

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi Tanaman dan Preparasi Ekstrak

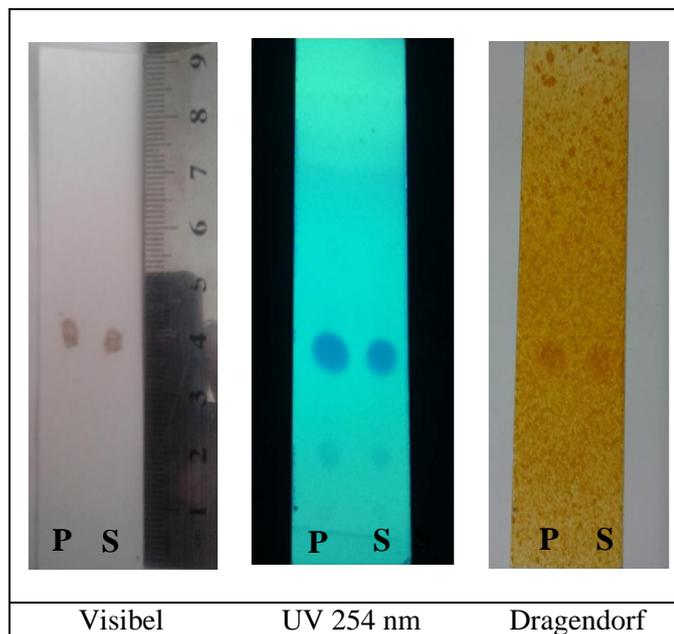
Identifikasi tanaman secara determinasi tidak dilakukan, tetapi menggunakan identifikasi secara kimia. Serbuk lada diambil dari Herbal Anugrah Alam, Mayungan RT 04, Potorono, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta. Lada tersebut dibuat menjadi serbuk dengan tujuan untuk meningkatkan luas permukaan bahan baku. Dari serbuk lada yang didapat tersebut kemudian diekstraksi menggunakan metode sokletasi. Sokletasi serbuk lada menggunakan penyari etilasetat dengan perbandingan 1: 3, yaitu serbuk lada 100 mg dengan pelarut etilasetat 300 ml.

Perbandingan jumlah bahan dengan pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi. Jumlah pelarut yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, namun dalam jumlah perbandingan tersebut pelarut dapat bekerja optimal dengan cara menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam etilasetat di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel serta mendapatkan zat aktif yang lebih banyak dan murni.

Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari untuk mencegah reaksi degradasi senyawa

aktif yang dikatalisis oleh cahaya matahari. Kristal yang terbentuk, kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh kristal berwarna kuning. Pada suhu kamar, senyawa piperin dalam bentuk kristalnya yang memang bersifat polar akan dapat melarut dalam etanol 96% yang juga bersifat polar. Ketika ditambahkan etanol sebagai pelarut, maka piperin yang ada akan melarut dalam filtratnya, sedangkan zat pengotor seperti piperin yang bersifat nonpolar atau kurang polar tidak larut dalam etanol akan tertinggal di dalam residunya.

Dari hasil sokletasi serbuk simplisia lada tersebut diperoleh kristal piperin seberat 2 gram yang berwarna kuning dan berbau khas. Identifikasi piperin dengan KLT menggunakan fase diam yaitu silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah etilasetat : n-heksan (1:4). Fase gerak yang digunakan merupakan campuran dari fase gerak yang bersifat kurang polar dan lebih polar karena elusi campuran kedua pelarut ini mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Pengamatan bercak dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan pereaksi *Dragendorff* dengan hasil seperti Gambar 12:



Gambar 1. Hasil Identifikasi KLT

Keterangan:

Fase diam: Silika Gel 60 F₂₅₄ ;

Fase gerak: etilasetat : n-heksan (1:4);

P: Pembanding Quinine ; S : Isolat Alkaloid Lada

Rf Quinin= 0,50 ; Rf Isolat Alkaloid Lada = 0,47

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan pembanding *quinine* karena senyawa ini merupakan senyawa golongan alkaloid. Sampel positif mengandung alkaloid jika bercak berwarna jingga sampai merah coklat pada pengamatan sinar tampak. Pengamatan pada UV254 menghasilkan bercak berwarna biru dan meredam (Robinson, 1995).

Identifikasi senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan metoda fisika, dengan cara penyinaran kromatogram di bawah sinar ultraviolet 254 nm. Beberapa alkaloid memberikan warna fluoresensi biru atau kuning di bawah sinar tersebut, serta metoda kimia dengan menggunakan pereaksi tertentu, seperti pereaksi *Dragendorf* membentuk endapan jingga-merah (Wagner, 1984; Kyle, *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil uji identifikasi

piperin menggunakan metode KLT dapat dilihat pada sinar UV dan setelah penyemprotan pereaksi *Dragendorf* pada ekstrak lada diduga mengandung piperin.

2. Pengaruh Pemberian Isolat Alkaloid Lada (*Piper nigrum* L.)

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur Wistar, umur 2-3 minggu, berat badan \pm 100-150 gram sebanyak 25 ekor dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan masing-masing 5 ekor, yakni sebagai berikut : Kelompok I (kontrol negatif), II (pembeding), dan kelompok III, IV, dan V merupakan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak secara oral. Volume normal kaki tikus diukur dengan alat *plethismometer* dan dinyatakan sebagai volume dasar untuk setiap tikus (V_0). Setelah 30 menit pemberian variasi dosis dan pembeding, hewan percobaan diinjeksi dengan 0,1 ml suspensi karagenin 1% secara subplantar pada tiap telapak kaki kanan tikus. Kaki tikus yang telah diinduksi karagenin setiap 30 menit setelah penyuntikan sampai dengan 6 jam, diukur dengan cara dicelupkan kedalam air pada alat *plethismometer* (V_t), pertambahan volume kaki untuk setiap pengukuran tersebut didata dan dihitung volume edema. Rata-rata volume udem telapak kaki tikus masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat dalam tabel 1.

Tabel. 1 Rata-rata volume udem telapak kaki tikus masing-masing kelompok perlakuan

Grup	Waktu (menit)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
I	0.122	0.176	0.182	0.186	0.192	0.202	0.204	0.206	0.216	0.208	0.202	0.192	0.184
SE	0.014	0.011	0.014	0.009	0.012	0.014	0.022	0.017	0.019	0.017	0.012	0.020	0.020
II	0.034	0.062	0.070	0.088	0.096	0.098	0.104	0.100	0.090	0.084	0.070	0.060	0.050
SE	0.004	0.005	0.013	0.011	0.007	0.014	0.017	0.013	0.010	0.020	0.009	0.004	0.011
III	0.052	0.104	0.122	0.136	0.146	0.156	0.168	0.138	0.134	0.124	0.106	0.100	0.086
SE	0.009	0.004	0.004	0.007	0.009	0.008	0.005	0.007	0.013	0.010	0.009	0.011	0.008
IV	0.042	0.096	0.108	0.130	0.144	0.160	0.166	0.134	0.118	0.116	0.094	0.086	0.072
SE	0.004	0.005	0.007	0.007	0.006	0.003	0.009	0.007	0.010	0.010	0.010	0.006	0.004
V	0.030	0.080	0.084	0.102	0.116	0.118	0.124	0.114	0.104	0.098	0.092	0.080	0.068
SE	0.005	0.008	0.011	0.007	0.011	0.017	0.010	0.007	0.012	0.007	0.009	0.006	0.006

Keterangan:

I = kelompok kontrol negatif air suling 2 mL/100 g BB dengan volume udem maksimal 0,216 ml di menit ke 240;

II = kelompok pembanding Na diklofenak 13,5 mg/Kg BB dengan volume udem maksimal 0,104 ml di menit ke 180;

III = kelompok isolat alkaloid lada 5 mg/Kg BB dengan volume udem maksimal 0,168 ml di menit ke 180;

IV = kelompok isolat alkaloid lada 10 mg/Kg BB dengan volume udem maksimal 0,166 ml di menit ke 180;

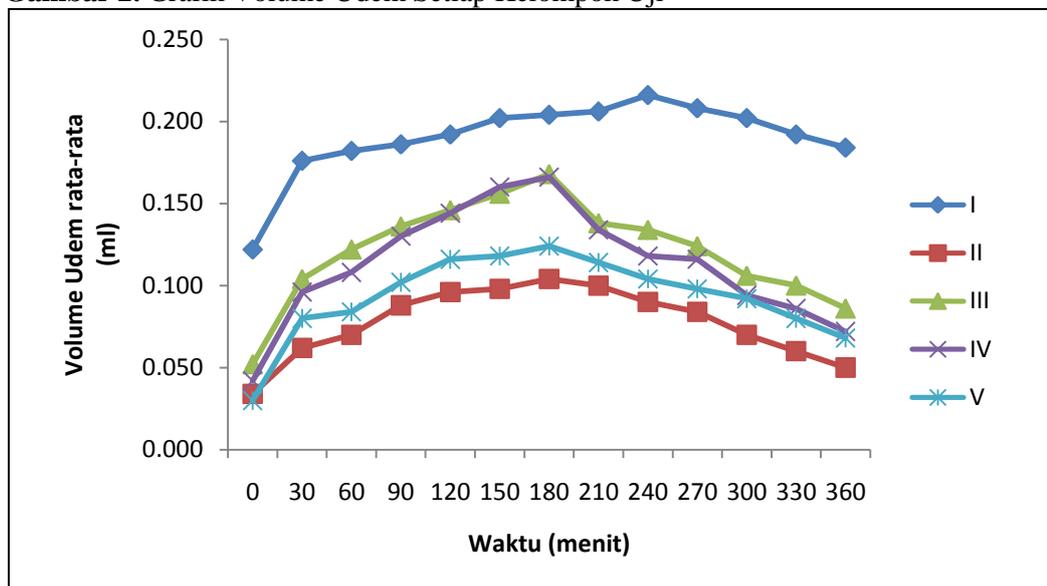
V = kelompok isolat alkaloid lada 15 mg/Kg BB dengan volume udem maksimal 0,124 ml di menit ke 180.

Pada kelompok kontrol, injeksi karagenin menghasilkan edema lokal, yang meningkat pada menit ke-30 dan terus meningkat sampai menit ke-240. Karagenin tersebut menginduksi cedera sel sehingga sel yang cedera akan melepaskan mediator yang mengawali proses inflamasi. Setelah pelepasan mediator tersebut, terjadi edema yang mampu bertahan selama 6 jam dan perlahan berkurang dalam waktu 24 jam setelah injeksi. Setelah injeksi karagenin, terjadi respon menyebabkan edema yang terbagi dalam dua fase. Fase awal berhubungan dengan pelepasan histamin dan serotonin. Antara fase I dan II, edema dipertahankan oleh kinin. Fase kedua berhubungan dengan pelepasan prostaglandin (PG) dan *Slow Reacting Substances* yang mencapai puncak pada 3 jam. Pemberian

karagenin subplantar tersebut akan meningkatkan kadar COX-2 (Hidayati, *et al.*, 2008).

Pada kelompok pembanding, volume udem meningkat sampai menit ke-180. Volume udem kelompok perlakuan dengan kontrol positif (pembanding) lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif karena AINS seperti Na-diklofenak dapat menekan respon pada fase akhir, yang juga disebut fase PG, karena kemampuan menekan migrasi leukosit mononuklear ke jaringan radang (Hidayati, *et al.*, 2008).

Volume udem kelompok perlakuan dosis 5 mg/kg BB lebih kecil apabila dibandingkan dengan kontrol. Volume udem ini terus meningkat sampai menit ke-180. Volume udem kelompok perlakuan dosis 10 mg/kg BB lebih kecil apabila dibandingkan dengan kontrol. Volume udem maksimal dicapai pada menit ke-180. Pada dosis 15 mg/kg BB, volume udem juga lebih kecil dibandingkan kontrol dan volume udem maksimal dicapai pada menit ke-180. Grafik volume udem dapat dilihat pada Gambar 13 berikut.

Gambar 2. Grafik Volume Udem Setiap Kelompok Uji

Keterangan : I = kelompok kontrol negatif air suling 2 mL/100 g BB; II = kelompok pembanding Na diklofenak 13,5 mg/Kg BB; III = kelompok isolat alkaloid lada 5 mg/Kg BB; IV = kelompok isolat alkaloid lada 10 mg/Kg BB; V = kelompok isolat alkaloid 15 mg/Kg BB.

Efek antiinflamasi pembanding Na diklofenak 13,5 mg/Kg BB mempunyai kurva paling rendah dibandingkan kontrol negatif, isolat alkaloid lada dosis 5, 10 dan 15 mg/Kg BB, yang berarti kemampuannya dalam menghambat udem lebih baik dari keempat perlakuan (Gambar 13).

Dari volume udem yang terbentuk kemudian dicari nilai AUC (*Area Under Curve*), tiap kelompok untuk memperoleh persentase daya antiinflamasi seperti tertera pada Tabel 2 berikut ini :

Tabel 2. Rata-rata Nilai AUC total, serta % Daya Anti Inflamasi Tiap Kelompok

Kelompok	Harga AUC Total (ml/jam) ($\bar{x} \pm SE$)	% Daya Anti Inflamasi
Kontrol negatif air suling 2 mL/100 g BB	71.400 \pm 4.67	
Pembanding Na diklofenak 13,5 mg/Kg BB	29.430 \pm 2.94*	58.78%
Isolat alkaloid lada 5 mg/Kg BB	45.87 \pm 1.77*	35.76%
Isolat alkaloid lada 10 mg/Kg BB	42.90 \pm 1.09*	39.92%
Isolat alkaloid lada 15 mg/Kg BB	35.28 \pm 1.72*	50.59%

Keterangan : * berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Harga AUC (*Area Under the Curve*), yaitu luas daerah di bawah kurva antara rata-rata volume udem terhadap waktu, dianalisis statistik menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dan diperoleh hasil data terdistribusi normal, pada *Levene test* didapatkan data homogen lalu dilanjutkan perhitungan Tukey HSD. Dari perhitungan menunjukkan bahwa kontrol positif natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB, isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB, dosis 10 mg/kgBB, dan dosis 15 mg/kgBB berbeda signifikan dengan kontrol negatif akuades ($p < 0,05$ pada lampiran 9), artinya natrium diklofenak dan isolat alkaloid lada dengan konsentrasi tersebut mempunyai efek antiinflamasi. Hasil uji Tukey HSD dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa kontrol positif natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dengan isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB (nilai signifikansi 0,571 pada lampiran 9). Hal ini berarti isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB memiliki kemampuan menghambat inflamasi sebanding dengan natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB.

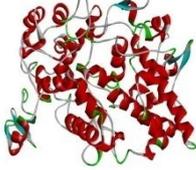
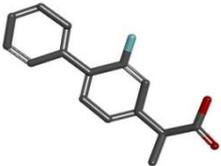
3. *Molecular Docking* dengan Aplikasi AutoDock

Penambatan molekul (*molecular docking*) merupakan penelitian dengan metode komputasi untuk mendeteksi interaksi suatu ligan dengan suatu reseptor. Hasil dari penambatan molekul ini adalah berupa skor penambatan dan hasil visualisasi secara *virtual* 3D. Skor penambatan yang baik adalah skor yang nilainya lebih kecil, karena menggambarkan senyawa yang diuji secara penambatan molekul tersebut akan melekat dengan sangat baik dengan reseptornya dan tidak membutuhkan banyak energi untuk berikatan. Setelah didapatkan skor penambatan yang baik, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*.

a. Proses Pemilihan Protein Target

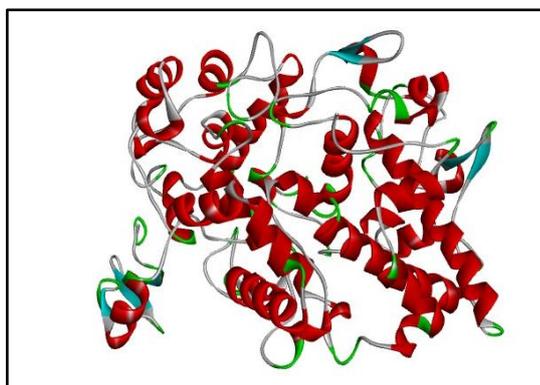
Sebelum dilakukan uji penambatan molekul pada senyawa isolat alkaloid *piperine*, protein diunduh terlebih dahulu pada situs www.rcsb.org. Protein yang digunakan berupa berkas (*file*) dalam format “.pdb”. Pada penelitian ini protein yang diunduh adalah protein siklooksigenase dengan kode protein 3PGH. Enzim COX-2 memiliki kode PDB yaitu 6COX, 4COX, dan 3PGH. Kode protein 3PGH menghasilkan nilai RMSD paling baik diantara kode protein lainnya (Agistia, *et al.*, 2013).

Tabel 3. Kode dan Struktur Reseptor

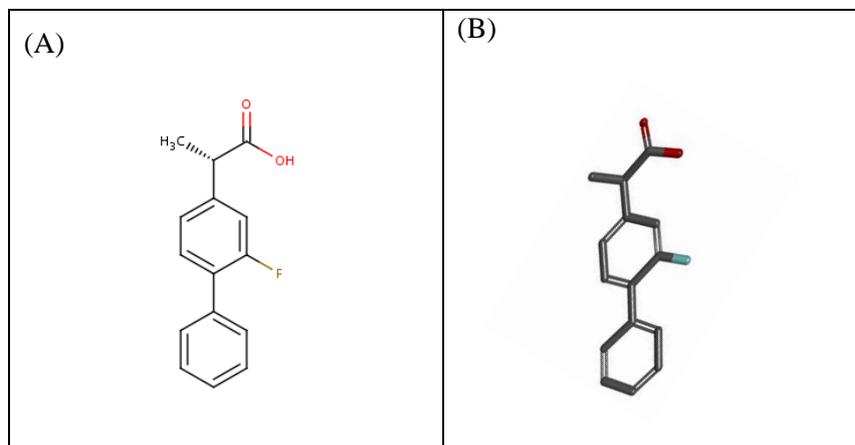
Kode Protein	Native Ligand	Struktur Reseptor	Struktur Native Ligand
3PGH	FLP (Flurbiprofen)		

b. Preparasi Protein dan Ligan Asli (*Native Ligand*)

Setelah berkas protein diunduh, dilakukan preparasi berkas protein dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Tahap ini merupakan tahap awal untuk melakukan penambatan molekul. Pada umumnya terdapat banyak molekul dengan komponen residu yang sama pada berkas protein, sehingga beberapa molekul yang terdapat pada berkas protein dihapus dan diambil 1 molekul saja. Setelah itu residu yang dianggap sebagai residu pengganggu (senyawa air dan senyawa detergen) dan senyawa ligan asli dihapus, tujuannya untuk menghindari kemungkinan ligan yang akan diuji melekat pada senyawa pengganggu tersebut seperti pada Gambar 14.

**Gambar 3.** Preparasi Protein Reseptor

Berkas protein disimpan dalam format “*target.pdb*” agar dapat dijalankan dengan menggunakan aplikasi AutoDock.



Gambar 4. Senyawa *Native Ligand* Flurbiprofen
(A). Ligan 2D (B). Ligan 3D

Senyawa ligan asli diambil dari berkas protein dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dengan cara menghapus seluruh komponen protein dan menyisakan senyawa ligan aslinya. Senyawa ligan asli disimpan dengan format “*ligan.pdb*”. Senyawa ligan asli berfungsi sebagai pembanding.

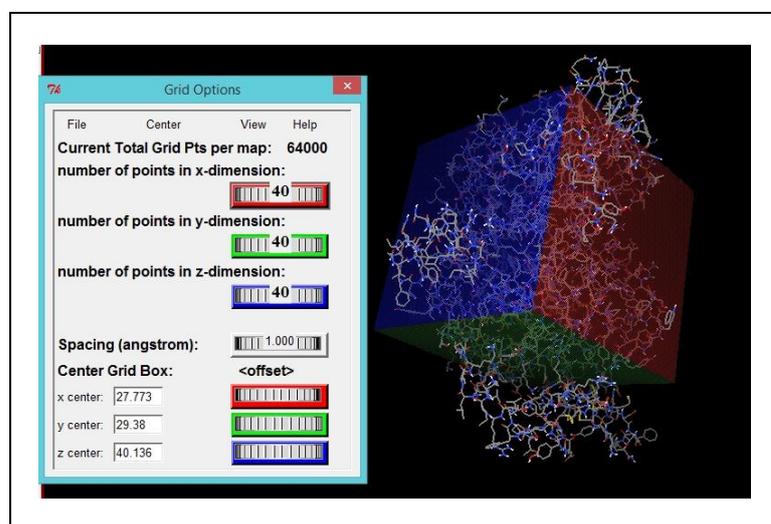
c. Preparasi Ligan Uji

Preparasi ligan uji dilakukan dengan cara menggambar struktur ligan (senyawa *marker*) yang akan diuji dengan menggunakan aplikasi *MarvinSketch*. Ligan uji yang digunakan dalam uji *molecular docking* ini adalah beberapa senyawa alkaloid yang dapat ditemukan pada tumbuhan lada (*Piper nigrum* L.) yaitu *Piperine*, *Piperamide*, *Pipericide*, *Piperettine*, *Piperolein B*, *Isopiperolein B*, *Sarmentine*, dan *Tricholein*.

d. Proses *Molecular Docking* dengan AutoDock

Setelah diperoleh berkas (*file*) ligan dan protein disimpan dalam satu *folder*, kemudian dilakukan penambatan molekuler menggunakan aplikasi AutoDock. AutoDock merupakan sebuah aplikasi yang digunakan untuk menentukan target atau sasaran dari protein yang akan diuji. AutoDock juga digunakan untuk melihat skor ikatan (*binding energy score*) dari senyawa yang diuji terhadap reseptor target.

Pada aplikasi AutoDock, berkas “3PGH.pdb” yang sudah dipreparasi dimasukkan dan pada menu *Edit* dan klik submenu *Delete Water* untuk menghapus air pada berkas “3PGH.pdb”. Kemudian *Edit* lagi dan klik submenu *Hydrogen* untuk menambahkan atom hidrogen pada residu protein.



Gambar 5. Proses preparasi parameter grid

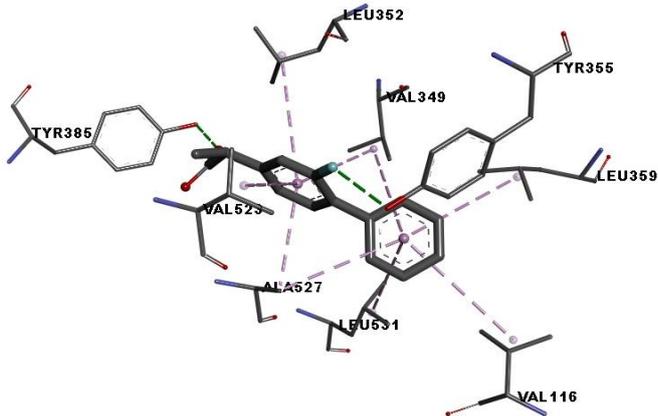
Preparasi parameter *grid* (Gambar 16) dilakukan untuk membatasi ruang gerak dari ligan yang akan diuji. Ruang *grid* yang digunakan sebesar 1 Å. *Gridbox* merupakan suatu parameter di dalam AutoDock untuk

mengatur area (*mapping*) pada proses *docking*. Hal tersebut bertujuan untuk menentukan letak sisi aktif dari enzim dan memberikan ruang (*spacing*) terhadap ligan dapat berotasi. Dimensi *gridbox* yang digunakan harus cukup besar agar ligan dapat berotasi secara bebas (Prasetia, 2011).

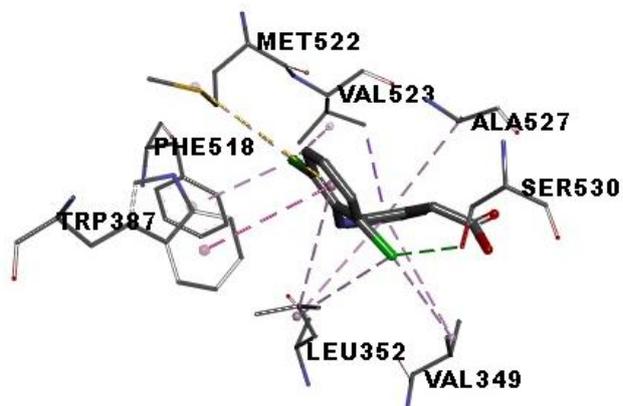
e. Visualisasi Hasil Validasi dan *Molecular Docking*

Setelah didapatkan skor penambatan, kemudian akan dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Hal ini dirancang agar memberikan suasana interaktif untuk melihat dan mengedit struktur molekul, sekuen, data refleksi X-ray dan data lainnya. Aplikasi ini dapat dioperasikan dalam sistem operasi *Windows* dan *Linux*. Hasil visualisasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil *Docking*

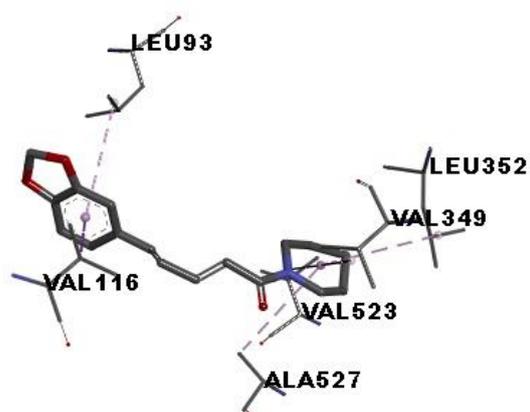
Ligan	Interaksi ikatan	Binding Energi (kkl/mol)	Hidrogen formed & result
Ligan Asli Flurbiprofen		-8,9	9 ikatan ; TYR385, LEU352, VAL349, TYR355, LEU359, VAL166, LEU531, ALA527, VAL523

Ligan
Pembanding
(Natrium
Diklofenak)



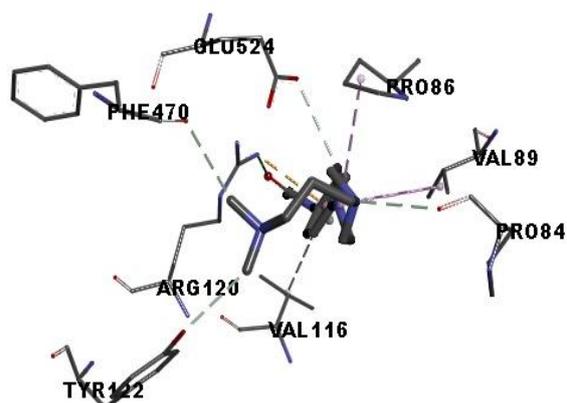
8 ikatan ;
TRP387, PHE518,
MET522, VAL523,
ALA527, SER530,
VAL349, LEU352

Ligan Uji
(Piperine)



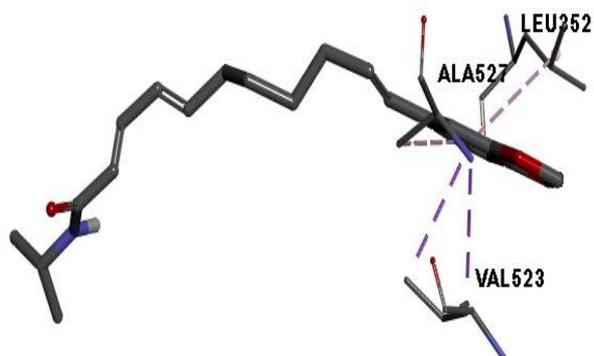
6 ikatan ;
LEU93, LEU352,
VAL349, VAL523,
ALA527, VAL116

Ligan Uji
(Piperamide)



8 ikatan ;
PHE470, GLU524,
PRO86, VAL89,
PRO84, VAL116,
ARG120, TYR122

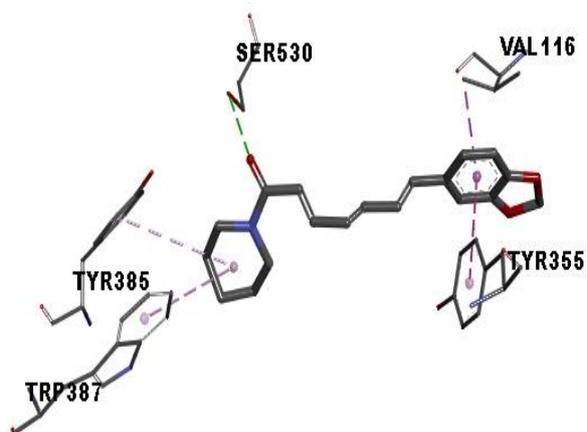
Ligan Uji
(Pipericide)



-7,6

3 ikatan ;
ALA527, LEU352,
VAL523

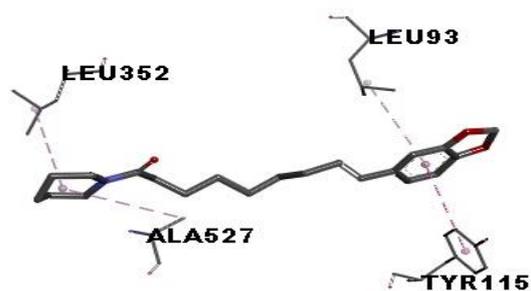
Ligan Uji
(Piperettine)



-7,9

5 ikatan ;
SER530, VAL116,
TYR355, TYR385,
TRP387

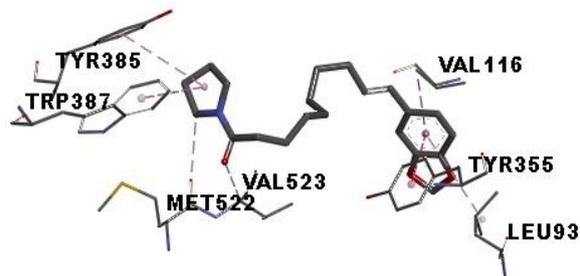
Ligan Uji
(Piperolein
B)



-7,2

4 ikatan ;
LEU352, LEU93,
TYR115, ALA527

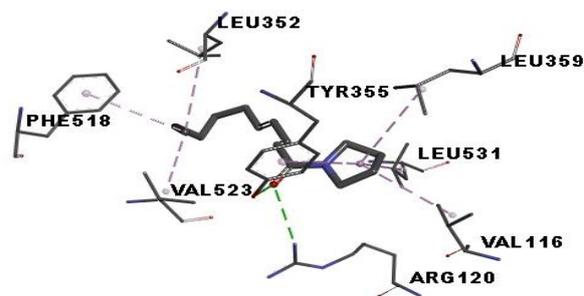
Ligan Uji
(*Isopiperolin B*)



-7,2

7 ikatan ;
TRP387, TYR385,
VAL116, TYR355,
LEU93, VAL523,
MET522

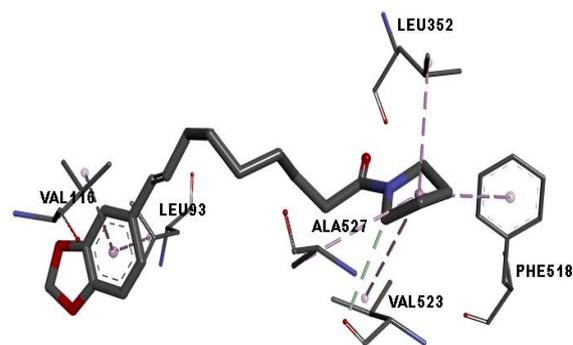
Ligan Uji
(*Sarmentine*)



-6,5

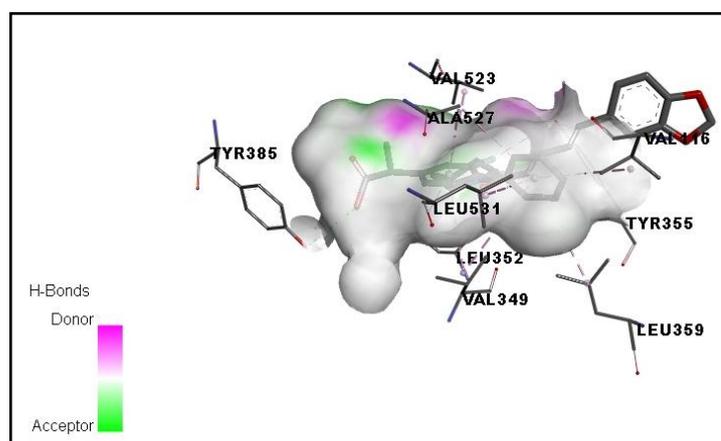
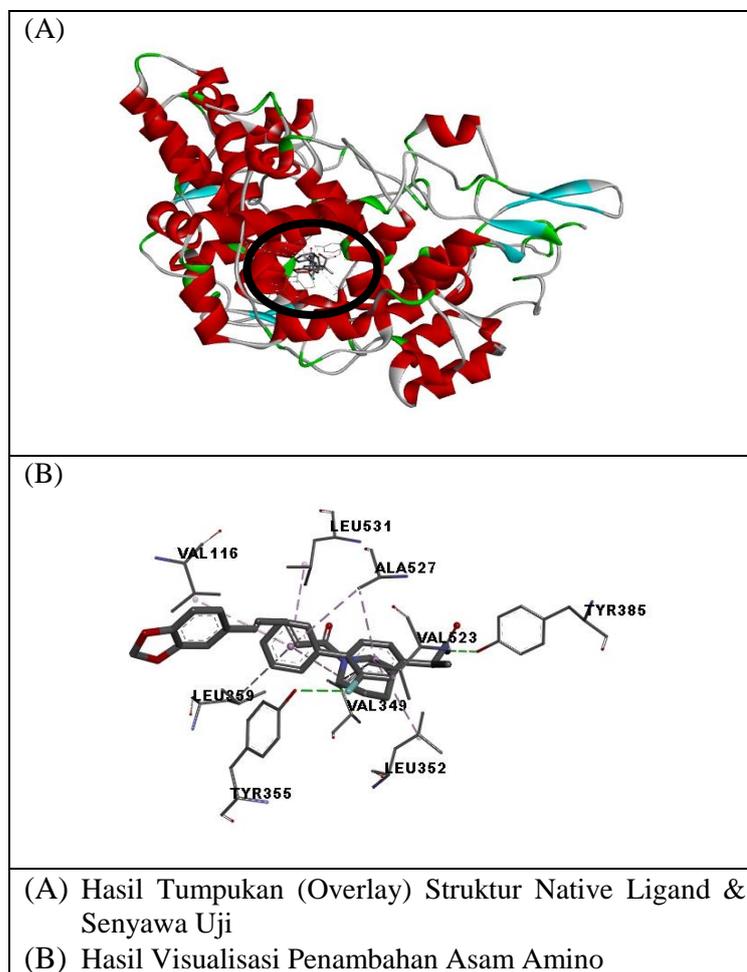
8 ikatan ;
PHE518, LEU352,
TYR355, LEU359,
LEU531, VAL116,
ARG120, VAL523

Ligan Uji
(*Tricholein*)



-7,2

6 ikatan ;
VAL116, LEU93,
LEU352, PHE518,
VAL523, ALA527

Tabel 5. Hasil *Overlay*

Gambar 6. Hasil Visualisasi Piperin

Hasil dari proses *docking* (Gambar 17) berupa ligan yang menunjukkan nilai energi yang paling kecil, semakin kecil energi yang dihasilkan dari ikatan suatu ligan dengan reseptornya, maka semakin stabil ikatan antara ligan dan reseptor tersebut. Dari Tabel 4 dapat diketahui bahwa energi yang dibutuhkan ligan asli untuk berikatan dengan reseptornya adalah -8,9 kkl/mol sedangkan ligan pembanding membutuhkan energi sebesar -6,9 kkl/mol serta senyawa *marker* lada (*Piper nigrum*) yaitu *Piperine* sebesar -8,0; *Piperamide* sebesar -6,4 kkl/mol; *Pipericide* sebesar -7,6 kkl/mol; *Piperettine* sebesar -7,9 kkl/mol; *Piperolein B* sebesar -7,2 kkl/mol; *Isopiperolein B* sebesar -7,2 kkl/mol; *Sarmentine* sebesar -6,5 kkl/mol; *Tricholein* sebesar -7,2 kkl/mol. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa ligan asli memiliki interaksi ikatan yang lebih stabil dengan protein 3PGH dibandingkan beberapa ligan uji, dan senyawa *marker* lada (*Piper nigrum*) yaitu *Piperine* memiliki energi ikatan yang lebih baik dari beberapa ligan uji lainnya dan memiliki potensi lebih baik sebagai antiinflamasi dibandingkan dengan natrium diklofenak.

B. Pembahasan

Inflamasi atau radang merupakan proses di dalam tubuh dengan tujuan memperbaiki jaringan yang rusak serta mempertahankan diri terhadap infeksi. Inflamasi merupakan respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi yang merusak (Soesaty, 2002). Rangsangan ini akan menyebabkan timbulnya reaksi radang seperti bengkak dan rasa nyeri (Adjirni, 2008). Proses inflamasi dimulai dari suatu stimulus yang mengakibatkan kerusakan sel. Sebagai reaksi terhadap kerusakan ini, maka sel tersebut akan melepaskan

enzim fosfolipase yang akan menghidrolisis enzim fosfolipase dan menghasilkan asam arakhidonat. Setelah asam arakhidonat tersebut bebas akan segera diaktifkan oleh beberapa enzim, diantaranya lipooksigenase dan siklooksigenase. Bila jaringan cedera, misalnya karena terbakar, teriris, atau karena infeksi kuman, maka pada jaringan ini akan terjadi serangkaian reaksi yang merusak jaringan. Reaksi-reaksi ini juga menyebabkan jaringan yang cedera diperbaiki atau diganti dengan jaringan baru. Rangkaian reaksi yang terjadi pada tempat jaringan cedera ini disebut radang (Hamid, 1986).

Telah diteliti beberapa jenis tanaman yang memiliki kemampuan sebagai agen antiinflamasi, salah satunya dari marga *Piper*. Berbagai jenis anggota *Piper* digunakan sebagai pengobatan tradisional dan telah diteliti bahwa tanaman ini mengakumulasi metabolit sekunder dengan aktivitas biologi yang berbeda. Kandungan senyawa metabolit sekunder utama pada *Piper* adalah golongan senyawa flavonoid, alkaloid, senyawa polifenolat, tannin dan minyak atsiri (Puspitasari, 2010). Senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada *Piper* tersebut mempunyai aktivitas biologis, yaitu dapat berperan sebagai anti inflamasi. Senyawa alkaloid merupakan metabolit sekunder yang mampu bertindak sebagai antiinflamasi.

Pemanfaatan isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) yang digunakan melalui 3 dosis bertingkat pada tiap kelompok perlakuan dengan dosis 15 mg/KgBB yang pada penelitian adalah dosis tertinggi, berdasarkan hasil uji Tukey HSD dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB tidak berbeda signifikan dengan kontrol

positif natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB (nilai signifikansi 0,571 pada lampiran 9). Hal ini berarti isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB memiliki kemampuan menghambat inflamasi sebanding dengan natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB dengan persen daya antiinflamasi (Tabel 2) dari dosis 15 mg/KgBB sebesar 50,59%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hidayati, *et al.*, (2008) bahwa AINS seperti Na-diklofenak diduga dapat menekan respon pada fase akhir, yang juga disebut fase PG, karena kemampuan menekan migrasi leukosit mononuklear ke jaringan radang. Dari pernyataan tersebut berarti isolat alkaloid lada diduga mampu menekan migrasi leukosit mononuklear ke jaringan radang dengan dosis yang semakin tinggi memungkinkan penurunan persentase radang.

Penelitian ini menggunakan karagenin yang akan menginduksi cedera sel dengan dilepaskannya mediator yang mengawali proses inflamasi. Penelitian ini menunjukkan terbentuknya volume udem maksimum terjadi pada menit ke 180 (Tabel 1) atau pada jam ke tiga. Hal tersebut sesuai dengan penelitian terdahulu, yaitu edema berkembang cepat 3 jam setelah induksi dan bertahan pada volume maksimal sekitar 5 jam setelah induksi (Morris 2003; Zubaidi 1975). Setelah injeksi karagenin, terjadi respon yang menyebabkan edema yang terbagi dalam dua fase. Fase awal berhubungan dengan pelepasan histamin dan serotonin. Antara fase I dan II, edema dipertahankan oleh kinin. Fase kedua berhubungan dengan pelepasan prostaglandin (PG) dan *Slow Reacting Substances* yang mencapai puncak pada 3 jam. Pemberian

karagenin subplantar tersebut akan meningkatkan kadar COX-2 (Hidayati, *et al.*, 2008).

Secara statistik didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dan pembanding natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB, isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB, dosis 10 mg/kgBB, dan dosis 15 mg/kgBB ($p < 0,05$) (lampiran 9). Hal ini menandakan sensitisasi karagenin terhadap tikus wistar berhasil menimbulkan reaksi inflamasi yang diperantarai COX-2, sehingga terjadi proses inflamasi karena sintesis prostaglandin. Prostaglandin dapat meningkatkan aliran darah ke tempat yang mengalami inflamasi, meningkatkan permeabilitas kapiler dan merangsang reseptor nyeri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hidayati, *et al.*, (2008) bahwa pemberian karagenin subplantar tersebut akan meningkatkan kadar COX-2. *Cyclooxygenase-2* (COX-2) adalah enzim kunci yang mengkonversi asam arakhidonat, PG dan tromboksan. COX-2 di induksi oleh berbagai rangsangan inflamasi seperti sitokin dan lipopolisakarida (LPS) dalam sel *in vitro* dan *in vivo* (Monneret, *et al.*, 2001; Wang, *et al.*, 2009; Rozsasi & Keck, 2010). Untuk mengetahui lebih dalam mengenai kekuatan ikatan isolat alkaloid lada pada enzim siklooksigenase, penelitian ini dilanjutkan dengan *docking* menggunakan aplikasi Autodock.

Uji *in silico* dilakukan untuk mengetahui konformasi energi ikatan ligan (senyawa uji) yang paling rendah terhadap ligan uji (3PGH) menggunakan software AutoDock 4.2. 3PGH merupakan kompleks antara enzim COX-2 dengan inhibitor non-selektif Flurbiprofen (FLP) (Agistia, *et al.*, 2013),

enzim COX-2 ini merupakan enzim yang berperan aktif dalam pembentukan prostaglandin sebagai mediator rasa nyeri. Struktur molekul 3PGH diunduh dari situs www.rcsb.org berupa berkas pdb (*protein database*) dengan kode protein yaitu FLP. Sebelum proses validasi dilakukan, reseptor 3PGH harus dipreparasi terlebih dahulu dengan cara menambahkan atom H. Hal ini dikarenakan *file* reseptor tersebut belum mengandung atom H. *Native ligand* dari reseptor 3PGH adalah Flurbiprofen (FLP). Setelah dilakukan proses validasi skor *docking*-nya adalah -8,9 kkl/mol.

Pada tahapan *docking* ligan uji senyawa *marker* lada (*Piper nigrum*) ke reseptor 3PGH diperoleh skor *docking* dari *Piperine* sebesar -8,0 kkl/mol; *Piperamide* sebesar -6,4 kkl/mol; *Pipericide* sebesar -7,6 kkl/mol; *Piperettine* sebesar -7,9 kkl/mol; *Piperolein B* sebesar -7,2 kkl/mol; *Isopiperolein B* sebesar -7,2 kkl/mol; *Sarmentine* sebesar -6,5 kkl/mol; *Tricholein* sebesar -7,2 kkl/mol. Skor *docking* ini berada di bawah skor *native ligand*. Sehingga diketahui ikatan *native ligand* dengan reseptor 3PGH bersifat lebih kuat jika dibandingkan dengan ligan uji senyawa *marker* lada (*Piper nigrum*). Sedangkan ligan pembanding membutuhkan energi sebesar -6,9 kkl/mol. Dari senyawa yang di *docking*-kan, urutan senyawa dengan skor terbaik adalah sebagai berikut *native ligand* (FLP) > *Piperine* > *Piperettine* > *Pipericide* > *Isopiperolein B* > *Piperolein B* > *Tricholein* > pembanding natrium diklofenak > *Sarmentine* > *Piperamide*. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa ligan asli memiliki interaksi ikatan yang lebih stabil dengan protein 3PGH dibandingkan beberapa ligan uji, dan senyawa *marker*

lada (*Piper nigrum*) yaitu *Piperine* memiliki energi ikatan yang lebih baik dari beberapa ligan uji lainnya dan memiliki potensi lebih baik sebagai antiinflamasi dibandingkan dengan natrium diklofenak. Piperin sebagai ligan uji senyawa *marker* dari lada yang memiliki nilai *binding energy* paling baik memiliki skor sebesar -8,0 kkal/mol dan nilai RMSD sebesar 1,438 Å yang terletak pada konformasi ke 7. Pada hasil visualisasi (Tabel 4) menunjukkan bahwa senyawa uji tersebut mempunyai 6 ikatan hidrogen yang berinteraksi dengan asam amino yaitu *Leucine* pada posisi 93 (LEU93); *Leucine* pada posisi 352 (LEU352); *Valine* pada posisi 116 (VAL116); *Valine* pada posisi 349 (VAL349); *Valine* pada posisi 523 (VAL523); dan *Alanine* pada posisi 527 (ALA527).

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi DS *Visualizer*, pada hasil tumpukan/ *overlay* (Tabel 5) antara struktur *native ligand* dan senyawa uji memperlihatkan kedua struktur tersebut menumpuk atau saling melapisi. Kemudian setelah ditambahkan asam amino dan ikatan Hidrogen untuk mengetahui interaksinya pada struktur senyawa uji, terlihat pada Gambar 17 bahwa asam amino Tirosin berperan sebagai akseptor sedangkan Leusin, Valin, dan Alanin berperan sebagai pendonor.

Apabila dibandingkan skor *dockingnya* dengan senyawa pembanding, hasil ikatan *Piperine* dengan reseptor 3PGH lebih baik. Skor *docking* natrium diklofenak adalah -6,9 kkal/mol, sehingga diprediksi ikatan ligan uji tersebut ke reseptor 3PGH bersifat lebih kuat dibanding ikatan dari senyawa pembanding ke reseptor 3PGH. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa

senyawa uji piperin dan senyawa pembanding melekat pada residu yang sama, yaitu leusin ke 352, valin ke-349, valin ke-523, dan alanin ke-527. Dengan melihat hasil *scoring* dan interaksi secara visual, *Piperine*, *Piperettine*, *Pipericide*, *Isopiperolien B*, *Piperolein B*, dan *Tricholein* memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antiinflamasi (COX *inhibitor*). Natrium diklofenak sebagai senyawa pembanding termasuk jenis AINS (obat antiinflamasi nonsteroid) dengan aksi antiradang paling kuat, dan efek samping obat relatif lebih ringan dibanding obat segolongan. Obat ini sering digunakan untuk segala macam nyeri, juga pada migrain dan encok (Tjay dan Rahardja, 2002). Mekanisme kerja Natrium Diklofenak adalah dengan menghambat enzim siklooksigenase sehingga pembentukan prostaglandin menjadi terhambat. Natrium diklofenak merupakan derivat fenilasetat yang kuat anti radangnya dengan efek samping yang relatif ringan dibandingkan obat jenis lainnya (Ganiswarna, 2005).