan dalam rangka melakukan penetapan kecukupan kadar terapi, sementara diketahui bahwa respon dinamika suatu tubuh terhadap obat dalam suatu waktu setiap individu bersifat dinamis. Dengan demikian uji ketepatan dosis secara berkala harus selalu dilakukan (Lazuardi, 2018). Beberapa kemungkinan-kemungkinan terjadinya pergeseran nilai dosis lazim terkait perubahan

dinamika terhadap fisiologis subjek, diantaranya adalah (1) kualitas makromolekul tubuh, (2) kualitas elektrolit tubuh, (3) dan adanya patofisiologis dari tubuh penderita. Patofisiologis yang dimaksudkan diantaranya adalah fenomena farmakogenetik dan fenomena farmakogenetik klinik. Bentuk penyebab patofisiologis lain adalah perdarahan tubuh, dehidrasi tubuh dsb.



BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian secara umum adalah untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang bekerja seperti kerja farmakodina progesteron (*progesterone like-effect*) yang berasal dari unsur daun (*Dendrophthoe pentandra L. Miq*). Sedangkan tujuan khusus yaitu melakukan isolasi bioaktif progesteron like-effect pada ekstrak kasar metanol daun benalu duku.

2. Manfaat Penelitian

Manfaat praktis yaitu dapat dimanfaatkan sebagai substituen obat-obat sintetik androgenik yang belum tentu dapat diperoleh secara cepat, mudah dan murah.. Sedangkan manfaat teoritik adalah dapat digunakan model pembelajaran bidang farmasi veteriner, Manfaat teoritis lain hasil penelitian ini adalah dapat digunannya model penelitian untuk jenis tanaman obat Indonesia lain.

UNIVERSITAS AIRLANGGA
PERPUSTAKAAN



BAB 4. METODE PENELITIAN

1. Rancangan, Materi Penelitian, Lokasi Pengerjaan dan Variabel penelitian

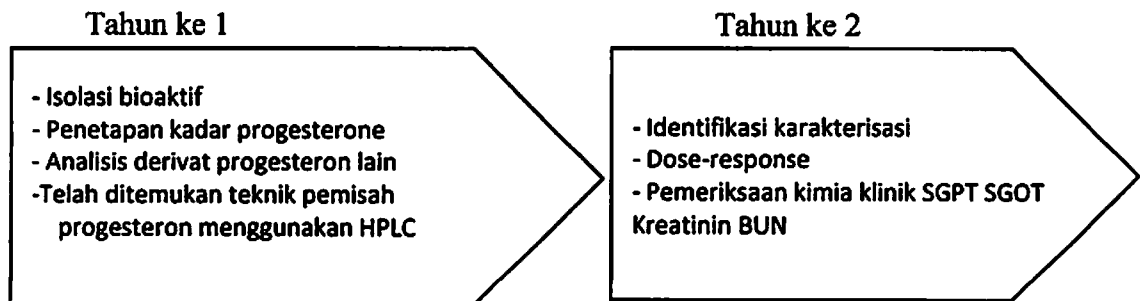
Merupakan penelitian jenis eksploratif dengan rancangan *post test only control group design*. Pusat pengerjaan penelitian dilakukan di Lab. Ilmu Farmasi Veteriner FKH UNAIR.

Kriteria variabel penelitian adalah sebagai berikut: variabel bebas ekstrak methanol daun benalu duku, sedangkan sebagai variabel tergantung adalah (1) waktu tambat menggunakan KCKT, (2) titik leleh, (4) nilai probit analysis, (5) nilai SGPT SGOT kreatinin dan BUN.

Sebagai obyek penelitian adalah bioaktif fitoprogesteron yang terkandung dalam ekstrak methanol daun benalu duku. Daun benalu duku diambil dari Muara Enim Sumatera Selatan dan dilakukan standardisasi di Ba. Biologi LIPI Jakarta.

Peralatan yang digunakan untuk menetapkan identifikasi dan karakterisasi fitoprogesteron adalah (1) termal gravimetry - thermal analysis dan (2) kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sedangkan khusus untuk uji dose-respon hewan coba yang digunakan adalah tikus sehat jenis kelamin betina dewasa. Khusus untuk uji toksisitas hewan yang digunakan adalah tikus betina dewasa. Dalam pelaksanaan penelitian akan dilakukan uji *animal ethic clearance* di FKH UNAIR. Uji *animal ethic clearance* dilakukan sebelum menggunakan hewan coba yaitu tikus.

Sebagai *road map* penelitian adalah sebagai berikut di bawah, termasuk bagan alir hal-hal yang sudah dilakukan penelitian dan hal-hal yang kelak akan dilakukan penelitian.



Gambar 4.1. Bagan alir penelitian PTUPT 2018 Isolasi dan identifikasi bioaktif *progesterone-like effect* ekstrak methanol daun benalu duku

2. Identifikasi dan Karakterisasi

Dalam pengerjaan identifikasi dan karakterisasi, terlebih dahulu dilakukan analisis (1) adsorpsi-partisi menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kolom yang digunakan ODS C-18 sedangkan eluen fase mobil yang digunakan metanol: air (30%:70%) pada panjang gelombang 254 nm. Kecepatan alir diatur 0,5 ml/menit. Sebagai baku progesterone di gunakan *Certified Reference Material* (CRM) progesteron yang diperoleh dari Merck., corp. Indikator fito-progesteron yang akan menghasilkan kromatogram sekitar 6 hingga 6.5 menit. Untuk memastikan adanya progesteron, maka dilakukan perbandingan dengan baku CRM.

Eksplorasi lebih lanjut adalah menggunakan uji titik leleh dengan teknik Thermal gravimetry dan Thermal analysis. Langkah thermal gravimetry dan thermal analysis adalah sbb; Sejumlah 400 mg isolate dimasukkan dalam basket selanjutnya dilakukan running setiap 2 detik pada suhu antara 120 °C hingga 300 °C. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan mulai dari suhu rendah hingga suhu tinggi. Hasil analisis sampel akan

dapat diketahui suhu leleh progesterone diperbandingkan dengan waktu dan suhu kelelahan CRM.

Selanjutnya dilakukan analisis FT-IR terhadap isolat progesteron terutama pada daerah bilangan gelombang antara 800 - hingga 400 cm^{-1} . Selanjutnya dilekukan komparasi dengan data pustaka perangkat FT-IR terhadap gugus fungsi dari progesteron. Perangkat FT-IR yang digunakan adalah Shimadzu IRTracer-100.

3. Uji dose-respon

Protokol kerja uji dose-respon akan dilakukan menggunakan dosis mulai 50 mg/kg berat badan, selanjutnya berturut-turut ditingkatkan menjadi 55 mg/kg berat badan, 60 mg/kg berat badan. 65 mg/kg berat badan, 70 mg/kg berta badan dan 75 mg/kg berta badan. Lebih lanjut acuan dosis 50 mg/kg berat badan didasarkan pada temuan Lazuardi, Bambang (2016).

Adapun jumlah tikus yang dibutuhkan setiap dosis uji adalah seperti pada persamaan 4.1 di bawah. Pada persamaan 4.1., dikwtahui bahwa $Z_{1-\alpha/2}$ pada tingkat kepercayaan 95% = 1,96 dan Z_{β} pada tingkat kesalahan 5% bernilai 1,645 (uji dua sisi). Asumsi toleransi harga beda rerata dua kelompok uji (d) = 3,62 dengan simpangan baku $S_a = 1,7$ dan $S_b = 1,4$ (Lazuardi dan Bambang, 2016^b). Dengan demikian nilai N adalah 5 ekor.

$$N = \frac{\left[\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} \right) + Z_{\beta} \right]^2}{\frac{(d)^2}{(S_a)^2 + (S_b)^2}} \quad \text{Persamaan 4.1}$$

Hasil persamaan 4.1., menghasilkan jumlah total untuk seluruh mencit yang digunakan baikkelompok uji maupun kelompok kotrol 30 ekor. Dalam uji dose-respon

pada dosis lazim akan diwakili 5 ekor tikus sedangkan dosis minimalis dan maksimalis masing-masing akan diwakili 5 ekor. Sebagai tolok ukur penilaian respon adalah peningkatan kadar progesteron tubuh setelah pemberian yang diperbandingkan dengan nilai normal progesteron dalam tikus betina yang tidak diberikan apapun. Pemeriksaan kadar fito-progesteron dalam serum dilakukan menggunakan KCKT dengan kondisi parameter seperti yang telah ditemukan oleh Lazuardi, Bambang (2017). Hasil analisis dose-respon selanjutnya akan dilakukan analisis probit dengan tingkat signifikansi 5%.

Selanjutnya akan dilakukan pemeriksaan kimia klinik yaitu SGOT, SGPT, Kreatinin dan BUN untuk menilai daya toksisitas fito-progesteron terhadap organ hati dan ginjal. Hasil yang diperoleh selanjutnya akan diperbandingkan dengan kelompok kontrol dan dilakukan analisis uji t dua sisi (tingkat signifikansi 5%). Perangkat lunak yang digunakan untuk analisis statistik yaitu SPSS versi 24.

Pada tahap akhir akan dilakukan pengajuan patent produk fito-progesterone yang berasal dari ekstrak methanol daun benalu duku. Produk yang telah jadi pada TKT 4, akan siap diproduksi massal secara skala kecil untuk dilakukan uji klinik sesuai modifikasi uji klinik fase IV.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DI CAPAI

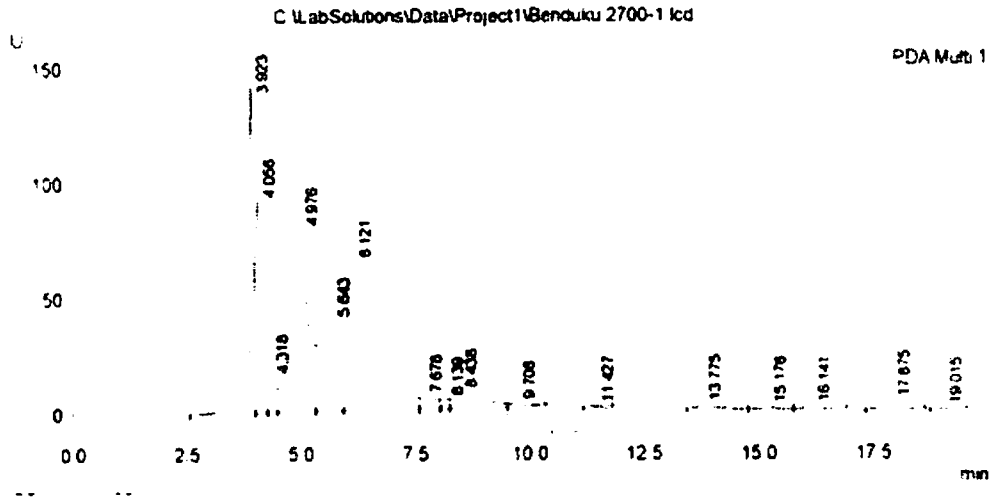
1. Hasil Yang Dicapai

Hasil yang dicapai yaitu telah diperoleh isolat hasil pemisahan extract kasar daun benalu duku sebesar tidak lebih dari 500 mg (Gambar 5.1).

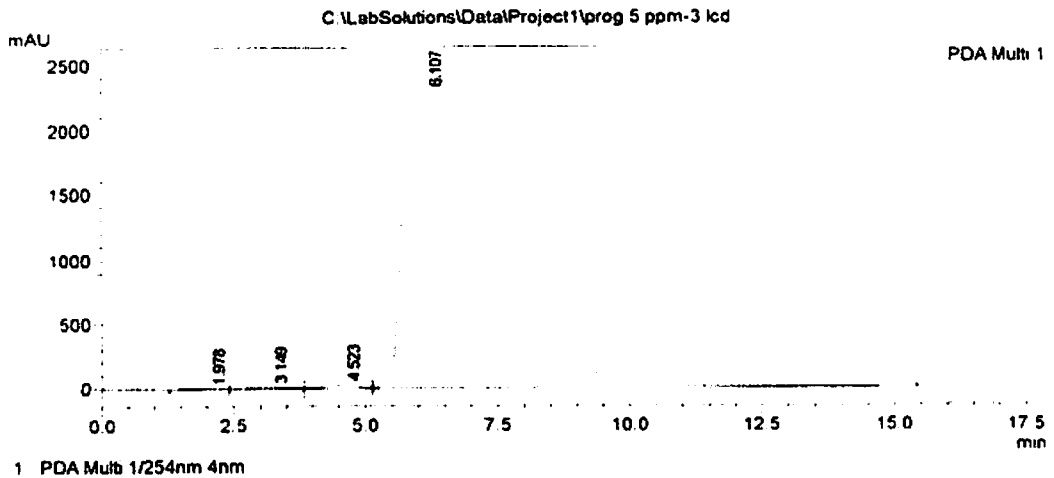


Gambar 5.1. Isolated fito-progesteron hasil pemisahan menggunakan kolom analitik KCKT

Selanjutnya isolate fito-progesteron dilakukan analisis KCKT adalah seperti tampak pada Gambar 5.2. di bawah dengan pembanding progesteron CRM seperti Gambar 5.3 di bawah.

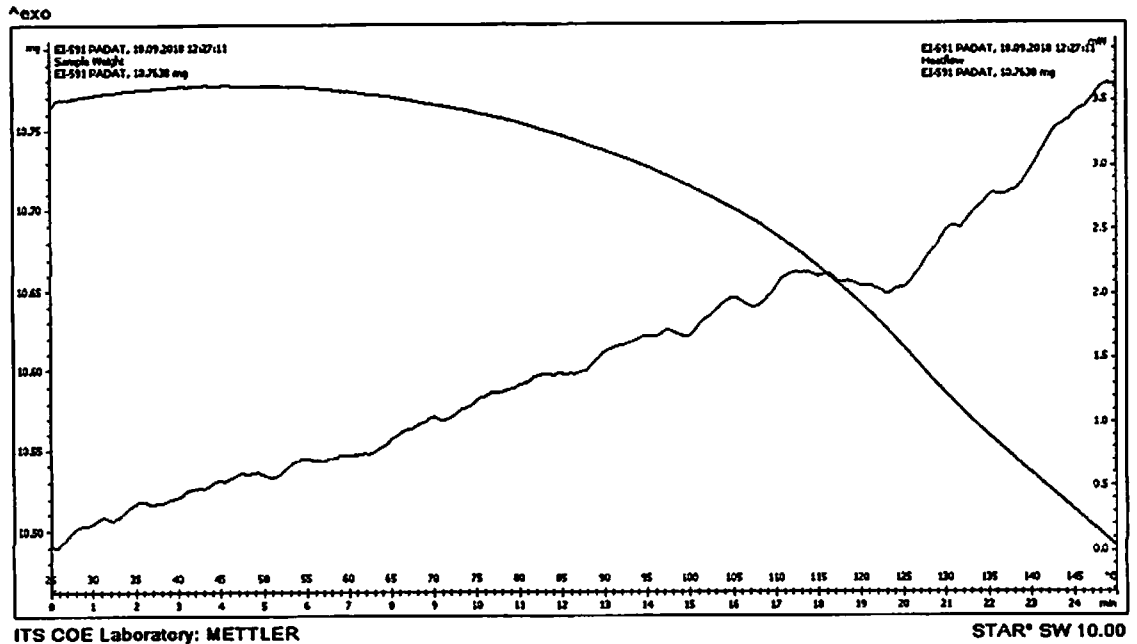


Gambar 5. 2. Isolate kromatogram fito-progesterone pada waktu tambat 6.121 menit dalam eluen fase mobil Metanol : air (70:30) panjang gel 254 nm, menggunakan kolom ODS C-18



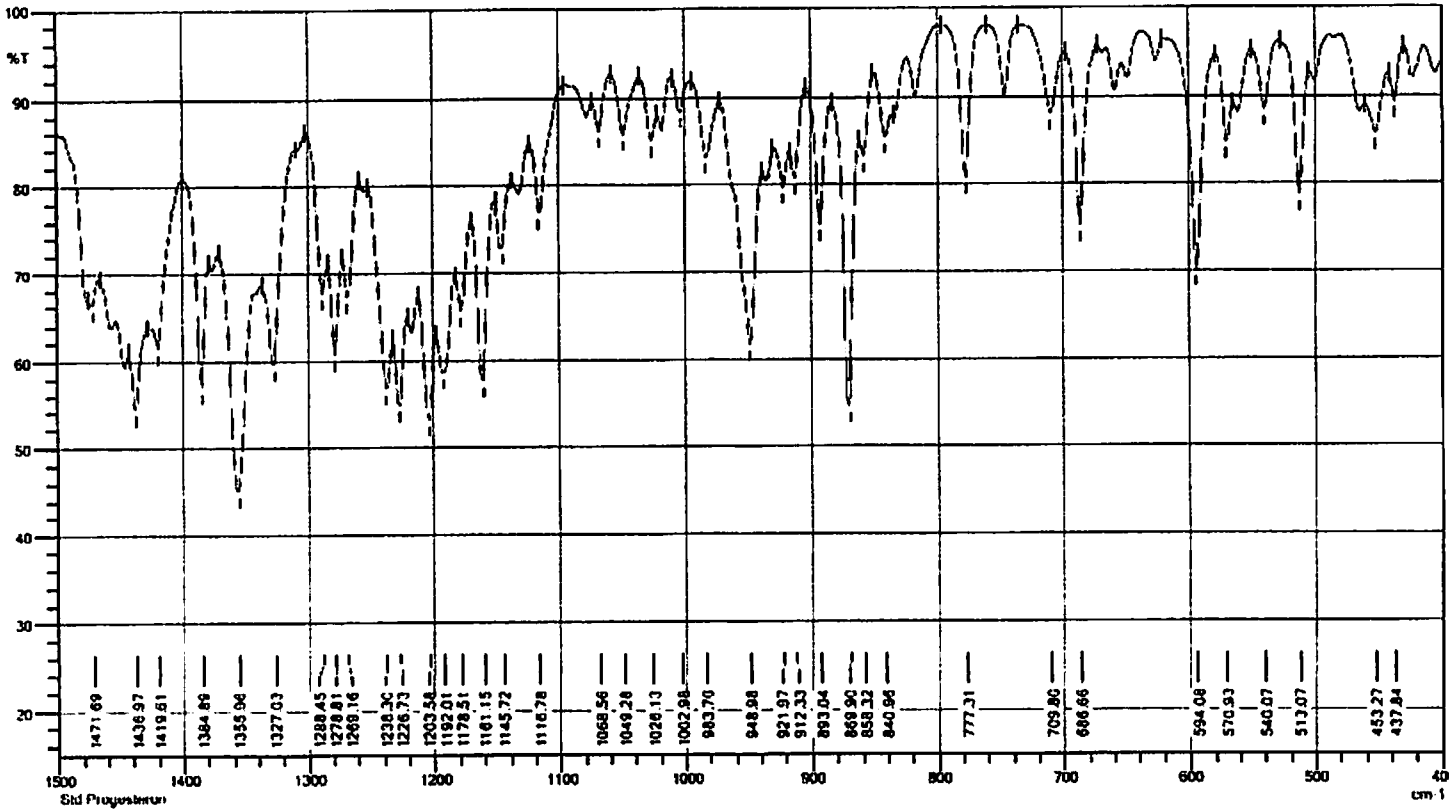
Gambar 5.3. Kromatogram Certified Reference Material (CRM) progesterone 5 ppm dalam eluen fase mobil metanol air (70:30) dengan waktu tambat 6.107 menit menggunakan KCKT

Pemeriksaan lebih lanjut dilakukan thermal gravimetry - thermal analysis menunjukkan bahwa pada suhu 145 °C fito-progesteron mengalami penurunan masa. (Gambar 5.4).

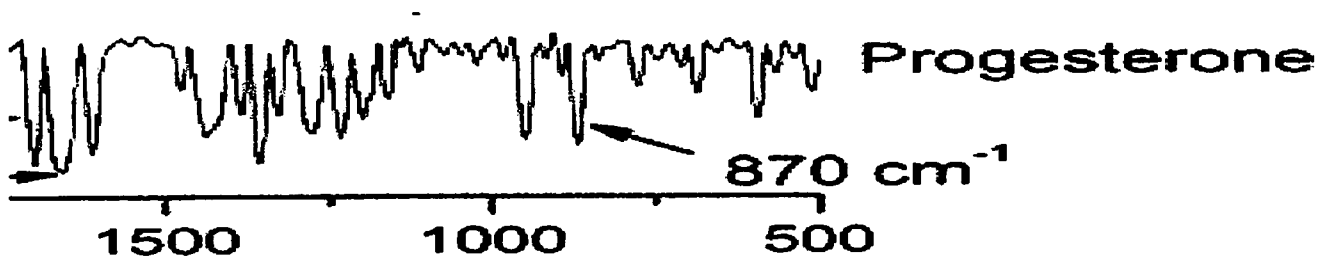


Gambar 5.4. Thermal gravimetry-thermal analysis fito-progesteron

Pada Gambar 5.4 menunjukkan bahwa pada suhu 55,5°C telah menunjukkan g/mL) mulai terjadi penurunan masa. Pada keadaan demikian maka potensi farmakodinami akan mengalami kehilangan hingga 95 %. Bila ditinjau dari sifat fisiko kimia progesterone murni, disebutkan bahwa titik leleh terjadi pada suhu 120 °C. Keadaan ini menggambarkan bahwa isolate fito-progesterone mendekati titik leleh struktur murninya meskipun tidak sepenuhnya 120 °C. Tidak tepatnya titik leleh seperti acuan kepustakaan yang digunakan menunjukkan bahwa terdapat komponen lain yang terikat dari unsur pregnane. Hasil analisis FT-IR pada bilangan gelombang (cm^{-1}) antara 400 hingga 1500. Lebih lanjut hasil FT IR adalah sebagai berikut pada Gambar 5.5 dengan pembandingan Gambar 5.6.



Gambar 5.5 spektogram FT-IR isolate benalu duku pada bilangan gelombang 400 hingga 1000 cm^{-1} .



Gambar 5.6. FT-IR *Certified Reference Material* progesteron pada bilangan gelombang 500 hingga 1500 cm^{-1} .

Hasil analisis FT-IR menunjukkan bahwa daerah bilangan gelombang 870 cm^{-1} adalah daerah spesifik dan gugus tersebut diperkirakan adalah pregnane yang terikat pada komponen lain.

Hasil analisis dose-response adalah seperti pada tabel 5.1 di bawah dengan catatan seluruh tikus tidak ditemui kematian. Hasil analisis menunjukkan bahwa dosis efektif terjadinya peningkatan kadar progesteron adalah pada pemberian antara 50 mg/kg berta badan dan 50 sampai 55 mg/kg berta badan (Lampiran 6). Pemberian dosis diatas 55 mg/kg berta badan tidak menunjukkan dampak nyata.

Tabel 5.1. Hubungan antara dosis-respon peningkatan kadar progesteron antar tikus perlakuan pada pemberian isolate fitoprogesteron 50 mg/kg berta badan

Kadar progesteron tikus kontrol ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup I 50 mg/kg berat badan	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup II 55 mg/kg berat badan	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup III 60 mg/kg berat badan	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup IV 65 mg/kg berta badan	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup V 70 mg/kg berat badan	Kadar progesteron ($\mu\text{g/mL}$) Grup VI 75 mg/kg berat badan
22.0	28.0	32,4	33.3	33.2	33.2	35.4
23.0	25.6	34.5	32.3	33.6	33.4	35.6
22.0	24.3	35.3	35.5	34.5	35.6	38.3
23.5	28.5	34.2	36.6	36.7	36.7	39.2
22.5	23.5	33.5	36.1	38.5	33.8	35.3

Hasil pemeriksaan kimia klinik terhadap seluruh tikus sesudah pemberian fito-progesteron adalah sebagai berikut di bawah (Tabel 5.2).

Tabel 5.2. Hasil pemeriksaan kimia klinik tikus pasca pemberian fito-progesteron

No. Tikus	Pemeriksaan kimia klinik						
	Group kontrol	Grup I Dosis 50 mg/kg berat badan	Grup II Dosis 55 mg/kg berat badan	Grup III Dosis 60 mg/kg berat badan	Grup IV Dosis 65 mg/kg berat badan	Grup V Dosis 70 mg/kg berat badan	Grup VI Dosis 75 mg/kg berat badan
	SGOT (U/L)	170.00 ^a	195.00 ^a	120.00 ^b	120.00 ^b	115.00 ^c	120.00 ^c
	SGPT (U/L)	80.00 ^a	110.00 ^a	75.00 ^c	60.00 ^d	55.00 ^f	70.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.81 ^a	0.88 ^a	0.67 ^b	0.66 ^b	0.77 ^f	0.69 ^g
	BUN (mg/dl)	18.50 ^a	18.90 ^a	19.00 ^b	17.50 ^b	26.70 ^f	27.60 ^g
	SGOT (U/L)	135.00 ^b	120.00 ^b	125.00 ^d	125.00 ^d	110.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	80.00 ^b	75.00 ^b	80.00 ^d	80.00 ^d	80.00 ^f	81.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.67 ^b	0.66 ^b	0.75 ^d	0.68 ^d	0.85 ^f	0.67 ^g
	BUN (mg/dl)	17.50 ^b	19.00 ^b	24.40 ^d	26.60 ^d	50.00 ^f	25.70 ^f
	SGOT (U/L)	100.00 ^c	125.00 ^c	145.00 ^e	120.00 ^e	170.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	75.00 ^c	75.00 ^c	70.00 ^e	80.00 ^e	110.00 ^f	70.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	1.41 ^c	0.78 ^c	0.76 ^e	0.69 ^e	0.89 ^f	0.77 ^f
	BUN (mg/dl)	24.60 ^c	28.90 ^c	18.40 ^e	18.40 ^e	55.00 ^f	26.70 ^f
	SGOT (U/L)	125.00 ^d	125.00 ^d	145.00 ^e	120.00 ^e	170.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	80.00 ^d	80.00 ^d	70.00 ^e	81.00 ^e	110.00 ^f	81.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.68 ^d	0.88 ^c	0.76 ^e	0.71 ^e	0.85 ^f	0.67 ^g
	BUN (mg/dl)	19.00 ^d	27.30 ^c	18.40 ^e	19.70 ^e	55.00 ^f	26.70 ^f
	SGOT (U/L)	110.00 ^e	125.00 ^d	145.00 ^e	111.00 ^e	170.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	70.00 ^e	80.00 ^e	70.00 ^e	81.00 ^e	110.00 ^f	81.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.66 ^e	0.85 ^c	0.76 ^e	0.68 ^e	0.85 ^f	0.67 ^g
	BUN (mg/dl)	18.50 ^e	28.50 ^c	17.80 ^e	19.30 ^e	55.00 ^f	26.50 ^f
	SGOT (U/L)	110.00 ^f	125.00 ^d	145.00 ^e	114.00 ^e	170.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	70.00 ^f	80.00 ^f	70.00 ^e	84.00 ^e	110.00 ^f	83.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.79 ^f	0.85 ^c	0.77 ^f	0.68 ^e	0.85 ^f	0.67 ^g
	BUN (mg/dl)	26.500 ^f	27.40 ^c	17.80 ^e	19.30 ^e	55.00 ^f	26.50 ^f
	SGOT (U/L)	123.00 ^g	125.00 ^d	145.00 ^e	114.00 ^e	170.00 ^f	120.00 ^f
	SGPT (U/L)	83.00 ^g	80.00 ^d	70.00 ^e	84.00 ^e	110.00 ^f	81.00 ^g
	KREATININ (mg/dl)	0.94 ^g	0.95 ^c	0.76 ^e	0.68 ^e	0.85 ^f	0.67 ^g
	BUN (mg/dl)	29.80 ^g	27.40 ^c	17.80 ^e	19.30 ^e	55.00 ^f	26.50 ^f

Superscript a vs., b,c,d,e,g tidak berbeda nyata p<0.05 (Lampiran 7).

2. Luaran Yang Dicapai

Luaran wajib yang akan dicapai : (1) Jurnal ilmiah terindeks scopus, (2) buku ajar, (3) permohonan patent, sedangkan luaran tambahan (1) *invited speaker* pada seminar nasional dan workshop.



BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Beberapa kesimpulan yang dapat ditarik dari hasil penelitian diantaranya adalah :

- a. Fito-progesteron dapat diperoleh dari ekstrak metanol daun benalu duku setelah dilakukan preparasi menggunakan KCKT.
- b. Fito-progesteron yang didapat tidak terlalu murni mendekati progesteron sesuai *Certified Reference Material* (CRM), namun terdapat inti pregnane yang memiliki kemiripan dengan CRM.
- c. Dosis efektif pada tikus betina terhadap fito-progesteron untuk meningkatkan kadar fito-progesteron adalah 50 sampai dengan 55 mg/kg berat badan atau 0,055 mg/gram berat badan.
- d. Fito-progesteron tidak menyebabkan peningkatan nilai SGOT SGPT serta kreatinin dan BUN, dengan demikian tidak menyebabkan sifat toksik pada liver dan ginjal tikus.

2. Saran

Perlu dilakukan penelitian sejenis menggunakan pelarut lain seperti non-polar seperti n-heksana dsb untuk melihat potensi fito-progesteron yang tertarik. Serta perlu dilakukan penelitian sejenis dengan hewan coba ternak poli gastri atau anjing maupun kucing, untuk melihat implikasi farmakodinami yang ditimbulkan.





DAFTAR PUSTAKA

- Awad NE, Kassem HA, Hamed MA, El-Feky AM, Elnaggar MAA, Mahmoud K, Ali MA. 2018. Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. *Mycology*. 9(1):70-80.
- Bambang H, Lazuardi M. 2013. Assesment of luteinizing testosterone prolactin estrogen hormonee after giving crude methanol extract of benalu duku leaves on healthy adult female rat. In LazuardiM, Rinidar, Ietje Wientarsih, eds. Proceeding Musyawarah Nasional II dan Pertemuan Ilmiah Nasional ke II AFFAVETI. 21-22 September 2013. Pusat Veterinaria Farma jl. Ahmad Yani Surabaya.
- Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. 2014. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal.* ;87:218-28.
- Bushra W, Tauheed I, Soonmi W, Donald GS, Iqbal S. 2013. Progesterone in experimental permanent stroke: a dose-response and therapeutic time-window study. *Brain*. 137(2): 486–502.
- Lazuardi M dan Bambang H, 2014. *Dendrophthoe pentandra* methanolic leaf extract increases progesterone levels in female rats. *Universa Medicina*. 33 (2): 100-108.
- Lazuardi M dan Bambang H. 2017^a. Isolasi dan Identifikasi bioaktif *progesterone like-effect* ekstrak metanol daun benalu duku. Laporan akhir tahun ke 1 Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT). Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lazuardi M dan Bambang H. 2017^b. Technique separation phyto-hormones of progesterone on crude extract benalu duku leaf by analytical column of high performance liquid chromatography. Di. LazuardiM, Ietje W, Rinidar Eds. Proceeding Musyawarah Nasional KE III Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia (AFFAVETI) 7-8 Oktober 2017, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya: Airlangga University Press.
- Lazuardi M, Bambang H. 2016. LC ESI-MS and FT-IR analysis of *Dendrophthoe pentandra* L. Miq leaf methanolic extracts to identify compound with progesterone like-effect. *Pak. J. Nutr.* 15 (3): 274-282.
- Lazuardi M. 2010. *Biofarmasetik dan farmakokinetik klinik medis veteriner*. Cetakan ke 2. Jakarta: Ghalia Indonesia.
- Lazuardi M. 2016. *Bagian Umum Ilmu Farmasi Veterinar*. Cetakan ke 1. Jakarta: Ghalia Indonesia

- Lazuardi M. 2018. Panduan Terapetika Veteriner XI. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, Surabaya.
- Lucia S, Gregory S, Whitt BS, Joanna X, Kyle PQ, Adeline JC, Clifford B, Irene G, Carlos S and Ana MS, 2014. Hormonal Regulation of Epithelial Organization in a Three-Dimensional Breast Tissue Culture Model. *Tissue Eng Part C Methods*. 20(1): 42–51.
- NagaPraveena U, Vincent J, Aida B. 2016. Inhibitory respiratory responses to progesterone and allopregnanolone in newborn rats chronically treated with caffeine. *J Physiol*. 594(2): 373–389.
- Nuraini F, Lazuardi M, Siti F. 2000. The study of anti cancer effect of benalu duku (*Dendrophthoe spec.*,) infusion to the myeloma induced rat. *YARSI Medical Journal* 8 (1):59-81.
- Rachael SA, Timothy WO, Iqbal Sa, Heather AC, Katherine CM, Yuliya O, Irina L, Jeffrey HB, Machel TP, Donald GS. 2015. Progesterone Treatment in Two Rat Models of Ocular Ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56(5): 2880–2891.
- Ratna SM, Roostantia I, Teguh Wahyudi M, Lazuardi M. 2007. The amino acid surveillance benalu duku leaf extract (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq). *J. of Trad. Med*. 11 (39): 14-18.
- Roostantia I, Arifa M, Nuraini F. 2010. Chemical analysis of Loranthaceae *Dendrophthoe* Sp., by thin layer chromatography. *Folia Medica Indonesiana*. 46 (1): 45-49.
- Roostantia I, Lazuardi M, Ratna SM. 2000. Perbandingan daya hambat pertumbuhan sel myeloma antara maserasi benalu duku dan benalu teh serta metotrexate, *Ebers papyrus*. 6(1): 13-21.
- Zhaohui L and Peter GS. 2014. Persistent Genital Hyperinnervation Following Progesterone Administration to Adolescent Female Rats. *Biol Reprod*. ; 91(6): 144.



Lampiran 1

PERSONALIA TENAGA PELAKSANA BESERTA KUALIFIKASINYA

No	Nama /NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi waktu (jam/minggu)	Uraian Tugas
1	Prof. Dr. M. Lazuardi Drh., MSi/0018125804	Fakultas Ked. Hewan UNAIR	Farmasi-Vet	25 jam/minggu	Koordinator riset
2	Bambang Hermanto, dr., MS	Fak. Kedokteran, Univ Airlangga	Farmakologi	18 jam/minggu	Analisis farmakodinami
3.	Dr. Eka Pramytha Hestianah, Drh., M.Si	Fak Kedokteran Hewan UNAIR	Histologi	18 jam / minggu	Analisis hewan coba

Lampiran 2

ISOLATION AND IDENTIFICATION BIO-ACTIVE OF PROGESTERONE-LIKE EFFECT FROM METHANOLIC EXTRACT OF BENALU DUKU LEAVES

¹Mochamad Lazuardi, ²Bambang Hermanto, ³Eka Pramytha Hestianah

1. Lab. Farmasi Veteriner, Departemen Kedokteran Dasar Veteriner FKH UNAIR. Jl. Mulyorejo kampus "C" Unair (60115) Telp. 0315992785, e-mail: lazuardi@fkh.unair.ac.id
2. Bambang Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Unair Jl. Moestopo 47 Surabaya, e-mail: bambanghermanto506@gmail.com.
3. Lab. Histologi, Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Jl. Mulyorejo kampus "C" Unair. E-mail: ekamirta@gmail.com.

Abstract

Earlier of 2016 some researcher were explored the crude extract methanol of *benalu duku* as a androgenic plant medicinal. The *benalu duku* as a mistletoe was growth up well in host of plant namely *Lancium domesticum*. Objective of the research aim was to determined of the phyto-progesterone as a active substances in methanolic crude extract of benalu duku leaves. 500 g leaves of benalu duku (*Dendrophthoe pentandra L. Miq*) was pulverized and percolated by methanol at level of pro analysis grade. The crude extract were separated from impurities compounds for obtained pure isolate phyto-progesterone by analytic column of HPLC. The isolated were advances determined comparing to Certified Reference Material of progesterone by thermal and FT-IR analysis. The isolated were dose-response tested in female rats after subcutane injection to obtained usual dose and screened liver -kidney toxic effect by assessed of AST, ALT, creatinine, BUN of blood serum. The result research was indicate that usual dose was found at 0.050 to 0.055 mg/g body weight and no toxic effect in organs of liver and kidney ($p < 0.05$).

Keywords: Anti-proliferates effects of myeloma cells, Parasitic plant, Phyto-hormones, Androgenic compounds.

* Corresponding author: lazuardi@fkh.unair.ac.id

Introduction

The Benalu duku leaves was known potentially to inhibit in-vitro and in-vivo proliferated cancer cell or as an anti-proliferates effect of the myeloma cells (Roostantia *et al.*, 2000 and Nuraini *et al.*, 2000). Some researcher explained that leaves of parasitic plant were containing 7.622% (w/w) amino acid essential from 4.384 mg of

pulverized leaves (Ratna *et al.*, 2007). The hot water extract of the leaves was known free from toxic effects to the rat liver and kidney (Arifa *et al.*, 2007). Research report between 2009 to 2010 explained that plants was containing functional group of hydroxyl carbonyl amine and a double bond of aliphatic chains and various alkaloids, flavonoid, polyphenols, terpenoids, steroid (Arifa *et al.*, 2009 and Roostantia *et al.*, 2010).

The steroid compounds of the plants were predicting contained phyto-hormones as a reproduction hormones. Report research in 2013 explained that bio-active compounds from methanolic extract of the leaves can be stimulate prolactine and testosterone hormones (Bambang and Lazuardi, 2013). Other reproduction hormones with activities inhibitors effect of fertility as bio-active of crude extract methanolic benalu duku leaves were namely progesterone-like effect as referred by Lazuardi and Bambang (2014). The progesterone-like effects as an androgenic compounds were predicted as follows; (1) progesterone, (2) medroxy progesterone acetate, (3) megestrol acetate, (4) dydrogesterone. The 4th androgenic compounds domination is phyto-medroxy progesterone acetate and phyto-progesterone at about 66% and 30% (Lazuardi, Bambang, 2016). The phyto-progesterone from crude extract methanolic benalu duku leaves were isolated using analytic column of HPLC (Lazuardi, Bambang 2017). Unfortunately, until last of 2018 did not know about quality of isolate phyto-progesterone after separated from crude extract methanolic benalu duku leaves.

By the result problems at above, will be explored the isolate bio-actives compounds as phyto-progesterone. Objective of the research aim was to obtained the data of characterization phyto-progesterone and usual dose and safely for therapeutic activity.

Materials and Methods

Plants and Progesterone Standard

Benalu duku leaves growth up well in lancium domesticum at 3rd years old were obtained from Muara enim districts of Palembang, South of Sumatera, Indonesia. The progesterone standard as Certified Reference material (CRM) was obtained from Sigma corp.. at level pro analysis.

Instrument analysis

The HPLC UV-PDA detector used a shimadzu LC-6AD pump with DGU-20A5 degasser, communication module-20 A, and

PDA detector SPD-M20A with FRC-10A, fraction collector. The HPLC was set at 254 nm with a reverse-phase ODS C18 Column with mobil phase Methanol water at fraction 70:30.

The Thermal gravimetry -thermal analysis was using by Mettler with adjusted the temperature between 25 °C to 150 °C at mass weight minimum 400 mg. Running condition was adjusted at time interval 30 minutes and gradual increased temperature each 10 °C /seconds.

The infra red analysis was carried out using the Diffuse reflectance spectroscopy (DRS) method or also called the Diffuse reflectance infrared Fourier Transform (DRIFT). The instrument used is Shimadzu IRTracer-100 as refereed to link: http://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/ftir/irtracer/irtracer_2.html.

Animal experiment and Approved ethics clearance

Healthy adult female rat were using for treated animal experimental with species *Rattus norvegicus* approximately between 250 to 300 g. The rats were obtained from breeder in Surabaya with recommendation veterinary doctors by health certificate. Animal ethic clearance was obtained from Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University. The animal experimental was using 30 rats as referred to Lazuardi *et al.*, (2018).

Research protocol

The pulverized of leaves benalu duku at about 500 g were percolated by methanol p.a than crude extract at about 5 g were drying by nitrogen gas in condition 40 °C. The crude extract were isolated refereed to Lazuardi and Bambang (2017). The isolated were characterization by thermal analyzed and FT-IR spectropho meter. The CRM of progesterone was using for control after assessed the samples. The isolated of

phyto-progesterone were analyzed dose-response by rat with method as described by Lazuardi (2010). Result of the probite test were assesment using SPSS version 24 at 5 % significance. Dose test was start at 55 mg/kg body weight; 60 mg/kg body weight, 65 mg/kg body weight, 70 mg/kg body weight and 75 mg/kg body weight by subcutant injection. Than all rat were analyzed for toxic effect of liver and kidney organ by analyzed of SGPT, SGOT creatinine and BUN. Control rat were using by rat at blank condition without giving isolated of phyto-progesterone. Comparing test between control and test of SGPT SGOT creatinine BUN were analyzed using comparing tool of SPSS version 24 at 5 % significant.

Result and Discussion

The chromatogram of phyto-progesterone were accumulate in 4 to 6 of retention time as follows (Figure 1), than the CRM was available at 6.107 min (Figure 2). That phenomenon indicated that phyto-progesterone were easy to identified by HPLC at suitable test system. Separation of isolates using analytic columns will basically get very few active compounds because the capacity of the analyte column is very small, which is around 20 μ L. But its superiority becomes more specifically separate because it can be known the exact time when the analyte are separated in the analyte column. There is a separation technology that uses HPLC with many results, namely the semipreparative separation technology. But the lack of this technology, which is often separated is not the existence of analytes. This situation is understandable considering the appearance of analytes separated by a relatively preparative column changing

The isolates from crude methanol extract after separation from other matrix

by analytic column indicated the melting point of phyto-progesterone was near to CRM (120 $^{\circ}$ C). The melting point of samples was 140 $^{\circ}$ C. The difference in melting point can occur due to a slight difference from the core of the analyte molecule which may be bound to other elements of the sample matrix. In figure 3 shows that at 140 $^{\circ}$ C, there will be a period of destruction that starts at 40 $^{\circ}$ C.

Continuous destruction since the temperature of 40, will make the period unable to be effective again. Thus when the mass destruction occurs at a temperature of 80 $^{\circ}$ C, It will cause the strength of molecular pharmacodynamics to decrease by half of the initial strength. The FT-IR examination results showed that there were identical functional groups compared to CRM functional groups (Figure 4). In figure 5, it can be seen that the spectrum in wave number 850 shows the same. In table 1 it appears that the increase in serum progesterone after administration of 50 mg / kg takes between 1 and 2 times. However, increasing the dose to 55 mg / kg body weight is a common dose. So that the increase in dosage to 60 mg / kg body weight up to 75 mg / kg body weight will not have any effect. This phenomenon is known as full strength mechanism. Giving 55 mg / kg body weight through subcutaneous injection, shows that the dose is the usual dose for rats. The administration of subcutaneous injection is relatively safe and does not cause hypersensitivity or anaphylaxis shock.

In table 2, it can be seen that the clinical chemistry of rats after phyto-progesterone administration did not show an increase in clinical chemistry compared to control rats. Thus the administration of phyto-progesterone will not damage the liver and kidneys ($p < 0.05$).

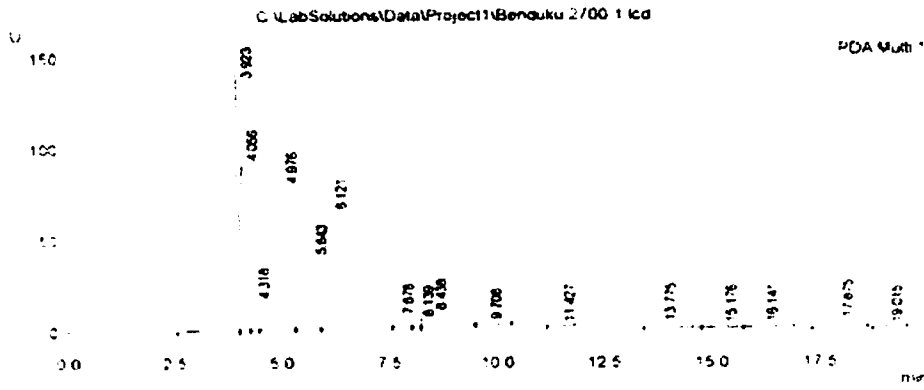


Figure 1. The chromatogram sample in HPLC, the phyto-progesterone was available at rt 4 to 6 minutes

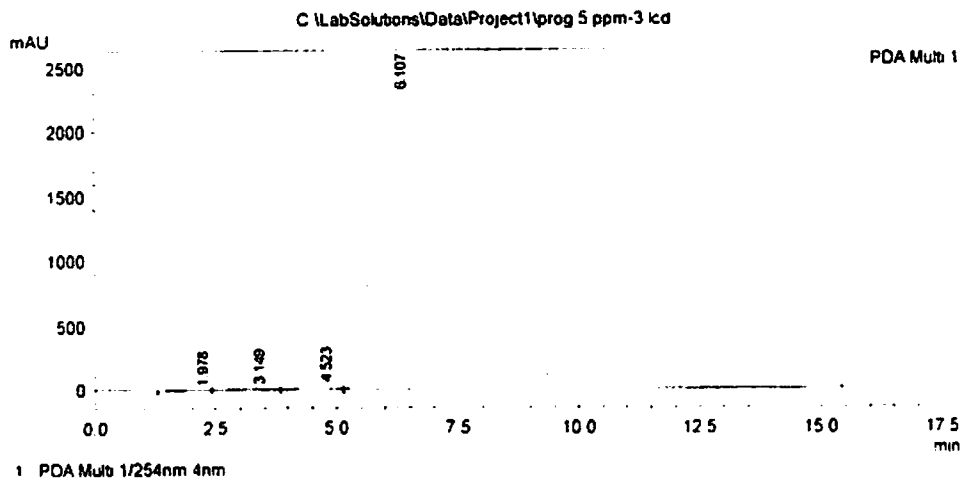


Figure 2. The CRM of phyto-progesterone was available at 6.107 minutes

Table 1. Concentration of phyto-progesteron in rat research object and rat research control

Conc. progesterone control (µg/mL)	Conc. Progesterone (µg/mL) Group I 50 mg/kg body weight	Conc progesterone (µg/mL) Group II 55 mg/kg body weight	Conc. Progesterone (µg/mL) Group III 60 mg/kg berat badan	Conc. Progesterone (µg/mL) Group IV 65 mg/kg body weight	Conc. Progesterone (µg/mL) Group V 70 mg/kg body weight	Conc. Progesterone (µg/mL) Group VI 75 mg/kg body weight
22.0	28.0	32.4	33.3	33.2	33.2	35.4
23.0	25.6	34.5	32.3	33.6	33.4	35.6
22.0	24.3	35.3	35.5	34.5	35.6	38.3
23.5	28.5	34.2	36.6	36.7	36.7	39.2
22.5	23.5	33.5	36.1	38.5	33.8	35.3

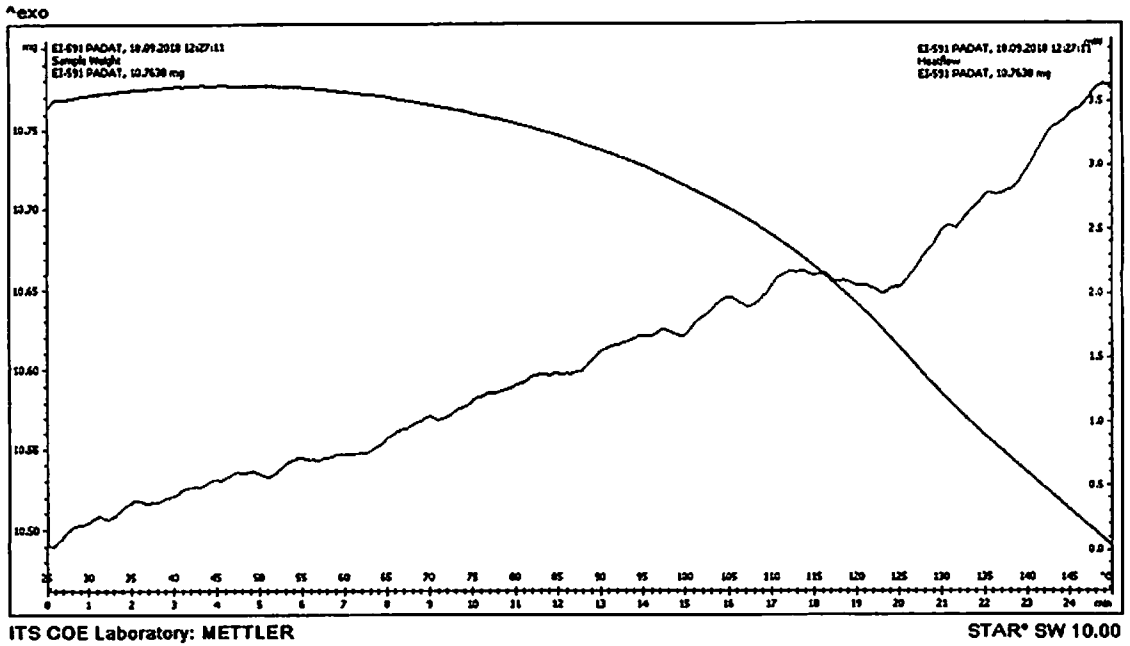


Figure 3. The thermal gravimetry-thermal analysis of the isolate phyto-progesterone

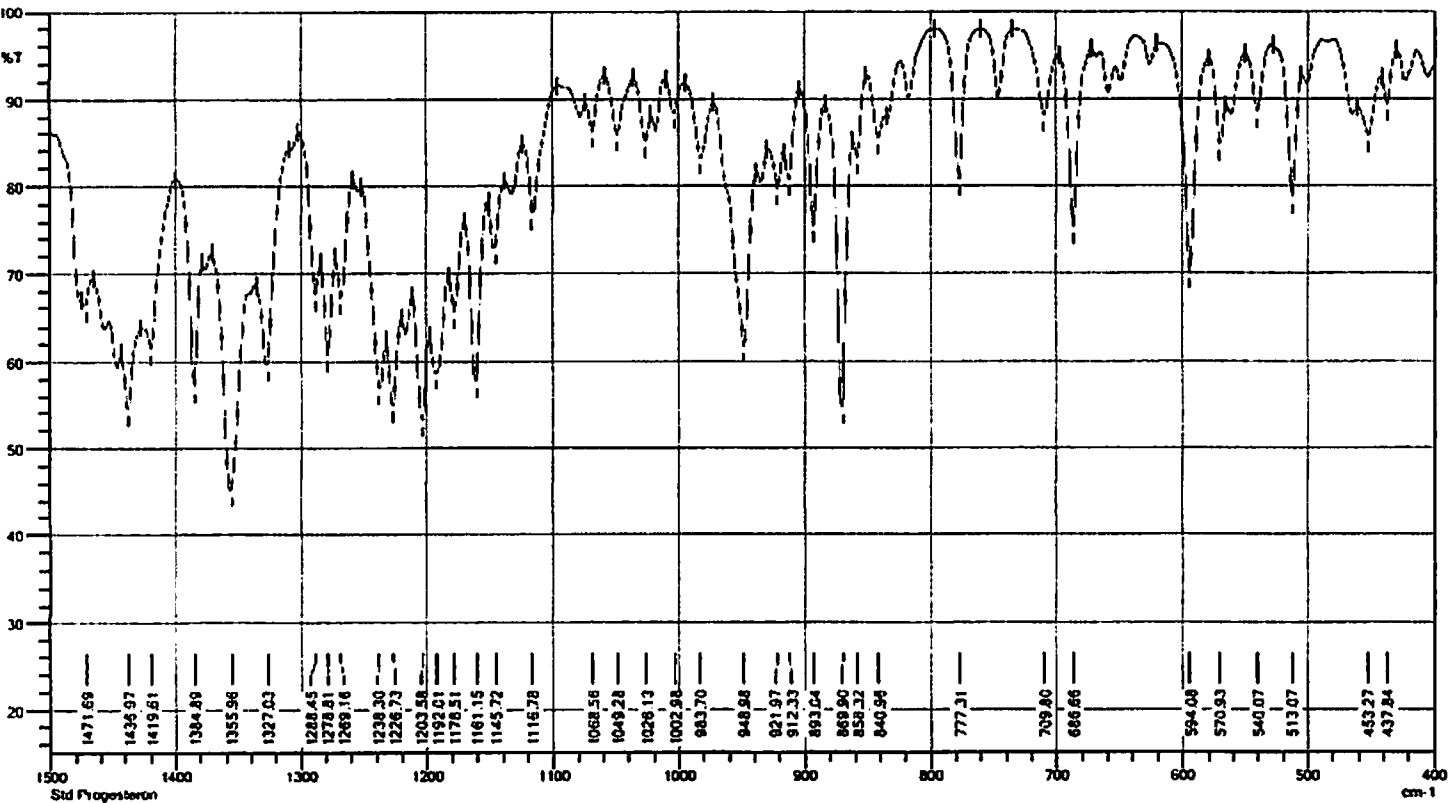
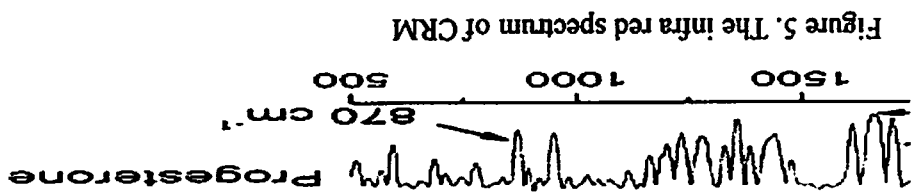


Figure 4. The Infra red spectrum of isolate crude extract methanolic benalu duku leaves

No. of Rats	Clinical chemistry assessment					Group
	1	2	3	4	5	
	170.00 ^a	195.00 ^a	90.00 ^a	95.00 ^a	100.00 ^a	Control
	SGOT (U/L)	80.00 ^a	110.00 ^a	70.00 ^a	50.00 ^a	
	SGPT (U/L)	0.81 ^a	0.88 ^a	0.65 ^a	0.64 ^a	
	BUN (mg/dl)	18.50 ^a	18.90 ^a	19.23 ^a	19.26 ^a	
	135.00 ^b	120.00 ^b	120.00 ^b	180.00 ^b	110.00 ^b	Group I Doses 50 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	80.00 ^b	75.00 ^b	80.00 ^b	80.00 ^b	
	SGPT (U/L)	0.67 ^b	0.66 ^b	0.68 ^b	0.66 ^b	
	BUN (mg/dL)	17.50 ^b	19.00 ^b	17.50 ^b	19.50 ^b	
	100.00 ^c	125.00 ^c	120.00 ^c	100.00 ^c	125.00 ^c	Group II Doses 55 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	75.00 ^c	75.00 ^c	80.00 ^c	70.00 ^c	
	SGPT (U/L)	1.41 ^c	0.78 ^c	0.88 ^c	0.85 ^c	
	BUN (mg/dL)	24.60 ^c	28.90 ^c	27.30 ^c	28.50 ^c	
	125.00 ^d	140.00 ^d	120.00 ^d	125.00 ^d	125.00 ^d	Group III Doses 60 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	75.00 ^d	60.00 ^d	80.00 ^d	70.00 ^d	
	SGPT (U/L)	0.75 ^d	0.77 ^d	0.68 ^d	1.02 ^d	
	BUN (mg/dL)	25.20 ^d	24.40 ^d	26.60 ^d	31.50 ^d	
	145.00 ^e	120.00 ^e	111.00 ^e	114.00 ^e	112.00 ^e	Group IV Doses 65 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	70.00 ^e	80.00 ^e	81.00 ^e	84.00 ^e	
	SGPT (U/L)	0.76 ^e	0.69 ^e	0.71 ^e	0.68 ^e	
	BUN (mg/dL)	17.80 ^e	18.40 ^e	19.70 ^e	19.30 ^e	
	110.00 ^f	170.00 ^f	80.00 ^f	95.00 ^f	110.00 ^f	Group V Doses 70 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	50.00 ^f	55.00 ^f	60.00 ^f	65.00 ^f	
	SGPT (U/L)	0.77 ^f	0.89 ^f	0.85 ^f	0.71 ^f	
	BUN (mg/dL)	25.70 ^f	26.70 ^f	25.40 ^f	26.50 ^f	
	120.00 ^g	115.00 ^g	115.00 ^g	110.00 ^g	123.00 ^g	Group VI Doses 75 mg/kg body weight
	SGOT (U/L)	70.00 ^g	81.00 ^g	75.00 ^g	83.00 ^g	
	SGPT (U/L)	0.69 ^g	0.67 ^g	0.76 ^g	0.82 ^g	
	BUN (mg/dL)	27.60 ^g	28.80 ^g	28.70 ^g	29.80 ^g	

Table 2 analysis chemical clinic rat of object vs., rat of control



Conclusion

Some conclusions that can be drawn from the results of the study are: (a) phyto-progesterone can be obtained from methanol extract from duku parasite leaves after preparation using HPLC. (b) phyto-progesterone obtained is not too pure approaching progesterone according to Certified Reference Material (CRM), but there is a core pregnancy that has similarities with CRM. (c) The effective dose in female mice of phyto-progesterone to increase levels of phyto-progesterone is 50 to 55 mg / kg body weight or 0.050 to 0.055 mg / gram body weight. (d) phyto-progesterone does not cause an increase in SGOT value of SGPT and creatinine and BUN, thus not causing toxic properties in the liver and kidneys of mice.

References

- Arifa, M., Roostantia, I., Ratna, S.M. 2007. Effect of *Loranthaceae dendrophthoe species* on serum transaminase level and hepatic necrosis in rat. *Fol. Med. Indo*, 43(1): 7-12
- Arifa, M., Roostantia, I., Ratna, S.M. 2009. Identification functional cluster of extract parasites duku (*Loranthaceae Dendrophthoe species*) with FT-IR spectrophotometer. *Fol. Med. Indon.* 45 (4): 275-277.
- Bambang, H., Lazuardi, M. 2013. Assesment of luteinizing testosterone prolactine estrogen hormone after giving crude methanol extract of benalu duku leaves on healthy adult female rat. *Proceeding 2nd National Conference of Indonesia Veterinary Pharmacy and Pharmacology Association*. September, 21th-22nd 2013, Center of Veterinary Pharma, Directorate General of Lives stock Services, Ministry of Agriculture, Surabaya Indonesia. pp 29-33.
- Lazuardi, M., Bambang, H. 2014. *Dendrophthoe Dendrophthoe pentandra* methanolic leaf extract increased progesterone levels in female rats. *Universa Medicina*. 33 (2): 100-108.
- Lazuardi, M., Bambang, H. 2016. LC ESI-MS and FT-IR analysis of *Dendrophthoe pentandra* L. Miq leaf methanolic extracts to identify coumpounds with progesterone-like effects. *Pak. J. nutr.* 15(3): 274-282.
- Lazuardi M dan Bambang H. 2017. Technique separation phyto-hormones of progesterone on crude extract benalu duku leaf by analytical column of high performance liquid chromatography. *Proceeding Musyawarah Nasional KE III Asosiasi Farmakologi dan Farmasi Veteriner Indonesia (AFFAVETI) 7-8 Oktober 2017*, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya: Airlangga University Pres.
- Lazuardi, M., Bambang, H, Restiadi, T.I. 2018. Calculate of withdrawal times of clenbuterol in goats to obtain safe times of slaughter. *Vet. World* 11(6): 731-738.
- Nuraini, F., Lazuardi, M., Siti, F. 2000. The study of anti cancer effect of Benalu duku (*Dendrophthoe spec.*,) infusion to the myeloma induced rat. *YARSI Medical Journal*. 8 (1): 59-81.
- Ratna, S.M., Roostantia, I., Teguh W.M., Lazuardi, M. 2007. The amino acid surveillance Benalu duku leaf extract (*Dendrophthoe sp.*,). *J. of Trad. Med.* 11(39): 14-18.
- Roostantia, I., Lazuardi, M., Ratna, S.M. 2000. Perbandingan daya hambat pertumbuhan sel myeloma antara maserasi Benalu duku dan Benalu Teh dan Metotreaxate. *Ebers papyrus*. 6 (1): 13-21.
- Roostantia, I., Arifa, M., Nuraini, F. 2010. Chemical analysis of *Loranthaceae Dendrophthoe Species* by Thin Layer

**Chromatography. Fol. Med. Indon. 46
(1): 45-49.**

Acknowledgement

**We are appreciate to Indonesia
Government for supporting this research by
Ministry of Research Technology and High
Education at programme 2017-2018.**

Lampiran 3

PR0201702065*** 25/04/2017 15:34 DE***PRASCT-A*** 450,000.00*** 164***25/04/2017



DEPARTEMEN KEHAKIMAN DAN HAK ASASI MANUSIA R.I
DIREKTORAT JENDERAL HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

dibuat rangkai :

Formulir Permohonan Paten

Ditisi oleh petugas

Tanggal Pengisian :

Nomor permohonan :

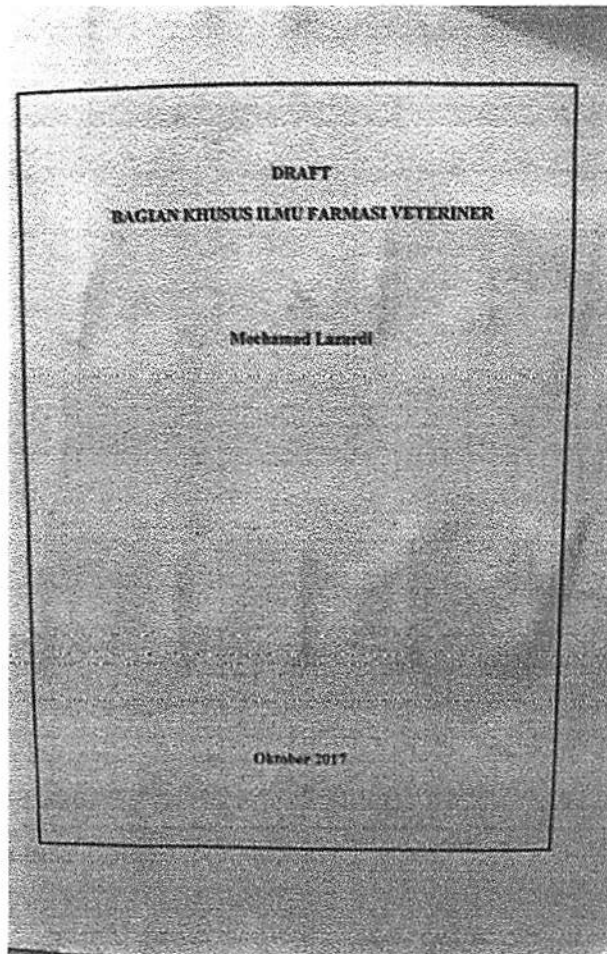
Dengan ini saya/kami ¹⁾ (1) Nama : Universitas Airlangga Alamat ²⁾ : Kampus C Unair, Mulyorejo, Surabaya Warga Negara : Indonesia Telepon : 031-5998246 NPWP : 00 005 564 0 606 000		
Mengajukan permohonan paten/paten sederhana		<input type="checkbox"/>
Yang merupakan permohonan paten internasional/PCT dengan nomor :		<input type="checkbox"/>
(2) melalui/tidak melalui ³⁾ Konsultan Paten Nama Badan Hukum ³⁾ : Alamat Badan Hukum ³⁾ : Nama Konsultan Paten : Alamat ²⁾ : Nomor Konsultan Paten : Telepon / fax :		<input type="checkbox"/>
(5) dengan judul invensi : EKSTRAK ETANOL DAUN BENALU DUKU (DENDROPHTOE PENTANDRA L.MIQ) YANG TUMBUH PADA POHON BENALU (ANSUM DOMESTICUM) SEBAGAI OBAT HEWAN ALAMI PROGESTERON KOMPOSITUM PENINGKATHORMON PEROGESTERONE DAN PROSES PEMBUATANNYA		<input type="checkbox"/>
Permohonan Paten ini merupakan pecahan dari permohonan paten nomor :		<input type="checkbox"/>

Lampiran 4

Draft buku ajar

Kover dan Daftar Isi

BUKU AJAR BAGIAN KHUSUS ILMU FARMASI VETERINER



Penerbit Ghalia Indonesia : Halaman 600 halaman

Lampiran 5

Nara sumber seminar kerjasama riset Internasional Asia University - Univ Airlangga



ASIA UNIVERSITY
CENTER for INTERNATIONAL ACADEMIC EXCHANGE
 500 Liufeng Road, Wufeng, Taichung 41354, Taiwan ROC
 Phone: +886-4-23323456 ext. 6278 • Fax: +886-4-23394140
 Email: ciae@asia.edu.tw • <http://ciae.asia.edu.tw>


To Whom It May Concern,

Dec. 30, 2017

This is to certify that Prof. Mohamad Lazuardi Hartojo has completed a total of 40 hours of lecturing and sharing the research during his visit to Asia University, Taiwan, from Dec. 25 to Dec. 31, 2018. Courses his the study and research are listed as follows:

No.	Activities	Hours	Remarks
1	2 days of workshop	20 hours	
2	field study on culturing of art	3 hours	
3	lecture and discussion of 3D Printing technology	6 hours	
4	Lecture and discussion of Soil Technology at the Agriculture Research Center	3 hours	
5	Historical & Industrial visit to Asia University, Taichung Science Park and Taichung City	8 hour	

Should you have any questions in this regard, don't hesitate to contact us.


 Minghua Chen, Prof./PhD
 Dean, the International College &
 Dean, College of Humanities and Social Sciences
 Asia University, Taichung



HEALTH • CARE • INNOVATION • EXCELLENCE

PROBIT Frekuensi OF Subyek WITH dosis
 /LOG NONE
 /MODEL PROBIT
 /PRINT FREQ CI
 /CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1).

Probit Analysis

Data Information

		N of Cases
Valid		6
Rejected	Missing	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	20	No ^a

a. Parameter estimates did not converge.

Parameter Estimates

						95% ...
	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	Lower Bound
PROBIT ^a	dosis	.248	.185	1.342	.180	-.114
	Intercept	-12.110	9.541	-1.269	.204	-21.651

Parameter Estimates

			95% Confidence .
	Parameter		Upper Bound
PROBIT ^a	dosis		.610
	Intercept		-2.569

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.351	4	.986 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	dosis	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual
PROBIT	1	50.000	5	3	3.082	-.082
	2	55.000	5	5	4.689	.311
	3	60.000	5	5	4.986	.014
	4	65.000	5	5	5.000	.000
	5	70.000	5	5	5.000	.000
	6	75.000	5	5	5.000	.000

Cell Counts and Residuals

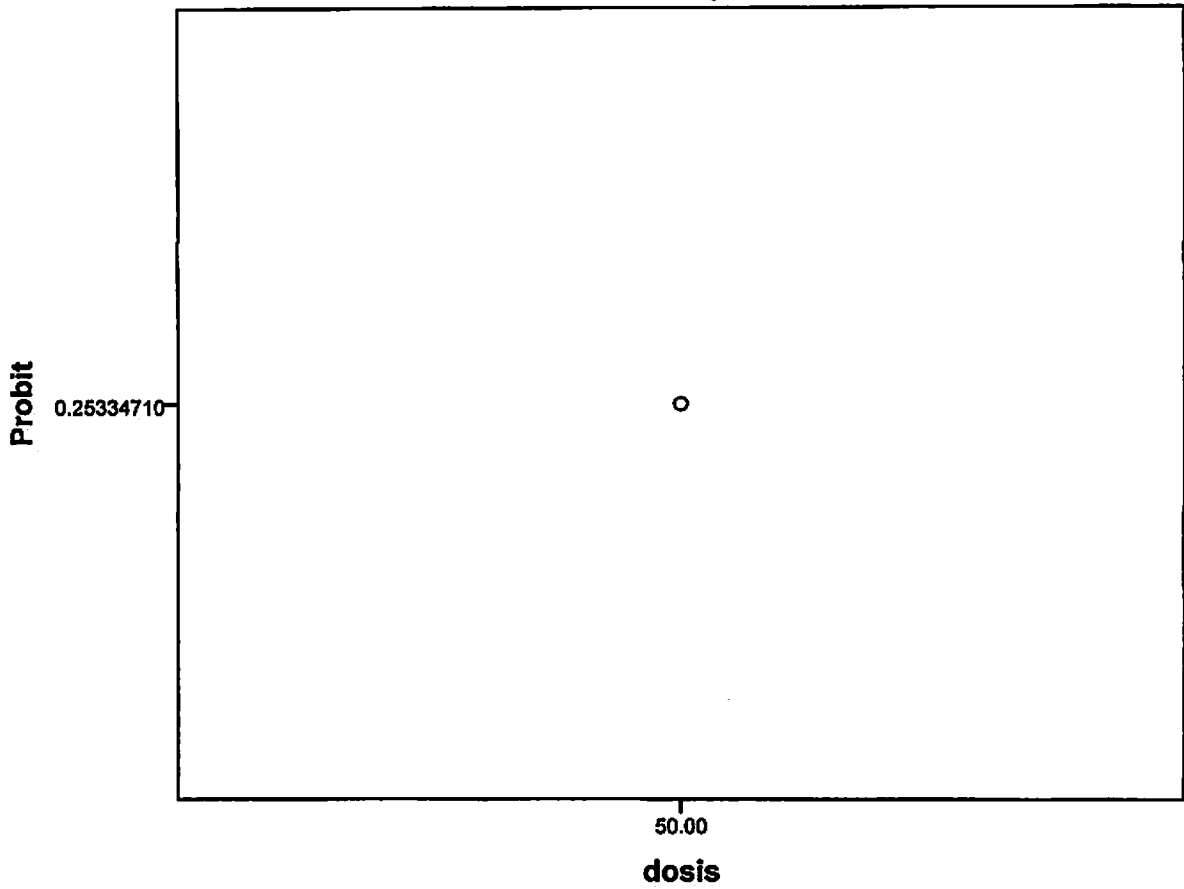
	Number	Probability
PROBIT	1	.616
	2	.938
	3	.997
	4	1.000
	5	1.000
	6	1.000

Confidence Limits

95% Confidence Limits for dosis

	Probability	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	39.432	.	.
	.020	40.530	.	.
	.030	41.227	.	.
	.040	41.752	.	.
	.050	42.178	.	.
	.060	42.541	.	.
	.070	42.860	.	.
	.080	43.145	.	.
	.090	43.404	.	.
	.100	43.642	.	.
	.150	44.630	.	.
	.200	45.415	.	.
	.250	46.089	.	.
	.300	46.694	.	.
	.350	47.254	.	.
	.400	47.786	.	.
	.450	48.301	.	.
	.500	48.807	.	.
	.550	49.314	.	.
	.600	49.828	.	.
	.650	50.360	.	.
	.700	50.921	.	.
	.750	51.526	.	.
	.800	52.199	.	.
	.850	52.984	.	.
	.900	53.972	.	.
	.910	54.211	.	.
	.920	54.470	.	.
	.930	54.755	.	.
	.940	55.073	.	.
	.950	55.437	.	.
	.960	55.863	.	.
	.970	56.387	.	.
	.980	57.084	.	.
	.990	58.183	.	.

Probit Transformed Responses



SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample 1" N2=5 MEAN
 2=133 SD2=27.749
 LABEL2="Sample 2" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample 1	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample 2	5.000	133.000	27.749	12.410

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-3.000	25.130	-.119	8.000	.908
Equal variances not assumed	-3.000	25.130	-.119	6.337	.909

Hartley test for equal variance: F = 3.101, Sig. = 0.1199

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-52.253	46.253
Asymptotic (unequal variance)	-52.253	46.253
Exact (equal variance)	-60.949	54.949
Exact (unequal variance)	-63.706	57.706

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample kontrol" N2=
 5 MEAN2=114 SD2=12.942
 LABEL2="Sample B" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample kontrol	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample B	5.000	114.000	12.942	5.788

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	16.000	22.605	.708	8.000	.499
Equal variances not assumed	16.000	22.605	.708	4.558	.514

Hartley test for equal variance: $F = 14.254$, Sig. = 0.0056

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-28.306	60.306
Asymptotic (unequal variance)	-28.306	60.306
Exact (equal variance)	-36.128	68.128
Exact (unequal variance)	-43.843	75.843

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample kontrol" N2=5 MEAN2=127 SD2=7.583

LABEL2="Sample c" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample kontrol	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample c	5.000	127.000	7.583	3.391

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	3.000	22.113	.136	8.000	.895
Equal variances not assumed	3.000	22.113	.136	4.193	.898

Hartley test for equal variance: $F = 41.520$, Sig. = 0.0004

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-40.341	46.341
Asymptotic (unequal variance)	-40.341	46.341
Exact (equal variance)	-47.993	53.993
Exact (unequal variance)	-57.300	63.300

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample kontrol" N2=5 MEAN2=120.4 SD2=14.188
 LABEL2="Sample d" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample kontrol	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample d	5.000	120.400	14.188	6.345

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	9.600	22.754	.422	8.000	.684
Equal variances not assumed	9.600	22.754	.422	4.670	.692

Hartley test for equal variance: $F = 11.860$, Sig. = 0.0084

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-34.998	54.198
Asymptotic (unequal variance)	-34.998	54.198
Exact (equal variance)	-42.872	62.072
Exact (unequal variance)	-50.158	69.358

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample kontrol" N2=5 MEAN2=113 SD2=34.205
 LABEL2="Sample e" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample kontrol	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample e	5.000	113.000	34.205	15.297

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	17.000	26.674	.637	8.000	.542
Equal variances not assumed	17.000	26.674	.637	7.161	.544

Hartley test for equal variance: $F = 2.041$, Sig. = 0.2262

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-35.280	69.280
Asymptotic (unequal variance)	-35.280	69.280
Exact (equal variance)	-44.510	78.510
Exact (unequal variance)	-45.787	79.787

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=130 SD1=48.862 LABEL1="Sample kontrol" N2=5 MEAN2=116.6 SD2=5.030

LABEL2="Sample f" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Sample kontrol	5.000	130.000	48.862	21.852
Sample f	5.000	116.600	5.030	2.249

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	13.400	21.967	.610	8.000	.559
Equal variances not assumed	13.400	21.967	.610	4.085	.574

Hartley test for equal variance: $F = 94.364$, Sig. = 0.0001

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-29.655	56.455
Asymptotic (unequal variance)	-29.655	56.455
Exact (equal variance)	-37.257	64.057
Exact (unequal variance)	-47.095	73.895

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="Sample kontrol" N2=5
 MEAN2=116.6 SD2=5.030
 LABEL2="Sample f" CI=95.

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=78.
 8 SD2=2.168
 LABEL2="AGPT" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
AGPT	5.000	78.800	2.168	.970

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-4.800	10.341	-.464	8.000	.655
Equal variances not assumed	-4.800	10.341	-.464	4.071	.666

Hartley test for equal variance: $F = 112.763$, Sig. = 0.0000

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-25.069	15.469
Asymptotic (unequal variance)	-25.069	15.469
Exact (equal variance)	-28.647	19.047
Exact (unequal variance)	-33.316	23.716

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=74
SD2=4.183 LABEL2="BGPT"
CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
BGPT	5.000	74.000	4.183	1.871

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.000	10.464	.000	8.000	1.000
Equal variances not assumed	.000	10.464	.000	4.264	1.000

Hartley test for equal variance: $F = 30.291$, Sig. = 0.0010

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-20.510	20.510
Asymptotic (unequal variance)	-20.510	20.510
Exact (equal variance)	-24.131	24.131
Exact (unequal variance)	-28.358	28.358

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=73
SD2=8.367 LABEL2="CGPT"
CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
CGPT	5.000	73.000	8.367	3.742

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	1.000	10.955	.091	8.000	.930
Equal variances not assumed	1.000	10.955	.091	5.039	.931

Hartley test for equal variance: $F = 7.571$, Sig. = 0.0222

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-20.471	22.471
Asymptotic (unequal variance)	-20.471	22.471
Exact (equal variance)	-24.261	26.261
Exact (unequal variance)	-27.095	29.095

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=79.
8 SD2=5.762

LABEL2="DGPT" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
DGPT	5.000	79.800	5.762	2.577

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-5.800	10.613	-.546	8.000	.600
Equal variances not assumed	-5.800	10.613	-.546	4.499	.611

Hartley test for equal variance: $F = 15.964$, Sig. = 0.0043

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-26.602	15.002
Asymptotic (unequal variance)	-26.602	15.002
Exact (equal variance)	-30.274	18.674
Exact (unequal variance)	-34.022	22.422

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=60
SD2=7.906 LABEL2="EGPT"
CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
EGPT	5.000	60.000	7.906	3.536

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	14.000	10.886	1.286	8.000	.234
Equal variances not assumed	14.000	10.886	1.286	4.931	.256

Hartley test for equal variance: $F = 8.480$, Sig. = 0.0175

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-7.336	35.336
Asymptotic (unequal variance)	-7.336	35.336
Exact (equal variance)	-11.103	39.103
Exact (unequal variance)	-14.102	42.102

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=74 SD1=23.022 LABEL1="KGPT" N2=5 MEAN2=76.
8 SD2=5.215

LABEL2="FGPT" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KGPT	5.000	74.000	23.022	10.296
FGPT	5.000	76.800	5.215	2.332

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-2.800	10.557	-.265	8.000	.798
Equal variances not assumed	-2.800	10.557	-.265	4.409	.803

Hartley test for equal variance: F = 19.488, Sig. = 0.0027

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-23.491	17.891
Asymptotic (unequal variance)	-23.491	17.891
Exact (equal variance)	-27.144	21.544
Exact (unequal variance)	-31.067	25.467

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.67 SD2=0.01

LABEL2="AKREATININ" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
AKREATININ	5.000	.670	.010	.004

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.070	.047	1.498	8.000	.172
Equal variances not assumed	.070	.047	1.498	4.074	.207

Hartley test for equal variance: F = 108.160, Sig. = 0.0000

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.022	.162
Asymptotic (unequal variance)	-.022	.162
Exact (equal variance)	-.038	.178
Exact (unequal variance)	-.059	.199

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.974 SD2=0.251

LABEL2="BKREATININ" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
BKREATININ	5.000	.974	.251	.112

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-.234	.122	-1.926	8.000	.090
Equal variances not assumed	-.234	.122	-1.926	5.334	.108

Hartley test for equal variance: $F = 5.825$, Sig. = 0.0378

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.472	.004
Asymptotic (unequal variance)	-.472	.004
Exact (equal variance)	-.514	.046
Exact (unequal variance)	-.541	.073

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.846 SD2=0.158

LABEL2="CKREATININ" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
CKREATININ	5.000	.846	.158	.071

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-.106	.085	-1.253	8.000	.246
Equal variances not assumed	-.106	.085	-1.253	6.918	.251

Hartley test for equal variance: $F = 2.308$, Sig. = 0.1900

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.272	.060
Asymptotic (unequal variance)	-.272	.060
Exact (equal variance)	-.301	.089
Exact (unequal variance)	-.307	.095

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.706 SD2=0.032

LABEL2="DKREATININ" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
DKREATININ	5.000	.706	.032	.014

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.034	.049	.699	8.000	.505
Equal variances not assumed	.034	.049	.699	4.751	.517

Hartley test for equal variance: $F = 10.562$, Sig. = 0.0109

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.061	.129
Asymptotic (unequal variance)	-.061	.129
Exact (equal variance)	-.078	.146
Exact (unequal variance)	-.093	.161

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.802 SD2=0.070

LABEL2="EKREATININ" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
EKREATININ	5.000	.802	.070	.031

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-.062	.056	-1.106	8.000	.301
Equal variances not assumed	-.062	.056	-1.106	7.007	.305

Hartley test for equal variance: $F = 2.207$, Sig. = 0.2026

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.172	.048
Asymptotic (unequal variance)	-.172	.048
Exact (equal variance)	-.191	.067
Exact (unequal variance)	-.195	.071

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=0.74 SD1=0.104 LABEL1="KKREATININ" N2=5 MEAN2=0.776 SD2=0.109

LABEL2="FKREATININ" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KKREATININ	5.000	.740	.104	.047
FKREATININ	5.000	.776	.109	.049

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-.036	.067	-.534	8.000	.608
Equal variances not assumed	-.036	.067	-.534	7.982	.608

Hartley test for equal variance: $F = 1.098$, Sig. = 0.4602

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.168	.096
Asymptotic (unequal variance)	-.168	.096
Exact (equal variance)	-.191	.119
Exact (unequal variance)	-.191	.119

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=18.4 SD2=0.894

LABEL2="ABUN" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
ABUN	5.000	18.400	.894	.400

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.578	.423	1.367	8.000	.209
Equal variances not assumed	.578	.423	1.367	4.930	.231

Hartley test for equal variance: $F = 8.480$, Sig. = 0.0175

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.251	1.407
Asymptotic (unequal variance)	-.251	1.407
Exact (equal variance)	-.397	1.553
Exact (unequal variance)	-.513	1.669

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=27.34 SD2=1.680
 LABEL2="BBUN" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
BBUN	5.000	27.340	1.680	.751

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-8.362	.764	-10.948	8.000	.000
Equal variances not assumed	-8.362	.764	-10.948	4.267	.000

Hartley test for equal variance: $F = 29.946$, Sig. = 0.0010

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-9.859	-6.865
Asymptotic (unequal variance)	-9.859	-6.865
Exact (equal variance)	-10.123	-6.601
Exact (unequal variance)	-10.431	-6.293

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=27.96 SD2=3.599
 LABEL2="CBUN" CI=95.

Summary T-Test

Summary Data

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
CBUN	5.000	27.960	3.599	1.610

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-8.982	1.615	-5.560	8.000	.001
Equal variances not assumed	-8.982	1.615	-5.560	4.058	.005

Hartley test for equal variance: $F = 137.432$, Sig. = 0.0000

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-12.148	-5.816
Asymptotic (unequal variance)	-12.148	-5.816
Exact (equal variance)	-12.707	-5.257
Exact (unequal variance)	-13.442	-4.522

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=18.96 SD2=0.826

LABEL2="DBUN" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
DBUN	5.000	18.960	.826	.369

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.018	.394	.046	8.000	.965
Equal variances not assumed	.018	.394	.046	5.084	.965

Hartley test for equal variance: $F = 7.239$, Sig. = 0.0243

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-.754	.790
Asymptotic (unequal variance)	-.754	.790
Exact (equal variance)	-.891	.927
Exact (unequal variance)	-.990	1.026

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=25.96 SD2=0.598

LABEL2="EBUN" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
EBUN	5.000	25.960	.598	.267

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-6.982	.301	-23.226	8.000	.000
Equal variances not assumed	-6.982	.301	-23.226	5.972	.000

Hartley test for equal variance: $F = 3.794$, Sig. = 0.0848

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-7.571	-6.393
Asymptotic (unequal variance)	-7.571	-6.393
Exact (equal variance)	-7.675	-6.289
Exact (unequal variance)	-7.718	-6.246

SAVE OUTFILE='G:\PUPT 2018\Laporan akhir\KImia klinik kontrol vs., trial.sav'
v'

/COMPRESSED.

SPSSINC SUMMARY TTEST N1=5 MEAN1=18.978 SD1=0.307 LABEL1="KBUN" N2=5 MEAN2=28.88 SD2=0.853

LABEL2="FBUN" CI=95.

Summary T-Test**Summary Data**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
KBUN	5.000	18.978	.307	.137
FBUN	5.000	28.880	.853	.381

Independent Samples Test

	Mean Difference	Std. Error Difference	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	-9.902	.405	-24.424	8.000	.000
Equal variances not assumed	-9.902	.405	-24.424	5.019	.000

Hartley test for equal variance: F = 7.720, Sig. = 0.0213

95.0% Confidence Intervals for Difference

	Lower Limit	Upper Limit
Asymptotic (equal variance)	-10.697	-9.107
Asymptotic (unequal variance)	-10.697	-9.107
Exact (equal variance)	-10.837	-8.967
Exact (unequal variance)	-10.943	-8.861