

Uji Aktivitas Antiinflamasi Isolat Alkaloid Lada (*Piper nigrum* L.)  
pada Tikus Galur Wistar: Studi *In Vivo* dan *In Silico*

*Anti-inflammatory Activity Test of Isolate Alkaloids Pepper (Piper nigrum L.)  
in Wistar rats: In Vivo and In Silico Studies*

\*Puguh Novi Arsito, \*\*Aditya Rizqi Abdi Setyo  
Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta\*  
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta\*\*  
aras.radit@gmail.com

## ABSTRACT

Inflammation occurs as the attempt of body to inactivate organisms that attack the body, removing irritants and regulate tissue repair. One of the medicinal plants used empirically as antiinflammation is the pepper (*Piper nigrum* L.). This study aims to analyze the anti-inflammatory activity of isolate alkaloid of pepper (*Piper nigrum* L.) against to cyclooxygenase enzyme in Wistar rats that induced by carrageenin in accordance with in vivo and in silico test used molecular docking method. This study used experimental design, the strain wistar male rats as test animals. As much as 25 rats, divided into 5 groups. Group I: without treatment. Group II: Natrium Diclofenac as comparative compound dose of 13.5 mg / kgBB. Group III. IV, V: use isolate alkaloid of pepper dose of 5; 10 and 15 mg/kgBB. The measurement result of udem volume is measure the value of *Area Under Curve* (AUC) and % of anti-inflammatory power then the data is analyzed to understand the differences among groups. Besides in vivo test, in silico test also apply in this research using molecular docking method with auto dock tools to the COX-2 as target receptor. The result shows, the provision of isolate alkaloid of pepper (*Piper nigrum* L.) dose of 15 mg/KgBB to rats will increase the Anti-Inflammatory Power (50, 59%) in foot of edema wistar rats model that induced by carrageenin. Based on the results of Tukey HSD test with a level of 95% shows that isolate alkaloid of pepper dose of 15 mg/kgBB is not significantly different from the comparative compound natrium diclofenac dose of 13.5 mg/kgBB. Isolate alkaloid of pepper dose of 15 mg/kgBB has ability to inhibit inflammatory as well as natrium diclofenac dose 13.5 mg / kgBB. In silico test of some marker compound pepper (*Piper nigrum*) that have potential to be developed as an anti-inflammatory agent, Piperine with the value of binding energy of -8.0 kcal/mol is more powerful than the comparative compound natrium diclofenac (docking score: -6.9 kcal / mol). The results of visualization showed that the test compound piperine and comparative compound were bonded with the same residue, that was leucine 352, valine 349, valine 523, and alanine 527. The conclusion of this study is alcaloid isolate from *Piper nigrum* have activity as an anti-inflammatory agents suspected to inhibit the cyclooxygenase enzyme.

**Keywords:** Anti-inflammatory, Rat, Docking, Piperine, Cyclooxygenase-2, Carragenin

### INTISARI

Inflamasi adalah usaha tubuh untuk mengeliminasi organisme asing yang masuk ke dalam tubuh, menghilangkan zat iritan dan mengatur perbaikan jaringan. Salah satu tanaman obat yang digunakan secara empirik sebagai antiinflamasi adalah lada (*Piper nigrum* L.). Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiinflamasi dari isolat alkaloid dari lada (*Piper nigrum* L.) terhadap enzim *cyclooxygenase* pada tikus galur Wistar yang terinduksi karagenin secara *in vivo* dan uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental, dengan tikus jantan galur wistar sebagai hewan uji. Sebanyak 25 ekor tikus, dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok I: tanpa perlakuan. Kelompok II: senyawa pembanding natrium diklofenak dosis 13,5 mg/kg BB. Kelompok III, IV, V: Isolat alkaloid lada dengan dosis 5; 10 dan 15 mg/kgBB. Hasil pengukuran volume udem dihitung nilai *Area Under Curve* (AUC) dan % daya antiinflamasi kemudian data dianalisis untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Selain uji *in vivo*, pada penelitian ini juga dilakukan uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking* dengan *auto dock tools* pada target reseptor enzim COX-2. Hasil penelitian antiinflamasi pada tikus pemberian isolat alkaloid dari lada (*Piper nigrum* L.) dosis 15 mg/KgBB tikus dapat menaikkan persen daya antiinflamasi (50,59%) pada tikus wistar model edema kaki dengan induksi karagenin. 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. Isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB memiliki kemampuan menghambat inflamasi sebanding dengan natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB. Pada uji *in silico*, dari beberapa senyawa marker lada (*Piper nigrum*) yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antiinflamasi, *Piperine* dengan nilai binding energi sebesar -8,0 kkal/mol bersifat lebih kuat jika dibandingkan dengan senyawa pembanding natrium diklofenak (skor *docking*: -6,9 kkal/mol). 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. Kesimpulan dari penelitian ini adalah isolat alkaloid dari *Piper nigrum* memiliki aktivitas sebagai agen antiinflamasi diduga dapat menghambat enzim *cyclooxygenase*.

Kata kunci: Antiinflamasi, Tikus, *Docking*, Piperin, *Cyclooxygenase-2*, Karagenin

## PENDAHULUAN

Inflamasi atau radang merupakan penyakit yang kerap dijumpai dalam masyarakat, yaitu respon biologis dari reaksi kimia secara berurutan dan bertugas melindungi tubuh dari infeksi dan perbaikan jaringan yang rusak akibat trauma. Tanda-tanda yang dimiliki pada umumnya yaitu bengkak, nyeri, kemerahan, panas dan hilangnya fungsi.

Salah satu obat tradisional yang dipakai masyarakat Indonesia sebagai antiinflamasi adalah lada. Lada atau *Piper nigrum* merupakan tanaman kelompok *Pyridine* dan famili *Piperaceae*. Adapun kandungan senyawa yang terdapat pada lada antara lain piperin 5–9 %, piperonal 2,5 %, kariofilen 8,8 % dan amilum 50 % (Claus, *et al.*, 1970). Kandungan senyawa yang diduga memiliki aktivitas biologi yaitu piperin (Stahl, 1985).

Fokus penelitian ini pada uji farmakodinamik interaksi piperin dengan enzim *cyclooxygenase* secara *in vivo* dan *in silico*. Metode yang biasa digunakan dalam penelitian efek antiinflamasi pada inflamasi akut adalah metode udem kaki tikus

terinduksi karagenin dengan pengukuran volume udem dilakukan setiap setengah jam selama 6 jam untuk mendapat hasil pengukuran yang lebih baik. Zat aktif *piperine* yang diisolasi dari lada hitam juga diketahui memiliki efek antiinflamasi pada inflamasi akut maupun inflamasi kronik masing-masing melalui metode udem kaki tikus terinduksi karagenin (Mujumdar, *et al.*, 1990).

Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi isolat alkaloid Lada (*Piper nigrum* L.) dengan menggunakan metode penambatan molekul (*molecular docking*). Hasilnya akan dinyatakan dalam skor penambatan dan visualisasi bentuk ikatan ligan dan reseptor pada uji *in silico*.

## METODE PENELITIAN

### Alat.

*Personal Computer* (PC), *Soxhlet*, *rotary evaporator*, *Plestimometer UGO BASILE*, pipa kapiler, alat timbang hewan uji, *stopwatch*, alat-alat gelas, spuit injeksi ukuran 1 ml, spuit injeksi per oral ukuran 5 ml

### **Bahan.**

Lada (*Piper nigrum* L.), pelarut etilasetat, etanol 96%, CMC 0,5%, silika gel 60 F<sub>254</sub>, etilasetat : n-heksan (1:4), dan pereaksi *Dragendorf*. Karagenin 1%, Natrium diklofenak, NaCl fisiologis dan aquades, dan tikus putih jantan galur Wistar umur 2-3 minggu disiapkan sebanyak 25 ekor dengan berat badan 100-150 gram.

### **Metode Sokletasi**

Serbuk simplisia lada sebanyak 100 mg dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi pada *Soxhlet*. Pelarut etilasetat sebanyak 300 ml dimasukan ke dalam labu alas bulat. Kemudian *soxhlet* diletakkan di atas pemanas dan dibagian atas dihubungkan dengan pendingin (kondensor) yang dialiri air. Proses ekstraksi dilakukan hingga pelarut yang merendam ekstrak terlihat bening selama  $\pm$  5 jam. Filtrat yang tertampung pada labu alas bulat kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm.

### **Isolasi Kristal Piperin**

Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan terlindung dari

sinar matahari selama 2 hari. Kristal yang terbentuk, kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh kristal berwarna kuning.

### **Identifikasi Piperin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak yang digunakan adalah etilasetat : n-heksan (1:4) serta pembanding *quinine*. Identifikasi dengan KLT dilakukan dengan cara menotolkan pembanding dan kristal yang telah dilarutkan dengan etilasetat pada plat dengan bantuan pipa kapiler kemudian dielusi dengan fase gerak di dalam bejana tertutup rapat yang telah dijenuhkan dengan fase gerak tersebut. Elusi dihentikan pada saat fase gerak mencapai batas yang telah ditentukan yaitu 1 cm sebelum ujung akhir plat kemudian plat dikeluarkan dari bejana. Pengamatan bercak dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan pereaksi *Dragendorf*.

### **Pembuatan larutan karagenin 1%**

Suspensi karagenin dibuat dengan kadar 1% dalam larutan NaCl fisiologis. Karagenin ditimbang

seksama sebanyak 0,1 gram kemudian dilarutkan ke dalam NaCl fisiologis sampai volume 10 ml hingga diperoleh suspensi karagenin dengan kadar 1%. Volume suspensi karagenin yang disuntikkan pada telapak kaki belakang tikus sebanyak 0,1 mL.

### **Pembuatan larutan Na diklofenak**

Dosis yang diberikan berdasarkan dosis harian orang dewasa 100-200 mg per hari, jika dikonversikan pada pemberian tikus adalah sebagai berikut :

$$150 \text{ mg} \times 0,018 = 2,7 \text{ mg} / 200 \text{ gram kg BB} \\ = 13,5 \text{ mg/kg BB}$$

Sediaan uji Natrium diklofenak diberikan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%. Sejumlah 60 mg Na diklofenak dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 10 mL dengan bantuan pengadukan dan vortex hingga didapatkan larutan yang homogen, sehingga didapatkan larutan 6 mg/mL.

### **Metode *In Vivo***

Metode yang dipakai adalah metode edema terinduksi pada telapak kaki tikus (*rat hind paw*). Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar, umur 2-3 minggu, berat badan 100-

150 g sebanyak 25 ekor dibagi menjadi lima kelompok masing-masing 5 ekor, yakni sebagai berikut:

Kelompok I (kontrol negatif) diberikan air suling 2 mL/100 g BB tikus secara oral; kelompok II (pembeding) diberikan Na diklofenak dosis 13,5 mg/Kg BB secara oral; kelompok III diberikan isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB secara oral; kelompok IV diberikan isolat alkaloid lada dosis 10 mg/Kg BB secara oral; dan kelompok V diberikan isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB secara oral.

Karagenin diberikan pada waktu optimal yang dapat menimbulkan efek antiinflamasi. Larutan karagenin 1% diberikan secara subplantar untuk tiap-tiap tikus. Pengukuran volume edema kaki segera dilakukan dengan mencelupkan kaki (sampai tanda) ke dalam *plestimometer*, dan dicatat sebagai menit ke-0. Kemudian pengukuran dilakukan setiap 30 menit selama enam jam. Pemberian bahan uji menggunakan rute oral karena rute yang dipilih disesuaikan dengan rute yang digunakan pada manusia.

### Metode *In Silico*

Senyawa *marker* dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggambar struktur senyawa *marker* menggunakan aplikasi *MarvinSketch* pada sistem operasi *Linux*. Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) dalam format “.*pdb*”. Berkas protein/reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cyclooxygenase-2* dengan kode protein yaitu 3PGH. Setelah protein diunduh lalu dilakukan preparasi protein target dalam format PDBQT. Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan protein target. Hasil preparasi protein dilakukan preparasi lebih lanjut dengan aplikasi *AutoDockTools* dengan menambahkan atom hidrogen polar yang berfungsi untuk memberikan muatan parsial (*partial charges*) dalam protein target tersebut. Selain itu target protein perlu ditambahkan muatan melalui pilihan *Kollman Charges* dan disimpan dalam format \*.*pdbqt*. Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa *marker* dari

Lada (*Piper nigrum* L.), yang akan diteliti sebagai antiinflamasi. Struktur ligan didesain melalui aplikasi *ChemDraw* dan dipilih dalam bentuk 3D SDF. *File* ligan tersebut dibuka melalui aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan disimpan dalam format PDB (\*.*pdb*). Setelah dilakukan preparasi protein target selanjutnya dilakukan *input* ligan melalui perintah *Open Ligand* pada aplikasi *AutoDockTools*. Ligan yang telah masuk ke dalam protein target kemudian dilakukan preparasi dalam hal *Torsion Free* dan *Aromatic Carbons* dan disimpan dalam format \*.*pdbqt*. Aplikasi *AutoDockTools* yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan penyiapan *Grid Box*. *Grid Box* merupakan penentuan area untuk simulasi *docking*. Kemudian hasil *grid* disimpan dalam format *grid parameter file* (\*.*gpf*). Proses *docking* dapat dilakukan pengaturan melalui perintah *Search Parameters* dan *Docking Parameters*. Selanjutnya pada bagian *output* dipilih *Lamarckian Genetic Algorithm* dan disimpan dalam format *docking*

*parameter file* (\*.dpf). Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan AutoDock 4.2 melalui Cygwin Terminal. *File* hasil preparasi sebelumnya yang meliputi *Target.pdbqt*, *Ligand.pdbqt*, *parameter file* (\*.gpf), dan *docking parameter file* (\*.dpf) disimpan dalam 1 folder pada Cygwin Terminal. Hasil simulasi *docking* ini berupa *file* dengan format \*.dlg yang berisi informasi 10 konformasi dan *file* complex.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil. Validasi *molecular docking* bertujuan untuk menentukan apakah protein yang digunakan untuk *molecular docking*-nya dapat digunakan atau tidak. Validasi *molecular docking* ini dilakukan dengan cara menentukan nilai RMSD. Nilai RMSD yang dikatakan valid adalah <2.00 Å.

#### **Pengolahan Data dan Analisa Data**

Data yang diperoleh dari uji efek antiinflamasi adalah data volume kaki tikus yang diberi perlakuan. Volume udem merupakan selisih dari volume kaki sebelum dan sesudah diradangkan dengan karagenin 1%. Perhitungan dapat dilakukan dengan rumus:

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan:

$V_u$  : Volume udem kaki tikus tiap waktu  $t$

$V_t$  : Volume kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1% pada waktu tertentu

$V_o$  : Volume awal kaki tikus sebelum diradangkan dengan karagenin 1%.

Nilai AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume udem rata-rata tiap satuan waktu dengan rumus:

$$AUC = \frac{V_{t_{n-1}} + V_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan :

AUC : *Area Under Curve* (Luas di bawah kurva)

$V_{t_{n-1}}$  : volume udem rata-rata pada waktu  $t_{n-1}$  (setengah jam sebelumnya)

$V_{t_n}$  : volume udem rata-rata pada waktu ke- $t_n$

$t_n$  : waktu

$t_{n-1}$  : waktu, saat setengah jam sebelum

Hasil perhitungan AUC digunakan untuk mengetahui prosentase Daya Anti Inflamasi (%DAI). Prosentase Daya Anti

Inflamasi (%DAI) dihitung dengan membandingkan  $AUC_{0-6}$  perlakuan terhadap kontrol, dengan rumus sebagai berikut :

$$\%DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

%DAI : Prosentase Daya Anti Inflamasi

$AUC_k$  : *Area Under Curve* kelompok kontrol

$AUC_p$  : *Area Under Curve* kelompok perlakuan

Tahap awal analisis statistik hasipenelitian dilakukan dengan tes Kolmogorov-Smirnov yang digunakan untuk mengetahui apakah data hasil penelitian terdistribusi normal atau tidak, Levene Test untuk mengetahui homogenitas variannya, karena data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan analisis varian satu jalan (*Oneway Anova*) dengan taraf kepercayaan 95%. Setelah diuji *Oneway Anova* ternyata mendapatkan nilai  $p < 0,05$ , yang berarti terdapat sedikitnya dua kelompok data yang berbeda bermakna maka dilanjutkan dengan melakukan analisis *Post Hoc Test* dengan uji Tukey HSD untuk

mengetahui data yang memiliki perbedaan bermakna. Untuk mengolah data digunakan program komputer Microsoft Excel dan SPSS versi 16.

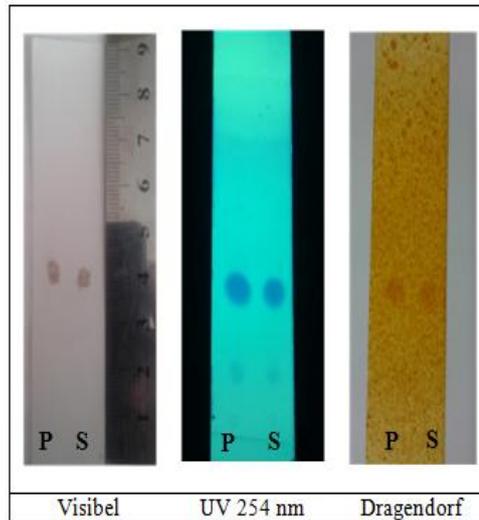
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Ekstraksi

Dari hasil sokletasi serbuk simplisia lada menggunakan penyari etilasetat dengan perbandingan 1: 3, yaitu serbuk lada 100 mg dengan pelarut etilasetat 300 ml diperoleh kristal piperin seberat 2 gram yang berwarna kuning dan berbau khas.

#### Identifikasi Senyawa dengan KLT

Identifikasi piperin dengan KLT menggunakan fase diam yaitu silika gel 60  $F_{254}$  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 *Dragendorf* dengan hasil seperti Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Identifikasi KLT

Keterangan:

Fase diam: Silika Gel 60 F<sub>254</sub> ;

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.

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

Kaki tikus yang telah diinduksi karagenin setiap 30 menit setelah penyuntikan sampai dengan 6 jam, diukur dengan cara dicelupkan kedalam air pada alat plethismometer ( $V_t$ ), penambahan volume kaki untuk setiap pengukuran tersebut didata dan dihitung volume udem. Rata-rata volume udem telapak kaki tikus masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat dalam tabel 1.

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

**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.

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).

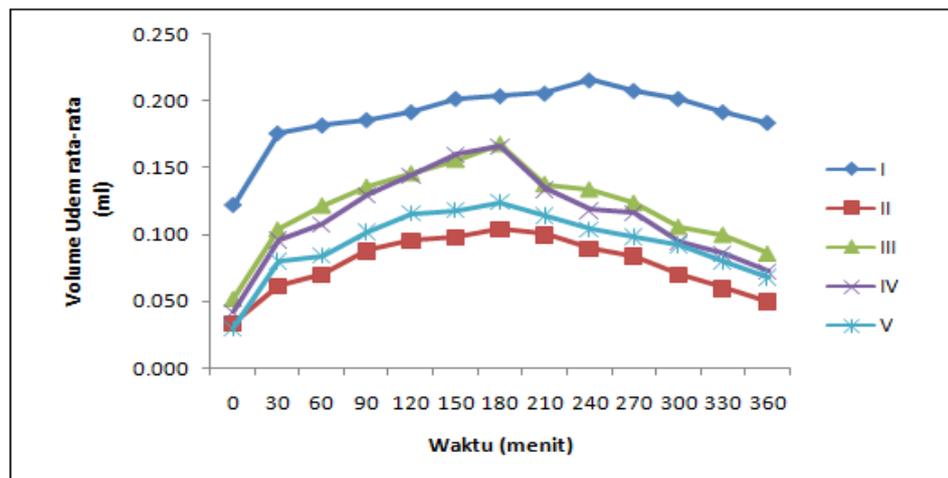
Pada kelompok pembanding, volume udem meningkat sampai menit ke-180. Volume udem

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

Efek antiinflamasi pembeding 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 2).



Gambar 2. Grafik Volume Udem Setiap Kelompok Uji

Keterangan : I = kelompok kontrol negatif air suling 2 mL/100 g BB; II = kelompok pembeding 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.

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.

Penambatan molekul yaitu penelitian dengan metode komputasi yang bertujuan 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 dianggap 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 VMD (*Visual Molecular Dynamics*). Aplikasi VMD akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D. Aplikasi VMD juga dapat digunakan untuk mendeteksi bentuk ikatan dan jarak dari struktur yang diuji dengan reseptornya. Langkah selanjutnya yaitu dilakukan *molecular docking* menggunakan aplikasi

AutoDock. Setelah didapatkan skor penambatan, kemudian akan dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. *DS Visualizer* merupakan sebuah aplikasi penampil gratis yang digunakan untuk visualisasi hasil dari penambatan molekuler. 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 menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil Docking

Ligan	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)	-6,9	8 ikatan ; TRP387, PHE518, MET522, VAL523, ALA527, SER530, VAL349, LEU352
Ligan Uji ( <i>Piperine</i> )	-8,0	6 ikatan ; LEU93, LEU352, VAL349, VAL523, ALA527, VAL116
Ligan Uji ( <i>Piperamide</i> )	-6,4	8 ikatan ; PHE470, GLU524, PRO86, VAL89, PRO84, VAL116, ARG120, TYR122
Ligan Uji ( <i>Pipericide</i> )	-7,6	3 ikatan ; ALA527, LEU352, VAL523
Ligan Uji ( <i>Piperettine</i> )	-7,9	5 ikatan ; SER530, VAL116, TYR355, TYR385, TRP387
Ligan Uji ( <i>Piperolein B</i> )	-7,2	4 ikatan ; LEU352, LEU93, TYR115, ALA527
Ligan Uji ( <i>Isopiperolin B</i> )	-7,2	7 ikatan ; TRP387, TYR385, VAL116, TYR355, LEU93, VAL523, MET522
Ligan Uji ( <i>Sarmentine</i> )	-6,5	8 ikatan ; PHE518, LEU352, TYR355, LEU359, LEU531, VAL116, ARG120, VAL523
Ligan Uji ( <i>Tricholein</i> )	-7,2	6 ikatan ; VAL116, LEU93, LEU352, PHE518, VAL523, ALA527

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](http://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

kkal/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 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).

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).

## KESIMPULAN

1. Isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) memiliki efek sebagai antiinflamasi dengan menghambat enzim *cyclooxygenase* secara *in vivo* hal ini dapat terlihat pada penurunan volume udem kaki tikus pada kelompok perlakuan III, IV dan V dan nilai  $p < 0,05$

dari kelompok perlakuan tersebut yang berbeda signifikan dengan kontrol negatif.

2. Isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) dengan dosis optimal 15 mg/KgBB tikus memiliki kemampuan menghambat inflamasi sebanding dengan natrium diklofenak dosis 13,5 mg/kgBB karena tidak berbeda signifikan dan dapat menaikkan persen Daya Anti Inflamasi pada tikus wistar model edema kaki sebesar 50,59%.
3. Melalui analisis *molecular docking*, dari beberapa senyawa marker lada (*Piper nigrum*) yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antiinflamasi, *Piperine* dengan nilai binding energi sebesar -8,0 kkal/mol dan berinteraksi dengan asam amino yaitu *Leucine* ke-93, *Leucine* ke-352, *Valine* ke-116, *Valine* ke-349, *Valine* ke-523, dan *Alanine* ke-527. *Piperine* bersifat lebih kuat jika dibandingkan dengan senyawa pembanding natrium diklofenak (skor *docking*: -6,9 kkal/mol). 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.

#### SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan peningkatan dosis Isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) sehingga dapat diketahui dosis maksimum yang dapat memberikan aktivitas antiinflamasi lebih baik.
2. Perlu dilakukan pengujian toksisitas akut dan kronis untuk menunjang tingkat keamanan penggunaan Isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.).

**DAFTAR PUSTAKA**

- Agistia, D.D, Hari P, Maulana T and Agung E.N, 2013, Interaction Between Active Compounds From *Aegle marmelos* Correa as Anti Inflammation Agent With COX-1 and COX-2 Receptor, *Traditional Medicine Journal*, Vol. 18(2), p 80-87
- Claus, E.P., Tyler V.R, Brady, L.R., 1970, *Pharmacognosy*, 6<sup>th</sup> ed., Lea and Febrieger, Philadelphia, 165-166
- Ganiswarna, S.G., 2005, *Farmakologi Dan Terapi edisi IV*, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Jakarta: Universitas Indonesia.
- Hidayati, Nurannis., Shanti Listyawati, dan Ahmad Dwi Setyawan, 2008, Kandungan Kimia dan Uji Antiinflamasi Ekstrak Etanol *Lantana camara* L. Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.), *Bioteknologi*, 5(1):14,15,16.
- Kyle J. M. Bishop, Rafal Klajn, Bartosz A. Grzybowski, 2006. *Angewandte Chemie International Edition* 45, Issue 32: 5348 – 5354
- Mujumdar, A.M., Dhuley, J.N., Deshmukh, V.K., Raman, P.H., and Naik, S.R., 1990, *Antiinflammatory Activity of Piperine*, *Jpn J Med Sci Biol.*, 43 (3), 95-100, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 26 Mei 2015
- Robbins, S.L., dan Kumar, V., 1995, *Buku Ajar Patologi I*, alih bahasa oleh Oswari, J., Edisi IV, 28-33, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Surabaya
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padma Winata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB, Bandung, 205-206
- Tjay, H.T., dan Rahardja, K., 2002, *Obat-Obat Penting, Khasiat Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya*, Edisi V, 303-326, Direktorat POM, Depkes RI, PT Elek Media Komputindo, Kelompok Gramedia, Jakarta
- Wagner H., 1984. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography*, 1st Ed., Springer Verlag, Berlin