



**Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian Baru
Skema Penelitian Dasar Kompetitif (Penugasan)
TAHUN ANGGARAN 2022
Nomor : 731/UNWAR/LEMLIT/PD-13/2022**

Pada hari ini **Kamis** tanggal **Enam Belas** bulan **Juni** tahun **Dua Ribu Dua Puluh Dua**, kami yang bertanda tangan dibawah ini :

1. **Prof. Dr. I Made Suwitra, SH., MH.** : Kepala Lembaga Penelitian Universitas Warmadewa selanjutnya di sebut **PIHAK PERTAMA**
NIP: 196012311985031024
2. **Dr. dr. Dewa Ayu Putri Sri Masyeni,** : Ketua Peneliti selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**
Sp.PD-KPTI.
NIDN: 0827116503

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA** secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Kontrak Penelitian, dengan ketentuan dan syarat sebagai berikut:

**PASAL 1
DASAR HUKUM**

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2003, tentang Sistem Pendidikan Nasional;
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2012, tentang Pendidikan Tinggi;
3. Peraturan Menteri Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia Nomor 38 Tahun 2019 tentang Prioritas Riset Nasional Tahun 2020-2024;
4. Peraturan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2020, tentang Standar Nasional Pendidikan Tinggi;
5. Surat Plt. Direktur Riset, Teknologi, dan Pengabdian kepada Masyarakat Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi Nomor: 0267/E5/AK.04/2022 tanggal 28 April 2022 perihal Pengumuman Penerima Pendanaan Penelitian Program Kompetitif Nasional dan Penugasan di Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2022 Tahap Pertama.
6. Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian Baru Penelitian Dasar Kompetitif Nasional Tahun Anggaran 2022 antara Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi Wilayah VIII dengan Universitas Warmadewa Nomor: 160/E5/PG.02.00.PT/2022 dan Nomor: 0967/LL8/Ak.04/2022;

**PASAL 2
RUANG LINGKUP**

- (1) Ruang lingkup Kontrak Penelitian ini meliputi pelaksanaan penelitian tahun anggaran 2022.

- (2) Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) beserta nama pelaksana penelitian, skema, luaran tambahan, jangka waktu penelitian, dan besarnya biaya penelitian sebagaimana tercantum dalam Kontrak Penelitian ini.

PASAL 3 SUMBER DANA

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberikan pendanaan Pelaksanaan Program Penelitian dengan judul **Identification of Molecular and Cellular Pathways Predicting Susceptibility or Resistance to Severe Dengue Fever** yang bersumber pada DIPA (Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran) Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi Kementerian Pendidikan, kebudayaan, Riset, dan Teknologi Tahun Anggaran 2022, Nomor SP DIPA-023.17.1.690523/2022 revisi ke-02 tanggal 22 April 2022..
- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan, administrasi dan keuangan atas pekerjaan sebagai dimaksud pada ayat (1) dan berkewajiban menyimpan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya.
- (3) **PIHAK PERTAMA** memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA**, dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk mengkoordinir dan sebagai penanggungjawab Pelaksanaan Program Penelitian yang dilakukan oleh para dosen sebagai Tim Peneliti pada skema penelitian yang diperoleh.

PASAL 4 NILAI DAN TAHAPAN PEMBAYARAN

- (1) Pendanaan Penelitian dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap melalui mekanisme transfer, dengan ketentuan sebagai berikut:
- a. Pendanaan Penelitian keseluruhan sebesar Rp. 259,200,000,- (*Dua Ratus Lima Puluh Sembilan Juta Dua Ratus Ribu Rupiah*)
 - b. Pembayaran tahap pertama sebesar 70% (Tujuh puluh persen) dari jumlah keseluruhan bantuan dana penelitian yaitu Rp. 259,200,000,- x 70% = Rp. 181,440,000,- (*Seratus Delapan Puluh Satu Juta Empat Ratus Empat Puluh Ribu Rupiah*) setelah **PIHAK KEDUA** menandatangani Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian;
 - c. Pembayaran tahap pertama sebagaimana dimaksud pada huruf a, akan dibayarkan dengan ketentuan apabila revisi proposal penelitian dan surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian telah diunggah ke laman yang ditentukan;
 - d. Pembayaran tahap kedua sebesar 30% (Tiga puluh persen) dari jumlah keseluruhan bantuan dana penelitian yaitu Rp. 259,200,000,- x 30% = Rp.77,760,000,- (*Tujuh Puluh Tujuh Juta Tujuh Ratus Enam Puluh Ribu Rupiah*), dibayarkan setelah pelaksana peneliti mengunggah Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) ke laman yang ditentukan paling lambat tanggal 16 Agustus 2022; dan
 - d. Apabila pembayaran tahap pertama sebagaimana dimaksud pada huruf a cair setelah tanggal 9 Agustus 2022, pelaksana penelitian mengunggah Surat Pernyataan

Tanggung Jawab Belanja (SPTB) ke laman yang ditentukan paling lambat 2 (dua) minggu setelah dana cair.

- (2) **PIHAK KEDUA** harus menyampaikan surat pernyataan telah menyelesaikan seluruh pekerjaan yang dibuktikan dengan pengunggahan pada laman yang ditentukan paling lambat tanggal 20 November 2022, dengan melampirkan dokumen sebagai berikut:
 - a. Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB); dan
 - b. laporan kemajuan pelaksanaan pekerjaan.
- (3) Khusus untuk dana pembayaran 30% yang baru cair setelah tanggal 13 November 2022, **PIHAK KEDUA** mengunggah dokumen sebagaimana dimaksud pada ayat (2) paling lambat 2 (dua) minggu setelah dana dicairkan..

PASAL 5

JANGKA WAKTU PENYELESAIAN

Jangka waktu pelaksanaan penelitian dimulai sejak tanggal 10 Mei hingga 20 November 2022

PASAL 6

HAK DAN KEWAJIBAN

- (1) **PIHAK PERTAMA** mempunyai kewajiban:
 - a. Memberikan pendanaan penelitian kepada **PIHAK KEDUA**;
 - b. Melakukan pemantauan dan evaluasi;
- (2) **PIHAK KEDUA** mempunyai kewajiban:
 - a. Mengoordinir dan bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan Penelitian, administrasi dan keuangan;
 - b. Menyimpan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya;
 - c. Mengunggah dokumen revisi proposal penelitian;
 - d. Mengunggah surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian;
 - e. Mengunggah catatan harian pelaksanaan penelitian;
 - f. Mengunggah laporan kemajuan pelaksanaan penelitian;
 - g. Mengunggah Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) atas dana penelitian yang telah ditetapkan;
 - h. Mengunggah laporan akhir penelitian (dilaporkan padan tahun terakhir pelaksanaan penelitian); dan
 - i. Mengunggah luaran penelitian.
 - j. Mengembalikan sisa dana ke Kas Negara setelah berkoordinasi dengan **PIHAK PERTAMA**, apabila dalam pelaksanaan penelitian terdapat sisa dana.
- (3) **PIHAK PERTAMA** mempunyai hak menerima dokumen hasil unggahan di lama yang ditentukan sebagai berikut:
 - a. revisi proposal penelitian;
 - b. surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian;
 - c. catatan harian pelaksanaan penelitian;
 - d. laporan kemajuan pelaksanaan penelitian;

- e. Surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTB) atas dana penelitian yang
- f. telah ditetapkan;
- g. laporan akhir penelitian; dan
- h. luaran penelitian.

(4) **PIHAK KEDUA** mempunyai hak mendapatkan dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA**.

PASAL 7 PENGANTIAN KEANGGOTAAN

- (1) Perubahan terhadap susunan tim pelaksana penelitian dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan dari Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi.
- (2) Apabila ketua tim pelaksana penelitian tidak dapat menyelesaikan penelitian atau mengundurkan diri, maka **PIHAK KEDUA** wajib menunjuk pengganti ketua tim pelaksana penelitian yang merupakan salah satu anggota tim setelah mendapat persetujuan dari Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi.
- (3) Dalam hal tidak terdapat pengganti ketua tim pelaksana penelitian sesuai dengan syarat dan ketentuan dalam panduan penelitian, maka penelitian dibatalkan dan dana dikembalikan ke Kas Negara.

PASAL 8 PAJAK

Ketentuan pengenaan pajak pertambahan nilai dan/atau pajak penghasilan dalam rangka pelaksanaan kegiatan penelitian ini wajib dilaksanakan oleh **PIHAK KEDUA** sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan di bidang perpajakan.

PASAL 9 KEKAYAAN INTELEKTUAL

- (1) Hak Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari pelaksanaan penelitian diatur dan dikelola sesuai dengan ketentuan peraturan dan perundang-undangan.
- (2) Setiap publikasi, makalah, dan/atau ekspos dalam bentuk apapun yang berkaitan dengan hasil penelitian wajib mencantumkan pemberi dana, paling sedikit mencantumkan nama Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi.

PASAL 10 INTEGRITAS AKADEMIK

- (1) Pelaksana penelitian wajib menjunjung tinggi integritas akademik yaitu komitmen dalam bentuk perbuatan yang berdasarkan pada nilai kejujuran, kredibilitas, kewajaran, kehormatan, dan tanggung jawab dalam kegiatan penelitian yang dilaksanakan.

- (2) Penelitian dilakukan sesuai dengan kerangka etika, hukum, dan profesionalitas serta kewajiban sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.
- (3) Penelitian dilakukan dengan menjunjung tinggi standar ketelitian dan integritas tertinggi dalam semua aspek penelitian.

PASAL 11 **KEADAAN KAHAR**

- (1) Apabila terjadi keadaan kahar (*force majeure*) suatu keadaan yang terjadi di luar kehendak PARA PIHAK dalam kontrak, dan tidak dapat diperkirakan sebelumnya, sehingga kewajiban yang ditentukan dalam kontrak menjadi tidak dapat dipenuhi, maka PARA PIHAK sepakat tidak akan saling menuntut pelaksanaan pemenuhan ketentuan dalam Kontrak Penelitian ini.
- (2) Peristiwa atau kejadian yang dapat digolongkan keadaan kahar (*force majeure*) sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi bencana alam, wabah penyakit, kebakaran, perang, blokade, peledakan, sabotase, revolusi, pemberontakan, huru-hara, serta adanya tindakan pemerintah dalam bidang ekonomi dan moneter yang secara nyata berpengaruh terhadap pelaksanaan Kontrak Penelitian ini.
- (3) Apabila terjadi keadaan kahar (*force majeure*) sebagaimana dimaksud pada ayat (2), maka pihak yang mengalami wajib memberitahukan kepada pihak lainnya secara tertulis, selambat-lambatnya dalam waktu 7 (tujuh) hari kerja sejak terjadinya keadaan kahar (*force majeure*), disertai dengan bukti-bukti yang sah dari pihak yang berwajib, dan PARA PIHAK dengan itikad baik akan segera membicarakan penyelesaiannya.

PASAL 12 **AMANDEMEN KONTRAK**

Apabila terdapat hal lain yang belum diatur atau terjadi perubahan dalam Kontrak Penelitian ini, maka akan dilakukan amandemen Kontrak Penelitian.

PASAL 13 **SANKSI**

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Kontrak Penelitian telah berakhir, PIHAK KEDUA tidak melaksanakan kewajiban sebagaimana dimaksud dalam Pasal 6 ayat (2), maka PIHAK KEDUA dikenai sanksi administratif.
- (2) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 ayat (1) ditemukan adanya duplikasi dengan program penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidak jujuran/etikas kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka kegiatan program penelitian tersebut dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** dikenai sanksi administratif.
- (3) Sanksi administratif sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dan (2) dapat berupa penghentian pembayaran dan/atau Ketua Tim Pelaksana Penelitian tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu 2 (dua) tahun berturut-turut.

PASAL 14
PENUTUP

Kontrak Penelitian ini dibuat dan ditandatangani oleh **PARA PIHAK** dalam rangkap 2 (dua) asli bermeterai cukup yang biayanya dibebankan kepada **PIHAK KEDUA**, untuk tiap-tiap PIHAK dan memiliki kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA,

PIHAK KEDUA,



Prof. Dr. I Made Suwitra, SH., MH.
NIP. 196012311985031024



Dr. dr. Dewa Ayu Putri Sri Masyeni, Sp.PD-KPTI.
NIDN: 0827116503



Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Gedung BPPT II Lantai 19, Jl. MH. Thamrin No. 8 Jakarta Pusat
<https://simlitabmas.ristekdikti.go.id/>

PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN MULTI TAHUN

ID Proposal: d4018fbb-f39e-4115-8d08-5be6a3cd963a

laporan akhir Penelitian: tahun ke-1 dari 2 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

Identification of molecular and cellular pathways predicting susceptibility or resistance to severe dengue fever

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kesehatan	-		Penyakit Dalam

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Penugasan			SBK Riset Dasar	3	2

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama (Peran)	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
DEWA AYU PUTRI SRI MASYENI - Ketua Pengusul	Universitas Warmadewa	Profesi Dokter	- Membuat konsep proposal - Mengurus ijin penelitian - Mengorganisir dan	5978655	10

			melaksanakan penelitian pada hewan coba - Melakukan pemeriksaan klinis hewan coba - Menganalisis data, menulis dan submit manuskript untuk publikasi		
--	--	--	--	--	--

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
Mitra Pelaksana Penelitian	Diana Hansen

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)
1	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi	Submitted	Virology Journal
2	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi		Cytokine Journal

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)

		<i>lainnya)</i>	
2	Artikel pada Conference/ Seminar Internasional di Pengeindeks Bereputasi		All about dengue meeting
1	Artikel pada Conference/ Seminar Internasional di Pengeindeks Bereputasi		ASM meeting

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Total RAB 2 Tahun Rp. 773,360,000

Tahun 1 Total Rp. 259,200,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,400,000	2,400,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	188,000,000	188,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	-	OH	3	800,000	2,400,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	6	250,000	1,500,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	6	300,000	1,800,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	6	200,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	2	3,000,000	6,000,000
Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	6	500,000	3,000,000
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	240	25,000	6,000,000

Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	1	4,000,000	4,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	0	0	0
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	5	500,000	2,500,000
Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	0	0	0
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	1	1,500,000	1,500,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	18,800,000	18,800,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	1	7,000,000	7,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib,	Biaya konsumsi rapat	-	OH	5	200,000	1,000,000

dan Luaran Tambahan						
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	-	OH	5	100,000	500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	2	800,000	1,600,000

Tahun 2 Total Rp. 272,160,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,560,000	2,560,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	165,000,000	165,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	-	OH	60	25,000	1,500,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	4	300,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	4	1,000,000	4,000,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	4	3,000,000	12,000,000
Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	6	500,000	3,000,000
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	270	25,000	6,750,000
Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	2	5,000,000	10,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	4	200,000	800,000
Sewa Peralatan	Ruang penunjang	-	Unit	2	5,000,000	10,000,000

	penelitian					
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	4	500,000	2,000,000
Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	1	300,000	300,000
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	1	1,500,000	1,500,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	4	100,000	400,000
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	30,950,000	30,950,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	2	6,000,000	12,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	-	OH	5	100,000	500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib,	Uang harian rapat di	-	OH	3	100,000	300,000

dan Luaran Tambahan	dalam kantor					
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	3	800,000	2,400,000

Tahun 3 Total Rp. 242,000,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,400,000	2,400,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	185,000,000	185,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	-	OH	60	80,000	4,800,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	240	25,000	6,000,000
Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	0	0	0
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	2	500,000	1,000,000

Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	0	0	0
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	1	2,000,000	2,000,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	23,400,000	23,400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	-	OH	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	-	OH	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	2	800,000	1,600,000

6. KEMAJUAN PENELITIAN

A. RINGKASAN

Infeksi oleh virus dengue/ dengue virus (DENV) masih menjadi penyebab utama infeksi virus di daerah tropis dan subtropis. Jumlah kasus sebelumnya diperkirakan kurang lebih 50 juta infeksi, dengan 500.000 kasus dengue berat, yang menyebabkan 20.000 kematian per tahun. Angka ini diperkirakan sudah meningkat 3 kali lipat mencapai 390 juta infeksi per tahun, dengan 96 juta kasus simptomatis. Kasus dengue berat sering ditemukan pada penderita usia terlalu muda, usia lanjut atau penduduk dengan komorbiditas. Angka kematian diperkirakan dibawah 1%. Manifestasi klinis sangat bervariasi dari kasus tidak bergejala atau asimtomatik, gejala ringan sampai gejala berat mengancam nyawa. Sebagian kasus dapat berkembang menjadi demam berdarah berat yang juga dikenal sebagai demam berdarah dengue yang dapat jatuh sebagai dengue syok syndrome dengan angka kematian yang tinggi. Tata laksana infeksi virus dengue sampai saat ini hanya terapi simptomatis, belum ada terapi spesifik seperti antivirus. Oleh karena itu dapat mengidentifikasi kasus mana yang secara klinis berpotensi untuk menjadi kasus dengue berat, merupakan tantangan bagi klinisi di lapangan. Hanya belum ada cara yang valid untuk mengidentifikasi pasien mana yang akan berkembang menjadi demam berdarah berat, yang menimbulkan beban ekonomi yang sangat besar bagi sistem kesehatan. Menentukan mekanisme imunologis mana yang dapat menjadi pedoman untuk menentukan infeksi dengue berat adalah merupakan tantangan riset masa kini sehingga deteksi kasus dengue berat dapat dilakukan pada fase awal penyakit sehingga dapat diberikan tata laksana yang tepat untuk mencegah kematian akibat infeksi dengue berat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan mekanisme molekuler dan imunologi yang memprediksi kerentanan terhadap demam berdarah yang berat. Informasi ini sangat penting karena akan dapat mengidentifikasi biomarker spesifik untuk mengembangkan alat diagnostik untuk deteksi dini demam berdarah khususnya infeksi demam berdarah berat.

Penelitian ini terdiri dari 3 tahapan selama 3 tahun. Pada tahun pertama telah dilakukan penelitian mengenai gambaran molekuler virus dengue yang menginfeksi pasien di Bali. Penelitian tahun kedua akan diukur ekspresi microRNA dan ekspresi atau kadar sitokin proinflamasi yaitu tumour necrosis (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-10, IL-10). Penelitian tahun ketiga akan dilakukan karakterisasi subset antibodi yang terbentuk pada infeksi berat dan infeksi dengue ringan. luaran penelitian publikasi artikel hasil penelitian pada jurnal internasional bereputasi seperti PLoS One (ISSN 0022538X). Status Tingkat Kesiaapterapan Teknologi adalah 3 (TKT 3).

B. KATA KUNCI

Mekanisme;infeksi dengue berat

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Penelitian mengenai “identification of molecular pathway of severe dengue” dilaksanakan dalam 3 tahapan tahun penelitian. Ada banyak aspek yang diteliti dan berikut adalah salah satu hasil penelitian penugasan/ kemitraan dalam bentuk manuscript. Berikut adalah hasil penelitian peran microRNA dalam memicu produksi sitokin pada patogenesis infeksi dengue berat:

The microRNA mir-150 Expression and Interleukin 6 (IL-6) Gene Regulation in A549 Human Cell Line Infected with Dengue Virus Serotype 2 (DENV-2)

Sri Masyeni¹, Diana Hanzen²

¹Faculty of Medicine and Health Science, University of Warmadewa, Jl. Terompong
24, Denpasar, Bali, Indonesia.

²The Walter Hall Institute, Australia

*Corresponding author: masyeniputu@yahoo.com

Abstract

Background: Dengue disease poses significant public health problems in tropical and subtropical regions in the world. The vascular plasma leakage, one of the hallmarks of severe dengue, has been associated with the cascade of cytokines responses termed cytokines storm. Changes in expression level of microRNA (miRNA) in the serum or immune cells of dengue-infected patients have been related to the altered cytokine response.

Methods: Using an *in vitro* dengue human cell line model A549, we sought to determine the expression of miRNA and the corresponding cytokine gene regulation. Total RNA and miRNA were extracted from A549 cells model infected with dengue virus serotype 2 (DENV-2). The relative expression of miRNAs, Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3), and Interleukin 6 (IL-6) genes were quantified using SYBR-Green-based quantitative Real-Time PCR.

Results: The down-regulated expression of miR-150 in DENV-2 infected cells was observed relative to the uninfected control. The decrease was in parallel with the up-regulation of SOCS3 and the down-regulation of IL-6 genes during the progression of infection. Following the decrease of SOCS3 level, a significant increase in IL-6 gene expression was observed.

Conclusion: We report here the potential association of mir-150 in regulating IL-6 gene expression in DENV-2 infected human cell line *in vitro* and highlight the potential use of A549 cells in miRNA studies.

Keywords: dengue, A549, miRNA, SOCS3, IL-6, gene expression

Introduction

Dengue has been considered as the disease of the future with alarming epidemiological patterns for both human health and the global economy [1]. The prevalence of dengue virus (DENV) infection has been predicted to cause 390 million new cases arising each year and approximately 96 million dengue hemorrhagic fever (DHF) cases leading to hospitalization each year [2]. Four serotypes of DENV (DENV-1, -2, -3, -4) have spread rapidly within countries and across regions, causing epidemics and severe dengue disease, hyperendemicity of multiple dengue virus serotypes in tropical countries, and autochthonous transmission in Europe and the USA [3]. Among the serotypes, DENV-2 has been significantly associated with the severe form of dengue disease [4].

The theory of antibody-dependent enhancement (ADE) postulated the incomplete neutralization of heterotypic antibodies to the subsequent infecting DENV serotype that facilitate virus entry and replication in target immune cells and initiates an immune cascade that results in vascular leak and severe dengue disease [5]. The cytokine storm is one of the severe dengue responses where both the innate and the adaptive immune systems are activated and contribute to the cytokine production [6,7].

Discovered in 1993, microRNA (miRNA) has been recognized as a repressor of gene expression of target messenger RNA (mRNA), resulted in inhibition of translation [8]. The role of miRNA in the immune regulation of virus infections revealed the differential expression or abundance of host miRNA expressed following virus infection [9]. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins are inhibitors of cytokine signaling pathways and are key physiological regulators of both innate and adaptive immunity [10]. The relationship between differential expression of miRNA

and SOCS has been demonstrated in human mononuclear leukocytes of patients with severe dengue cases [11].

The human lung epithelial A549 cells has been used as an *in vitro* model of DENV infection and immune responses [12]. In this study, we sought the relationship between miRNA expression and regulation of cytokine gene expression, especially IL-6, in DENV-2 infected A549 cells.

Methods

Ethical considerations

Ethics approval for this study was granted by the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine and Health Sciences, Warmadewa University, Bali, Indonesia (Approval No: 485/Unwar/FKIK/KEPK/2022).

Cell line, virus strain, and in vitro infection

The A549 human cell line was obtained from ATCC and maintained as described elsewhere [12]. The DENV-2 challenge virus strain SMG-SE001 was isolated from a severe dengue patient from Semarang in 2012 [13]. The virus strain has been characterized genetically as a member of Cosmopolitan genotype of DENV-2. The A549 cells were seeded 2×10^5 cells/well of 24-well plate in $1 \times$ RPMI medium supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and antibiotic/antimycotic (all from Gibco-Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY) followed by overnight incubation at humidified 37°C incubator with 5% CO₂. Cells were then infected with DENV-2 using the multiplicity of infection (m.o.i) of 1 (theoretically one virus particle per cell) in $1 \times$ RPMI medium-2% FBS, performed in duplicate. Following the infection period of 1 hour at 37°C, 5% CO₂, the inoculum

was aspirated and replenished with 1 mL of fresh medium. Plates were then incubated for 6, 12, 24, 36, and 48 hours post-infection at 37°C, 5% CO₂. Supernatant was harvested and cells were lysed using RNA lysis buffer and directly stored at -80°C freezers until use.

RNA extraction and miRNA real-time RT-PCR

The miRNA and total RNA were simultaneously extracted from cell lysate using miRCURY RNA Isolation kit – Cell and Plant (Exiqon, Vedbaek, Denmark), as described in the manufacturer’s instructions. Total RNA quantity was measured using Qubit 3.0 fluorometer and Qubit RNA BR Assay Kit (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR). RNA samples were adjusted to a concentration of 5 ng/μL. The adjusted RNA samples were then used as templates in two-steps First Strand cDNA synthesis and Real-time amplification using miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR (Exiqon) as described in the manufacturer’s instructions, and using primer set as listed in Table. The small nuclear RNA (snRNA) U6 was used as internal reference genes in relative expression analysis using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ equation, compared to uninfected control for each time-point. The RT-PCR reaction was performed in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA).

Table. Primer set used in miRNA expression analysis using real-time RT-PCR.

No.	Primer set name	Target sequence (5’-3’)
1.	hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
2.	hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
3.	has-miR-150-5p	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG

Gene expression analysis

Changes in mRNA gene expression of SOCS3 and IL-6 cytokine genes were measured as relative gene expression compared to uninfected cells at the designated time points. The amount of 300 ng of mRNA was reverse-transcribed using GoScript Reverse Transcription System and oligo dT primer (Promega, Madison, WI). The resulting cDNA was then analyzed using quantitative real-time PCR using GoTaq qPCR Master Mix (Promega). The primers used were SOCS3-F: 5'-CCTGCGCCTCAAGACCTTC and SOCS3-R: 5'-GTCAGTGCCTCCAGTAGAA, and IL-6-F: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC and IL-6-R: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA. Analysis was performed using the equation of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of normalized Ct value to human β -actin.

Statistical analysis

The independent Student's t-test was used to calculate differences between means of two groups, using R statistical software.

Results

We performed miRNA and cytokine gene regulation analyses of human A549 cell line infected with DENV-2. The analysis of miRNA expression of infected cells revealed the different expression patterns among three miRNAs assayed. Increase in miRNA expression was observed for hsa-miR-150-5p (miR-150) at 24 hours continued with decrease at 36 hours post-infection (Figure 1). There was 3.84-fold increase in miR-150 expression at 24 hours and significantly decreased to 0.45-fold at 36 hours. There were no significant changes in the expression of miR-30e and let-7e throughout infection course.

The cytokine gene regulation analysis showed that the decrease of miR-150 expression at 36 hours post-infection was in parallel with the increase in SOCS3 gene expression (statistically significant difference, $p = 0.0083$), where there was 10.65-fold increase observed (Figure 2). At this 36 hours' time point, the IL-6 gene expression was observed at 8.38-fold increase. However, parallel to the slight increase of miR-150 expression and the decrease of SOCS3 gene expression at 48 hours post-infection, the significant increase of IL-6 gene expression (up to 27.19-fold) was detected (Figure 1).

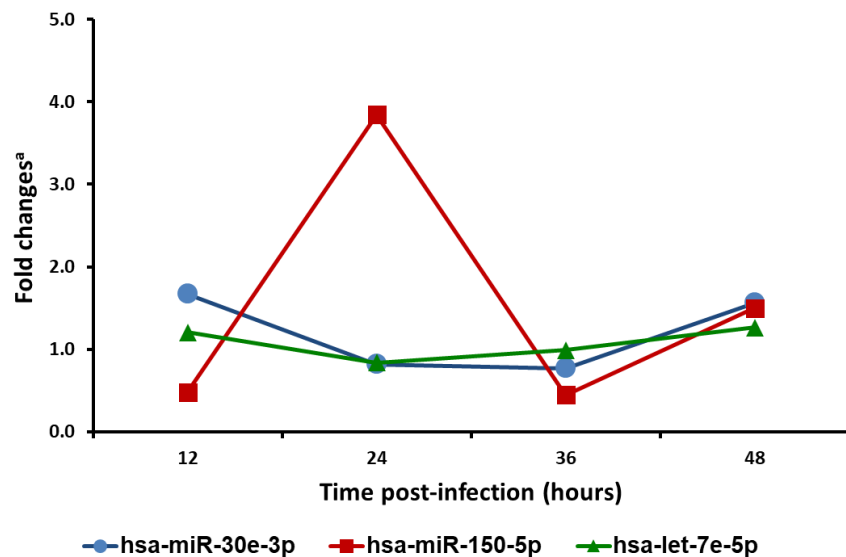


Figure 1. The relative expression of three miRNA in A549 cells infected by DENV-2. Data were analyzed from experiments performed in duplicate. ^aRelative fold changes compared to uninfected cells at time points.

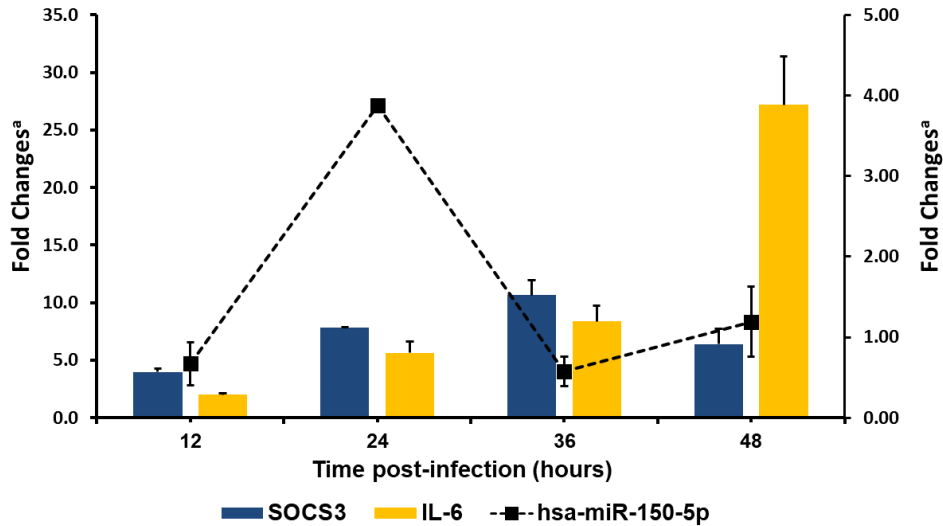


Figure 2. Relative expression of miRNA has-miR-150-5p and the expression of the corresponding SOCS3 and IL-6 genes. Data were analyzed from experiments performed in duplicate. *Relative fold changes compared to uninfected cells at time points

Discussion

The relationship between miRNA and the immune regulation of virus infections has been recognized and the differential expression or abundance of host miRNA expressed following virus infection was observed [9]. Changes in miRNA profiles was observed in serum [14] and blood [15] of dengue patients and in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donor infected with DENV [16]. However, the patterns among the miRNA profiles and their association with the disease were still unclear [17] and variable results observed depending on the source and form of samples analyzed and the miRNA target used.

The use of human lung epithelial A549 cells has been demonstrated to be suitable for DENV studies and proposed as an *in vitro* model of DENV infection and immune responses [12]. The use of cell line offers several advantages, such as less variability, cost effective, easy to use, and provides a consistent sample and reproducible results, compared to primary cells [18]. In this report, we assessed the

use of A549 cells to study the association between miRNA and cytokine gene regulation.

Systematic review and meta-analysis of factors associated with severe dengue disease revealed that DENV-2 was significantly associated with dengue shock syndrome (DSS) [4]. The DENV-2 infected A549 cells generated dynamic miRNA expression profiles through time. Variability between different miRNA targets was also observed (Figure (a)). The increase of miR-150 expression was apparent at 24 hours post-infection, consistent with result from other study [11], but not in the other two miRNA targets studied. The result was in contrast to other studies that observed the increase of miR-30e in human monocyte cell line U937 [19] and let-7e in PBMCs [16].

Single miRNAs can have substantial effects in regulating immune responses and approximately 50 miRNAs are predicted to target the genes of the JAK–STAT pathway including the negative regulators SOCS and PIAS [20]. SOCS-3 is a negative regulator of the IL-6 and IFN- γ -induced signaling pathways. The suppression of SOCS3 has been shown to lead to an increase in inflammatory response in the skin [21]. We observed the association between miR-150 and SOCS3 gene expression and the resulting effect on IL-6 cytokine production. The decrease in miR-150 expression at 36 hours post-infection was in parallel with the increase in SOCS3 gene expression. The relatively stable expression of miR-150 at 48 hours post-infection lead to the decrease in SOCS3 gene expression and striking increased level of IL-6 cytokine gene expression (Figure B). Our results supported the proposed mechanism of miRNA that act as rheostats, modulating the expression of target genes to an optimal level rather than an on–off switch [20]. These findings may need to be complemented with future studies of signaling pathway and the use of miRNA mimic.

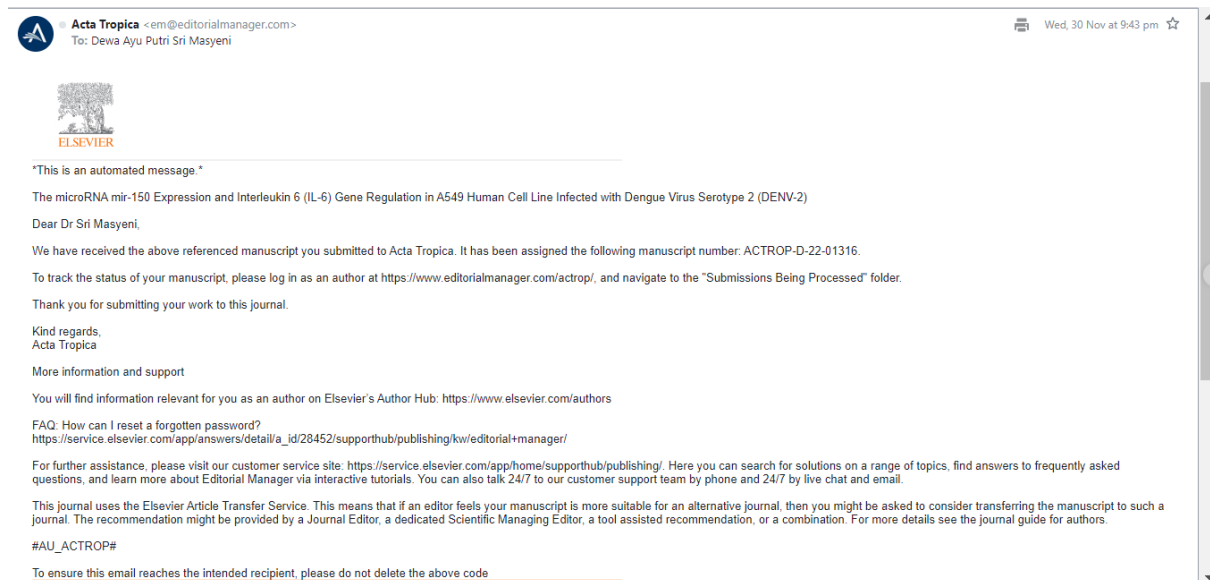
Conclusion

We highlighted the role of miRNA miR-150 in the SOCS3-related IL-6 cytokine gene expression regulation. We also demonstrated the use of A549 human cell line as an *in vitro* model in miRNA analysis of DENV induced immune responses.

Funding: This research was funded by The Ministry of Research and Higher Education of the Republic of Indonesia and University of Warmadewa to S.M.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

D. STATUS LUARAN: Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta unggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui BIMA.



E. PERAN MITRA: Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUP). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui BIMA.

Mitra membantu peningkatan kapasitas peneliti dalam mengerjakan isolasi PBMC untuk riset serta memberikan bantuan berupa tabung nitrogen, serta membantu / supervisi dalam penulisan manuskrip.



The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research
ABN 12 004 251 423
1G Royal Parade Parkville Victoria 3052 Australia
T +61 3 9345 2555 F +61 3 9347 0852
www.wehi.edu.au

13 September 2022

Dear sir or madam,

I am writing to confirm that the Walter and Eliza Hall Institute in Melbourne, Australia has successfully attracted funding through philanthropic donations to support the research Dr Sri Masyeni and her team at the Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Warmadewa, Bali, Indonesia, for the discovery of biomarker of severe dengue fever, research that she is conducting in collaboration with Dr Tedjo Sasmono and my team in Melbourne. The funding covers the cost of a new centrifuge and a liquid nitrogen tank, to support the collection of blood mononuclear cells from patients infected with dengue virus that are recruited in our study. My laboratory remains strongly connected to this research and I will provide my expertise in all areas of the research project, including study design, cell preparation and storage, data analysis and interpretation, as well as preparation of manuscripts arising from the results of this research for publication in competitive virology journals.

Yours

sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'D Hansen', with a large, sweeping flourish underneath.

Associate Professor Diana Hansen
Laboratory Head
Infectious Diseases and Immune Defense Division
The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research







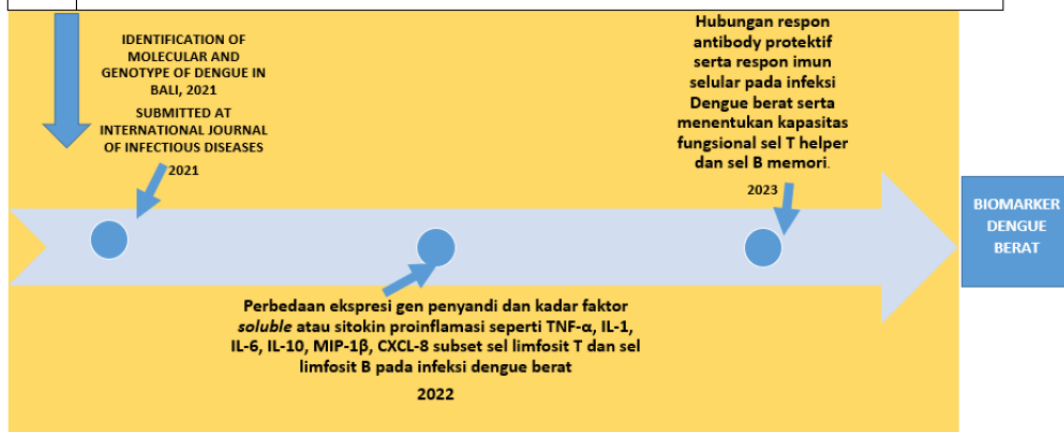
F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Kendala yang dihadapi kesulitan dalam pengumpulan sampel pasien untuk isolasi PBMC karena kasus infeksi dengue berkurang karena pandemi COVID-19, sehingga sebagian rencana riset masih terhambat dan akan dilanjutkan tahun 2023.

G. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA: Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Roadmap penelitian

Tahun	Judul Publikasi
2017	Megawati D, Masyeni S, Yohan B et al. Dengue in Bali: Clinical characteristics and genetic diversity of circulating dengue viruses. <i>PLoS Neg Trop Dis</i> 2017;11;5:e0
2018	Masyeni, S, Yohan B, Somia A, et al. Dengue infection among international travellers in Bali. <i>Journal of Travel Medicine</i> 2018;25:1 tav61
2019	Masyeni S, Hadi U, Kuntaman K. Expression of four cytokine/chemokine genes in peripheral blood mononuclear cells infected with dengue virus. <i>Indonesian Journal of Tropical and Infectious Diseases</i> 2019;7(4):75-78
2019	Masyeni S, Yohan B, Sasmono RT. Concurrent infection of dengue virus serotype in Bali. <i>BMC Research Note</i> 2019;12(1):1-6
2021	Masyeni, Kuntaman, Aryati, et al. Correlation of miR-150, hsa-let-7e, and miR-146a and gene expression of IL-6, IL-8, IP-10, and MIP-1 β during dengue virus infection. <i>Narra J</i> 2021;1(1):



Rencana publikasi bagian hasil riset yang lain juga masih dipersiapkan dan akan dilaksanakan tahun 2023 awal. kelanjutan penelitian untuk dapat menemukan biomarker infeksi dengue berat direncanakan tahun 2023.

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

References

1. Guzman, M. G.; Gubler, D. J.; Izquierdo, A.; Martinez, E.; Halstead, S. B. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2, 16055, doi:10.1038/nrdp.2016.55.

2. Bhatt, S.; Gething, P. W.; Brady, O. J.; Messina, J. P.; Farlow, A. W.; Moyes, C. L.; Drake, J. M.; Brownstein, J. S.; Hoen, A. G.; Sankoh, O.; Myers, M. F.; George, D. B.; Jaenisch, T.; Wint, G. R. W.; Simmons, C. P.; Scott, T. W.; Farrar, J. J.; Hay, S. I. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507, doi:10.1038/nature12060.
3. Guzman, M. G.; Harris, E. Dengue. *Lancet* **2015**, *385*, 453–465, doi:10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
4. Huy, N. T.; Van Giang, T.; Thuy, D. H. D.; Kikuchi, M.; Hien, T. T.; Zamora, J.; Hirayama, K. Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7*, e2412, doi:10.1371/journal.pntd.0002412.
5. Katzelnick, L. C.; Gresh, L.; Halloran, M. E.; Mercado, J. C.; Kuan, G.; Gordon, A.; Balmaseda, A.; Harris, E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* **2017**, doi:10.1126/science.aan6836.
6. John, D. V.; Lin, Y.-S.; Perng, G. C. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J. Biomed. Sci.* **2015**, *22*, 83, doi:10.1186/s12929-015-0191-6.
7. Srikiatkachorn, A.; Mathew, A.; Rothman, A. L. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol* **2017**, *39*, 563–574, doi:10.1007/s00281-017-0625-1.
8. Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 597–610, doi:10.1038/nrg2843.
9. Asgari, S. Role of microRNAs in arbovirus/vector interactions. *Viruses* **2014**, *6*, 3514–3534, doi:10.3390/v6093514.
10. Yoshimura, A.; Naka, T.; Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 454–465, doi:10.1038/nri2093.
11. Chen, R.-F.; Yang, K. D.; Lee, I.-K.; Liu, J.-W.; Huang, C.-H.; Lin, C.-Y.; Chen, Y.-H.; Chen, C.-L.; Wang, L. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic fever. *J. Infect.* **2014**, *69*, 366–374, doi:10.1016/j.jinf.2014.05.013.
12. Yohan, B.; Kendarsari, R. I.; Mutia, K.; Bowolaksono, A.; Harahap, A. R.; Sasmono, R. T. Growth characteristics and cytokine/chemokine induction profiles of dengue viruses in various cell lines. *Acta Virol.* **2014**, *58*, 20–27.
13. Fahri, S.; Yohan, B.; Trimarsanto, H.; Sayono, S.; Hadisaputro, S.; Dharmana, E.; Syafruddin, D.; Sasmono, R. T. Molecular Surveillance of Dengue in Semarang, Indonesia Revealed the Circulation of an Old Genotype of Dengue Virus Serotype-1. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7*, e2354, doi:10.1371/journal.pntd.0002354.
14. Ouyang, X.; Jiang, X.; Gu, D.; Zhang, Y.; Kong, S. K.; Jiang, C.; Xie, W. Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *Int J Med Sci* **2016**, *13*, 195–205, doi:10.7150/ijms.13996.
15. Tambyah, P. A.; Ching, C. S.; Sepramaniam, S.; Ali, J. M.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. microRNA expression in blood of dengue patients. *Ann. Clin. Biochem.* **2016**, *53*, 466–476, doi:10.1177/0004563215604001.
16. Qi, Y.; Li, Y.; Zhang, L.; Huang, J. microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cells. *Mol Med Rep* **2013**, *7*, 791–798, doi:10.3892/mmr.2013.1288.
17. Lu, M.; Zhang, Q.; Deng, M.; Miao, J.; Guo, Y.; Gao, W.; Cui, Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3420, doi:10.1371/journal.pone.0003420.
18. Kaur, G.; Dufour, J. M. Cell lines. *Spermatogenesis* **2012**, *2*, 1–5, doi:10.4161/spmg.19885.
19. Zhu, X.; He, Z.; Hu, Y.; Wen, W.; Lin, C.; Yu, J.; Pan, J.; Li, R.; Deng, H.; Liao, S.; Yuan, J.; Wu, J.; Li, J.; Li, M. MicroRNA-30e* suppresses dengue virus replication by

promoting NF- κ B-dependent IFN production. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8*, e3088, doi:10.1371/journal.pntd.0003088.

20. Asirvatham, A. J.; Magner, W. J.; Tomasi, T. B. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* **2009**, *45*, 58–69, doi:10.1016/j.cyto.2008.11.010.

21. Sonkoly, E.; Wei, T.; Janson, P. C. J.; Sääf, A.; Lundeberg, L.; Tengvall-Linder, M.; Norstedt, G.; Alenius, H.; Homey, B.; Scheynius, A.; Ståhle, M.; Pivarcsi, A. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS ONE* **2007**, *2*, e610, doi:10.1371/journal.pone.0000610.



**Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian Baru
Skema Penelitian Dasar Kompetitif Nasional
TAHUN ANGGARAN 2022
Nomor : 731/UNWAR/LEMLIT/PD-13/2022**

Pada hari ini **Kamis** tanggal **Enam Belas** bulan **Juni** tahun **Dua Ribu Dua Puluh Dua**, kami yang bertanda tangan dibawah ini :

1. **Prof. Dr. I Made Suwitra, SH., MH.** : Kepala Lembaga Penelitian Universitas Warmadewa selanjutnya di sebut **PIHAK PERTAMA**
NIP: 196012311985031024
2. **Dr. dr. Dewa Ayu Putri Sri Masyeni, Sp.PD-KPTL.** : Ketua Peneliti selanjutnya disebut **PIHAK KEDUA**
NIDN: 0827116503

PIHAK PERTAMA dan **PIHAK KEDUA** secara bersama-sama bersepakat mengikatkan diri dalam suatu Kontrak Penelitian, dengan ketentuan dan syarat sebagai berikut:

**PASAL 1
DASAR HUKUM**

1. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 20 Tahun 2003, tentang Sistem Pendidikan Nasional;
2. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2012, tentang Pendidikan Tinggi;
3. Peraturan Menteri Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia Nomor 38 Tahun 2019 tentang Prioritas Riset Nasional Tahun 2020-2024;
4. Peraturan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia Nomor 3 Tahun 2020, tentang Standar Nasional Pendidikan Tinggi;
5. Surat Plt. Direktur Riset, Teknologi, dan Pengabdian kepada Masyarakat Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi Nomor: 0267/E5/AK.04/2022 tanggal 28 April 2022 perihal Pengumuman Penerima Pendanaan Penelitian Program Kompetitif Nasional dan Penugasan di Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2022 Tahap Pertama.
6. Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian Baru Penelitian Dasar Kompetitif Nasional Tahun Anggaran 2022 antara Lembaga Layanan Pendidikan Tinggi Wilayah VIII dengan Universitas Warmadewa Nomor: 160/E5/PG.02.00.PT/2022 dan Nomor: 0967/LL8/Ak.04/2022;

**PASAL 2
RUANG LINGKUP**

- (1) Ruang lingkup Kontrak Penelitian ini meliputi pelaksanaan penelitian tahun anggaran 2022.

- (2) Penelitian sebagaimana dimaksud pada ayat (1) beserta nama pelaksana penelitian, skema, luaran tambahan, jangka waktu penelitian, dan besarnya biaya penelitian sebagaimana tercantum dalam Kontrak Penelitian ini.

PASAL 3 SUMBER DANA

- (1) **PIHAK PERTAMA** memberikan pendanaan Pelaksanaan Program Penelitian dengan judul **Deteksi aktifitas Anti-inflamasi, Analgetik serta Antiviral dari Spons Laut *Aplysina Caissara*, *Xestospongia sp.* dan *Agelas sp.* pada Chikungunya-induced arthritis** yang bersumber pada DIPA (Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran) Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi Kementerian Pendidikan, kebudayaan, Riset, dan Teknologi Tahun Anggaran 2022, Nomor SP DIPA-023.17.1.690523/2022 revisi ke-02 tanggal 22 April 2022..
- (2) **PIHAK KEDUA** bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan, administrasi dan keuangan atas pekerjaan sebagai dimaksud pada ayat (1) dan berkewajiban menyimpan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya.
- (3) **PIHAK PERTAMA** memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA**, dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk mengkoordinir dan sebagai penanggungjawab Pelaksanaan Program Penelitian yang dilakukan oleh para dosen sebagai Tim Peneliti pada skema penelitian yang diperoleh.

PASAL 4 NILAI DAN TAHAPAN PEMBAYARAN

- (1) Pendanaan Penelitian dibayarkan oleh **PIHAK PERTAMA** kepada **PIHAK KEDUA** secara bertahap melalui mekanisme transfer, dengan ketentuan sebagai berikut:
- a. Pendanaan Penelitian keseluruhan sebesar Rp. 220,000,000,- (*Dua Ratus Dua Puluh Juta Rupiah*)
 - b. Pembayaran tahap pertama sebesar 70% (Tujuh puluh persen) dari jumlah keseluruhan bantuan dana penelitian yaitu Rp. 220,000,000,- x 70% = Rp. 154,000,000,- (*Seratus Lima Puluh Empat Juta Rupiah*) setelah **PIHAK KEDUA** menandatangani Kontrak Pelaksanaan Program Penelitian;
 - c. Pembayaran tahap pertama sebagaimana dimaksud pada huruf a, akan dibayarkan dengan ketentuan apabila revisi proposal penelitian dan surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian telah diunggah ke laman yang ditentukan;
 - d. Pembayaran tahap kedua sebesar 30% (Tiga puluh persen) dari jumlah keseluruhan bantuan dana penelitian yaitu Rp. 220,000,000,- x 30% = Rp.66,000,000,- (*Enam Puluh Enam Juta Rupiah*), dibayarkan setelah pelaksana peneliti mengunggah Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) ke laman yang ditentukan paling lambat tanggal 16 Agustus 2022; dan
 - d. Apabila pembayaran tahap pertama sebagaimana dimaksud pada huruf a cair setelah tanggal 9 Agustus 2022, pelaksana penelitian mengunggah Surat Pernyataan

Tanggung Jawab Belanja (SPTB) ke laman yang ditentukan paling lambat 2 (dua) minggu setelah dana cair.

- (2) **PIHAK KEDUA** harus menyampaikan surat pernyataan telah menyelesaikan seluruh pekerjaan yang dibuktikan dengan pengunggahan pada laman yang ditentukan paling lambat tanggal 20 November 2022, dengan melampirkan dokumen sebagai berikut:
 - a. Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB); dan
 - b. laporan kemajuan pelaksanaan pekerjaan.
- (3) Khusus untuk dana pembayaran 30% yang baru cair setelah tanggal 13 November 2022, **PIHAK KEDUA** mengunggah dokumen sebagaimana dimaksud pada ayat (2) paling lambat 2 (dua) minggu setelah dana dicairkan..

PASAL 5

JANGKA WAKTU PENYELESAIAN

Jangka waktu pelaksanaan penelitian dimulai sejak tanggal 10 Mei hingga 20 November 2022

PASAL 6

HAK DAN KEWAJIBAN

- (1) **PIHAK PERTAMA** mempunyai kewajiban:
 - a. Memberikan pendanaan penelitian kepada **PIHAK KEDUA**;
 - b. Melakukan pemantauan dan evaluasi;
- (2) **PIHAK KEDUA** mempunyai kewajiban:
 - a. Mengoordinir dan bertanggungjawab penuh atas pelaksanaan Penelitian, administrasi dan keuangan;
 - b. Menyimpan semua bukti-bukti pengeluaran serta dokumen pelaksanaan lainnya;
 - c. Mengunggah dokumen revisi proposal penelitian;
 - d. Mengunggah surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian;
 - e. Mengunggah catatan harian pelaksanaan penelitian;
 - f. Mengunggah laporan kemajuan pelaksanaan penelitian;
 - g. Mengunggah Surat Pernyataan Tanggung Jawab Belanja (SPTB) atas dana penelitian yang telah ditetapkan;
 - h. Mengunggah laporan akhir penelitian (dilaporkan padan tahun terakhir pelaksanaan penelitian); dan
 - i. Mengunggah luaran penelitian.
 - j. Mengembalikan sisa dana ke Kas Negara setelah berkoordinasi dengan **PIHAK PERTAMA**, apabila dalam pelaksanaan penelitian terdapat sisa dana.
- (3) **PIHAK PERTAMA** mempunyai hak menerima dokumen hasil unggahan di lama yang ditentukan sebagai berikut:
 - a. revisi proposal penelitian;
 - b. surat pernyataan kesanggupan pelaksanaan penelitian;
 - c. catatan harian pelaksanaan penelitian;
 - d. laporan kemajuan pelaksanaan penelitian;

- e. Surat Pernyataan Tanggungjawab Belanja (SPTB) atas dana penelitian yang
- f. telah ditetapkan;
- g. laporan akhir penelitian; dan
- h. luaran penelitian.

(4) **PIHAK KEDUA** mempunyai hak mendapatkan dana penelitian dari **PIHAK PERTAMA**.

PASAL 7 PENGANTIAN KEANGGOTAAN

- (1) Perubahan terhadap susunan tim pelaksana penelitian dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan dari Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi.
- (2) Apabila ketua tim pelaksana penelitian tidak dapat menyelesaikan penelitian atau mengundurkan diri, maka **PIHAK KEDUA** wajib menunjuk pengganti ketua tim pelaksana penelitian yang merupakan salah satu anggota tim setelah mendapat persetujuan dari Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi.
- (3) Dalam hal tidak terdapat pengganti ketua tim pelaksana penelitian sesuai dengan syarat dan ketentuan dalam panduan penelitian, maka penelitian dibatalkan dan dana dikembalikan ke Kas Negara.

PASAL 8 PAJAK

Ketentuan pengenaan pajak pertambahan nilai dan/atau pajak penghasilan dalam rangka pelaksanaan kegiatan penelitian ini wajib dilaksanakan oleh **PIHAK KEDUA** sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan di bidang perpajakan.

PASAL 9 KEKAYAAN INTELEKTUAL

- (1) Hak Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari pelaksanaan penelitian diatur dan dikelola sesuai dengan ketentuan peraturan dan perundang-undangan.
- (2) Setiap publikasi, makalah, dan/atau ekspos dalam bentuk apapun yang berkaitan dengan hasil penelitian wajib mencantumkan pemberi dana, paling sedikit mencantumkan nama Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi.

PASAL 10 INTEGRITAS AKADEMIK

- (1) Pelaksana penelitian wajib menjunjung tinggi integritas akademik yaitu komitmen dalam bentuk perbuatan yang berdasarkan pada nilai kejujuran, kredibilitas, kewajaran, kehormatan, dan tanggung jawab dalam kegiatan penelitian yang dilaksanakan.

- (2) Penelitian dilakukan sesuai dengan kerangka etika, hukum, dan profesionalitas serta kewajiban sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan.
- (3) Penelitian dilakukan dengan menjunjung tinggi standar ketelitian dan integritas tertinggi dalam semua aspek penelitian.

PASAL 11 **KEADAAN KAHAR**

- (1) Apabila terjadi keadaan kahar (*force majeure*) suatu keadaan yang terjadi di luar kehendak PARA PIHAK dalam kontrak, dan tidak dapat diperkirakan sebelumnya, sehingga kewajiban yang ditentukan dalam kontrak menjadi tidak dapat dipenuhi, maka PARA PIHAK sepakat tidak akan saling menuntut pelaksanaan pemenuhan ketentuan dalam Kontrak Penelitian ini.
- (2) Peristiwa atau kejadian yang dapat digolongkan keadaan kahar (*force majeure*) sebagaimana dimaksud pada ayat (1) meliputi bencana alam, wabah penyakit, kebakaran, perang, blokade, peledakan, sabotase, revolusi, pemberontakan, huru-hara, serta adanya tindakan pemerintah dalam bidang ekonomi dan moneter yang secara nyata berpengaruh terhadap pelaksanaan Kontrak Penelitian ini.
- (3) Apabila terjadi keadaan kahar (*force majeure*) sebagaimana dimaksud pada ayat (2), maka pihak yang mengalami wajib memberitahukan kepada pihak lainnya secara tertulis, selambat-lambatnya dalam waktu 7 (tujuh) hari kerja sejak terjadinya keadaan kahar (*force majeure*), disertai dengan bukti-bukti yang sah dari pihak yang berwajib, dan PARA PIHAK dengan itikad baik akan segera membicarakan penyelesaiannya.

PASAL 12 **AMANDEMEN KONTRAK**

Apabila terdapat hal lain yang belum diatur atau terjadi perubahan dalam Kontrak Penelitian ini, maka akan dilakukan amandemen Kontrak Penelitian.

PASAL 13 **SANKSI**

- (1) Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan untuk melaksanakan Kontrak Penelitian telah berakhir, PIHAK KEDUA tidak melaksanakan kewajiban sebagaimana dimaksud dalam Pasal 6 ayat (2), maka PIHAK KEDUA dikenai sanksi administratif.
- (2) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul penelitian sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 ayat (1) ditemukan adanya duplikasi dengan program penelitian lain dan/atau ditemukan adanya ketidak jujuran/etiket kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka kegiatan program penelitian tersebut dinyatakan batal dan **PIHAK KEDUA** dikenai sanksi administratif.
- (3) Sanksi administratif sebagaimana dimaksud pada ayat (1) dan (2) dapat berupa penghentian pembayaran dan/atau Ketua Tim Pelaksana Penelitian tidak dapat mengajukan proposal penelitian dalam kurun waktu 2 (dua) tahun berturut-turut.

PASAL 14
PENUTUP

Kontrak Penelitian ini dibuat dan ditandatangani oleh **PARA PIHAK** dalam rangkap 2 (dua) asli bermeterai cukup yang biayanya dibebankan kepada **PIHAK KEDUA**, untuk tiap-tiap PIHAK dan memiliki kekuatan hukum yang sama.

PIHAK PERTAMA,



Prof. Dr. Made Suwitra, SH., MH.
NIP. 196012311985031024

PIHAK KEDUA,



Dr. dr. Dewa Ayu Putri Sri Masyeni, Sp.PD-KPTI.
NIDN: 0827116503



Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Gedung BPPT II Lantai 19, Jl. MH. Thamrin No. 8 Jakarta Pusat
<https://simlitabmas.ristekdikti.go.id/>

PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN MULTI TAHUN

ID Proposal: 5c98dfd4-1c07-40a0-8796-264725dad932
laporan akhir Penelitian: tahun ke-1 dari 3 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

Deteksi aktifitas anti-inflamasi, analgetik serta antiviral dari Spons laut *Aplysina Caissara*, *Xestospongia* sp. dan *Agelas* sp. pada Chikungunya-induced arthritis

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Perguruan Tinggi	Fokus RIRN / Bidang Unggulan	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
	Kesehatan	-		Ilmu Kedokteran Dasar & Biomedis

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional			SBK Riset Dasar	3	3

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama (Peran)	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
ANAK AGUNG GEDE INDRANINGRAT - Anggota Pengusul	Universitas Warmadewa	Kedokteran	- Memesan, menyimpan dan administrasi reagen - Mengatur dan	6707079	3

			mengawasi pengambilan sampel spon - Melaksanakan ekstraksi spons laut - Analisis data - Menyiapkan pembuatan laporan akhir - Pembuatan manuskrip untuk publikasi		
DEWA AYU PUTRI SRI MASYENI - Ketua Pengusul	Universitas Warmadewa	Profesi Dokter	- Membuat konsep proposal - Mengurus ijin penelitian - Mengorganisir dan melaksanakan penelitian pada hewan coba - Melakukan pemeriksaan klinis hewan coba - Menganalisis data, menulis dan submit manuskript untuk publikasi	5978655	10

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)
1	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di	Submitted	BMC Pharmacology and Toxicology

	Pengindeks Bereputasi		
2	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi		Current Clinical Pharmacology
3	Artikel di Jurnal Internasional Terindeks di Pengindeks Bereputasi		Fundamental and Clinical Pharmacology

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)
3	Artikel pada Conference/ Seminar Internasional di Pengindeks Bereputasi		International Conference on Viral Infection and Influenza
2	Artikel pada Conference/ Seminar Internasional di Pengindeks Bereputasi		International Conference on Immunology and Infection
1	Artikel pada Conference/ Seminar Internasional di Pengindeks Bereputasi		International Conference on Tropical Medicine and Infectious Diseases

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Total RAB 3 Tahun Rp. 754,000,000

Tahun 1 Total Rp. 220,000,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,400,000	2,400,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	171,000,000	171,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu	-	OH	3	400,000	1,200,000

	Lapangan					
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	6	250,000	1,500,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	6	300,000	1,800,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	6	200,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	6	500,000	3,000,000
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	240	25,000	6,000,000
Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	1	4,000,000	4,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	0	0	0
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	5	500,000	2,500,000
Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	0	0	0
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	0	0	0
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0

Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	8,400,000	8,400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	1	7,000,000	7,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	0	0	0

Tahun 2 Total Rp. 292,000,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,400,000	2,400,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	185,000,000	185,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	-	OH	60	25,000	1,500,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	4	300,000	1,200,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di	-	OH	0	0	0

	luar kantor					
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	4	1,000,000	4,000,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	4	3,000,000	12,000,000
Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	6	500,000	3,000,000
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	270	25,000	6,750,000
Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	2	5,000,000	10,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	4	200,000	800,000
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	-	Unit	2	5,000,000	10,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	4	500,000	2,000,000
Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	1	300,000	300,000
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	1	1,500,000	1,500,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	4	100,000	400,000
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib,	Luaran KI (paten, hak	-	Paket	0	0	0

dan Luaran Tambahan	cipta dll)					
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	30,950,000	30,950,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	2	6,000,000	12,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	-	OH	5	100,000	500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	-	OH	3	100,000	300,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	3	800,000	2,400,000

Tahun 3 Total Rp. 242,000,000

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Bahan	ATK	-	Paket	1	2,400,000	2,400,000
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	-	Unit	1	185,000,000	185,000,000
Bahan	Barang Persediaan	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	-	OH	60	80,000	4,800,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Pengumpulan Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0

Pengumpulan Data	Transport	-	OK (kali)	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Petugas Survei	-	OH/OR	0	0	0
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	-	Paket	0	0	0
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	-	OJ	240	25,000	6,000,000
Sewa Peralatan	Kebun Percobaan	-	Unit	0	0	0
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	-	OK (kali)	0	0	0
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	-	Unit	1	5,000,000	5,000,000
Sewa Peralatan	Obyek penelitian	-	Unit	0	0	0
Analisis Data	Biaya analisis sampel	-	Unit	2	500,000	1,000,000
Analisis Data	Honorarium narasumber	-	OJ	0	0	0
Analisis Data	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	0	0	0
Analisis Data	HR Pengolah Data	-	P (penelitian)	1	2,000,000	2,000,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Penginapan	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Transport Lokal	-	OK (kali)	0	0	0
Analisis Data	Uang Harian	-	OH	0	0	0
Analisis Data	Tiket	-	OK (kali)	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Luaran Iptek lainnya (purwa rupa, TTG dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	-	Paket	1	23,400,000	23,400,000
Pelaporan, Luaran Wajib,	Biaya Publikasi artikel di	-	Paket	0	0	0

dan Luaran Tambahan	Jurnal Nasional					
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar internasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	-	Paket	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	-	OH	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di luar kantor	-	OH	0	0	0
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	-	OH	4	100,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/ Administrasi Peneliti	-	OB	2	800,000	1,600,000

6. KEMAJUAN PENELITIAN

A. RINGKASAN

Rasa nyeri serta inflamasi/peradangan pada beberapa penyakit seperti Arthritis baik akibat infeksi maupun non-infeksi sangat mengganggu kualitas kehidupan manusia. Seperti pada arthritis paska infeksi Chikungunya yang terjadi pada kira-kira 4,1-78,6% pasien dan dapat berlangsung selama lebih dari 3 bulan. Chikungunya adalah infeksi virus yang disebabkan oleh virus Chikungunya (CHIKV) yang tergolong dalam Alphavirus dengan salah satu manifestasi klinis yaitu arthralgia yang ditandai dengan inflamasi sendi berupa edema, nyeri, kemerahan serta demam yang cukup menyakitkan. Kasus post-Chikungunya-chronic arthritis bahkan dapat menetap selama berhari-hari bahkan berbulan-bulan dan menimbulkan morbiditas bagi umat manusia. Saat ini sedang terjadi lonjakan kasus infeksi CHIKV di Bali sehingga dikhawatirkan akan banyak muncul kasus arthritis paska infeksi CHIKV. Saat ini salah satu pengobatan arthritis terkait infeksi CHIKV adalah analgetik dan anti-inflamasi golongan klorokuin yang dikenal memiliki efek-samping khususnya gangguan pada penglihatan.

Spons laut adalah sumber senyawa di laut yang kaya produk alami bioaktif dengan beberapa sifat farmakologis yang berguna bagi dunia kesehatan. Selain itu spons laut juga disebutkan memiliki aktifitas seperti menghilangkan rasa nyeri serta bersifat anti-inflamasi. Spons laut memiliki substansi dengan mekanisme penghambatan pada fosfolipase A2, penghambatan efek interleukin-1 (IL-1) melalui sintesis prostaglandin, menghambat siklo- oksigenase serta menghambat sintesis superoksida radikal oleh netrofil. Spesies spons laut yang memiliki efek di atas diantaranya *Xestospongia* sp., *Aplysina* sp. dan *Agelas* sp.

Tujuan penelitian adalah untuk menemukan bahan obat baru sebagai analgetik dan anti-inflamasi yang berasal dari kekayaan hayati yang diambil dari kekayaan alam pulau Bali, yang dapat menggantikan

Klorokuin dalam menangani arthritis kronis paska infeksi CHIKV. Urgensi dari penelitian ini adalah karena kasus infeksi Chikungunya tampaknya telah menjadi endemik bagi-negara-negara tropis sehingga harus ditemukan bahan obat baru berupa anti-inflamasi non-steroid baru dengan efek yang kuat dalam mencegah arthritis kronis paska infeksi CHIK dengan efek samping yang lebih ringan.

Penelitian ini terdiri dari 3 tahapan selama 3 tahun. Pada tahun pertama akan dilakukan penelitian invitro mengenai efek analgetik serta anti-inflamasi spons laut *Aplysina Caissara*, *Xestospongia* sp. dan *Agelas* sp. pada mencit Swiss yang belum terinfeksi CHIKV. Nyeri diinduksi dengan injeksi asam asetat 0,6% dan inflamasi diinduksi dengan injeksi formalin 2,5%. Pada tahap ini juga akan dilakukan isolasi serta formulasi 3 jenis spons laut yang diambil dari perairan pulau Nusa Penida Bali pada kedalaman 10 meter di bawah permukaan laut untuk mendapatkan dilakukan secara invitro berupa uji eksperimental pada kelompok mencit yang diberikan perlakuan diinfeksi virus CHIK, kemudian akan diberikan ekstrak spons *Aplysina Caissara*, *Xestospongia* sp. dan *Agelas* sp.. Output yang diamati adalah menurunnya inflamasi pada sendi yang terdampak serta menurunnya sitokin pro-inflamasi tumour necrozing alfa (TNF- α), dan interleukin (IL)-6. Pada tahun ketiga akan diteliti efek antiviral *Aplysina Caissara*, *Xestospongia* sp. dan *Agelas* sp. pada mencit Swiss yang diinfeksi CHIKV dengan mengukur kadar viral load sebelum dan setelah perlakuan dengan RT-PCR.

Luaran penelitian adalah publikasi artikel hasil penelitian pada jurnal internasional bereputasi seperti BMC Pharmacology and Toxicology (ISSN 20506511), Current Clinical Pharmacology (ISSN 15748847) atau Fundamental and Clinical Pharmacology (ISSN 07673981). Status Tingkat Kesiapterapan Teknologi adalah 3 (TKT 3).

B. KATA KUNCI

Spons laut; analgetik; anti-inflamasi; infeksi virus; Chikungunya

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Penelitian ini telah dilaksanakan, mulai dari proses pengurusan ijin penelitian serta etikal klirens penelitian. Sesuai tahapan penelitian maka pada tahun pertama ini dilakukan identifikasi efek anti-inflamasi dan efek analgetik dari spons laut *Xestospongia muta*, *Agelas sp.* dan *Apylisina sp.* yang berhasil diekstraksi setelah dikumpulkan dari perairan laut dalam kepulauan Nusa Penida, Kabupaten Klungkung, Bali dan telah diekstraksi. Uji dimulai dengan menyiapkan tikus Winstar jantan albino ukuran 20-30 gram untuk masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yang diberikan uji parasetamol sebagai pembanding, uji kelompok spons *Xestospongia muta*, *Agelas sp.* dan *Apylisina sp.* Masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor tikus coba. Adapapun hasil penelitian dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut dalam bentuk manuskrip.

Abstract

Marine sponges are a ridiculous source of bioactive compounds with numerous pharmacological properties such as anti-inflammatory, anti-viral and antibacterial activities. The study objective to study the possible anti-inflammatory and antinociceptive effects of extracts attained from Xestospongia muta, Agelas sp. and Apylisina sp by using the writhing test and formalin-induced mouse paw edema model in mice. Entirely extracts were administered via oral pathway in the doses of 20 mg/kg. The potential anti-inflammatory activity of the extracts was assess with formalin-induced paw edema. The oral administration of Xestospongia muta, Agelas sp. and Apylisina sp extracts significantly reduced the formalin-induced paw edema in mice. The formalin test showed that the extracts from Xestospongia muta, Agelas sp. and Apylisina sp, in the tested doses, however, they were effective in the late phase. In the writhing test the pre-treatment with all sponges resulted in significant inhibition of the acetic acid-induced response, suggesting an antinociceptive effect. In conclusion, our study show that marine sponges can be an important source of anti-inflammatory and antinociceptive products that can be promising therapeutical principals. Furthermore, pharmacological and chemical studies have been developed not only to characterize the mechanism(s) that is/are responsible for the antinociceptive and anti-inflammatory action but also to identify the active principles of sponges.

Keywords: inflammation; nociception; marine sponges.

Introduction

The oceans and deep seas are a natural habitat to approximately 80% of the world's plant and animal species^{1,2}. The ocean is known to accommodate various living organisms, ranging from prokaryotic bacteria and marine invertebrates to multicellular complex organisms such as sharks and whales³. Despite the extreme conditions of the marine environment, the accessibility of new compounds from marine organisms from the various depths of the sea is now possible due to the advancement in technologies such as scuba diving equipment, remotely operated vehicles, closed-circuit computerized mixed gas rebreathers and manned submersibles^{4,5}. More than 5000 novel natural products have been extracted from marine organisms living in these extreme environments. Sponge-derived bioactive substances have possessed antibacterial, antiviral, antifungal, antimalarial, antihelminthic, immunosuppressive, muscle relaxants, anti-inflammatory and analgesic activities⁶. The search for new anti-inflammatory and analgesic agents from marine sources has yielded several promising therapeutic leads. Several sponges' species and isolated sponges derived compounds have been described by their effects. Some examples of sponge species with anti-inflammatory activity includes *Fasciospongia cavernosa*, *Petrosia contignata*, *Cacospongia linteiformis*⁷, *Luffariella variabilis*⁸, *Xestospongia testudinaria*⁹ and *Apylisina fistularis*¹⁰. Some of the reported mechanisms involved in the anti-inflammatory effects of marine sponges metabolites were the inhibition of phospholipase A2, inhibition of interleukin-1 mediated prostaglandin synthesis, inhibition of cyclooxygenase and reduction of

superoxide production by neutrophils^{11,12}. The analgesic potential of sponges is less explored and was already evidenced for *Aplysina caissara*.

Our study was conducted with three species of marine sponges, *Xestospongia muta*, *Agelas sp.* and *Aplysina sp.* Sponges of the genus *Agelas* are well-known for producing a variety of secondary metabolites, many of them are cytotoxic^{13,14}, antifungal¹⁵, antimicrobial¹⁶ and anti-inflammatory¹⁹. The genus *Xestospongia* produce some secondary metabolites that are cytotoxic, antimicrobial, antiprotozoal and antiviral. The genus *Xestospongia* produce some secondary metabolites that are cytotoxic, antimicrobial, antiprotozoal and antiviral. More recently, Medeiros et al.¹⁰ showed that an isolated compound from *Aplysina fistularis* present anti-inflammatory effects in macrophages cell line. The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of extracts from *Xestospongia muta*, *Agelas sp.* and *Aplysina sp.*, sponges that are abundant in Indonesia, by using the writhing test and formalin-induced mouse paw edema model. We have also compared the effects of the extracts between them and with paracetamol.

Material and methods

Ethical approval

The study was approved by the institutional review board of the Faculty of Medicine and Health Sciences Universitas Warmadewa (document number: 70/Unwar/FKIK/KEPK/VIII/2022).

Chemicals

Paracetamol, Formalin, acetic acid were kindly provided by the Animal Laboratory of. The extracts and drugs were dispersed or dissolved in saline solution (0.9% NaCl) for administration.

Sampel preparation

Samples of *Xestospongia muta*, *Agelas sp.* and *Aplysina sp.* Sponges of the genus *Agelas* were collected on Nusa Penida Island (Klungkung, Bali) in August 2022 at a depth of 10 m. They were washed in sea water and all visible surface debris was removed. Afterwards, they were rapidly washed in freshwater and immediately frozen. The frozen samples were also immersed in ethanol and maintained at -20°C. The specimens were identified by Laboratory of Genetica Science, Jakarta, Indonesia and kept in the minus 20 degree of freezer at Faculty of Medicine and Health Sciences Universitas Warmadewa Laboratory.

The extract was prepared according to the following procedure: the sponges were extracted in ethanol and the remaining material was sequentially extracted four times with methanol (0.3 g/mL) by maceration for 4 days. After the fourth day, the ethanol and methanol solutions were blended and filtered. After filtration, the extracted material was concentrated in a rotary evaporator (Fisaton, Brazil) and the final extract was partitioned against hexane (1 : 1 v/v). The final extract was dried in SpeedVac (SPD1010; ThermoSavant, NY, USA)

Male Winstar albino mice (20–30 g) were provided by the Animal House Faculty of Medicine and Health Sciences Universitas Warmadewa, were housed in rooms at controlled temperature (20–22°C), in 12-h : 12-h light/dark cycles. Standard rodent diet and tap water were provided *ad libitum*.

Formalin-Induced Paw Edema

In this test, 20 µL of 2.5% formalin was injected into the left hind paws of mice 30 or 60 min after they had been submitted to their respective treatments (n=8 animals/group). Animals were treated with the *Xestospongia muta* extract (96 mg), *Agelas sp.* extract (96 mg), *Aplysina* extract (96 mg) or saline (control group) (0.9%; 0.1 mL/10 g) by oral pathway (gavage) 30 min prior to formalin injection. One group was treated (60 min prior to the formalin injection) with the acetaminophen analgesic (88 g oral). Before formalin injection (20 µL; 2.5%), the volume of each mouse paw was measured separately by means of a plethysmometer (Letica, Barcelona, Spain). Thirty minutes after the administration (by gavage) of the sponges extract (96 mg) or saline (control group) (0.9%; 0.1 mL/10 g) to the mice, acute inflammatory edema was induced by sub plantar injection of formalin into the right hind paws of mice (n = 8 animals/group). The edema caused by formalin was measured at 30 and 180 min after formalin injection. The volume of the edema was expressed for each animal as the difference between before and after formalin injected paws

Antinociceptive Activity

Writhing Test

The abdominal writhing response to the acetic acid administration (0.6%, 10 mL/kg, i.p.) consists of contractions of the hind limbs 23. For the writhing test, mice got the acetic acid injection 30 min after getting their respective treatments (n = 8 animals/group). Animals were treated with the *Xestospongia muta* extract (96 mg), *Agelas* sp. extract (96 mg), *Apylisina* extract (96 mg) or saline (control group) (0.9%; 0.1 mL/10 g) by oral pathway (gavage). One group was treated with the acetaminophen analgesic (88 g oral), 60 min prior to the acetic acid injection by intraperitoneal pathway (i.p.) and, 60 min prior to the acetic acid injection. The number of abdominal writhing was counted cumulatively for 25 min, starting 5 min after the administration. Antinociception was calculated as a percentage of inhibition of writhing constrictions by using the formula [(control group mean – test group mean)/(control group)] 100%.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM (standard error of mean). Data were analyzed by one way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Anti-inflammatory and the antinociceptive effects of extracts obtained from three sponges, *Xestospongia muta* extract (96 mg), *Agelas* sp. extract (96 mg), *Apylisina* extract (96 mg) was evaluated in mice in this study. The anti-inflammatory and antinociceptive effect of *Xestospongia muta* extract (96 mg), *Agelas* sp. extract (96 mg), *Apylisina* extract (96 mg) activities were assessed by the acetic acid-induced writhing response and the formalin test.

In this study, oral administration of *Xestospongia muta* extract, *Agelas* sp., *Apylisina* extracts reduced the formalin-induced paw edema in mice. Table 1 shows that *Xestospongia muta* extract (96 mg/kg) significantly reduced the formalin-induced hind paw edema in rats in 30.4 ($p < 0.001$) and *Agelas* sp. 6.7 ($p < 0.05$) and *Apylisina* sp. 48.3% ($p < 0.001$), respectively. The effects were similar to the one obtained by acetaminophen (positive control).

Table 1. Effect of *Xestospongia muta* extract, *Agelas* sp., *Apylisina* extract extracts reduced the formalin-induced paw edema

Group	Paw edema (mL) 3 h after formalin	% of inhibition
Control	2.07 \pm 0.25	
Acetaminophen	1.75 \pm 0.38	15.5
<i>Xestospongia muta</i>	1.44 \pm 0.37	30.4
<i>Agelas</i> sp	1.93 \pm 0.19	6.7
<i>Apylisina</i> sp	1.07 \pm 0.27	48.3

The metabolites of *Apylisina* sp. have been described as microbicides and antitumorals¹⁷, however, the anti-inflammatory effects of these compounds are poorly studied. Some years ago, Medeiros et al.¹⁰ reported the anti-inflammatory activity of 11-oxoaerthionin, a bromotyrosine-derived alkaloid isolated from the marine sponge *Aplysina fistularis* in culture of macrophages. Moreover, the authors showed that the anti-inflammatory mechanism of this compound seems to be related to the inhibition of NO production, inflammatory cytokines and PGE₂. Chemical studies from the crude extract of *A. caissara* showed the presence of bromotyrosine-derived alkaloids: caissarine A, B and C; agelocaissarines A1, A2, B1, B2; fistularin-3 and 11-hydroxyaerthionin^{18,19}. Based on this studies we can suggest that this class of compounds may be responsible for the anti-inflammatory and antinociceptive effects of *A. caissara* observed in this study and in our previous work from Azevedo et al¹³. In addition to *A. caissara*, the extract of *Haliclona* sp also presented anti-inflammatory activity in the experimental model.

To evaluate the possible analgesic effect of the sponges, we used the writhing test, that is commonly used for screening peripherally active. Our results showed (Figure 1) that pre-treatment with all sponges resulted in significant inhibition of the acetic acid-induced writhing response. All extracts were

evaluated at doses of 96 mg by oral pathway. Results show that the oral administration of both doses of aqueous extract of *Xestospongia muta* inhibited the acetic acid-induced abdominal constriction (62.8 and 60.1% - $p < 0.001$, respectively). Similar results were obtained by both oral doses of aqueous extract of *Haliclona* sp. in the acetic acid-induced abdominal constriction (40% - $p < 0.001$). One doses of the extract of *Agelas* sp. *reticulatus* also significantly inhibited the acetic acid-induced abdominal constriction (14.3; $p < 0.05$), however it was less effective than *Xestospongia*. Extract of *Apylisina* sp. reveals best inhibition effect than others, account for 57.1% reducing writhing test. Furthermore, the antinociceptive effects in the test were also observed for acetaminophen (20% - $p < 0.02$), used as the reference peripheral analgesic drug. These data suggest the possible antinociceptive action of the extracts from *X. muta*, *Agelas* sp, and *Apylisina* sp.

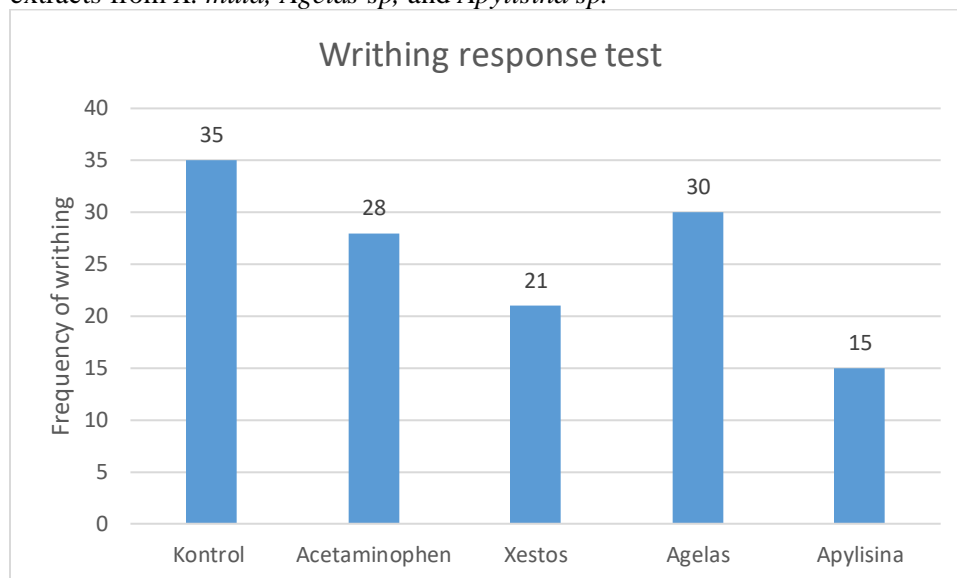


Figure 1. Effect of *Xestospongia muta* extract, *Agelas* sp., *Apylisina* extract extracts reduced the writhing response in mice

In the writhing test, the acetic acid-induced writhing response, the nociceptive response appears to result from the release of TNF- α , interleukin-1 β and interleukin-8 by resident peritoneal macrophage and mast cells²⁰, the release of biogenic amines (e.g., histamine and serotonin), cyclooxygenases and their metabolites (e.g., PGE₂ and PGF₂ α) and opioid mechanisms²¹.

D. STATUS LUARAN: Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta mengunggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui BIMA.

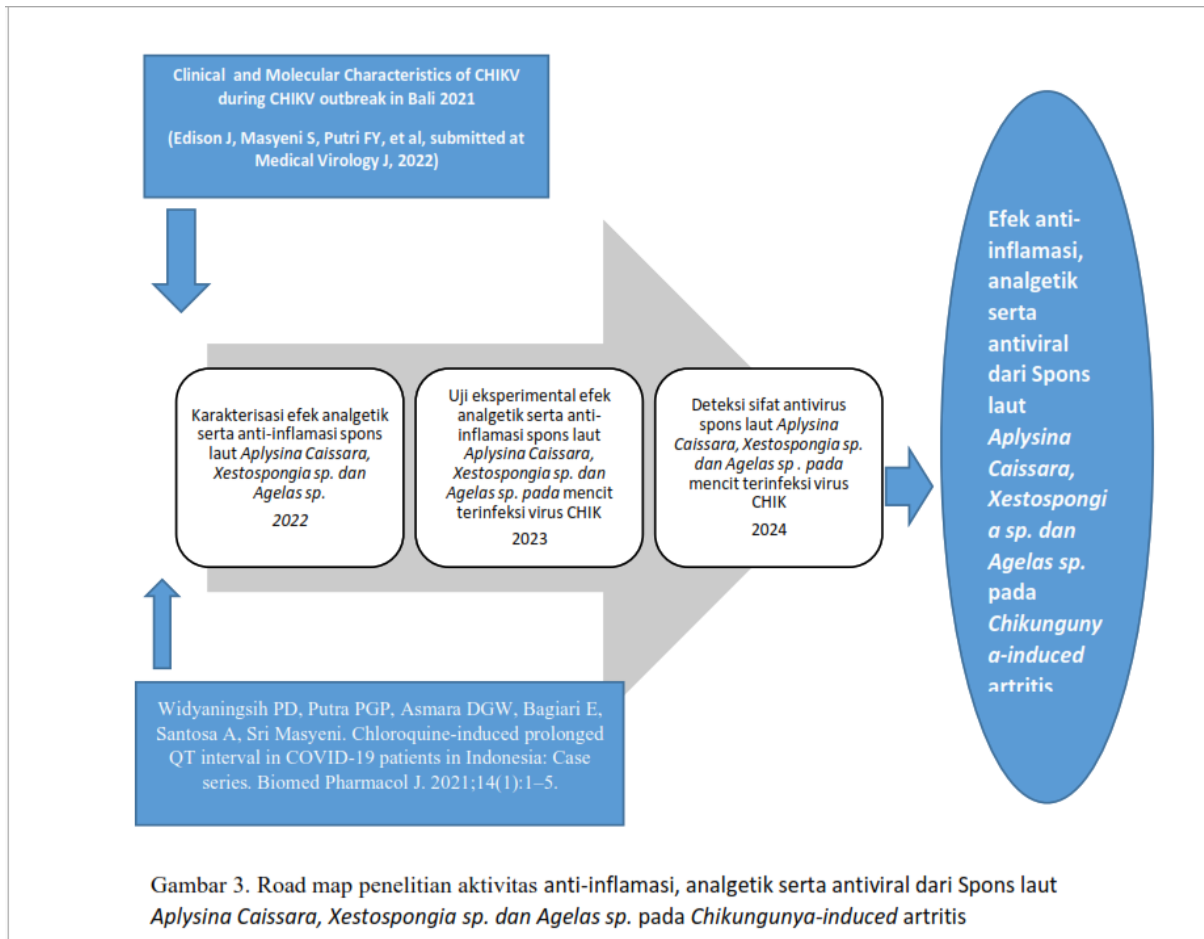
Manuskript telah disubmit pada jurnal internasional bereputasi dan masih menunggu proses review.

F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Kendala penelitian adalah kesulitan pada saat menemukan spons di lautan perairan karena cuaca ekterm kurang kondusif bagi proses penyelaman, Kendala juga terjadi pada saat eksperimen karena laboratorium sedang digunakan oleh beberapa penelitian sehingga menunggu proses dengan waktu penantian yang cukup lama.

G. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA: Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Rencana tahapan berikutnya adalah melaksanakan penelitian tahap kedua tahun kedua sesuai Roadmap penelitian;



H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

Daftar pustaka

- Rane, R.; Sahu, N.; Shah, C.; Karpoormath, R. Marine bromopyrrole alkaloids: Synthesis and diverse medicinal applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 253–273
- Ancheeva, E.; El-Neketi, M.; Song, W.; Lin, W.; Daletos, G.; Ebrahim, W.; Proksch, P. Structurally unprecedented metabolites from marine sponges. *Curr. Org. Chem.* **2017**, *21*, 426–449
- Bickmeyer, U.; Drechsler, C.; Köck, M.; Assmann, M. Brominated pyrrole alkaloids from marine *Agelas* sponges reduce depolarization-induced cellular calcium elevation. *Toxicon* **2004**, *44*, 45–51.
- Pettit, G.R.; Tang, Y.; Zhang, Q.; Bourne, G.T.; Arm, C.A.; Leet, J.E.; Knight, J.C.; Pettit, R.K.; Chapuis, J.C.; Doubek, D.L.; et al. Isolation and structures of axistatins 1-3 from the Republic of Palau marine sponge *Agelas axifera* Hentschel. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 420–424.
- Assmann, M.; Soest, R.W.M.; Köck, M. Description of *Agelas cerebrum*, a new species and redescription of *A. dilata*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* **2001**, *114*, 359–366.
- Anjum K, Abbas SQ, Shah SAA, Akhter N, Batool S, Hassan SSU. Marine sponges as a drug treasure. *Vol. 24, Biomolecules and Therapeutics.* 2016. p. 347–62.

7. Mayer AMS, Rodríguez AD, Tagliatela-Scafati O, Fusetani N. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of . *Mar Drugs*. 2013;11(7):2510–73.
8. Kijjoa A, Sawangwong P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Mar Drugs* [Internet]. 2004;2(2):73–82.
9. El-Shitany NA, Shaala LA, Abbas AT, Abdel-dayem UA, Azhar EI, Ali SS, et al. Evaluation of the anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects of the organic extract of the red sea marine sponge *xestospongia testudinaria* against carrageenan induced rat paw Pharmacology of marine sponges *testudinaria* against carrageenan induced rat paw inflammation. *PLoS One*. 2015;10(9):1–16.
10. De Medeiros AI, Gandolfi RC, Secatto A, Falcucci RM, Faccioli LH, Hajdu E, et al. 11-Oxo-aerthionin isolated from the marine sponge *Aplysina fistularis* shows anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012;34(6):919–24.
11. Keyzers RA, Davies-Coleman MT. Anti-inflammatory metabolites from marine sponges. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2005;34(4):355–65.
12. D’Orazio N, Gammone MA, Gemello E, De Girolamo M, Cusenza S, Riccioni G. Marine bioactives: Pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases., *Marine Drugs*. 2012; 10: p. 812–33.
13. Azevedo LG, Peraza GG, Lerner C, Soares A, Murcia N, Muccillo-Baisch AL. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects from an extract of *Aplysina caissara*, a marine sponge. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(5):549–56.
14. Rashid MA, Gustafson KR, Boswell JL, Boyd MR. Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptides from the marine sponge *Haliclona nigra*. *J Nat Prod*. 2000;63(7):956–9.
15. Mahdian D, Iranshahy M, Shakeri A, Hoseini A, Yavari H, Nazemi M, et al. Cytotoxicity evaluation of extracts and fractions of five marine sponges from the Persian Gulf and HPLC fingerprint analysis of cytotoxic extracts. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2015;5(11):896–901.
16. Wattanadilok R, Sawangwong P, Rodrigues C, Cidade H, Pinto M, Pinto E, et al. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar Drugs*. 2007;5(2):40–51.
17. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2015;32(2):116–211
18. Saeki BM, Granato AC, Berlinck RGS, Magalhães A, Schefer AB, Ferreira AG, et al. Two unprecedented dibromotyrosine-derived alkaloids from the Brazilian endemic marine sponge *Aplysina caissara*. *J Nat Prod*. 2002;65(5):796–9.
19. De Lira TO, Berlinck RGS, Nascimento GGF, Hajdu E. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. *J Braz Chem Soc*. 2006;17(7):1233–40.
20. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother*. 1968;32(2):295–310.
21. Barros WM, Rao VSN, Silva RM, Lima JCS, Martins DTO. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K stem bark. *An Acad Bras Cienc*. 2010;82(3):609–16.