



Anti-Inflammatory Activity of Dysmenorrhea Herbal Medicine Through Inhibition of the Cyclooxygenase Enzyme and Metabolomic Analysis

Fajar Prasetya¹, Nurul M. Mus¹, Mentarry Bafadal¹, Nur R. K. Nisaa¹, Ani Isnawati²,
Lucie Widowati^{2*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur

²Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, BRIN

Submitted 07 February 2024; Revised 04 June 2024; Accepted 11 June 2024; Published 31 July 2024

*Corresponding author: luci003@brin.go.id

Abstract

Dysmenorrhea is the cramping or pain that occurs during menstruation. Although effective in treating dysmenorrhea, long-term use of NSAIDs can cause gastrointestinal side effects and bleeding. The aim of this study is to determine the anti-inflammatory activity of a traditional herbal remedy for dysmenorrhea, consisting of extracts of *Andrographis paniculata*, turmeric, moringa, red ginger, and dark chocolate, on cyclooxygenase (COX) enzymes, as determined by the TMPD method spectrophotometrically, and to identify the compounds and their concentrations in the samples using LC-HRMS. Based on the test results, all components of the dysmenorrhea herbal remedy exhibited inhibitory activity on COX-2 enzymes above 50% at a concentration of 1000 ppm. Metabolomic analysis using LC-HRMS showed that dark chocolate samples, turmeric rhizome infusion, ginger rhizome infusion, and ethanol extract of *Andrographis paniculata* herb contain compounds reported to have anti-inflammatory activity, such as andrographolide and its derivatives, theobromine, betaine, and pipecolic acid, with concentrations above 7%.

Keywords: Bitter, COX, Dysmenorrhea, Dark chocolate, Metabolomic analysis, Moringa, Red ginger, Turmeric

Aktivitas Antiinflamasi Ramuan Jamu Dismenor melalui Penghambatan Enzim Siklooksigenase dan Analisis Metabolomiknya

Abstrak

Dismenore adalah rasa kram atau nyeri yang terjadi ketika menstruasi. Meskipun efektif dalam pengobatan dismenore, penggunaan AINS jangka panjang dapat menyebabkan efek samping pada sistem gastrointestinal dan terjadi pendarahan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi ramuan jamu dismenore yang terdiri dari ekstrak sambiloto, kunyit, kelor, jahe merah, dan coklat hitam terhadap enzim siklooksigenase (COX) yang ditentukan dengan menggunakan metode TMPD secara spektrofotometri dan mengetahui kandungan dan kadar senyawa pada sampel tersebut menggunakan metode LC-HRMS. Berdasarkan hasil pengujian, seluruh komponen penyusun jamu dismenor memiliki aktivitas penghambatan pada enzim COX-2 di atas 50 % pada konsentrasi 1000 ppm dan berdasarkan hasil analisis metabolomik menggunakan LC-HRMS menunjukkan bahwa sampel coklat hitam, infusa rimpang kunyit, infusa rimpang jahe dan ekstrak etanol herba sambiloto mengandung senyawa yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti inflamasi seperti andrografolid dan turunannya, teobromin, betaine dan asam pipokolat dengan kadar kandungan di atas 7%.

Kata Kunci: Analisis metabolomik, Coklat hitam, COX, Dismenor, Jahe merah, Kelor, Kunyit, Sambiloto

1. Pendahuluan

Sindrom pramenstruasi (PMS) dan dismenore primer merupakan keluhan ginekologi yang umum di kalangan wanita di usia reproduksi. Sebanyak 80 % wanita mengalami dismenor saat periode menstruasi.⁸ Dismenor adalah nyeri yang terjadi pada saat menstruasi. Gejala sistemik dismenor yang dapat muncul dapat berupa kram, sakit kepala, rasa lesu, kelelahan yang berlebihan, kesulitan tidur atau keinginan untuk tidur, nyeri pada payudara, perasaan berat di bagian bawah perut, nyeri punggung, serta sensasi nyeri pada lutut dan paha bagian dalam. Selain itu, dapat timbul pula mialgia, arthralgia, dan pembengkakan pada kaki. Gejala lain dismenor yang berkaitan dengan sistem pencernaan mencakup perubahan nafsu makan, mual, muntah, dan kembung, termasuk sembelit, diare, frekuensi buang air kecil yang meningkat, dan peningkatan produksi keringat.^{1,2,3,4} Dismenore dapat memberikan dampak buruk yang cukup besar pada kesejahteraan emosional, psikologis, fungsional, seperti kecemasan, stres, mudah tersinggung dan suasana hati tertekan sehingga memengaruhi tingkat kualitas hidup para penderitanya.¹

Rasa nyeri yang timbul selama siklus menstruasi diakibatkan oleh adanya peningkatan ekspresi enzim siklooksigenase⁶ yang pada akhirnya meningkatkan produksi mediator inflamasi prostaglandin. Prostaglandin yang terlibat yaitu prostaglandin F2 α (PGF2 α) dan prostaglandin E2 (PGE2). PGF2 α berperan dalam mengatur penyempitan pembuluh darah yang mengakibatkan hipoksia lokal pada jaringan endometrium serta dapat merangsang kontraksi otot polos yang mendukung perdarahan menstruasi. Sedangkan PGE2 dapat meningkatkan pembengkakan serta merekrut leukotriene yang juga merupakan mediator pro-inflamasi.⁵ Hal inilah yang mendorong penggunaan obat-obat anti inflamasi non-steroid sebagai terapi lini pertama untuk pengobatan dismenor.⁷ seperti asam mefenamat, natrium diklofenak, ibuprofen, dan naproxen.

Namun saat ini, pemanfaatan bahan alam dalam bidang pengobatan juga

telah memiliki peranan penting dalam pengembangan solusi kesehatan yang berkelanjutan dan efektif. Bahan alam, seperti tumbuhan obat dan senyawa-senyawa alami, telah lama digunakan dalam berbagai tradisi pengobatan di seluruh dunia. Keberagaman sumber daya alam memberikan potensi besar untuk menemukan zat-zat aktif baru yang dapat digunakan dalam formulasi obat. Dengan memanfaatkan kearifan lokal dan pengetahuan tradisional, potensi besar bahan alam sebagai sumber terapi yang inovatif dan berkelanjutan untuk menjaga kesehatan manusia dapat dioptimalkan khususnya pada pengobatan dismenor.

Pada penelitian ini, peneliti memanfaatkan sampel kunyit, jahe merah, kelor dan sambiloto, dan coklat sebagai bahan baku ramuan jamu dismenor berdasarkan pertimbangan bahwa kurkumin yang banyak terdapat pada kunyit, memiliki efektivitas yang baik dalam mengurangi keparahan gejala PMS secara psikologis, fisik dan perilaku sehingga kunyit potensial digunakan sebagai pengobatan herbal untuk mengurangi keparahan dan durasi dismenore.^{9,10} Senyawa 6-gingerol yang terdapat pada jahe dapat mengurangi kadar PGE2 dengan menekan aktivitas enzimatis siklooksigenase dan PGE sintase yang secara kooperatif mengkatalisis konversi asam arakidonat menjadi PGE2.¹¹ Selain itu, dalam pengobatan tradisional Indonesia, jahe merah telah digunakan secara empiris sebagai herbal untuk mengatasi batuk berdahak dan migrain serta terbiasa menetralkan perut kembung, menghangatkan badan, memperbaiki pencernaan, dan menjaga stamina.¹² Senyawa *andrographolide* pada sambiloto juga dapat mengurangi ekspresi beberapa gen proinflamasi, termasuk siklooksigenase-2 (COX-2).¹³ *Moringa oleifera* kaya akan flavonoid dengan aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi yang tinggi.¹⁴ Penelitian lain juga menunjukkan *Moringa oleifera* dapat menekan inflamasi melalui penghambatan produksi mediator inflamasi NO.¹⁵ Sedangkan coklat (*cocoa/rawchocolate*) baik dalam penelitian in vitro maupun in vivo dilaporkan mampu mengurangi sitokin, kemokin, spesies oksigen reaktif (ROS),

NO, dan molekul lain yang terlibat dalam respons inflamasi dan nyeri meliputi senyawa golongan polifenol, metilxantin (kafein dan teobromin), *anandamide*, amina biogenik, alkaloid, dan triptofan.¹⁶ Kuersetin pada kakao juga dilaporkan telah terbukti memberikan aktivitas anti-inflamasi, antioksidan, dan analgesik.¹⁷ Berdasarkan pendekatan tersebut, ramuan jamu kunyit, jahe merah, kelor, sambiloto dan coklat diharapkan dapat menjadi herbal potensial sebagai antiinflamasi untuk mengurangi keluhan gejala dismenor.

Sebagai uji pendahuluan, dilakukan pengujian penghambatan terhadap enzim siklooksigenase (COX) oleh coklat, ekstrak air kunyit, ekstrak air jahe merah, ekstrak air kelor, ekstrak etanol sambiloto untuk mengetahui aktivitas anti inflamasinya secara *in vitro*.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain timbangan analitik, *freeze dryer*, mikro pipet Socorex Swiss, vorteks, *Sonikator Sonics Vibra Cell, 96-wells plate Cayman Chemical, microplate reader*, dan beberapa peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rimpang kunyit, rimpang jahe merah, daun kelor, herba sambiloto, coklat 72 % (*Couverture*), air suling, DMSO, *kit colorimetric COX (ovine) inhibitor screening assay No. 760111 (Cayman Chemical Comp.)*, Natrium Diklofenak.

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1. Ekstraksi Sampel

Simplisia kering rimpang kunyit, jahe merah dan kelor dipanaskan pada suhu 90 derajat celcius selama 15 menit menggunakan akuades dengan perbandingan jumlah simplisia kering dan akuades 100 g:1 L, lalu di-*freeze dry*. Herba sambiloto kering diekstraksi menggunakan etanol 96 % dengan perbandingan 100 g:1 L, 2x24 jam.

2.3.2. Preparasi Sediaan

Setiap pembanding (Natrium diklofenak) dan sampel (ekstrak kunyit, ekstrak jahe merah, ekstrak kelor, ekstrak sambiloto dan coklat 72 %) dilarutkan dalam DMSO 0.4 % 50 µl kemudian disonikasi untuk mempercepat kelarutannya dan dicukupkan dengan aquades hingga mencapai konsentrasi 200 dan 1000 ppm.

2.3.3. Pengujian Aktivitas Inhibisi COX

Metode penghambatan enzim siklooksigenase 1 dan 2 menggunakan metode TMPD secara kolorimetri sesuai pada panduan *kit colorimetric COX (ovine) inhibitor screening assay No. 760111*. Sebanyak 160 µL assay buffer dan 10 µL hemin dimasukkan ke dalam 3 *wells* sebagai *background wells*. Assay buffer sebanyak 150 µL, hemin 10 µL, dan enzim COX 1 atau COX 2 sebanyak 10 µL dimasukkan dalam 3 *wells* sebagai 100 % *initial activity wells*. Assay buffer sebanyak 150 µL, 10 µL hemin, enzim COX 1 atau COX 2 10 µL, dan 10 µL sampel uji (masing-masing ekstrak) dengan konsentrasi 200 ppm dan 1000 ppm dimasukkan ke dalam *inhibitor wells*. Pelarut 10 µL ditambahkan masing-masing ke dalam 100 % *initial activity wells* dan *background wells*. Plate dikocok beberapa detik dan diinkubasi selama 5 menit pada 25°C. Kemudian semua *wells* yang digunakan ditambahkan larutan substrat kolorimetrik 20 µL dan asam arakidonat 20 µl. *Plate* dikocok secara hati-hati selama beberapa detik dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada 25°C, lalu dilakukan pembacaan absorbansi pada λ 590 nm menggunakan *microplate reader*.

Nilai absorbansi *background wells*, 100% *initial activity wells*, dan setiap sampel pada inhibitor wells diambil nilai rata-ratanya, kemudian dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$a = A_{100\% \text{ initial wells}} - A_{\text{Background wells}}$$

$$b = A_{\text{inhibitor wells}} - A_{\text{Background wells}}$$

$$\% \text{ Penghambatan} = \left(\frac{a-b}{a} \right) \times 100\%$$

2.3.4. Ekstraksi sampel untuk analisis metabolomik

Proses ekstraksi menggunakan metode sebagaimana yang dilakukan oleh Windarsih A, dkk (2022) yaitu sebanyak 50 mg sampel ekstrak etanol sambiloto ditimbang dan ditempatkan ke dalam tabung mikrosentrifuge. Sampel diekstraksi dengan menggunakan 1 mL MeOH grade MS, divortex selama 30 detik, dan kemudian disonikasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Setelah itu, sampel disentrifugasi pada kecepatan $1400 \times g$ selama 5 menit untuk memisahkan supernatan dan pellet. Supernatan diambil dan difiltrasi menggunakan filter PTFE 0,22 μm . Supernatan yang telah difiltrasi siap untuk diinjeksikan dalam analisis LC-HRMS. Sebagai langkah persiapan, MeOH grade MS digunakan sebagai sampel kosong dalam analisis metabolomik.¹⁹

2.3.5. Analisis metabolomik dengan LC-HRMS

Analisis sampel (ekstak kunyit, sambiloto, coklat dan jahe merah) dilakukan menggunakan kromatografi cair (Pompa Binari UHPLC *Thermo Scientific™ Vanquish™*) dan spektrometri massa resolusi tinggi Orbitrap (Spektrometer Massa Resolusi Tinggi *Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Q Exactive™ Thermo Scientific™*) sebagaimana yang dilakukan oleh Windarsih A, dkk (2022) yaitu Kromatografi cair dilakukan menggunakan kolom analitis *Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl-Hexyl* 100 mm $\times$ 2,1 mm ID $\times$ 2,6 μm . Fasa gerak yang digunakan adalah air MS-grade yang mengandung 0,1% asam formik (A) dan metanol MS-grade yang mengandung 0,1% asam formik (B), dengan teknik gradien pada laju alir 0,3 mL/menit. Pertama, fase gerak B diatur pada 5% dan ditingkatkan secara bertahap hingga 90% dalam 16 menit. Kemudian, dipertahankan pada 90% selama 4 menit dan kembali ke kondisi awal (5% B) hingga 25 menit. Suhu kolom diatur pada 40°C, dan volume injeksi adalah 3 μL . Skrining tanpa target dilakukan menggunakan mode akuisisi full MS/dd-MS2 pada polaritas/ionisasi positif. Nitrogen digunakan untuk gas *sheath*, *auxiliary*, dan

sweep dengan pengaturan pada 32, 8, dan 4 *arbitrary unit* (AU). Tegangan semprot adalah 3,30 kV, suhu kapiler diatur pada 320°C, dan suhu pemanas gas tambahan diatur pada 30°C. Rentang pemindaian dilakukan pada 66,7–1000 m/z, dan resolusi yang digunakan adalah 70.000 untuk *full MS* dan 17.500 untuk dd-MS2 dalam mode ionisasi positif. Sistem diatur oleh perangkat lunak XCalibur 4.4 (*Thermo Scientific*, Bremen, Jerman).¹⁹

3. Hasil dan Pembahasan

Cyclooxygenase (COX) atau yang disebut juga dengan Prostaglandin H Sintase (PGHS) adalah enzim bifungsional yang menunjukkan aktivitas COX dan peroksidase. Komponen COX mengubah asam arakidonat menjadi hidroperoksil endoperoksida (PGG₂), dan enzim peroksidase mengubah PGG₂ menjadi PGH₂ (prostaglandin H₂).¹⁸ Uji skrining kolorimetri penghambatan COX (*ovine*) Cayman bekerja dengan cara mengukur komponen peroksidase COX. Aktivitas peroksidase diuji secara kolorimetri dengan memantau munculnya TMPD yang teroksidasi pada panjang gelombang 590 nm.

Pada penelitian ini, hasil pengujian aktivitas antiinflamasi dinyatakan dengan % inhibisi enzim COX. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak sambiloto memiliki aktivitas penghambatan baik pada enzim COX-1 maupun enzim COX-2 dengan persen inhibisi masing-masing sebesar 4.5% (1000 ppm) dan 74.29% (1000 ppm). Sedangkan ekstrak kelor, jahe merah, kunyit dan coklat hitam hanya memiliki aktivitas penghambatan pada enzim COX-2 masing-masing 71.02%, 67.14%, 65.78%, dan 68.99% pada konsentrasi 1000 ppm. Namun, natrium diklofenak sebagai pembanding tetap memiliki aktivitas penghambatan paling baik (Tabel 1).

Berdasarkan hasil analisis metabolomik menggunakan LC-HRMS, data kandungan senyawa sampel uji, formula senyawa, *retention time* (RT) dan kadar senyawa ditunjukkan pada tabel 2. Pada penelitian ini, senyawa dominan yang dilaporkan jika kadarnya melebihi 3 %. Analisis metabolomik sampel dengan LC-HRMS

Tabel 1. Hasil Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Sampel Terhadap Enzim COX

Sampel	% Inhibisi			
	COX-1		COX-2	
	200ppm	1000ppm	200ppm	1000ppm
Sambiloto	4.073	4.515	10.96	74.29
Kelor	4.578	-	26.72	71.02
Jahe Merah	-	-	2.12	67.14
Kunyit	-	-	2.34	65.78
Coklat Hitam	-	-	14.70	68.99
Na. diklofenak	6.26	10.009	67.39	76.50

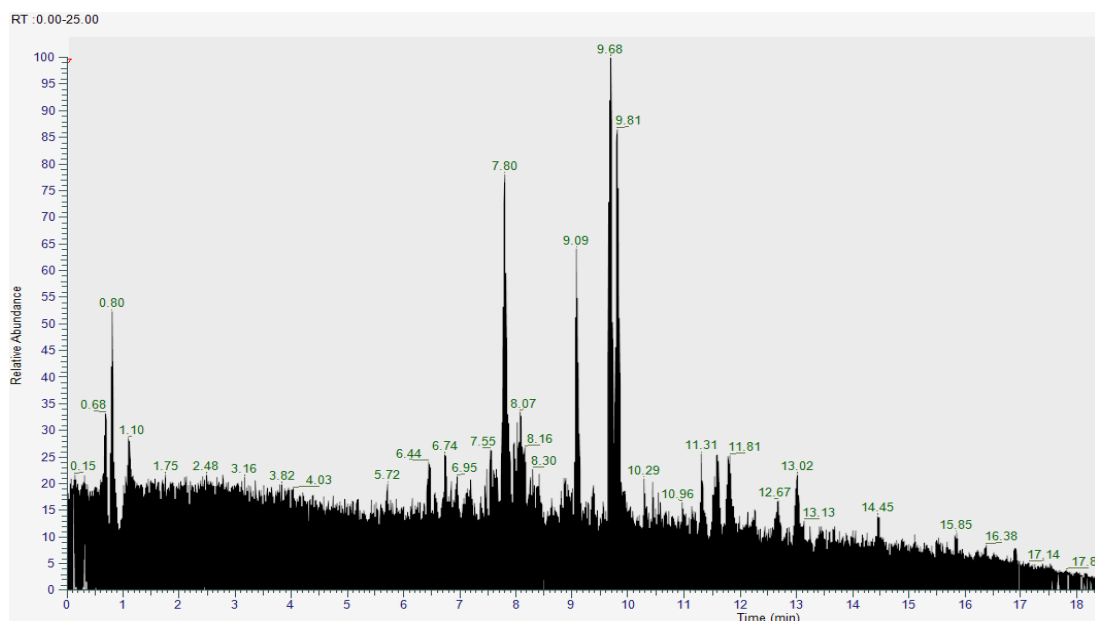
menggunakan *library ChemSpider* dan *mzCloud*. Kromatogram sampel uji disajikan pada gambar 1, 2, 3, 4.

Senyawa-senyawa dominan yang terkandung pada sampel uji turut berkontribusi terhadap aktivitas penghambatan pada enzim siklooksigenase seperti senyawa andrografolid dan turunannya yaitu 14-Deoksi-11,12-didehidro andrografolid yang terdapat pada

sambiloto, teobromin pada coklat, betain yang terkandung pada rimpang jahe merah, herba sambiloto dan rimpang kunyit serta asam pipekolat pada rimpang jahe merah. Aktivitas anti inflamasi ini juga didukung oleh berbagai riset seperti senyawa andrografolid dan turunannya (14-Deoksi-11,12-didehidro andrografolid) telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dengan berbagai model

Tabel 2. Kandungan dan kadar senyawa komponen penyusun ramuan jamu dismenor

No	Sampel	Kandungan Senyawa	Formula	Berat Molekul	RT	Kadar (%)
1	Kunyit	Betaine	C ₅ H ₁₁ N O ₂	117.07877	0.816	12.56
		(+)-ar-Turmerone	C ₁₅ H ₂₀ O	216.15064	7.509	9.29
		alpha-methylstyrene	C ₉ H ₁₀	118.078	7.507	5.77
		D-(+)-Pipicolinic acid	C ₆ H ₁₁ N O ₂	129.07872	0.886	5.24
2	Coklat	Theobromine	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.0642	2.018	38.67
		Theobromine	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180.0642	1.869	24.36
		Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.0798	4.164	8.40
3	Sambiloto	14-Deoxy-11,12-didehydro andrographolide	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.1974	9.804	9.66
		Andrographolide	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350.2078	7.802	7.79
		Betaine	C ₅ H ₁₁ N O ₂	117.0788	0.804	4.68
		Eicosatetraynoic acid	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.1766	9.81	4.03
		3-{2-[(1R,4aS,5R,8aS)-5,8a-dimethyl-2-methylidene-5-({[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy} methyl)-decahydronaphthalen-1-yl]ethyl}-2,5-dihydrofuran-2-one	C ₂₆ H ₄₀ O ₈	480.2706	9.08	3.99
		Cannabidivarin	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1923	9.677	3.6
		D - (+)-Pipicolinic acid	C ₆ H ₁₁ N O ₂	129.0787	0.887	20.18
4	Jahe Merah	Betaine	C ₅ H ₁₁ N O ₂	117.0788	0.822	12.18
		1-Naphthol	C ₁₀ H ₈ O	144.057	10.26	4.43
		Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	152.1198	3.7	3.99



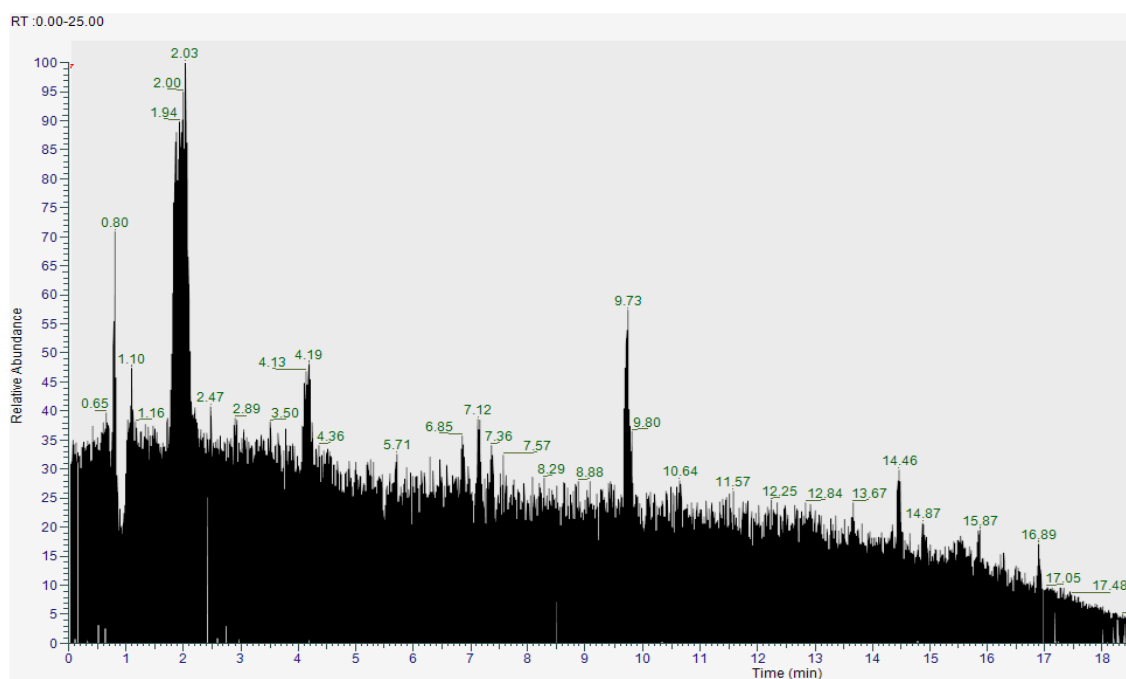
Gambar 1. Kromatogram sampel ekstrak herba sambiloto

pendekatan penyakit inflamasi²⁰ salah satunya 14-Deoksi-11,12-didehidro andrografolid mampu menurunkan NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi untuk memproduksi sitokin proinflamasi baik pada mencit model asma²¹ dan pada model hewan fibrosis hati²² sementara andrografolid salah satunya dilaporkan dapat mengobati artritis yang diinduksi CFA dengan menghambat ekspresi sejumlah molekul terkait arthritis, termasuk COX-2, NF- κ B, p-p38, CD40, TNF- α , IL-1 β , dan IL-6.²³ Asam pipecolat juga memberikan efek anti-inflamasi yang signifikan melalui

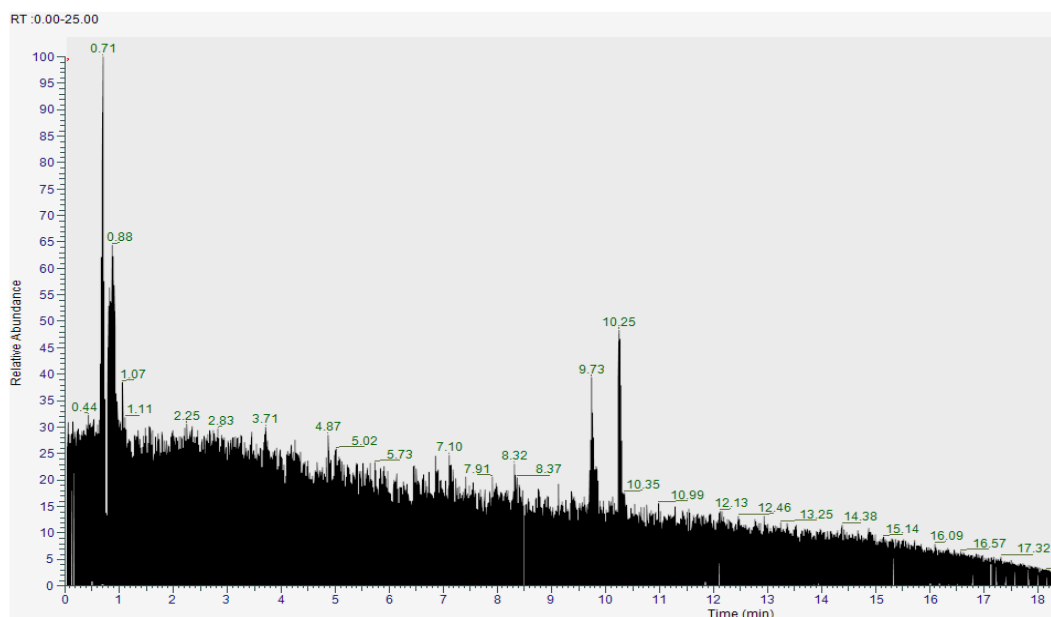
pengurangan sitokin pro-inflamasi pada makrofag melalui penghambatan sinyal mTORC1.²⁴ Betain memiliki efek anti-inflamasi melalui penghambatan jalur sinyal NF- κ B yang terlibat dalam produksi sitokin pro-inflamasi,²⁵ sedangkan teobromin juga bekerja sebagai anti inflamasi dengan cara menekan produksi sitokin proinflamasi TNF- α yang diinduksi oleh IL-1 β .²⁶

4. Kesimpulan

Pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa seluruh komponen penyusun ramuan



Gambar 2. Kromatogram sampel coklat



Gambar 3. Kromatogram sampel infusa rimpang jahe merah

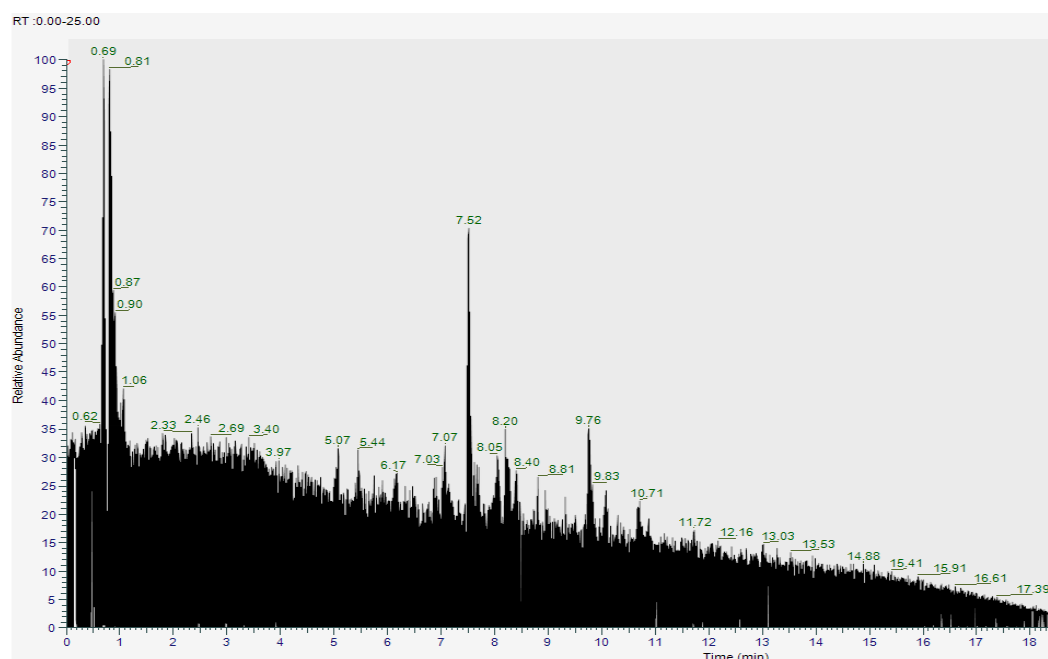
jamu dimenor memiliki aktivitas inhibisi pada enzim COX khususnya enzim COX-2 dengan persen penghambatan di atas 50 % pada konsentrasi 1000 ppm sehingga komponen penyusun jamu tersebut dapat digunakan sebagai ramuan untuk mengatasi dismenor. Hasil LC-HRMS pada komponen penyusun jamu juga menunjukkan adanya berbagai senyawa yang sebelumnya telah dilaporkan memiliki potensi sebagai antiinflamasi seperti andrografolid dan turunannya, teobromin, betain serta asam pipecolat dengan kadar kandungan di atas 7%.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) dan didukung oleh fasilitas riset, dan dukungan ilmiah serta teknis dari Laboratorium Karakterisasi Lanjut Yogyakarta di BRIN.

Referensi

1. Adib-Rad, H., Kheirkhah, F., Faramarzi, M., Omidvar, S., Basirat, Z., & Haji Ahmadi, M. (2022). Primary Dysmenorrhea Associated with Psychological Distress in Medical Sciences Students in The North of Iran:



Gambar 4. Kromatogram sampel infusa rimpang kunyit

- A Cross-Sectional Study. *International journal of fertility & sterility*, 16(3), 224–229. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2022.542056.1216>
2. Nagy H, Carlson K, Khan MAB. Dysmenorrhea. [Updated 2023 Nov 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
 3. Alsaleem MA. Dysmenorrhea, associated symptoms, and management among students at King Khalid University, Saudi Arabia: An exploratory study. *J Family Med Prim Care*. 2018 Jul-Aug;7(4):769-774.
 4. Calis KA, Dang DK, Kalantaridou SN, Erogul M. Dysmenorrhea: practice essentials, background, pathophysiology. New York (NY): Medscape; 2019.
 5. Evans, J.; Salamonsen, L.A. Inflammation, leukocytes and menstruation. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2012;13:277–288.
 6. Oladosu FA, Tu FF, Hellman KM. Nonsteroidal antiinflammatory drug resistance in dysmenorrhea: epidemiology, causes, and treatment. *Am J Obstet Gynecol*. 2018 Apr;218(4):390-400.
 7. Doty E, Attaran M. Managing primary dysmenorrhea. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2006 Oct;19(5):341-4
 8. Bahrami, Afsane & Ariakia, Fatemeh & A.Ferns, Gordon & Ghayour-Mobarhan, Majid. The prevalence of menstrual problems amongst adolescent girls in northeastern Iran. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*.2022; 30:1-8.
 9. Tabari, Naghmeh & Kheirkhah, Masoomah & Mojab, Faraz & Salehi, Masoud. An Investigation of the Effect of Curcumin (Turmeric) Capsule on the Severity and Duration of Dysmenorrhea in Students of Iran University of Medical Sciences. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*.2020; 9:3444-3451.
 10. Khayat S, kheirkhah M, Fanaei H, Behboodi Moghadam Z, pourmohsen M, Kasaeiyan A. Comparison the effects of Ginger and Curcumin in treatment of premenstrual syndrome. *Iran South Med J*. 2015;18(3):575-586.
 11. Hwang, Y. H., Kim, T., Kim, R., & Ha, H. The Natural Product 6-Gingerol Inhibits Inflammation-Associated Osteoclast Differentiation via Reduction of Prostaglandin E₂ Levels. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7):2068.
 12. Hendra, R. J., Rusdi, R. A., & Misfadhila, S. (2022). Phytochemical and Traditional Uses of Red Ginger: A Review (*Zingiber officinale* var. *rubrum*).
 13. Tan W.S.D., Liao W., Zhou S., Wong W.S.F. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol*. 2017;139:71–81.
 14. Xu, Y. B., Chen, G. L., & Guo, M. Q. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Crude Extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*.2019; 8(8):296.
 15. Fard, M. T., Arulselvan, P., Karthivashan, G., Adam, S. K., & Fakurazi, S. Bioactive Extract from *Moringa oleifera* Inhibits the Pro-inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide Stimulated Macrophages. *Pharmacognosy magazine*. 2015;11(Suppl 4):S556–S563.
 16. De Feo, M., Paladini, A., Ferri, C., Carducci, A., Del Pinto, R., Varrassi, G., & Grassi, D. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cocoa: a review on future perspectives in treatment of pain. *Pain and Therapy*. 2020;9:231-240.
 17. Borghi SM, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Bussmann AJ, Vignoli JA, Camilios-Neto D, Casagrande R, Verri WA., Jr Quercetin inhibits peripheral and spinal cord nociceptive mechanisms to reduce intense acute swimming-induced muscle pain in mice. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162267.
 18. Liu J, Seibold SA, Rieke CJ, Song I, Cukier RI, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide H synthases: peroxidase hydroperoxide specificity and cyclooxygenase activation. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18233-18244.

19. Windarsih A, Suratno, Warmiko HD, Indrianingsih AW, Rohman A, Ulumuddin YI. Untargeted metabolomics and proteomics approach using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry to detect pork adulteration in *Pangasius hypophthalmus* meat. *Food Chem.* 2022 Aug 30;386:132856.
20. Li, X., Yuan, W., Wu, J., Zhen, J., Sun, Q., & Yu, M. Andrographolide, a natural anti-inflammatory agent: An Update. *Frontiers in pharmacology.* 2022;13:920435.
21. Lim J. C., Goh F. Y., Sagineedu S. R., Yong A. C., Sidik S. M., Lajis N. H., et al. A semisynthetic diterpenoid lactone inhibits NF- κ B signalling to ameliorate inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse asthma model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016;302:10–22.
22. Liu Y. T., Chen H. W., Lii C. K., Jhuang J. H., Huang C. S., Li M. L., et al. A diterpenoid, 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide, in *andrographis paniculata* reduces steatohepatitis and liver injury in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Nutrients.* 2020;12 (2): E523.
23. Gupta S., Mishra K. P., Kumar B., Singh S. B., Ganju L. Andrographolide attenuates complete freund's adjuvant induced arthritis via suppression of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines. *J. Ethnopharmacol.* 2020; 261: 113022.
24. Zhang, N., Wang, X., Feng, M. et al. Early-life exercise induces immunometabolic epigenetic modification enhancing anti-inflammatory immunity in middle-aged male mice. *Nat Commun.* 2024;15:3103. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47458-3>
25. Zhao, Guangfu, et al. "Betaine in inflammation: mechanistic aspects and applications." *Frontiers in immunology* 9. 2018;1070.
26. Gu, Ronghe, et al. "Theobromine mitigates IL-1 β -induced oxidative stress, inflammatory response, and degradation of type II collagen in human chondrocytes." *International Immunopharmacology* 82. 2020; 106226.