

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Kristal Alkaloid Lada

Langkah awal penelitian adalah ekstraksi alkaloid lada menggunakan metode sokhletasi dengan pelarut etilasetat. Pelarut etilasetat merupakan pelarut semipolar dimana berdasarkan tabel *solvent miscibility*, etilasetat memiliki indeks polaritas 4,4 sehingga diharapkan alkaloid lada yang merupakan senyawa alkaloid piperin yang bersifat semi polar dapat ditarik. Nilai indeks polaritas etilasetat tidak jauh berbeda dengan nilai indeks polaritas 3 pelarut yang digunakan dalam penelitian Shingate *et al.* (2013) sehingga etilasetat dapat digunakan sebagai pelarut untuk mengekstraksi alkaloid lada. Hasil sokhletasi akan mengendap membentuk kristal yang selanjutnya dicuci menggunakan etanol 96%. Hasil pencucian kristal dapat dilihat pada Gambar 7.

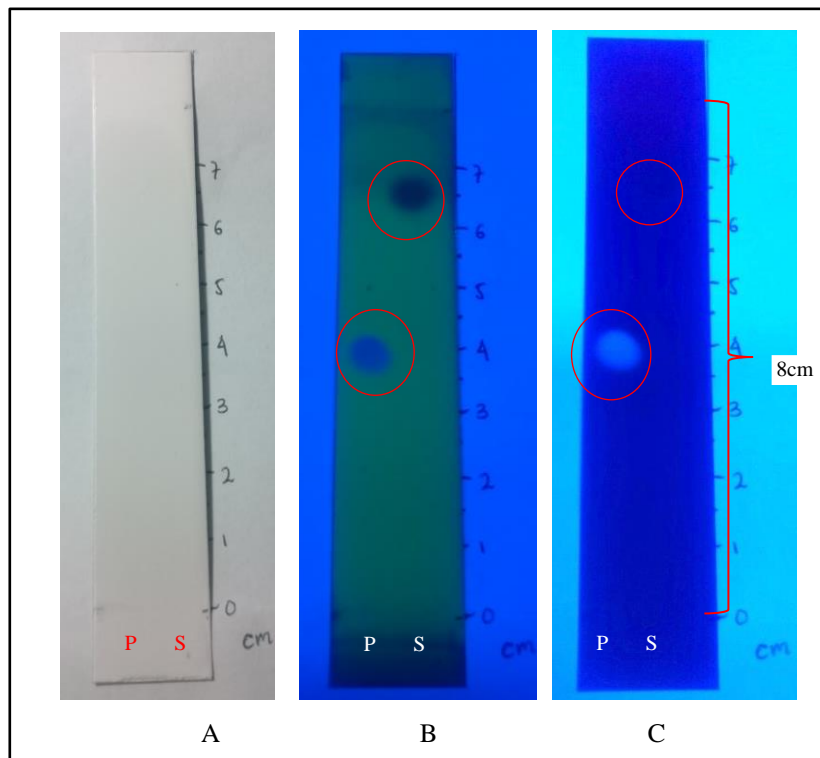


Gambar 1. Kristal alkaloid lada

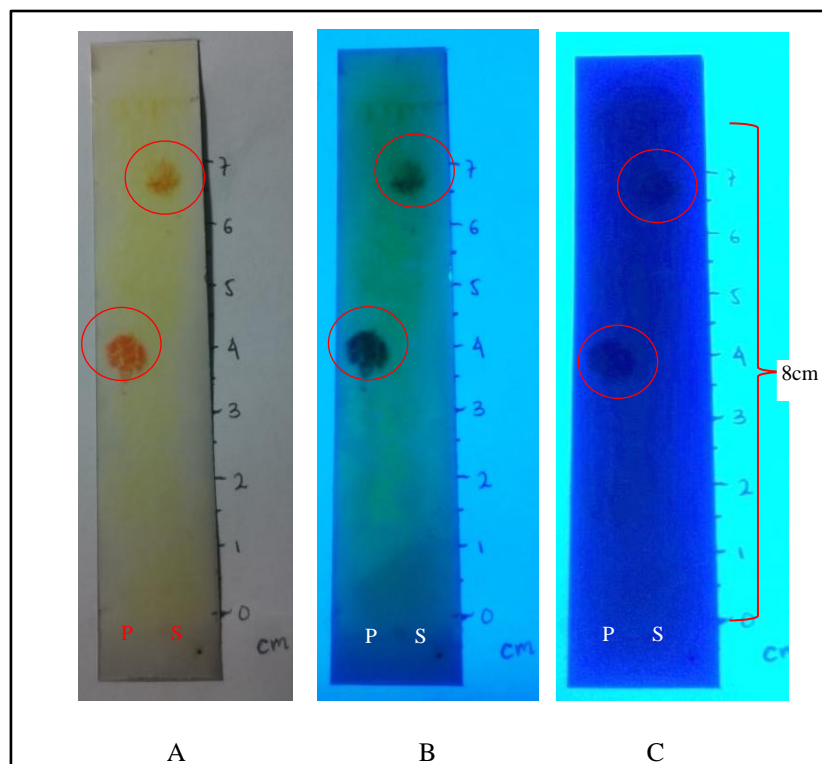
1. Uji identifikasi kandungan Alkaloid lada

Analisis dengan KLT digunakan untuk mengidentifikasi kandungan alkaloid lada dalam kristal yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah BAW (4:1:5) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 GF₂₅₄ yang bersifat polar (Gandjar & Abdul Rohman, 2007). Plat KLT dibuat dengan panjang 10 cm dengan jarak elusidasi 8 cm. Deteksi bercak dilakukan dengan sinar tampak, sinar UV 254 dan UV 366 sebelum dan sesudah disemprot pereaksi *dragendorff*. Pada fase gerak BAW (n-butanol : asam asetat : air = 4 :1:5), bercak alkaloid berada di atas ($R_f = 0,82$) sedangkan senyawa pembanding alkaloid kinin sulfat berada di tengah ($R_f = 0,50$). Senyawa yang mempunyai R_f lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang lebih rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut dikarenakan fase diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fase diam, sehingga menghasilkan nilai R_f yang lebih rendah. Kinin sulfat yang digunakan sebagai pembanding berbentuk garam sehingga bersifat lebih polar dan tertahan pada fase diam dibandingkan alkaloid dalam bentuk bebas.

Selanjutnya dilakukan deteksi alkaloid melalui penampakan bercak menggunakan pereaksi *dragendorff*. Hasil penampakan bercak pada cahaya tampak dapat dilihat pada Gambar 9. Uji dengan pereaksi *dragendorff* memberikan hasil positif alkaloid jika terbentuk endapan coklat muda sampai kuning (jingga) (Marliana *et al*, 2005). Hasil pada Gambar 9 (A) menunjukkan bahwa bercak kristal yang diperoleh (S) berubah warna menjadi jingga. Hal tersebut juga terjadi pada bercak pembanding (P).



Gambar 2. Uji identifikasi KLT senyawa alkaloid lada sebelum disemprot *dragendorff*. Keterangan: (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366, (P) pembeding menggunakan kinin sulfat ($R_f=0,5$), (S) Alkaloid lada ($R_f=0,82$)

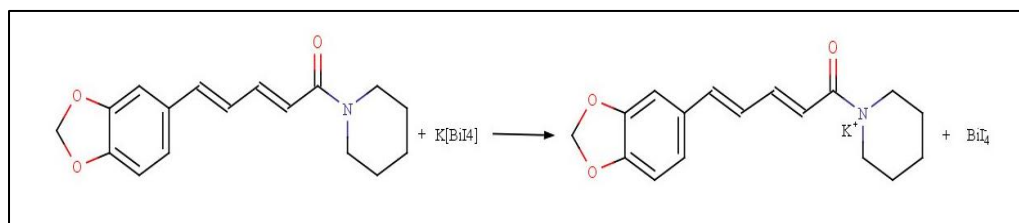


Gambar 3. Uji identifikasi KLT senyawa alkaloid lada setelah disemprot reaksi *dragendorff*. Keterangan: (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366. (P) pembeding menggunakan kinin sulfat ($R_f=0,5$), (S) Alkaloid lada ($R_f=0,82$)

Tabel 1. Hasil identifikasi senyawa pada plat KLT

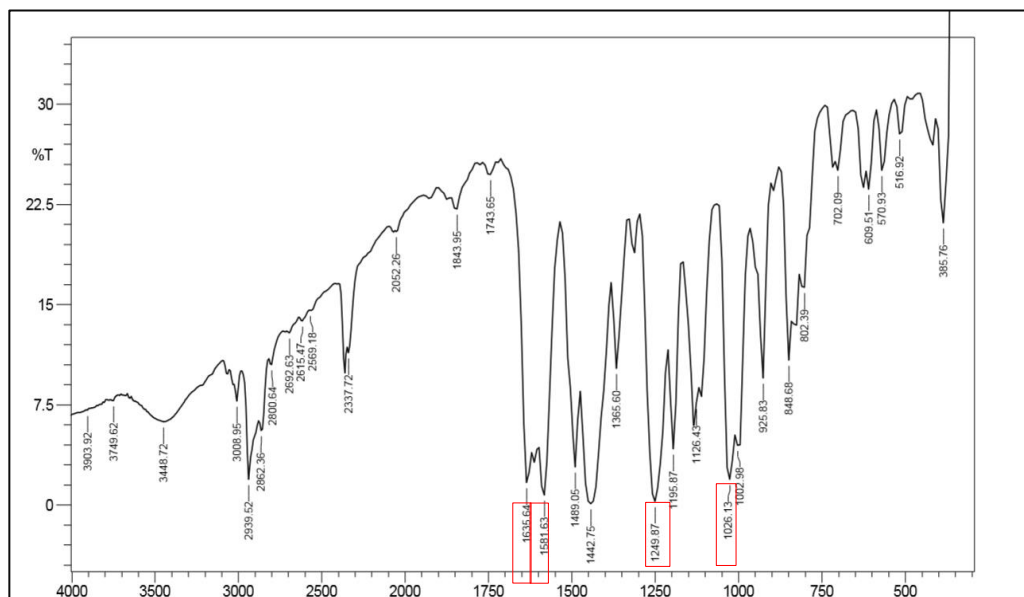
Senyawa	Bercak sebelum disemprot pereaksi			Bercak setelah disemprot pereaksi			Jarak eluen (cm)	Jarak senyawa (cm)	Rf
	Sinar tampak	UV 254 Nm	UV 366 nm	Sinar tampak	UV 254 Nm	UV 366 nm			
Kinin SO ₄	Tak tampak	Biru terang	Biru ber-endar	orange	Coklat meredam	Biru gelap	8	4	0,50
Sampel	Tak tampak	Biru gelap	Tidak tampak	orange	Coklat meredam	Biru gelap	8	6,5	0,82

Pada uji alkaloid dengan pereaksi *dragendorff*, nitrogen membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K⁺ yang merupakan ion logam sehingga terbentuk endapan coklat muda sampai kuning (Marliana *et al.*, 2005) sedangkan pada plat KLT terbentuk bercak coklat muda sampai kuning. Reaksi antara alkaloid lada dengan pereaksi *dragendorff* dapat dilihat pada Gambar 10.

**Gambar 4.** Reaksi antara piperin dan *dragendorff*

2. Uji FTIR piperin pada kristal alkaloid lada

Uji *FTIR* bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan piperin pada kristal alkaloid lada berdasarkan serapan inframerah gugus fungsinya. Hasil *FTIR* dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 5. FTIR kristal alkaloid lada

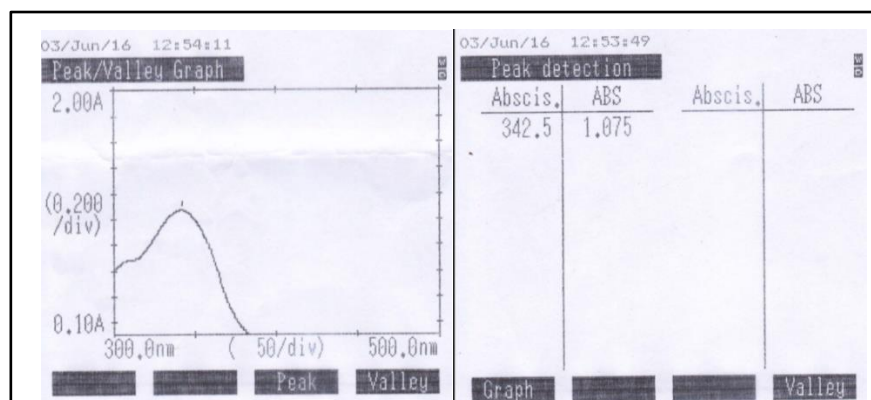
Senyawa piperin merupakan senyawa turunan piperidin yang terdiri dari cincin benzodioxol dan amina tersier alisiklik yang dihubungkan oleh karbonil terkonjugasi α , β , γ , δ . Gugus ikatan C=C aromatik pada cincin benzodioxol muncul pada bilangan gelombang $1581,63 \text{ cm}^{-1}$. Selain itu gugus C-O-C asimetrik dan simetrik muncul pada bilangan gelombang $1249,87 \text{ cm}^{-1}$ dan $1026,13 \text{ cm}^{-1}$. Pada spektra serapan yang diperoleh juga memperlihatkan pita absorpsi pada daerah $1635,64 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan pita absorpsi karbonil keton. Keton dalam keadaan normal akan muncul pada daerah 1715 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005). Adanya efek resonansi ikatan α , β *unsaturated* pada gugus karbonil memunculkan karakteristik menyerupai ikatan tunggal sehingga menggeser absorpsi ke daerah gelombang yang lebih pendek (Pavia *et al.*, 2000). Data spektrum IR tersebut menunjukkan bahwa kristal alkaloid yang diperoleh memiliki kesesuaian gugus fungsi senyawa piperin. Namun, terdapat serapan khas gugus N-H pada daerah gelombang $3448,72 \text{ cm}^{-1}$ (Silverstein *et*

al., 2005). Hal tersebut dapat mengindikasikan bahwa kristal alkaloid yang diperoleh masih belum 100% murni mengandung piperin saja.

2. Uji Spektrofotometer UV kristal alkaloid lada

Uji spektrofotometer UV dilakukan untuk mengidentifikasi spektra panjang gelombang maksimum kristal yang diperoleh. Spektra panjang gelombang maksimum yang diperoleh akan dibandingkan dengan spektra panjang gelombang maksimum piperin yaitu 342,5 nm (Vishnath *et al.*, 2011).

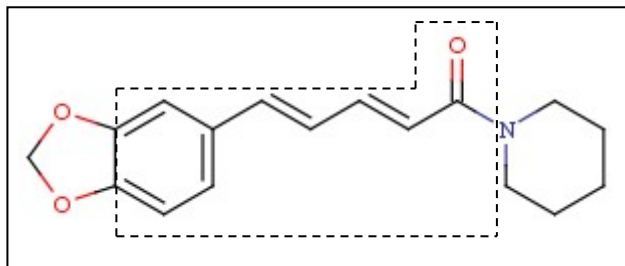
Hasil uji spektrofotometer UV dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 6. Hasil uji spektrofotometer UV

Hasil uji spektrofotometer menunjukkan hasil panjang gelombang maksimal kristal alkaloid lada berada pada $\lambda = 342,5$ nm. Hasil tersebut sama dengan panjang gelombang maksimal pada acuan. Selain itu, hasil uji spektrofotometer UV-Vis senyawa alkaloid dalam pelarut metanol ($c = 0,001$ %, $b = 1$ cm) menunjukkan 1 pita absorpsi dengan panjang gelombang maksimum 342,5 nm ($\epsilon = 30.675,125$). Perhitungan absortivitas molar dapat dilihat pada Lampiran 4. Spektrum UV-Vis kristal alkaloid yang diperoleh memperlihatkan 1 pita absorpsi yang menunjukkan bahwa hanya terdapat 1 sistem kromofor. Hasil tersebut sesuai dengan struktur piperin yang memiliki satu sistem

kromofor. Sistem kromofor piperin dapat dilihat pada Gambar 13. Konjugasi gugus enon memiliki nilai absorptivitas >10.000 (Pavia *et al.*, 2000). Nilai absorptivitas (ϵ) alkaloid lada adalah >10.000 sehingga sistem kromofor yang terdapat pada struktur piperin termasuk dalam gugus enon.



Gambar 7. Gugus kromofor piperin

Spektra panjang gelombang gugus enon dapat diprediksi dengan menghitung total panjang gelombang berdasarkan *Empiric Rules for enon* (Pavia *et al.*, 2000). Total panjang gelombang gugus enon berdasarkan *Empiric Rules for enon* adalah 345 nm. Perhitungan panjang gelombang dengan berdasarkan *Empiric Rules for enon* dapat dilihat pada Lampiran 5.

4. Uji Titik Lebur kristal alkaloid lada

Uji titik lebur digunakan untuk mengidentifikasi dan mengetahui kemurnian kristal alkaloid lada yang diperoleh. Pada uji titik lebur diperoleh rentang temperatur pertama kali kristal meleleh hingga kristal tersebut meleleh seluruhnya yaitu pada suhu 122-132°C. Hasil uji titik lebur kristal yang diperoleh tersebut sesuai dengan titik lebur piperin pada acuan yaitu 128-130°C (Adosraku, 2013). Namun, kristal yang murni memiliki rentang temperatur sempit yaitu 1-2 °C (Hart *et al.*, 2012) sedangkan kristal yang diperoleh memiliki rentang yang lebar. Pelebaran rentang temperatur di atas 5°C mengindikasikan kristal kurang murni. Senyawa lain mengacaukan

konsistensi dan bentuk ikatan kristal pada level molekuler. Gangguan tersebut melemahkan struktur ikatan yang menyebabkan ikatan lebih mudah terurai pada saat diberikan energi (panas). Hal tersebut menyebabkan batas bawah temperatur turun dan rentang temperatur menjadi melebar.

B. Uji *In Vitro* Aktivitas Alkaloid Lada

Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid yang diketahui memiliki efek menghambat degranulasi pada kultur sel mast melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase* (Bojjireddy *et al.*, 2014). Selain itu, pengujian campuran ekstrak herbal mengandung *Piper nigrum* L. menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin (Antony, 2010). Ada kemungkinan piperin juga memiliki mekanisme spasmolitik dengan jalan menghambat aktivasi dari reseptor H₁. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk membuktikan aktivitas antagonis alkaloid lada pada reseptor H₁.

Mekanisme terjadinya kontraksi oleh histamin ketika berinteraksi dengan reseptor H₁ ileum adalah melalui rangsangan pada reseptor H₁ yang terhubung pada protein G atau disebut dengan *G-protein-coupled Receptor (GPCR)* melalui jalur fosfolipase C (PLC). Selanjutnya PLC yang telah teraktivasi akan mengkatalis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat (PIP₂), membentuk inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). IP₃ yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP₃ pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potencial Channels (TRPC)* dan mengakibatkan pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca²⁺ intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium

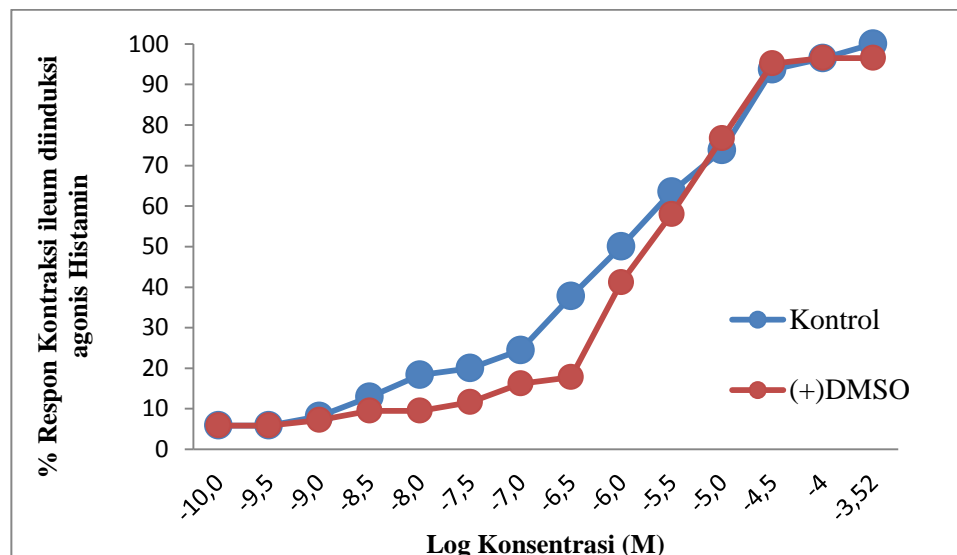
di permukaan membran sel (Sanders, 2001). Dengan aktifnya kanal kalsium menyebabkan influks Ca^{2+} ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar Ca^{2+} intraseluler yang menginduksi terjadinya kontraksi otot polos (Gosens *et al.*, 2006).

Mekanisme Peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler yang berasal dari aktivasi *GPCR* atau kanal ion dapat menyebabkan kontraksi pada otot polos adalah dengan cara Ca^{2+} berikatan dengan reseptor calmodulin (CaM). Calmodulin merupakan suatu protein pengikat Ca yang tidak memiliki aktivitas enzim. Calmodulin akan bekerja setelah membentuk kompleks dengan Ca^{2+} /calmodulin. Selanjutnya kompleks tersebut mengaktifkan *myosin light-chain kinase (MLCK)* yang akan memfosforilasi myosin. Myosin yang terfosforilasi akan berinteraksi dengan filamen aktin sehingga terjadi kontraksi (Lodish, 2000). Alkaloid lada dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor H_1 apabila dapat mengurangi potensi histamin dalam menginduksi kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi.

1. Uji Pendahuluan Pengaruh DMSO Terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum

Uji *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas senyawa piperin pada alkaloid lada yang diduga memiliki efek sebagai antagonis reseptor H_1 . Pada uji ini digunakan alkaloid lada konsentrasi 1000 μM dan 5000 μM . DMSO digunakan sebagai pelarut kristal alkaloid lada pada penelitian ini, sehingga DMSO perlu di uji efeknya terhadap kontraksi otot polos. DMSO sebagai pelarut alkaloid lada diharapkan tidak memiliki efek menurunkan kontraksi untuk menjamin bahwa penurunan efek kontraksi hanya disebabkan

oleh alkaloid lada saja. DMSO yang digunakan adalah sebesar 100 μ L sesuai dengan volume pemberian alkaloid lada pada organ *bath*.



Gambar 8. Pengaruh DMSO terhadap respon kontraksi otot polos ileum yang diinduksi histamin. Kurva hubungan konsentrasi histamin terhadap respon kontraksi otot polos ileum, dengan atau tanpa pengaruh DMSO 100 μ L (n=5, rata-rata \pm SEM).

Hasil uji menunjukkan adanya sedikit pergeseran pada kurva (Gambar 14) disertai dengan penurunan nilai pD₂ DMSO (Tabel 6). Namun berdasarkan uji statistik menggunakan *paired t-test* penurunan tersebut tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,005$). Oleh karena itu, DMSO tidak memiliki efek menurunkan kontraksi secara signifikan sehingga dapat digunakan sebagai pelarut alkaloid lada.

Tabel 2. Nilai rata-rata pD₂ histamin karena pengaruh DMSO 100 μ L (n=5, rata-rata \pm SEM).

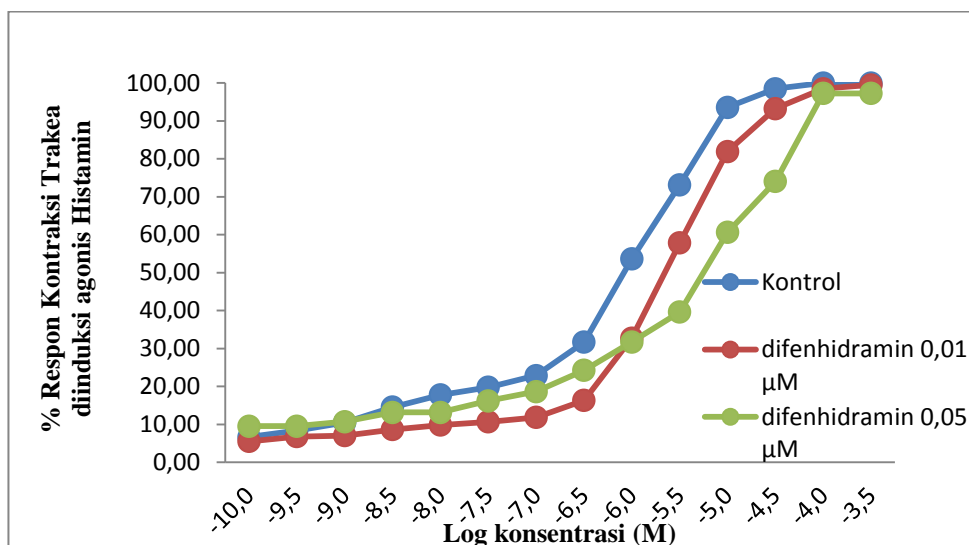
No	Kelompok Perlakuan	pD ₂	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,84 \pm 0,12	100 \pm 0,00
2	DMSO 100 μ M	5,72 \pm 0,13	100 \pm 0,00

Keterangan : Berdasarkan uji signifikansi menggunakan *paired t-test* dengan kepercayaan 95 %, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p > 0,05$) antara perlakuan pD₂ kontrol dan DMSO.

2. Uji Pembandingan Menggunakan Difenhidramin (Kontrol Positif)

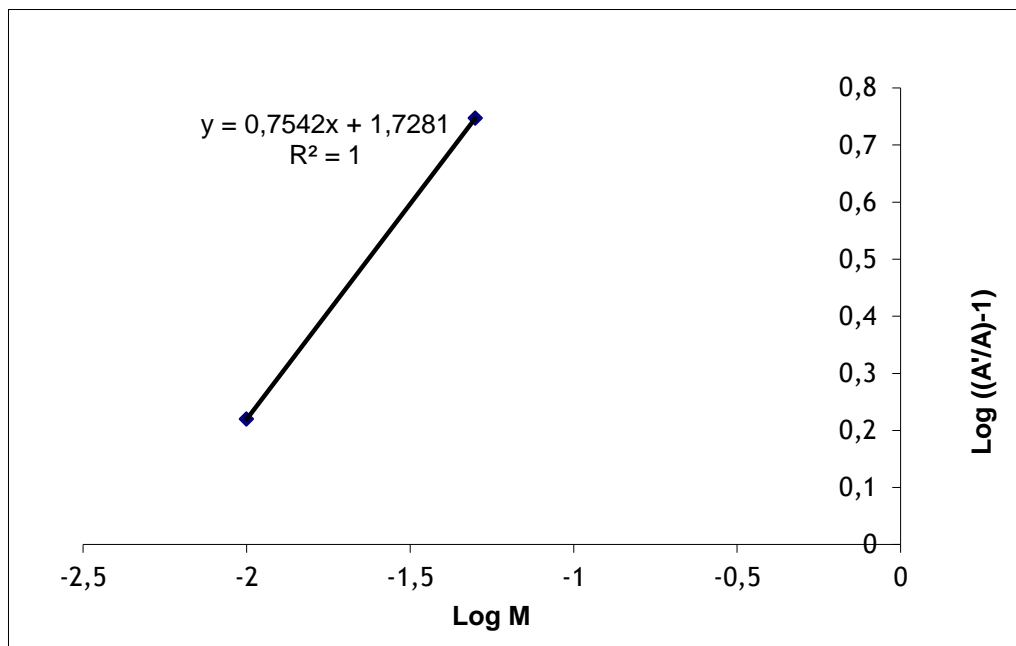
Reseptor H_1 telah teridentifikasi pada vertebrata dan diketahui banyak terdistribusi pada permukaan otot polos ileum marmut. Aktivasi reseptor H_1 oleh histamin akan mengakibatkan kontraksi otot polos baik di ileum manusia maupun marmut.

Uji pembandingan dilakukan menggunakan difenhidramin dengan metode yang sama persis dengan perlakuan menggunakan alkaloid lada. Difenhidramin merupakan antagonis reseptor H_1 generasi pertama dengan efek sedatif dan anti alergi. Difenhidramin secara kompetitif menghambat reseptor H_1 . Biasanya digunakan untuk gejala-gejala yang diakibatkan histamin endogen pada bronkus, pembuluh darah dan otot polos pencernaan. Tujuan dilakukannya uji difenhidramin sebagai pembandingan adalah untuk melihat apakah alkaloid lada bisa berefek sama dengan difenhidramin sebagai obat antihistamin. Selain itu juga untuk memastikan metode yang digunakan *valid* jika uji difenhidramin pada penelitian ini terbukti sebagai antagonis reseptor H_1 .



Gambar 9. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian difenhidramin 0,01 dan 0,05 μ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 5 – 10)

Hasil menunjukkan uji difenhidramin memberikan efek relaksasi dilihat dari pergeseran kurva ke arah kanan (Gambar 15) dan penurunan nilai pD_2 (Tabel 7). Bentuk kurva menunjukkan respon kontraksi (E_{max}) agonis yang kembali mencapai 100% setelah diberi perlakuan dengan antagonis histamin. Posisi antagonis kompetitif yang menduduki sisi aktif yang sama pada reseptor dapat digeser dengan penambahan konsentrasi agonis sehingga EC_{50} dapat tercapai dengan penambahan konsentrasi agonis yang lebih besar dan respon maksimal (E_{max}) dapat kembali 100% seperti sebelum diberikan antagonis. Hal tersebut menunjukkan bahwa difenhidramin merupakan antagonis kompetitif terhadap reseptor H_1 .



Gambar 10. Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis (pA₂) difenhidramin terhadap reseptor H₁. Sebagai sumbu x adalah nilai logaritma konsentrasi difenhidramin (Log M) dan sumbu y adalah nilai logaritma ((A'/A)-1), dimana A adalah nilai D₅₀ histamin tanpa pemberian difenhidramin dan A' adalah nilai D₅₀ histamin dengan pemberian difenhidramin.

Selain itu, jenis antagonis juga dapat dipastikan melalui analisa *Schild-Plot* (Gambar 16). Dari analisis ini didapatkan persamaan *Schild-Plot* $y = 0,7542x + 1,7281$. Nilai *slope* persamaan *Schild-Plot* adalah sebesar 0,7542 (mendekati angka 1,00) dan intersep (nilai pA₂) sebesar 1,7281. Nilai pA₂ (parameter afinitas) menunjukkan kadar antagonis yang dapat menyebabkan agonis dilipatkan kadarnya menjadi 2 kali untuk mendapatkan efek yang sama dengan efek sebelum diberikan antagonis. Dari uji difenhidramin dapat disimpulkan bahwa difenhidramin bertindak sebagai antagonis kompetitif terhadap reseptor H₁.

Tabel 3. Pergeseran nilai pD2 histamin karena pengaruh difenhidramin 0,01 dan 0,05 μM .

No	Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	6,10 \pm 0,16	100 \pm 0,00
2	Difenhidramin 0,01 μM	5,67 \pm 0,09	100 \pm 0,00
3	Difenhidramin 0,05 μM	5,15 \pm 0,23*	100 \pm 0,00

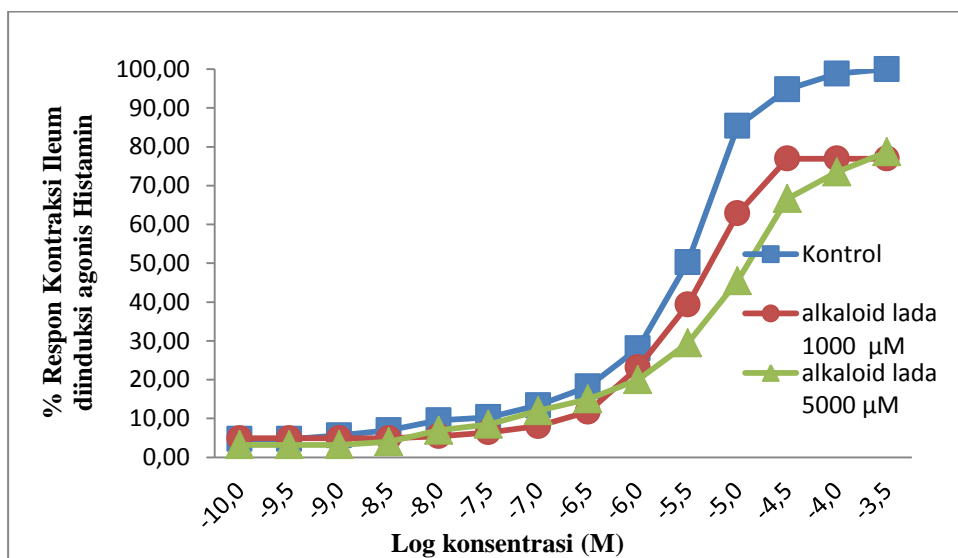
Keterangan : Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 5 - 10$). Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap nilai pD2 histamin/kontrol (*), setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %

3. Pengaruh Alkaloid Lada Terhadap Reseptor H₁ Otot Polos Ileum

Pengaruh alkaloid lada terhadap reseptor H₁ diuji dengan mengamati perubahan profil kurva hubungan seri konsentrasi histamin dengan % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi dalam media larutan *buffer tyrode*.

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 ileum dengan beberapa konsentrasi alkaloid lada harus dapat menurunkan nilai pD2 histamin. Selanjutnya, jika tipe antagonis adalah kompetitif maka nilai parameter antagonis (pA₂) alkaloid lada terhadap reseptor H₁ dapat diidentifikasi dan diukur dengan menggunakan analisa *Schild-Plot*.

Histamin dapat memicu kontraksi setelah berikatan dengan reseptor H₁ pada otot polos ileum. Pemberian konsentrasi bertingkat histamin eksogen mengakibatkan peningkatan % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi. Respon kontraksi otot polos ileum terisolasi 100 % tercapai pada pemberian histamin eksogen 3×10^{-4} M.



Gambar 11. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian alkaloid lada 1000 dan 5000 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 4-10).

Hasil penelitian menunjukkan praperlakuan otot polos ileum dengan alkaloid lada 1000 dan 5000 μM selama 5 menit, mampu mengurangi respon kontraksi otot polos ileum terisolasi yang diinduksi oleh histamin eksogen dengan pola tergantung konsentrasi. Pengurangan respon kontraksi ini terjadi terutama pada pemberian histamin konsentrasi rendah. Profil kurva (Gambar 17) menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi histamin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi.

Pergeseran kurva menunjukkan adanya penurunan kemampuan histamin dalam memicu respon kontraksi otot polos ileum karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada 1000 dan 5000 μM , keadaan tersebut ditandai dengan terjadinya penurunan nilai pD_2 histamin (Tabel 8). Nilai pD_2 histamin untuk perlakuan kontrol, alkaloid lada 1000 μM dan 5000 μM berturut-turut

adalah sebesar 5,61, 5,24 dan 4,94. Penurunan nilai pD2 alkaloid lada dosis 5000 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$).

Tabel 4. Pergeseran nilai pD2 histamin karena pengaruh alkaloid lada 1000 dan 5000 μM .

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,61 \pm 0,12	100 \pm 0,00
2	Alkaloid lada 1000 μM	5,24 \pm 0,16	76,93 \pm 0,00
3	Alkaloid lada 5000 μM	4,94 \pm 0,52*	78,68 \pm 0,00

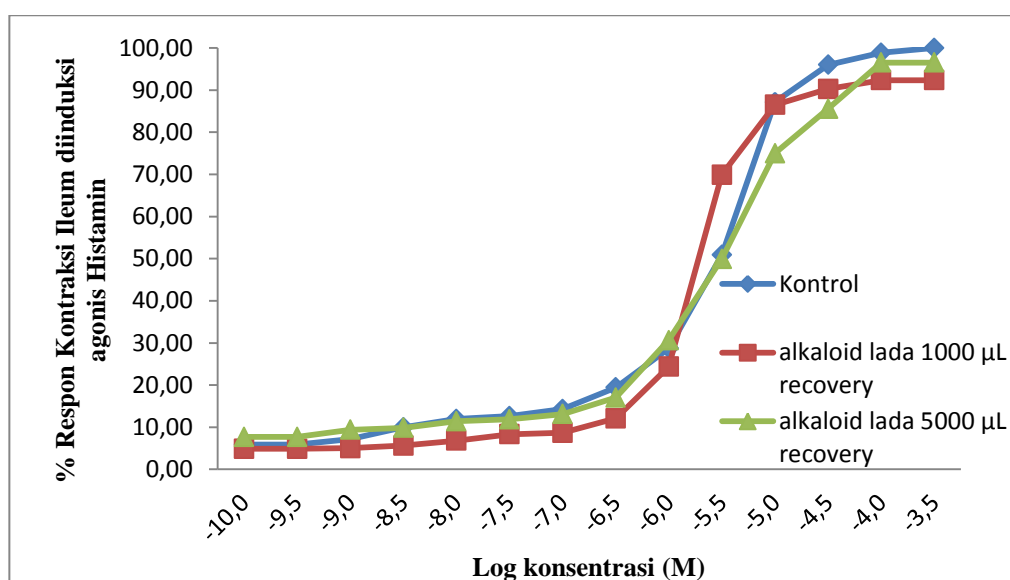
Keterangan : Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 4 - 10$). Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap nilai pD2 histamin/kontrol(*), setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

Penurunan nilai pD2 histamin karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada membuktikan bahwa alkaloid lada memiliki efek antagonis terhadap reseptor H_1 otot polos ileum. Untuk menetapkan tipe antagonis alkaloid lada, dapat dilihat pada bentuk kurva hubungan konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum yang mengalami praperlakuan dengan alkaloid lada 1000 dan 5000 μM . Praperlakuan otot polos ileum dengan alkaloid lada tidak dapat mengembalikan respon kontraksi (*Emax*) menjadi 100%. Pemberian alkaloid lada 1000 μM hanya mencapai Emaks 76,93% dan pemberian alkaloid lada 5000 μM mencapai Emaks 78,68 %. Antagonis non-kompetitif merupakan antagonis yang mampu mengurangi efektifitas suatu agonis melalui mekanisme selain berikatan dengan tempat ikatan agonis. Penambahan konsentrasi agonis pada mekanisme jenis ini tidak mampu menggeser kedudukan antagonis dan mengatasi efek *blocking*-nya. Akibatnya, respon maksimal (*Emax*) tidak dapat mencapai 100% kembali.

4. Uji Reversibilitas Alkaloid Lada Terhadap Reseptor H_1 Otot Polos ileum

Uji reversibilitas bertujuan untuk melihat apakah ikatan alkaloid lada dengan reseptor H_1 dapat terdisosiasi sehingga efek kontraksi ileum terhadap

reseptor dapat kembali seperti sebelum diberikan praperlakuan. Uji dilakukan melalui proses pencucian organ ileum marmut dengan mengganti *buffer tyrode* setiap 5 menit selama 30 menit. Sifat ikatan antagonis alkaloid lada dikatakan reversibel jika nilai pD_2 kontraksi dalam kondisi setelah perlakuan tidak jauh berbeda dengan kontraksi sebelum diberikan praperlakuan. Hasil dapat dilihat pada kurva respon (Gambar 18) bentuk kurva relatif mirip.



Gambar 12. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi pada uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000 μM terhadap reseptor H_1 . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 4 - 10$).

Selain itu nilai pD_2 (Tabel 9) tidak jauh berbeda dan secara statistik tidak ada beda signifikan antara kontrol dan kelompok uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000 μM ($p > 0,005$). Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan ikatan alkaloid lada dapat terlepas setelah pencucian setiap 5 menit selama 30 menit. Dengan kata lain, ikatan alkaloid lada dengan reseptor H_1 masih bersifat reversibel.

Tabel 5. Pergeseran nilai pD2 histamin pada uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000 μM terhadap reseptor H_1 .

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,61 \pm 0,16	100 \pm 0,00
2	Recovery alkaloid lada 1000 μM	5,73 \pm 0,09	92,35 \pm 0,00
3	Recovery alkaloid lada 5000 μM	5,54 \pm 0,23	96,52 \pm 0,00

Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 4 – 10). Tidak ada perbedaan bermakna ($p > 0,05$) terhadap nilai pD2 kontrol histamin, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %.

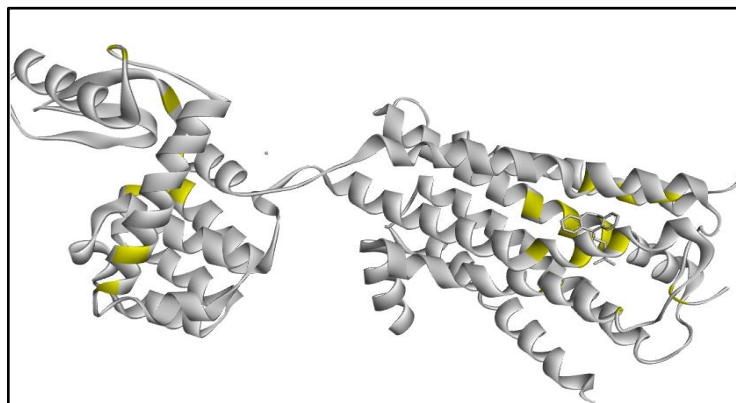
C. Uji *In Silico* Senyawa Piperin Pada Reseptor H_1

1. Validasi protokol *docking*

Sebelum memulai proses *docking*, hal yang perlu dilakukan adalah validasi protokol *docking* terlebih dahulu. Validasi ditunjukkan dengan nilai *RMSD* (*Root Mean Square Distance*). Jika nilai *RMSD* dibawah 2,000 Å maka dapat dikatakan tidak ada pergeseran yang signifikan pada proses *redocking* ligan asli yang berarti protokol *docking* tersebut valid (Paul & Rognan, 2002). *Native ligand* yang digunakan pada tahapan validasi ini adalah doksepin (5EH). Nilai *RMSD* yang diperoleh adalah 1,723 (< 2,0000 Å) dengan skor *docking* -5,6 (Lampiran 15), sehingga dapat diketahui protokol *docking* pada reseptor H_1 ini bersifat valid.

2. Hasil *Molecular Docking*

Aktivitas piperin terhadap reseptor H_1 dapat diteliti melalui uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Aplikasi yang digunakan untuk uji *in silico* pada penelitian ini adalah *AutoDockTools*. Protein yang digunakan sebagai target adalah 3RZE yang merupakan protein reseptor H_1 pada manusia. Sisi aktif 3RZE dapat dilihat pada bagian berwarna kuning pada gambar 19.



Gambar 13. Visualisasi sisi aktif protein reseptor H_1 .

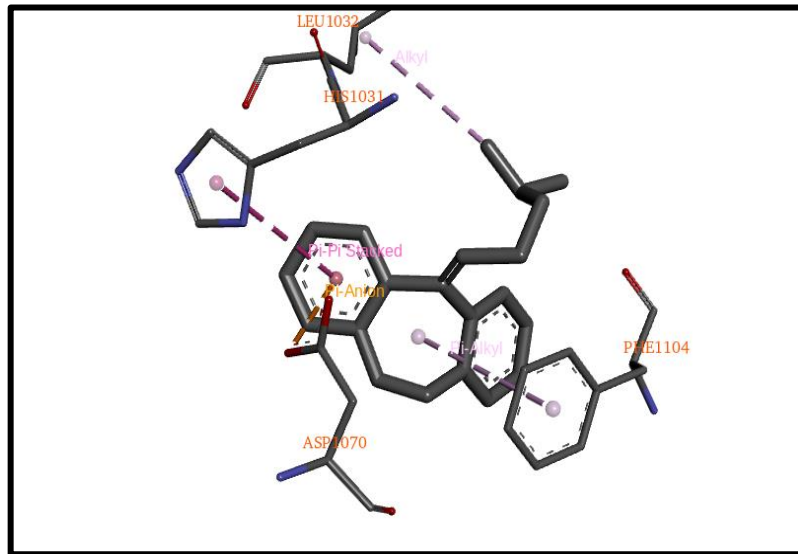
Proses *docking* menghasilkan 10 konformasi yang berisi informasi energi dari masing-masing konformasi. Hasil 10 Konformasi tersebut dilihat pada energi ikatannya untuk memilih konformasi yang terbaik karena nilai energi ikatan menggambarkan kekuatan ikatan yang terjadi antara ligan dan protein. Semakin negatif nilai energi ikatan, maka semakin kuat ikatannya terhadap reseptor. Nilai energi ikatan dan interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada Tabel 10.

Skor piperin sedikit lebih tinggi dibandingkan 5EH sebagai ligan asli dan lebih rendah dibandingkan difenhidramin sebagai antagonis reseptor H_1 . Namun pada uji *in vitro* diketahui alkaloid piperin berperan sebagai antagonis non-kompetitif dimana penghambatan aktivitas reseptor H_1 melalui mekanisme selain berikatan pada tempat duduk yang sama dengan histamin. Perbedaan skor tidak dapat menunjukkan perbandingan kekuatan afinitas masing-masing senyawa terhadap reseptor.

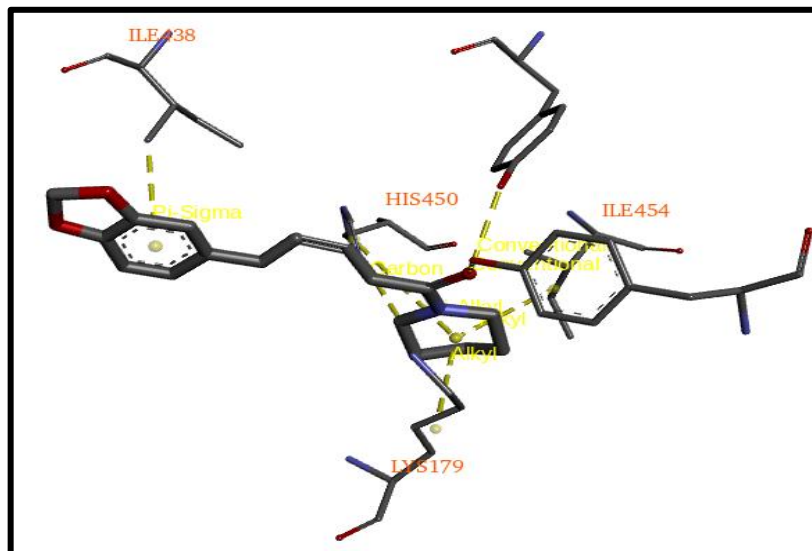
Tabel 6. Nilai energi ikatan dan interaksi ligan dengan residu protein target

Ligan	Energi ikatan (kkl/mol)	Residu protein
Piperin	-5,70	<i>Isoleucine 438</i> <i>Histidine 450</i> <i>Isoleucine 454</i> <i>Lysine 179</i>
Doksepin (5EH) sebagai ligan asli	-5,02	<i>Aspartic acid 107</i> <i>Histidine 1031</i> <i>Leucine 1032</i> <i>Pheninalanine 1104</i>
Difenhidramin	-6,99	<i>Tyrosine 458</i> <i>Tryptophan 428</i> <i>Tyrosine 431</i> <i>Serine 111</i> <i>Tyrosine 108</i> <i>Phenylalanine 432</i>

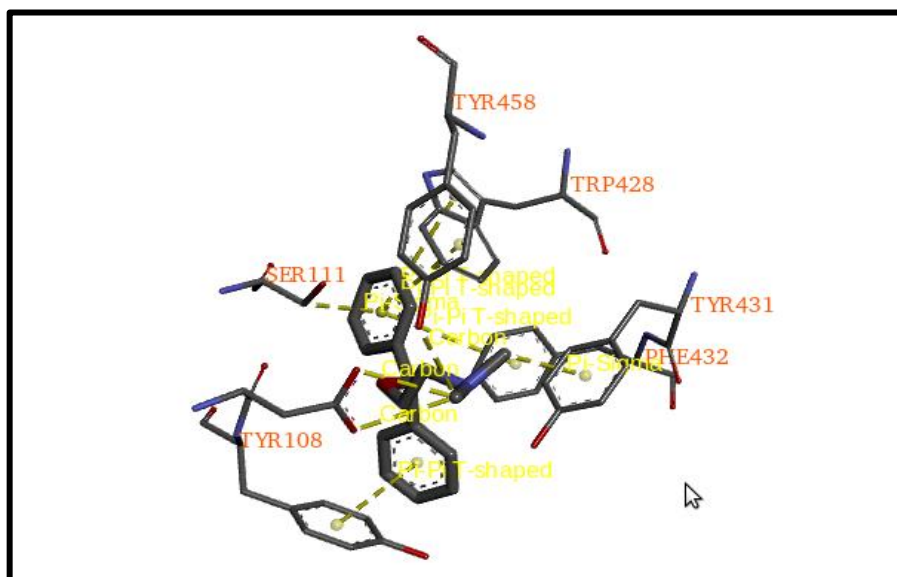
Reseptor H₁ memiliki banyak asam amino, namun hanya sebagian saja yang berperan penting dalam aktivitas histaminergik yaitu *Trp428*, *Asp107*, *Asn198*, *Lys191*, dan *Lys179* (Nugroho *et al.*, 2013). Lebih lanjut menurut Shimamura *et al* (2011) dan Rahim (2010) asam amino *Asp107* and *Trp428* merupakan asam amino yang berperan penting dalam ikatan histamin sebagai antagonis. Pada penelitian ini, dapat diketahui konformasi 5HE (ligan asli) dengan nilai energi ikatan tertinggi (-5,02) berikatan pada residu *Asp107* (Gambar 20), sedangkan konformasi piperin dengan nilai energi ikatan tertinggi (-5,70) berikatan pada *Lys179* (Gambar 21). Difenhidramin sebagai antagonis kompetitif dengan nilai energi ikatan tertinggi (-6,99) berikatan pada asam amino *Trp428* (Gambar 22).



Gambar 14. Interaksi doksepin (ligan asli) dan reseptor H₁. Visualisasi menggunakan aplikasi *DS visualizer*. Ikatan ditopang oleh asam amino *Asp107*, *His1031*, *Leu1032* dan *Phe1104*



Gambar 15. Interaksi piperin dan reseptor H₁. Visualisasi menggunakan aplikasi *DS visualizer*. Ikatan ditopang oleh asam amino *Ile 438*, *His450*, *Ile454*, *Lys179*.



Gambar 16. Interaksi difenhidramin dengan reseptor H_1 . Visualisasi menggunakan aplikasi *DS visualizer*. Ikatan ditopang oleh asam amino *Tyr458*, *Trp428*, *Tyr431*, *Ser111*, *Tyr108* dan *Phe432*.

Dari hasil uji *in silico* tersebut dapat disimpulkan bahwa ligan asli dan difenhidramin berikatan pada kedua asam amino *Asp107* dan *Trp428* yang berperan penting dalam ikatan histamin sebagai antagonis sesuai dengan fungsi difenhidramin yang bekerja sebagai antagonis kompetitif terhadap reseptor H_1 . Sedangkan piperin pada uji *in vitro* alkaloid lada sebelumnya terbukti sebagai antagonis non-kompetitif dan berikatan pada sisi protein *Lys179* yang juga berperan dalam sistem histaminergik. Piperin sebagai antagonis non-kompetitif reseptor H_1 perlu diteliti lebih lanjut lagi bagaimana mekanismenya dalam mengurangi potensi histamin untuk menghasilkan respon kontraksi pada otot polos.