

## Inhibitory Activity of *Polypodium feei* Root Extracts on Nitric Oxide and TNF- $\alpha$ Synthesis in LPS-activated RAW264.7 Cell Line

Deden W. Suwandi<sup>1\*</sup>, Siva Hamdani<sup>1</sup>, and Ruchiyat Ruchiyat<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Garut, Garut, Indonesia

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Garut, Garut, Indonesia

### Abstract

*Polypodium feei* (*P. feei*) roots have been reported to contain sellegueain A, a compound with analgesic and anti-inflammatory properties demonstrated in experimental animals. However, the anti-inflammatory activity of extracts, which represent the form most used in traditional medicine, has not been scientifically validated. This study aims to test the anti-inflammatory activity of *P. feei* root extract in inhibiting the synthesis of inflammatory mediators such as NO, iNOS, and TNF- $\alpha$  in RAW264.7 macrophage cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS). RAW264.7 cells were used to evaluate the inhibitory activity of test compounds on the production of inflammatory mediators NO, iNOS, and TNF- $\alpha$ . Research parameters included cell viability testing with MTS, colorimetric test to determine the concentration of nitric oxide (NO), ELISA test to measure protein levels of the iNOS and TNF- $\alpha$ . *P. feei* root extract at concentrations of 10, 50, 100, and 150  $\mu\text{g/mL}$  inhibited the production of inflammatory mediators with the best activity in inhibiting NO and iNOS with IC<sub>50</sub> values of 87.22 and 99.99  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. This study shows that *P. feei* root extract has anti-inflammatory activity through inhibiting the production of NO, iNOS and TNF- $\alpha$  mediators in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells.

**Keywords:** Inflammation, iNOS, nitric oxide, *P. feei* roots, TNF- $\alpha$

### Aktivitas Penghambatan Ekstrak Akar Pakis Tangkur (*Polypodium feei*) terhadap Pembentukan Nitrit Oksida dan TNF- $\alpha$ pada Sel RAW264.7

#### Abstrak

Akar pakis tangkur dilaporkan mengandung senyawa Sellegueain A yang memiliki aktivitas sebagai analgesik dan antiinflamasi pada hewan uji. Namun, aktivitas anti inflamasi dalam bentuk ekstrak yang merupakan bentuk sediaan obat yang paling umum digunakan oleh masyarakat belum dilaporkan secara ilmiah. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas anti inflamasi ekstrak akar pakis tangkur melalui penghambatan sintesis mediator inflamasi seperti NO, iNOS, dan TNF- $\alpha$  pada sel makrofag RAW264.7 yang distimulasi oleh lipopolisakarida (LPS). Sel RAW264.7 digunakan untuk mengevaluasi aktivitas penghambatan senyawa uji terhadap produksi mediator inflamasi NO, iNOS, dan TNF- $\alpha$ . Parameter penelitian diantaranya uji viabilitas sel dengan metode MTS, uji kolorimetri untuk menentukan konsentrasi nitrit oksida (NO), uji ELISA untuk mengukur kadar protein nitrit oksida sintase (iNOS) dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Ekstrak akar pakis tangkur pada konsentrasi 10, 50, 100, dan 150  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan kemampuan menghambat produksi mediator inflamasi pada NO dan iNOS dengan nilai IC<sub>50</sub> untuk masing-masing adalah 87,22  $\mu\text{g/mL}$  (NO) dan 99,99  $\mu\text{g/mL}$  (iNOS). Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak akar pakis tangkur memiliki aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan produksi mediator NO, iNOS, dan TNF- $\alpha$  pada pada sel makrofag RAW264.7 yang distimulasi LPS.

**Kata Kunci:** Akar pakis tangkur, Inflamasi, iNOS, Nitrit oksida, TNF- $\alpha$

#### Article History:

Submitted 22 November 2024

Revised 06 February 2025

Accepted 10 February 2025

Published 08 Juni 2026

\*Corresponding author:

[deden@uniga.ac.id](mailto:deden@uniga.ac.id)

#### Citation:

Suwandi DW, Hamdani S, Ruchiyat R. Inhibitory Activity of *Polypodium feei* Root Extracts on Nitric Oxide and TNF- $\alpha$  Synthesis in LPS-activated RAW264.7 Cell Line. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. year :2025 vol 12 (2), 200-207.

## 1. Pendahuluan

Peradangan merupakan respon imun bawaan sebagai mekanisme pertahanan terhadap mikroorganisme, penyakit, dan kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti traumatis, iskemik, infeksi, autoimun, dan toksisitas yang akan mempengaruhi integritas sel, jaringan atau organ.<sup>1</sup> Regulasi peradangan salah satunya adalah melalui aktivitas sel monosit/makrofag dan mediator seperti sitokin, enzim, atau metabolit asam arakidonat, dan lain-lain.<sup>2</sup>

Salah satu pencetus inflamasi dalam tubuh adalah lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari komponen endotoksin bakteri Gram negatif yang dapat berikatan dengan reseptor di permukaan sel seperti *toll-like receptor* (TLRs). Interaksi LPS dengan TLR pada sel makrofag akan mengaktifkan *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) intraseluler dan akan mengekspresi asam arakidonat, TNF- $\alpha$ , metabolit iNOS (*nitric oxide synthases*), dan *nitric oxide* (NO) secara berlebihan.<sup>3</sup>

Dalam pengobatan inflamasi, obat sintetik seperti obat anti-inflamasi non steroid (AINS) biasanya digunakan untuk menghalangi enzim siklooksigenase (COX) dalam membuat asam arakidonat seperti prostaglandin.<sup>4</sup> Namun, penggunaan AINS secara terus-menerus akan berdampak negatif bagi penggunaannya seperti tukak lambung, perdarahan saluran cerna, dan gagal ginjal karena enzim COX-1 yang mengontrol integritas lapisan lambung dan fungsi ginjal yang normal.<sup>5,6</sup>

Salah satu obat herbal yang berpotensi untuk dikembangkan adalah akar pakis tangkur (*Polypodium feei* METT) yang secara tradisional masyarakat memanfaatkan untuk pengobatan beberapa penyakit seperti hipertensi, rematik, dan gangguan kesehatan lainnya.<sup>6</sup> Akar pakis tangkur mengandung proanthocyanidin trimerik selliguaein A.<sup>7</sup> Dalam penelitian sebelumnya, selliguaein A terbukti menunjukkan aktivitas analgesik dan anti-inflamasi pada tikus dan secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas siklooksigenase.<sup>6</sup> Pengujian interaksi penambatan molekuler menunjukkan *proanthocyanidin afzelechin* (monomer selliguaein A) memiliki afinitas yang baik terhadap residu Met522 pada enzim COX-1.<sup>8</sup> Aktivitas ekstrak akar pakis tangkur belum pernah dilaporkan, utamanya mekanisme kerjanya sebagai antiinflamasi, meskipun masyarakat secara umum menggunakan akar ini dalam bentuk sediaan ekstrak. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas anti-inflamasi ekstrak akar pakis tangkur secara *in vitro* terhadap penghambatan mediator inflamasi yaitu TNF- $\alpha$ , iNOS, dan NO pada sel makrofag RAW 264.7 yang distimulasi lipopolisakarida.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Alat

96-well plate (Costar, 3506), tips biru, kuning, dan putih (Neptune, 2110-2100-2040), *serological pipettes* 5 mL (SPL, 91005), *syringe filter tissue culture* 0,22  $\mu$ m (Sartorius, 17845), *syringe* dengan *needle* 1 mL (Terumo, PS01T26), CO<sub>2</sub> *incubator* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II), *refrigerated centrifuge* (MWP 260r), *hemacytometer* (Neubauer), dan *microtube* 1.5 mL (SPL, 62015).

### 2.2. Bahan

Akar pakis tangkur, metanol, akuabides, medium Dulbecco yang dimodifikasi Eagle's/DMEM (Biowest®), 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest®), 1% antibiotik dan antimikotik/ABAM (Biowest®), sel RAW 264.7 (ATCC®TIB-71), *kit* TNF- $\alpha$  ELISA mouse (No. KE00154, ElabScience®), *kit* ELISA mouse NOS2/iNOS (No. EEL132, ElabScience®), *kit nitric oxide* (No. EIANOC, ElabScience®).

### 2.3. Prosedur

#### 2.3.1. Ekstraksi

Selama 3  $\times$  24 jam, serbuk kering akar pakis tangkur (4.500 gram) direndam dengan metanol pada suhu kamar. Ekstrak metanol encer diuapkan pada tekanan rendah dan suhu 50°C hingga menjadi pekat.

#### 2.3.2. Kultur sel

Tahapan pertama adalah proses *thawing* sel RAW264.7. Setelah sel mencair, suspensi sel dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 15 mL berisi medium kultur (10% FBS, 1% ABAM dan medium basal DMEM hingga 100% dari total volume di dalam tube 50 mL) sebanyak 4 mL. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 4 mL media kultur. Suspensi sel dimasukkan pada beberapa *flask* T25. Sel-sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C.<sup>7</sup> Sel yang telah tumbuh pada *flask* T25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga konfluen sekitar 70-80%. Selama perawatan sel, setiap waktu perawatan (2-3 hari) medium pertumbuhan harus diganti.<sup>9</sup>

#### 2.3.3. Pengukuran viabilitas sel RAW264.7

Setelah sel konfluen, medium pertumbuhan dibuang. Selanjutnya, *flask* dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dan ditambahkan 1 mL enzim *trypsin-EDTA* 0,25%, lalu diinkubasi pada suhu 37°C sampai

sel terlepas dari dasar *flask*. Sel dimasukkan ke dalam *conical* 15 mL dan disentrifugasi (5 menit, 1600 rpm). Pellet yang dihasilkan kemudian diresuspensi dengan 1 mL medium pertumbuhan setelah supernatan dibuang. Jumlah sel yang terkumpul dihitung dengan hemositometer.

Setelah mengetahui berapa banyak sel dalam 1 mL suspensi sel, sel ditanam sebanyak  $5 \times 10^3$  sel per sumuran pada 96-*well plate*, serta sampel dengan konsentrasi berbeda (200; 150; 100; 50; 25; 12,5; dan 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) diinkubasi selama 24 jam pada inkubator 37°C yang dialiri 5% CO<sub>2</sub>. Selanjutnya, 20  $\mu\text{L}$  MTS ditambahkan dan diinkubasi kembali (3 jam, inkubator 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub>), sebelum dibaca nilai absorbansi pada *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm.<sup>10</sup>

#### 2.3.4. Penentuan aktivitas penghambatan NO dengan kolorimetri

Pengukuran Konsentrasi NO dengan cara sel ditanam sebanyak  $5 \times 10^3$  sel/sumur dan diinkubasi (24 jam pada inkubator 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub>). Setelah itu, media tumbuh diganti dengan yang baru sebanyak 1.600  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan sampel ekstrak pada konsentrasi 10, 50, 100, dan 150  $\mu\text{g/mL}$  pada setiap *well*, selanjutnya diinkubasi selama 1-2 jam pada inkubator suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Selanjutnya, sel ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ , dan diinkubasi kembali selama 24 jam.

Penentuan kadar NO diawali dengan pembuatan larutan standar natrium nitrat dalam air deionisasi dengan konsentrasi 0, 10, 20, 40, 100, 150, 200, dan 300  $\mu\text{mol/L}$ . Setiap larutan dengan konsentrasi tersebut kemudian dicampur dengan reagen larutan sulfat dan alkali serta diinkubasi selama 15 menit. Selanjutnya, larutan uji dan larutan standar yang sudah disiapkan di atas, disentrifugasi (3100 g, 10 menit) untuk diperoleh supernatan. Uji penghambatan pembentukan nitrit oksida (NO) dilakukan dengan memipet 160  $\mu\text{L}$  supernatan hasil sentrifugasi. Supernatan dicampur dengan reagen kromogen sebanyak 80  $\mu\text{L}$ , lalu diinkubasi selama 15 menit (suhu ruang) dan hasilnya dibaca dengan spektrofotometer pada OD 550 nm.<sup>11</sup>

#### 2.3.5. Penentuan kadar iNOS dan TNF- $\alpha$ dengan ELISA

Konsentrasi iNOS dan TNF- $\alpha$  diukur dengan teknik ELISA. Sel ditanam sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran pada 96-*well plate*, lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, penggantian medium tumbuh dilakukan dengan sebanyak 1.600  $\mu\text{L}$ , lalu sampel ekstrak konsentrasi 10, 50, 100, dan 150  $\mu\text{g/mL}$  ditambahkan pada sel serta diinkubasi (1-2 jam,

inkubator 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub>). Pada campuran tersebut ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ , dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Selanjutnya, larutan tersebut disentrifugasi (3100 g, 10 menit) untuk diperoleh supernatan.

Penentuan kadar iNOS ditentukan dengan menggunakan *kit* ELISA yang tersedia secara komersial. Pengujian dilakukan dengan cara pada sumuran *kit* ELISA dimasukkan masing-masing 100  $\mu\text{L}$  Larutan standar dan supernatan, lalu larutan dibuang. Selanjutnya dimasukkan larutan *biotinylated detection antibody* (Ab) sebanyak 100  $\mu\text{L}$ /sumuran, dan diinkubasi (1 jam, 37°C). Larutan tersebut dibuang dan sel dicuci dengan *wash buffer*, kemudian ditunggu 1-2 menit sebelum dibuang. Selanjutnya, ditambahkan 100  $\mu\text{L}$ /well HRP (*horseradish peroxidase*) *conjugate* dan inkubasi kembali (37°C, 30 menit). Plate dicuci sebanyak lima kali sebelum ditambahkan 90  $\mu\text{L}$ /well substrat dan diinkubasi selama 15 menit sampai terjadi perubahan warna. Apabila belum terjadi perubahan warna, waktu inkubasi diperpanjang sampai 30 menit. Setelah itu, 50  $\mu\text{L}$ /well stop solution ditambahkan pada setiap sumuran. Ukur *Optical Density* (OD) pada 450 nm menggunakan spektrofotometer.<sup>12,13</sup>

#### 2.3.6. Analisis statistik

Analisis data dilakukan menggunakan metode *analysis of varians* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji lanjut post hoc. Data sebagai rerata  $\pm$  *standard error the mean* (SEM). Nilai *p-value* yang kurang dari 0,05 dianggap berbeda secara signifikan.

### 3. Hasil

#### 3.1. Ekstraksi

Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan metanol. Setelah perendaman/maserasi selama 3×24 jam dan diproses dengan alat vakum evaporator pada suhu 45°C, diperoleh bobot 1.232,7 gram ekstrak akar pakis tangkur.

#### 3.2. Pengukuran Viabilitas Sel RAW264.7

Viabilitas sel makrofag RAW 264.7 diukur terlebih dahulu menggunakan metode MTS untuk menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol. Pengujian ini berguna untuk melihat pengaruh senyawa uji terhadap ketahanan sel uji (sitotoksitas) (Gambar 1). Hasilnya menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak akar pakis tangkur konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 150; dan 200  $\mu\text{g/mL}$  tidak menimbulkan kematian sel RAW264.7 (data tidak ditampilkan), sebagaimana ditunjukkan oleh kelompok kontrol negatif (DMSO 1%). Hal ini dapat dikatakan sampel uji tidak bersifat sitotoksik

**Tabel 1.** Persen penghambatan dan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak akar pakis tangkur terhadap NO

Kelompok Uji µg/mL	Persen inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> µg/mL
EAPT 10	20,52	87,22
EAPT 50	31,93	
EAPT 100	59,69	
EAPT 150	72,6	

terhadap sel RAW264.7 Efek penghambatan ekstrak akar pakis tangkur terhadap pelepasan NO dilakukan dengan model sel RAW264.7 yang distimulasi LPS. Aktivitas penghambatan ekstrak akar pakis tangkur terhadap sintesis NO oleh sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

### 3.3. Efek Penghambatan Ekstrak Terhadap Pelepasan iNOS

Aktivitas ekstrak akar pakis tangkur juga dilakukan untuk menentukan kemampuan terhadap penghambatan enzim iNOS. Enzim ini bertanggung jawab sebagai pensintesis mediator inflamasi NO sebagai marker fisiologis yang dapat menginisiasi proses peradangan. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 2.

### 3.4. Efek Penghambatan Ekstrak Terhadap Pelepasan TNF-α

Aktivitas ekstrak akar pakis tangkur juga dilakukan untuk menentukan kemampuan terhadap penghambatan

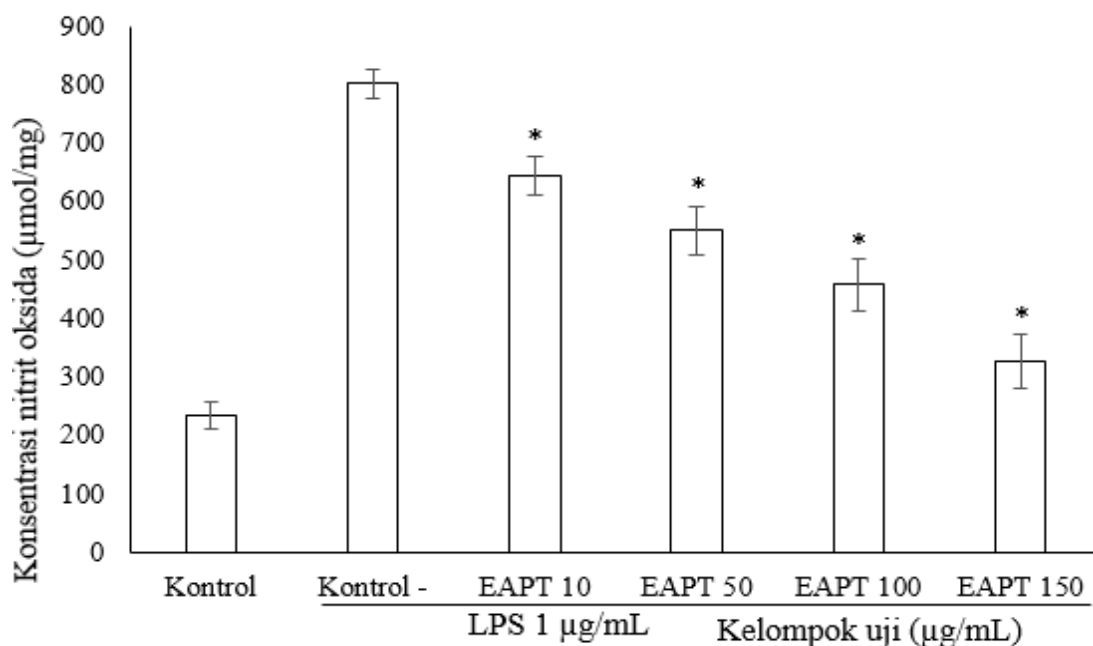
TNF-α yang termasuk sitokin proinflamasi.

Hasilnya merupakan kadar TNF-α dalam supernatan seperti tertera pada Tabel 3 dan Gambar 3.

## 4. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan mekanisme kerja aktivitas antiinflamasi ekstrak akar pakis tangkur pada penghambatan enzim iNOS, serta mediator inflamasi NO dan TNF-α yang bertanggung jawab terhadap proses inflamasi. Pengujian dilakukan secara *in vitro* menggunakan media uji sel makrofag RAW264.7 yang diinduksi lipopolisakarida (LPS), suatu senyawa endotoksin patogen yang dikeluarkan oleh bakteri Gram negatif yang dapat menginduksi reaksi inflamasi.<sup>3</sup>

Sel makrofag berperan besar dalam respon inflamasi dengan memproduksi sitokin dan mengaktifkan enzim proinflamasi.<sup>14</sup> Sel ini dapat diinduksi LPS dengan cara berikatan pada reseptor permukaan sel makrofag *toll-like receptor* (TLRs) sehingga akan mengaktifkan *nuclear factor kappa-B* (NF-κB) sebagai faktor



**Gambar 1.** Konsentrasi nitrit oksida (NO) dalam sel RAW264.7 setelah perlakuan dengan ekstrak akar pakis tangkur (EAPT). \*; p<0,05 terhadap kontrol negatif.

**Tabel 2** Persen penghambatan dan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak akar pakis tangkur terhadap iNOS

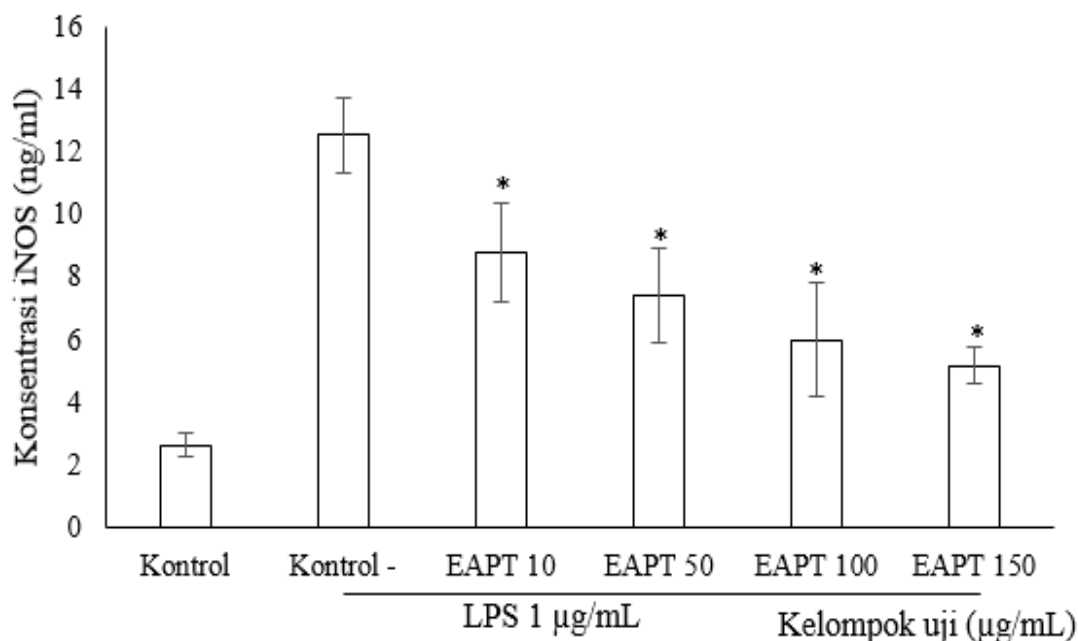
Kelompok Uji (µg/mL)	Persen inhibisi (%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EAPT 10	29,94	99,99
EAPT 50	40,92	
EAPT 100	52,07	
EAPT 150	58,6	

transkripsi yang akan menstimulasi produksi mediator inflamasi seperti interleukin (IL-1 $\beta$ ), interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), *nitric oxide synthase* (iNOS), *cyclooxygenase-2* (COX-2), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1b (IL-1b), IL-6, nitrit oksida (NO) dan prostaglandin E2.<sup>14</sup> Selama proses inflamasi berlangsung, makrofag berpartisipasi dalam respons inflamasi dengan melepaskan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan NO, serta faktor inflamasi lainnya seperti iNOS untuk melindungi tubuh dari infeksi atau cedera jaringan.<sup>15</sup>

Pengujian ini diawali dengan penentuan sitotoksitas ekstrak akar pakis tangkur terhadap sel RAW264.7 sehingga diperoleh konsentrasi yang tidak menyebabkan kematian pada sel uji dengan metode MTS. Tes MTS merupakan tes proliferasi sel dengan melihat aktivitas metabolismenya. Prinsip pengujian MTS adalah dengan mengukur secara tidak langsung produk senyawa berwarna yang dihasilkan dari interaksi reagen dengan sel hidup. MTS adalah komponen tetrazolium [3-(4,5-dimethyliazol-2-

il)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Komponen garam MTS akan direduksi oleh sel yang hidup memproduksi senyawa berwarna formazena yang larut. Senyawa berwarna ini setara dengan sel hidup yang dapat diukur kadarnya pada panjang gelombang 490 nm.<sup>16</sup> Hasil pengujian diatas menunjukkan seluruh konsentrasi yang digunakan untuk uji viabilitas tidak mengalami perubahan yang nyata pada penurunan maupun peningkatan dibandingkan dengan kontrol. Dapat dikatakan bahwa ekstrak akar pakis tangkur tidak toksik terhadap sel RAW264.7.

Pengujian dilanjutkan pada aktivitas antiinflamasi. Pengujian ini dilakukan secara *in vitro* untuk menentukan mekanisme kerja obat sebagai antiinflamasi melalui penghambatan NO, iNOS, dan TNF- $\alpha$ . Penentuan kadar NO menggunakan metode *Griess nitrite assay*. Aktivitas penghambatan NO menggunakan konsentrasi uji dalam DMSO (10, 100, dan 150 µg/mL). Sediaan uji ini ditambahkan pada sel RAW264.7 yang diinduksi LPS (1 µg/mL). Hasil pengujian menunjukkan



**Gambar 2.** Konsentrasi enzim iNOS pada sel RAW264.7 setelah perlakuan dengan ekstrak akar pakis tangkur (EAPT). \*:p<0,05 terhadap kontrol negatif.

**Tabel 3.** Persen penghambatan dan nilai IC50 ekstrak akar pakis tangkur (EAPT) terhadap TNF- $\alpha$

Kelompok Uji ( $\mu\text{g/mL}$ )	Persen inhibisi (%)	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
EAPT 10	16,71	
EAPT 50	20,37	
EAPT 100	33,66	226,35
EAPT 150	41,1	
EAPT 300	59,4	

bahwa ekstrak akar pakis tangkur konsentrasi 10, 100, 50 dan 150  $\mu\text{g/mL}$  mampu menghambat produksi NO pada sel RAW264.7 ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol. Penghambatan terhadap NO diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 87,22  $\mu\text{g/mL}$ .

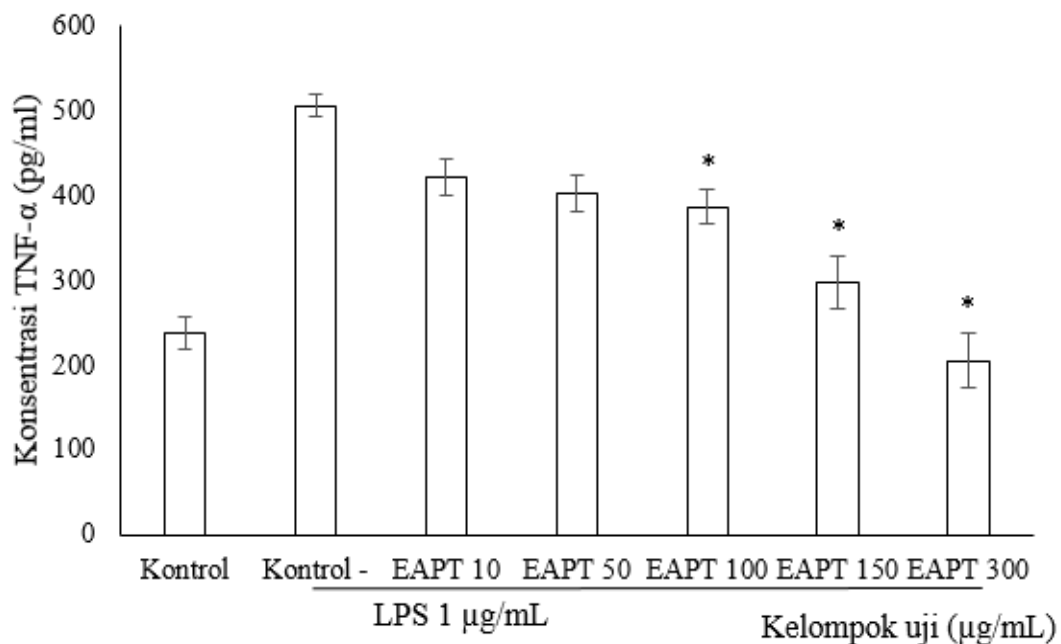
Pada pengujian penghambatan produksi iNOS dari ekstrak akar pakis tangkur juga dilakukan pada sel RAW264.7 yang diukur kadarnya menggunakan metode ELISA. Ekstrak akar pakis tangkur konsentrasi 10, 100, dan 150  $\mu\text{g/mL}$  mampu menghambat produksi iNOS pada sel RAW264.7 yang berbeda bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ( $*p < 0,05$ ). Penghambatan terhadap iNOS diperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 99,99  $\mu\text{g/mL}$ .

Kedua penghambatan di atas sejalan aktivitasnya, yaitu ketika enzim iNOS keberadaannya dihambat akan berpengaruh terhadap konsentrasi NO yang mengalami penurunan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa golongan triterpenoid mempunyai aktivitas anti inflamasi melalui penghambatan enzim iNOS

pada sel RAW264.7 yang diinduksi oleh LPS.<sup>17</sup> Akar pakis tangkur mengandung senyawa golongan triterpenoid, flavonoid, dan senyawa fenol lainnya. Mediator NO dan iNOS merupakan faktor utama dalam proses inflamasi. Penurunan produksi NO dan iNOS akan mampu menekan dan mencegah terjadinya peradangan.<sup>18</sup>

Enzim iNOS adalah agen pro-inflamasi yang menyebabkan syok septik, asma, rheumatoid arthritis, penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), dan penyakit inflamasi lainnya. Nitrit oksida akan meningkat pada saat inflamasi dan akan membentuk peroksi nitrit yang merupakan oksidan yang akan menginisiasi perubahan pada sistem vaskuler sebagai reaksi inflamasi.<sup>19</sup>

Peningkatan kadar NO dapat menyebabkan proses inflamasi dan karsinogenesis. Nitrit oksida dihasilkan dari L-arginin oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa NO dapat mengaktifkan enzim COX untuk meningkatkan produksi prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan



**Gambar 3.** Konsentrasi TNF- $\alpha$  pada sel RAW264.7 setelah perlakuan dengan ekstrak akar pakis tangkur (EAPT).  
\*;  $p < 0,05$  terhadap kontrol negatif.

A2. Prostaglandin dan nitrit oksida merupakan vasodilator yang akan mengatur mekanisme inflamasi pada penyakit reumatik, penyakit degeneratif kronik, iskemia otak, penyakit neuroinflamasi (seperti *multiple sclerosis*, demielinasi, dan demensia).<sup>20</sup> Aktivitas antiinflamasi dilakukan juga dengan menilai ekstrak akar pakis tangkur dalam menekan produksi TNF- $\alpha$  dalam sistem tubuh. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak pada konsentrasi hingga 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mampu menghambat produksi TNF- $\alpha$  pada sel RAW264.7 yang berbeda bermakna apabila dibandingkan kepada kelompok kontrol negatif ( $p < 0,05$ ) dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 226,35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

TNF- $\alpha$  dapat memicu demam melalui stimulasi sintesis PGE2 pada endotel pembuluh darah, dan mempunyai efek sistemik bila diproduksi dalam jumlah banyak seperti sepsis bakteri atau infeksi kronis. TNF- $\alpha$  juga dapat menyebabkan sensitisasi saraf dan nyeri melalui jalur TNFR1 dan prostaglandin.<sup>20</sup> Produksi TNF- $\alpha$  yang berkelanjutan juga dilaporkan bertanggung jawab atas penyakit yang berhubungan dengan infeksi parasit, kanker, dan pasien *rheumatoid arthritis* (RA). TNF- $\alpha$  telah diketahui terlibat dalam patologi penyakit inflamasi. Dengan demikian, penurunan regulasi sitokin ini dianggap sebagai salah satu fungsi penting dari agen anti-inflamasi.

Ekstrak akar pakis tangkur dilaporkan mengandung proanthocyanidin yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Proanthocyanidins merupakan flavan-3-ol terkondensasi yang merupakan kelompok polifenol penting karena bioaktivitasnya antara lain aktivitas anti-inflamasi, anti-oksidan dan anti-kanker. *Proanthocyanidins* ditemukan pada tanaman seperti teh, anggur, blackcurrant, bilberry, cranberry, kulit kayu pinus, dan kulit kacang tanah. *Proanthocyanidins* terbukti mengurangi stres oksidatif (ROS) dan anti inflamasi.<sup>20</sup> Efek penghambatan ekstrak akar pakis tangkur konsentrasi 10, 50, 100, dan 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  secara signifikan menghambat produksi enzim iNOS, NO, dan TNF- $\alpha$  pada sel yang terstimulasi LPS secara *dose dependant*.

## 5. Simpulan

Ekstrak akar pakis tangkur memiliki aktivitas anti-inflamasi secara *in vitro* melalui penghambatan produksi mediator inflamasi pada sel RAW264.7 yang distimulasi LPS. Ekstrak akar pakis tangkur mampu menghambat mediator inflamasi yaitu enzim iNOS dan NO dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  masing-masing adalah 87,22 dan 99,99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa data yang dipublikasikan

pada naskah ini tidak ada konflik kepentingan terhadap pihak manapun.

## Daftar Pustaka

1. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.* 2018;68-69:106-121.
2. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA Jr, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol.* 2017;38(1):5-19.
3. Wei Jinrui, Zhang Yan, Li Haopeng, Wang Fuquan, Yao Shanglong. Toll-like receptor 4: A potential therapeutic target for multiple human diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2023; 166:1-9.
4. Endrinaldi E, Darwin E, Zubir N, Revilla G. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Wharton's Jelly on ADAMTS-4 and iNOS Levels in Osteoarthritis Rat Model. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(8):1270-5.
5. Farrar FC, White D, Darnell L. Pharmacologic Interventions for Pain Management. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2017;29(4):427-47.
6. Subarnas A and Wagner H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shellgein A from *Polypodium feei* METT. *Phytomedicine.* 2000; 7(5): 401-5.
7. Baek NI, Chung MS, Shamon L, Kardono LB, Tsauri S, Padmawinata K, et al. Selliguaeain A, a novel highly sweet proanthocyanidin from the rhizomes of *Selliguea feei*. *Journal of Natural Product.* 1993;56(9):1532-8.
8. Hasanah AN, Levita J, Natapoera ED, Subarnas A. Analyzing the interaction of shellegueain A: A bioactive compound of pakis tangkur (*Selliguea feei* or *Polypodium feei*) to cyclooxygenase enzyme by molecular docking. *Asian Journal of Chemistry.* 2011;23(7):3093.
9. Lee M, Shim SY, Sung SH. Triterpenoids isolated from *Alnus japonica* inhibited LPS-induced inflammatory mediators in HT-29 cells and RAW264.7 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2017;40(9):1544-50
10. Park SB, Park GH, Um Y, Kim HN, Song HM, Kim N, Kim HS, Jeong JB. Wood-cultivated ginseng exerts anti-inflammatory effect in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Int J Biol Macromol.* 2018;116:327-34.
11. Wu J, Qu Y, Deng JX, Liang WY, Jiang ZL, Lai R, Yu QH. Resveratrol inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 for treatment of rheumatoid arthritis: from In-Silico to In-vitro elucidation. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(2):745-52.
12. Ooi YP, Wong YP, Koh RY, Ling AP. An Investigation of Anti-Inflammatory Properties of Methanol Extract of *Syzygium malaccense* on Lipopolysaccharide-Stimulated Raw 264.7 Macrophages. In International Conference on Latest Trends in Food, Biological & Ecological Sciences Phuket (Thailand)(ICLTFBE'14). 2014; 15-6.
13. Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Patel S, Pan X, Naz S, et al. Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;116:108999.
14. Sayah K, Chemlal L, Marmouzi I, El Jemli M, Cherrah Y, Faouzi ME. In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aqueous extracts. *South African Journal of Botany.* 2017;113:160-3.
15. Suwandi DW, Rostinawati T, Muchtaridi M, Subarnas A. Aktivitas Analgetik Ekstrak dan Fraksi-fraksi Akar Pakis

- Tangkur (*Polypodium feei.*, METT) dari Gunung Talaga Bodas secara In Vivo. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2020;8(1):52-66.
16. Kim E, Yi YS, Son YJ, Han SY, Kim DH, Nam G, et al. BIOGF1K, a compound K-rich fraction of ginseng, plays an antiinflammatory role by targeting an activator protein-1 signaling pathway in RAW264. 7 macrophage-like cells. *Journal of Ginseng Research*. 2018;42(2):233-7.
  17. Suwandi DW, Rostnawati T, Muchtaridi M, Subarnas A. In vitro evaluation of selligueain A effects on the proinflammatory mediators production in RAW264. 7 murine macrophages. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 2021;10(3):313-8.
  18. Yang XR, Zhang XF, Zhang XM, Gao HY. Analgesic and anti-inflammatory activities and mechanisms of 70% ethanol extract of *Zygophyllum macropodum* in animals. *Chinese Herbal Medicines*. 2018;10(1):59-65.
  19. Navarro M, Moreira I, Arnaez E, Quesada S, Azofeifa G, Alvarado D, Monagas MJ. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. *Plants (Basel)*. 2017;6(4):50.
  20. Yang L, Xian D, Xiong X, Lai R, Song J, Zhong J,. Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Biomed Res Int.*, 2018:1-11.