

LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN PRODI

**Nama Rumpun Ilmu:
Kesehatan**



Judul:

**UJI DAYA ANTIINFLAMASI DAN ANTIKANKER SENYAWA PIPERIDIN
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

oleh :

Sabtanti Harimurti, Ph.D., Apt	(19730223201310173127)
Hari Widada, M.Sc., Apt	(19770721201004173120)
Puguh Novi Arsito, M.Sc., Apt	(19861107201310173224)
Rifki Febriansah, M.Sc., Apt	(19870227201202173188)

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

2016

JUDUL PENELITIAN

Uji Antiinflamasi Dan Antikanker Senyawa Piperidin Secara *In Vitro* Dan *In Silico*

RINGKASAN

Piperin atau 1-[5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine adalah suatu alkaloid alami yang dapat diekstraksi dari buah lada hitam dan atau buah lada panjang. Secara turun-temurun buah lada yang mengandung piperin ini sudah luas dimanfaatkan sebagai obat kaki bengkak pada ibu hamil, kolera, nyeri haid, rematik, salesma, air mani yang encer, dan impoten. Untuk pengembangan senyawa piperin, modifikasi gugus fungsi dengan sintesis di laboratorium sudah banyak dilakukan untuk menghasilkan senyawa analog yang mempunyai aktifitas serupa tetapi mempunyai bioavailabilitas lebih baik. Berdasarkan data-data tentang manfaat piperin ataupun turunannya pada dunia kesehatan, maka penelitian ini dibuat untuk pemenuhan bahan baku sebagai bahan dasar pembuatan berbagai bentuk sediaan obat yang mudah untuk digunakan. Uji coba sintesis selanjutnya bisa dilakukan dalam skala laboratorium dengan optimasi menggunakan sebuah metode statistik dan matematik *software Response Surface Methodology (RSM)* agar lebih efektif dan efisien dalam hal dana dan waktu. Data-data yang nantinya diperoleh akan sangat bermanfaat bagi industrialisasi sintesis turunan piperin. Sambil menunggu bahan-bahan baku untuk sintesis yang sangat susah untuk diperoleh, maka penelitian tentang daya anti kanker pada sel kanker HeLa dan WiDr dilakukan untuk melengkapi data-data daya antikanker senyaw piperin. Selain itu, uji daya antiinflamasi secara *in vivo* juga dilakukan untuk melihat daya anti inflamasi pada binatang percobaan. Yang mana uji menggunakan binatang percobaan ini merupakan titik awal uji ke tingkat selanjutnya yang pada akhirnya bisa dicobakan kepada manusia.

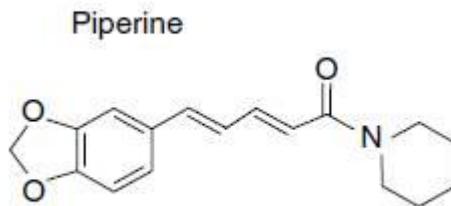
Dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, ekstraksi piperin yang terbaik adalah dengan cara sokletasi, yang ditunjukkan dengan hasil rendemen yang lebih banyak dibandingkan dengan cara ekstraksi yang lain, yaitu maserasi untuk pembandingnya. Sedangkan untuk daya antikanker terhadap sel HeLa dan WiDr terbukti bahwa piperin efektif menghambat sel kanker. Kemudian pada uji anti-inflamasi menggunakan hewan uji (tikus) menunjukkan hasil bahwa piperin dapat menurunkan inflamasi buatan pada kaki tikus.

Kata Kunci: Piperin, Sintesis, Anti kanker, Anti inflamasi, RSM, Industrialisasi

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Piperin adalah suatu alkaloid alami yang dapat diekstraksi dari buah lada dan buah lada panjang. Berasa pedas dan sudah banyak dipakai sebagai obat tradisional dan insektisida. Secara turun-temurun buah lada yang mengandung piperin ini sudah luas dimanfaatkan sebagai obat kaki bengkak pada ibu hamil, kolera, nyeri haid, rematik, salesma, air mani yang encer, dan impoten (Septiatin, 2008). Struktur kimia piperin adalah seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia piperin

Penelitian selanjutnya melaporkan bahwa piperin bermanfaat sebagai penghambat [CYP3A4](#) and [P-glycoprotein](#), enzim penting untuk metabolisme dan transport dari xenobiotik dan metabolit (Bhardwaj et al, 2002). Studi pada binatang, piperin dilaporkan menghambat [CYP 450](#) yang merupakan enzim penting dalam metabolisme obat (Atal et al, 1985). Dengan mekanisme inhibisi beberapa enzim metabolisme, piperin memungkinkan berpengaruh pada bioavailabilitas berbagai obat, seperti telah dilaporkan bahwa piperin mampu meningkatkan bioavailabilitas curcumin sampai 2000% (Shoba et al, 1998). Sebagai anti kanker, piperin telah dilaporkan efektif untuk menyembuhkan kanker prostat (Samyikutty et al, 2013). Selain itu, piperin juga bermanfaat sebagai penstimulasi pigmentasi dengan bantuan sinar UVB yang sangat bermanfaat sebagai penyembuh penderita vitiligo (BBC New, 2008). Piperin juga berefek sebagai anti-depresan dan meningkatkan kesegaran yang dibuktikan dengan penelitian pada tikus (Wattanathorna, 2008). Sebagai anti inflamasi, piperin dilaporkan berefek sebagai anti-arthritis pada manusia dan tikus (Bang, 2009).

Berdasarkan data-data tentang manfaat piperin pada dunia kesehatan, maka penelitian ini dibuat untuk pemenuhan bahan baku sebagai bahan dasar pembuatan berbagai bentuk sediaan obat yang mudah untuk digunakan. Ekstraksi telah dilakukan dalam skala lab dan karakterisasi senyawa serta uji anti inflamasi dan anti kanker juga sudah dilakukan baik secara *in vitro* ataupun *in silico*.

Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah aktifitas anti inflamasi senyawa piperin?
2. Bagaimanakah aktifitas anti kanker senyawa piperin?

Keaslian Penelitian

Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Istiqomah (2013) tentang perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap penetapan kadar piperin buah cabe jawa (*Piper retrofractum fructus*). Hasil penelitian menunjukkan kadar piperin dari ekstrak etanol 95% buah cabe jawa (*Piper retrofractum fructus*) dengan metode maserasi yaitu 70,6255 ng (8,8281%) dan ekstrak etanol 95% buah cabe jawa (*Piper retrofractum fructus*) dengan metode sokletasi yaitu 126,0098 ng (15,7512%). Kadar piperin tertinggi diperoleh dari hasil ekstrak sokletasi. Perbedaan dengan penelitian ini adalah pada penelitian yang telah dilakukan istiqomah (2013), menggunakan etanol sebagai pelarut sedangkan pada penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat. Selain itu, Kolhe *et al* (2011) melakukan penelitian tentang ekstraksi piperin dari *Piper nigrum linn* menggunakan pelarut etil asetat sedangkan pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi *Piper retrofractum fructus* menggunakan pelarut etil asetat.

Prashantha *et al* (2012) juga melakukan penelitian yang berjudul *In Silico Docking Analysis of Piperine With Cyclooxygenases*, hasilnya menunjukkan afinitas antara piperin dengan COX-1 dan COX-2 adalah (-9.06 kcal / mol, $K_i = 227.73$ nM dan -8.77 kcal / mol, $K_i = 375.62$ nM). Pada penelitian Prashantha *et al* (2012), melakukan penambatan molekuler piperin terhadap reseptor Cyclooxygenases sedangkan pada penelitian ini akan dilakukan uji molekuler docking piperin terhadap reseptor kanker payudara yaitu HER2, ER α dan ER β . Menurut Do *et al* (2013), piperin menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis melalui caspase-3 dan PARP. Selain itu, piperin menghambat ekspresi gen HER2 pada proses transkripsi..

Faedah Penelitian

Data-data dari hasil penelitian akan:

- a. Digunakan sebagai dasar bagi pengembangan lebih lanjut dari senyawa turunan/ analog piperin untuk dikembangkan menjadi obat paten yang potensial di dunia medis.
- b. Ditawarkan ke industri bahan baku obat sebagai dasar proses sintesis senyawa analog piperin.
- c. Selain itu untuk edukasi di dunia internasional, data-data dari hasil penelitian akan dipublikasikan di jurnal ilmiah ataupun forum-forum ilmiah.

Tujuan Penelitian

1. Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui aktifitas anti inflamasi senyawa piperin
- b. Untuk mengetahui aktifitas anti kanker senyawa piperin

2. Tujuan Umum

a) Untuk Pengembangan Keilmuan Farmasi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar ilmiah bagi industrialisasi sintesis piperin yang merupakan bahan dasar pembuatan sediaan obat-obat yang berkenaan dengan anti kanker, anti inflamasi dan anti depresan.

b) Untuk Pembangunan Nasional

Penelitian ini dapat dijadikan pemacu kreativitas dan keaktifan peneliti untuk mengeksplorasi factor-faktor yang berpengaruh pada sintesis piperin, seperti suhu reaksi, konsentrasi bahan-bahan penyusunnya, lama pengadukan dan lain-lain. Dengan demikian sintesis piperin dapat dilakukan dengan baik dan efisien yang mana akan sangat membantu dalam swasembada sumber bahan baku obat di Indonesia.

Tinjauan Pustaka

1. Piperine dan Senyawa Turunan Piperidin

Produk herbal yang umum dikenal sebagai lada hitam (*Piper nigrum* Linn), merupakan rempah-rempah yang sangat terkenal di seluruh dunia. Lada hitam telah memainkan peran utama dalam membentuk peristiwa-peristiwa sejarah di dunia. konstituen utamanya adalah Piperin yang merupakan anggota dari keluarga Lipid. Sebagai rempah-rempah aromatik, lada hitam ditandai dengan sedikit dan jelas aroma apak, bau ini adalah karena kehadiran banyak

minyak volatile terutama dalam daging dan kulit buah. Buah *P. nigrum* diketahui mengandung alkaloid piperin dan terutama piperidine, minyak esensial, saponin, flavonoid, dan pati. Sementara itu, daun tanaman terdiri dari piperin dan minyak esensial (Pino, *et al.*, 2003). Rasa pahit yang kuat dari lada hitam adalah karena adanya dua alkaloid utama dalam herbal ini yaitu senyawa piperin dan piperidin majemuk, rasa pahit tajam juga timbul sebagian karena banyak resin tanaman tertentu yang ditemukan dalam biji lada (Kolhe, *et al.*, 2011).

Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas tanaman sebagai antikanker dan immunomodulator (Gomez-Flores *et al.*, 2010, antibakteri (Reddy *et al.*, 2004), antioksidan (Chatterjee *et al.*, 2007), antiproliferatif (Reshmi *et al.*, 2010), dan larvisida (Park *et al.*, 2002). Terkait dengan penelitian potensi antibakteri, Patilaya dkk. (2012) melaporkan bahwa fraksi etil asetat daun *Piper nigrum* memiliki aktivitas potensial terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Siklooksigenase

Siklooksigenase (COX) merupakan enzim kunci dalam biosintesis prostaglandin dan leukotrien dari asam arakidonat (Jager & Staden, 2005). Enzim ini juga merupakan enzim katalitik bifungsional. Pertama, COX bertanggungjawab pada metabolisme asam arakidonat menjadi prostanoid termasuk prostaglandin (PG), prostasiklin (PGI₂), dan tromboksan (TXA₂). Prostanoid terutama prostaglandin E₂ (PGE₂) adalah mediator utama dalam inflamasi. Kedua, COX bertanggungjawab pada fisiologi normal dan homeostasis (Pairet & Engelhardt, 1996).

COX mempunyai dua sisi aktif yang terpisah dan berbeda, yaitu sisi aktif siklooksigenase dan peroksidase (Moore & Simmons, 2000; van Ryn dkk., 2000; Patrono, 2006). Ketika asam arakidonat berikatan dengan sisi aktif siklooksigenase maka akan mengalami siklisasi oksidatif menjadi prostaglandin endoperoksida (PGG₂), yang selain mengandung gugus peroksi juga mengandung satu gugus hidroperoksi. Selanjutnya, gugus hidroperoksi direduksi membentuk gugus alkohol, menghasilkan produk prostaglandin H₂ (PGH₂) (Orbayinah dkk., 2003). PGH₂ kemudian akan dikonversikan menjadi beberapa jenis eikosanoid seperti PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂, dan TXA₂ (Brooks dkk., 1999).

Jenis-Jenis COX

Sampai saat ini COX ditemukan dalam 3 isoform yaitu siklooksigenase 1 (COX-1), siklooksigenase 2 (COX-2), dan siklooksigenase 3 (COX-3).

1) *Siklooksigenase-1 (COX-1)*

Struktur utama COX-1 pertama kali dikarakterisir pada domba dan sejumlah spesies (Sirois dkk., 2004). COX-1 diekspresikan secara konstitutif di hampir semua jaringan pada kondisi basal. Enzim ini merupakan satu-satunya bentuk enzim yang ada pada platelet matang dan diekspresikan di pembuluh darah endotelium epitel gastro, *spinal cord*, otak dan ginjal, serta beberapa jaringan lain (Fries & Grosser, 2005). Pada jaringan-jaringan tersebut enzim ini memiliki peran dalam pemeliharaan kehidupan sel (*housekeeping*) atau perlindungan untuk mensintesis prostaglandin yang dibutuhkan dalam pengaturan aktivitas fungsi sel normal. Konsentrasi enzim COX-1 ini jumlahnya kecil namun stabil (Vane & Botting, 1996).

2) *Siklooksigenase-2 (COX-2)*

Enzim ini pertama kali dikarakterisir pada tahun 1991 pada fibroblas embrio ayam (Sirois dkk., 2004). COX-2 diinduksi pada sel-sel yang terpapar oleh agen-agen pro-inflamasi, termasuk sitokin, mitogen dan endokrin. Selain itu, enzim ini juga dapat dinaikkan regulasinya hingga 20 kali lipat pada makrofag, monosit, sinoviosit, kondrosit, fibroblas, dan sel endotelial oleh berbagai rangsang selama proses inflamasi (Brooks dkk., 1999). Tidak seperti COX-1, yang terekspresi di platelet matang, COX-2 tidak diekspresikan di platelet matang, meski hanya sejumlah kecil protein COX-2 terdeteksi pada platelet *immature* (Fries & Grosser, 2005).

3. *Docking Molekuler*

Docking molekuler merupakan suatu metode komputasi untuk menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein, hal ini termasuk salah satu uji *in silico*. Proses *docking* diawali dengan penerapan *docking algorithm* yang memosisikan ligan pada sisi aktif dengan konformasi tertentu dan urutan pencarian konformasi tertentu, kemudian *scoring function* yang melengkapi *docking algorithm* akan mengevaluasi konformasi dengan melakukan perhitungan berdasarkan sifat fisikokimia untuk memperoleh struktur molekul yang optimal. Software yang dapat digunakan diantaranya *docking* PLANTS yang merupakan program yang dikembangkan untuk memprediksi interaksi ligand dengan target biomakromolekul.

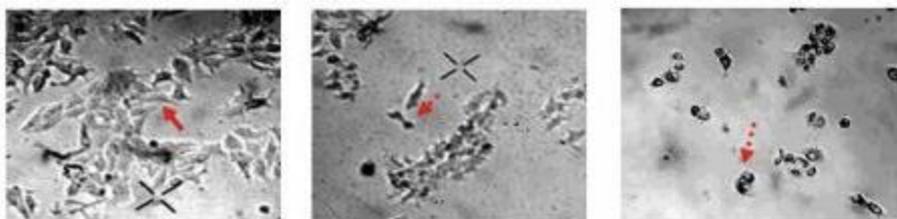
4. Uji Sitotoksik

Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay* (Junedy,2005).

Uji MTT *assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. (Doyle dan Griffith, 2000). Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC₅₀ merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto, 2003). Semakin besar harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004). Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi persen sel yang mampu bertahan dihidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dan Griffiths,2000 *cit* Nurrochmad, 2001).

5. Sel Kanker Serviks HeLa

Sel HeLa merupakan salah satu model sel kanker serviks yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan serviks seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim,2007). Sel HELA memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner et al., 1998; Aouali *et al.*, 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt *et al.*, 2000; Amundson *et al.*, 2005).



Gambar 1. Morfologi sel HELA pada perlakuan EP dan FKP. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5x10³ sel HELA dengan EP (25-100 µg/mL) dan FKP (10-500 µg/mL) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75 µg/mL, C adalah sel dengan perlakuan FKP 70 µg/mL.

6. Sel Kanker Kolon WiDr

Sel WiDr merupakan salah satu model sel kanker kolon yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan kolon seorang wanita Kaukasian berumur 76 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh RPMI yang mengandung *foetal bovine serum* (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel WiDr memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner *et al.*, 1998; Aouali *et al.*, 2003), overekspresi COX-2 (Butt *et al.*, 2000; Amundson *et al.*, 2005).

II. METODOLOGI PENELITIAN

Sintesis Turunan Piperidine

1. Alat Penelitian

- Labu alas bulat 250 mL
- Magnetig stirrer
- Adaptor Claisen
- Termometer
- Pendingin Leibig
- Conector
- Beaker Glass 500 mL
- Pemanas listrik
- Labu alas bulat leher tiga
- Corong gelas
- Penangas es
- Erlenmeyer 250 mL
- Pendingin balik
- Corong Buchner

2. Bahan Penelitian

- Metil 4-bromo-2-butenolat (pro sintesis)
- Metil 2-bromoetenoat (pro sintesis)
- Trietilfosfit (pro sintesis)
- Vanillin (pro sintesis)
- Natrium metoksida
- Etil asetat (p.a)
- Heksana (p.a)

Cara Kerja

1. Preparasi senyawa piperin dan turunannya

Serbuk simplisia lada putih sebanyak 100 mg dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi pada *soxhlet*. Pelarut etil asetat sebanyak 300 ml dimasukkan 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 tidak berwarna selama ± 5 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm.

Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan dalam wadah yang terlindung dari sinar matahari selama 7 hari. Kristal yang terbentuk, kemudian dicuci dengan terlebih dahulu memisahkan kristal yang terbentuk dengan ekstrak. Kemudian, kristal dicuci menggunakan 20 ml etanol 96% dengan bantuan pengadukan. Etanol yang digunakan untuk mencuci kemudian dibuang. Pencucian dilakukan 3 kali hingga diperoleh kristal berwarna kuning.

2. Uji Aktivitas Senyawa Piperin

a. Docking Molekuler (*In silico*)

Pertama-tama dilakukan pengunduhan protein Bcl-2 yang akan diposisikan sebagai reseptor, pengunduhan ini dilakukan melalui PDB (*Protein Data Bank*) dengan alamat <http://www.pdb.org>. Mula-mula dilakukan proses validasi pada reseptor tersebut dengan ligan asli yang di unduh dari PDB. Tahapan proses validasi yang meliputi preparasi *ligand*, *ref_ligand.mol2*, dan *running docking simulation*. Parameter validasi berupa nilai RMSD. Nilai RMSD yang kurang dari 2 menunjukkan metode ini valid dan dapat digunakan untuk men-*docking*-kan senyawa *5-fluorourasil* (5-FU) yang merupakan obat antikanker sebagai ligan pembanding, dan ligan dari senyawa aktif yang diketahui melalui uji KLT dalam ekstrak etanolik labu kuning (golongan triterpenoid dan *flavonoid*) yang diuji. Hasil *docking* antara senyawa 5-FU dan senyawa aktif dalam ekstrak etanolik labu kuning dinyatakan dalam skor *docking*. Semakin besar nilai mutlak skor *docking* maka senyawa tersebut semakin potensial untuk berikatan dengan reseptor.

b. Uji Sitotoksitas

1. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dilap.

2. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan RPMI dibuat dengan melarutkan RPMI dalam aquades, ditambah 2,0 gram NaHCO₃ dan 2,0 gram Hepes. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl encer 1N hingga pH 7,2-7,4 diukur dengan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril 0,2 µm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI steril dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF.

3. Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

4. Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut, tambahkan larutan 1 ml tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambah 3 ml larutan PBS, diamkan selama 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar 5x10³ sel/100 µl dan siap digunakan untuk penelitian.

5. Pembuatan larutan uji

Senyawa piperin dibuat stok dengan kadar 2×10^5 $\mu\text{g/ml}$ dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi dalam media kultur.

6. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT (Mosmann, 1983)

Sel dengan kepadatan 5×10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji dalam bentuk tunggal (Ekstrak etanolik daun Waru) diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μL PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μL media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200 μL untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

7. Analisis dan Pengolahan Data Uji sitotoksitas

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Hidup} = \frac{\text{AbsorbansiSelDenganPerlakuan} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}}{\text{AbsorbansiKontrolSel} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai IC_{50} menggunakan analisis probit (SPSS 14.0) untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Nilai IC_{50} adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik.

c. Uji Daya Antiinflamasi

1. Pembuatan pereaksi dan sediaan uji

1) 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.

2) 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 :

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

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.

2. Uji utama daya antiinflamasi

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 :

- 1) Kelompok I (kontrol negatif) diberikan air suling 2 mL/100 g BB tikus secara oral.
- 2) Kelompok II (pembanding) diberikan Na diklofenak dosis 13,5 mg/Kg BB secara oral.
- 3) Kelompok III diberikan isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB secara oral.
- 4) Kelompok IV diberikan isolat alkaloid lada dosis 10 mg/Kg BB secara oral.
- 5) 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

Analisis Hasil

Data pengukuran volume edema yang diperoleh digunakan untuk mengetahui efek inflamasi, yang dihitung dalam persen (%) inflamasi dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inflamasi} = \frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100\%$$

Keterangan :

V_t = Volume kaki waktu pengukuran

V_o = Volume kaki waktu pengukuran

Dari data persen inflamasi dapat dihitung nilai AUC (*Area Under Curve*). Penentuan nilai AUC selama enam jam, digunakan rumus sebagai berikut :

$$AUC = \frac{R_{t-1} + R_t}{2} (t_t - t_{t-1})$$

Keterangan :

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

R_{t-1} : persen radang pada waktu t-1 (setengah jam sebelumnya)

R_t : persen radang pada waktu ke-t

t_t : waktu

t_{t-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 :

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

Keterangan :

%DAI : Prosentase Daya Anti Inflamasi

AUC_k : *Area Under Curve* kelompok kontrol

AUC_p : *Area Under Curve* kelompok perlakuan

Baik hasil perhitungan nilai Persen Inflamasi maupun AUC kemudian dianalisis menggunakan metode statistik. Analisis statistik didahului dengan analisis homogenitas varian dengan Levene test dan uji normalitas dengan Kolmogorov-Smirnov. Jika hasil analisis terbukti terdistribusi normal dan varian telah homogen maka analisis dilanjutkan dengan *one way* ANNOVA. Apabila ada perbedaan yang bermakna antara kelompok satu dengan kelompok yang lain maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji Tukey HSD, taraf kepercayaan 95%.

Pada output uji Tukey HSD akan diperoleh dua macam output yaitu output descriptive statistic dan Homogeneous subsets. Analisis dilakukan menggunakan Homogenous subsets. Perbedaan dari keduanya adalah descriptive statistic digunakan untuk menguji kelompok mana saja yang berbeda secara nyata, sedangkan Homogenous subsets akan mencari grup/subsets yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Subsets yang nilai perbedaan rata-ratanya tidak berbeda secara signifikan pada $p < 0,05$ akan berada dalam satu kolom/subsets dan juga sebaliknya. Jika tidak homogen dan tidak terdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan dengan analisis non-parametrik.