

UJI AKTIVITAS ANTAGONISME ISOLAT ALKALOID LADA
(*Piper nigrum* Linn.) PADA RESEPTOR ASETILKOLIN OTOT POLOS ILEUM MARMUT
TERISOLASI: STUDI *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

* Indah Mutiara, ** Puguh Novi Arsito

Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta*
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta**

INTISARI

Lada putih (*Piper nigrum* L.) mengandung senyawa piperin. Senyawa ini dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast dengan jalan menghambat jalur signal yang dimediasi oleh IgE dan diduga memiliki aksi antagonisme terhadap reseptor asetilkolin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh alkaloid lada (*Piper nigrum* Linn.) terhadap kontraksi otot polos ileum secara *in vitro* dan afinitas senyawa piperin terhadap reseptor asetilkolin secara *in silico*.

Biji *Piper nigrum* Linn. di sokhletasi menggunakan pelarut etil asetat. Hasil ekstraksi diidentifikasi menggunakan KLT, uji titik lebur, FTIR dan spektrofotometri UV-Vis. Alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. dosis 1000 μ M dan 5000 μ M diuji secara *in vitro* untuk melihat respon kontraksi dan relaksasi organ ileum marmut terisolasi dan uji *in silico* dilakukan untuk melihat skor *Piper nigrum* Linn. terhadap reseptor ACh menggunakan perangkat lunak *AutoDock*. Data hasil pengujian *in vitro* dianalisis menggunakan *one way ANOVA* dan LSD dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil identifikasi pada uji KLT menunjukkan adanya bercak coklat muda sampai kuning (positif mengandung alkaloid). Titik lebur senyawa alkaloid *Piper nigrum* Linn. adalah 122-132⁰C (kurang murni) dan hasil uji spektrofotometri menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki gugus fungsi C-H aromatik (3008,95), C=C asimetrik dan simetrik (1635,4), C=C aromatik (1581,63), -C-O-N- (1635,4), C-O (925,83), =C-O-C (1249,87) serta memiliki panjang gelombang maksimum 342,5 nm. Nilai pD2 *Piper nigrum* Linn. dosis 1000 μ M dan 5000 μ M adalah berturut-turut 3,89 dan 3,94. Nilai pD2 tersebut tidak beda signifikan ($p < 0,05$) dalam menghambat kontraksi otot polos ileum. Alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. mampu menghambat kontraksi ileum marmut yang diinduksi agonis asetilkolin dan memiliki skor *docking* pada reseptor ACh sebesar -6,6.

Kata kunci: alkaloid lada, ileum, *in silico*, piperin, *Piper nigrum* l., reseptor ACh

ABSTRACT

White pepper (*Piper nigrum* L.) containing piperine. Piperine inhibits release of histamine from mast cells (inhibiting the signaling pathway mediated by IgE) and alleged to have action an antagonism of acetylcholine receptor. The aim of this research was to know the effect of alkaloids pepper (*Piper nigrum* Linn.) against ileum smooth muscle contraction with in vitro study and to determine the affinity of piperine against the acetylcholine receptor with in silico study.

Seeds of *Piper nigrum* Linn. was extracted by soxhletation method using ethyl acetate as solvent. The results of extraction were identified by TLC, melting point test, FTIR and UV-Vis spectrophotometry. Alkaloids pepper *Piper nigrum* Linn. 1000 μ M and 5000 μ M were tested with in vitro study to see the response of contraction and relaxation of isolated guinea pig ileum organ and in silico study was be done to see the scores of *Piper nigrum* Linn. on ACh receptors using Autodock software. Data from in vitro study were analyzed using one-way ANOVA and LSD with confidence level at 95%.

The results of the identification of the TLC test showed a brown to yellow spot (positive alkaloid). The melting point of alkaloid *Piper nigrum* Linn. was 122-132⁰C (less pure) and the result of spectrophotometric assay indicated that the compound has an aromatic CH functional group (3008.95), C = C asymmetric and symmetric (1635.4), C = C aromatic (1581.63), - C-O-N- (1635.4), CO (925.83), = COC (1249.87) and has a maximum wavelength at 342.5 nm. The value pD2 of *Piper nigrum* Linn. dosage 1000 μ M and 5000 μ M are respectively 3.89 and 3.94. The pD2 value did not differ significantly ($p < 0.05$) in inhibiting contraction of ileum smooth muscle. An alkaloid pepper *Piper nigrum* Linn. can inhibit the contraction of guinea pig ileum which was induced by acetylcholine agonists and this alkaloid has a score of docking on ACh receptors at -6.6.

Keywords: ACh receptors, alkaloid pepper, ileum, in silico, piperine, *Piper nigrum* L.

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki kira-kira 30.000 jenis tumbuhan dan 1000 diantaranya telah dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat.¹ Salah satu tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai obat adalah lada (*Piper nigrum* Linn).

Kandungan yang terdapat pada lada antara lain alkaloid piperin (5-9 %), minyak

volatil (1-2,5%), resin (6,0%), piperidin dan pati (sekitar 30%).²

Piper nigrum Linn. dalam ekstrak *aquoeous*, ekstrak metanol dan ekstrak etanol positif mengandung karbohidrat, protein, tannin, fenol, kumarin, alkaloid dan antrakuinon.³ Senyawa alkaloid lada pernah diteliti secara in vivo menunjukkan bahwa piperin (senyawa aktif *Piper nigrum* L.) memiliki efek antiinflamasi, antinosiseftif,

antiatritis dengan jalan menghambat beberapa mediator inflamasi.⁴ Selain itu pengujian secara *in vivo* ekstrak biji *Piper nigrum L.* terbukti memiliki efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin.⁵ Piperin juga terbukti dapat menghambat degranulasi sel mast melalui mekanisme penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase(s)* yang terlibat dalam proses degranulasi sel mast.⁶

Isolate alkaloid pada *Piper nigrum* Linn. mampu menghambat kontraksi kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor asetilkolin, mengetahui dosis yang efektif antara 1000 μM dan 5000 μM pada isolate alkaloid pada *Piper nigrum* Linn. dalam menghambat kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor asetilkolin dan mengetahui skor senyawa isolate alkaloid sebagai penghambat reseptor asetilkolin di ileum marmut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah satu set alat untuk preparasi organ, *vortex*, pengaduk magnet thermostat tipe 1419 (B. Brawn, W. Germany), *tranduser isonik* (Level Tranduser Tipe 368, HSE, W. Germany), rekorder, dua set organ bath volume 20 mL, *bridge amplifier* tipe 336, pipet volume mikro 100 μL , 100 μL dan 500 μL .

Bahan dalam penelitian ini adalah *Buffer Tyrode*, marmut jantan, gas karbogen mengandung 95% oksigen dan 5% karbon dioksida, agonis fisiologis (asetilkolin) dan larutan atropine, aquadest dan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn.

Isolasi alkaloid lada

Lada diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etil asetat. Proses ekstraksi dilakukan terhadap 100 g serbuk simplisia dengan 300 ml etil asetat (1:3).

Identifikasi kristal piperin menggunakan KLT

Identifikasi kristal menggunakan KLT dengan cara sampel dilarutkan dengan etil asetat kemudian ditotolkan pada plat *silica* menggunakan fase gerak etil asetat : heksana (4:1) dan disemprot dengan pereaksi *dragendorf*. Kemudian diamati dengan sinar UV 254.

Identifikasi Kristal Piperin Menggunakan FTIR

Identifikasi kristal piperin menggunakan FTIR adalah dengan cara campur sampel dengan KBr kemudian dimasukkan ke dalam wadah uji dan rekam spektra serapannya pada bilangan gelombang 500-4000 cm^{-1} .

Identifikasi Piperin Dengan Spektrofotometri UV

Identifikasi piperin dengan spektrofotometri adalah dengan cara sampel

sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian diencerkan hingga konsentrasi 10 µg/ml. Selanjutnya dimasukan ke dalam kuvet dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV

Identifikasi Piperin Dengan Uji Titik Lebur

Identifikasi piperin dengan uji titik lebur dengan cara sampel diletakkan pada gelas objek pada thermometer dan kemudian atur mikroskop hingga sampel tampak jelas. Catat temperatur saat kristal mulai meleleh hingga semua kristal meleleh.

Preparasi Organ Ileum

Marmut jantan dianestesi menggunakan dietil eter dan dilakukan pembedahan. Ileum diambil pada bagian perut sepanjang 2 cm dan diletakkan di cawan fiksasi yang telah diisi dengan larutan *buffer tyrode*. Otot polos ileum kemudian diikat dengan benang, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organ bath* dan pada bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser.

Uji Aktivitas Alkaloid Lada Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas alkaloid lada terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi ileum marmut menggunakan alat *organ bath* menggunakan konsentrasi 1000 µM dan 5000 µM. Pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang

terjadi akan tercatat pada rekorder (kertas *polygraph*).

Uji Reversibilitas

Uji reversibilitas dilakukan untuk melihat kemampuan organ untuk kembali pada kondisi semula, atau pada kondisi sebelum dilakukannya pengenalan agonis reseptor. Uji reversibilitas ini dilakukan pada setiap uji aktivitas agonis reseptor asetilkolin. Pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder (kertas *polygraph*).

Uji Pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida)

Uji pengaruh DMSO dilakukan untuk menjamin bahwa aktivitas kontraksi otot polos ileum hanya disebabkan oleh alkaloid lada saja. DMSO digunakan sebagai pelarut dari alkaloid lada. Jumlah DMSO yang diberikan adalah sebanyak 100 µL disesuaikan dengan volume maksimal pemberian alkaloid lada ke dalam *organ bath*. Kurva hubungan konsentrasi agonis terhadap % respon sebelum dan sesudah perlakuan DMSO kemudian dibandingkan.

Uji *In silico*

Protein yang digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org) dalam format “.pdb”. Berkas protein / reseptor yang digunakan adalah reseptor *Asetilkolin Muskarinik* dengan kode 4DAJ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

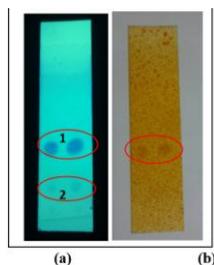
Isolasi Kristal Piperin



Gambar 1. Kristal piperin

Kristal yang terbentuk dicuci dengan etanol 96% . Pencucian dilakukan 3 kali dengan 20 ml etanol hingga diperoleh kristal berwarna kuning keputihan.

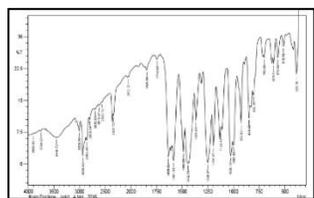
Uji KLT Kandungan Piperin



Gambar 2. Uji pendahuluan KLT senyawa alkaloid piperin diamati dengan (a) sinar UV 254 (b) pereaksi dragendorf.

Uji dengan pereaksi *dragendorf* memberikan hasil yang positif. Hasil KLT menunjukkan endapan coklat muda sampai kuning (jingga).⁷ Kristal yang diperoleh merupakan alkaloid dilihat dari penampakan bercak pereaksi *dragendorf*.

Uji FTIR Kristal Piperin



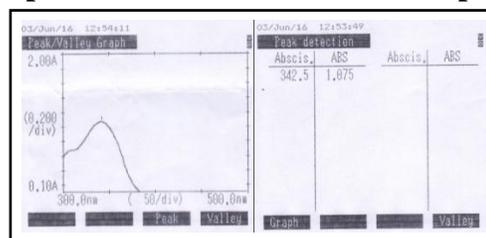
Gambar 3. FTIR kristal piperin

Spektra serapan yang diperoleh dibandingkan dengan nilai standar serapan IR oleh gugus tertentu). Spektra serapan gugus yang ada pada kristal piperin mendekati nilai standar IR dari masing-masing gugus fungsional.

Tabel I. Perbandingan nilai serapan IR gugus ikatan senyawa piperin

Tipe ikatan	Nilai standar IR	Nilai IR Isolasi piperin
C-H aromatic	3000	3008,95
C=C asimetrik dan simetrik (diene)	1635	1635,4
C=C aromatik (cincin benzen)	1580	1581,63
-C-O-N-	1635	1635,4
C-O (karakteristik terbanyak)	930	925,83
=C-O-C	1250	1249,87

Uji Spektrofotometer UV Kristal Piperin



Gambar 41. Hasil Uji Spektrofotometri UV (kiri) Peak (b) Nilai absorbansi

Hasil uji spektrofotometer menunjukkan hasil panjang gelombang maksimal kristal piperin berada pada $\lambda = 342,5$ nm. Hasil tersebut sama dengan panjang gelombang maksimal pada penelitian *Vishnath G et al* (2011) yaitu 342,5 nm.

Uji Titik Lebur

Kristal yang murni memiliki rentang temperatur sempit yaitu 1-2 °C,⁸ sedangkan kristal yang diperoleh pada penelitian ini memiliki rentang yang lebar, yaitu 122-132°C. Pelebaran rentang temperatur di atas 5°C mengindikasikan kristal kurang murni.

Uji Aktivitas Alkaloid Lada Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Tabel II. Pergeseran nilai pD₂ asetilkolin karena pengaruh piperin 1000 μM dan 5000 μM

No	Kelompok Perlakuan	pD ₂ ± SEM	Cmaks (%) ± SEM
1	Kontrol ACh	4,74 ± 0,17 ^{b,c}	100 ± 0,00
2	Piperin 1000 μM	3,89 ± 0,24 ^a	100 ± 0,00
3	Piperin 5000 μM	3,94 ± 0,15 ^a	100 ± 0,00

Keterangan :

- a. berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ACh (p<0,05)
- b. berbeda bermakna dengan kelompok piperin 1000 μM (p<0,05)
- c. berbeda bermakna dengan kelompok piperin 5000 μM (p<0,05)

Pengaruh DMSO Terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum

Tabel III. Nilai rata-rata pD₂ asetilkolin karena pengaruh DMSO 100μL (n=6, rata-rata ± SEM)

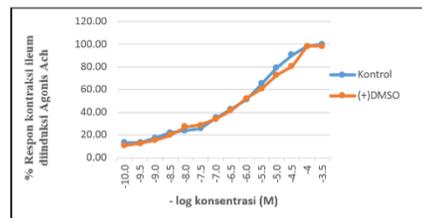
Kelompok Perlakuan	pD ₂	Emaks (%)
1 Kontrol Asetilkolin	4,28 ± 0,45	100 ± 0,00
2 DMSO 1000 μM	4,22 ± 0,45	100 ± 0,00

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.

Tabel ini menunjukkan pada pemberian agonis didapatkan nilai pD₂ kontrol asetilkolin. Nilai pD₂ kontrol asetilkolin adalah 4,28 dan DMSO 4,22. Hasil ini menunjukkan bahwa DMSO dapat digunakan sebagai pelarut piperin.

Pada gambar kurva dibawah ini menunjukkan penurunan kurva antara DMSO terhadap kontrol hampir sama. Uji statistik dengan menggunakan *paired t-test* penurunan tersebut tidak berbeda secara signifikan (p>0,005). Hal ini dapat disimpulkan bahwa DMSO tidak memiliki efek menurunkan

kontraksi secara signifikan sehingga dapat digunakan sebagai pelarut piperin.



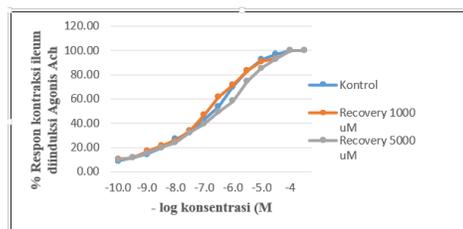
Gambar 5. Pengaruh DMSO terhadap respon kontraksi otot polos ileum yang diinduksi asetilkolin.

Uji Reversibilitas

Tabel IV. Pergeseran nilai pD₂ asetilkolin pada uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000 μM terhadap reseptor ACh.

No	Kelompok perlakuan	pD ₂	Emaks (%)
1	Kontrol Asetilkolin	6,74 ± 0,17	100 ± 0,00
2	Recovery alkaloid lada 1000 μM	6,84 ± 0,21	100 ± 0,00
3	Recovery alkaloid lada 5000 μM	6,46 ± 0,30	100 ± 0,00

Tabel IV menunjukkan nilai pD₂ tidak jauh berbeda dan secara statistik tidak beda signifikan antara kontrol dan kelompok uji reversibilitas alkaloid lada 1000 dan 5000 μM (p<0,005). Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ikatan alkaloid lada dapat terlepas setelah pencucian menggunakan *buffer Tyrode*. Ikatan alkaloid lada dengan reseptor ACh M3 bersifat reversibel.

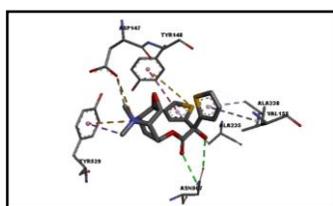


Gambar 6. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian piperin 1000 dan 5000 μM.

Hasil kurva menunjukkan bahwa pergeseran antar kurva tidak berbeda secara signifikan. Uji statistik menggunakan ANOVA ($p > 0,05$).

Uji *In silico*

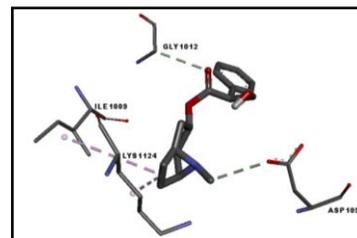
Validasi *Native Ligand* (tiotropium) terhadap reseptor ACh M3 dan diperoleh nilai RMSD sebesar 0,913 pada konformasi 2 ($< 2,00 \text{ \AA}$). Protokol *docking* pada reseptor ACh M3 ini bersifat valid. Gambar 7 menunjukkan hasil visualisasi tiotropium menggunakan *DS Visualizer* dan menghasilkan skor *docking* yang terbaik yaitu sebesar -9,1. Senyawa tiotropium diketahui terikat pada beberapa residu dari protein, yaitu *tyrosine 529 (TYR529)*, *tyrosine ke 148 (TYR148)*, *tyrosine ke 506 (TYR506)*, *valine ke 155 (VAL155)*, *alanine ke 238 (ALA238)*, *cysteine ke 532 (CYS532)* dan *tryptopan ke 503 (TRP503)*.



Gambar 7. Posisi senyawa Tiotropium ketika terikat ke reseptor ACh M3

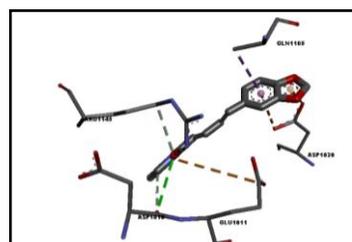
Hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor *docking* dari senyawa *Atropine Sulfate* pada reseptor ACh M3 yang paling baik yaitu -5,7 yang terletak pada konformasi ke 5. Pada hasil visualisasi

(Gambar 8) menunjukkan bahwa senyawa *Atropine Sulfate* mengikat pada beberapa residu dari protein target yaitu *GLY1020*, *LYS1124*, *ILE1009*, dan *ASP1092*.



Gambar 82. Posisi senyawa Atropin ketika terikat ke reseptor ACh M3

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor *docking* dari senyawa *piperin* pada reseptor ACh M3 yg paling baik yaitu -6,6 sebesar 1,997 yang terletak pada konformasi ke 9. Pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa *piperin* mengikat pada beberapa residu dari protein target (Gambar 9) yaitu *ARG1145*, *ASP1010*, *GLU1011*, *GLN11105*, DAN *ASP 1020*.



Gambar 93. Posisi senyawa Piperin ketika terikat ke reseptor ACh M3

Kesimpulan

Isolat alkaloid memiliki aktivitas antagonisme secara kompetitif setelah dilakukan uji *in vitro* dan *in silico*, dosis 1000

μM ($\text{pD}_2 = 3,89$) dan $5000 \mu\text{M}$ ($\text{pD}_2 = 3,94$) sama-sama efektif dalam menghambat kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor asetilkolin ($p > 0,05$) dan berdasarkan analisis *molecular docking* skor isolat alkaloid (*Piper nigrum* Linn.) memiliki skor (-6,6).

Saran

1. Untuk menghasilkan piperin murni, perlu dilakukannya metode yang lebih baik dan efektif lagi.
2. Untuk mengetahui efektifitas lanjutan dari penelitian ini, bisa dilakukan uji *in-vivo* pada hewan uji untuk melengkapi data terkait mengenai efektifitas antikoninergik.
3. Terimakasih kepada Lembaga Penelitian, Publikasi dan Pengabdian Masyarakat Fakultas Universitas Muhammadiyah Yogyakarta atas dana penelitian unggulan Prodi Farmasi yang mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, (2000), *Acuan sediaan herbal*, Cetakan I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, dan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta, 2.
2. 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.
3. Kadam, p. V., Yadav, k. N., Karjekar, f. A., Patel, f. A., Patidar, m. K., & Patil, m. J., (2013), Pharmacognostic, phytochemical and physicochemical studies of allium sativum linn. Bulb (liliaceae), *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 4(9), 3524.
4. 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 1β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models, *Arthritis research & therapy*, 11(2), R49.
5. 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.
6. 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.

7. Marlina, 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.
8. Hart, H., Craine, L. E., & Hart, D. J., (1999), *Organic chemistry: A short course*, Boston: Houghton Mifflin Co.