

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Aktivitas Piperin

Studi perkembangan ilmu modern mengenai sel, hewan dan manusia, piperin memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antikarsinogenik, antiinflamasi, antiasma dan modulasi imun (Meghwal & Goswami, 2013). Alkaloid lada (*Piper nigrum* Linn.) mampu menghambat kontraksi dari otot polos ileum marmut yang diinduksi oleh agonis asetilkolin (Mutiara, 2012). Reseptor *Ach-3* merupakan reseptor asetilkolin yang berikatan pada protein Gq yang bertanggung jawab pada pengaturan motilitas otot polos saluran pencernaan (Arsito, 2013). Selain itu reseptor asetilkolin juga berperan dalam kontraksi otot polos bronkus (Ikawati, 2008). Berdasarkan hal tersebut, piperin diduga memiliki aktivitas relaksasi terhadap otot polos organ trakea yang diinduksi oleh *acetyl-β-methylcholine*.

Uji *in-vitro* dengan metode isolasi organ digunakan untuk mengetahui efek dari kontraksi dan relaksasi dari suatu organ. Penggunaan *buffer krebs* pada penelitian ini digunakan sebagai pengganti cairan fisiologis organ. Penggunaan *buffer krebs* dalam jangka waktu lama dapat berpengaruh buruk terhadap organ, karena larutan *buffer krebs* tidak sepenuhnya sama dengan cairan fisiologis (Anas, 2011). Biasanya 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 M_3 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 IP_3 dan pelepasan Ca^{2+} intraseluler. Pelepasan Ca^{2+} 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*. *Acetyl- β -Methylcholine* merupakan senyawa analog dari asetilkolin yang menstimulasi muskarinik dan menyebabkan penyempitan otot polos bronkus (Birnbaum & Barreiro, 2007). Agonis yang disuntikkan pada trakea akan memacu terjadinya kontraksi otot polos.

Pengujian piperin yang diduga memiliki efek antagonisme reseptor asetilkolin dilakukan menggunakan dosis 10 μ M dan 50 μ M. Data yang akan diperoleh dari uji adalah kurva hubungan antara persentase respon kontraksi dengan seri konsentrasi *acetyl- β -methylcholine*. Perbandingan nilai pD_2 *acetyl- β -methylcholine* dengan dan tanpa pemberian piperin digunakan untuk mengukur nilai antagonisme yang dihasilkan, semakin kecil nilai pD_2 maka semakin kecil kontraksi yang dihasilkan oleh kontraksi organ. Perlakuan pemberian alkaloid piperin harus dapat menurunkan nilai dari kontraksi *acetyl- β -methylcholine*. Jika diketahui antagonis yang dihasilkan adalah antagonis

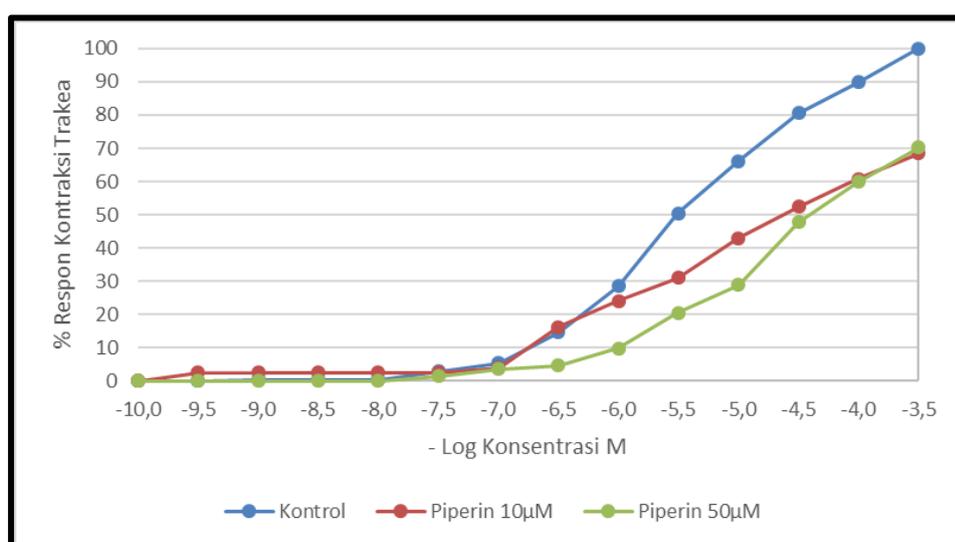
kompetitif, maka selanjutnya dilakukan pengukuran nilai parameter antagonis (pA₂) piperin terhadap asetilkolin menggunakan metode *schild-plot*.

Tabel 1. Pergeseran Nilai pD₂ *acetyl-β-methylcholine* karena Pengaruh Piperin 10 μM dan 50 μM

No	Kelompok Perlakuan	pD ₂	Cmaks (%) ± SEM
1	Kontrol	5,50 ± 0,09	100 ± 0,00
2	Piperin 10 μM	4,67 ± 0,08*	68,49 ± 4,22
3	Piperin 50 μM	4,41 ± 0,07*	70,28 ± 5,60

Keterangan : Nilai pD₂ disajikan dalam bentuk rata – rata ± SEM (n= 4-7). Analisa ANOVA satu jalan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada *acetyl-β-methylcholine* /kontrol (*)

Hasil pengukuran nilai pD₂ menunjukkan penurunan nilai pD₂, hal ini menunjukkan telah terjadi penurunan respon kontraksi pada pemberian piperin dosis 10 μM dan 50 μM. Hal ini membuktikan bahwa piperin memiliki efek antagonis terhadap reseptor asetilkolin otot polos trakea. Untuk mengetahui tipe antagonis yang dihasilkan dapat dilihat pada bentuk kurva hubungan antara hubungan konsentrasi *acetyl-β-methylcholine* dengan persentase respon kontraksi.



Gambar 1. Kurva hubungan logaritma konsentrasi *Acetyl-β-Methylcholine* (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea

marmut terisolasi, dengan dan tanpa pemberian piperin 10 μ M dan 50 μ M. Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri *acetyl- β -methylcholine* (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n= 4-7).

Hasil kurva hubungan antara konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* dengan persentase respon kontraksi menunjukkan bahwa pemberian piperin dosis 10 μ M dan 50 μ M mampu mengurangi respon kontraksi otot polos organ trakea terisolasi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi dengan rata-rata persentase respon kontraksi ke arah kanan. Perlakuan dengan piperin dosis 10 μ M dan 50 μ M tidak mampu mengembalikan respon kontraksi ke kondisi 100%. Pemberian piperin dosis 10 μ M hanya mencapai respon kontraksi sebesar 68,49% dan pemberian piperin dosis 50 μ M mencapai 70,28%. Pergeseran kurva ke arah bawah menunjukkan tipe antagonisme piperin pada *acetyl- β -methylcholine* bersifat nonkompetitif. Respon kontraksi maksimal (100%) tidak tercapai dan kurva cenderung menurun.

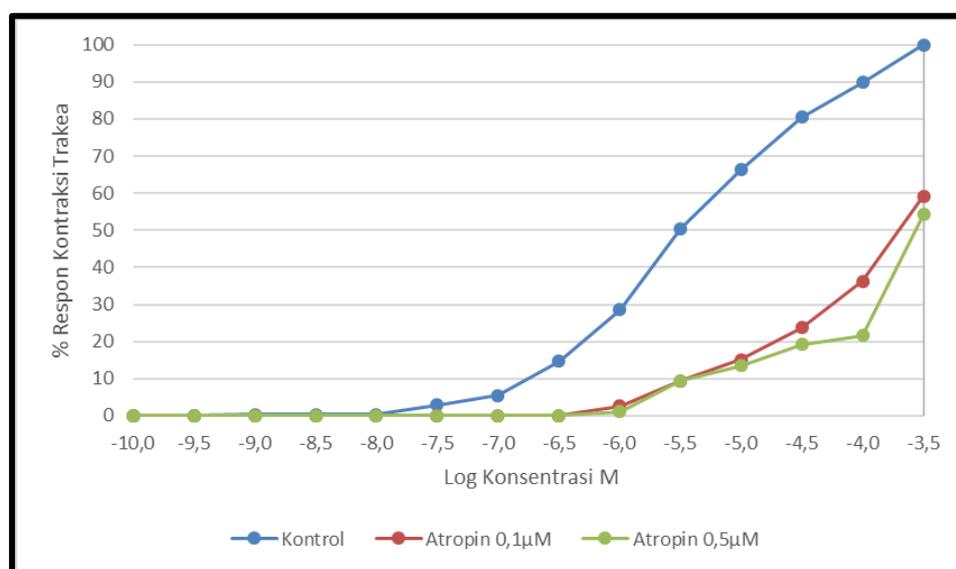
B. Uji Aktivitas Atropin

Antagonis antikolinergik memiliki aktivitas pada asetilkolin dan selektif terhadap reseptor asetilkolin. Proses kontraksi otot terjadi akibat meningkatnya Ca^{2+} didalam intrasel. Peningkatan Ca^{2+} juga berkaitan dengan meningkatnya fosfolipase C yang diaktivasi oleh reseptor asetilkolin muskarinik 3. Selektifitas antagonis antikolinergik diperlukan untuk menghentikan efek yang ditimbulkan dari reseptor asetilkolin dalam meng-

aktivasi fosfolipase C. Dengan inaktivasi fosfolipase C menyebabkan kadar Ca^{2+} intraseluler tidak terjadi peningkatan.

Atropin merupakan suatu senyawa alkaloid *prototype* antikolinergik yang dihasilkan dari tanaman *Atropa belladonna* dan memiliki efek antagonis kompetitif reseptor antagonis muskarinik (Gray & Ray, 2014). Atropin diketahui memiliki efek bronkodilatasi (Lullman *et al.*, 2000).

Pengujian atropin dilakukan dengan menggunakan dosis 0,1 μM dan 0,5 μM . Diperoleh data penelitian seperti pada pengujian piperin, yaitu kurva hubungan antara persentase respon kontraksi dengan seri konsentrasi *acetyl- β -methylcholine*.



Gambar 2. Kurva hubungan log konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi, dengan dan tanpa pemberian atropin 0,1 μM dan 0,5 μM . Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri *acetyl- β -methylcholine* (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n= 4-7).

Hasil dari kurva hubungan persentase respon kontraksi dengan konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* menunjukkan bahwa perlakuan terhadap

trakea marmut yang diberi atropin dosis 0,1 μM dan 0,5 μM terjadi pengurangan respon kontraksi. Pergeseran kurva kekanan dan kebawah menunjukkan adanya proses pengurangan kontraksi yang terjadi. Penurunan kurva akibat pemberian atropin dosis 0,1 μM dan 0,5 μM menandakan respon kontraksi yang terjadi pada perlakuan otot polos trakea tidak mampu kembali pada posisi maksimum. Pemberian atropin dosis 0,1 μM memberikan respon kontraksi otot polos trakea sebesar 59,29% dan pada pemberian atropin dosis 0,5 μM hanya mampu memberikan respon akhir sebesar 54,17%. Respon kontraksi otot polos trakea tidak mampu kembali ke posisi maksimum akibat pemberian atropin menunjukkan bahwa efek yang timbul merupakan antagonis nonkompetitif.

Menurut Kenakin (2014), antagonis nonkompetitif merupakan antagonis yang berikatan dengan reseptor yang mampu memberikan efek secara fungsional melalui penghindaran agonis dan mekanisme biokimia lain. Ikatan antara antagonis dan reseptor dapat menghilangkan efek agonis dan mengurangi respon yang timbul akibat agonis. Kondisi ini tidak ada penambahan jumlah agonis yang dapat membalikkan efek antagonis nonkompetitif. Ciri dari antagonis nonkompetitif adalah efek yang didapatkan terhadap respon agonis maksimal. Penurunan respon maksimal tidak terjadi jika terdapat cadangan reseptor (Kenakin 2014).

Selain data kurva hubungan persentase respon kontraksi dengan konsentrasi *acetyl- β -methylcholine*, pengujian aktivitas atropin dilakukan pengukuran nilai pD₂. Nilai pD₂ digunakan untuk mengukur nilai antagonisme

yang dihasilkan. Semakin kecil kontraksi yang dihasilkan dari kontraksi otot polos trakea, akan didapatkan nilai pD2 yang rendah. Atropin yang merupakan salah satu *prototype* obat antikolinergik yang bekerja dengan mekanisme penghambatan dan selektif pada reseptor muskarinik harus dapat menurunkan nilai kontraksi maksimum yang dihasilkan akibat induksi dari *acetyl-β-methylcholine*. Berdasarkan hasil dari kurva hubungan persentase respon kontraksi dengan konsentrasi *acetyl-β-methylcholine* menunjukkan bahwa antagonis yang terjadi merupakan antagonis nonkompetitif, maka pengukuran nilai antagonisme hanya diukur dari nilai pD2 tanpa menggunakan pengukuran metode antagonis *Schild-plot*.

Tabel 2. Pergeseran nilai pD2 *acetyl-β-methylcholine* karena pengaruh atropin 0,1μM dan 0,5μM

No	Kelompok Perlakuan	pD2 ± SEM	Cmaks (%) ± SEM
1	Kontrol	5,50 ± 0,09	100 ± 0,00
2	Atropin 0,1 μM	3,75 ± 0,05*	59,29 ± 3,14
3	Atropin 0,5 μM	3,57 ± 0,02*	54,17 ± 2,64

Keterangan : Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata – rata ± SEM (n= 4 -7). Analisa ANOVA satu jalan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada *acetyl-β-methylcholine* /kontrol (*)

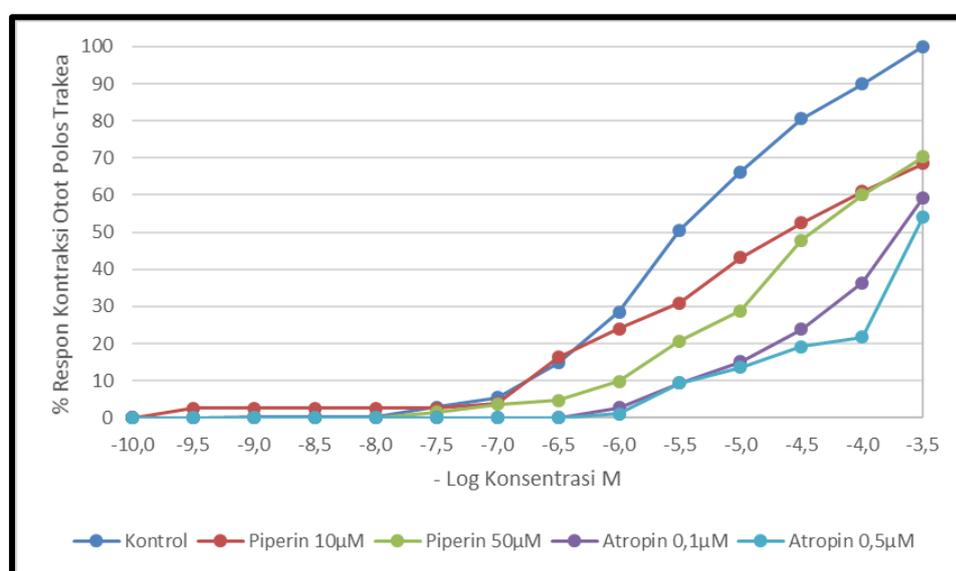
Hasil dari pengukuran nilai pD2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan nilai pada masing – masing kelompok perlakuan. Penurunan nilai pD2 menandakan bahwa terjadi penurunan respon kontraksi akibat pemberian atropin dosis 0,1μM dan 0,5μM.

C. Perbandingan Hasil Uji Aktivitas Piperin dan Aktivitas Atropin

Perbandingan hasil uji aktivitas piperin dan aktivitas atropin dilakukan untuk memastikan ketepatan metode yang digunakan pada uji aktivitas piperin.

Metode yang digunakan antara uji aktivitas piperin dan uji aktivitas atropin adalah sama. Metode yang digunakan valid jika hasil pengujian aktivitas atropin menunjukkan bahwa atropin mampu menunjukkan sebagai antagonis *acetyl- β -methylcholine*. Selain untuk mengetahui ketepatan metode, perbandingan uji aktivitas piperin dan aktivitas atropin juga dapat digunakan untuk mengetahui apakah piperin memiliki efek yang sama dengan atropin. Menurut Al-Badr dan Muhtadi (1985), atropin juga digunakan sebagai terapi pada asma. Atropin direkomendasikan secara klinis sebagai bronkodilator antikolinergik yang diberikan secara inhalasi (Cattapan dan Gross, 2002).

Perbandingan hasil uji aktivitas piperin dan aktivitas atropin dilakukan dengan cara membandingkan masing – masing kurva hubungan persentase respon kontraksi dengan konsentrasi *acetyl- β -methylcholine*.



Gambar 3. Kurva hubungan log konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi, dengan dan tanpa pemberian piperin dan atropin. Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri *acetyl- β -methylcholine* (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n= 4-7)

Hasil pada kurva hubungan persentase respon kontraksi dengan konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* menunjukkan pergeseran kurva ke arah kanan dan ke bawah pada masing – masing perlakuan. Kurva yang dihasilkan pada perlakuan kontrol menggambarkan bentuk respon kontraksi maksimal dari otot polos trakea marmut terisolasi dengan nilai 100%. Respon kontraksi mulai terlihat pada pemberian *acetyl- β -methylcholine* konsentrasi 3×10^{-8} M dan terus terjadi kenaikan kurva sampai respon maksimal pada pemberian *acetyl- β -methylcholine* konsentrasi 3×10^{-4} M. Kurva perlakuan piperin dengan dosis $10 \mu\text{M}$ menunjukkan respon kontraksi mulai terlihat naik pada pemberian *acetyl- β -methylcholine* dengan konsentrasi 10^{-7} M dan terus naik sampai pada pemberian konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* 3×10^{-4} M. Naiknya respon kontraksi yang terjadi pada rentang konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* tersebut masih berada dibawah respon kontraksi maksimal yang dihasilkan oleh perlakuan kontrol, hal tersebut mengakibatkan kurva menjadi bergeser kebawah. Pergeseran kurva kebawah menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dihasilkan oleh otot polos trakea. Perlakuan piperin dosis $50 \mu\text{M}$ terjadi sedikit pergeseran kurva dibawah kurva dengan perlakuan piperin $10 \mu\text{M}$. Pergeseran kurva yang terjadi menunjukkan bahwa piperin dengan dosis $50 \mu\text{M}$ juga mampu menurunkan respon kontraksi.

Kurva perlakuan atropin dosis $0,1 \mu\text{M}$ tidak terlihat respon kontraksi pada pemberian agonis *acetyl- β -methylcholine* dengan konsentrasi 10^{-7} M, dimana pada titik konsentrasi ini sudah terlihat adanya kenaikan respon kontraksi pada perlakuan kontrol, piperin dosis $10 \mu\text{M}$ dan piperin dosis 50

μM . Respon kontraksi mulai terlihat pada pemberian konsentrasi agonis *acetyl- β -methylcholine* 10^{-6} M. Respon kontraksi pada titik ini sebesar 2,68%, lebih rendah daripada nilai respon kontraksi perlakuan kontrol, piperin $10 \mu\text{M}$ dan piperin $50 \mu\text{M}$ di titik konsentrasi agonis yang sama. Respon kontraksi pada titik konsentrasi yang sama pada piperin $10 \mu\text{M}$ sebesar 24,06% dan piperin $50 \mu\text{M}$ sebesar 9,80% . Selanjutnya respon kontraksi naik secara bertahap pada pemberian konsentrasi *acetyl- β -methylcholine* berikutnya. Secara keseluruhan, kenaikan respon kontraksi pada perlakuan atropin dosis $0,1 \mu\text{M}$ memiliki nilai respon dibawah respon kontraksi perlakuan kontrol, piperin $10 \mu\text{M}$ dan piperin $50 \mu\text{M}$. Kurva pada atropin $0,5 \mu\text{M}$ menunjukkan penurunan nilai persentase respon kontraksi otot polos dibawah nilai respon persentase kontraksi yang dihasilkan akibat pemberian atropin $0,1 \mu\text{M}$. Perlakuan piperin dan atropin sama – sama mampu menurunkan respon kontraksi otot polos trakea marmut yang diinduksi *acetyl- β -Methylcholine*.

Penelitian terhadap piperin yang pernah dilakukan oleh Mutiara (2016) terhadap reseptor asetilkolin pada organ ileum marmut dengan menggunakan agonis aetilkolin menunjukkan bahwa jenis antagonisme piperin merupakan antagonisme kompetitif. Hasil tersebut memiliki perbedaan hasil dengan penelitian ini, pada penelitian ini berdasarkan bentuk kurva yang didapatkan, terlihat bahwa antagonisme piperin membentuk kurva antagonis nonkompetitif. Perbedaan tersebut juga terjadi pada kontrol positif atropin yang menunjukkan hasil bentuk kurva antagonisme nonkompetitif. Menurut

Patocka dan Jelivonka (2017), atropin merupakan antagonis yang bersifat kompetitif terhadap reseptor asetilkolin muskarinik.

Perbedaan pada hasil ini mungkin disebabkan karena terjadinya kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan bisa terjadi akibat perbedaan lingkungan fisiologis. Menurut Anas (2011), larutan *buffer krebs* tidak sepenuhnya sama dengan cairan fisiologis dalam tubuh, sehingga penggunaan dalam jangka waktu yang lama dapat berpengaruh terhadap jaringan. Kerusakan jaringan juga dapat terjadi selama proses pembedahan. Beberapa penelitian mengenai antagonisme fisiologis, kurva hubungan antara dosis dengan respon memiliki bentuk yang mirip dengan kurva nonkompetitif, jika bentuk kurva hubungan dosis dengan respon tidak paralel, mungkin terdapat dua reseptor atau satu reseptor yang telah dirubah menjadi bentuk ireversibel (Tallarida dan Jacob, 1979).

Penentuan sifat antagonisme fisiologis memiliki peran dalam penentuan langkah terapi. Menurut Katzung (1997), antagonisme kompetitif memiliki dua peran penting dalam proses terapeutik diantaranya:

1. Kekuatan hambatan antagonis kompetitif tergantung pada konsentrasi antagonis. Lama kerja obat tergantung pada konsentrasi dalam plasma dan sangat dipengaruhi kecepatan metabolisme dan ekskresinya.
2. Menetapkan sumber lain yang penting dari keanekaragaman dalam respon klinik terhadap antagonis kompetitif, penentuan dosis harus mempertimbangkan perubahan yang mungkin terjadi pada peningkatan agonis endogen.

Antagonis nonkompetitif tidak bekerja berdasarkan kecepatan eliminasi tetapi berdasarkan kecepatan pergantian molekul pada reseptor (Katzung, 1997).