

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan *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 aquades terlebih dahulu selanjutnya masing-masing formula diambil 100 mL untuk dilarutkan ke dalam aquades 800 mL. Proses pencampuran kedua formula perlu diperhatikan, 100 mL formula B dilarutkan terlebih dahulu ke dalam aquades 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. *Buffer Krebs* dipilih karena memiliki kandungan cairan yang hampir sama dengan cairan di dalam tubuh hewan uji.

B. 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.

C. Preparasi Organ Trakea Marmut

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.

D. Penyiapan Larutan Alkaloid *Piper nigrum* Linn.

Larutan stok yang sudah tersedia dengan konsentrasi 2×10^{-2} M, untuk Selanjutnya larutan stok alkaloid *Piper nigrum* Linn. 2×10^{-2} M diencerkan menggunakan larutan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 2×10^{-3} M. Larutan 2×10^{-3} M ditambahkan sebanyak 100 μ L dan 1000 μ L ke dalam organ bath yang telah berisi organ trakea dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum* Linn. konsentrasi 10 μ M dan 100 μ M. Dasar pemilihan kadar 10 μ M dan 100 μ M berdasarkan penelitian (Amaliah, 2016) yang sebelumnya telah melakukan optimasi kadar 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, dan 100 μ M pada otot polos ileum terisolasi yang diinduksi reseptor histamin. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa kadar 10 μ M dan 100 μ M memiliki nilai pD₂ yang lebih stabil diantara kadar lainnya.

E. Uji *In vitro* Aktivitas Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Penelitian yang dilakukan oleh (Bojjireddy *et al.*, 2014) piperin diketahui memiliki efek menghambat degranulasi pada kultur sel mast melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase*. Pengujian campuran ekstrak biji mengandung *Piper nigrum* L. menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin (Antony, 2010). Beberapa hasil penelitian ini, memungkinkan piperin juga memiliki mekanisme antihistamin dengan cara menghambat aktivasi dari reseptor H₁ yang berada pada otot polos trakea. Penelitian ini untuk membuktikan aktivitas antagonisme lada pada reseptor H₁ tersebut.

F. Uji Aktivitas Antagonisme Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Terhadap agonis reseptor H₁

Uji aktivitas alkaloid *Piper nigrum* Linn. terhadap agonis reseptor H₁ dilakukan untuk mengukur kontraksi trakea marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer krebs*, kemudian organ direndam dalam *organ bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrasi sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (Emaks) 100%.

Pengukuran kontraksi dilakukan dua kali, dimana antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer krebs* setiap lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian alkaloid *Piper nigrum* Linn. konsentrasi 10 µM dan 100 µM. Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam *organ bath* dengan konsentrasi bertingkat dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Kurva hubungan konsentrasi

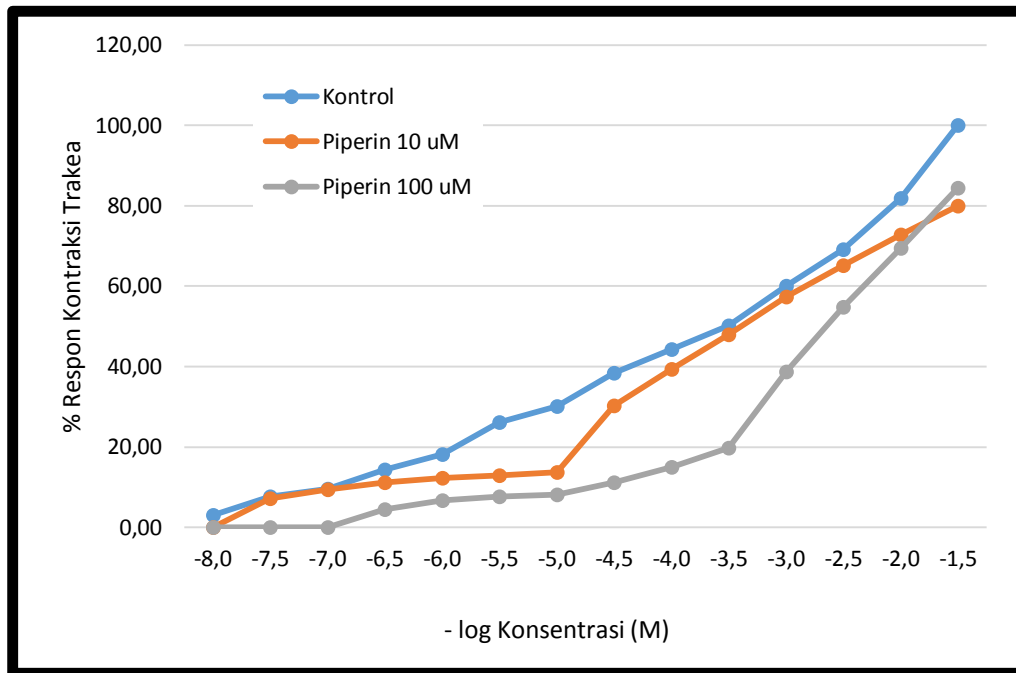
dan % respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* Linn. yang terjadi kemudian dibandingkan.

Alkaloid lada dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor H₁ apabila dapat mengurangi potensi histamin dalam menginduksi kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi.

G. Pengaruh Alkaloid Lada Terhadap Reseptor H₁ Otot Polos Trakea

Konsentrasi alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. yang digunakan dalam uji ini adalah 10 µM dan 100 µM. Pengaruh alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. terhadap reseptor H₁ diuji dengan mengamati perubahan profil kurva hubungan seri konsentrasi histamin dengan persentase respon kontraksi otot polos trakea terisolasi dalam media larutan *buffer krebs*. Piperin pada alkaloid lada diduga memiliki potensi sebagai antagonis reseptor H₁. Potensi tersebut dapat diukur dengan membandingkan nilai pD₂ histamin dengan dan tanpa praperlakuan alkaloid lada. Praperlakuan otot polos trakea dengan beberapa konsentrasi alkaloid lada harus dapat menurunkan nilai pD₂ histamin. Histamin dapat memicu kontraksi setelah berikatan dengan reseptor H₁ pada otot polos trakea. Pemberian konsentrasi bertingkat histamin eksogen mengakibatkan peningkatan % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi.

Puncak respon kontraksi otot polos trakea terisolasi 100 % tercapai pada pemberian histamin eksogen 3×10^{-4} M.



Gambar 7. 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).

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 7) 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%. Hal tersebut menunjukkan adanya penurunan kemampuan histamin dalam memicu respon

kontraksi otot polos trakea karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada 10 μM dan 100 μM , keadaan tersebut juga ditandai dengan terjadinya penurunan nilai pD2 histamin (Tabel 3). 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 1. Pergeseran nilai pD2 histamin karena pengaruh alkaloid lada 10 μM dan 100 μM .

No	Kelompok Perlakuan	pD2 \pm SEM	Emaks (%) \pm SEM
1	Kontrol Histamin	4,08 \pm 0,08	100 \pm 0,00
2	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 10 μM	3,71 \pm 0,06	80,05 \pm 0,00
3	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 100 μM	2,58 \pm 0,06*	84,38 \pm 0,00

Keterangan : Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 4 - 8$).

pD2 merupakan parameter afinitas agonis terhadap reseptor H_1 , SEM merupakan standar kesalahan rata-rata nilai pD2, Emaks (%) menunjukkan persentase (%) efek maksimal yang dihasilkan oleh otot polos trakea terinduksi agonis reseptor H_1 .

Berdasarkan (Tabel 4) setelah dilakukan uji statistik *One-Way ANOVA* dengan *LSD* taraf kepercayaan 95% didapatkan nilai signifikansi kontrol histamin, piperin 10 μM dan piperin 100 μM berturut-turut adalah 0,18 ; 0,18 ; 0,00.

Tabel 4. Uji Statistik *One-Way ANOVA* dengan *LSD* taraf kepercayaan 95%.

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

Nilai signifikansi tersebut menunjukkan bahwa piperin dengan kadar 100 μM memiliki perbedaan paling signifikan dengan kontrol histamin maupun piperin kadar 10 μM 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. 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 μM . 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 (Mutschler,1991).

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 B_1 jantung berdasarkan hasil kurva slop tidak sejajar dan efek maksimal tidak sama (Sudiwati, 2010). 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.