

UJI *IN VITRO* EFEK ANTAGONISME PIPERIN (SENYAWA AKTIF *Piper nigrum* Linn.) PADA TRAKEA MARMUT TERISOLASI DIINDUKSI *Acetyl- β -Methylcholine*

Ilham Perdana, Puguh Novi Arsito

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
Email: puguh.arsito@gmail.com

INTISARI

Piperin merupakan suatu senyawa alkaloid yang terdapat pada tanaman lada (*Piper nigrum* Linn.). Beberapa penelitian mengenai senyawa alkaloid menunjukkan bahwa senyawa alkaloid memiliki spesifitas terhadap reseptor muskarinik. Reseptor asetilkolin muskarinik 3 (*AChM₃*) banyak terdapat pada saluran pernafasan. Reseptor *AChM₃* berperan dalam proses kontraksi saluran pernafasan pada penderita asma. Piperin diprediksi memiliki pengaruh terhadap reseptor asetilkolin pada aktivitas kontraksi otot polos saluran pernafasan.

Penelitian dilakukan secara *in vitro* menggunakan trakea marmut terisolasi yang diinduksi *Acetyl- β -Methylcholine*. Hasil dari penelitian dilakukan dengan mengukur nilai pD₂ dan kurva hubungan antara persentase respon kontraksi dengan logaritma konsentrasi *Acetyl- β -Methylcholine*. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa piperin memiliki aktivitas pada reseptor asetilkolin muskarinik 3 (*AChM₃*).

Kata kunci: Piperin, *in vitro*, isolasi organ, reseptor *AChM₃*

1. PENDAHULUAN

Lada (*Piper nigrum* Linn.) merupakan tanaman dengan genus *piper* dan family *piperacea* (Tjitrosoepomo, 2004). Suatu senyawa alkaloid yang banyak ditemukan pada tanaman *Piper nigrum* Linn. adalah piperin (Vasavirama & Upender, 2014). Kandungan alkaloid piperin pada tanaman lada sebesar 3-9% (Madhavi *et*

al., 2009). Senyawa alkaloid piperin mudah larut pada klorofom, metanol dan etanol, tetapi tidak larut pada air (Kolhe *et al.*, 2011).

Asma merupakan suatu keadaan inflamasi kronis saluran nafas yang bersifat reversibel, baik dengan pengobatan atau tanpa pengobatan. Terjadinya asma ditandai dengan penyempitan saluran pernafasan.

Penanda utama asma selain akibat inflamasi adalah kontraksi otot polos pada bronkus. Kontraksi otot polos bronkus diperantarai oleh aktivitas saraf simpatik dan parasimpatik dengan reseptor asetilkolin muskarinik 3 (*AChM₃*) yang bertindak sebagai reseptor utama (Ikawati, 2015). Aktivasi reseptor asetilkolin muskarinik 3 pada protein G menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler.

Beberapa penelitian yang sudah pernah dilakukan untuk meneliti hubungan pengobatan inflamasi kronis saluran nafas dengan reseptor asetilkolin muskarinik diantaranya oleh John T. Fisher dkk. (2004) tentang pengaruh asetilkolin muskarinik *M₃* dan *M₂* pada bronkokonstriksi dan Reinoud Gosens dkk. (2006) tentang pengaruh reseptor muskarinik pada asma dan Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa alkaloid piperin terhadap kontraksi relaksasi otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi oleh agonis *acetyl-β-methylcholine*. Pengujian dilakukan menggunakan metode *in vitro* menggunakan organ trakea terisolasi.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorium dengan metode *in vitro* menggunakan organ trakea marmut terisolasi.

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi satu set alat preparasi organ, pengaduk magnet thermostat, transduser isotonik (Ugo Basile[®]), *software* rekorder *Labscribe*[®], dua set *chamber organ bath* volume 20 mL (Ugo Basile[®]), *bridge amplifier* (Ugo Basile[®]), pipet mikro 200 µL, 1000 µL (Eppendorf[®]).

Bahan yang digunakan penelitian ini adalah piperin yang diisolasi dari buah *Piper nigrum*. Hewan uji menggunakan marmut jantan dengan berat badan antara 400 – 500 gram. Bahan kimia menggunakan larutan *buffer krebs*, gas karbogen (terdiri dari 95% oksigen dan 5% karbon dioksida, yang diperoleh dari PT. Putra Kembar Refill Oxygen, Condong Catur, Yogyakarta), *Acetyl-β-Methylcholine* (Sigma Aldrich[®]), Aquades (diperoleh dari Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta).

2.2. Tahap Persiapan

Tahap persiapan terdiri dari beberapa penyiapan meliputi penyiapan

larutan *buffer krebs* yang digunakan sebagai pengganti cairan fisiologis organ, pembuatan larutan piperin, larutan *Acetyl- β -Methylcholine* dan preparasi organ trakea marmut. Pembuatan larutan *buffer krebs* dilakukan dengan melarutkan NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaHPO₄ dan NaHCO₃ (Vogel, 2002). Isolat Piperin dibuat larutan baku dengan konsentrasi 2x10⁻¹M. Isolat piperin dilarutkan dengan pelarut DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*). Pembuatan stok larutan *Acetyl- β -Methylcholine* dengan konsentrasi 2x10⁻¹M menggunakan aquades. Kemudian dari konsentrasi stok larutan dibuat larutan baku dengan konsentrasi 2x10⁻²M, 2x10⁻³M, 2x10⁻⁴M, 2x10⁻⁵M, 2x10⁻⁶M, 2x10⁻⁷M, 2x10⁻⁸M.

Preparasi organ trakea dilakukan dengan cara mengambil trakea pada marmut sepanjang 2 cm kemudian dilakukan pembersihan dari jaringan yang masih menempel (jaringan lemak). Trakea dimasukkan kedalam *chamber organ bath* dan salah satu ujungnya terikat pada transduser yang berfungsi sebagai pembaca respon.

2.3. Uji *In Vitro*

Chamber organ bath diisi dengan larutan *buffer krebs* sebanyak 20 mL. Kemudian dilakukan ekuilibrasi organ sampai diperoleh kondisi stabil. Tahap pengujian awal organ trakea dilakukan dengan pemberian konsentrasi agonis *Acetyl- β -Methylcholine* 2x10⁻²M untuk mencapai kontraksi maksimum yang dihasilkan oleh organ trakea. Respon kontraksi terekam pada *software labscribe*[®].

Setelah kontraksi maksimum organ tercapai, dilakukan pencucian organ dengan menggunakan larutan *buffer krebs* selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer krebs* setiap 5 menit. Kemudian, dilakukan pemberian seri konsentrasi kumulatif agonis dari konsentrasi 2x10⁻⁸M sampai konsentrasi 2x10⁻²M. Setelah diperoleh respon kontraksi kemudian dilakukan pencucian organ kembali selama 30 menit dengan pergantian *buffer krebs* setiap 5 menit. Kemudian setelah dilakukan pencucian selama 30 menit, 10 μ M larutan piperin ditambahkan pada *organ bath* yang berisi organ trakea dan dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi kumulatif agonis *Acetyl- β -Methylcholine*.

2.4. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa respon kontraksi yang terekam pada *software labscribe*[®]. Data tersebut dirubah kedalam bentuk % (persentase) respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap % (persentase) respon kontraksi.

Nilai konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum pada agonis reseptor (EC_{50}) dengan atau tanpa pengaruh dari piperin dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon EC_{50} . Nilai EC_{50} dihitung berdasarkan persamaan 1. Selanjutnya, nilai dari EC_{50} dirubah menjadi nilai $-\text{Log } EC_{50}$ yang berarti merupakan nilai $pD2$ (persamaan 3). Data yang didapatkan kemudian disajikan kedalam tabel kelompok perlakuan dan nilai rata-rata $pD2$ agonis \pm *Standard Error* ($pD2 \pm SE$). Tabel kelompok perlakuan agonis merupakan data dengan atau tanpa pengaruh piperin.

Persamaan 1 :

$$\text{Log } EC_{50} = \left[\frac{50-y_1}{y_2-y_1} x (x_2 - x_1) \right] + x_1$$

Keterangan :

X1 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat dibawah 50%

X2 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat diatas 50%

Y1 = % respon tepat dibawah 50%

Y2 = % respon tepat diatas 50%

Persamaan 2 :

$$pD2 = -\log EC_{50}$$

Piperin ditetapkan sebagai antagonis reseptor asetilkolin apabila inkubasi otot polos trakea marmut terisolasi dengan piperin mengakibatkan penurunan nilai $pD2$ *acetyl- β -methylcholine*. Uji normalitas menggunakan metode *shapiro-wilk* untuk mengetahui kenormalan sebaran distribusi data nilai $pD2$ *acetyl- β -methylcholine*. Penurunan nilai $pD2$ dianalisis dengan metode statistik parametrik menggunakan uji *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan LSD dengan taraf kepercayaan 95%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji *in-vitro* dengan metode isolasi organ digunakan untuk mengetahui efek

kontraksi dan relaksasi dari suatu organ. *Acetyl- β -Methylcholine* yang merupakan senyawa analog dari asetilkolin digunakan sebagai agonis karena memiliki sifat menstimulasi muskarinik dan menyebabkan penyempitan otot polos bronkus (Birnbaum & Barreiro, 2007). Kontraksi terjadi akibat dari rangsangan elektrik, rangsangan kimia dan rangsangan mekanik. Kontraksi akibat rangsangan kimia seperti hormon dan neurotransmitter yang mengikat reseptor mengakibatkan aktifnya jalur persinyalan yang mengarah pada kontraksi tanpa menyebabkan adanya depolarisasi (Vetterkind & Morgan, 2012). Rangsangan kimiawi reseptor M₃ oleh asetilkolin menyebabkan kontraksi otot saluran pernafasan. Reseptor terikat protein G diaktivasi oleh rangsangan kimiawi dan mekanik. Aktivasi protein Gq (bagian dari protein G) menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas fosfolipase C. Peningkatan aktivitas fosfolipase C memicu pembentukan IP₃ dan pelepasan Ca²⁺ intraseluler. Pelepasan Ca²⁺ intraseluler akan berikatan dengan *Calmodulin* dan menyebabkan *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK) aktif. Pengaktifan

MLCK memicu terjadinya fosforilasi *Myosin Light Chain* dan meningkatnya kontraksi otot polos. Penelitian ini menggunakan agonis *Acetyl- β -Methylcholine*.

Data yang akan diperoleh dari uji adalah kurva hubungan antara persentase respon kontraksi dengan seri konsentrasi agonis. Perbandingan nilai pD₂ *Acetyl- β -Methylcholine* dengan dan tanpa pemberian piperin digunakan untuk mengukur nilai antagonisme yang dihasilkan, semakin kecil nilai pD₂ maka semakin kecil kontraksi yang dihasilkan oleh kontraksi organ. Perlakuan pemberian alkaloid piperin harus dapat menurunkan nilai dari kontraksi *acetyl- β -methylcholin*.

Tipe antagonisme yang dimiliki piperin ditunjukkan oleh bentuk kurva hubungan antara konsentrasi agonis *Acetyl- β -Methylcholine* dengan persentase respon kontraksi. Menurut Nugroho (2014), antagonisme bersifat kompetitif apabila antagonis mengikat tempat ikatan agonis pada reseptornya secara reversibel, dan efek tersebut dapat digeser oleh pemberian agonis pada dosis yang tinggi. Antagonis kompetitif menghambat efek farmakologi agonis

dengan berinteraksi secara reversibel sehingga kurva kembali ke kondisi 100%. Hasil kurva hubungan antara konsentrasi agonis dengan persentase respon kontraksi tidak mampu kembali ke kondisi 100% pada antagonis nonkompetitif.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian *in vitro*, maka dapat disimpulkan bahwa piperin memiliki aktivitas pada reseptor asetilkolin muskarinik 3 (*AChM₃*).

5. SARAN

Perlu dilakukan penelitian secara *in vitro* mengenai uji aktivitas piperin menggunakan dosis yang bervariasi, sehingga didapatkan data yang lebih lengkap mengenai aktivitas piperin dengan target reseptor asetilkolin.

6. REFERENSI

- Birnbaum, S. and Barreiro, T.J., (2007). Methacholine challenge testing: identifying its diagnostic role, testing, coding, and reimbursement. *CHEST Journal*, 131(6), pp.1932-1935
- Fisher, J.T., Vincent, S.G., Gomeza, J., Yamada, M. and Wess, J., (2004). Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors, *The FASEB Journal*, 18(6), pp.711-713
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H. and Halayko, A.J., (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respiratory research*, 7(1), p.73
- Ikawati Z. (2015). *Farmakologi Molekuler: Target Aksi Obat dan Mekanisme Molekulernya*. Gadjah Mada University Press:Yogyakarta
- Kolhe, S. R., Borole, P., & Patel, U. (2011). Extraction and evaluation of piperine from piper nigrum linn. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, Vol:2 Issue 2, ISSN 0976-4550
- 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, 156-161.
- Nugroho, A.E. (2014). *Prinsip Aksi & Nasib Obat dalam Tubuh*. Pustaka Pelajar:Yogyakarta
- Tjitrosoepomo, G., (2004). Taksonomi Tumbuhan (spermatophyta), Cetakan ke delapan. UGM Press. hal. 244.
- Vasavirama, K., & Upender, M. (2014). Piperine: a Valuable Alkaloid from

Piper Species. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(4), 34-38.

Vetterkind, S., Morgan, K.G. (2012). Regulation of Smooth Muscle Contraction. In Hill Joseph (Eds.), *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease* (pp.1173-1180). Canada: Elsevier

Vogel, G.H., (2002). *Drug Discovery and Evaluation*, Second Ed., 31 -32, Springer-Verlag Berlin