

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Lada

1. Uraian Tanaman

Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Divisio	: Spermatophyta (menghasilkan biji)
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Piperales
Genus	: Piper
Family	: <i>Piperaceae</i>
Species	: <i>Piper nigrum</i> Linn (Tjitrosoepomo, 2004)



Gambar 1. Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.)
(Rudi T Setiyono *et al.*, 2014)

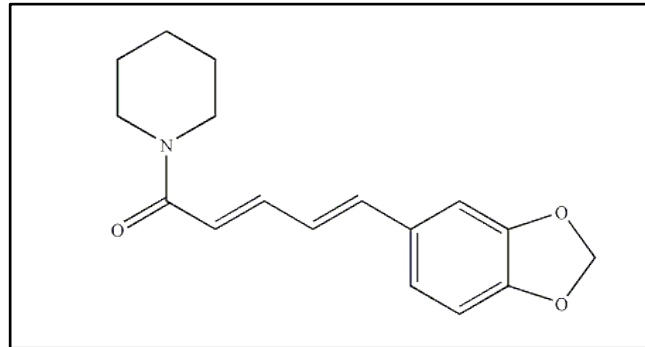
Deskripsi tanaman lada adalah batang pokok berkayu, beruas-ruas dan tumbuh merambat dengan menggunakan akar pelekat pada tiang panjat atau menjalar di atas permukaan tanah. Akar tanah tanaman lada merupakan akar

tunggang. Daun tanaman lada merupakan daun tunggal, berseling dan tersebar (Tjitrosoepomo, 2004). Daun berbentuk bulat telur sampai memanjang dengan ujung meruncing (Rismunandar, 2007). Buah lada memiliki bentuk bulat, biji keras dan kulit lunak. Kulit buah yang masih muda berkulit luar (epikarp) hijau mengkilap dimana ketika masak berubah menjadi kuning dan merah menyala. (Ditjenbun, 2013; Sarpin, 2003). Buah lada umumnya dikenal dalam dua jenis, yaitu lada hitam dan lada putih. Yang membedakan kedua jenis ini adalah proses pembuatannya. Proses pembuatan lada hitam adalah dengan mengambil buah yang masih hijau, diperam, kemudian dijemur sampai kering. Dari penjemuran diperoleh buah lada yang keriput dan berwarna kehitam-hitaman. Sedangkan lada putih diambil dari buah yang hampir masak, direndam, dan dikupas kulitnya yang kemudian dijemur hingga berwarna putih (Rismunandar, 2007).

2. Kandungan dan Manfaat *Piper nigrum* Linn.

Piper nigrum L. dalam ekstrak *aquoeous*, ekstrak metanol dan ekstrak etanol positif mengandung karbohidrat, protein, tanin, fenol, kumarin, alkaloid dan antrakuinon (Kadam *et al.*, 2013). Penelitian mengenai alkaloid mendapat perhatian khusus karena memberikan aktivitas yang menjanjikan seperti antiinflamasi, antibakteri dan anti-asma (Khusbhu *et al.*, 2011). Sebanyak 5-9% alkaloid yang terdapat pada lada sebagian besar merupakan senyawa piperin (Epstein *et al.*, 1993).

B. Piperin



Gambar 2. Struktur kimia piperin

Piperin adalah senyawa golongan alkaloid, dapat diisolasi dari tanaman-tanaman famili Piperaceae, seperti *Piper nigrum* dan *Piper longum* (Vasavirama & Mahesh, 2014; Sudjarwo, 2005). Sebanyak 5-9% alkaloid yang terdapat pada lada sebagian besar merupakan senyawa piperin (Epstein *et al.*, 1993). Rumus kimia piperin adalah $C_{17}H_{19}NO_3$. Struktur kimia piperin dapat dilihat pada gambar 2. Kristal piperin berwarna kuning, larut dalam eter, etanol, metanol, kloroform, sedikit larut dalam air (Kolhe, 2011). Rentang titik lebur piperin adalah 128-130°C (Adosraku, 2013), sedangkan larutan piperin dalam metanol menyerap panjang gelombang maksimal pada 342,5 nm (Vishnath *et al.*, 2011).

C. Ekstraksi dan Isolasi Senyawa murni Piperin

Metode yang umum digunakan untuk mengisolasi kristal piperin adalah dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik seperti etanol (96%) dan KOH (Ikan R., 1991). Selain itu ekstraksi juga bisa menggunakan beberapa jenis pelarut seperti diklorometan dan asam asetat glasial (Kohle, 2011; Madhavi, 2009). Selanjutnya isolasi dan pemurnian senyawa piperin dapat dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan pelarut toluen dan etil asetat (Shingate *et al.*, 2013).

D. Identifikasi Alkaloid Dengan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Zat penjerap (fase diam) pada KLT berupa lapisan tipis serbuk halus yang dilapiskan pada lempeng kaca, pelat plastik atau logam secara merata. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*) atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Farmakope Herbal Indonesia, 2009; Gandjar & Abdul Rohman, 2007). Uji alkaloid dengan metode KLT dapat diamati dengan menggunakan pereaksi *dragendorff* (Adeanne *et al.*, 2013).

E. *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)*

Spektrofotometer inframerah merupakan instrumen yang digunakan untuk mengukur resapan radiasi inframerah pada berbagai panjang gelombang (Fessenden, 1982). Radiasi inframerah terletak pada spektrum elektromagnetik antara daerah visibel dan daerah *microwave* (gelombang mikro). Penggunaannya paling banyak untuk kimia organik pada batas panjang gelombang antara 4000 dan 400 cm^{-1} . Spektrum vibrasi tampak berupa pita. Ada dua tipe vibrasi molekuler yaitu *stretching* dan *bending*. Hanya vibrasi yang menghasilkan perubahan secara ritmik pada momen dipol yang diobservasi dalam IR (Silverstein, 2005)

Daerah antara 1400-4000 cm^{-1} pada bagian kiri spektrum inframerah merupakan daerah khusus untuk identifikasi gugus-gugus fungsional dimana daerah absorpsi diakibatkan oleh *stretching*. Daerah disebelah kanan 1400 cm^{-1}

seringkali rumit karena absorpsi disebabkan oleh adanya *stretching* dan *bending*. Dalam daerah ini biasanya hubungan antara pita serapan dan gugus fungsional spesifik tidak dapat diamati dengan cermat. Namun, suatu senyawa pasti memiliki resapan tertentu yang unik di daerah ini sehingga disebut dengan *fingerprint region* (daerah sidik jari). Meskipun pada bagian kiri suatu spektrum sama dengan senyawa-senyawa yang mirip, daerah sidik jari juga penting untuk memutuskan kedua senyawa tersebut sama (Fessenden, 1982).

Instrumen *Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR)* berdasarkan pada interferometer yang terdiri dari *beam splitter*, cermin diam, dan cermin bergerak. Sinar radiasi yang berasal dari sumber melewati *beam splitter* dan terbagi menjadi dua berkas yang direfleksikan pada cermin yang diam dan berkas lainnya direfleksikan pada cermin yang bergerak tegak lurus. Cermin merefleksikan kembali radiasi pada *beam splitter* berulang kali menghasilkan satu berkas sampai pada detektor dan berkas yang lain kembali ke sumber (Stuart, 2004).

F. Spektrofotometer UV-Vis

Panjang gelombang ultraviolet (UV) maupun cahaya tampak (Vis) jauh lebih pendek dari pada inframerah namun memiliki energi yang lebih tinggi. Spektrum cahaya tampak berada pada rentang 400-750 nm sedangkan UV berada pada rentang 100-400 nm. Absorpsi cahaya UV atau tampak akan mengakibatkan transisi elektronik (Fessenden, 1982). Absorpsi cahaya pada daerah UV-Vis hanya akan menghasilkan transisi elektron pada transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ (Royal Society of Chemistry, 2009). Hal tersebut disebabkan karena energi yang

diperlukan untuk transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ sesuai dengan energi sinar yang terletak diantara panjang gelombang 200-700 nm yang merupakan panjang gelombang pada spektrofotometer UV-Vis (Gandjar & Abdul Rohman, 2007).

Spektra UV-Vis dapat digunakan sebagai informasi kualitatif maupun kuantitatif. Data yang diperoleh dari spektroskopi UV dan Vis adalah panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH, dan pelarut yang dapat dibandingkan dengan data acuan. Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang dengan absorbansi maksimal (Gandjar & Abdul Rohman, 2007).

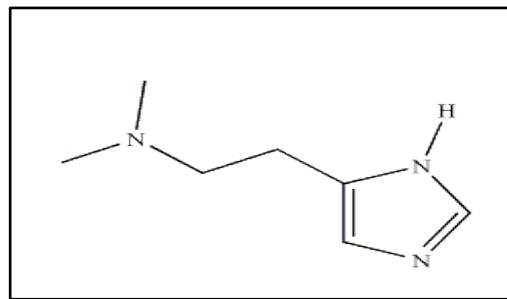
G. Titik Lebur

Titik lebur senyawa murni organik solid merupakan jarak temperatur ketika bentuk padat setimbang dengan bentuk cairnya. Titik lebur merupakan salah satu karakteristik untuk menentukan kemurnian substansi solid. Titik lebur menunjukkan rentang temperatur dari pertama kali kristal dari substansi solid meleleh hingga kristal tersebut meleleh seluruhnya. Kristal solid yang murni memiliki rentang titik lebur yang sempit yaitu 1-2°C (Hart *et al.*, 2012).

H. Reseptor Histamin

Histamin 2-(4-imidazoil)etilamin merupakan suatu amina biologis yang berperan sebagai neurotransmitter dan neuromodulator. Pada manusia, histamin merupakan perantara penting dari reaksi alergi cepat dan reaksi peradangan. Senyawa ini dihasilkan oleh sel mast dari asam amino histidin. Senyawa ini disintesis dengan enzim histidin dekarboksilase dan diurai oleh histamin-N metil transferase atau diamin oksidase. Histamin merupakan suatu autokid, yaitu agen

penyembuh diri sendiri yang dilepaskan oleh sel sebagai respon terhadap stimulus, bisa juga dikatakan sebagai hormon lokal (Offerans & Rosenthal, 2006). Histamin hampir tersebar diseluruh tubuh, akan tetapi sebagian besar ditemukan di kulit, saluran pernapasan, saluran pencernaan, dan otak. Histamin tersimpan di dalam tiga tipe sel yaitu sel mast, *enterochromaffin-like cell* (ECL), dan sel syaraf (Lullman *et al.*, 2000). Pelepasan histamin dari sel mast memicu reaksi alergi (Offerans & Rosenthal, 2006).



Gambar 3. Struktur kimia histamin

Ketika terlepas dari sel mast, histamin akan berikatan dengan reseptor histamin dan selanjutnya akan terjadi transduksi sinyal. Reseptor histamin tergolong ke dalam famili reseptor terkait protein G (*G-protein coupled receptor/GPCR*). Hingga saat ini telah ditemukan 4 sub tipe reseptor histamin tersebut yakni reseptor H₁, H₂, H₃ dan H₄. Reseptor H₁ tersebar di otot polos endotelium, adrenal medula, dan sistem saraf pusat. Reseptor H₂ terdapat pada sel-sel parietal lambung. Reseptor ini berperan dalam sekresi asam lambung, reseptor H₃ terdapat pada sel-sel saraf, sedangkan reseptor H₄ terdapat pada sumsum tulang belakang, ginjal, dan leukosit. Efek dari histamin dapat dihalangi melalui obat-obatan antagonis fisiologis yang memiliki efek berlawanan dengan histamin. Selain itu juga dapat menggunakan agen kompetitif histamin yang

bekerja dengan cara menduduki reseptor histamin serta mencegah pelepasan histamin melalui degranulasi sel mast (Katzung, 1997).

I. Interaksi Obat dengan Reseptor

1. Obat Agonis dan Antagonis

Obat agonis berikatan dengan suatu cara untuk memacu reseptor secara langsung atau tidak hingga memberikan efek. Pada beberapa reseptor, mekanisme yang terjadi melalui satu molekul yang berikatan pada reseptor sehingga memberikan efek langsung. Untuk reseptor lain harus berikatan dengan satu atau lebih molekul pasangan (*coupling molecule*) yang terpisah dengan molekul yang memberikan efek (Katzung, 1997).

Obat antagonis bekerja dengan cara menghambat reseptor berikatan dengan molekul lain. Misalnya, antihistamin bekerja dengan cara menyekat reseptor histamin sehingga tidak dapat berikatan dengan histamin atau agonis serupa yang dapat berikatan pada reseptor tersebut. Zat-zat antagonis seperti ini mengurangi efek dari histamin (Katzung, 1997).

2. Hubungan Konsentrasi Obat dengan Respon

Dalam pengontrolan sistem *in-vitro*, hubungan antara konsentrasi obat dan efeknya dapat dijelaskan secara matematik. Hubungan antara konsentrasi dan efek obat dijelaskan oleh suatu kurva hiperbola dengan persamaan sebagai berikut :

$$E = \frac{(E_{max}) \times C}{C + EC_{50}}$$

Dimana E merupakan efek yang dihasilkan pada konsentrasi C, E_{max} merupakan respon maksimal yang dihasilkan obat dan EC_{50} merupakan konsentrasi obat yang menghasilkan 50% efek maksimal. Nilai EC_{50} dapat

digunakan untuk mencari parameter afinitas agonis terhadap reseptor (pD_2). Nilai pD_2 adalah minus logaritma dari EC_{50} . Semakin besar nilai pD_2 maka semakin besar afinitas agonis terhadap reseptor.

Dengan adanya suatu antagonis pada sistem, kurva hubungan konsentrasi agonis dengan respon juga akan berubah. Pada antagonis kompetitif, kurva akan bergeser ke kanan. Sedangkan pada antagonis non-kompetitif, kurva akan bergeser ke bawah (E_{max} turun). Untuk menentukan sifat kompetitif dari suatu antagonis dapat digunakan persamaan *Schild* yang berupa persamaan garis lurus :

$$\text{Log } (A'/A - 1) = \text{log } [B] - \text{log } KB$$

Keterangan :

(A'/A) : Rasio konsentrasi EC_{50} dengan pengaruh antagonis terhadap EC_{50} tanpa pengaruh antagonis

$[B]$: Konsentrasi antagonis

KB : Konstanta disosiasi ekuilibrium

Persamaan tersebut merupakan suatu persamaan garis lurus dengan $Y = \text{log } (A'/A - 1)$ dan $X = \text{log } [B]$. Sifat kompetitif dari suatu antagonis dilihat dari *slope* pada sumbu X ($\text{Log } [B]$). Nilai *slope* suatu antagonis kompetitif adalah mendekati 1 (satu) (Janković *et al.*, 1999).

J. Percobaan dengan Organ Terisolasi

Percobaan dengan menggunakan organ terisolasi merupakan metode klasik dalam percobaan farmakologi yang dapat digunakan untuk menganalisa hubungan antara dosis dan respon suatu senyawa obat. Walaupun beberapa metode tingkat molekuler telah tersedia untuk mempelajari respon seluler suatu

obat pada beberapa dekade belakangan ini, metode organ terisolasi masih dianggap sebagai metode yang baik untuk menelusuri aktivitas farmakologi suatu obat.

Perubahan-perubahan yang terjadi pada tingkat jaringan atau organ karena pengaruh suatu senyawa kimia dapat dipelajari lebih mendalam dan akurat dengan cara mengisolasi suatu organ atau jaringan dari suatu sistem fisiologis. Sebagai contoh, senyawa vasokonstriktor dapat diukur aktivitasnya dengan menggunakan beberapa bagian pembuluh darah terisolasi, seperti vena portal atau vena *saphenous*, vena *mesentric*, arteri koroner dan arteri basiler. Organ atau bagian organ yang diisolasi akan mampu tetap bertahan hidup selama beberapa jam di luar tubuh jika organ dikondisikan tetap berada dalam lingkungan fisiologisnya, yaitu dengan cara pemberian cairan fisiologis dalam temperatur yang sesuai, asupan oksigen dan nutrien yang tepat dari luar. Rangsangan fisiologis dan farmakologis terhadap organ terisolasi selanjutnya dapat tercatat dengan menggunakan alat perekam yang tepat. Efek kontraksi pembuluh darah akan tercatat dengan mengkondisikan pembuluh darah dengan bantuan dua penjepit atau penahan sedemikian rupa dalam alat organ terisolasi dengan sedikit diberi tekanan (Lullmann *et al.*, 2000).

Percobaan dengan menggunakan organ terisolasi memiliki beberapa keuntungan, diantaranya adalah sebagai berikut (Lullman *et al.*, 2000) :

- a. Konsentrasi obat pada jaringan bisa diketahui dengan pasti.
- b. Sistem obat terisolasi bersifat lebih sederhana, sehingga adanya kemudahan dalam mengamati hubungan rangsangan dan respon.

- c. Jika dibandingkan dengan efek yang terjadi ketika menggunakan organisme utuh, metode organ terisolasi sangat memungkinkan untuk menghindari efek kompensasi yang akan mengurangi efek mencapai separuhnya.
- d. Metode organ terisolasi mempunyai kemampuan untuk mengukur efek sampai pada efek dengan intensitas maksimum. Hal ini tidak sepenuhnya dapat dilakukan ketika menggunakan organisme utuh, seperti efek konotropik negatif dari suatu obat tidak bisa dilanjutkan sampai pada efek maksimumnya, karena akan mengakibatkan berhentinya denyut jantung (*cardiac arrest*) pada organisme hidup sehingga hal ini tidak bisa dilakukan.

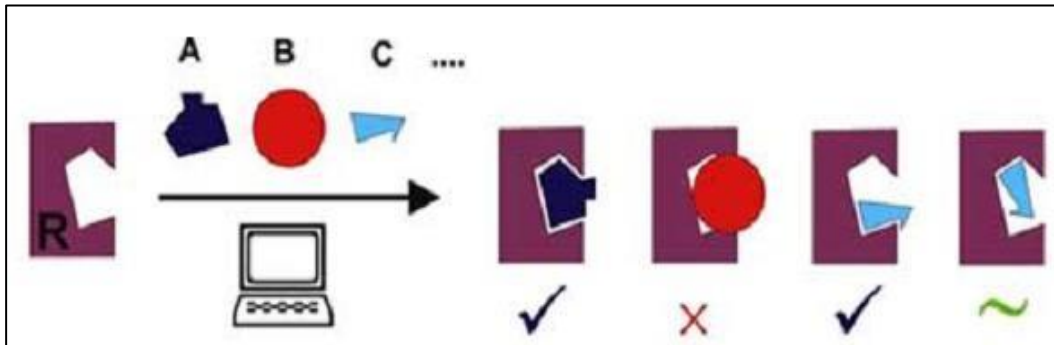
Beberapa kelemahan percobaan dengan organ terisolasi (Lullmann *et al.*, 2000; Niemeyer & Bingham, 1972) :

- a. Kerusakan jaringan selama pembedahan tidak dapat dihindarkan.
- b. Hilangnya regulasi fisiologis dari fungsi organ terisolasi.
- c. Lingkungan fisiologis buatan tidak sepenuhnya sama dengan cairan fisiologis dalam tubuh, sehingga lama kelamaan akan berpengaruh buruk terhadap jaringan.
- d. Tidak dapat digunakan pada penelitian yang membutuhkan waktu pengamatan yang relatif lama, sebagai contoh preparat paru-paru dalam alat organ terisolasi hanya mampu bertahan hidup selama 4 jam.

K. Metode *In Silico* Menggunakan *Molecular Docking*

Penelitian secara *in silico* dapat dilakukan dengan penambatan molekul atau *molecular docking* (Motiejunas & Wade, 2006). *Molecular docking* (penambatan molekuler) merupakan suatu teknik yang bisa digunakan untuk mempelajari

interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul antara biomolekul dengan molekul kecil atau ligan. Interaksi kompleks molekul tersebut berorientasi untuk mencapai kestabilan. Tujuan dari *molecular docking* adalah pemodelan struktural secara akurat dan memprediksi aktivitasnya secara tepat (Kitchen, 2004). Terdapat dua aspek dalam *molecular docking*, yaitu fungsi *scoring* dan penggunaan algoritma. Algoritma *docking* berfungsi untuk mengidentifikasi energi yang dihasilkan dari konformasi molekular dan kemudian mencari konformasi yang memiliki energi bebas paling rendah dalam sistem. Penambatan molekuler juga digunakan untuk memperoleh nilai energi ikatan konformasi yang paling rendah dengan afinitas yang paling tinggi (Kroemer, 2007). Pada dasarnya cara kerja dari beberapa aplikasi tersebut digambarkan pada gambar 4.



Gambar 4. Prinsip Dasar *Molecular Docking* (Kroemer, 2007)

Keterangan :

- R : Reseptor
- A : Ligan yang cocok dengan reseptor
- B : Ligan yang tidak cocok dengan reseptor
- C : Ligan yang cocok dengan reseptor dalam konformasi yang lain
- ✓ : Ikatan ligan cocok dengan reseptor
- X : Ikatan ligan tidak cocok dengan reseptor

~ : Ikatan ligan tidak begitu sempurna dengan reseptor

Ada banyak aplikasi yang umum digunakan untuk melakukan *virtual screening* dengan metode *molecular docking*, yaitu *PLANTS (Protein-Ligand ANT System)*, *MVD (Molegro Virtual Docking)*, dan *AutoDock* (Korb *et al.*, 2006). *Autodock* merupakan alat *docking* otomatis yang dirancang untuk memprediksi ikatan molekul berukuran kecil, seperti substrat atau obat (ligan) dengan struktur 3D biomolekuler (Morris, 2013).

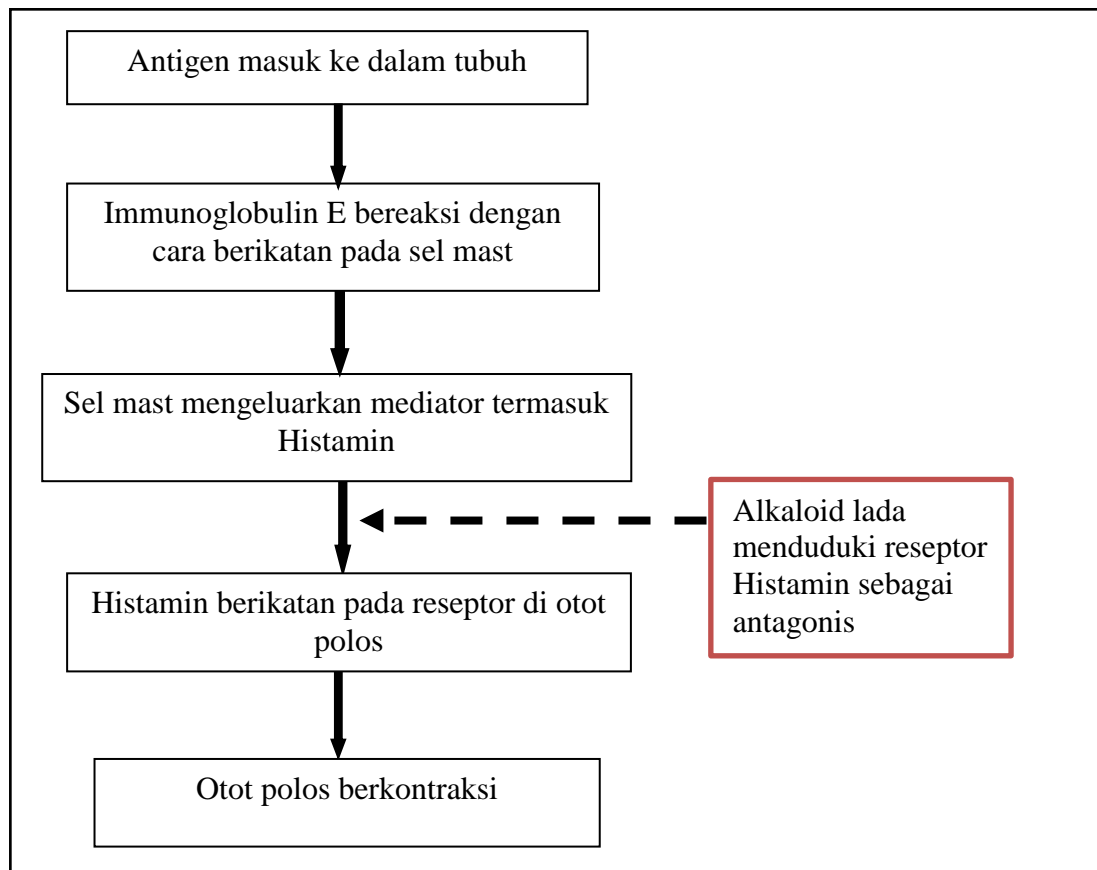
Penelitian menggunakan metode *in silico* pernah dilakukan untuk mengidentifikasi ikatan senyawa-senyawa aktif dari *Aegle marmelos* C. terhadap reseptor histamin H₁. Menurut penelitian tersebut, senyawa yang terdapat pada tanaman *Aegle marmelos* C. berpotensi sebagai agen antihistamin melalui interaksi dengan residu protein *Asp107*, *Lys179*, *Lys191*, *Asn198*, dan *Trp428* pada reseptor histamin H₁ (Nugroho *et al.*, 2013).

L. Landasan Teori

Salah satu akibat yang terjadi pada reaksi alergi adalah pelepasan histamin dari sel mast yang dimediasi oleh Immunoglobulin E yang akan dilanjutkan dengan terjadinya ikatan antara histamin dan reseptor histamin. Ikatan yang bersifat agonis ini memicu terjadinya kontraksi pada otot polos ileum. Telah dilakukan penelitian *in-vitro* tentang aktivitas piperin yang merupakan komponen utama alkaloid *Piper nigrum* L. pada kultur sel mast (RBL-2H3). Penelitian tersebut menyatakan bahwa piperin dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast dengan jalan menghambat jalur sinyal yang dimediasi oleh immunoglobulin E. Selain itu alkaloid lada diketahui menghambat degranulasi

histamin melalui penghambatan enzim *phosphatidylinositol 4-kinase(s)* yang merupakan komponen penting dalam proses menempelnya imunoglobulin E pada reseptor FcεR.

M. Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka konsep

N. Hipotesis

1. Alkaloid lada mengandung senyawa piperin berdasarkan uji *FTIR*, spektrofotometri UV-Vis dan uji titik lebur.
2. Alkaloid lada dapat memiliki efek antagonisme terhadap reseptor H₁ pada otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi agonis histamin.
3. Alkaloid lada dapat bekerja sebagai antagonis kompetitif atau non kompetitif pada reseptor histamin H₁.

4. Semakin kecil skor *docking* suatu senyawa berarti semakin kecil energi yang dibutuhkan senyawa untuk berikatan dengan reseptor, maka semakin besar afinitas senyawa tersebut.
5. Piperin dapat berikatan pada residu protein reseptor histamin H₁ yang berperan penting dalam proses histaminergik.