

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PIPERIN DAN  
ASAM PIPERAT DARI BUAH LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) SERTA  
POTENSINYA SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*  
MELALUI PENDEKATAN *IN SILICO***

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Bayu Anggara Krisna**

**1917011094**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG**

**2026**

## ABSTRAK

### IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PIPERIN DAN ASAM PIPERAT DARI BUAH LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) SERTA POTENSINYA SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* MELALUI PENDEKATAN *IN SILICO*

Oleh

Bayu Anggara Krisna

Biofilm yang dibentuk oleh *Pseudomonas aeruginosa* berperan penting dalam meningkatkan resistensi bakteri terhadap agen antibakteri, sehingga diperlukan pencarian senyawa alami yang berpotensi sebagai agen antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa piperin dan asam piperat hasil isolasi dari buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) serta mengevaluasi potensinya sebagai agen antibiofilm melalui pendekatan *in silico*.

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode sokhletasi dengan pelarut etanol, diikuti pemurnian dan karakterisasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), spektrofotometer UV-*Vis*, dan *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Hasil KLT menunjukkan nilai *Retention Factor* (*R<sub>f</sub>*) piperin sebesar 0,33 dan asam piperat sebesar 0,20. Spektrum UV-*Vis* piperin menunjukkan puncak serapan pada 342,50; 310,00; 254,50; dan 244,50 nm, sedangkan asam piperat pada 338,00 dan 307,00 nm, yang mengindikasikan sistem aromatik dan karbonil terkonjugasi. Analisis FTIR piperin menunjukkan pita serapan pada 2937 dan 2855  $\text{cm}^{-1}$  (C–H alifatik), 1632  $\text{cm}^{-1}$  (karbonil), 1446  $\text{cm}^{-1}$  (C–C aromatik), dan 1252  $\text{cm}^{-1}$  (C–O eter), sedangkan asam piperat menunjukkan pita serapan pada 1676,14  $\text{cm}^{-1}$  (C=O asam karboksilat), 3400–3200  $\text{cm}^{-1}$  (O–H), serta 2653,9 dan 2534,6  $\text{cm}^{-1}$  (dimer –COOH), yang mengonfirmasi keberadaan gugus fungsi khas kedua senyawa.

Hasil *molecular docking* menunjukkan bahwa piperin memiliki nilai *binding affinity* sebesar -6,549 dan -8,874 kkal/mol, sedangkan asam piperat sebesar -6,522 dan -8,010 kkal/mol terhadap reseptor target. Nilai ini sebanding dengan kontrol positif *tobramycin* dan *cinnamaldehyde*, sehingga menunjukkan bahwa piperin dan asam piperat berpotensi sebagai agen antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

**Kata kunci:** piperin, asam piperat, antibiofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *in silico*.

## ABSTRACT

### IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PIPERINE AND PIPERIC ACID FROM BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) AND THEIR POTENTIAL AS ANTIBIOFILM AGENTS AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* THROUGH AN *IN SILICO* APPROACH

By

Bayu Anggara Krisna

Biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* plays an important role in increasing bacterial resistance to antibacterial agents, highlighting the need to explore natural compounds with potential antibiofilm activity. This study aimed to isolate and characterize piperine and piperic acid from black pepper (*Piper nigrum* L.) and evaluate their potential as antibiofilm agents using an *in silico* approach.

Extraction was carried out using the Soxhlet method with ethanol as the solvent, followed by purification and characterization using Thin Layer Chromatography, UV-Vis spectrophotometry, and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. TLC analysis showed R<sub>f</sub> values of 0.33 for piperine and 0.20 for piperic acid. The UV-Vis spectrum of piperine exhibited absorption maxima at 342.50, 310.00, 254.50, and 244.50 nm, while piperic acid showed peaks at 338.00 and 307.00 nm, indicating conjugated aromatic and carbonyl systems. FTIR analysis of piperine revealed absorption bands at 2937 and 2855 cm<sup>-1</sup> (aliphatic C–H), 1632 cm<sup>-1</sup> (carbonyl), 1446 cm<sup>-1</sup> (aromatic C–C), and 1252 cm<sup>-1</sup> (ether C–O). Piperic acid showed absorption bands at 1676.14 cm<sup>-1</sup> (carboxylic acid C=O), 3400–3200 cm<sup>-1</sup> (O–H), and 2653.9 and 2534.6 cm<sup>-1</sup> (–COOH dimer), confirming the characteristic functional groups of both compounds.

Molecular docking results showed that piperine exhibited binding affinity values of -6.549 and -8.874 kcal/mol, while piperic acid showed -6.522 and -8.010 kcal/mol against the target receptors. These values were comparable to the positive controls tobramycin and cinnamaldehyde, indicating that piperine and piperic acid have potential as antibiofilm agents against *Pseudomonas aeruginosa*.

**Keywords:** piperine, piperic acid, antibiofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *in silico*

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PIPERIN DAN  
ASAM PIPERAT DARI BUAH LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) SERTA  
POTENSINYA SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*  
MELALUI PENDEKATAN *IN SILICO***

**Oleh**

**BAYU ANGGARA KRISNA**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

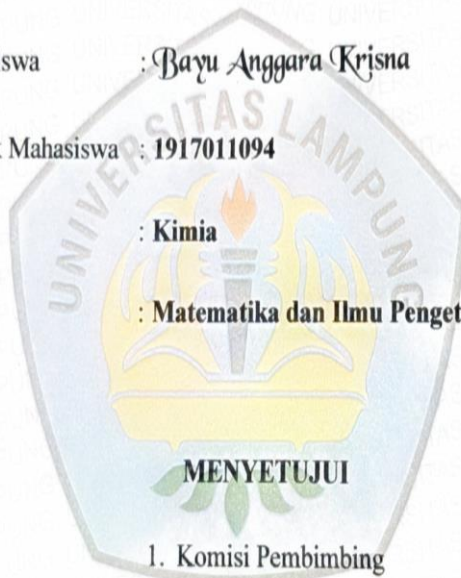
Judul Penelitian : **IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI  
SENYAWA PIPERIN DAN ASAM PIPERAT  
DARI BUAH LADA HITAM (*Piper nigrum* L.)  
SERTA POTENSINYA SEBAGAI AGEN  
ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*  
MELALUI PENDEKATAN *IN SILICO***

Nama Mahasiswa : *Bayu Anggara Krisna*

Nomor Pokok Mahasiswa : **1917011094**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



*[Signature]*  
**Dr. Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.**  
NIP 19730825 200003 1 001

*[Signature]*  
**Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**  
NIP 19770713 200912 2 002

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

*[Signature]*  
**Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si.**  
NIP 19720530 200003 2 001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Syaiful Bahri, S.Si, M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**



Anggota : **Dr. Sonny Widiarto, S.Si, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si, M.Si.**  
NIP. 197110012005011002



**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 2 Februari 2026**

**LEMBAR PENYATAAN  
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Bayu Anggara Krisna  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011094  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **"Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Piperin dan Asam Piperat dari Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) Serta Potensinya sebagai Agen Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* Melalui Pendekatan *In Silico*"** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruhnya data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 23 Februari 2026



Bayu Anggara Krisna  
NPM 1917011094

## RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Bayu Anggara Krisna, lahir pada tanggal 19 Juni 2001 di Bandar Lampung. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Hartarto Didik Kristiar dan Ibu Nina Armaini Oktivia. Penulis menyelesaikan pendidikan TK pada tahun 2007 dan dilanjutkan pendidikan dasar di SD Kartika II-5 Bandar Lampung hingga tahun 2013. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMPN 14 Bandar Lampung hingga lulus pada tahun 2016. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMAN 2 Unggul Sekayu dan lulus pada tahun 2019. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama masa perkuliahan, penulis aktif dalam berbagai organisasi, diantaranya sebagai kader muda Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2020, kemudian mengemban amanah sebagai Kepala Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) di HIMAKI periode 2021. Penulis juga aktif dalam Unit Kegiatan Mahasiswa Fakultas (UKMF) sebagai Anggota Muda Rois (AMAR) pada periode 2020 di Rohani Islam (Rois). Penulis dikenal aktif dan bertanggung jawab dalam setiap organisasi yang diikuti serta dapat menjalin hubungan baik dengan anggota organisasi lainnya. Penulis juga dikenal aktif menjadi Asisten Praktikum Kimia Organik I, II, dan III untuk mahasiswa angkatan 2022 dan 2023 di Jurusan Kimia.

Penulis menyelesaikan penelitian di Laboratorium Kimia Organik dengan judul *“Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Piperin dan Asam Piperat dari Buah*

*Lada Hitam (Piper nigrum L.) Serta Potensinya sebagai Agen Antibiofilm  
Pseudomonas aeruginosa Melalui Pendekatan In Silico” pada tahun 2026.*

## MOTTO

*“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”*

*(QS. Al-Insyirah: 5-6)*

*“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”*

*(QS. Al-Baqarah: 286)*

*“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada apa diri mereka sendiri”*

*(QS. Ar-Ra'd: 11)*

*“Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik”*

*(QS. Al-A'raf: 56)*

*“Akan datang kepada manusia tahun-tahun yang penuh tipu daya, dimana pendusta dipercaya dan orang jujur didustakan, pengkhianat diberi amanah dan orang yang amanah dikhianati”*

*(Muhammad Assaewad)*

*“Progress setiap manusia berbeda-beda, ada yang lambat, ada yang cepat, ada juga yang mulus, begitupun yang penuh hambatan. Fokus pada dirimu sendiri, karena apa yang kamu lihat belum tentu sesuai dengan kenyataannya. Perbanyak bersyukur, karena hidupmu jauh lebih bermakna daripada hanya sekedar perbandingan”*

*(Bayu Anggara Krisna)*



Segala puji bagi Allah SWT atas limpahan rahmat, kasih sayang, dan hidayah-Nya yang tiada henti, sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan di jenjang perguruan tinggi ini. Dengan penuh rasa syukur dan cinta, penulis mempersembahkan karya ini kepada:

Kedua Orang Tua Tercinta,

Ayahanda Hartarto Didik Kristiar dan Ibunda Nina Armaini Oktivia yang telah membimbingku dari kecil hingga menyelesaikan studi sarjana ini dan telah menjadi cahaya dalam setiap langkah, mencintai tanpa syarat, serta mendoakan tanpa lelah.

Keluarga Tersayang,

Bunga Nilam Ramadhani Krisna yang selalu mendoakan dan memberiku semangat.

Pembimbing Penelitianku, Dr. Syaiful Bahri, S.Si., M.Si. dan Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. yang selalu sabar dalam membimbingku.

Bapak/Ibu Dosen Jurusan Kimia, yang telah membimbing, memberi ilmu, dan motivasi kepada penulis selama menjalankan studi ini.

Para sahabat dan semua orang yang hadir dalam perjalanan ini, yang telah menemani dalam suka dan duka, serta memberi kehangatan di saat sedih.

**Almamater Tercinta**

**Universitas Lampung**

## SANWACANA

Alhamdulillah rabbil'alamin, Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Piperin dan Asam Piperat dari Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) Serta Potensinya sebagai Agen Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* Melalui Pendekatan *In Silico*”**. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada baginda Rasulullah Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabat serta umatnya di akhir zaman. Semoga di yaumul akhir kelak mendapatkan syafa'atnya. Aamiin.

Penulis menyadari laporan ini dapat tersusun dan diselesaikan dengan adanya bantuan, motivasi, dan doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua serta seluruh keluarga penulis yang senantiasa memberikan dukungan baik berupa doa maupun materi sehingga penulis dapat sampai di tahap ini.
2. Bapak Dr. Syaiful Bahri, M.Si. selaku dosen pembimbing penulis yang senantiasa memberikan ilmu dan arahan sehingga penelitian dan penulisan laporan dapat berjalan dengan baik dan terarah.
3. Prof. Drs. Andi Setiawan, M.Sc, Ph.D. selaku Pembimbing Akademik yang selalu memberikan arahan, motivasi, serta saran untuk penulis selama masa perkuliahan.
4. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

5. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si, selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung.
6. Ibu Wiwit Kasmawati (mbak wit) selaku laboran organik jurusan kimia FMIPA Unila yang sangat baik dalam membantu penulis selama bekerja di laboratorium.
7. Mbak Yuni yang selalu membantu penulis selama di kampus.
8. Teman-teman dekat penulis dari SMA seperti Aswa, Andika dan Hares yang selalu menyemangati penulis.
9. Teman-teman *chemistry*'19 yang telah banyak membantu penulis dalam hal perkuliahan.
10. Ejak, Silboedh dan Ucup sebagai sahabat yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis sehingga penulis dapat bertahan hingga saat ini.
11. Ibnu, Jihan Nafisa, Niko Hilal Fazri, Adiya dan Ponco yang terkhusus sangat amat membantu penulis dalam banyak hal selama penelitian maupun perkuliahan.
12. Mbak Armidla, Mbak Rista, Mbak Ofriani dan Mbak Reni juga yang sangat amat membantu penulis untuk memberikan arahan serta pengalaman kepada penulis dalam penelitian dan penulisan laporan.
13. Kak Lanang, Kak Ikhsan, Kak Indra juga yang selalu membantu penulis.
14. Kak Fendy Setiawan yang telah banyak memberi bantuan dan saran selama penulis melakukan penelitian.
15. Rekan-rekan kerja di laboratorium seperti Naurah Nabilah dan Aulia Reyzifa.
16. NRG 20 (Angela, Dilla, Muti, Vio) dan NRG 21 (Rita, Inggit, Julia, Diah Vio dan Govindo).
17. Yuwan, Sabil, Gomgom, Rahmadtullah, Fansang, dan Jordyyang telah banyak membantu penulis selama di kampus.
18. Nendhita (Bre) yang selalu menjadi teman ketika mengulang mata perkuliahan.
19. Dika (Aufa Baladika) dan Morin (Agoy) yang menjadi teman mabar roblox penulis.
20. Taylor Swift yang menjadi semangat penulis dan *role model* penulis.

21. EXO, NCT, Red Velvet, Twice. Blackpink, Aespa, ITZY, MCND, Hearts2Hearts yang menjadi semangat juga untuk penulis.
22. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Demikian yang dapat penulis sampaikan, penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini belum sempurna dan masih terdapat kekurangan serta kesalahan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar karya ini dapat diperbaiki dan dikembangkan lebih baik. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis maupun bagi pembaca.

Bandar Lampung, 16 Oktober 2025

Penulis

Bayu Anggara Krisna  
NPM. 1917011094

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xviii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xix</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Lada Hitam ( <i>Piper nigrum</i> Linn.) .....	5
2.2 Kandungan Alkaloid pada Lada Hitam ( <i>Piper nigrum</i> L.).....	6
2.3 Asam Piperat.....	7
2.4 Teknik Isolasi Senyawa Alkaloid.....	7
2.4.1 Ekstraksi .....	8
2.4.2 Kromatografi.....	10
2.5 Spektrofotometri.....	11
2.5.1 Spektrofotometri UV-Vis.....	11
2.5.2 <i>Fourier Transform Infrared Spectrometry</i> (FTIR) .....	13
2.6 <i>Bioassay</i> Aktivitas Antibiofilm .....	15
2.6.1 Bakteri.....	15
2.6.2 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.7 Biofilm.....	16
2.7.1 Proses Pembentukan Biofilm .....	17
2.7.2 Peran Biofilm dalam Resistensi Bakteri .....	18
2.7.3 Antibiofilm .....	20
2.8 Kontrol Positif Uji Antibiofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
2.8.1 <i>Tobramycin</i> .....	21
2.8.2 <i>Cinnamaldehyde</i> ( <i>Cinnamaldehyde</i> ) .....	22
2.9 <i>Molecular Docking</i> .....	23
2.9.1 Aplikasi <i>Molecular Docking</i> dalam Studi Senyawa Bahan Alam .....	24
2.9.2 <i>Molecular Docking</i> sebagai Pendekatan Studi Antibiofilm.....	25

2.10	Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas Secara <i>In Silico</i> .....	26
2.10.1	Farmakokinetik dan Toksisitas .....	26
2.10.2	Prediksi Farmakokinetik dengan SwissADME .....	27
2.10.3	Prediksi Toksisitas dengan ProTox-II .....	28
<b>III.</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian .....	30
3.2	Alat dan Bahan .....	30
3.2.1	Alat yang Digunakan.....	30
3.2.2	Bahan yang Digunakan .....	31
3.3	Prosedur Penelitian.....	31
3.3.1	Persiapan dan Pengambilan Sampel .....	31
3.3.2	Isolasi Piperin.....	31
3.3.3	Hidrolisis Piperin.....	32
3.3.4	Karakterisasi Senyawa .....	33
3.3.5	Pengambilan dan Persiapan Struktur Protein .....	33
3.3.6	Pengambilan dan Persiapan Struktur <i>Native Ligand</i> .....	33
3.3.7	Pengambilan dan Persiapan Struktur Ligan (Uji, <i>Native Ligand</i> dan Kontrol Positif) .....	34
3.3.8	Penentuan Parameter <i>Grid Box</i> .....	34
3.3.9	Validasi Metode <i>Docking</i> .....	35
3.3.10	Visualisasi dan Analisis Interaksi.....	36
3.3.11	Prediksi Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas <i>In Silico</i> .....	36
<b>IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>38</b>
4.1	Persiapan Sampel .....	38
4.2	Ekstraksi Sampel .....	38
4.3	Persiapan Ekstrak <i>Crude</i> Piperin.....	39
4.4	Refluks dan Rekrystalisasi Piperin.....	40
4.5	Rekrystalisasi.....	41
4.6	Persiapan Asam Piperat .....	42
4.7	<i>Monitoring</i> Kemurnian Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Piperin dan Asam Piperat.....	42
4.8	Uji Titik Leleh Kristal Piperin dan Asam Piperat.....	44
4.9	Karakterisasi Piperin dan Asam Piperat .....	45
4.9.1	Spektrofotometer UV- <i>Vis</i> .....	45
4.9.2	Fourier Transform Infra-Red (FTIR).....	48
4.10	Uji Aktivitas Antibiofilm Secara <i>In Silico</i> .....	50
4.10.1	<i>Re-docking</i> : Validasi <i>Docking</i> Reseptor terhadap <i>Ligand Native</i> -nya .....	54
4.10.2	<i>Docking</i> Ligan Uji dan Kontrol Positif Reseptor 1MV8 .....	60
4.10.3	<i>Docking</i> Ligan Uji dan Kontrol Positif Reseptor 4NG2 .....	66
4.11	Analisis Sifat Farmakokinetik dan Toksisitas Senyawa Secara <i>In Silico</i> .....	70
4.11.1	Analisis Sifat Farmakokinetik Piperin dan Asam Piperat melalui SwissADME.....	70

4.11.2 Analisis Toksisitas Piperin dan Asam Piperat melalui ProTox-II .....	75
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>78</b>
5.1 Kesimpulan .....	78
5.2 Saran .....	79
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>80</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>89</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Perbandingan Spektrum Piperin Hasil Penelitian dengan Literatur (Bahri <i>et al.</i> , 2019) .....	46
Tabel 2. Perbandingan Spektrum Asam Piperat Hasil Penelitian dengan Literatur (Bahri <i>et al.</i> , 2019) .....	47
Tabel 3. Informasi Makromolekul 1MV8 dan 4NG2 .....	51
Tabel 4. Data Hasil Analisis Farmakokinetik SwissADME Piperin.....	72
Tabel 5. Data Hasil Analisis Farmakokinetik SwissADME Asam Piperat .....	74

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur senyawa piperin.....	6
Gambar 2. Struktur senyawa asam piperat.....	7
Gambar 3. Spektrum UV senyawa piperin (Bahri <i>et al.</i> , 2019).....	12
Gambar 4. Spektrum UV asam piperat ((Bahri <i>et al.</i> , 2019) .....	12
Gambar 5. Spektrum <i>Infrared</i> Senyawa Piperin (Octavia <i>et al.</i> , 2024).....	13
Gambar 6. Spektrum <i>Infrared</i> Senyawa Asam Piperat (Bahri <i>et al.</i> , 2019).....	14
Gambar 7. Struktur senyawa <i>tobramycin</i> .....	22
Gambar 8. Struktur senyawa <i>cinnamaldehyde</i> .....	23
Gambar 9. Kristal Piperin dalam Botol <i>Vial</i> .....	41
Gambar 10. Hasil KLT Piperin dan Asam Piperat pada (a) 365 nm (b) 254 nm..	43
Gambar 11. Hasil KLT Piperin dan Asam Piperat setelah Diberikan Penampil Bercak $Ce(SO_4)_2$ .....	44
Gambar 12. Spektra UV- <i>Vis</i> Piperin.....	46
Gambar 13. Spektra UV- <i>Vis</i> Asam Piperat.....	47
Gambar 14. Spektra <i>Infra-Red</i> Piperin.....	48
Gambar 15. Spektra <i>Infra-Red</i> Asam Piperat .....	49
Gambar 16. Reseptor beserta Hidrogen Polar (a) Alginat (b) LasR. ....	52
Gambar 17. Muatan Kollman (a) Alginat (b) LasR .....	53
Gambar 18. Muatan Gasteiger (a) Alginat (b) LasR.....	53
Gambar 19. Sebaran Muatan Merata (a) Alginat (b) LasR.....	54
Gambar 20. Reseptor 1MV8 dengan native ligand.....	55
Gambar 21. Struktur (a) Reseptor 1MV8 (b) <i>Native Ligand</i> NAD.....	55
Gambar 22. Jumlah torsi pada Ligan NAD.....	56
Gambar 23. Interaksi Ikatan-Ikatan pada 1MV8 dan <i>Native Ligand</i> NAD .....	57

Gambar 24. Reseptor 4NG2 dengan <i>native ligand</i> -nya .....	57
Gambar 25. Struktur (a) Reseptor 4NG2 (b) <i>Native Ligand</i> OHN .....	58
Gambar 26. Jumlah torsi pada ligan OHN .....	58
Gambar 27. Interaksi Antarmolekul 4NG2 dan <i>Native Ligand</i> OHN.....	59
Gambar 28. Jumlah Torsi pada Ligan Piperin .....	60
Gambar 29. Interaksi Antarmolekul 1MV8 dan Ligan Uji Piperin .....	61
Gambar 30. Jumlah Torsi pada Ligan Asam Piperat .....	62
Gambar 31. Interaksi Antarmolekul 1MV8 dengan Ligan Uji Asam Piperat.....	63
Gambar 32. Jumlah Torsi pada Ligan <i>Tobramycin</i> .....	64
Gambar 33. Interaksi Antarmolekul 1MV8 dengan Ligan Uji <i>Tobramycin</i> .....	65
Gambar 34. Interaksi Antarmolekul 4NG2 dengan Ligan Uji Piperin .....	66
Gambar 35. Interaksi Antarmolekul 4NG2 dengan Ligan Uji Asam Piperat .....	67
Gambar 36. Jumlah Torsi pada Ligan <i>Cinnamaldehyde</i> .....	68
Gambar 37. Interaksi Antarmolekul 4NG2 dengan Ligan Uji <i>Cinnamaldehyde</i> ..	69
Gambar 38. Hasil <i>Report</i> Toksisitas Piperin dengan ProTox-II .....	76
Gambar 39. Hasil <i>Report</i> Toksisitas Asam Piperat dengan ProTox-II.....	77

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik yang disebabkan oleh bakteri patogen telah menjadi isu kesehatan global yang sangat mengkhawatirkan (WHO, 2020). Laporan dari *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) Amerika Serikat pada tahun 2019 mencatat lebih dari 2,8 juta kasus infeksi yang terkait dengan resistensi bakteri setiap tahunnya, dengan jumlah kematian mencapai setidaknya 35.000 jiwa. Salah satu mekanisme utama yang berkontribusi terhadap fenomena ini adalah pembentukan biofilm, struktur kompleks yang memungkinkan bakteri bertahan dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan dan sulit dijangkau oleh antibiotik. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri patogen yang diketahui memiliki kemampuan tinggi dalam membentuk biofilm, terutama pada lingkungan klinis seperti rumah sakit. Diperkirakan sekitar 80% infeksi kronis yang terjadi saat ini berkaitan langsung dengan keberadaan biofilm (Penesyant *et al.*, 2020). Melihat tingginya peran biofilm dalam resistensi bakteri, maka pentingnya penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiofilm untuk mengatasi infeksi bakteri akibat adanya biofilm.

Berbagai strategi intervensi telah dieksplorasi oleh banyak peneliti untuk menghadapi biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, terutama *strain mucoid* yang kaya alginat. Salah satu pendekatan menjanjikan adalah pemanfaatan enzim seperti  $\beta$ -glukosidase dan *lyticase*, yang terbukti secara signifikan mampu mendegradasi biofilm klinis serta menurunkan MBEC (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) antibiotik tanpa menimbulkan toksisitas terhadap sel eukariotik (Banar *et al.*, 2019). Pendekatan lain yang juga banyak dibahas adalah

penggunaan *alginate lyase*, baik dalam bentuk murni maupun yang terangkai dalam nanopartikel, yang mampu merusak struktur alginat biofilm dan meningkatkan efektivitas antibiotik seperti *ceftazidime* atau gentamisin pada isolat PAO-1 bahkan hingga eradikasi biofilm total (Chareza *et al.*, 2023). Di samping itu, upaya terapeutik juga mencakup pencarian senyawa alami yang berpotensi memecah biofilm atau menghambat regulasi *quorum sensing* dengan harapan menemukan agen antibiofilm baru yang aman, efektif, dan minim resistensi. Peneliti terus mencari senyawa alami dengan aktivitas antibiofilm untuk dijadikan alternatif terapi pengendalian infeksi *P. aeruginosa* yang sulit ditangani termasuk dengan meneliti senyawa-senyawa kimia bahan alam, salah satunya adalah piperin.

Piperin, alkaloid utama yang ditemukan dalam buah lada hitam (*Piper nigrum* Linn.), telah lama dikenal memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sifat anti inflamasi, antioksidan, antikanker (Haq *et al.*, 2021) dan antibiofilm (Ndezo *et al.*, 2021). Tsopmene *et al.*, (2024) mengungkapkan bahwa piperin, senyawa aktif utama dari lada hitam (*Piper nigrum*) memiliki potensi sebagai agen antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Studi ini menggunakan isolat klinis yang diambil dari rumah sakit dan menguji efek piperin terhadap pertumbuhan bakteri dan kemampuan pembentukan biofilm. Dari hasil yang diperoleh, piperin menunjukkan aktivitas antibakteri sedang dengan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) rata-rata 128 µg/mL. Namun, yang menarik adalah kemampuannya dalam menghambat pembentukan biofilm meskipun digunakan pada konsentrasi di bawah MIC, terutama pada dosis 64 µg/mL. Temuan bahwa piperin mampu menghambat dan menguraikan biofilm *P. aeruginosa* pada konsentrasi sub-MIC, mendorong rasa ingin tahu penulis untuk mengetahui apakah asam piperat (*piperic acid*) juga memiliki potensi yang sama atau bahkan lebih kuat sebagai antibiofilm dari piperin.

Asam piperat diperoleh melalui proses hidrolisis basa terhadap piperin yang diisolasi dari buah lada hitam (*Piper nigrum* L., Piperaceae), dan selanjutnya dapat dimodifikasi menjadi senyawa turunan berupa ester melalui sintesis kimia (Choochana *et al.*, 2015). Penelitian oleh Singh *et al.*, (2022) menunjukkan bahwa

asam piperat dan beberapa turunannya, seperti 4-etilamida piperat, dapat bekerja secara sinergis dengan *ciprofloxacin* dalam meningkatkan aktivitas antibiofilm. Kombinasi ini terbukti mampu menurunkan secara signifikan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat pembentukan biofilm maupun merusak biofilm yang telah terbentuk, jika dibandingkan dengan penggunaan masing-masing senyawa secara tunggal. Temuan ini mengindikasikan bahwa struktur kimia asam piperat yang mengandung gugus karboksilat lebih polar dibandingkan piperin berpotensi memperkuat afinitas terhadap target pembentukan biofilm, sehingga menjadikannya salah satu kandidat senyawa alam yang patut dipertimbangkan dalam pengembangan agen antibiofilm alternatif.

Berdasarkan berbagai temuan tersebut, baik piperin maupun asam piperat menunjukkan potensi yang menjanjikan sebagai agen antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Aktivitas piperin yang mampu menghambat dan menguraikan biofilm pada konsentrasi sub-MIC, serta adanya indikasi bahwa struktur kimia asam piperat berkontribusi terhadap peningkatan afinitas terhadap target biofilm, menjadi dasar kuat untuk dilakukan analisis lebih lanjut. Salah satu pendekatan modern yang dapat dilakukan adalah melalui metode *molecular docking*. Menurut Frimayanti *et al.*, (2021), *molecular docking* adalah metode komputasional yang digunakan untuk memprediksi interaksi antara molekul kecil (ligan) dengan makromolekul seperti protein (reseptor), berdasarkan struktur spasial keduanya. Teknik ini memungkinkan peneliti untuk mengevaluasi afinitas ikatan serta orientasi ligan di dalam situs aktif target, sehingga dapat memberikan gambaran awal mengenai potensi aktivitas biologis suatu senyawa. Tujuan dari metode ini memungkinkan peneliti untuk memahami potensi afinitas suatu senyawa terhadap situs aktif protein target, yang dapat mengindikasikan kemungkinan aktivitas biologisnya, termasuk sebagai antibiofilm dengan menargetkan struktur biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan target utama yaitu alginat sebagai komponen utama penyusun biofilm *Pseudomonas aeruginosa* (Lavery *et al.*, 2014) dan LasR sebagai regulator utama dalam sistem *quorum sensing* yang mengatur ekspresi gen-gen virulensi dan biosintesis matriks biofilm (Déziel *et al.*, 2005).

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

1. Menganalisis senyawa piperin hasil isolasi dari buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) berdasarkan data titik leleh dan karakterisasi.
2. Menganalisis senyawa asam piperat hasil hidrolisis piperin berdasarkan data titik leleh dan karakterisasi.
3. Menganalisis karakteristik senyawa piperin dan asam piperat menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* dan FTIR.
4. Memvalidasi metode *molecular docking* melalui uji *re-docking* berdasarkan nilai RMSD.
5. Menganalisis potensi piperin dan asam piperat sebagai agen antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan afinitas ikatan dengan protein 1MV8.
6. Menganalisis interaksi molekuler piperin dan asam piperat terhadap protein LasR (4NG2) sebagai regulator pembentukan biofilm.
7. Menganalisis profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa piperin dan asam piperat sebagai kandidat agen antibiofilm menggunakan pendekatan *in silico* untuk menilai potensi pengembangan terapeutiknya.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait potensi senyawa piperin dan asam piperat sebagai agen antibiofilm melalui pendekatan *molecular docking* terhadap protein LasR dan alginat pada *Pseudomonas aeruginosa*. Informasi ini dapat menjadi referensi awal untuk pengembangan riset di bidang farmasi, mikrobiologi, dan kimia bahan alam.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Lada Hitam (*Piper nigrum* Linn.)

Lada atau *Piper nigrum* L., sering disebut sebagai "raja rempah-rempah" karena dominasinya dalam perdagangan global. Nama "lada" berasal dari kata Sanskerta "pippali", yang berarti beri. *Piper nigrum* adalah tanaman pemanjat beraroma yang bisa tumbuh setinggi 50-60 cm. Perbedaan antara lada putih dan lada hitam terletak pada waktu panen dan cara pengolahannya. Lada putih diperoleh dengan menghilangkan kulit buah yang sudah matang, sedangkan lada hitam diperoleh dengan mengeringkan buah mentah sehingga kulitnya tetap ada. Kedua jenis lada ini digunakan dalam berbagai hal, termasuk bumbu masakan, pengawet, insektisida, dan pengobatan herbal (Wang *et al.*, 2017).

Lada seringkali digunakan sebagai bahan kuliner dalam berbagai hidangan. Dalam masakan Barat, lada hitam umumnya digunakan sebagai bumbu untuk meningkatkan cita rasa dan mengawetkan makanan. Lada utuh dapat dimasukkan ke dalam semur dan sup atau digunakan dalam bouquet garni bersama dengan peterseli, *thyme*, dan daun salam. Biji lada yang ditumbuk ringan bisa ditambahkan ke dalam saus krim atau digunakan untuk melapisi *steak fillet* atau dada ayam untuk memberikan rasa pedas. Lada putih bubuk sering digunakan dalam masakan Thailand dan Cina, serta dalam pembuatan salad, saus krim, dan saus berwarna terang (Ravindran & Kallapurackal, 2024).

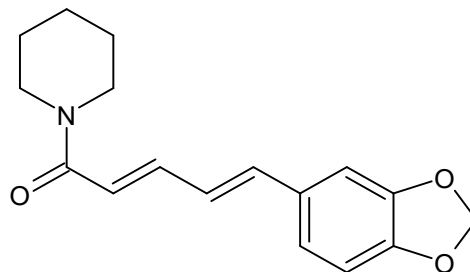
Selain dimanfaatkan dalam kuliner, lada juga digunakan dalam pengobatan tradisional di berbagai negara. Profil biologis tanaman ini telah dipelajari secara ekstensif oleh komunitas ilmiah dan didukung oleh banyak publikasi, tetapi belum tersedia kompilasi terbaru yang menyajikan profil lengkap mengenai aspek

pengobatan dari lada. Penelitian ini bertujuan untuk meninjau secara sistematis data ilmiah terkait sifat tradisional dan farmakologis *P. nigrum* (Takooree *et al.*, 2019).

## 2.2 Kandungan Alkaloid pada Lada Hitam (*Piper nigrum* L.)

Alkaloid adalah sekelompok senyawa yang beragam dengan berat molekul rendah dan mengandung nitrogen, sebagian besar berasal dari asam amino. Sebagai metabolit sekunder yang terdapat pada sekitar 20% spesies tanaman, alkaloid dianggap berperan dalam pertahanan terhadap herbivora dan patogen (Ziegler & Facchini, 2008). Salah satu contohnya adalah lada hitam (*Piper nigrum* L.). Lada hitam mengandung beberapa senyawa diantaranya piperin (5,3-9,2%), ka $\beta$ visin (sampai 1%) dan metil-pirolin; minyak atsiri (1,2-3,5%); lemak (6,5-7,5%); pati (36-37%) dan serat kasar ( $\pm$ 14%) (Hikmawanti *et al.*, 2016).

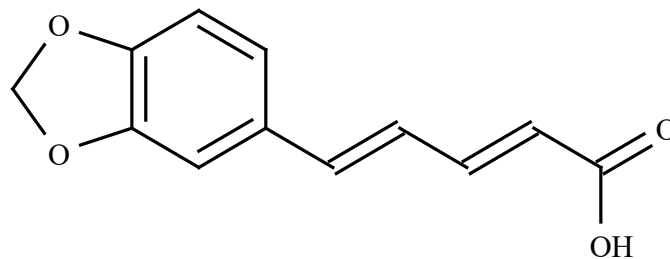
Piperin adalah salah satu alkaloid utama yang diisolasi dari lada hitam, serta dapat juga diisolasi dari berbagai anggota keluarga *Piperaceae* termasuk *Piper longum* (Mohapatra dan Basak, 2015), *Piper chaba* (Khan, 2015), *Piper guineense* (Juliani *et al.*, 2013), dan *Piper sarmentosum* (Hussain *et al.*, 2009). Tanaman dalam famili ini juga merupakan sumber utama berbagai senyawa bioaktif lainnya seperti flavonoid, fenolik, amida, alkaloid, steroid, neolignan, lignan, *chalcones*, terpen, dan berbagai fitokimia lainnya.



**Gambar 1.** Struktur senyawa piperin

### 2.3 Asam Piperat

Asam piperat (*piperic acid*) adalah senyawa turunan hasil reaksi hidrolisis basa dari piperin, alkaloid utama dalam lada hitam (*Piper nigrum*). Struktur kimianya adalah (2E,4E)-pentadienoik asam dengan gugus fenil metilendioksi, salah satu senyawa aktif dari tumbuhan *Piperaceae* (Rudraraju *et al.*, 2017).



**Gambar 2.** Struktur senyawa asam piperat

Asam piperat diperoleh dari hasil hidrolisis piperin melalui proses refluks selama 95 menit menggunakan larutan KOH etanolat 10% sebanyak 100 mL. Setelah refluks selesai, larutan dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh residu. Residu tersebut kemudian didinginkan dalam es, disuspensikan dalam air panas menggunakan penangas air, lalu diasamkan dengan larutan HCl 6 N hingga pH mencapai 3. Kristal yang terbentuk selanjutnya dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan etanol teknis dan dibiarkan semalaman hingga diperoleh asam piperat dalam bentuk kristal murni (Bahri *et al.*, 2019).

### 2.4 Teknik Isolasi Senyawa Alkaloid

Isolasi adalah proses pemisahan suatu komponen kimia yang diinginkan dari komponen-komponen lainnya yang bersifat sebagai kontaminan dalam suatu bahan (Wasia *et al.*, 2017). Terdapat beberapa teknik isolasi seperti contohnya ekstraksi, proses fraksinasi (partisi) serta kromatografi.

### 2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode untuk memisahkan campuran zat menjadi komponen-komponen terpisah. Memilih pelarut yang tepat sangat penting. Pelarut harus efektif melarutkan bahan yang diekstraksi dan cepat terpisah setelah pengocokan. Selain itu, pertimbangkan toksisitas, ketersediaan, harga, keamanan dari kebakaran, serta suhu dan tekanan kritis yang rendah untuk mengurangi biaya operasional dan reaktivitas (Williams, 1981). Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan satu jenis pelarut, dua atau bahkan lebih jenis pelarut yang disebut dengan ekstraksi bertingkat. Pada ekstraksi bertingkat, akan dihasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan. Ekstraksi terbagi menjadi beberapa metode, yaitu maserasi, sokletasi, refluks.

Pelarut sangat mempengaruhi proses ekstraksi. Pemilihannya dipengaruhi oleh beberapa faktor :

1. Selektivitas

Pelarut harus cepat dan sempurna melarutkan zat yang diekstrak.

2. Titik didih rendah agar mudah diuapkan tanpa suhu tinggi dan tidak meninggalkan residu dalam minyak.
3. Tidak larut dalam air.
4. Bersifat inert, tidak bereaksi dengan komponen lain.
5. Harga murah.
6. Mudah terbakar (Guenther, 1987).

Berikut adalah beberapa pelarut yang biasa digunakan dalam ekstraksi minyak atau lemak:

1. Etanol

Sering digunakan di laboratorium karena kelarutannya yang tinggi dan tidak bereaksi dengan komponen lain. Etanol juga memiliki titik didih rendah, memudahkan pemisahan minyak melalui distilasi.

2. n-Heksana

Pelarut ringan yang efektif mengangkat minyak dari biji-bijian dan mudah menguap, memudahkan proses refluks. Titik didihnya antara 65–70°C.

3. Isopropanol

Pelarut polar dengan massa jenis 0,789 g/ml, mirip dengan etanol dalam hal kelarutan yang tinggi. Titik didihnya adalah 81-82°C.

4. Etil Asetat

Pelarut semi-polar dengan titik didih 77°C, memudahkan pemisahan minyak melalui distilasi.

5. Aseton

Larut dalam berbagai pelarut lain seperti air, etanol, dan dietil eter. Digunakan dalam pembuatan plastik, serat, obat-obatan, dan senyawa kimia lainnya.

6. Metanol

Pelarut yang paling sering digunakan dalam isolasi senyawa organik dari bahan alam (Susanti *et al.*, 2012).

#### 2.4.1.1 Sokletasi

Metode ekstraksi sokletasi adalah teknik pemisahan zat dari campurannya dengan pemanasan, di mana pelarut mengalami sirkulasi. Dibandingkan dengan maserasi, ekstraksi sokletasi menghasilkan ekstrak yang lebih tinggi. Prinsip Sokletasi adalah penyaringan yang berulang-ulang sehingga hasil yang didapat sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Pelarut organik dapat menarik senyawa organik dalam bahan alam secara berulang-ulang (Anam *et al.*, 2014).

Kadji *et al.*, (2013) menyatakan bahwa ekstraksi dengan metode Sokhlet menghasilkan rendemen lebih besar dibandingkan dengan maserasi. Ini karena perlakuan panas meningkatkan kemampuan pelarut untuk mengekstraksi senyawa yang tidak larut pada suhu kamar, dan sirkulasi pelarut yang terus-menerus selama proses kontak dengan simplisia meningkatkan hasil ekstraksi.

## 2.4.2 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan, sedangkan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan (McNair & Miller, 2009). Adapun jenis-jenis kromatografi yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Cair Vakum (KCV), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dan lain-lain.

### 2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode analisis sederhana untuk mengidentifikasi senyawa kimia dalam tumbuhan selain skrining fitokimia. Nilai *RF* dan warna noda pada KLT membantu mengidentifikasi senyawa tersebut (Forestryana & Arnida, 2020). Prinsip Kromatografi Lapis Tipis yaitu pemisahan senyawa multi komponen dengan menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Oktaviantari *et al.*, 2019). Fase diam yang digunakan yaitu silika gel dan fase gerak yang digunakan yaitu eluen berupa n-Heksana : Etil Asetat (7:3) serta DCM : Etil Asetat (2:1).

Kelebihan metode KLT adalah biayanya relatif murah dan menggunakan instrumen sederhana. Meski begitu, metode ini tetap bisa menjadi analisis kualitatif yang andal jika didukung dengan preparasi sampel yang tepat, seperti ekstraksi pelarut (Pebe, 2022). Disamping kelebihanannya, terdapat kekurangan dari KLT sebagaimana yang diungkapkan oleh Anwar *et al.*, (2017) yaitu resolusi pemisahan senyawa yang relatif rendah. Hal ini dapat menyebabkan senyawa dengan polaritas yang berdekatan sulit terpisah secara sempurna, sehingga muncul noda yang saling bertumpang tindih. Oleh karena itu, pemilihan fase gerak dan optimasi kondisi elusi menjadi faktor penting untuk meningkatkan kualitas pemisahan pada analisis KLT.

## 2.5 Spektrofotometri

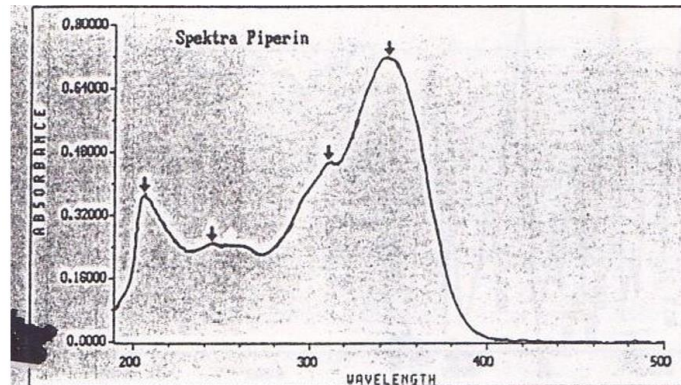
Spektrofotometri adalah metode dalam kimia analitik yang digunakan untuk menentukan kandungan atau komposisi suatu sampel, baik secara kualitatif maupun kuantitatif, dengan mengukur penyerapan cahaya (Priyanto *et al.*, 2008). Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif ketika energi tersebut ditransmisikan, dipantulkan, atau dipancarkan. Alat ini terdiri dari dua bagian utama: spektrometer, yang menghasilkan cahaya dari spektrum pada panjang gelombang tertentu, dan fotometer, yang mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan, dipancarkan, atau diserap (Jami *et al.*, 2021). Spektrofotometer dapat menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu. Pada penelitian ini, digunakan dua jenis alat spektrofotometer, yaitu spektrofotometer inframerah (IR) dan UV-*Vis*.

### 2.5.1 Spektrofotometri UV-*Vis*

Spektrofotometri UV-*Vis* adalah metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV (200-400 nm) dan *Visible* (400-750 nm) untuk mendeteksi senyawa (Karim *et al.*, 2022). Umumnya, senyawa yang dapat diidentifikasi dengan teknik ini adalah yang memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Pengujian dengan spektrofotometri UV-*Vis* dianggap sederhana dan cepat dibandingkan dengan metode lainnya (Sahumena *et al.*, 2020). Spektrofotometri UV-*Vis* menggunakan dua sumber cahaya yang berbeda, sehingga dapat digunakan untuk menganalisis baik sampel berwarna maupun tidak berwarna.

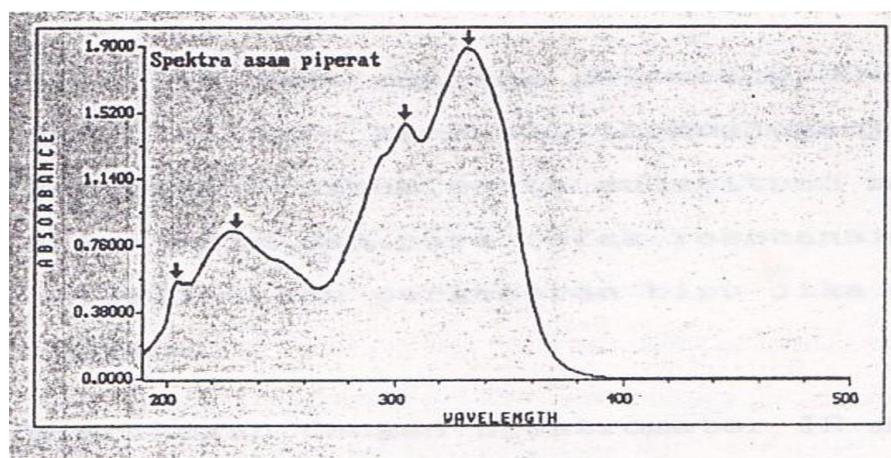
Menurut Bahri *et al.*, (2019), pada spektrum UV senyawa piperin, terlihat adanya puncak serapan pada panjang gelombang maksimum 208,0 nm, 254,0 nm, 308,0 nm, dan 342,0 nm. Puncak-puncak awal, yakni di 208,0 nm dan 254,0 nm, mencerminkan karakteristik serapan dari inti benzenoid. Sementara itu, puncak yang muncul di 308,0 nm dan 342,0 nm diasosiasikan dengan adanya sistem karbonil yang berkonjugasi dengan struktur diena yang terikat pada cincin

aromatik, serta pengaruh dari gugus metilenedioksi yang berada pada posisi meta dan para, yang memperkuat efek resonansi dalam molekul tersebut. Gambar spektrum UV senyawa piperin, dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Spektrum UV senyawa piperin (Bahri *et al.*, 2019)

Sedangkan untuk senyawa asam piperat, tampak pita-pita serapan dengan panjang gelombang maksimum masing-masing di 204,0 nm, 230,0 nm, 304,0 nm, dan 332,0 nm. Pola spektral ini secara umum mirip dengan hasil pengamatan dari studi sebelumnya. Pita serapan pada 204,0 nm dan 230,0 nm mengindikasikan keberadaan struktur benzenoid. Sebagai perbandingan, senyawa piperin diketahui menunjukkan pita serapan benzenoid pada panjang gelombang 206,0 nm dan 224,0 nm dalam spektrum ultravioletnya (Bahri *et al.*, 2019). Gambar spektrum UV untuk senyawa asam piperat, ditunjukkan pada Gambar 4.

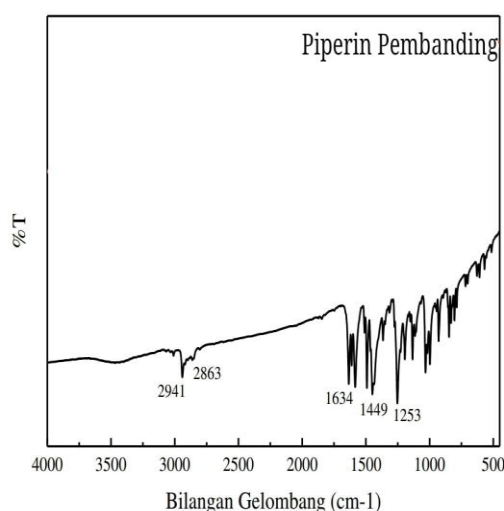


**Gambar 4.** Spektrum UV asam piperat (Bahri *et al.*, 2019)

### 2.5.2 Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR)

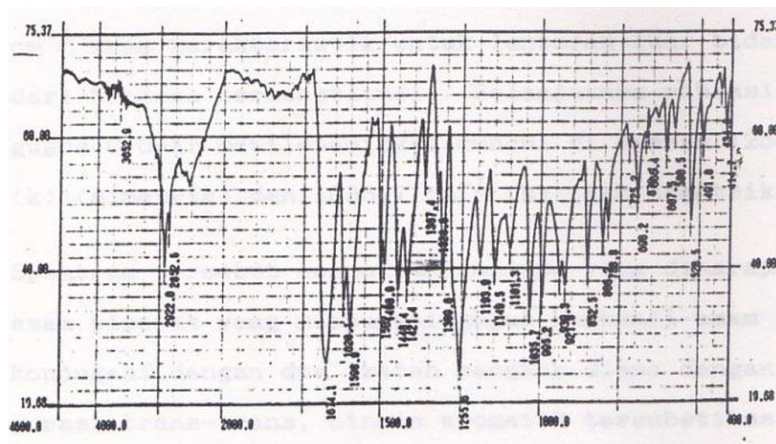
*Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FTIR) merupakan teknik analisis penting dalam karakterisasi senyawa organik melalui identifikasi gugus fungsi berdasarkan pola serapan frekuensi vibrasi ikatan kimia. Teknik ini bekerja dengan mengukur seberapa banyak energi inframerah diserap oleh sampel pada berbagai panjang gelombang, lalu diterjemahkan menggunakan transformasi Fourier menjadi spektrumnya (Mohammed *et al.*, 2016).

Piperin dan asam piperat yang telah didapatkan perlu untuk dikarakterisasi dengan FTIR agar didapat spektrum-spektrum yang dapat mengidentifikasi gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawanya. Menurut Octavia *et al.*, (2024), Pita karakteristik piperin menunjukkan pola transmitan yang khas yaitu gugus fungsi regangan C-H aromatik, diamati pada bilangan gelombang  $2941\text{ cm}^{-1}$ , regangan C-H alifatik pada grup *methylenedioxy* diamati pada bilangan gelombang  $2863\text{ cm}^{-1}$ . Regangan gugus fungsi C=O ditunjukkan pada bilangan gelombang  $1634\text{ cm}^{-1}$ . Gugus C=C aromatik ditunjukkan pada bilangan gelombang yang sama pada  $1449\text{ cm}^{-1}$  dan regangan gugus =C-O-C diamati pada bilangan gelombang  $1253\text{ cm}^{-1}$ . Gambar Spektrum FTIR piperin ditunjukkan pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Spektrum *Infrared* Senyawa Piperin (Octavia *et al.*, 2024)

Pada asam piperat terdapat perbedaan spektrum yang muncul ketika dikarakterisasi dengan FTIR mengingat perbedaan struktur senyawa dari keduanya. Menurut Bahri *et al.*, (2019), Hasil analisis spektrum inframerah (IR) dari senyawa menunjukkan beberapa puncak serapan khas yang mengindikasikan keberadaan gugus fungsional tertentu. Serapan lemah yang muncul di rentang  $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan kehadiran gugus  $\text{--OH}$  dari asam karboksilat. Intensitas yang rendah ini diduga akibat terbentuknya ikatan hidrogen antar molekul, membentuk struktur dimer. Keberadaan dimer asam karboksilat ini juga diperkuat dengan munculnya pita serapan yang cukup lebar pada area  $2700\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$ , berkaitan dengan regangan ikatan C-H alifatik. Sementara itu, pita serapan intens pada  $1674,1\text{ cm}^{-1}$  menandakan adanya gugus karbonil ( $\text{C=O}$ ) dari sistem asam terkonjugasi. Serapan C-H aromatik terekam pada bilangan gelombang sekitar  $2922,0\text{ cm}^{-1}$  dan  $3000\text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas sedang. Indikasi keberadaan struktur aromatik ini semakin kuat dengan terdeteksinya regangan C=C aromatik pada bilangan gelombang  $1598,9\text{ cm}^{-1}$ . Di samping itu, adanya pembengkokan luar (*out-of-plane bending*) dari gugus C-H pada cincin benzena tersubstitusi tampak pada rentang  $850\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ . Pada gugus metilen-dioksi yang terikat pada cincin aromatik (C-O-Ar) juga teridentifikasi. Regangan simetris dari gugus ini muncul pada  $1255,6\text{ cm}^{-1}$ , sedangkan regangan asimetrisnya terlihat pada  $1035,7\text{ cm}^{-1}$ , keduanya menunjukkan serapan kuat yang khas untuk struktur metilen-dioksi. Gambar spektrum *infrared* pada asam piperat ditunjukkan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Spektrum *Infrared* Senyawa Asam Piperat (Bahri *et al.*, 2019)

## 2.6 Bioassay Aktivitas Antibiofilm

### 2.6.1 Bakteri

Bakteri secara tradisional dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan Gram staining, yakni Gram-positif dan Gram-negatif. Metode ini dikembangkan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884 dan tetap menjadi acuan utama dalam identifikasi bakteri klinis dan riset mikrobiologi sehari-hari. Perbedaan utama keduanya terletak pada ketebalan lapisan peptidoglikan dinding sel: Gram-positif memiliki dinding sel yang sangat tebal (sekitar 20–80 nm), sehingga mampu mempertahankan pewarna kristal violet meski dicuci alkohol; akibatnya sel tersebut terlihat berwarna biru atau ungu saat diamati di bawah mikroskop. Sebaliknya, Gram-negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang jauh lebih tipis (~5–10 nm) serta dikelilingi oleh membran luar yang mengandung lipopolisakarida. Hal ini menyebabkan pewarna kristal violet mudah terelusi saat dibilas dan selnya menyerap pewarna kontras (safranin), sehingga tampak merah atau merah muda (MacCain & Tuomanen, 2020).

### 2.6.2 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif oportunistik yang sering ditemukan di lingkungan seperti tanah, air, dan permukaan medis. Bakteri ini dikenal memiliki kemampuan adaptasi tinggi, dapat bertahan di berbagai kondisi lingkungan karena genomnya yang besar (~5–7 Mbp) dan jaringan regulasi genetik yang kompleks untuk merespons berbagai stres lingkungan, termasuk sistem kekebalan manusia dan terapi antibiotik (Moradali *et al.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* sering menyebabkan infeksi nosokomial—terutama pada pasien dengan sistem imun lemah, seperti penderita *cystic fibrosis*, luka bakar, atau pasien ICU dan WHO menempatkannya dalam daftar prioritas tertinggi untuk pengembangan antibiotik baru (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Di dunia klinis, *P. aeruginosa* menjadi patogen oportunistik utama yang menyebabkan infeksi nosokomial seperti *pneumonia ventilator-associated*, infeksi

luka bakar, infeksi aliran darah, dan saluran kemih, terutama pada pasien imunokompromais (seperti *cystic fibrosis*) (Qin *et al.*, 2022). *World Health Organization* (WHO) menempatkan *P. aeruginosa* dalam kategori prioritas kritis untuk pengembangan terapi baru karena kemampuannya menghindari banyak kelas antibiotik yang biasa digunakan (Elfadadny *et al.*, 2024).

Menurut Toyofuku *et al.*, (2012) *Pseudomonas aeruginosa* terklasifikasikan sebagai :

Divisi	: Bacteria
Sub Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Bangsa	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Bakteri ini dikenal dengan kemampuannya kolonisasi luas di permukaan biotik maupun abiotik, termasuk sistem kelistrikan rumah sakit atau permukaan medis seperti ventilator, selang kateter, dan permukaan keras lain. *P. aeruginosa* juga menghasilkan berbagai faktor virulensi seperti pigmen fenazin (*pyocyanin*), siderofor seperti pyoverdine, dan eksoprotein seperti protease, elastase, dan exotoxin yang berperan dalam patogenesis dan kerusakan jaringan inang. Adaptasi bakterinya terhadap lingkungan berubah-ubah akibat kehadiran sistem sekresi tipe III dan VI, serta kemampuan membentuk biofilm yang membuatnya sulit diobati dalam setting klinis akut maupun kronis (Grace *et al.*, 2022).

## 2.7 Biofilm

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme yang melekat pada permukaan dan terbungkus dalam matriks eksopolisakarida (EPS) yang diproduksi sendiri. Pada *Pseudomonas aeruginosa*, EPS ini menyumbang sekitar 85–90% dari biomassa biofilm total, berfungsi sebagai *scaffold* struktural dan melindungi

mikroba dari gangguan lingkungan eksternal seperti antibiotik maupun respon imun. Komunitas biofilm sering disebut sebagai “kota mikroba” karena strukturnya yang kompleks dan terorganisir dengan sel–sel yang terhubung erat satu sama lain melalui matriks EPS (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Tahapan pembentukan biofilm *P. aeruginosa* dapat dibagi menjadi lima fase, diantaranya yaitu adhesi reversibel, adhesi irreversibel dan pembentukan mikrokoloni, maturasi struktur biofilm tiga dimensi, pembentukan struktur “jamur” (*macrocolonies*), dan dispersal atau pelepasan sel kembali ke bentuk planktonik untuk kolonisasi permukaan baru.

Thi *et al.*, (2020) mengungkapkan bahwa biofilm memiliki peran penting dalam mekanisme resistensi bakteri terhadap antibiotik dan sistem imun tubuh. Matriks EPS menciptakan penghalang fisik dan kimia yang mengurangi penetrasi antibiotik, menciptakan gradient nutrisi, serta memfasilitasi sel persistor yang tahan terhadap pengobatan. Selain itu, biofilm memungkinkan gen-gen resistensi dan materi genetik berpindah antar sel melalui vesikula membran atau nanotube, memperbesar kemungkinan penyebaran resistensi.

### **2.7.1 Proses Pembentukan Biofilm**

Pembentukan biofilm terdiri dari 5 tahap. Yin *et al.*, (2022) mengungkapkan Pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* tahap 1-3 dimulai dari *initial attachment* dimana bakteri, melalui flagela dan pili tipe IV, menempel secara reversibel pada permukaan. Interaksi awal ini dipengaruhi oleh kekuatan elektrostatis, hidrofobisitas, dan adhesi non-spesifik seperti pembentukan awal mikrokoloni. Saat sel-sel menetap lebih lama, peningkatan kadar *second messenger*-di-GMP (*cyclic di-guanosine monophosphate*) memicu transisi menjadi adhesi irreversibel, menghambat mobilitas flagela, dan memicu produksi matriks eksopolisakarida (EPS).

Pada tahap selanjutnya, Borisova *et al.*, (2025) dalam jurnalnya mengatakan akan terbentuk struktur tiga dimensi seperti *microcolonies* dan *macrocolonies* (berbentuk jamur/*mushroom-like*), yang diperkuat melalui *Cross-linking* EPS, e-DNA, dan protein matriks. Matriks *exopolysaccharides* seperti Pel, Psl, dan alginat memberikan kestabilan fisik dan *Viskoelastisitas*, serta membangun saluran internal untuk distribusi nutrisi dan sinyal interseluler. Pada fase ini, struktur biofilm menunjukkan regulasi genetik yang kompleks untuk mempertahankan komunitas sel.

Tahap akhir disebut *dispersal*, yaitu proses pelepasan sel bakteri dari biofilm untuk memulai siklus kolonisasi pada permukaan baru. Dispersal ini dapat dipicu oleh sinyal lingkungan seperti stres nutrisi atau oksidatif, serta penurunan kadar c-di-GMP (*cyclic di-guanosine monophosphate*) melalui aktivitas fosfodiesterase. Sel yang terlepas dapat berbentuk planktonik atau agregat sel, dan memiliki potensi virulensi yang berbeda serta rentan terhadap stres lingkungan (Rumbaugh & Sauer, 2020).

### **2.7.2 Peran Biofilm dalam Resistensi Bakteri**

Biofilm dari *Pseudomonas aeruginosa* secara signifikan meningkatkan toleransi terhadap terapi antibiotik melalui keberadaan sel persister subpopulasi sel yang tidak aktif secara metabolik dan resisten terhadap sebagian besar antibiotik. Studi menunjukkan bahwa daya tahan biofilm dalam kondisi stres obat tidak sepenuhnya disebabkan oleh mutasi genetik, melainkan fenomena fenotipik transien yang diinduksi oleh biofilm itu sendiri. Bahkan ketika antibiotik efektif membunuh sel planktonik, sel persister yang tetap hidup dapat memicu kembali pertumbuhan bakteri setelah terapi usai (Borisova *et al.*, 2025).

Selain itu, biofilm menciptakan hambatan penetrasi antibiotik melalui matriks EPS yang padat dan struktural, yang secara fisik menghambat infiltrasi obat hingga ke lapisan terdalam (Azeem *et al.*, 2025). Perbedaan aktivitas metabolik

antara lapisan luar dan dalam pada struktur biofilm menyebabkan terbentuknya zona dengan metabolisme rendah di bagian tengah komunitas. Di area ini, sebagian besar sel berada dalam kondisi dorman atau tumbuh sangat lambat. Kondisi tersebut membuat antibiotik yang menargetkan proses aktif sel, seperti sintesis protein atau pembentukan peptidoglikan, menjadi kurang efektif. Hal ini menjadi salah satu alasan mengapa nilai *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) cenderung jauh lebih tinggi dibandingkan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) pada sel planktonik. Selain itu, *Pseudomonas aeruginosa* diketahui mengaktifkan sejumlah mekanisme adaptif spesifik ketika berada dalam bentuk biofilm. Beberapa di antaranya meliputi aktivasi regulator transkripsi khusus biofilm seperti *brlR*, peningkatan ekspresi pompa efluks seperti *MexAB-OprM* dan *MexEF-OprN*, serta produksi enzim  $\beta$ -laktamase *AmpC*. Mekanisme ini secara keseluruhan berkontribusi terhadap peningkatan resistensi intrinsik bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik. Mekanisme ini umumnya terekspresi hanya dalam konteks biofilm dan tidak terdeteksi pada kultur planktonik, menjadikan terapi konvensional kurang efektif tanpa strategi tambahan untuk menembus atau mengganggu biofilm tersebut (Mulcahy *et al.*, 2014).

Selain itu, komunikasi seluler lewat *quorum sensing* (QS) berkontribusi aktif dalam regulasi formasi dan pertahanan biofilm: molekul signal QS mengatur ekspresi EPS, *efflux pump*, dan mempromosikan resistensi kolektif terhadap antibiotik. QS memainkan peran utama baik pada bakteri gram-negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa* maupun gram-positif seperti *Staphylococcus aureus*, dan QS ini membuat biofilm sulit ditembus dan sulit dibasmi (Grooters *et al.*, 2024). Dalam komunitas biofilm, pergantian gen resistensi juga sering terjadi melalui *horizontal gene transfer* (HGT), misalnya plasmid atau DNA bebas (eDNA) di dalam EPS, memungkinkan distribusi gen resistensi lebih luas dan cepat dibandingkan sel planktonik (Uruén *et al.*, 2021).

### 2.7.3 Antibiofilm

Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* merupakan tantangan besar dalam pengobatan karena struktur matriksnya yang kompleks, sehingga menginspirasi penelitian fang yang mendalam terhadap senyawa antibiofilm. Salah satunya berasal dari senyawa tanaman. Berbagai senyawa tanaman, seperti polifenol dan alkaloid, yang menunjukkan aktivitas antibiofilm kuat terhadap *P. aeruginosa* baik *in vitro* maupun *in vivo*. Senyawa seperti *curcumin*, *baicalein*, dan *mangiferin* mampu menghambat pembentukan biofilm serta menekan ekspresi gen *quorum sensing* lasR/rhlR. Mekanisme kerjanya tidak hanya menghambat adhesi, tetapi juga mematikan regulasi QS sehingga menurunkan produksi virulensi seperti *pyocyanin* dan elastase (Guzzo *et al.*, 2020). Studi eksperimental khusus terhadap senyawa *thymoquinone* yang diisolasi dari minyak *Nigella sativa* (*black seed*) menunjukkan efek antibiofilm dan antivirulen yang nyata pada isolat *P. aeruginosa* PAO1. *Thymoquinone* secara signifikan menghambat pembentukan biofilm, produksi *pyocyanin*, aktivitas protease, dan motilitas *swarming*. Lebih penting lagi, senyawa ini menurunkan ekspresi gen *quorum sensing* seperti lasI, lasR, rhlI, dan rhlR, yang berdampak pada virulensi bakterinya. Uji *in vivo* pada model tikus juga membuktikan bahwa perlakuan *thymoquinone* meningkatkan tingkat kelangsungan hidup tikus dari 20% menjadi 100% setelah infeksi aktif oleh *P. aeruginosa* (Al-Rabia *et al.*, 2024).

Agen antibiofilm merupakan senyawa atau bahan aktif yang mampu mencegah terbentuknya biofilm atau mengganggu struktur biofilm yang telah terbentuk. Berbeda dengan agen antibakteri konvensional yang hanya menargetkan sel planktonik, agen antibiofilm secara khusus ditujukan untuk melemahkan atau menghancurkan matriks ekstraseluler yang melindungi komunitas mikroba dalam biofilm. Meski sebagian pendekatan antibiofilm menitikberatkan pada penghambatan QS dan virulensi, metode enzimatis juga menawarkan solusi yang menjanjikan. *Alginate lyase*, enzim yang dapat memecah *alginate*, komponen utama EPS *mucoid* biofilm *P. aeruginosa*, telah diuji baik dalam diskus maupun integrasi pada membran luka berbasis *bacterial cellulose*. Penelitian menunjukkan

bahwa immobilisasi *alginate lyase* pada membran ini mampu menurunkan polimer EPS hingga signifikan dan bekerja sinergis dengan gentamisin untuk membunuh hingga 86,5% sel biofilm PAO-1. Pendekatan enzimatik ini membuktikan bahwa selain memecah matriks, enzim antibiofilm dapat meningkatkan efektivitas antibiotik sekaligus mempercepat penyembuhan luka terkontaminasi. Namun, efektivitasnya terhadap resistensi antibiotik tidak selalu konsisten jika lingkungan ionik kompleks seperti dalam kondisi *cystic fibrosis* tidak dikendalikan (Chareza *et al.*, 2023). Mengingat adanya potensi yang besar dari senyawa-senyawa bahan alam sebagai antibiofilm terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkaji potensi-potensi senyawa bahan alam yang dapat menghancurkan atau meleburkan struktur biofilm.

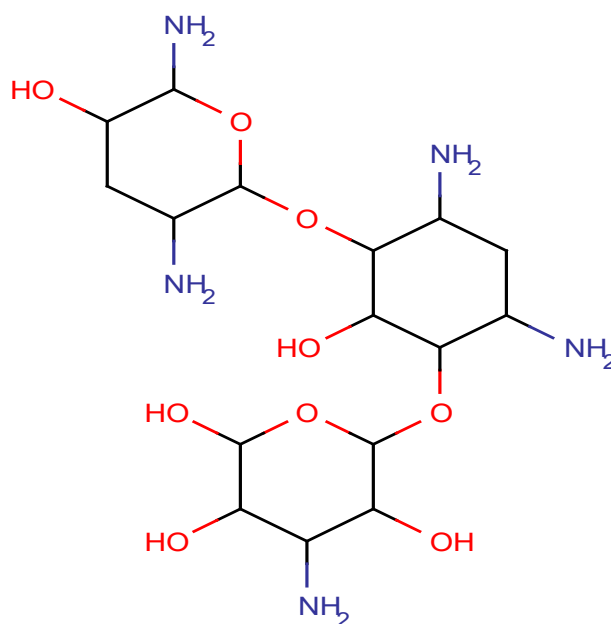
## **2.8 Kontrol Positif Uji Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa***

### **2.8.1 Tobramycin**

*Tobramycin* telah digunakan sebagai kontrol positif dalam studi antibiofilm terhadap komponen alginat karena kemampuannya berinteraksi dengan eksopolisakarida utama yang diproduksi oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Sebuah kajian yang dipublikasikan di *MDPI* melaporkan bahwa *tobramycin*, meskipun tidak sepenuhnya membunuh bakteri dalam biofilm, mampu memperlambat difusi antibiotik melalui lapisan alginat. Dalam kondisi tersebut, permeabilitas obat di dalam matriks biofilm berubah signifikan, ini menjadi tolok ukur bahwa *tobramycin* secara efektif memengaruhi struktur dan stabilitas biofilm berbasis alginat (Coquet *et al.*, 1998).

Penggunaan *tobramycin* sebagai kontrol positif pada aktivitas antibiofilm terutama berkaitan dengan kemampuannya berikatan dengan alginat, komponen utama matriks polisakarida pada biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Sebuah studi *in vitro* menunjukkan bahwa *tobramycin* berinteraksi dengan natrium alginat dan eksopolisakarida yang dihasilkan oleh strain *mucoïd P. aeruginosa*, dan hal ini

memengaruhi difusi antibiotik terutama memperlambat pergerakannya di dalam biofilm tanpa secara signifikan meningkatkan waktu penetrasi ke dalam koloni mikro (dari ~12 detik menjadi ~35 detik pada kadar 1%). Dari temuan ini, *tobramycin* sering dijadikan kontrol positif untuk eksperimen inhibisi alginat karena kemampuannya untuk berinteraksi langsung dengan eksopolisakarida dan memengaruhi penetrasi obat (Nichols *et al.*, 1988). Struktur senyawa *tobramycin* terdapat pada Gambar 7.

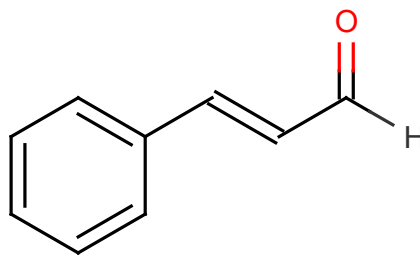


**Gambar 7.** Struktur senyawa *tobramycin*

### 2.8.2 Cinnamaldehyde (Cinnamaldehyde)

*Cinnamaldehyde*, senyawa utama dari minyak kayu manis, berperan sebagai kontrol positif yang kuat terhadap sistem *Quorum Sensing* (khususnya LasR dan RhIR) pada *Pseudomonas aeruginosa*. *Cinnamaldehyde* secara efektif menurunkan ekspresi gen QS seperti *lasI*, *lasR*, *rhlA*, dan *pqsA*, serta mengurangi produksi faktor virulensi seperti protease, elastase, dan pyocyanin. Interaksi *in silico* menunjukkan bahwa *cinnamaldehyde* dapat berikatan dengan situs aktif reseptor LasR dengan afinitas kompetitif, sehingga menghambat QS dan pembentukan biofilm (Topa *et al.*, 2020). Karena itu, *cinnamaldehyde* sering digunakan sebagai kontrol positif dalam *docking* atau studi antibiofilm berbasis

QS untuk memvalidasi potensi senyawa uji dalam menekan jalur LasR. Struktur senyawa *cinnamaldehyde* terdapat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Struktur senyawa *cinnamaldehyde*

## 2.9 Molecular Docking

*Molecular docking* adalah metode komputasi berbasis struktur yang memungkinkan prediksi interaksi antara molekul kecil (ligan) dan target biologis seperti protein, asam nukleat, atau kompleks reseptor. Metode ini menargetkan pencarian orientasi ligan paling stabil secara energetik di dalam situs aktif target, serta memperkirakan afinitas ikatannya (*binding affinity*) atau ukuran seberapa kuat suatu ligan berinteraksi dengan tergetnya. *Docking* sering digunakan untuk memfasilitasi desain obat berbasis struktur (*Structure-Based Drug Design/SBDD*), sehingga memungkinkan *de-novo identification* atau optimalisasi senyawa bioaktif tanpa pengujian eksperimental awal (Pinzi & Rastelli, 2019).

Tahapan dasar *docking* meliputi persiapan 3D struktur protein (reseptor), persiapan ligan dalam format yang sesuai (misalnya pdbqt atau mol2), penentuan *grid region* untuk pengikatan, serta penggunaan algoritma sampling dan fungsi skor untuk memilih pose terbaik. *Algoritma sampling* seperti *Genetic Algorithm*, *Monte Carlo*, atau *Hill-Climbing* digunakan untuk eksplorasi ribuan pose ligan. Fungsi skor kemudian mengevaluasi interaksi energetik berdasarkan parameter seperti *van der Waals*, ikatan hidrogen, ikatan elektrostatik, dan kontribusi solvasi (*desolvation*) (Tripathi & Misra, 2017). Meskipun *docking* awalnya menggunakan model *lock-and-key rigid* untuk protein dan ligan, evolusi metode kini

mencakup pendekatan fleksibel dan semi-fleksibel seperti *induced-fit docking*. Pendekatan ini memperkenankan adaptasi konformasi sisi rantai protein atau ligand, sehingga prediksi orientasi lebih akurat dalam konteks perubahan dinamis protein nyata (Pagadala *et al.*, 2017).

Dalam kurun 2015–2021, integrasi *machine learning* dan *scoring functions* berbasis data eksperimental mulai berkembang. Algoritma *machine learning* dilatih dengan dataset besar kompleks ligand–protein untuk meningkatkan akurasi ranking pose yang tepat. Selain itu, *ensemble docking*, QM/MM *hybrid scoring*, dan integrasi dengan dinamika molekuler (*Molecular Dynamics*) juga mulai diadopsi untuk memperbaiki kualitas hasil prediksi *docking* (Deshmukh *et al.*, 2025). Secara umum, *molecular docking* menyediakan solusi efisien untuk virtual screening dalam riset obat modern. Ia memungkinkan penyaringan ribuan senyawa secara cepat untuk menentukan kandidat potensial sebelum pengujian eksperimental. Meski terbatas oleh asumsi rigiditas residu target, keterbatasan skor, dan sensitivitas terhadap kualitas struktur input, *docking* tetap menjadi teknologi utama awal dalam identifikasi interaksi ligan–protein. Jika hasil *docking* digabungkan dengan validasi eksperimental atau pendekatan dinamik molekuler, prediksinya bisa mendekati realitas biologis yang kompleks (Chen *et al.*, 2020).

### **2.9.1 Aplikasi *Molecular Docking* dalam Studi Senyawa Bahan Alam**

Aplikasi *molecular docking* dalam studi senyawa alam terhadap *Pseudomonas aeruginosa* semakin populer karena kemampuannya untuk memprediksi interaksi antara senyawa bioaktif dan target virulensi dengan cepat. Misalnya, studi MDPI tahun 2015 menggunakan analisis metabolomik daun burdock untuk mengidentifikasi senyawa antibiofilm potensial yang selanjutnya dievaluasi menggunakan docking terhadap enzim FabZ dari *P. aeruginosa*. Hasil *docking* menunjukkan interaksi yang stabil antara senyawa alami dan situs aktif FabZ, memberikan indikasi kuat bahwa pendekatan komputasi ini dapat mendukung seleksi awal kandidat antibakteri berbasis alam (Lou *et al.*, 2015). Penelitian lain

memanfaatkan ekstrak tanaman yang mengandung flavonoid atau *chalcone* misalnya *falcarindiol* dari *Notopterygium incisum* yang diuji secara *in silico* terhadap regulator *quorum sensing* LasR. *Docking* menunjukkan bahwa *falcarindiol* membentuk ikatan hidrogen dengan residu penting seperti Tyr47, Thr75, dan Ser129, dengan energi ikatan mencapai  $-7,5$  kcal/mol, hampir mendekati ligand alami LasR. Hasil ini mendukung potensi *falcarindiol* sebagai antagonis QS dan penekan ekspresi virulensi *P. aeruginosa* (Zhao *et al.*, 2021).

Studi lain memanfaatkan senyawa eugenol dari minyak cengkeh melalui kombinasi *docking* dan uji *in vitro*. *Docking* memperlihatkan interaksi kuat antara eugenol dan reseptor LasR terutama melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik dengan Arg61 dan Tyr41. Pengujian selanjutnya mengonfirmasi penurunan ekspresi gen *lasA*, *lasB*, dan produksi virulensi lain seperti *pyocyanin* dan elastase, membuktikan efek antibiofilm yang menjanjikan dari senyawa alami ini (Shariati *et al.*, 2024).

### **2.9.2 Molecular Docking sebagai Pendekatan Studi Antibiofilm**

*Molecular docking* menjadi pendekatan komputasi yang efektif dalam mengevaluasi potensi senyawa antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, tanpa memerlukan uji laboratorium awal. Salah satu studi oleh Sadiq *et al.*, (2020) melakukan *virtual screening* lebih dari 2.300 senyawa obat FDA-approved terhadap domain pengikatan ligan LasR. *Docking* dilakukan dengan AutoDock Vina, rDock, dan LeDock untuk menghasilkan prediksi konsensus interaksi yang tinggi. Beberapa senyawa terpilih menampilkan *binding energy* kompetitif dan dominan terhadap situs aktif LasR, mengindikasikan potensi sebagai inhibitor sistem *quorum sensing*. Studi ini sepenuhnya berbasis *in silico* dan menyediakan dasar kuat untuk pengembangan agen antibiofilm tanpa intervensi eksperimental di tahap awal (Vetrivel *et al.*, 2021).

Penelitian lain oleh Abelyan *et al.*, (2020) menyusun *database* senyawa turunan *flavone* dan benzamida untuk screening terhadap regulator QS LasR menggunakan *docking virtual*. Hasil menunjukkan senyawa-senyawa tertentu berikatan dengan residu penting pada ligan LasR yang sama seperti *autoinducer* asli. Analisis konformasi memperlihatkan potensi interaksi kompetitif yang dapat menghambat respon *quorum sensing*. Studi ini bersifat *in silico* sepenuhnya dan diakui sebagai referensi awal dalam pengembangan senyawa berbasis struktur flavonoid sebagai antibiofilm.

Lebih lanjut, Shahab *et al.*, (2023) melaporkan identifikasi senyawa antagonis PqsA (enzim kunci dalam sintesis *autoinducer* PQS) melalui pendekatan *pharmacophore-based virtual screening* dan *molecular docking*. Senyawa terpilih menunjukkan *binding affinity* tinggi terhadap situs aktif PqsA, setelah itu dilakukan simulasi dinamika molekuler untuk mengevaluasi stabilitas interaksi kompleks ligan–protein. Hasil *in silico* menunjukkan bahwa interaksi tetap stabil selama durasi simulasi MD (*Molecular Dynamics*) dan nilai MM-PBSA (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann SuRFace Area*) mendukung prediksi energi ikatan yang kuat. Semua analisis ini murni komputasional tanpa uji laboratorium awal.

## **2.10 Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas Secara *In Silico***

### **2.10.1 Farmakokinetik dan Toksisitas**

Farmakokinetik (PK) adalah cabang ilmu farmakologi yang mempelajari bagaimana tubuh mempengaruhi senyawa setelah administrasi, mencakup proses *absorption, distribution, metabolism, dan excretion* (ADME) . Pada tahap awal pengembangan obat, pemahaman terhadap mekanisme PK esensial untuk memastikan senyawa memiliki profil penyerapan dan distribusi yang optimal, serta dapat dimetabolisme dan dieliminasi secara efisien tanpa menimbulkan akumulasi toksik. Pendekatan farmakokinetik kini kian dikembangkan dari

sekadar deskriptif menjadi lebih kuantitatif dan mekanistik, guna memahami nasib kandidat obat dalam sistem biologis secara mendalam. Studi ini menekankan peran fundamental PK dalam mengurangi kegagalan klinis dan meminimalkan interaksi obat serta meningkatkan keberhasilan terapi (Lai *et al.*, 2022).

Sementara itu, toksisitas merujuk pada potensi suatu senyawa menimbulkan efek membahayakan secara biologis. Evaluasi toksisitas meliputi kajian mutagenisitas, hepatotoksitas, karsinogenisitas, hingga toksisitas akut (misalnya nilai LD<sub>50</sub>). Penelitian modern banyak menggunakan komputasi toksikologi (*computational toxicology*) untuk melakukan prediksi toksisitas secara *in silico*, yang terbukti lebih cepat, efisien, dan etis dibandingkan uji biologis konvensional. Penggunaan pendekatan ini penting terutama pada tahap skrining awal agar kandidat obat yang berisiko toksik maupun cenderung gagal di fase klinik dapat diidentifikasi dan disaring lebih awal (Zhang *et al.*, 2018).

### **2.10.2 Prediksi Farmakokinetik dengan SwissADME**

SwissADME adalah alat daring yang dikembangkan oleh *Swiss Institute of Bioinformatics* untuk memprediksi parameter farmakokinetik dan *drug-likeness* senyawa kecil secara *in silico*. Platform ini mampu menghitung nilai-nilai penting seperti *molar refractivity*, LogP, TPSA, *bioavailability score*, serta memverifikasi kepatuhan terhadap *Lipinski's Rule of Five*, model *BOILED-Egg* untuk penyerapan usus dan permeabilitas sawar darah-otak, serta prediksi interaksi dengan enzim CYP450. Studi menyebut SwissADME sebagai metode cepat dan efisien dalam menilai kelayakan awal senyawa sebagai kandidat obat, bahkan tanpa memerlukan akses ke sampel fisik secara langsung (Daina *et al.*, 2017).

Prediksi karakteristik ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) memiliki peran penting dalam mengevaluasi kelayakan suatu molekul sebagai kandidat obat. Penilaian ini memberikan gambaran menyeluruh terhadap aspek farmakokinetik dan farmakodinamik, termasuk kemampuan senyawa untuk

diserap secara oral, menembus membran sel, dimetabolisme dalam tubuh, hingga dieliminasi serta potensi efek toksiknya (Kalita *et al.*, 2019). Analisis ADMET juga mencakup berbagai parameter penting seperti absorpsi pada saluran cerna (*Human Intestinal Absorption/HIA*), bioavailabilitas oral pada manusia (*Human Oral Bioavailability/HOB*), kemampuan distribusi senyawa melewati sawar darah otak (*Blood Brain Barrier/BBB*), ikatan terhadap protein plasma (*Plasma Protein Binding/PPB*), serta interaksinya sebagai substrat atau inhibitor dari P-glikoprotein (P-gp). Di samping itu, evaluasi terhadap potensi karsinogenik serta toksisitas akut secara oral turut menjadi bagian dari penilaian ini (Nusantoro & Fadlan, 2020).

### 2.10.3 Prediksi Toksisitas dengan ProTox-II

ProTox-II merupakan *platform* berbasis *web* yang dirancang untuk memprediksi berbagai parameter toksisitas senyawa kimia dengan pendekatan kecerdasan buatan, khususnya *machine learning*. Server ini menyediakan prediksi untuk toksisitas akut (dinyatakan dalam LD<sub>50</sub>), serta parameter toksikologi lainnya seperti karsinogenisitas, mutagenisitas, hepatotoksitas, imunotoksitas, dan sitotoksitas. Keunggulan dari ProTox-II terletak pada kemampuannya mengklasifikasikan toksisitas ke dalam beberapa kategori, termasuk toksisitas organ (misalnya hati), titik akhir toksikologi (seperti efek mutagenik dan sitotoksik), jalur toksikologi (*Adverse Outcome Pathways/AOP*), serta target-target molekuler yang terlibat dalam respon toksik. Prediksi pada platform ini didasarkan pada integrasi berbagai pendekatan, seperti analisis farmakofor, kecenderungan fragmen molekul, serta fitur-fitur kimiawi umum, yang seluruhnya dikombinasikan dalam model prediktif berbasis pembelajaran mesin. Model-model tersebut dikembangkan dan divalidasi menggunakan data eksperimental, baik dari uji *in vitro* maupun *in vivo*, serta diuji ulang menggunakan dataset eksternal untuk meningkatkan akurasi. Hasil analisis ditampilkan dalam format *Visual* seperti diagram radar toksisitas, klasifikasi tingkat toksisitas, dan estimasi nilai LD<sub>50</sub> disertai dengan skor kepercayaan. Karena kemampuannya

dalam menyaring senyawa toksik secara cepat dan efisien, ProTox-II banyak dimanfaatkan dalam penelitian bioinformatika, pengembangan obat, serta proses regulasi keamanan senyawa kimia. (Banerjee *et al.*, 2018).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari-Juni 2025, di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat laboratorium berbahan dasar kaca seperti pipet tetes, botol *vial* berbagai ukuran, seperangkat alat soklet, seperangkat alat refluks, *rotary evaporator*, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, seperangkat alat destilasi, *beaker glass* berbagai ukuran, neraca analitik merk optika, labu bundar, labu erlenmeyer berbagai ukuran *melting point apparatus* merk kruss, corong pisah, corong Buchner, gelas ukur berbagai ukuran dan spektrofotometer UV-*Vis* merk Shimadzu Uv-1780. Untuk bagian *molecular docking*, digunakan perangkat lunak (*software*) dan perangkat keras (*hardware*) yang mendukung analisis molekuler secara *in silico* seperti laptop dengan spesifikasi prosesor intel64 *family 6 model 78*, RAM (*Random Access Memory*) 8 GB, sistem operasi Windows 10, *AutoDock Tools* 1.5.6, *AutoDock Vina*, *VinaSplit*, Pymol, dan *Discovery Studio Visualizer*.

### 3.2.2 Bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol yang telah didestilasi, asamklorida, kalium hidroksida, aseton, etil asetat, n-heksana dan aquades. Struktur 3d ligan dari piperin dan asam piperat yang diperoleh dari *database PubChem*, struktur 3 dimensi protein target dari LasR dan alginat dari *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) dan struktur 3 dimensi dari kontrol positif yang digunakan yaitu *tobramycin* dan *cinnamaldehyde* dari *database PubChem*.

## 3.3 Prosedur Penelitian

### 3.3.1 Persiapan dan Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah lada hitam varietas Natar II, yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) Natar. Sebelum digunakan, buah lada hitam terlebih dahulu dikeringkan dan dihaluskan dengan menggunakan *blender*.

### 3.3.2 Isolasi Piperin

Bubuk halus buah lada hitam yang telah disiapkan dibungkus dengan kertas saring, dibentuk silinder yang besarnya disesuaikan dengan ukuran soklet yang digunakan. Selanjutnya sampel diekstraksi dengan destilat etanol sampai larutan etanol dalam soklet menjadi bening. Proses ini dilakukan selama  $\pm$  9-14 jam. Larutan hasil ekstraksi dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* kemudian didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin ditambahkan larutan KOH etanolat 10% sebanyak 3/5 dari volume ekstrak, penambahan dilakukan sambil diaduk. Larutan didiamkan lebih kurang selama 3,5 jam hingga pengendapan sempurna. Setelah seluruhnya mengendap, kemudian disaring

dengan cara biasa dan filtratnya dibiarkan selama semalam hingga diperoleh kristal berbentuk jarum berwarna kuning mengkilat. Kristal disaring dengan corong Buchner dan dicuci dengan sedikit etanol teknis kemudian direkristalisasi dengan etanol sampai murni, sehingga diperoleh kristal piperin murni.

### 3.3.3 Hidrolisis Piperin

Piperin sebanyak 2,5 gram direfluks selama 12 jam dengan menggunakan KOH etanolat 20% sebanyak 100 mL. Hasil refluks ditambah HCl 15 mL dan akan terbentuk dua fase yaitu fase padat (endapan yang terletak di bawah) serta fase cair (supernatan yang terletak di bagian atas). Setelah itu, dipisahkan menggunakan corong pisah. Kemudian, dipekatkan supernatan dengan *rotary evaporator* hingga kering dan menempel di sekeliling dinding labu. Lalu, ditimbang labu beserta supernatan yang telah kering hingga didapatkan berat total tertentu.

Setelah didapatkan berat labu beserta supernatan yang telah kering dalam labu, dilakukan pelarutan supernatan agar dapat ditampung dalam botol *vial*.

Digunakan pelarut metanol : air dengan perbandingan 8 : 2 untuk melarutkan supernatan (*crude*) secukupnya. Setelah itu, dipanaskan campuran *crude* asam piperat dan metanol-air untuk direkristalisasi (Choochana *et al.*, 2015). Setelah dipanaskan dan larut, didinginkan perlahan hingga asam piperat terbentuk kembali. Setelah didapatkan hasil yang sesuai, dilakukan analisis kemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil yang diharapkan berupa noda tunggal (*single spot*) yang muncul pada plat silika yang menandakan bahwa sampel piperin dan asam piperat yang terbentuk sudah murni tanpa adanya pengotor.

### 3.3.4 Karakterisasi Senyawa

Ketika sampel telah menunjukkan *single spot* pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), maka selanjutnya dapat dilakukan karakterisasi senyawa dengan instrumen Spektrofotometer UV-*Vis* yang dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Lampung dan *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FTIR) di UPT-LTSIT Universitas Lampung.

### 3.3.5 Pengambilan dan Persiapan Struktur Protein

Struktur kristal protein target yang digunakan dalam penelitian ini adalah LasR dan alginat biosintesis protein dari *Pseudomonas aeruginosa*, yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB). Protein disiapkan dengan menghilangkan molekul air dan ligan bawaan yang tidak diperlukan dalam proses *docking*. Setelah itu, ditambahkan hidrogen polar, dilakukan pemeriksaan ulang terhadap atom yang hilang, memperbaiki atom yang hilang dari struktur protein, menambahkan *Kollman charges* dan muatan Gasteiger, lalu meratakan muatan tersebut ke seluruh atom dari protein yang akan dilakukan *docking* menggunakan *AutoDock Tools*, kemudian disimpan dalam format .PDBQT.

### 3.3.6 Pengambilan dan Persiapan Struktur *Native Ligand*

*Native ligand* adalah molekul ligan yang secara alami atau eksperimental terikat dengan protein target dalam struktur kristalnya (biasanya diperoleh melalui kristalografi X-ray). *Native ligand* ini kemudian digunakan sebagai acuan dalam proses *redocking*, yaitu *docking* kembali ligan bawaan ke struktur protein originalnya untuk mengukur akurasi metode *docking* berdasarkan seberapa dekat hasil prediksi pose ligan dengan posisi kristal asli. Dengan kata lain, *native ligand* adalah “ligan referensi” yang posisinya sudah diketahui secara eksperimental,

menjadi tolok ukur validasi metode *docking* agar model bisa dipercaya (McNutt *et al.*, 2021).

*Native ligand* dipreparasi dan dipisahkan dari proteinnya untuk memvalidasi hasil *docking*. Preparasi dilakukan dengan memuat struktur protein yang sudah mengandung *native ligand* yang kemudian dipisahkan dengan memilih ligan pada menu *selection* di *Autodock Tools* lalu menyimpannya dalam format .PDBQT.

### **3.3.7 Pengambilan dan Persiapan Struktur Ligan (Uji, *Native Ligand* dan Kontrol Positif)**

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur tiga dimensi dari senyawa piperin dan asam piperat sebagai ligan uji. Untuk kontrol positif alginat digunakan *Tobramycin* (Nichols *et al.*, 1988), dan untuk LasR digunakan senyawa *cinnamaldehyde* (Topa *et al.*, 2020). Struktur 3 dimensi senyawa diunduh melalui basis data *PubChem* dalam format \*.sdf. File tersebut kemudian dikonversi ke format \*.pdb menggunakan perangkat lunak Pymol. Selanjutnya ligan yang telah dikonversi, dimuat dalam aplikasi *Autodock Tools* (ADT), diatur jumlah torsi dan disimpan dalam format \*.pdbqt agar kompatibel untuk proses *molecular docking*.

### **3.3.8 Penentuan Parameter *Grid Box***

Penentuan grid dilakukan dengan mengatur lokasi pusat grid berdasarkan lokasi situs aktif dari protein target, baik dengan mengacu pada posisi ligan bawaan (*native ligand*). Buka aplikasi *autodock tools* terlebih dahulu, lalu muat protein yang sudah dipreparasi, kemudian muat ligan bawaan untuk melihat posisi situs aktif dari protein. Kemudian, diatur *grid box* agar mencakup seluruh situs aktif serta area sekitarnya guna mengakomodasi fleksibilitas ligan saat proses *docking*. *File* konfigurasi yang memuat parameter grid kemudian disiapkan dan disimpan sebagai input untuk *AutoDock Vina*. Isi dari *file* konfigurasi adalah nama *file*

protein, ligan, ukuran *spacing* dalam satuan angstrom, *num mode* (jumlah model *docking* yang diinginkan), *exhaustiveness* (tingkat ke dalaman pencarian atau seberapa teliti program *docking* menjelajahi beberapa kemungkinan posisi saat berinteraksi dengan protein target), ukuran *grid box*, posisi *center grid box* dan nama *file* keluaran hasil *docking* dalam format \*.pdbqt sesuai keinginan.

### 3.3.9 Validasi Metode *Docking*

Validasi *metode docking* dilakukan dengan melakukan *docking* kembali (*redocking*) *native ligand* protein target yang sudah dihilangkan *native ligand*-nya. Parameter validasi metode yaitu RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Bila hasil penambatan ligan standar memiliki nilai RMSD < 2 angstrom, maka protokol penambatan dapat diterima atau dinyatakan valid (Ischak *et al.*, 2023).

*Redocking* dilakukan dengan bantuan *Autodock Vina* dan *Command prompt*. *File* konfigurasi yang sudah disiapkan sebelumnya digunakan agar memudahkan proses *redocking*. Buka *command prompt* dalam sistem komputer, lalu *copy-paste* letak *file* kerja yang digunakan untuk menyimpan data-data *docking*. Dijalankan perintah pada *command prompt* yang berfungsi untuk menjalankan *docking* berdasarkan parameter dalam *file* konfigurasi dan menyimpan hasilnya ke dalam *file* keluaran berekstensi .txt. Semua hasil *docking* dari *Autodock vina* tergabung menjadi satu dalam satu *file*, sehingga perlu dipisahkan dengan bantuan program *vina split*. Setelah *file* keluaran dan hasil *docking* berekstensi. PDBQT sudah tersimpan otomatis dalam *file* kerja, langkah selanjutnya adalah mengetahui nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) di aplikasi Pymol.

Untuk tahapan *docking* ligan uji serta kontrol positif, memiliki langkah-langkah yang sama persis dengan *redocking ligand natives*, tetapi tidak dilakukan penghitungan nilai RMSD. RMSD tidak digunakan pada ligan uji karena molekul tersebut belum memiliki data eksperimen terkait ikatannya dengan protein target. Dengan tidak tersedianya struktur referensi atau pose asli, maka tidak ada acuan

yang bisa digunakan untuk mengukur deviasi posisinya. Oleh karena itu, perhitungan RMSD pada ligan uji menjadi kurang tepat dan tidak dapat memberikan informasi yang valid mengenai akurasi posisi ikatan (Ischak *et al.*, 2023).

### **3.3.10 Visualisasi dan Analisis Interaksi**

Hasil *docking* dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan Pymol dan *Discovery Studio Visualizer* untuk memvisualisasikan posisi ligan dalam situs aktif protein serta interaksi yang terjadi. Interaksi yang diamati meliputi ikatan hidrogen, hidrofobik, elektrostatik, dan interaksi lainnya yang relevan terhadap penghambatan biofilm. Analisis ini digunakan untuk mengevaluasi potensi antibiofilm dari senyawa uji berdasarkan nilai afinitas dan jenis ikatan yang terbentuk pada kompleks ligan–reseptor.

### **3.3.11 Prediksi Sifat Faramakokinetik dan Toksisitas *In Silico***

#### **3.3.11.1 Prediksi ADMET dan *Drug-Likeness* dengan SwissADME**

Untuk mendukung evaluasi kelayakan senyawa uji sebagai kandidat agen antibiofilm, dilakukan analisis prediksi farmakokinetik dan toksikologi menggunakan pendekatan *in silico*. Analisis ini melibatkan parameter ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity*) untuk mengetahui sejauh mana senyawa memiliki potensi sebagai obat dari segi penyerapan, distribusi, metabolisme, ekskresi, serta tingkat toksisitasnya.

Prediksi ADMET dilakukan menggunakan *platform* daring SwissADME, yang memungkinkan evaluasi terhadap parameter penting seperti *gastrointestinal absorption, blood-brain barrier permeability*, dan *bioavailability score*. *Platform*

ini juga menyediakan informasi prediktif mengenai sifat fisikokimia dan kelarutan senyawa dalam lingkungan biologis.

### **3.3.11.2 Prediksi Toksisitas Senyawa dengan ProTox-II**

Selain evaluasi farmakokinetik, dilakukan pula analisis prediksi toksisitas senyawa menggunakan *platform in silico* ProTox-II. Analisis ini bertujuan untuk memperkirakan potensi sitotoksik dari senyawa uji berdasarkan struktur kimianya. ProTox-II memanfaatkan model pembelajaran mesin (*machine learning*) untuk memprediksi nilai LD<sub>50</sub> (dosis letal 50%), kelas toksisitas, serta potensi efek samping seperti hepatotoksisitas, karsinogenisitas, mutagenisitas, dan lainnya. Hasil prediksi ini berguna sebagai penilaian awal keamanan senyawa sebelum dilakukan uji toksisitas lebih lanjut secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pendekatan ini dinilai efisien dan hemat biaya, khususnya dalam tahap skrining awal pengembangan kandidat obat dari senyawa alam.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian identifikasi dan karakterisasi senyawa piperin dan asam piperat dari buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) serta potensinya sebagai agen antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* melalui pendekatan *in silico* diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa piperin berhasil diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan titik leleh sebesar 130,5°C. Nilai titik leleh tersebut sesuai dengan rentang titik leleh piperin yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya.
2. Senyawa asam piperat berhasil diperoleh melalui proses hidrolisis dari senyawa piperin dengan titik leleh sebesar 217,3°C. Nilai ini berada dalam rentang titik leleh asam piperat yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya.
3. Hasil karakterisasi senyawa piperin dan asam piperat menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) menunjukkan pola spektra yang sesuai dengan karakteristik spektra piperin dan asam piperat yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya, sehingga mengonfirmasi keberhasilan identifikasi kedua senyawa tersebut.
4. Hasil *re-docking* menunjukkan nilai RMSD kurang dari 2 Å, sehingga metode *molecular docking* yang digunakan dinyatakan valid.
5. Hasil penambatan ligan piperin dan asam piperat terhadap reseptor 1MV8 menunjukkan nilai afinitas ikatan masing-masing sebesar -6,549 kkal/mol dan -6,522 kkal/mol. Nilai tersebut menunjukkan afinitas ikatan yang sebanding dengan kontrol positif *tobramycin*.

6. Hasil penambatan ligan piperin dan asam piperat terhadap reseptor 4NG2 menghasilkan nilai afinitas ikatan masing-masing sebesar  $-8,874$  kkal/mol dan  $-8,010$  kkal/mol, yang menunjukkan afinitas ikatan lebih kuat dibandingkan kontrol positif *cinnamaldehyde*, sehingga sangat berpotensi sebagai antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa*.
7. Piperin dan asam piperat menunjukkan profil farmakokinetik yang baik, ditandai dengan absorpsi gastrointestinal yang tinggi dan kemampuan menembus *Blood-Brain Barrier*, yang didukung oleh nilai TPSA rendah hingga sedang serta lipofilisitas yang moderat, sehingga berpotensi sebagai senyawa aktif dalam aplikasi terapeutik.
8. Piperin dan asam piperat menunjukkan tingkat toksisitas rendah hingga sedang berdasarkan prediksi LD50 dan klasifikasi toksisitas, meskipun terdapat potensi efek toksik pada sistem saraf, pernapasan, dan sistem imun yang perlu diperhatikan dalam pengembangan lebih lanjut.

## 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, piperin dan asam piperat yang diperoleh dari lada hitam (*Piper nigrum* L.) memiliki potensi yang cukup tinggi sebagai agen antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan profil yang cukup baik setelah dianalisis berdasarkan sifat-sifat farmakokinetik serta tingkat toksisitasnya. Penelitian dapat dilanjutkan ke arah pembuatan obat yang efektif untuk menghancurkan lapisan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* yang aman dikonsumsi oleh tubuh manusia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abelyan, N., Grabski, H., & Tiratsuyan, S. (2020). *In silico* Screening of Flavones and its Derivatives as Potential Inhibitors of Quorum-Sensing Regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology*, 54(1), 134–143.
- Al-Rabia, M. W., Asfour, H. Z., Alhakamy, N. A., Abdulaal, W. H., Ibrahim, T. S., Abbas, H. A., Salem, I. M., Hegazy, W. A. H., & Nazeih, S. I. (2024). Thymoquinone is a Natural Antibiofilm and Pathogenicity Attenuating Agent in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(2), 145–150.
- Anam, C., Agustini, T. ., & Romadhon. (2014). Pengaruh Pelarut yang berbeda pada Ekstraksi *Spirulina platensis* Serbuk Sebagai Antioksidan dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal Pengolahan Dan Bioteknologi*, 3, 106–112.
- Anwar, H. ., Andarwulan, N., & Yuliana, N. . (2017). Identifikasi Komponen Antibakteri pada Ekstrak Buah Takokak Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Mutu Pangan*, 4(2), 59–64.
- Azeem, K., Fatima, S., Ali, A., Ubaid, A., Husain, F. M., & Abid, M. (2025). Biochemistry of Bacterial Biofilm: Insights into Antibiotic Resistance Mechanisms and Therapeutic Intervention. *Life*, 15(1), 1–23.
- Bagus Pratama, W., Parida Hutapea, H., Parida Hutapea, H., & Ambarwati, S. (2024). Rotary Evaporator Design and Equipment PeRFormance to Increase The Concentration of Moringa Leaf Extract. *Proceeding of International Conference on Science, Health, And Technology*, 515–521.
- Bahri, S., Ambarwati, Y., Iqbal, M., & Baihaqy, A. A. (2019). Synthesis 4-Piperoilmorpholine from Piperine. *Journal of Physics: Conference Series*, 1338(1).
- Banar, M., Emaneini, M., Beigverdi, R., Fanaei Pirlar, R., Node Farahani, N., Van Leeuwen, W. B., & Jabalameli, F. (2019). The Efficacy of Lyticase and  $\beta$ -Glucosidase Enzymes on Biofilm Degradation of *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Different Gene Profiles. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–10.

- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: A Webserver for the Prediction of Toxicity of Chemicals. *Nucleic Acid Research*, 46(1), 257–263.
- Bikadi, Z., & Hazai, E. (2009). Application of the PM6 Semi-Empirical Method to Modeling Proteins Enhances Docking Accuracy of AutoDock. *Journal of Cheminformatics*, 1(1), 1–16.
- Bisso Ndezo, B., Tokam Kuate, C. R., & Dzoyem, J. P. (2021). Synergistic Antibiofilm Efficacy of Thymol and Piperine in Combination with Three Aminoglycoside Antibiotics against *Klebsiella pneumoniae* Biofilms. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021.
- Borisova, D., Paunova-krasteva, T., & Strateva, T. (2025). Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis : Mechanisms of Persistence , Adaptation and Pathogenesis. 1–25.
- Chareza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Smiglak, M., & Drozd, R. (2023). Enhancement of Inhibition of the *Pseudomonas* sp. Biofilm Formation on Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing by the Combined Action of Alginate Lyase and Gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5).
- Chen, G., Seukep, A. J., & Guo, M. (2020). Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs. *Marine Drugs*, 18(11).
- Choochana, P., Mounjaroen, J., Jongkon, N., Gritsanapan, W., & Tangyuenyongwatana, P. (2015). Development of Piperinic Acid Derivatives from *Piper nigrum* as UV Protection Agents. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 477–482.
- Coquet, L., Junter, G. A., & Jouenne, T. (1998). Resistance of Artificial Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem and Tobramycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(6), 755–760.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*, 7(3), 1–13.
- Deshmukh, H. S., Dhangude, V. M., Bhosale, T. A., Patil, R. V., Bagwan, R. R., Ghule, R. G., Deshmukh, P. A. T., Lamkane, R. B., & Shivpuje, S. S. (2025). Precision in Binding: An Insightful Review on Molecular Docking Techniques and their Applications. *South Asian Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(01), 29–42.

- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G., & Rahme, L. G. (2005). The Contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis and Quorum Sensing Circuitry Regulation: Multiple Quorum Sensing-Regulated Genes are Modulated without Affecting IasRI, RhIRI or the Production of N-acyl-L-Homoserine Lactones. *Molecular Microbiology*, 55(4), 998–1014.
- Elfadadny, A., Ragab, R. F., AlHarbi, M., Badshah, F., Ibáñez-Arancibia, E., Farag, A., Hendawy, A. O., De los Ríos-Escalante, P. R., Aboubakr, M., Zakai, S. A., & Nageeb, W. M. (2024). Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Navigating Clinical Impacts, Current Resistance Trends, and Innovations in Breaking Therapies. *Frontiers in Microbiology*, 15(4), 1–20.
- Forestryana, D., & Arnida, A. (2020). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2), 113.
- Forli, S., & Olson, A. J. (2012). A Force Field with Discrete Displaceable Waters and Desolvation Entropy for Hydrated Ligand Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(2), 623–638.
- Frimayanti, N., Lukman, A., & Nathania, L. (2021). Studi *Molecular Docking* Senyawa 1,5-Benzothiazepine sebagai Inhibitor Dengue DEN-2 NS2B/NS3 Serine Protease. *Chempublish Journal*, 6(1), 54–62.
- Grace, A., Sahu, R., Owen, D. R., & Dennis, V. A. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strains PAO1 and PA14: A Genomic, Phenotypic, and Therapeutic Review. *Frontiers in Microbiology*, 13(10), 1–15.
- Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for Combating Antibiotic Resistance in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(1), 1–7.
- Guenther, E. (1987). *Minyak Atsiri*. Universitas Indonesia.
- Guzzo, F., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., Buommino, E., & D'abrosca, B. (2020). Plant Derived Natural Products Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm Activity and Molecular Mechanisms. *Molecules*, 25(21).
- Haq, I. U., Imran, M., Nadeem, M., Tufail, T., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2021). Piperine: A Review of its Biological Effects. *Phytotherapy Research*, 35(2), 680–700.

- Hikmawanti, N. P. E., Hariyanti, H., Aulia, C., & Viransa, V. P. (2016). Kandungan Piperin dalam Ekstrak Buah Lada Hitam dan Buah Lada Putih (*Piper nigrum* L.) yang Diekstraksi dengan Variasi Konsentrasi Etanol Menggunakan Metode KLT-Densitometri. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 13(2), 173.
- Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., & Ibrahim, P. (2009). Antioxidant, Anti-TB Activities, Phenolic and Amide Contents of Standardised Extracts of *Piper sarmentosum* Roxb. *Natural Product Research*, 23, 238–249.
- Ino Ischak, N., Musa, W. J., Ode Aman, L., Alio, L., La Kilo, A., & Deltalia Saleh, S. (2023). Studi *Molecular Docking* dan Prediksi ADME Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Obat Tradisional Gorontalo terhadap Reseptor HER-2 sebagai Antikanker Payudara. *Jamb.J.Chem*, 5(1), 90–103.
- J, K., D, C., & M, R. (2019). Molecular Docking, Drug-likeness Studies and ADMET Prediction of Quinoline Imines for Antimalarial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Design*, 2(1), 1–7.
- Jami, A., Lissa Nuri, H., & Subhiyah, H. (2021). Kajian Teknologi Instrumen untuk Analisis Plastik Sintilasi Berbasis Polistirena. *Prima*, 18(2), 1–7.
- Juliani, H. R., Koroch, A. R., Giordano, L., Amekuse, L., Koffa, S., Asante-Dartey, J., & Simon, J. E. (2013). *Piper guineense* (*Piperaceae*): Chemistry, Traditional Uses, and Functional Properties of West African Black Pepper. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1127). ACS Publications.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–37.
- Kadji, M. H., Runtuwene, M. R. J., & Citraningtyas, G. (2013). Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC). In *Pharmacon*, 2(2). FMIPA UNSRAT.
- Karim, A., Adnan, J., & Irmawati. (2022). Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* L.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Farmasi Pelamonia*, 2(2), 42–47.
- Khan, M. (2015). Comparative Physicochemical Evaluation of Fruits and Antidepressant Potential of Volatile Oils of Fruits of Local Piper Species. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(1), 541–545.
- Lai, Y., Chu, X., Di, L., Gao, W., Guo, Y., Liu, X., Lu, C., Mao, J., Shen, H., Tang, H., Xia, C. Q., Zhang, L., & Ding, X. (2022). Recent Advances in the Translation of Drug Metabolism and Pharmacokinetics Science for Drug Discovery and Development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(6), 2751–2777.

- Lavery, G., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens*, 3(3), 596–632.
- Lou, Z., Tang, Y., Song, X., & Wang, H. (2015). Metabolomics-Based Screening of Biofilm-Inhibitory Compounds Against *Pseudomonas aeruginosa* from Burdock Leaf. *Molecules*, 20(9), 16266–16277.
- MacCain, W. J., & Tuomanen, E. I. (2020). Mini-Review: Bioactivities of Bacterial Cell Envelopes in the Central Nervous System. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(10), 1–8.
- Makatita, F. A., Wardhani, R., & Nuraini. (2020). Riset *In Silico* dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan, Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana sebagai Agen Anti-Aging. *Jurnal ABDI*, 2(1), 59–67.
- McNair, H. & Miller, M. (2009). *Basic Gas Chromatography*. A John Wiley & Sons, Inc.
- McNutt, A. T., Francoeur, P., Aggarwal, R., Masuda, T., Meli, R., Ragoza, M., Sunseri, J., & Koes, D. R. (2021). GNINA 1.0: Molecular Docking with Deep Learning. *Journal of Cheminformatics*, 13(1), 1–20.
- Milenković, A., Aleksovski, S., Miteva, K., Milenković, L., Stanojević, J., Nikolić, G., Ilić, Z. S., & Stanojević, L. (2025). The Effect of Extraction Technique on the Yield, Extraction Kinetics and Antioxidant Activity of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Ethanolic Extracts. *Journal of Horticulturae*, 11(2).
- Mohammed, G. J., Omran, A. M., & Hussein, H. M. (2016). Antibacterial and Phytochemical Analysis of *Piper nigrum* Using Gas Chromatography – Mass Spectrum and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(6), 977–996.
- Mohapatra, M., & Basak, U. C. (2015). Evaluation of Piperine Content from Roots of *Piper longum* Linn., Originated from Different Sources with Comparison of Zonal Variation in Odisha, India. *International Journal of Pharma Research & Review*, Sept, 4, 1–8.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(FEB).
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1–12.

- Nichols, W. W., Dorrington, S. M., Slack, M. P. E., & Walmsley, H. L. (1988). Inhibition of Tobramycin Diffusion by Binding to Alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(4), 518–523.
- Nivedha, A. K., Makeneni, S., Foley, B. L., Tessier, M. B., & Woods, R. J. (2014). Importance of Ligand Conformational Energies in Carbohydrate Docking: Sorting the Wheat from the Chaff. *Journal of Computational Chemistry*, 35(7), 526–539.
- Nusantoro, Y. R., & Fadlan, A. (2020). Analisis Sifat Mirip Obat, Prediksi ADMET, dan Penambatan Molekular Isatinil-2-Aminobenzoilhidrazon dan Kompleks Logam Transisi Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Terhadap BCL2-XL. *Akta Kimia Indonesia*, 5(2), 114.
- Octavia, M. D., Zaini, E., Hasmiwati, H., & Revila, G. (2024). Isolasi Piperin dari Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) dan Uji Kemurniannya. *Jurnal Farmasi Higea*, 16(1), 52.
- Oktaviantari, D. E., Feladita, N., & Agustin, R. (2019). Identifikasi Hidrokuinon dalam Sabun Pemutih Pembersih Wajah pada Tiga Klinik Kecantikan di Bandar Lampung dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analis Farmasi*, 4(2), 91–97.
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszyński, J. (2017). Software for Molecular Docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102.
- Pebe, M. A. P. (2022). Uji Konfirmasi MoRFin dengan Metode KLT. *Jurnal Ilmiah Multi Disiplin Indonesia*, 1(7), 867–876.
- Penesyau, A., Paulsen, I. T., Gillings, M. R., Kjelleberg, S., & Manefield, M. J. (2020). Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11(September), 1–8.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Metode Berbasis Struktur Bergantung pada Informasi yang Diperoleh dari Pengetahuan tentang Struktur 3D Target yang Menarik, dan Mereka Memungkinkan Database Peringkat Molekul Sesuai dengan Struktur dan Komplementaritas Elektronik Ligan ke Target Tertentu. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–23.
- Priyanto, N., Dwiwitno, D., & Ariyani, F. (2008). Kandungan Logam Berat (Hg, Pb, Cd, dan Cu) pada Ikan, Air, dan Sedimen Di Waduk Cirata, Jawa Barat. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 3(1), 69.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, Virulence Factors, Antibiotic Resistance, Interaction with Host, Technology Advances and Emerging Therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 1–27.

- Rahman Khan, Z., Moni, F., Sharmin, S., Al-Mansur, M. A., Gafur, A., Rahman, O., & Afroz, F. (2017). Isolation of Bulk Amount of Piperine as Active Pharmaceutical Ingredient (API) from Black Pepper and White Pepper (*Piper nigrum* L.). *Pharmacology & Pharmacy*, 08(07), 253–262.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015.
- Ravindran, P. ., & Kallapurackal, J. . (2024). Black Pepper. In K. V. Peter (Ed.), *Food and World Culture* (pp. 62–110). Indian Institute of Spices Research.
- Rudraraju, N., Mokkaapati, A., Nagumantri, R., Babu Pydi, C., Chintala, R., & Rentala, S. (2017). In vitro Evaluation of Cytotoxic Properties of Piperic Acid. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(02), 675–682.
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571–586.
- Sadiq, S., Rana, N. F., Zahid, M. A., Zargaham, M. K., Tanweer, T., Batool, A., Naeem, A., Nawaz, A., Rizwan-Ur-Rehman, Muneer, Z., & Siddiqi, A. R. (2020). Virtual Screening of FDA-Approved Drugs against LasR of *Pseudomonas aeruginosa* for Antibiofilm Potential. *Molecules*, 25(16).
- Sahumena, M. H., Ruslin, R., Asriyanti, A., & Djuwarno, E. N. (2020). Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 2(2), 65–72.
- Shahab, M., Danial, M., Khan, T., Liang, C., Duan, X., Wang, D., Gao, H., & Zheng, G. (2023). *In silico* Identification of Lead Compounds for *Pseudomonas aeruginosa* PqsA Enzyme: Computational Study to Block Biofilm Formation. *Biomedicines*, 11(3).
- Shariati, A., Noei, M., Askarinia, M., Khoshbayan, A., Farahani, A., & Chegini, Z. (2024). Inhibitory Effect of Natural Compounds on Quorum Sensing System in *Pseudomonas aeruginosa*: a Helpful Promise for Managing Biofilm Community. *Frontiers in Pharmacology*, 15(April), 1–20.
- Singh, G., Wani, N. A., Rahim, J. U., Shankar, S., Rai, R., & Katoch, M. (2022). Synergistic Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Piperic Acid and 4-Ethylpiperic Acid Amides in Combination with Ciprofloxacin. *Journal of Antibiotics*, 75(4), 236–242.
- Sinha, D., Mukherjee, S., & Chowdhury, S. (2022). *Methods of Extraction of Phytochemicals* (Issue September 2022).

- Sulman, L. (2021). Isolation of Piperine from Black Pepper (*Piper nigrum*) in the Provision of Standard Compounds for Natural Chemical Practice and Research Activities. *Jurnal Pijar Mipa*, 16(5), 683–687.
- Susanti, A. D., Ardiana, D., P, G. G., & G, Y. B. (2012). Divisions of Labour: Maternity Protection in Europe. *Journal of Social Welfare and Family Law*, 22(3), 277–294.
- Takooree, H., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy, K. R. R., Venugopala, K. N., Jeewon, R., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2019). A Systematic Review on Black Pepper (*Piper nigrum* L.): from Folk Uses to Pharmacological Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 210–243.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25.
- Topa, S. H., Palombo, E. A., Kingshott, P., & Blackall, L. L. (2020). Effect of Cinnamaldehyde on Quorum Sensing and Antibiotic Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.. *Microorganisms*, 8(3).
- Toyofuku, M., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2012). Social Behaviours Under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology*, 2012.
- Tripathi, A., & Misra, K. (2017). Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach. *JSM Chem*, 5(2), 1.
- Tsopmene, U. J., Tokam Kuate, C. R., Kayoka-Kabongo, P. N., Bisso, B. N., Metopa, A., Mofor, C. T., & Dzoyem, J. P. (2024). Antibiofilm Activity of Curcumin and Piperine and Their Synergistic Effects with Antifungals against *Candida albicans* Clinical Isolates. *Scientifica*, 2024.
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2021). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics*, 10(1), 1–36.
- Vetrivel, A., Natchimuthu, S., Subramanian, V., & Murugesan, R. (2021). High-Throughput Virtual Screening for a New Class of Antagonist Targeting LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Omega*, 6(28), 18314–18324.
- Wang, B., Zhang, Y., Huang, J., Dong, L., Li, T., & Fu, X. (2017). Anti-Inflammatory Activity and Chemical Composition of Dichloromethane Extract from *Piper nigrum* and *P. longum* on Permanent Focal Cerebral Ischemia Injury in Rats. *ReVista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3), 369–374.

- Wasia, N. H., Sudarma, I. M., Savalas, L. R. T., & Hakim, A. (2017). Isolasi Senyawa Sinamaldehyd dari Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan Metode Kromatografi Kolom. *Jurnal Pijar Mipa*, 12(2), 91–94.
- Williams, D. F. (1981). Extraction with Supercritical Gases. *Chemical Engineering Science*, 36(11), 1769–1788.
- Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., & Lin, J. (2022). Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infectious Biofilms: Challenges and Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 13(8), 1–16.
- Zhang, L., Zhang, H., Ai, H., Hu, H., Li, S., Zhao, J., & Liu, H. (2018). Applications of Machine Learning Methods in Drug Toxicity Prediction. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(12), 987–997.
- Zhao, C., Zheng, H., Zhou, L., Ji, H., Zhao, L., Yu, W., & Gong, Q. (2021). Falcarindiol Isolated from *Notopterygium incisum* Inhibits the Quorum Sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 26(19), 1–11.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59). McMaster University.