

BAB IV

PEMBAHASAN

A. Isolasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Untuk mendapatkan kristal alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn, lada melalui proses ekstraksi, metode yang digunakan adalah metode sokhletasi dengan pelarut etil asetat. Metode ini memiliki banyak keuntungan yang dapat diperoleh, salah satunya karena metode ini hanya memerlukan pelarut sedikit. Pelarut etil asetat merupakan pelarut senyawa alkaloid semi polar dengan indeks polaritas 4,4, sehingga dapat menarik piperin yang merupakan senyawa alkaloid semi polar. Pada penelitian yang dilakukan oleh Shingate *et al* (2013) nilai indeks polaritas etil asetat tidak jauh berbeda dengan nilai indeks polaritas tiga pelarut yang digunakan dalam penelitiannya, sehingga etil asetat cocok digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi alkaloid piperin dalam lada putih.

Kristal alkaloid piperin diperoleh dari proses ekstraksi yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya oleh Amaliah (2015). Proses ekstraksi yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya menggunakan 100 gram serbuk simplisia dengan 300ml etil asetat (1:3). Sebelum kristal alkaloid piperin terbentuk, dilakukan proses evaporasi atau pemekatan dengan menggunakan rotary evaporator, kemudian ekstrak kental yang didapat disimpan dalam wadah tertutup selama 7 hari sehingga terbentuk kristal alkaloid lada (*Piper nigrum* Linn), kristal yang terbentuk dicuci menggunakan etanol 96% sebanyak 20ml untuk menghilangkan zat-zat pengotor yang ada dipermukaan kristal, pencucian dilakukan sebanyak 3 kali hingga diperoleh kristal berwarna kuning keputihan.

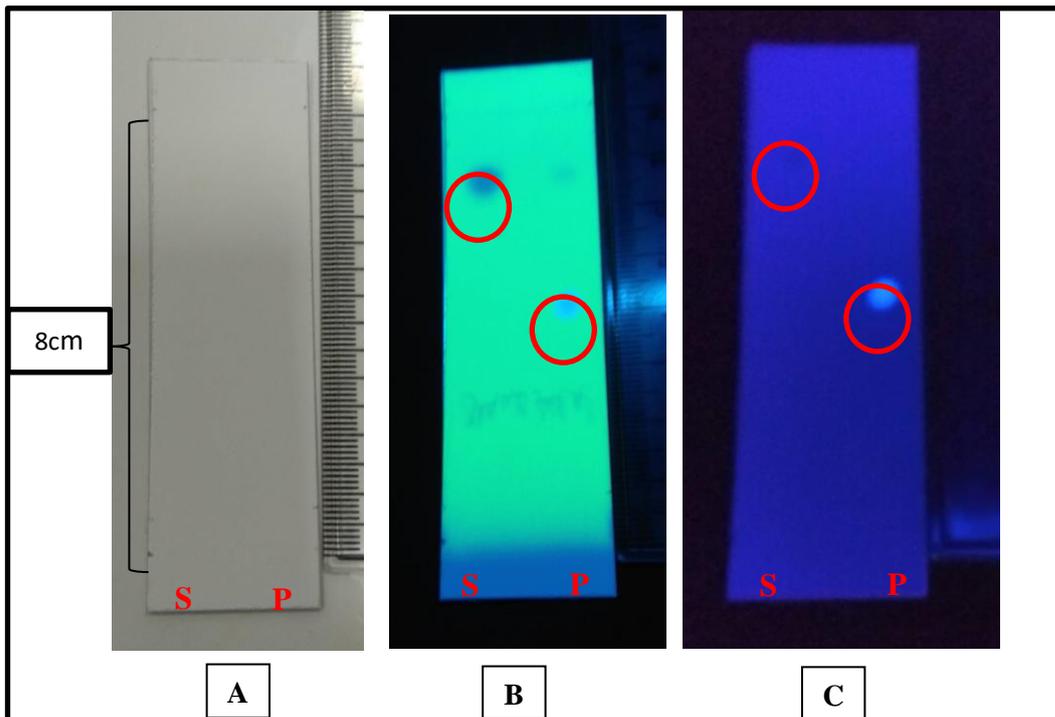
1. Uji KLT Kandungan Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Analisis menggunakan KLT bertujuan untuk mengetahui kandungan piperin dalam kristal yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah n-butanol : asam asetat : air (4 : 1: 5) dan fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 yang bersifat polar. Silika dipotong sebesar 10 cm x 3 cm dengan jarak elusidasi 8 cm, dan di deteksi menggunakan sinar tampak UV 254 nm, dan 366 nm sebelum dan sesudah diberi pereaksi dragendorff.

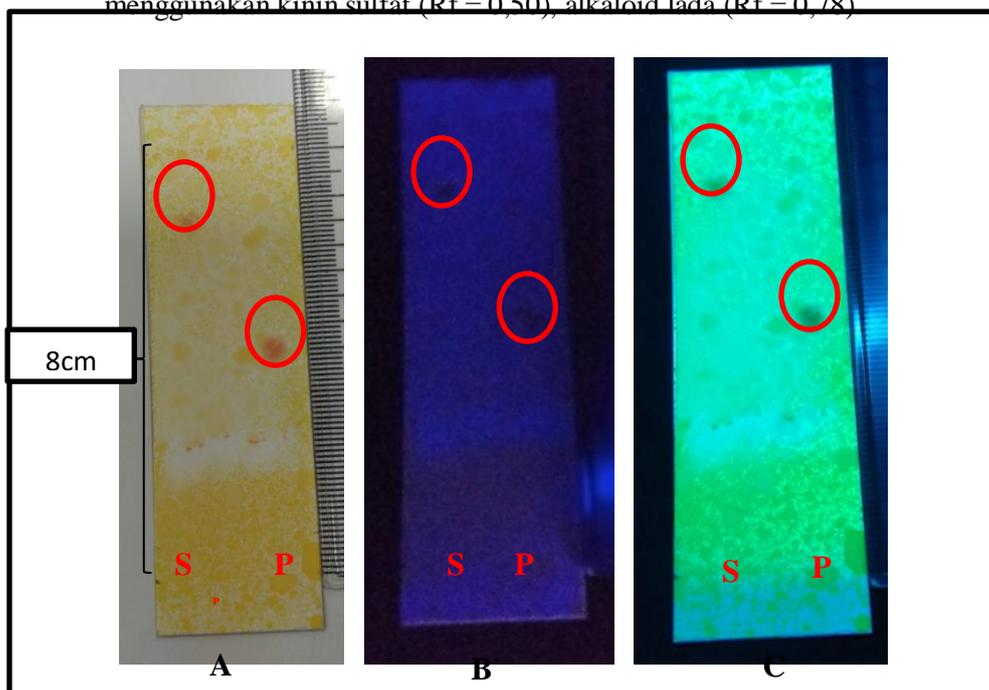
Didapatkan nilai bercak piperin berada di atas nilai RF 0,78 sedangkan pembanding kinin berada pada tengah jalur elusidasi nilai RF 0,50. Semakin tinggi nilai RF yang diperoleh maka senyawa yang terdeteksi mempunyai kepolaran senyawa yang semakin rendah. Senyawa yang lebih polar akan memiliki nilai RF yang lebih rendah dikarenakan senyawa tertahan oleh fase diam yang bersifat polar.

Senyawa kinin yang diuji adalah senyawa kinin dalam bentuk garamnya sehingga nilai RF yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan nilai RF yang didapatkan dari senyawa piperin dalam bentuk bebas.

Kemudian dilakukan penampakan bercak menggunakan pereaksi *dragendorff*. Uji dengan pereaksi *dragendorff* memberikan hasil yang positif jika terbentuk endapan coklat muda sampai kuning jingga (Marliana *et al*, 2005). Hasil pada Gambar 3 menunjukkan bahwa kristal yang diperoleh merupakan kristal alkaloid. Uji dengan pereaksi *dragendorff* memberikan hasil positif alkaloid jika terbentuk endapan coklat muda sampai 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).



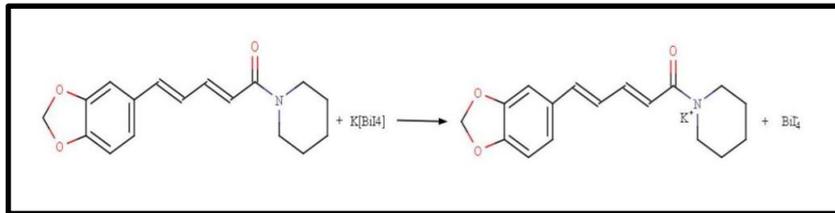
Gambar 4. Uji identifikasi KLT senyawa alkaloid lada sebelum disemprot *dragendorff*. Keterangan : (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366, (P) pembanding menggunakan kinin sulfat ($R_f = 0,50$), alkaloid lada ($R_f = 0,78$)



Gambar 5. Uji identifikasi KLT senyawa alkaloid lada setelah disemprot pereaksi *dragendorff*. Keterangan : (A) sinar tampak, (B) sinar UV 366, (C) sinar UV 254. (P) pembanding menggunakan kinin sulfat ($R_f = 0,50$) alkaloid lada ($R_f=0,78$).

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 piperin dengan pereaksi *dragendorff* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6.

Reaksi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff*.

B. Uji *Invitro* Aktivitas Alkaloid Lada *Piper Nigrum* Linn

Piperin merupakan senyawa alkaloid yang telah banyak dibuktikan memiliki efek sebagai antiinflamasi, antiartritis, tetapi sejauh ini tidak ditemukan penelitian spesifik yang dilakukan pada kardiovaskuler. Adapun penelitian yang dilakukan oleh Miyauchi (1989) mengenai campuran antara piperin dengan piperidine yang menunjukkan efek farmakologis sebagai antihipertensi.

Mekanisme kerja dari agonis beta telah banyak dilakukan dan dikaji secara mendetail. Aktifitas ketiga sub-tipe reseptor (β 1,2,3) mengaktifasi adenil siklase yang menyebabkan disosiasi subunit α dengan GTP dan kenaikan perubahan ATP menjadi cAMP. Aktifitas enzim siklase ini diperantarai oleh oleh pemicu pasangan protein Gs. Protein Gs tersebut merupakan jenis dari G-protein-couple Receptor (GPCR). Apabila protein Gs teraktifasi maka akan menstimulasi proses normal sel melalui jalur fosfolipase C (PLC). Selanjutnya PLC yang telah teraktifasi akan mengkatalisis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat(PIP₂), membentuk inositol 1,4,5-tripospat (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 Ca^{2+} dari *calcium store* sehingga konsentrasi Ca^{2+} intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca^{2+} 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). Reseptor β_2 -adrenergik terdapat pada saluran pernafasan dan pembuluh darah. Aktifitas agonis β_2 -adrenergik pada pembuluh darah akan menyebabkan kontraksi otot polos pembuluh darah pada manusia maupun marmut akibat adanya aktifitas Ca^{2+} yang teraktifasi oleh GCPR.

1. Preparasi Organ Aorta

Berdasarkan Apss (2013) untuk pengujian reseptor β_2 adrenergik dapat menggunakan organ aorta. Marmut dikorbankan dengan cara mendislokasi pada tulang belakang marmut. Kemudian pada bagian perut dibedah dan dikeluarkan semua organnya. Aorta terletak tepat di depan tulang belakang, kemudian aorta potong hingga ke jantung. Aorta yang telah dipotong kemudian dibersihkan dari jaringan lemak agar tidak mengganggu proses absorpsi obat yang diinduksikan. Aorta yang telah dibersihkan dipotong 6-7 cincin sekitar 1 cm. Kemudian diikat kedua ujungnya dan potong secara bersilangan kedua sisinya. Kemudian aorta dimasukkan ke dalam *chamber* 20 ml yang berisi larutan *buffer krebs*, sehingga diharapkan setiap cincin terendam oleh *buffer krebs* sebanyak 5 ml.

2. Pengaruh Piperin Terhadap Reseptor β_2 -Adrenergik Otot Polos Aorta.

Pengaruh aktivitas piperin terhadap reseptor β_2 -adrenergik diuji dengan mengamati perubahan profil kurva seri konsentrasi agonis yaitu ephinerprin dengan % konsentrasi otot polos aorta yang terisolasi dalam *buffer krebs*.

Piperin diduga memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor β_2 -adrenergik. Dugaan tersebut diukur dengan membandingkan nilai pD2 ephineprin dengan praperlakuan piperin dan tanpa praperlakuan piperin. perlakuan dengan piperin seharusnya menunjukkan hasil penurunan nilai pD2 dibandingkan dengan perlakuan tanpa piperin jika memiliki aktivitas antagonisme. Selanjutnya, apabila piperin memiliki tipe aktivitas antagonisme kompetitif, maka nilai pD2 (parameter antagonis) piperin terhadap reseptor β_2 - adrenergik dapat diidentifikasi dan diukur dengan menggunakan metode analisa *Schild-Plot* dengan syarat, respon maksimal (%Emaks) antara perlakuan kontrol dengan praperlakuan piperin harus sama (Kenakin, 1982).

Pada penelitian Putra (2018) terjadi aktivitas relaksasi pada aorta marmut teriolasi yang diinduksi oleh seri adenalin eksogen akibat praperlakuan piperin dosis 10 μM dan 50 μM . Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran grafik ke bawah dan dengan penurunan nilai pD2. Pergeseran kurva mengindikasikan adanya penurunan kemampuan adrenalin dalam mengkontraksi aorta marmut terisolasi akibat praperlakuan piperin dosis 10

dan 50 μM , keadaan tersebut ditandai dengan penurunan nilai pD2 dari adrenalin.

3. Uji Reversibilitas

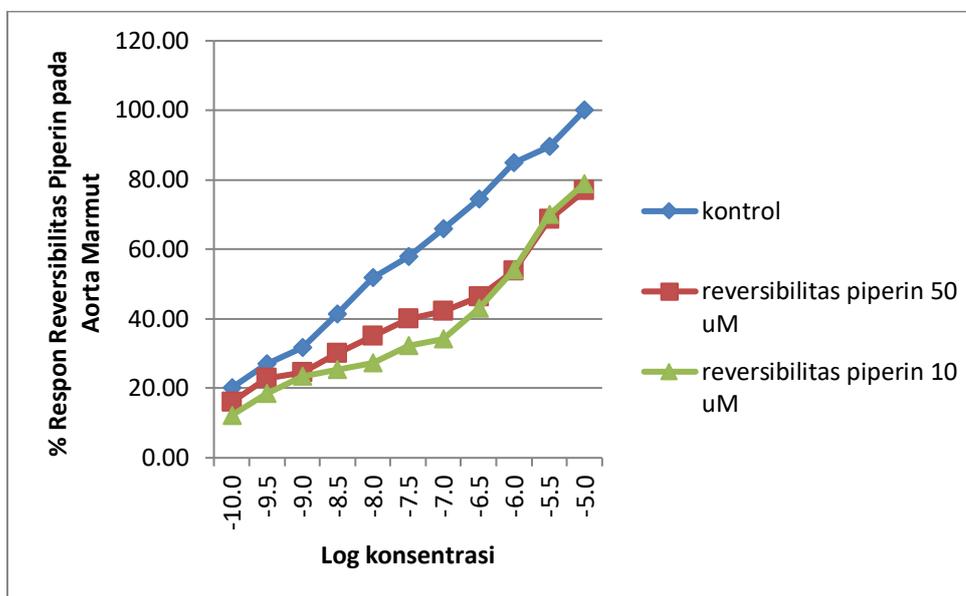
Untuk mengetahui kemampuan ikatan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. Terhadap reseptor β_2 -adrenergik otot polos aorta, maka dilakukan uji reversibilitas. Penggunaan *buffer krebs* digunakan untuk pencucian otot polos ileum untuk melepaskan ikatan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. Selama 30 menit setiap 5 menit.

Tabel 2. Pergeseran nilai pD2 dan Kenaikan Emaks reversibilitas aorta marmut.

No	Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Adrenalin	7,79 \pm 0,17	100,00 \pm 0,00
2	Reversibilitas Piperin 10 μM	6,28 \pm 0,27*	74,12 \pm 6,54
3	Reversibilitas Piperin 50 μM	6,33 \pm 0,24*	73,37 \pm 6,22

Keterangan : Nilai pD₂ disajikan dalam bentuk rata – rata ± SEM. Berdasarkan Uji Statistika menggunakan metode *one-way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) terhadap nilai pD₂ Adrenalin kontrol(*).

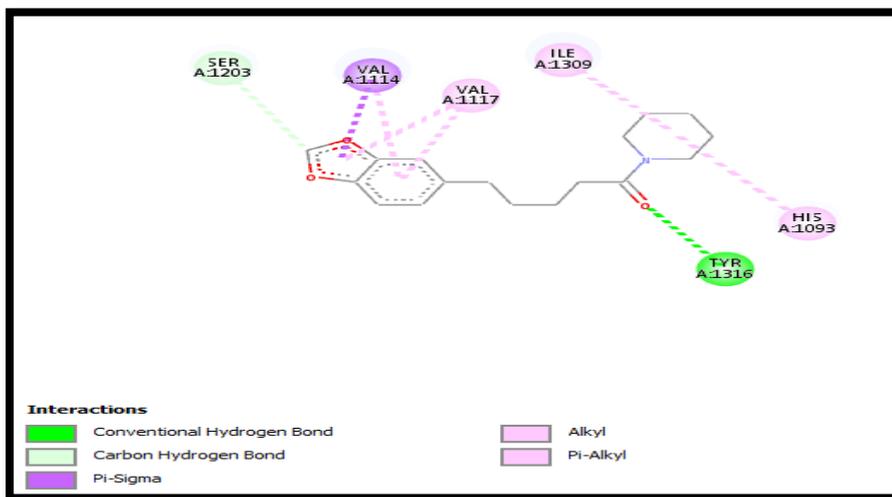
Tabel 2 menunjukkan nilai pD₂ yang berbeda dan secara statistik menunjukkan hasil yang berbeda signifikan antara kontrol dan kelompok uji reversibilitas alkaloid lada 10µM dan 50 µM menggunakan *one-way Anova* ($p < 0,05$). Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ikatan alkaloid lada tidak terlepas sempurna setelah pencucian setiap 5 menit selama 30 menit. Sehingga ikatan alkaloid lada dengan reseptor β₂-adrenergik bersifat irreversible.



Gambar 7. Kurva hubungan logaritma konsentrasi adrenalin terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian alkaloid Lada *Piper Nigrum* Linn. 10µM dan 50 µM presentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi adrenalin (kontrol). Presentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM (5-10)

Gambar 7 menunjukkan kurva melandai secara signifikan dan mengalami penurunan pD₂ sehingga bisa diartikan bahwa hasil kontraksi reversibilitas menunjukkan irreversible. Pada uji statistik menggunakan *one-way Anova* menunjukkan hasil antara kontrol dan alkaloid lada berbeda signifikan ($p < 0,05$).

Aktivitas piperin terhadap reseptor β_2 -adrenergik dapat diteliti melalui uji insilico dengan menggunakan metode *docking* molekuler. *Software* yang digunakan pada penelitian ini adalah *AutoDockTools 4.2*, *DS Visualizer*, *Marvinskecth*. *Docking* dilakukan pada reseptor β_2 -adrenergik pada manusia (PDBQT:4LDO). Hasil yang diperoleh berupa visualisasi 2D aktivitas ligan (piperin) terhadap reseptor β_2 adrenergik (PDBQT:4LDO). Berdasarkan hasil tersebut aktivitas reversibilitas sel piperin dilihat pada gugus keton dan benzena yang memiliki ikatan Pi-sigma dan alkil yang cenderung non polar, sehingga senyawa tersebut sulit untuk lepas dari reseptor.



Gambar 8.
Hasil

Visualisasi 2D Piperin terhadap reseptor β_2 adrenergik (Putra,2018). Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligand beserta jenis ikatan yang terjadi.

Hal yang mempengaruhi reversibilitas ligan dengan reseptor pada penelitian invitro menggunakan organbath adalah lamanya pencucian yang dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan pencucian sebanyak 5 kali setiap 5 menit selama 30 menit, sedangkan hasil yang diperoleh adalah irreversible, sehingga perlu di tambahkan waktu pencucian. Memperpanjang waktu pencucian memiliki resiko dapat menyebabkan proses penelitian menjadi lebih lama, hal ini dapat mempengaruhi waktu hidup organ yang terisolasi yang memiliki waktu hidup yang terbatas.

Pembersihan jaringan-jaringan di sekitar organ aorta perlu dilakukan, salah satunya adalah jaringan lemak, hal tersebut bertujuan untuk meningkatkan efektifitas kerja dari senyawa yang diinduksikan (Irfan, *et al*, 2012). Salah satu faktor yang mempengaruhi reversibilitas adalah adanya jaringan lemak disekitar organ aorta. Lemak memiliki sifat cenderung non polar, sehingga dapat memperlama proses senyawa piperin berikatan dengan organ aorta.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Putra (2018), diperoleh hasil piperin sebagai antagonis nonkompetitif. Hal ini ditunjukkan dengan nilai Emax yang tidak mencapai nilai 100% pada praperlakuan piperin. Antagonis non kompetitif merupakan suatu antagonis yang mampu mengurangi efektifitas suatu agonis dengan berikatan pada tempat yang tidak diduduki oleh agonis. Penambahan konsentrasi agonis pada antagonis ini tidak akan mampu untuk menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai Emax tidak dapat mencapai 100 % (Endro, 2006).