

**UJI AKTIVITAS ANTAGONISME ISOLAT ALKALOID LADA
(*Piper nigrum* Linn.) TERHADAP RESEPTOR H₁ PADA OTOT POLOS
ORGAN TRAKEA *Cavia porcellus* TERISOLASI**

*Julio Candra Wijaya, **Puguh Novi Arsito

Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta*
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta**

INTISARI

Piperin merupakan salah satu senyawa golongan alkaloid. Piperin diperoleh dari isolasi tanaman lada hitam. Piperin dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast dengan jalan menghambat jalur signal yang dimediasi oleh IgE. Piperin diduga memiliki aksi antagonisme pada otot polos trakea yang diinduksi agonis reseptor histamin H₁. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh piperin terhadap reseptor H₁ dan membuktikan bahwa piperin memiliki sifat sebagai antagonis kompetitif atau non-kompetitif.

Metode penelitian ini adalah eksperimental. Proses kerja pada penelitian ini yaitu preparasi otot polos organ trakea marmut terisolasi, kemudian diamati respon kontraksi atau relaksasi pada satu set alat organbath, piperin diberikan pengenalan seri konsentrasi histamin tertinggi, selanjutnya dilakukan pencucian dengan *buffer krebs* selama 30 menit setiap 5 menit, diberikan seri konsentrasi histamin bertingkat dengan dan tanpa piperin 10 μ M dan 100 μ M. Data hasil pembacaan *recorder* pengujian *in vitro* diubah menjadi bentuk persentase (%) dan pD₂ kemudian dianalisis menggunakan uji one way ANOVA dan LSD dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil nilai pD₂ pada reseptor H₁ bergeser secara signifikan pada kadar 10 μ M dan 100 μ M ($p < 0,05$) dengan tipe antagonis non-kompetitif dilihat dari bentuk kurva respon kontraksi yang tidak mencapai *E_{max}* 100%. Kesimpulan penelitian ini adalah piperin. dapat bertindak sebagai antagonis pada reseptor H₁, hal ini dapat terlihat dari penurunan nilai pD₂. Piperin memiliki aktivitas sebagai antagonis non kompetitif pada reseptor H₁. Kadar 100 μ M lebih efektif dapat menghambat kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor histamin H₁.

Kata kunci: Histamin, *in vitro*, Piperin, *Piper nigrum* L., trakea.

**ANTAGONISM ACTIVITY OF ALKALOID ISOLATED FROM PEPPER
(*Piper nigrum* Linn.) ON H₁ RECEPTOR IN THE ISOLATED TRACHEAL
MUSCLE OF *Cavia porcellus***

*Julio Candra Wijaya, **Puguh Novi Arsito

Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta*
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta**

ABSTRACT

Piperin is one of compound in the alkaloids group. Piperin obtained from the isolation of black pepper. Piperin could inhibit histamin from the mast cell via inhibiting signaling pathway that mediated by IgE. Piperin expected to have antagonist action in the smooth muscle of trachea that inducted by agonis of H₁ receptor. The main purpose of this study is to analyze the effect of piperin to H₁ receptor and to verify that piperin acts as a competitive antagonis or non-competitive compound.

This experiment using experimental method. The first procedure was preparing the trachea's smooth muscle from guinea pig, then observing the contraction or relaxation in the organ bath by given the highest concentration of histamine. After this procedure, washing it with buffer krebs for 30 minutes in every 5 minutes, then observing with another concentration series of histamin with piperin and without piperin 10 µM dan 100 µM. Data from the recorder of in vitro test will be changed to percentage (%) and pD₂, then analyze it with one way ANOVA and the LSD with 95% of confidence levels.

The result of pD₂ to H₁ receptor is significantly shifted from the 10 µM and 100 µM concentration (p<0,05) with non-competitive antagonist type because the response curve did not reach *E*_{max} 100%. The conclusion from this experiment is piperin acts as an antagonist of H₁ receptor, this can be seen from the decreasing of pD₂ value. Piperin have an effect as non-competitive antagonist of H₁ receptor. In 100 µM concentration showed to be more effective to inhibit the contraction of the isolated smooth muslce in guinea pig's trachea that inducted by agonis of H₁ receptor.

Keywords: Histamine, *in vitro*, Piperin, *Piper nigrum* L., trachea.

PENDAHULUAN

Indonesia sejak dahulu dikenal sebagai negara penghasil rempah-rempah dunia. Rempah tidak hanya dijadikan bumbu masakan, rempah juga seringkali digunakan masyarakat sebagai obat tradisional untuk berbagai macam penyakit. Tersedianya berbagai jenis rempah ini berpotensi untuk diteliti kandungannya dan dijadikan senyawa penuntun (*lead compound*) ataupun penemuan obat baru.¹ Salah satu kekayaan rempah yang memiliki potensi besar dijadikan tanaman obat adalah lada (*Piper nigrum* Linn) famili piperaceae. Lada mengandung serat dan vitamin. Selain itu, lada juga mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa alkaloid berupa piperin.² Kandungan yang terdapat pada lada antara lain alkaloid piperin (5-9 %), minyak volatil (1-2,5%), resin (6,0%), piperidin dan pati (sekitar 30%).³ Pengujian piperin secara *in-vivo* menunjukkan bahwa piperin memiliki efek antiinflamasi, antinosiseptif dan antiarthritis dengan jalan menghambat beberapa mediator inflamasi.⁴ Isolate alkaloid pada *Piper nigrum* Linn. mampu menghambat kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor histamin, mengetahui kadar yang efektif antara 10 μ M dan 100 μ M pada isolate alkaloid pada *Piper nigrum* Linn. dalam menghambat kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi

agonis reseptor histamin dan mengetahui tipe antagonisme piperin sebagai penghambat reseptor histamin di trakea marmut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah satu set alat untuk preparasi organ, pengaduk magnet termostat tipe 141916, Transduser (Ugo basille®), Rekorder (Ugo basille®), Bridge amplifier (Ugo basille®), Dua set *organ bath* volume 20 ml, mikro pipet 20-200 μ l, 200-1000 μ l (Eppendorf®)

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat alkaloid *Piper nigrum* Linn. yang didapatkan dari peneliti sebelumnya. Piperin didapatkan melalui metode sokletasi dengan pelarut etil asetat. Hasil sokhletasi akan mengendap membentuk kristal yang selanjutnya dicuci menggunakan etanol 96%, selanjutnya melewati beberapa uji diantaranya uji KLT, uji spektro UV, uji FTIR, dan uji titik lebur.⁵

Hewan percobaan yang digunakan adalah marmut jantan, umur lebih kurang 3 bulan dengan kondisi fisik sehat. Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer krebs*, gas karbogen (Samator®), agonis reseptor histamin (Sigma Aldrich®), dan aquades (Bratacho®).

Preparasi Organ Trakea

Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) selanjutnya diguyur air deras pada bagian mulutnya untuk memastikan bahwa marmut sudah benar-benar tidak sadar. Pembedahan pada bagian leher, kemudian bagian trakea dipisahkan. Trakea yang telah diambil kemudian diletakan ke dalam cawan fiksasi yang telah diisi dengan larutan *buffer krebs* dan selanjutnya dibersihkan dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel. Setelah bersih, trakea dipotong-potong dengan arah melintang berlawanan arah diantara ruas-ruas cincin tulang rawan dengan panjang 6-7 cincin (sesuai panjang *organ bath* ukuran 20 mL). Bagian yang berhadapan dengan otot polos dipotong sedemikian rupa, sehingga jarak otot polos dengan kedua ujung potongan lebih kurang sama. Kedua ujung tulang rawan otot polos diikat dengan benang, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas organ bath dengan menggunakan bantuan benang dan cincin, serta ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser.

Uji Aktivitas Alkaloid Lada Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas alkaloid lada terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi otot polos trakea marmut menggunakan alat organ bath menggunakan konsentrasi 10 μ M dan 100 μ M. Pemberian

agonis histamin ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder *software LabScribe*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Larutan *Buffer Krebs*

Buffer Krebs terdiri dari dua formula, yaitu formula A dan formula B. Masing-masing formula memiliki komposisi yang berbeda. Formula A mengandung *Sodium chloride*, *Potassium chloride*, *Magnesium sulfate heptahydrate*, *Calcium chloride dihydrate*, *Sodium phosphate dihydrate* sedangkan formula B mengandung *Sodium bicarbonate*. Pembuatannya dilakukan dengan masing-masing formula dilarutkan ke dalam 1,0 L akuades terlebih dahulu selanjutnya masing-masing formula diambil 100 mL untuk dilarutkan ke dalam akuades 800 mL. Proses pencampuran kedua formula perlu diperhatikan, 100 mL formula B dilarutkan terlebih dahulu ke dalam akuades 800 mL selanjutnya 100 mL formula A dituangkan sedikit-sedikit ke dalam campuran awal selanjutnya ditambah glukosa 1 g, proses pelarutan dibantu oleh pengaduk magnet thermostat dengan suhu 0°C.

Penyiapan alat *organbath*

Satu set alat *organbath* terdiri dari *tranduser isotonic*, *bridge amplifier*, dan seperangkat komputer yang sudah terinstal *software LabScribe*. Masing-masing alat dihidupkan secara manual. Penyesuaian

keadaan fisiologis organ trakea marmut perlu diperhatikan yaitu pada pengaturan suhu diatur pada suhu 36,5-37,5°C karena supaya organ trakea masih tetap dalam keadaan hidup dan juga pemberian gas karbogen (95% O₂, 5% CO₂) mampu mempertahankan kondisi trakea dalam keadaan hidup selama proses pengambilan data selesai.

Penyiapan Larutan Alkaloid *Piper nigrum* Linn.

Larutan stok yang sudah tersedia dengan konsentrasi 2x10⁻² M, untuk Selanjutnya larutan stok alkaloid *Piper nigrum* Linn. 2x10⁻² M diencerkan menggunakan larutan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 2x10⁻³ M. Larutan 2x10⁻³M ditambahkan sebanyak 100 µL dan 1000 µL ke dalam organ bath yang telah berisi organ trakea dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum* Linn. konsentrasi 10µM dan 100 µM.

Penyiapan seri konsentrasi histamin

Histamin memiliki bobot molekul 184,1 g/mol. Larutan histamin dibuat sebagai larutan stok histamin konsentrasi 2x10⁻¹ M dalam akuades. untuk membuat larutan tersebut, histamin ditimbang 0,3682 g dan dilarutkan ke dalam 10,0 mL akuades. Pengenceran larutan stok histamin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok histamin 2x10⁻¹ M sampai

diperoleh larutan histamin seri konsentrasi 2x10⁻², 2x10⁻³, 2x10⁻⁴, 2x10⁻⁵, 2x10⁻⁶, 2x10⁻⁷, 2x10⁻⁸ M.

Uji Aktivitas Alkaloid Lada Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Tabel I. Pergeseran nilai pD₂ histamin karena pengaruh piperin 10 µM dan 100 µM

No	Kelompok Perlakuan	pD ₂ ± SEM	Emaks (%) ± SEM
1	Kontrol Histamin	4,08 ± 0,08	100 ± 0,00
2	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 10 µM	3,71 ± 0,06	80,05 ± 0,00
3	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 100 µM	2,58 ± 0,06*	84,38 ± 0,00

Keterangan : Nilai pD₂ disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM (n = 4 – 8). pD₂ merupakan parameter afinitas agonis terhadap reseptor H₁, SEM merupakan standar kesalahan rata-rata nilai pD₂, Emaks (%) menunjukkan persentase (%) efek maksimal yang dihasilkan oleh otot polos trakea terinduksi agonis reseptor H₁.

(Tabel I) menunjukkan adanya penurunan kemampuan histamin dalam memicu respon kontraksi otot polos trakea karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 10 µM dan 100 µM, keadaan tersebut juga ditandai dengan terjadinya penurunan nilai pD₂ histamin. Nilai pD₂ histamin untuk perlakuan kontrol, alkaloid lada 10 µM dan 100 µM berturut-turut adalah sebesar 4,08 ; 3,71 dan 2,58. Penurunan nilai pD₂ alkaloid lada dosis 100 µM bermakna secara statistic uji *One Way ANOVA* dan *LSD* (p<0,05) dan terbukti lebih efektif menghambat kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor histamin.

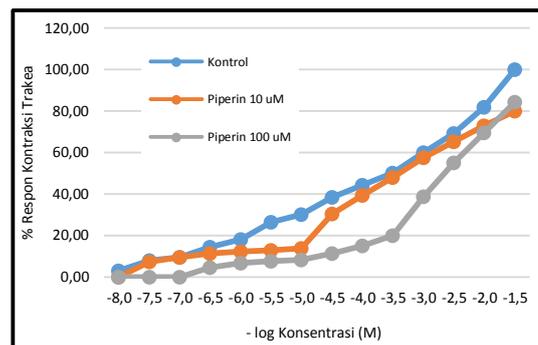
Tabel II. Uji Statistik *One-Way ANOVA* dengan LSD taraf kepercayaan 95%.

LSD	No.	Perlakuan	Sig.
	1	Kontrol Histamin	0,18
	2	Piperin 10 μ M	0,18
	3	Piperin 100 μ M	0,00*

Nilai signifikansi (Tabel II) tersebut menunjukkan bahwa piperin dengan kadar 100 μ M memiliki perbedaan paling signifikan yaitu 0,00. Penurunan nilai pD_2 histamin karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada membuktikan bahwa alkaloid lada memiliki efek antagonis terhadap reseptor H_1 otot polos trakea.

Hasil penelitian menunjukkan praperlakuan otot polos trakea dengan alkaloid lada 10 μ M dan 100 μ M, mampu mengurangi respon kontraksi otot polos trakea terisolasi yang diinduksi oleh histamin eksogen dengan pola tergantung konsentrasi. Hal tersebut dapat dilihat pada profil kurva (Gambar I) menunjukkan bahwa terjadi pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi histamin terhadap rata-rata persentase (%) respon kontraksi otot polos trakea terisolasi. Pergeseran kurva juga terlihat jelas pada puncak terakhir seri histamin, dengan hasil yang ditunjukkan pada puncak kontrol seri histamin tanpa perlakuan awal bisa mencapai 100 %, seri histamin yang diberi praperlakuan Alkaloid lada *Piper nigrum Linn.* 10 μ M hanya mencapai 80,05%, sedangkan seri histamin yang diberi praperlakuan Alkaloid lada

Piper nigrum Linn. 100 μ M hanya mencapai 84,38%.



Gambar I. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap persentase respon kontraksi otot polos trakea terisolasi baik tanpa atau dengan pemberian alkaloid lada 10 dan 100 μ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n=4-8).

Penetapan tipe antagonis alkaloid lada, dapat dilihat pada bentuk kurva hubungan konsentrasi histamin terhadap persentase (%) respon kontraksi otot polos trakea yang mengalami praperlakuan dengan alkaloid lada 10 dan 100 μ M. Antagonis non-kompetitif merupakan suatu antagonis yang dapat mengurangi efektifitas suatu agonis melalui mekanisme pengurangan afinitas pada reseptor yang dimana obat bekerja pada sel yang sama pada tempat yang berbeda atau penghambatan alosetrik.⁵

Interaksi senyawa antagonis dengan reseptor menyebabkan perubahan bentuk konformasi reseptor yang dapat menurunkan afinitas agonis sehingga efek yang ditimbulkan juga menurun. Hal ini berarti afinitas agonis dan antagonis terhadap reseptor sama tetapi aktivitas intrinsiknya

berbeda. Sifat antagonisme non-kompetitif ekstrak benalu teh menurunkan kontraksi atrium pada reseptor B₁ jantung berdasarkan hasil kurva slop tidak sejajar dan efek maksimal tidak sama.⁶

Penambahan konsentrasi agonis pada mekanisme jenis ini tidak mampu menggeser kedudukan antagonis dan mengatasi efek *blocking*-nya. Akibatnya, respon maksimal (*E_{max}*) tidak dapat mencapai 100% kembali. Hasil praperlakuan otot polos trakea dengan piperin tidak dapat mengembalikan respon kontraksi (*E_{max}*) menjadi 100%, sehingga tipe antagonisme piperin adalah antagonisme non-kompetitif.

Kesimpulan

Isolat alkaloid memiliki aktivitas antagonisme secara non-kompetitif setelah dilakukan uji *in vitro*, kadar piperin 100 µM (pD₂ = 2,58) lebih efektif daripada piperin kadar 10 µM (pD₂ = 3,71) dalam menghambat kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor histamin.

Saran

1. Untuk mengetahui efektifitas lanjutan dari penelitian ini, bisa dilakukan uji *in vivo* pada hewan uji untuk melengkapi data terkait mengenai efektifitas antikoninergik.

2. Terimakasih kepada Lembaga Penelitian, Publikasi dan Pengabdian Masyarakat Fakultas Universitas Muhammadiyah Yogyakarta atas dana penelitian unggulan Prodi Farmasi yang mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cragg, G. M., Newman D. J dan Weiss R. B. (1997) dalam Mans, Dennis R. A. 2013. From Forest to Pharmacy: Plant Based Traditional Medicines as Sources for Novel Therapeutic Compounds. *Academia Journal of Medicinal Plants* 1(6):101-110.
2. Wulandari, Heny, Zakiatulyaqin Dan Supriyanto. (2012). "Isolasi Dan Pengujian Bakteri Endofit Dari Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.) Sebagai Antagonis Terhadap Patogen Hawar Beludru (*Septobasidiumsp.*)" *Jurnal Perkebunan & Lahan Tropika* 2 no. 2, hal. 23.31
3. Madhavi, B. B., Nath, A. R., Banji, D., Madhu, M. N., Ramalingam, R., & Swetha, D. (2009). Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 156-161.
4. Bang, J. S., Choi, H. M., Sur, B. J., Lim, S. J., Kim, J. Y., Yang, H. I., ... & Kim, K. S. (2009). Anti-inflammatory and

antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis research & therapy*, 11(2), R49.

5. Amaliah, R. D. (2016). Uji Aktivitas Antagonisme Alkaloid Lada (*Piper nigrum L.*) pada Reseptor Histamin H1 Otot Polos Ileum Marmut Terisolasi : Studi *In Vitro* dan *In Silico*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
6. Mutschler Ernst. (1991). *Dinamika Obat*. Edisi 5. Penerjemah Mathilda B Widiyanto, Anna Setiadi Ranti. ITB. Bandung. hal 193-7.
7. Sudiwati, N. L. (2010). Efek Ekstrak daun *Scurulla oortiana* dari inang *Citrus maxima* (jeruk) dan *Camelia sinensis* (teh) pada kekuatan kontraksi atrium terpisah tikus. Skripsi. Malang.