

Senyawa Metabolit Sekunder dan Aktifitas Afrodisiak Ekstrak Etanol Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) secara In Silico

Taufikurrahman¹, Retno Widyowati² dan Sukardiman²

¹ Program Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, Indonesia

² Departemen Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115, Indonesia

Korespondensi: Sukardiman

Email: sukardiman@ff.unair.ac.id

Submitted: 31-03-2024, Revised: 25-05-2024, Accepted: 31-05-2024

ABSTRAK: Disfungsi ereksi merupakan salah satu masalah seksual yang paling umum terjadi pada pria. Obat yang tersedia di pasaran dapat digunakan untuk mengatasi masalah ini, tetapi penggunaan obat tersebut seringkali menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Penggunaan bahan alami sebagai alternatif pengobatan semakin populer, salah satunya yaitu ramuan berbahan cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl). Cabe jawa diketahui memiliki berbagai macam metabolit sekunder yang memiliki peran sebagai bioaktif diantaranya aktivitas afrodisiak. Cabe jawa diekstraksi dengan etanol 96% menggunakan metode maserasi dan dianalisa dengan menggunakan LC/MS untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung pada cabe jawa. Sebanyak sepuluh metabolit sekunder terdeteksi yaitu, *Salsolinol*, *Quercetin*, *Caffeoyl putrescin*, *Diferuloyl putrescine*, *Feruloyl tyramine*, *Hydroxychloroquine*, *Tetrahydropapaveroline*, *Piperine*, *N-Oleyl-Leucine*, dan *Capsaicin*. Selanjutnya dilakukan uji in silico terhadap masing-masing metabolit yang diketahui dengan ligan senyawa sildenafil sebagai pembanding terhadap aktifitasnya sebagai penghambat *phosphodiesterase type 5* (PDE5) dengan protein PDB ID 2H42. Dari hasil uji in silico dengan teknik *molecular docking* diketahui bahwa piperin memiliki aktifitas sebagai penghambat *phosphodiesterase type 5* (PDE5) dengan nilai energi ikat dan konstanta inhibisi sebesar -8,62 kkal/mol dan 0,485 uM, yang merupakan aktifitas terbaik dari sepuluh metabolit sekunder yang diketahui, namun aktifitas afrodisiak senyawa piperin ini masih lebih rendah dibandingkan dengan senyawa sildenafil.

Kata kunci: afrodisiak; metabolit sekunder; *Piper retrofractum* Vahl

ABSTRACT: Erectile dysfunction is one of the most common sexual problems in men. Drugs available on the market can be used to treat this problem, but the use of these drugs often causes unwanted side effects. The use of natural ingredients as an alternative treatment is increasingly popular, one of which is a herb made from chili jamu (*Piper retrofractum* Vahl). Metabolite profiling of the chili jamu plant turns out to be different depending on the location of growth. It is thought to result in differences in natural conditions and circumstances which result in differences in aphrodisiac activity. Cabe Jawa was extracted with 96% ethanol and analyzed using LC/MS. Ten secondary metabolites were detected namely *Salsolinol*, *Quercetin*, *Caffeoyl putrescin*, *Diferuloyl putrescine*, *Feruloyl tyramine*, *Hydroxychloroquine*, *Tetrahydropapaveroline*, *Piperine*, *N-Oleyl-Leucine*, and *Capsaicin*. In silico test was done using sildenafil as a control in the phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor and PDB ID 2H42 as protein. From the results of in silico tests, it was known that piperine had activity as a phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor with binding energy and inhibition constant values of -8.62 kcal/mol and 0.485 uM.

Keywords: aphrodisiac; secondary metabolite; *Piper retrofractum* Vahl



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

1. Pendahuluan

Disfungsi ereksi merupakan suatu penyakit yang sering dialami oleh pria maupun wanita. Disfungsi ereksi pada pria menyebabkan penurunan kualitas hidup. Hal tersebut diakibatkan oleh penurunan tingkat kepercayaan diri dalam melakukan hubungan seksual. Disfungsi ereksi dialami oleh 40% pria pada usia di atas 40 tahun dengan berbagai macam tingkat kompleksitasnya [1]. Disfungsi ereksi disebabkan oleh penurunan aktifitas afrodisiak. Afrodisiak digambarkan sebagai suatu zat yang dapat meningkatkan gairah seksual, yang bekerja dalam menghambat enzim phosphodiesterase (PDE) dan mempunyai peran dalam peningkatan hidrolase cAMP dan cGMP [2].

Salah satu cara mengatasi masalah disfungsi ereksi adalah dengan terapi obat-obatan yang mengandung tadalafil, vardenafil, avanafil, udenafil, mirodenafil, dan lodenafil carbonate [3]. Mengonsumsi obat-obatan yang mengandung tadalafil dalam jangka waktu yang lama dapat mengakibatkan timbulnya efek sakit kepala, gangguan pencernaan atau mual, diare, kemerahan, nyeri di perut, punggung, otot, lengan, dan batuk. Beberapa efek seriusnya antara lain, penurunan atau kehilangan penglihatan secara tiba-tiba, penglihatan kabur, perubahan penglihatan warna (melihat semburat biru pada objek atau kesulitan membedakan warna biru dan hijau), penurunan atau kehilangan pendengaran secara tiba-tiba, dan telinga berdenging [4].

Masyarakat Madura memiliki bermacam-macam ramuan herba, salah satunya ramuan herbal untuk meningkatkan keperkasaan pria. Beberapa jenis ramuan yang memiliki fungsi sebagai terapi bagi pasien dengan keluhan disfungsi ereksi. Salah satu bahan yang ada terdapat pada ramuan tersebut adalah cabe jawa. Ramuan tradisional Madura yang menggunakan cabe jawa digunakan sebagai pengobatan, sakit kepala, sakit perut, demam, dan penambah stamina [5]. Buah cabe jawa dilaporkan memiliki senyawa piperin, methyl piperate, N-isobutyl-2E,4E,14Z-eicosatrienamida [6]. Senyawa piperin pada cabe jawa

mencapai 41,71% dari seluruh senyawa yang berhasil diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 96% [7].

Identifikasi senyawa metabolit yang dilakukan dengan menggunakan LC/MS dapat mengidentifikasi beberapa metabolit sekunder, termasuk alkaloid, flavonoid, dan terpenoid. Informasi yang diperoleh dari analisis ini sangat berharga dalam memahami peran metabolit sekunder dalam berbagai proses biologis, seperti interaksi tumbuhan dengan lingkungannya, sifat obat dari tanaman obat, dan potensi farmakologis untuk pengembangan obat baru.

Metode *in silico* dilakukan untuk memprediksi aktivitas senyawa afrodisiak. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi aktivitas senyawa afrodisiak dari cabe jawa dilakukan terhadap reseptor fosfodiesterase-5 (PDE-5) manusia menggunakan teknik molekuler docking. Pendekatan *in silico* memungkinkan prediksi interaksi antara senyawa dan reseptor, seperti konstanta inhibisi, energi ikatan, ikatan hidrogen dan gaya van der Waals [8–10]. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini berkontribusi untuk mengidentifikasi senyawa metabolit dan aktifitas afrodisiak dari ekstrak etanol 96% cabe jawa.

2. Metode

2.1. Metode

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *True Experimental Research* dengan kombinasi penelitian di laboratorium dan pengujian dengan menggunakan instrumen komputasi.

2.2. Ekstrak cabe jawa

Penelitian ini diawali dengan sampling cabe jawa yang akan digunakan. Dalam penelitian ini sampel berasal dari kecamatan Bluto Kabupaten Sumenep. Sampel dikeringkan dan digiling hingga menjadi serbuk simplisia dengan ukuran 80 mesh untuk selanjutnya dilakukan analisa kadar air dan diekstraksi dengan metode maserasi

menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 b/v. Waktu perendaman dilakukan selama 24 jam dengan remaserasi sebanyak 3x. Ekstrak dikentalkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dengan kecepatan 120 rpm.

2.3. LC-MS ekstrak cabe jawa

Ekstrak dianalisa senyawa metabolitnya dengan menggunakan instrumen LC-MS. Sampel diinjeksikan ke dalam LC dengan microsyringe sebanyak 5 µl dan dimasukkan ke dalam kolom UPLC sebanyak 4 kali replikasi. Sampel dalam bentuk cairan dirubah menjadi butiran tetesan dan melewati needle yang diberi muatan ESI positif (+) dengan kisaran massa 50–1200 m/z dan suhu sumber serta desolvasi masing-masing 100 dan 350°C. Selain itu, laju aliran gas kerucut dan desolvasi 0 L/jam dan 793 L/jam juga digunakan secara bersamaan, sedangkan energi tumbukan bervariasi antara 4 dan 60 eV. Selanjutnya ion-ion yang telah dihasilkan oleh detektor dipisahkan oleh analisator Q-ToF. Penggunaan eluan yaitu (A) air:asam format dan (B) asetonitril:asam format dengan sistem elusi gradien pada kecepatan alir 0,2 ml/menit.

2.4. Uji *in silico* ekstrak cabe jawa

Senyawa metabolit yang telah teridentifikasi selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas afrodisiak dengan uji *in silico* menggunakan struktur tiga dimensi protein *Structure of human phosphodiesterase type 5* (PDE5) inhibitor sebagai protein penghambat afrodisiak dengan PDB ID 2H42 yang diunduh dari Bank Data Protein (*Protein Data Bank*). Pemilihan target protein PDB ID 2H42 bertujuan sebagai pembanding terhadap interaksi ligan senyawa uji dengan senyawa sildenafil sebagai pembanding utama dalam penelitian ini. Untuk post docking analysis, protein terpilih di analisa dengan menggunakan Discovery Studio Visualizer®, AutoDock Tools® 1.5.6 (The Scripps Research Institute, Amerika), AutoDock 4.2.6 (The Scripps Research Institute, Amerika), Autogrid 4.2.6 (The Scripps Research

Institute, Amerika), PyMOL® (DeLano Scientific LLC, Italia).

3. Hasil dan pembahasan

Hasil pengukuran kadar air menunjukkan bahwa simplisia cabe jawa memiliki kadar air yaitu 3,856%. Menurut Dewi dkk, parameter standar kadar air pada simplisia tidak lebih dari 10% [11]. Ekstraksi cabe jawa dilakukan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan pelarut yaitu sebanyak masing-masing 100 g. Simplisia cabe jawa dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml. Penggunaan pelarut ini dikarenakan selektif, tidak toksik, absorpsinya baik dan kemampuan penyariannya yang tinggi sehingga dapat menyari senyawa yang bersifat non-polar, semi polar dan polar. Metode maserasi ini digunakan karena merupakan ekstraksi cara dingin, sehingga tidak menggunakan suhu tinggi yang dapat merusak senyawa metabolit. Keuntungan maserasi yaitu bahan yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut [12]. Setelah perendaman 24 jam pertama, maserasi yang dihasilkan berwarna coklat pekat. Remaserasi dilakukan sebanyak 3x untuk memaksimalkan senyawa metabolit yang terekstrak.

Untuk mendapatkan ekstrak kental cabe jawa, dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator*. Pengentalan dimaksudkan untuk menghilangkan pelarut, dan yang tersisa merupakan senyawa aktif dan metabolit yang terdapat pada cabe jawa. Rendemen yang dihasilkan dari ekstrak etanol 96% cabe jawa sebesar 5,34% dengan ekstrak berwarna kental dan berminyak. Pada penelitian ini dilakukan pengujian senyawa fitokimia pada cabe jawa yang dideteksi menggunakan kromatografi cair ditambah dengan tandem spektrometri massa (LC-MS). Hasil ini disajikan pada Tabel 1 dan Kromatogram Ion Total (TIC) dari ekstrak cabe jawa disajikan pada Gambar 1. Puncak pada waktu retensi (Rt) 10,56 menunjukkan adanya se-

Tabel 1. Informasi spektra LC/MS

RT	WM (gr/mol)	Fragmentasi (m/z)	Senyawa
1,717	179,0946	163,0740; 145,0630	Salsolinol (C ₁₀ H ₁₃ NO ₂)
4,705	302,0426	285,0401; 257,0448; 229,0500; 153,0177	Quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)
5,718	250,298	163,0391; 145,0269; 135,0460	Caffeoyl putrescin (C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃)
6,421	440,4960	265,1559; 177,0564; 145,0289	Diferuloyl putrescine (C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆)
7,827	313,3530	177,0555; 145,0322; 121,0685	Feruloyl tyramine (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)
8,086	335,1764	247,0989; 248,1018; 158,1527	Hydroxychloroquine (C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O)
10,267	287,1157	271,0930; 164,069	Tetrahydropapaveroline (C ₁₆ H ₁₇ NO ₄)
10,56	285,34	201,05; 202,05; 286,14; 287,14; 288,15	Piperine (C ₁₇ H ₁₉ NO ₃)
13,451	395,3399	86,0959; 132,1018	N-Oleyl-Leucine (C ₂₄ H ₄₅ NO ₃)
15,778	305,1990	137,0599; 122,0368; 94,0414	Capsaicin (C ₁₈ H ₂₇ NO ₃)

Tabel 2. Hasil penambatan molekuler dari hasil LC/MS terhadap 2H42

Senyawa	Energi ikat	Konstanta inhibisi
Salsolinol (C ₁₀ H ₁₃ NO ₂)	-5,60 kcal/mol	82,00 uM
Quercetin (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	-6,70 kcal/mol	12,69 uM
Caffeoyl putrescin (C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃)	-5,60 kcal/mol	267,50 uM
Diferuloyl putrescine (C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₆)	-6,18 kcal/mol	67,60 uM
Feruloyl tyramine (C ₁₈ H ₁₉ NO ₄)	-5,08 kcal/mol	134,98 uM
Hydroxychloroquine (C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O)	-7,47 kcal/mol	6,23 uM
Tetrahydropapaveroline (C ₁₆ H ₁₇ NO ₄)	-7,80 kcal/mol	23,01 uM
Piperin (C ₁₇ H ₁₉ NO ₃)	-8,62 kcal/mol	0,485 uM
N-Oleyl-Leucine (C ₂₄ H ₄₅ NO ₃)	-5,80 kcal/mol	822,60 uM
Capsaicin (C ₁₈ H ₂₇ NO ₃)	-7,19 kcal/mol	7,57 uM

nyawa piperine. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya dimana senyawa bioaktif pada cabe jawa adalah piperine yang memiliki efek farma-

kologis dan memiliki potensi dalam terapi disfungsi ereksi [13]. Senyawa alkaloid telah menjadi perhatian besar selama satu dekade terakhir.

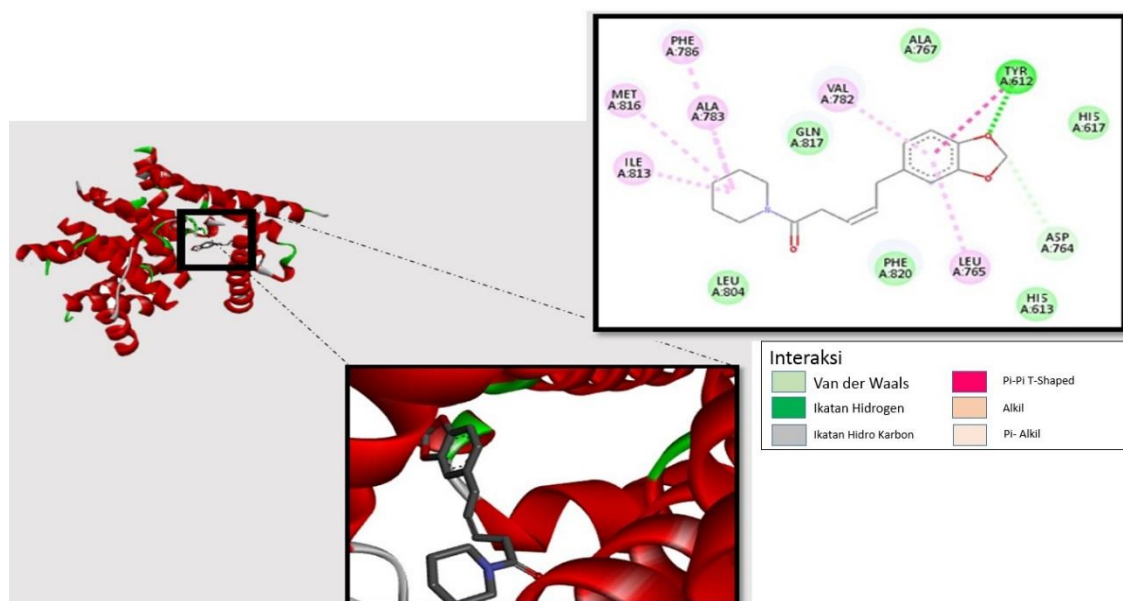
Dalam penelitian ini senyawa alkaloid lain yang ditemukan antara lain salsolinol, caffeoyl putrescine, tetrahydropapaveroline, dan capsaicin dengan waktu retensi masing-masing 1,717; 5,718; 10,267; dan 15,778.

Sebanyak 10 senyawa yang diperoleh dari hasil LC-MS kemudian dilakukan penambatan molekuler protein phosphodiesterase-5 inhibitor dengan PDB ID: 2H42. Pemilihan PDB ID 2H42 didasarkan pada relevansinya sebagai kompleks inhibitor-protein PDE-5 pada manusia dengan ligan asli sildenafil. Validasi metode dilakukan dengan *molecular docking* antara protein dan native ligand (AT). Nilai ikatan energi bebas senyawa native ligand (AT2) adalah 0.001 kcal/mol^o. Keberhasilan uji aktifitas afrodisiak pada berbagai macam senyawa aktif sebelumnya, ketersediaan informasi yang rinci, dan keterbukaan serta aksesibilitas struktur tersebut. Interaksi pengikatan molekul telah ditentukan berdasarkan nilai energi bebasnya dan peran utama interaksi asam amino. Hasil dari *molecular docking* dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan hasil *docking* terdeteksi beberapa senyawa dari cabe jawa yang memiliki konformasi terbaik dengan energi terendah. Senyawa bioaktif dengan energi ikat bebas terendah adalah piperine dengan $\Delta G = -8,62$ kkal/mol. Namun jika dibandingkan dengan kontrol positif, nilai energi ikatan sildenafil lebih

rendah dibandingkan tiga senyawa tertinggi yaitu -9,12 kkal/mol. Nilai energi pengikatan bebas negatif (ΔG) yang tinggi menyiratkan pengaruh pengikatan protein-ligan secara spontan dan menstabilkan interaksi protein-ligan. Skor pengikatan terendah berkorelasi dengan nilai konstanta inhibisi (K_i) terendah.

Berdasarkan penelitian penambatan molekuler, senyawa teratas dengan skor *docking* tertinggi yaitu piperine, memiliki kandungan kimia yang relatif lebih tinggi dan berpotensi sebagai inhibitor PDE5. Berdasarkan studi sebelumnya piperine juga menunjukkan sifat sebagai afrodisiak [14]. Interaksi asam amino dari hasil *molecular docking* dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil ini menunjukkan hal yang penting bahwa asam amino berkontribusi pada interaksi situs aktif hidrogen PDE-5, seperti LEU804, GLN817, PHE820, ALA767, HIS617, ASP764, dan HIS613. Ikatan hidrogen merupakan salah satu pengikat non-kovalen yang berperan penting dalam skor *docking*, formasi kompleks, dan pengikatan kekuatan modulus [15].

Ikatan hidrogen berperan dalam interaksi antara ligan dan protein, namun interaksi ikatan lainnya juga ikut mempengaruhi energi ikat yang terjadi. Oleh karena itu, selain ikatan hidrogen, hal yang penting komponen energi pengikat si-



Gambar 1. Interaksi protein dan ligan piperine sebagai ligan terbaik dalam aktifitas afrodisiak

tus-situs ini kemungkinan besar berasal dari kontak van der Waals.

4. Kesimpulan

Hasil LC/MS ekstrak etanol 90% cabe jawa menunjukkan bahwa ekstrak ini mengandung Salsolinol, Kuersetin, *Caffeoyl putrescin*, *Diferuloyl putrescine*, *Feruloyl tyramine*, *Hydroxychloroquine*, *Tetrahydropapaveroline*, Piperin, *N-Oleyl-Leucine*, dan Capsaicin. Piperin mendapatkan skor *docking* molekuler tertinggi pada uji *docking in-silico molecular* dengan nilai $\Delta G = -8,62$ kkal/mol. Namun jika dibandingkan dengan kontrol positif, nilai energi ikatan piperin masih lebih tinggi dibandingkan dengan sildenafil yaitu $-9,12$ kkal/mol, Informasi ini berguna untuk penyelidikan *bioassay* di masa depan mengenai potensi penerapannya sebagai terapi afrodisiak. Kombinasi ligan senyawa uji dan pengujian terhadap protein inhibitor PDE5 lainnya perlu dilakukan kedepannya, untuk mendapatkan aktifitas afrodisiak yang lebih efektif.

Daftar Pustaka

- Vlachopoulos C, Jackson G, Stefanadis C, Montorsi P. Erectile dysfunction in the cardiovascular patient. *Eur. Heart J.* 2013;34(27):2034–2046.
- Hadi KA, Samsul A, Khairunnisa, Komari N. Penambatan molekul kandungan *Eurycoma longifolia* Jack (pasak bumi) terhadap human phosphodiesterase 5. *J. Pharmascience.* 2020;7(2):36–47.
- Lee SH, Kim HY, Back SY, Han HK. Piperine-mediated drug interactions and formulation strategy for piperine: Recent advances and future perspectives. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2018;14(1):43–57.
- Aziz A, Bakar NA, Zakaria Z. Unsafe ingredients included in Malaysian Food Drug Interphase (FDI) products: Toyiyban perspective. *Malaysian J. Halal Res.* 2020;3(2):63–68.
- Sudarmaji L, Hayati A, Rahayu T. Etnobotany study of cabe jamu (*Piper retrofractum* Valh) in East Gapura Vilage Gapura District of Sumenep. *e-Jurnal Ilmiah BIOSAIN TROPIS (BIOSCIENCE-TROPIC).* 2019;4:26–32.
- Salleh WMNHW, Hashim NA, Fabarani NP, Ahmad F. Antibacterial activity of constituents from *Piper retrofractum* Vahl. and *Piper arborescens* Roxb. *Agric. Conspec. Sci.* 2020;85(3):269–280.
- Junairiah, Amalia SE, Ni'matuzahroh, Nurhariyati T. Identification of phytochemical compounds in ethanol and n-hexane leaf extracts of *Piper retrofractum* Vahl. by gas chromatography mass spectrometry. *Moroccan J. Chem.* 2020;8(S1):32–37.
- Kusumorini N, Nugroho AK, Pramono S, Martien R. Development of new isolation and quantification method of piperine from white pepper seeds (*Piper nigrum* L) using a validated HPLC. *Indones. J. Pharm.* 2021;32(2):158–165.
- Syukri Y, Nugroho AE, Martien R, Lukitaningsih E. Validasi penetapan kadar isolat andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menggunakan HPLC. *J. Sains Farm. Klin.* 2015;2(1):8.
- Syukri Y, Martien R, Lukitaningsih E, Nugroho AE. Quantification of andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* Nees obtained from traditional market in Yogyakarta using validated HPLC. *Indones. J. Chem.* 2016;16(2):190–197.
- Dewi NPYA, Pebriani NLGW, Duarsa PA, Warnaya PCI, Candraningrat IDAAD, Arisanti CIS. Formulasi dan uji pelepasan krim ekstrak etanol daun jambu biji dengan potensi antijerawat. *J. Kim.* 2020;14(2):119.
- Amalina NL. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70 % buah merica hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap sel HeLa. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2008.
- Rifa M. Andrographolide ameliorate rheumatoid arthritis by promoting the development of regulatory T cells. *J. Trop. Life Sci.* 2011;1(1):5–8.
- Tominik VI. Uji berbagai dosis ekstrak buah cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) terhadap histologi testis dan proses spermatogenesis mencit albino (*Mus musculus*). *Masker Med.* 2018;6(1).
- Fikrika H, Ambarsari L, Sumaryada T. Molecular docking studies of catechin and its derivatives as anti-bacterial inhibitor for glucosamine-6-phosphate synthase. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2016;31(1).