

**UJI AKTIVITAS ANTAGONISME ALKALOID LADA (*Piper nigrum* L.) PADA RESEPTOR HISTAMIN H<sub>1</sub> OTOT POLOS ILEUM MARMUT TERISOLASI : STUDI *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

\*Puguh Novi Arsito \*\*Ratih Dwi Amaliah  
Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta \*  
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta \*\*  
Email:puguh.arsito@gmail.com

**INTISARI**

Senyawa alkaloid utama yang terdapat pada lada (*Piper nigrum* L.) adalah piperin. Piperin merupakan salah satu senyawa aktif *Piper nigrum* L. yang banyak diteliti dan memiliki efek menjanjikan. Piperin dilaporkan dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast dengan jalan menghambat jalur signal yang dimediasi oleh IgE. Oleh karena itu piperin diduga memiliki aksi antagonisme terhadap reseptor histamin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengekstraksi senyawa alkaloid piperin dari *Piper nigrum* L. dan mengetahui pengaruhnya terhadap reseptor H<sub>1</sub>.

Penelitian ini dilakukan dengan mengamati pengaruh alkaloid lada terhadap kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi agonis histamin. Alkaloid diperoleh dari ekstrak buah lada kemudian dilakukan identifikasi piperin menggunakan KLT, FTIR, spektrofotometri UV-Vis dan uji titik lebur. Selanjutnya alkaloid diberikan dengan dosis 1000 µM dan 5000 µM. Pada uji *in vitro* ini juga akan dipelajari tipe antagonisme dari alkaloid dan sifat reversibilitasnya pada reseptor. Dalam penelitian ini juga dilakukan uji *in silico* senyawa piperin terhadap reseptor H<sub>1</sub> menggunakan perangkat lunak *AutoDock*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa alkaloid lada mengandung piperin berdasarkan pada hasil uji FTIR, spektrofotometri UV-Vis dan uji titik lebur. Alkaloid lada juga mampu menghambat kontraksi ileum marmut yang diinduksi agonis histamin. Nilai pD<sub>2</sub> pada reseptor H<sub>1</sub> bergeser secara signifikan pada dosis 5000 µM (p<0,05) dengan tipe antagonis non-kompetitif dilihat dari bentuk kurva respon kontraksi yang tidak mencapai *E<sub>max</sub>* 100%. Hasil uji reversibilitas menunjukkan dengan penggantian *buffer tyrode* setiap 5 menit selama 30 menit ikatan alkaloid dengan reseptor H<sub>1</sub> dapat terdisosiasi. Uji *in silico* menunjukkan bahwa piperin mampu berikatan dengan reseptor H<sub>1</sub> (skor *docking* : -5,70). Piperin berikatan pada asam amino *Lys179* yang merupakan salah satu protein penting dalam aktivitas histaminergik. Kesimpulan penelitian ini adalah alkaloid lada mengandung piperin dan memiliki aktivitas sebagai antagonis non kompetitif pada reseptor H<sub>1</sub>.

Kata kunci : Alkaloid piperin, ileum marmut terisolasi, *in silico* , *Piper nigrum* L., reseptor H<sub>1</sub>.

## ABSTRACT

The main alkaloid found in white pepper (*Piper nigrum* L.) is piperine. Piperine is one of the most studied compound and has promising effect that isolated from *Piper nigrum* L. Piperin was reported may inhibit the release of histamine from mast cells by inhibiting the signal pathway mediated by IgE. Based on the fact, piperin was expected to has the effect of antagonism action at the histamine receptor. The aim of this study was to extracting alkaloid compound from *Piper nigrum* L. and investigate its effects on H<sub>1</sub> receptor.

This research was conducted by investigated the effect of alkaloid of pepper on the guinea pig ileum smooth muscle contraction induced by histamine. Alkaloid was obtained from the pepper extract and then identification of piperin was done by using TLC, FTIR and UV-Vis spectrophotometry and melting point assay. The alkaloid was administered at the doses of 1000 µM and 5000 µM. On this in vitro study, the type of antagonism and reversibility will be investigated. In this study was also conducted in silico study of piperin using the AutoDock software.

The result showed that alkaloid of pepper containing piperine based on the result of the FTIR, UV-Vis spectrophotometry, and melting point assay. Alkaloid also able to inhibit the contraction of isolated guinea pig ileum smooth muscle induced by histamine. The pD<sub>2</sub> values of H<sub>1</sub> receptor shifted significantly on the dose of 5000 µM ( $p < 0.05$ ) with the types of non-competitive antagonists observed from the shape of the contraction response curve that was not reach 100% E<sub>max</sub>. Reversibility assay showed that by replaced buffer tyrode every 5 minutes for 30 minutes, the bond of alkaloid to the receptor able to dissociate. In the in silico study, piperine was observed can be bind to receptors H<sub>1</sub> (docking score :-5.70). Piperine bound at amino acid Lys179 which is one of the important proteins in the histaminergic activity. The conclusion of this research is the alkaloid of pepper containing piperine and has the activity as a non-competitive antagonist at the H<sub>1</sub> receptor.

Keywords : Alkaloid piperine, H<sub>1</sub> receptor, in silico, isolated guinea-pig ileum, *Piper nigrum* L.

## PENDAHULUAN

Indonesia dikenal memiliki kekayaan hayati yang sangat beragam, salah satunya adalah rempah. Tidak hanya dijadikan bumbu masakan, rempah juga seringkali digunakan masyarakat sebagai obat tradisonal untuk berbagai macam penyakit. Tersedianya berbagai jenis rempah ini berpotensi untuk diteliti kandungannya dan dijadikan senyawa penuntun (*lead compound*) ataupun penemuan obat baru.

Salah satu kekayaan rempah yang memiliki potensi besar dijadikan tanaman obat adalah Lada (*Piper nigrum* Linn) famili *Piperaceae*. Tanaman ini berasal dari India dan tumbuh juga di beberapa negara Asia Tenggara lainnya<sup>1</sup>. Di Indonesia juga sering dikenal dengan sebutan merica dan banyak digunakan sebagai bumbu masak. Lada secara tradisional digunakan sebagai obat analgesik, antipiretik, penekan sistem saraf pusat, antiinflamasi, antioksidan, antikonvulsan, anti bakteri, anti tumor, dan memiliki aktivitas hepatoprotektif<sup>2</sup>.

Kandungan yang terdapat pada lada antara lain alkaloid piperin (5-9 %), minyak volatil (1-2,5%), resin (6,0%), piperidin dan pati (sekitar 30%)<sup>1</sup>.

Penelitian mengenai lada sudah cukup banyak dilakukan. Kandungan Alkaloid mendapat perhatian yang khusus karena memiliki aktivitas yang menjanjikan. Sebanyak 5-9% alkaloid yang terdapat pada lada sebagian besar merupakan senyawa piperin<sup>3</sup>. Isolasi piperin dari *Piper nigrum* Linn. dilakukan untuk mengevaluasi efek antiinflamasi pada tikus yang diinduksi karagenin<sup>4</sup>. Pengujian piperin secara *in-vivo* menunjukkan bahwa piperin memiliki efek antiinflamasi, antinosiseptif dan antiarthritis dengan jalan menghambat beberapa mediator inflamasi<sup>5</sup>. Selain itu pengujian campuran ekstrak herbal (*polyherbal*) yang mengandung *Piper nigrum* L. menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin<sup>6</sup>. Penelitian *in-vitro* menunjukkan bahwa piperin dapat menghambat degranulasi pada kultur sel mast (RBL-2H3) melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase(s)*<sup>7</sup>. Selain itu juga ditemukan adanya penurunan level  $Ca^{2+}$  intraselular yang berperan pada penghambatan degranulasi sel mast<sup>8</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah piperin suatu alkaloid *Piper nigrum* Linn. memiliki pengaruh

terhadap kontraksi dan relaksasi otot polos ileum. Efek tersebut diamati berdasarkan selektifitasnya terhadap reseptor yang diduduki histamin. Pengujian dilakukan secara *in-vitro* melalui metode organ ileum marmut terisolasi. Dari penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan data-data yang dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi satu set alat untuk preparasi organ, pengaduk magnet thermostat (Cimarec®), dua set *organ bath* volume 20 mL (Ugo Basile®), *bridge amplifier* tipe 336, mikropipet (Socorex®), labu takar (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), beker glass (Pyrex®), satu set alat sokletasi, *Rotary Evaporator* (IKA®RV10), timbangan analitik (Mettler Toledo®), pengaduk, corong, cawan porselin, penggaris, pipa kapiler, pipet ukur, pipet tetes, kertas saring (Whatman 40), aluminium foil (Brand), plat silika gel 60 GF<sub>254</sub>, Spektroskopi IR Shimazu FTIR 8201PC Spektroskopi IR Shimazu FTIR 8201PC, komputer yang terinstal software *molecular docking Autodock* dan *LabScribe2*. Sistem operasi yang diinstal adalah *Linux Ubuntu* 12.04 LTS 64-bit dan aplikasi pendukung seperti *Marvin Sketch*, *AutoDockTools* 4.2, serta *DS Visualizer*. Berkas protein / reseptor yang digunakan

adalah reseptor *Histamine H<sub>1</sub>* dengan kode protein 3RZE. Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa piperin, doksepin (ligan asli) dan difenhidramin.

Zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal alkaloid lada dari *Piper nigrum L.* yang sudah dilakukan determinasi di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Sebelumnya kristal diperoleh dengan menggunakan metode sokhletasi menggunakan pelarut etilasetat (Brataco®) dengan perbandingan serbuk lada dan pelarut (1: 3). Filtrat hasil sokhletasi di epaporator hingga agak mengental dan didiamkan di suhu ruang terlindung dari cahaya hingga terbentuk kristal. Kristal selanjutnya dicuci dengan alkohol 96%(Brataco®). Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer tyrode*, gas karbogen (mengandung 95% oksigen dan 5% karbondioksida), agonis reseptor histamin (Sigma, USA), larutan difenhidramin (Recodryl®), akuades (Brataco®), pelarut dimetil sulfoksida (DMSO).

#### **Uji identifikasi kristal alkaloid lada menggunakan KLT**

Kristal alkaloid lada dilarutkan dengan metanol untuk selanjutnya ditotolkan pada plat Silika dengan fase gerak BAW (4:1:5). Perbandingan

menggunakan kuinin sulfat yang dilarutkan dengan metanol dan ditotolkan pada sisi sebelah kanan tempat penotolan alkaloid. Bercak selanjutnya diamati dengan sinar UV 254 nm dan pereaksi *dragendorff*.

#### **Identifikasi piperin pada kristal alkaloid lada menggunakan FTIR**

Sampel disampur dengan KBr kemudian dimasukkan dalam wadah uji dan spektra serapannya direkam pada bilangan gelombang 500-4000 cm<sup>-1</sup>.

#### **Identifikasi piperin pada alkaloid lada dengan Spektrofotometri UV-Vis**

Sebanyak 10 mg kristal dilarutkan dalam 10 ml methanol kemudian diencerkan hingga konsentrasi 10µg/ml. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Visas.

#### **Identifikasi kemurnian alkaloid lada dengan Uji Titik Lebur**

Sampel diletakkan pada pipa kapiler pada termometer dan mikroskop diatur hingga sampel tampak jelas. *Auto thermal controller* diatur pada temperatur yang lebih tinggi dari titik lebur senyawa uji. Alat pengontrol diatur dengan kenaikan temperatur mula-mula kecepatan 5°C/menit, ketika mendekati titik lebur senyawa uji, turunkan kecepatan menjadi 2°C/menit. Temperatur dicatat saat kristal mulai meleleh hingga semua kristal meleleh.

### Uji *In vitro*

Tahap pertama yang dilakukan adalah menguji efek dari 100  $\mu$ L DMSO terhadap kontraksi otot polos ileum yang diinduksi histamin. Tujuan pengujian ini adalah untuk memastikan bahwa DMSO yang digunakan sebagai pelarut alkaloid lada tidak akan berefek pada respon kontraksi ileum. Aktivitas alkaloid lada sebagai antagonis terhadap reseptor histamin  $H_1$  diamati dari pergeseran kurva respon kontraksi ileum yang diinduksi histamin. Kontraksi diinduksi dengan pemberian seri kadar kumulatif histamin  $10^{-3}$  sampai dengan  $3 \times 10^{-2}$  M.

Organ *bath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer tyrode*, kemudian ileum direndam dalam organ *bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrase sampai diperoleh kondisi stabil. Pengukuran kontraksi dilakukan dalam dua tahap dimana antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap 5 menit. Kontraksi diukur secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis ke dalam organ *bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (100%). Pada pengukuran kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian

alkaloid lada konsentrasi 1000  $\mu$ L dan 5000  $\mu$ L. Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam organ *bath* seperti pada pengukuran pertama.

Uji reversibilitas dilakukan dengan tujuan untuk mengamati kemampuan jaringan organ kembali ke kondisi basal setelah diberikan alkaloid lada. Uji dilakukan untuk mengevaluasi reversibilitas dari ikatan antara senyawa dengan reseptor. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan kontraksi sebelum diberikan praperlakuan dan setelah praperlakuan dengan pencucian organ menggunakan *buffer tyrode* selama 30 menit setiap 5 menit. Kurva yang dihasilkan selanjutnya dibandingkan.

Uji pembandingan juga dilakukan dengan metode yang sama persis dengan alkaloid lada menggunakan antihistamin difenhidramin. Uji ini untuk melihat apakah metode sudah valid dengan mengamati kurva respon kontraksi ileum tanpa dan dengan pemberian antihistamin difenhidramin.

### Uji *In Silico*

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *Auto Grid 4.2* dan *AutoDock 4.2* melalui *Cygwin Terminal*. File hasil preparasi sebelumnya yang meliputi *Target.pdbqt*, *Ligand.pdbqt*, *parameter file (\*.gpf)*, dan *docking parameter file (\*.dpf)* disimpan dalam 1 folder pada *Cygwin*

*Terminal*. Hasil simulasi *docking* ini berupa *file* dengan format \*.dlg yang berisi informasi 10 konformasi dan *file* complex.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil.

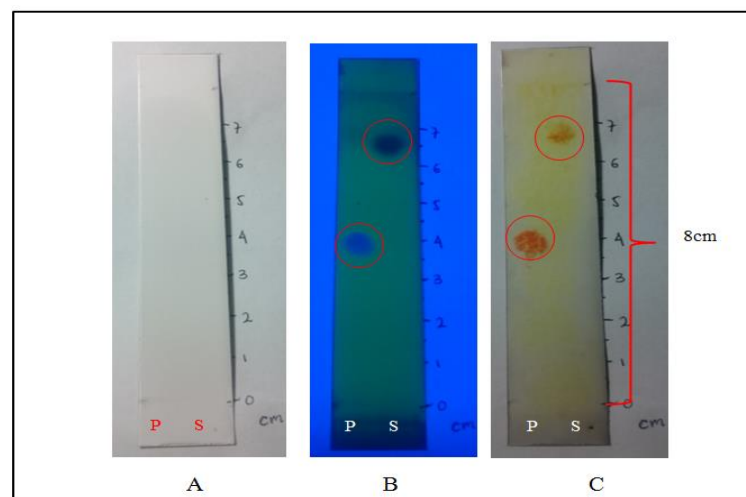
Setelah didapatkan skor penambatan yang terbaik dari beberapa konformasi, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi DS *Visualizer*. Aplikasi DS *Visualizer* akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 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 GF<sub>254</sub> yang bersifat polar<sup>9</sup>. Plat KLT dibuat dengan panjang 10 cm dengan

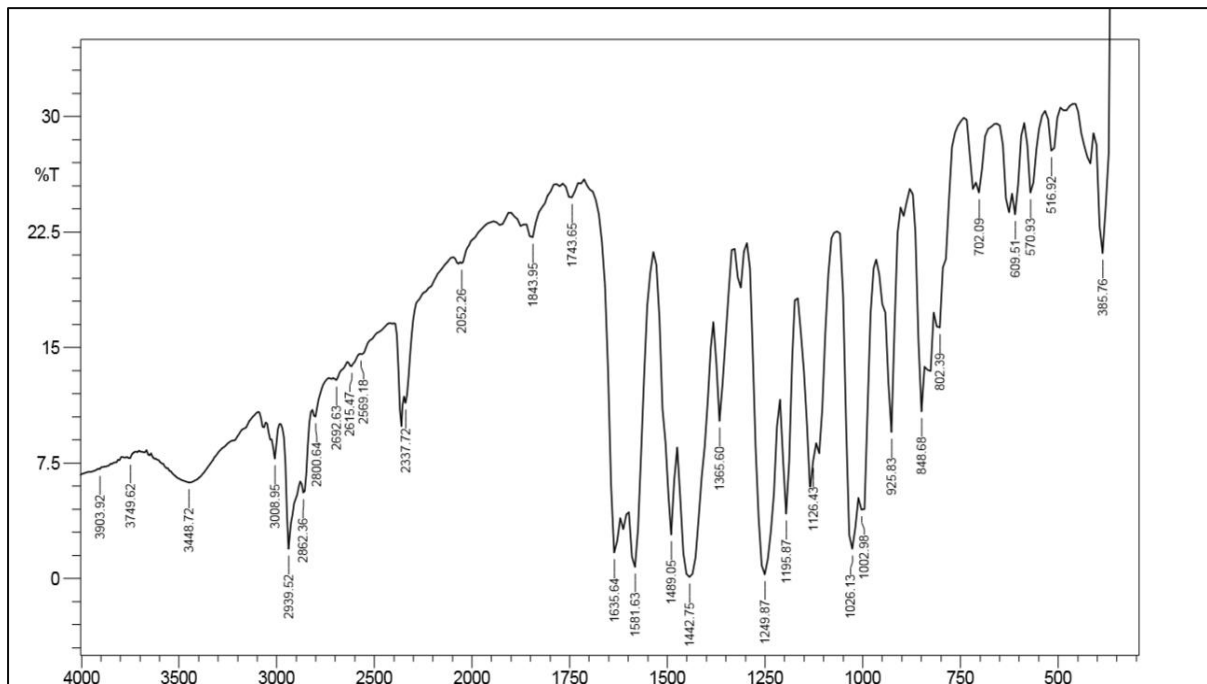
jarak elusidasi 8 cm. Deteksi bercak dilakukan dengan sinar UV 254, lempeng akan berfluoresensi dan bercak sampel akan tampak berwarna gelap (Gambar 1 (B)). Pada fase gerak BAW, bercak alkaloid berada di atas (Rf= 0,82) sedangkan senyawa pembanding alkaloid kinin sulfat berada di tengah (Rf=0,5). Senyawa yang mempunyai Rf 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 Rf 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.



**Gambar 1.** Uji identifikasi KLT senyawa alkaloid lada. Keterangan: (A) sebelum disemprot pereaksi *dragendorff*, (B) diamati pada sinar UV 254, (C) setelah disemprot pereaksi *dragendorff*. (P) pembanding menggunakan kinin sulfat (Rf=0,5), (S) Alkaloid lada (Rf=0,82)

Selanjutnya dilakukan deteksi alkaloid melalui penampakan bercak menggunakan pereaksi *dragendorff*. Hasil penampakan bercak pada cahaya tampak dapat dilihat pada Gambar 1(C). Uji dengan pereaksi *dragendorff* memberikan hasil yang

positif jika terbentuk endapan coklat muda sampai kuning (jingga)<sup>10</sup>. Hasil pada Gambar 1(C) menunjukkan bahwa bercak kristal yang diperoleh (S) berubah warna menjadi jingga. Hal tersebut juga terjadi pada bercak pembanding (P).



Gambar 2. FTIR kristal alkaloid lada

### Uji *FTIR* piperin pada kristal alkaloid lada

Uji *FTIR* bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan piperin pada kristal alkaloid lada berdasarkan serapan infra merah gugus fungsinya. Hasil *FTIR* dapat dilihat pada gambar 2.

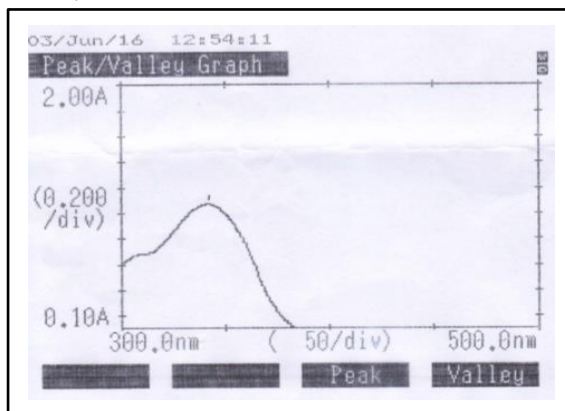
Senyawa piperin merupakan senyawa turunan piperidin yang terdiri dari cincin *benzodioxole* dan amina tersier alisiklik yang dihubungkan oleh karbonil terkonjugasi  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Gugus ikatan C=C

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  $1715 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>11</sup> Adanya efek resonansi ketika elektron tidak berpasangan pada atom nitrogen dan

ikatan  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated pada gugus karbonil memunculkan karakteristik menyerupai ikatan tunggal sehingga menggeser absorpsi ke daerah gelombang yang lebih pendek<sup>12</sup>. Data spektrum IR tersebut menunjukkan bahwa kristal alkaloid yang diperoleh memiliki keseusaian gugus fungsi senyawa piperin. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa piperin terdapat pada alkaloid lada tersebut.

### 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<sup>13</sup>.



Gambar 3. Hasil uji spektrofotometer UV-Vis ( $\lambda_{max}=342,5$ ,  $A=1,075$ )

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 ( $\epsilon = 30.675,125$ ). 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. Konjugasi gugus enon memiliki nilai absorptivitas  $> 10.000$ . Nilai absorptivitas ( $\epsilon$ ) alkaloid adalah  $> 10.000$  sehingga sistem kromofor yang terdapat pada struktur piperin termasuk dalam gugus enon<sup>12</sup>.

### 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<sup>14</sup>. Namun, kristal yang murni memiliki rentang temperatur sempit yaitu 1-2°C<sup>15</sup>. Sedangkan kristal yang diperoleh memiliki rentang yang lebar. Pelebaran rentang temperatur di atas 5°C mengindikasikan kristal kurang murni. Senyawa lain



megacaukan konsistensi dan bentuk ikatan kristal pada level molekuler. Gangguan tersebut melemahkan struktur ikatan yang menyebabkan ikatan lebih mudah terurai sehingga batas bawah temperatur turun dan rentang temperatur menjadi melebar.

### Uji *In Vitro*

Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid yang diketahui memiliki efek menghambat degranulasi pada kultur sel mast melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase*<sup>7</sup>. Selain itu, pengujian campuran ekstrak hebal mengandung *Piper nigrum L.* menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin<sup>6</sup>. Ada kemungkinan piperin juga memiliki mekanisme spasmolitik dengan jalan menghambat aktivasi dari reseptor H<sub>1</sub>. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk membuktikan aktivitas antagonis alkaloid lada pada reseptor H<sub>1</sub>.

Mekanisme terjadinya kontraksi oleh histamin ketika berinteraksi dengan reseptor H<sub>1</sub> ileum adalah melalui rangsangan pada reseptor H<sub>1</sub> yang terhubung pada protein G atau disebut dengan *G-protein-coupled Resetor (GPCR)* melalui jalur fosfolipase C (PLC). Selanjutnya PLC yang telah teraktivasi akan mengkatalis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat (PIP<sub>2</sub>), membentuk inositol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) dan

diasil gliserol (DAG). IP<sub>3</sub> yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP<sub>3</sub> pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potential Channels (TRPC)* dan mengakibatkan pelepasan Ca<sup>2+</sup> dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca<sup>2+</sup> intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium di permukaan membran sel<sup>16</sup>. Dengan aktifnya kanal kalsium menyebabkan influks Ca<sup>2+</sup> ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar Ca<sup>2+</sup> intraseluler yang menginduksi terjadinya kontraksi otot polos<sup>17</sup>.

Mekanisme Peningkatan kadar Ca<sup>2+</sup> intraseluler yang berasal dari aktivasi GPCR atau kanal ion dapat menyebabkan kontraksi pada otot polos adalah dengan cara Ca<sup>2+</sup> berikatan dengan reseptor calmodulin (CaM). Calmodulin merupakan suatu protein pengikat Ca yang tidak memiliki aktivitas enzim. Calmodulin akan bekerja setelah membentuk kompleks dengan Ca<sup>2+</sup>/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<sup>18</sup>. Alkaloid lada dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor H<sub>1</sub> apabila dapat mengurangi potensi histamin

dalam menginduksi kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi. Uji *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas senyawa piperin pada alkaloid lada yang diduga memiliki efek sebagai antagonis reseptor H<sub>1</sub>. Pada uji ini digunakan alkaloid lada konsentrasi 1000 μM dan 5000 μM.

**1. Uji Pendahuluan pengaruh DMSO terhadap kontraksi otot polos ileum**

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

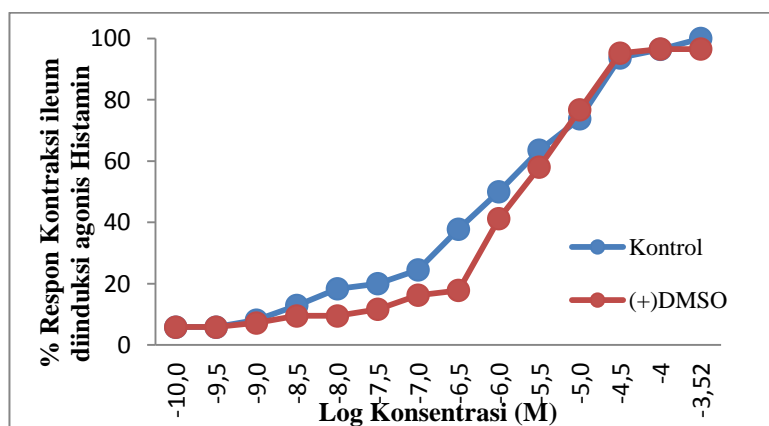
menjamin bahwa penurunan efek kontraksi hanya disebabkan oleh alkaloid lada saja. DMSO yang digunakan adalah sebesar 100μL sesuai dengan volume pemberian alkaloid lada pada *organ bath*.

Hasil uji menunjukkan adanya sedikit pergeseran pada kurva (Gambar 4) disertai dengan penurunan nilai pD<sub>2</sub> DMSO (Tabel 1). 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 1.** Nilai rata-rata pD<sub>2</sub> histamin karena pengaruh DMSO 100μL (n=5, rata-rata ± SEM).

No	Kelompok Perlakuan	pD <sub>2</sub>	Emaks (%)	pD <sub>2</sub>
1	Kontrol Histamin	5,84 ± 0,12	100 ± 0,00	5,84 ± 0,12
2	DMSO 100 μM	5,72± 0,13	100 ± 0,00	5,72± 0,13

Keterangan : Berdasarkan uji signifikansi menggunakan *paired t-test* dengan kepercayaan 95 %, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p>0,05$ ) antara perlakuan pD<sub>2</sub> kontrol dan DMSO.



**Gambar 4.** 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 μL (n=5, rata-rata ± SEM).

**2. Uji Pembanding menggunakan Difenhidramin (Kontrol Positif)**

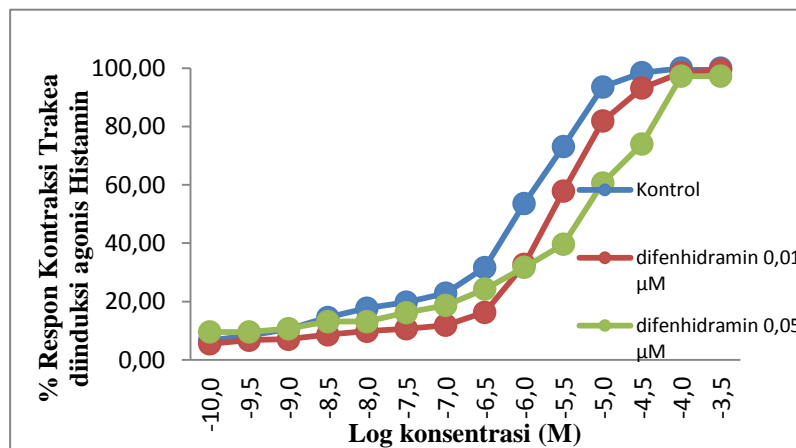
Reseptor H<sub>1</sub> telah teridentifikasi pada vertebrata dan diketahui banyak

terdistribusi pada permukaan otot polos ileum marmut. Aktivasi reseptor H<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> generasi pertama dengan efek sedatif dan anti alergi.

Difenhidramin secara kompetitif menghambat reseptor H<sub>1</sub>. 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<sub>1</sub>.



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

Hasil menunjukkan uji difenhidramin memberikan efek relaksasi dilihat dari pergeseran kurva ke arah kanan (Gambar 5) dan penurunan nilai pD<sub>2</sub> (Tabel 2). Bentuk kurva menunjukkan respon kontraksi (Emaks) 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<sub>50</sub> dapat tercapai dengan penambahan konsentrasi agonis yang lebih besar dan respon maksimal (Emaks) dapat kembali 100% seperti sebelum diberikan antagois. Hal tersebut menunjukkan bahwa difenhidramin merupakan antagonis kompetitif terhadap reseptor H<sub>1</sub>.

Selain itu, jenis antagonis juga dapat ditentukan melalui analisa *Schild-Plot*. 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 H<sub>1</sub>.

**Tabel 2.** Pergeseran nilai pD2 histamin karena pengaruh difenhidramin 0,01 dan 0,05 µM.

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

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

### 3. Pengaruh Alkaloid lada Terhadap Reseptor H<sub>1</sub> Otot Polos Ileum

Pengaruh alkaloid lada terhadap reseptor H<sub>1</sub> 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 H<sub>1</sub>. Potensi tersebut dapat diukur dengan Respon kontraksi otot polos ileum terisolasi 100 % tercapai pada pemberian histamin eksogen  $3 \times 10^{-4}$  M.

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

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.

Histamin dapat memicu kontraksi setelah berikatan dengan reseptor H<sub>1</sub> pada otot polos ileum. Pemberian konsentrasi bertingkat histamin eksogen mengakibatkan peningkatan % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi.

diinduksi oleh histamin eksogen dengan pola tergantung konsentrasi. Pengurangan respons kontraksi ini terjadi terutama pada pemberian histamin konsentrasi rendah. Profil kurva (Gambar 6) menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi histamin

terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi.

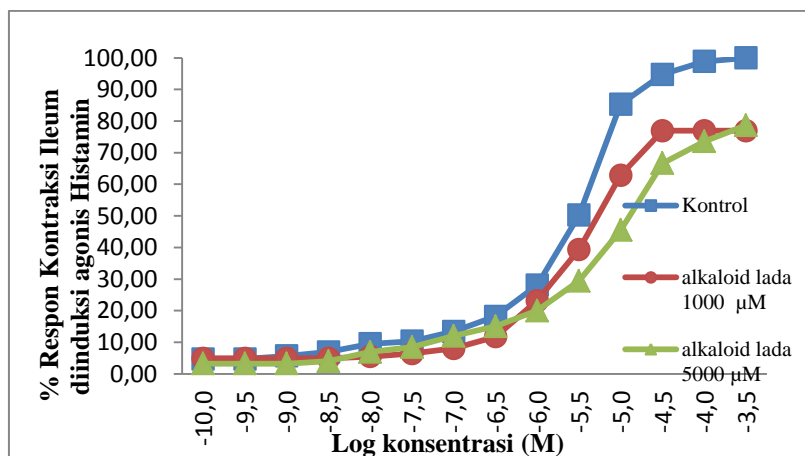
Pergeseran kurva menunjukkan adanya penurunan kemampuan histamin dalam memicu respon kontraksi otot polos ileum karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$ , keadaan tersebut ditandai dengan terjadinya

penurunan nilai pD2 histamin (Tabel 3). Nilai pD2 histamin untuk perlakuan kontrol, alkaloid lada 1000  $\mu\text{M}$  dan 5000  $\mu\text{M}$  berturut-turut adalah sebesar 5,61, 5,24 dan 4,94. Penurunan nilai pD2 alkaloid lada dosis 5000  $\mu\text{M}$  bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 3.** Pergeseran nilai pD2 histamin karena pengaruh alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$ .

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,61 ± 0,12	100 ± 0,00
2	Alkaloid lada 1000 $\mu\text{M}$	5,24 ± 0,16	76,93 ± 0,00
3	Alkaloid lada 5000 $\mu\text{M}$	4,94 ± 0,52*	78,68 ± 0,00

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



**Gambar 6.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$ . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM (n = 4-10)

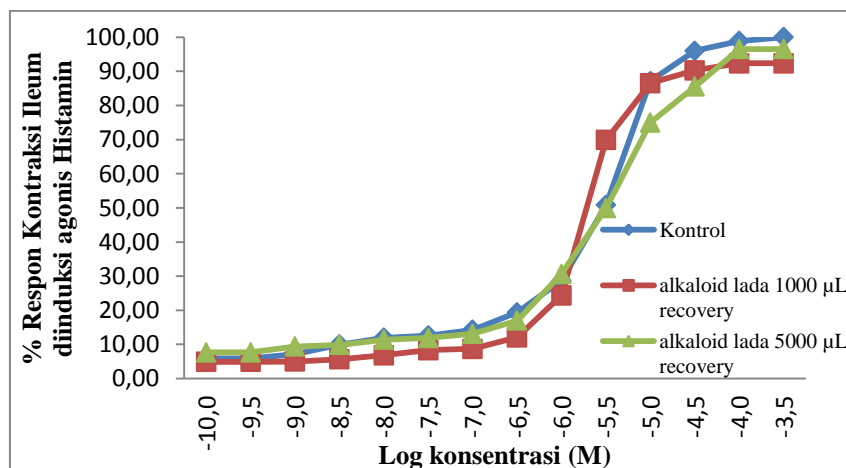
Penurunan nilai pD2 histamin karena pengaruh praperlakuan alkaloid lada membuktikan bahwa alkaloid lada memiliki efek antagonis terhadap reseptor H<sub>1</sub> otot polos ileum. Untuk menetapkan tipe antagonis alkaloid lada, dapat dilihat pada bentuk kurva hubungan konsentrasi

histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum yang mengalami praperlakuan dengan alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$ . Praperlakuan otot polos ileum dengan alkaloid lada tidak dapat mengembalikan respon kontraksi (Emaks) menjadi 100%. Pemberian alkaloid lada 1000  $\mu\text{M}$  hanya

mencapai Emaks 76,93% dan pemberian alkaloid lada 5000  $\mu\text{M}$  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 (Emaks) 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 7) bentuk kurva relatif mirip.



**Gambar 7.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi pada uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$  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 4) tidak jauh berbeda dan secara statistik tidak ada beda signifikan antara kontrol dan kelompok uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,005$ ). 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 4.** Pergeseran nilai pD2 histamin pada uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor  $\text{H}_1$ .

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,61 $\pm$ 0,16	100 $\pm$ 0,00
2	Recovery alkaloid lada 1000 $\mu\text{M}$	5,73 $\pm$ 0,09	92,35 $\pm$ 0,00
3	Recovery alkaloid lada 5000 $\mu\text{M}$	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 ANAVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

## Uji In Silico Senyawa Alkaloid Lada Pada Reseptor $\text{H}_1$

### 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. *Native ligand* yang digunakan pada tahapan validasi ini adalah doksepim (5EH). Nilai RMSD yang diperoleh adalah 1,723 (< 2,0000 Å) dengan skor *docking* -5,6, sehingga dapat diketahui protokol *docking* pada reseptor  $\text{H}_1$  ini bersifat valid.

### 2. Hasil *Molecular Docking*

Aktivitas piperin terhadap reseptor  $\text{H}_1$  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  $\text{H}_1$  pada manusia.

Proses *docking* menghasilkan 10 konformasi yang berisi informasi energi dari masing-masing konformasi. Hasil dari 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 5.

Skor piperin sedikit lebih tinggi dibandingkan 5EH sebagai ligan asli dan lebih rendah dibandingkan difenhidramin sebagai antagonis reseptor  $\text{H}_1$ . Namun pada uji *in vitro* diketahui alkaloid piperin berperan sebagai antagonis non-kompetitif dimana penghambatan aktivitas reseptor  $\text{H}_1$  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 5.** 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>
Doksepim (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 H<sub>1</sub> memiliki banyak asam amino, namun hanya sebagian saja yang berperan penting dalam aktivitas histaminergik yaitu *Trp428*, *Asp107*, *Asn198*, *Lys191*, dan *Lys179*<sup>19</sup>. Lebih lanjut lagi asam amino *Asp107* and *Trp428* merupakan asam amino yang berperan penting dalam ikatan histamin sebagai antagonis<sup>20,21</sup>. Pada penelitian ini, dapat diketahui konformasi 5HE (ligan asli) dengan nilai energi ikatan tertinggi (-5,02) berikatan pada residu *Asp107*, sedangkan konformasi piperin dengan nilai energi ikatan tertinggi (-5,70) berikatan pada *Lys179*. Difenhidramin sebagai antagonis kompetitif dengan nilai energi ikatan tertinggi (-6,99) berikatan pada asam amino *Trp428*.

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<sub>1</sub>. 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<sub>1</sub> perlu diteliti lebih lanjut lagi bagaimana mekanismenya dalam mengurangi potensi histamin untuk menghasilkan respon kontraksi pada otot polos.



## KESIMPULAN

1. Kristal alkaloid lada yang diperoleh mengandung senyawa piperin berdasarkan uji FTIR, uji spektrofotometri UV-Vis dan uji titik lebur.
2. Alkaloid lada mampu bertindak sebagai antagonis dilihat dari penurunan nilai pD<sub>2</sub>.
3. Alkaloid lada bertindak sebagai antagonis non kompetitif dilihat dari respon maksimal kontraksi yang tidak kembali mencapai 100% seperti sebelum diberikan antagonis.
4. Uji *in silico* menunjukkan piperin dapat berikatan pada reseptor H<sub>1</sub> (Skor *docking* :-5,70), namun skor tidak dapat digunakan untuk membandingkan afinitas piperin karena piperin merupakan antagonis non-kompetitif.
5. Uji *in silico* menunjukkan piperin dapat berikatan pada protein *Lys179* yang merupakan salah satu protein penting dalam aktivitas histaminergik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Lembaga Penelitian, Publikasi, dan Pengabdian Masyarakat Universitas Muhammadiyah Yogyakarta atas dana unggulan Prodi Farmasi yang mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- <sup>1</sup>Madhavi, B. B., Nath, A. R., Banji, D., Madhu, M. N., Ramalingam, R., & Swetha, D., (2009), Extraction, identification, formulation and evaluation of alkaloid ladae in alginate beads, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 156-161.
- <sup>2</sup>Pei, Y. Q., (1983), A review of pharmacology and clinical use of alkaloid ladae and its derivatives, *Epilepsia*, 24(2), 177-182.
- <sup>3</sup>Epstein, W. W., Netz, D. F., & Seidel, J. L., (1993), Isolation of alkaloid ladae from black pepper, *Journal of Chemical Education*, 70, 598
- <sup>4</sup>Mujumdar, A. M., Dhuley, J. N., Deshmukh, V. K., Raman, P. H., & Naik, S. R., (1990), Anti-inflammatory activity of alkaloid ladae, *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 43(3), 95-100.
- <sup>5</sup>Bang, J. S., Choi, H. M., Sur, B. J., Lim, S. J., Kim, J. Y., Yang, H. I., & Kim, K. S., (2009), Anti-inflammatory and antiarthritic effects of alkaloid ladae in human interleukin 1 $\beta$ -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models, *Arthritis research & therapy*, 11(2), R49.
- <sup>6</sup>Antony, A. S., JayaSankar, K., Roy, P. D., Vadivelan, R., Satish Kumar, M. N., & Elango, K., (2010), Pharmacological and biomolecular investigations of a polyherbal formulation (AAF-6) for its antiasthmatic activity, *International Journal of Green Pharmacy*, 4(4), 257.
- <sup>7</sup>Bojjireddy, N., Sinha, R. K., & Subrahmanyam, G., (2014), Alkaloid

- ladae inhibits type II phosphatidylinositol 4-kinases: a key component in phosphoinositides turnover, *Molecular and cellular biochemistry*, 393(1-2), 9.
- <sup>8</sup>Huang, J., Zhang, T., Han, S., Cao, J., Chen, Q., & Wang, S., (2014), The inhibitory effect of alkaloid ladae from Fructus piperis extract on the degranulation of RBL-2H3 cells, *Fitoterapia*, 99, 218-226.
- <sup>9</sup>Gandjar, I.G., & Abdul Rohman, (2007), *Kimia Farmasi Analisis, Pustaka Pelajar*, Yogyakarta.
- <sup>10</sup>Marliana, Soerya Dewi, Venty, S., Suyono, (2005), *Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol*, *Biofarmasi* 3 (1): 26-31, Februari 2005, ISSN: 1693-2242.
- <sup>11</sup>Silverstein, M. Robert, Webster, X. Francis, Kiemle, J. David, (2005), *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th Ed*, State University of New York : College of Environmental Science & Forest.
- <sup>12</sup>Pavia, D. L. (2000), *Introduction to Organic Laboratory Techniques, Third Edition*, United state : Brooks Cole/Thomson (Page: 91-93)
- <sup>13</sup>Vishvnath, G., & Jain, U. K., (2011), Quantitative analysis of piperine in ayurvedic formulation by UV Spectrophotometry, *Int J Pharm Sci Res (IJPSR)*, 2, 58-61.
- <sup>14</sup>Adosraku, R K., James, O K., Isaac, Y A, (2013), Characterization And HPLC Quantification Of Piperine Isolated From *Piper Guineense* (Fam. Piperaceae), *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 5, Issue 1, 2013 ISSN-0975-1491.
- <sup>15</sup>Hart, H., Craine, L. E., & Hart, D. J., (1999), *Organic chemistry: A short course*, Boston: Houghton Mifflin Co.
- <sup>16</sup>Sanders, K.M., (2001), Invited Review: Mechanisms of Calcium Handling in Smooth muscles, *J.Appl .Physiol*91: 1438–1449
- <sup>17</sup>Gosens, R., Zaagsma, J, Meurs, H. and Halayko, A.J., (2006), Muscarinic Receptor Signaling in the Pathophysiology of Asthma and COPD, *Respir.Res*.7(1) : 73-8
- <sup>18</sup>Lodish, H., Berk, A., Zipursky, A.L, Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., (2000), *Molecular Cel Biology*, 4<sup>th</sup> ed, Freeman and Company, New York.
- <sup>19</sup>Nugroho, A. E., Agistia, D. D., Tegar, M., & Purnomo, H., (2012), Interaction of active compounds from *Aegle marmelos* CORREA with histamine-1 receptor, *Bioinformation*, 9(8), 383-387.
- <sup>20</sup>Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., & Kobayashi, T., (2011), Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin, *Nature*, 475(7354), 65-70.
- <sup>21</sup>Rahim, F., (2010), An in silico development of selective inhibitor for histamine receptors, *Biotechnology*, 9(2), 157-16.