

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Isolasi Kristal Piperin Alkaloid *Piper nigrum* Linn.

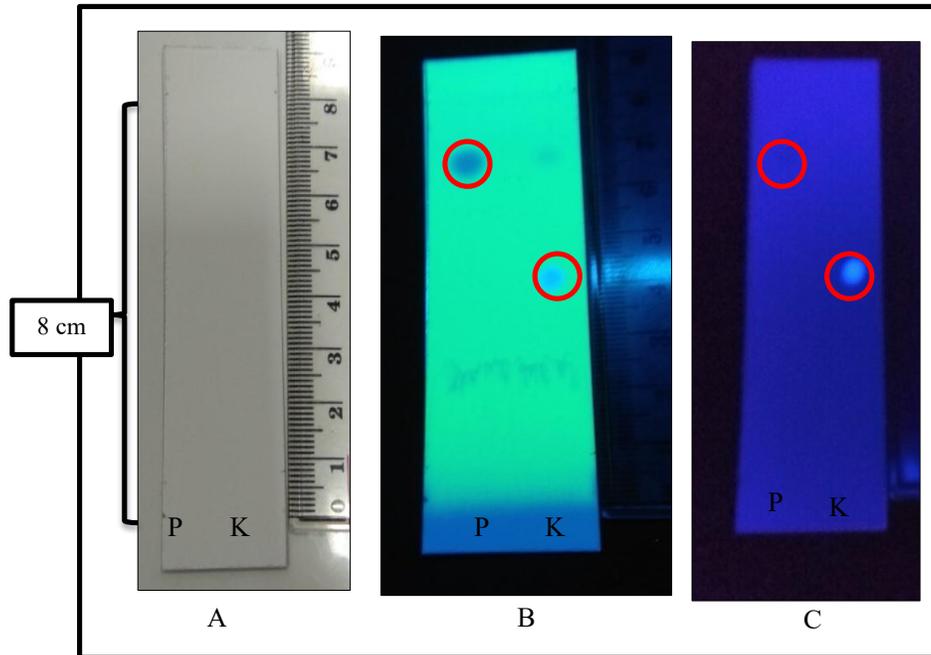
*Piper nigrum* Linn. diekstraksi dengan metode sokletasi dengan pelarut etil asetat. Metode ini memiliki keuntungan pelarut yang digunakan sedikit sehingga lebih efektif dan efisien. Etil asetat merupakan pelarut yang semi polar dan memiliki indeks polaritas 4,4 dengan demikian senyawa piperin dapat ditarik karena memiliki sifat semi polar. Etil asetat memiliki nilai indeks polaritas yang tidak jauh berbeda dengan nilai indeks polaritas 3 pelarut yang digunakan dalam penelitian Shingate *et al.*, (2013) sehingga etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut untuk mengekstraksi piperin dari lada putih.

##### 1. Uji Identifikasi Piperin dengan Metode KLT Pada Lada (*Piper nigrum* Linn.)

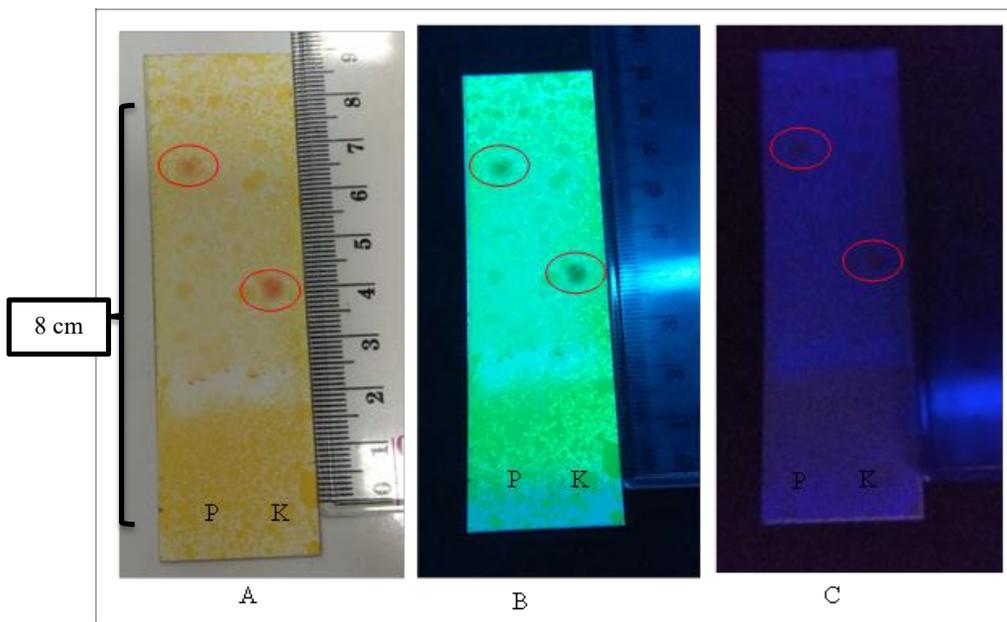
Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu pemeriksaan untuk mengetahui kebenaran bahan yang sedang diteliti. Uji identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) digunakan untuk mengidentifikasi kandungan piperin pada kristal yang telah diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah BAW (*n-butanol* : *acetit acid* : *water* = 4:1:5) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F254 yang memiliki sifat polar (Gandjar, 2007). Plat KLT dibuat dengan ukuran 10 cm x 3 cm dengan jarak elusidasi adalah 8 cm. Dideteksi dengan sinar tampak, sinar uv 254 nm, sinar uv 366 nm

sebelum dan sesudah diberi pereaksi *dragendorff*. Hasil yang diperoleh adalah nilai bercak piperin berada di atas ( $R_f = 0,78$ ) sedangkan pembandingnya kinin sulfat ( $R_f = 0,50$ ) berada pada tengah jalur elusidasi. Nilai  $R_f$  yang semakin tinggi menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki sifat kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal ini dikarenakan fase diam yang digunakan bersifat polar (Gandjar, 2007). Senyawa yang lebih polar akan memiliki nilai  $R_f$  yang lebih rendah karena senyawa tersebut tertahan oleh fase diam yang bersifat polar. Kinin sulfat bersifat lebih polar dikarenakan dalam bentuk garamnya sehingga memiliki nilai  $R_f$  yang lebih rendah dibandingkan piperin dalam bentuk bebas.

Deteksi alkaloid selanjutnya dilakukan melalui penampakan bercak menggunakan menggunakan pereaksi *dragendorff*. Hasil yang diperoleh adalah penampakan bercak pada cahaya tampak (gambar 10.). Uji dengan menggunakan pereaksi *dragendorff* memberikan hasil positif apabila terbentuk endapan berwarna coklat muda hingga kuning (jingga) (Marliana *et al.*, 2005). Hasil yang ditunjukkan pada gambar 11. menunjukkan adanya perubahan warna menjadi bercak jingga pada senyawa piperin (P), begitu juga pada larutan kinin sulfat (K) yang berfungsi sebagai pembanding.



**Gambar 10.** Uji identifikasi KLT senyawa piperin sebelum disemprot *dragendorff*.  
Keterangan: (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366, (P) piperin ( $R_f=0,78$ ), (K) sebagai pembanding kinin sulfat ( $R_f=0,50$ )

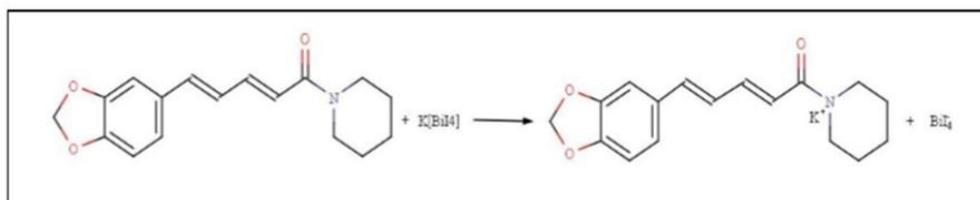


**Gambar 11.** Uji identifikasi KLT senyawa piperin setelah disemprot *dragendorff*.  
Keterangan: (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366, (P) piperin ( $R_f=0,78$ ), (K) sebagai pembanding kinin sulfat ( $R_f=0,50$ )

**Tabel 4.** Hasil identifikasi senyawa dengan 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			
<b>Kinin SO<sub>4</sub></b>	Tak nampak	Biru	Biru berpendar	Jingga	Cokelat	Cokelat gelap	8	4	0,5
<b>Piperin</b>	Tak nampak	Biru	Tak nampak	Jingga	Cokelat	Cokelat gelap	8	6,3	0,78

Hasil uji dengan menggunakan pereaksi *dragendorff*, pada gugus nitrogen akan berikatan dengan  $K^+$  yang merupakan ion logam akan membentuk ikatan kovalen sehingga akan membentuk warna cokelat hingga kuning (jingga) (Marliana *et al.*, 2005), sedangkan pada plat KLT terbentuk warna jingga hingga cokelat. Reaksi yang terjadi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff* dapat dilihat pada gambar 12.

**Gambar 12.** Reaksi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff*

## B. Uji *In Vitro* dengan Metode *Organ Bath*

Uji *in vitro* dilakukan menggunakan jaringan atau organ terisolasi. Pada prinsipnya, penelitian ini menggunakan organ yang direndam dalam larutan fisiologis yang sesuai (*Free Ca<sup>2+</sup> buffer krebs*), temperatur diatur sama dengan kondisi darimana organ tersebut berasal (37°C), serta dilakukan oksigenasi (*mixed 95% O<sub>2</sub> & 5% CO<sub>2</sub>*). Uji *in vitro* ini menggunakan alat *organ bath* (Perry, 1970). Dengan menggunakan metode *organ bath*, organ terisolasi dapat dijaga tetap hidup selama beberapa jam, memungkinkan untuk mengetahui secara terperinci respon fungsional pada zat yang ditambahkan kedalam organ terisolasi. Metode *organ bath* paling umum digunakan untuk mempelajari aksi obat secara *in vitro*, mengkarakterisasi aktivitasnya sebagai agonis atau antagonis (Kitchen, 1984).

### 1. Penyiapan *Free Ca<sup>2+</sup> Buffer Krebs*

*Free Ca<sup>2+</sup> buffer krebs* terdiri dari dua larutan yaitu larutan A dan larutan B. Kandungan larutan A adalah *sodium chloride*, *potassium chloide*, *magnesium sulfat heptahydrate*, *sodium phosphat dihydrate* sedangkan pada larutan B mengandung *sodium bicarbonat*. Masing-masing bahan yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam 1 L aquades terlebih dahulu selanjutnya diambil 100 ml pada masing-masing larutan A dan B untuk dilarutkan pada 800 ml aquades. Proses pelarutan A dan B perlu diperhatikan dalam pencampurannya. Pencampuran dilakukan ketika suhu berkisar 30 hingga 35°C,

kemudian ditambahkan 1 gram glukosa. Proses pelarutan dibantu dengan alat *magnetic stirer* dengan suhu 30°C. Larutan *free Ca<sup>2+</sup> buffer krebs* yang telah siap kemudian diatur suhunya 10°C pada *magnetic stirer*. Larutan *buffer* tersebut akan efektif dalam keadaan setimbang apabila dialiri dengan gas karbogen (*mixed* 95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub>).

## 2. Penyiapan Alat *Organ Bath*

Pada satu set alat *organ bath* terdiri dari seperangkat komputer yang telah terinstal *software* Lab Scribe 2, *organ bath*, *isotonic transducer* dan *bridge amplifier*. Sebelum digunakan *organ bath* diisi dengan aquades hingga batas air sampai indikator tidak berbunyi ketika dihidupkan. Air sebagai media untuk menjaga suhu pada *organ bath* agar tetap stabil sesuai dengan suhu makhluk hidup sekitar 36,5 hingga 37,5°C. Penyesuaian keadaan fisiologis tidak hanya suhu tetapi cairan fisiologis yang sesuai dengan keadaan jaringan tersebut. Aorta marmut yang terisolasi pada *organ bath* mampu hidup hingga 4-6 jam (Putra, 2018).

## 3. Preparasi Organ Aorta Marmut

Berdasarkan Taqvi (2008) untuk pengujian aktivitas Ca<sup>2+</sup> *channel* menggunakan organ aorta. Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi pada tulang belakang (*cervix*) pada benda keras. Darah dan cairan tubuh dibersihkan dengan cara dialiri dengan air mengalir. Kemudian marmut diletakan pada papan bedah, kulit bagian dada dipotong kebawah sampai daerah *perineal*. Isi perut kemudian

disingkirkan dan jaringan yang melekat pada aorta dibersihkan. Aorta yang menempel pada tulang belakang kemudian dipotong mulai dari daerah perineal sampai ke dada dan dimasukkan kedalam cawan petri yang sudah berisi *free Ca<sup>2+</sup> buffer krebs*. Aorta yang sudah dipindahkan kemudian dibersihkan dari jaringan lemak dan otot agar tidak mengganggu proses absorpsi obat yang diinduksikan. Aorta yang telah dibersihkan dipotong  $\pm 1$  cm panjangnya dengan salah satu ujung diikat dengan benang yang dihubungkan dengan transduser, sedangkan ujung satunya diikat dengan benang dan dikaitkan dengan *hook* dari *organ bath*. Sebelumnya, *chamber organ bath* harus berisi larutan *free Ca<sup>2+</sup> buffer krebs* 20,00 ml, sehingga diharapkan cincin terendam oleh *buffer* sebanyak 5,00 ml, serta suhu *organ bath* 37°C dan dialiri dengan gas karbogen.

#### 4. Uji *In vitro* Aktivitas Senyawa Piperin dalam *Piper nigrum L.*

Piperin adalah senyawa alkaloid yang tidak secara spesifik diteliti pada kardiovaskuler, kecuali adanya beberapa laporan secara empiris. Campuran antara piperin dan piperidine menunjukkan efek farmakologis sebagai antihipertensi, tanpa menyebutkan mekanismenya secara spesifik (Miyachi, 1989).

$Ca^{2+}$  merupakan *second messenger* yang banyak digunakan pada berbagai fungsi sel. Konsentrasi  $Ca^{2+}$  dalam sitosol sangat kecil (10-20 nM), sedangkan pada ekstrasel sebesar 1-2 mM. Pembukaan kanal  $Ca^{2+}$  menyebabkan naiknya kadar  $Ca^{2+}$  intraseluler sampai 100  $\mu$ M, yang dapat memicu berbagai proses seluler, seperti peristiwa

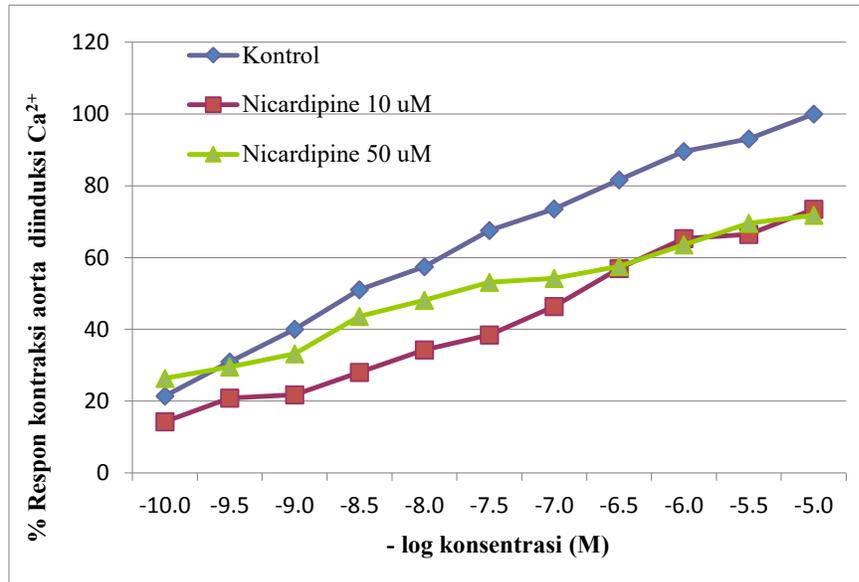
kontraksi otot, pelepasan neurotransmitter dari sel saraf, dan eksositosis pada sel sekretori. Pada otot polos, untuk beraksi,  $\text{Ca}^{2+}$  harus berikatan dengan reseptornya, yaitu Calmodulin. Calmodulin tidak memiliki aktivitas enzim. Setelah berikatan dengan  $\text{Ca}^{2+}$  akan menjadi kompleks  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin yang aktif dan mengikat protein lain. Kompleks tersebut mengaktifasi protein kinase yang tergantung  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-*dependent protein kinase* (CaM-kinase). Salah satu CaM-kinase adalah *Myosin Light-Chain Kinase* (MLCK) yang berperan dalam kontraksi otot polos. MLCK akan mengaktifkan myosin, yang merupakan protein motorik yang akan berikatan dengan filamen aktin untuk menyebabkan kontraksi (Ikawati, 2014).

##### 5. Uji Pembanding Menggunakan *Nicardipine* (Kontrol Positif)

$\text{Ca}^{2+}$  *channel* terdapat pada otot jantung, otot polos, sel endokrin, badan sel saraf dan dendrit. Aktivitas agonis  $\text{Ca}^{2+}$  pada pembuluh darah akan menyebabkan kontraksi otot polos pembuluh darah pada manusia maupun marmut.

Uji pembanding dilakukan menggunakan *nicardipine* dengan menggunakan metode yang sama persis dengan perlakuan pada piperin. *Nicardipine* merupakan  $\text{Ca}^{2+}$  *channel blocker* golongan dihidropiridin yang menimbulkan efek vasodilatasi pembuluh darah. Dihidropiridin umumnya tidak menurunkan konduksi nodus atrioventrikular (Dipiro, 2008). Tujuan dilakukannya uji *nicardipine* sebagai pembanding adalah untuk mengetahui perbandingan aktivitas piperin dengan *nicardipine*. Selain itu digunakan sebagai validasi

penelitian, jika uji *nicardipine* telah terbukti valid memiliki aktivitas antagonisme  $\text{Ca}^{2+}$  channel.



**Gambar 13.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, dengan praperlakuan *nicardipine* 10 dan 50  $\mu\text{M}$ . Presentase respon 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$ .

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai  $\text{EC}_{50}$ . Nilai  $\text{EC}_{50}$  adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50%. Nilai konsentrasi pascaperlakuan *nicardipine* menunjukkan kenaikan (tabel 5.), sehingga agar dapat memberikan respon kontraksi yang sama pada nilai  $\text{EC}_{50}$  praperlakuan *nicardipine* perlu adanya peningkatan konsentrasi agonis. Nilai  $\text{EC}_{50}$  selanjutnya ditransformasikan menjadi nilai  $\text{pD}_2$  yang diperoleh dari  $-\text{Log EC}_{50}$ .

**Tabel 5.** Kenaikan  $EC_{50}$  pascaperlakuan *nicardipine*.

No.	Kelompok Perlakuan	$EC_{50}$ (M)
1.	Kontrol $Ca^{2+}$	$1,19 \pm 0,87 \times 10^{-8}$
2.	<i>Nicardipine</i> 10 $\mu$ M	$2,87 \pm 0,76 \times 10^{-7}$
3.	<i>Nicardipine</i> 50 $\mu$ M	$1,72 \pm 1,03 \times 10^{-7}$

**Keterangan :** Nilai  $EC_{50}$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM.

Hasil uji pascaperlakuan *nicardipine* dosis 10 dan 50  $\mu$ M menunjukkan efek relaksasi dengan penurunan kurva dan terjadi penurunan nilai pD<sub>2</sub>. Profil kurva menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi  $Ca^{2+}$  terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos aorta terisolasi. Pergeseran kurva akibat pemberian *nicardipine* dosis 10 dan 50  $\mu$ M pada saat pascaperlakuan menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian  $Ca^{2+}$ , hal tersebut ditandai dengan penurunan nilai pD<sub>2</sub>  $Ca^{2+}$ . Nilai rata-rata pD<sub>2</sub>  $Ca^{2+}$  untuk perlakuan kontrol, *nicardipine* konsentrasi 10  $\mu$ M dan 50  $\mu$ M berturut-turut adalah 8,64, 6,66, dan 7,10. Penurunan nilai pD<sub>2</sub>  $Ca^{2+}$  pada pemberian *nicardipine* 10 dan 50  $\mu$ M bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ). Tetapi konsentrasi *nicardipine* 10 dan 50  $\mu$ M tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga pada pemberian *nicardipine* dosis 10  $\mu$ M sudah mampu memberikan efek vasodilatasi pada otot polos aorta.

**Tabel 6.** Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh *nicardipine* 10 dan 50  $\mu\text{M}$ .

No.	Kelompok Perlakuan	pD2	Emax (%)
1.	Kontrol $\text{Ca}^{2+}$	$8,64 \pm 0,27$	$100,00 \pm 0,00$
2.	<i>Nicardipine</i> 10 $\mu\text{M}$	$6,66 \pm 0,14^*$	$73,48 \pm 2,50$
3.	<i>Nicardipine</i> 50 $\mu\text{M}$	$7,10 \pm 0,21^*$	$71,79 \pm 2,42$

**Keterangan :** Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  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  $\text{Ca}^{2+}$  kontrol(\*).

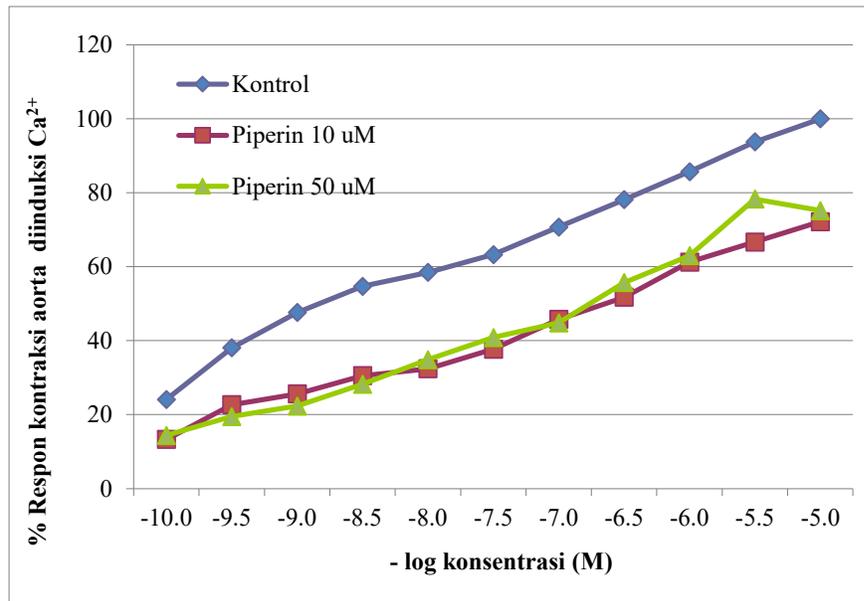
Antagonis nonkompetitif memiliki sifat tak terbalikkan (*irreversible*) dengan ditunjukkan pada nilai *Emax* yang tidak mencapai 100% pada pascaperlakuan *nicardipine*. Pascaperlakuan aorta dengan *nicardipine* konsentrasi 10  $\mu\text{M}$  hanya dapat mencapai *Emax* 73,48% dan pada pemberian *nicardipine* konsentrasi 50  $\mu\text{M}$  mencapai *Emax* 71,79%. Antagonis nonkompetitif merupakan suatu antagonis yang mampu mengurangi efektivitas 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%.

## 6. Pengaruh Piperin Terhadap $\text{Ca}^{2+}$ Channel Otot Polos Aorta

Pengaruh aktivitas piperin terhadap reseptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel diuji dengan mengamati perubahan profil kurva seri konsentrasi agonis yaitu  $\text{Ca}^{2+}$  dengan % kontraksi otot polos aorta yang terisolasi dalam *free  $\text{Ca}^{2+}$  buffer krebs*.

Piperin diduga memiliki aktivitas antagonisme pada  $\text{Ca}^{2+}$  *channel*. Dugaan tersebut diukur dengan membandingkan nilai  $\text{pD}_2$   $\text{Ca}^{2+}$  dengan pascaperlakuan piperin dan praperlakuan piperin. Pascaperlakuan piperin seharusnya menunjukkan hasil penurunan nilai  $\text{pD}_2$  dibandingkan dengan praperlakuan piperin jika memiliki aktivitas antagonisme. Selanjutnya, apabila piperin memiliki aktivitas antagonisme kompetitif, maka nilai  $\text{pD}_2$  (parameter antagonis) piperin terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  *channel* dapat diidentifikasi dan diukur dengan menggunakan metode analisa *Schild-Plot* dengan syarat, respon maksimal (% *Emax*) antara perlakuan kontrol dengan pascaperlakuan piperin harus sama (Kenakin, 1982).

$\text{Ca}^{2+}$  memiliki aktivitas memicu kontraksi setelah berikatan dengan  $\text{Ca}^{2+}$  *channel* pada otot polos aorta. Pemberian seri konsentrasi bertingkat  $\text{Ca}^{2+}$  eksogen menunjukkan peningkatan % respon kontraksi otot polos aorta terisolasi. Respon kontraksi maksimal (100%) otot polos aorta tercapai pada pemberian  $\text{Ca}^{2+}$  eksogen dengan konsentrasi  $1 \times 10^{-5}$ .



**Gambar 14.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, pascaperlakuan piperin 10 dan 50  $\mu\text{M}$ . Presentase respon 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  (kontrol).

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai  $\text{EC}_{50}$ . Nilai  $\text{EC}_{50}$  adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50%. Nilai konsentrasi pascaperlakuan piperin menunjukkan kenaikan (tabel 7.), sehingga agar dapat memberikan respon kontraksi yang sama pada nilai  $\text{EC}_{50}$  praperlakuan piperin perlu adanya peningkatan konsentrasi agonis. Nilai  $\text{EC}_{50}$  selanjutnya ditransformasikan menjadi nilai  $\text{pD}_2$  yang diperoleh dari  $-\text{Log. EC}_{50}$ .

**Tabel 7.** Kenaikan EC<sub>50</sub> pascaperlakuan piperin.

No.	Kelompok Perlakuan	EC <sub>50</sub> (M)
1.	Kontrol Ca <sup>2+</sup>	1,35 ± 0,73 x 10 <sup>-8</sup>
2.	Piperin 10 µM	2,29 ± 0,64 x 10 <sup>-7</sup>
3.	Piperin 50 µM	3,43 ± 1,79 x 10 <sup>-7</sup>

**Keterangan :** Nilai EC<sub>50</sub> disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM.

Terjadi aktivitas relaksasi pada aorta marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri Ca<sup>2+</sup> eksogen akibat pascaperlakuan piperin dosis 10 dan 50 µM. Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran grafik ke bawah dan dengan penurunan nilai pD<sub>2</sub>. Profil kurva (gambar.11) menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi Ca<sup>2+</sup> terhadap rata – rata % respon kontraksi aorta marmut terisolasi.

Pergeseran kurva mengindikasikan adanya penurunan kemampuan Ca<sup>2+</sup> dalam mengkontraksi aorta marmut terisolasi akibat pascaperlakuan piperin dosis 10 dan 50 µM, keadaan tersebut ditandai dengan penurunan nilai pD<sub>2</sub> dari Ca<sup>2+</sup>. Nilai pD<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> sebagai kontrol, pascaperlakuan 10 dan 50 µM secara berturut-turut adalah 8,27, 6,71, dan 6,81. Penurunan nilai pD<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> pada pemberian piperin 10 dan 50 µM bermakna secara statistik (p < 0,05). Tetapi pascaperlakuan piperin 10 dan 50 µM tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga pada pemberian piperin konsentrasi 10 µM sudah mampu memberikan efek vasodilatasi pada otot polos aorta.

**Tabel 8.** Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh piperin 10 dan 50  $\mu\text{M}$ 

No.	Kelompok Perlakuan	pD2	Emax (%)
1.	Kontrol $\text{Ca}^{2+}$	$8,27 \pm 0,19$	$100,00 \pm 0,00$
2.	Piperin 10 $\mu\text{M}$	$6,71 \pm 0,09^*$	$72,18 \pm 1,12$
3.	Piperin 50 $\mu\text{M}$	$6,81 \pm 0,21^*$	$75,19 \pm 1,80$

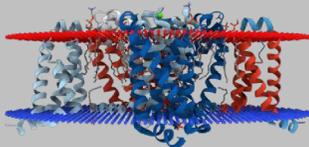
**Keterangan :** Nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM. Berdasarkan Uji Statistika menggunakan metode *one-way* Anova dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji LSD menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap pD2  $\text{Ca}^{2+}$ (\*).

Antagonis nonkompetitif memiliki sifat tak terbalikkan (*irreversible*) dengan ditunjukkan pada nilai *Emax* yang tidak mencapai 100% pada pascaperlakuan piperin. Pascaperlakuan aorta dengan piperin 10  $\mu\text{M}$  hanya dapat mencapai *Emax* 72,18% dan pada pemberian piperin 50  $\mu\text{M}$  mencapai *Emax* 75,19%. Antagonis nonkompetitif merupakan suatu antagonis yang mampu mengurangi efektifitas suatu agonis dengan mekanisme berikatan pada tempat yang tidak diduduki oleh agonis. Penambahan konsentrasi agonis pada antagonis ini tidak akan mampu menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai *Emax* tidak dapat mencapai 100%.

### C. Uji *In Silico* Alkaloid *Piper nigrum* L.

#### 1. Validasi Metode *Molecular Docking* Autodock Vina®

Validasi metode *molecular docking* dengan Autodock Vina® dilakukan untuk mengkalibrasi metode *docking* pada *software* yang digunakan, pada proses validasi ini dibandingkan antara posisi *native ligand* terhadap reseptor yang telah diuji secara eksperimental pada *binding site pocket* ligan. Dasar yang digunakan untuk memberikan penilaian kevalidan adalah harga RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Metode yang digunakan dikatakan valid jika harga RMSD  $< 2.00 \text{ \AA}$ , artinya posisi ligan *copy* setelah *superimpose* semakin dekat posisinya menduduki *native ligand* sehingga metode yang digunakan akan lebih tepat. Nilai RMSD dipengaruhi juga oleh resolusi protein reseptor dan metode pemodelan reseptor yang digunakan (Puspanigtiyas, 2013). *Native ligand* yang digunakan pada penelitian ini adalah *1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine* (ID: PX4).

Kode Protein	<i>Native Ligand</i>	Struktur	RMSD
4MS2	<i>1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine</i> (ID : PX4)		2.75 Å

Gambar 15. Kode dan struktur protein  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

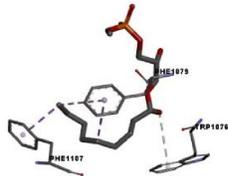
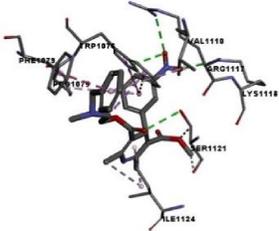
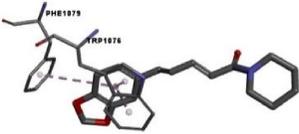
**Tabel 9.** Hasil validasi *native ligand* terhadap protein 4MS2.

Mode	Afinity (kcal/mol)	Dist from best mode	
		RMSD l.b	RMSD u.b
1	-5.0	0.000	0.000
2	-4.8	6.233	9.449
3	-4.8	1.435	1.719
4	-4.7	2.549	3.195
5	-4.7	1.793	2.837
6	-4.7	3.801	5.602
7	-4.6	6.155	9.351
8	-4.5	2.314	3.147
9	-4.4	6.145	8.904

Nilai RMSD didapat dari konformasi protein-ligan terbaik, terdapat dua tipe dari RMSD yaitu RMSD l.b (*lower bound*) dan RMSD u.b (*upper bound*). RMSD/u.b menjelaskan perbedaan nilai dari jarak antara setiap atom pada satu konformasi dengan konformasi yang lainnya, RMSD/l.b dapat didefinisikan sebagai  $RMSD/lb(c1,c2) = \max((RMSD'(c1,c2), RMSD(c1,c2)))$ . Sedangkan RMSD' menjelaskan nilai jarak atom pada satu konformasi dengan atom terdekat yang memiliki tipe yang sama dengan atom tersebut pada konformasi yang lain (Ferecz, 2015).

Semakin kecil nilai RMSD, maka dianggap tingkat kesalahannya lebih sedikit (Primana, 2014). Hasil validasi antara *native ligand* yaitu PX4 (*1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine*) dengan protein 4MS2 pada konformasi ke-3 didapatkan nilai RMSD sebesar 1.414 Å ( $< 2.00 \text{ \AA}$ ), dengan afinitas sebesar -4.8 kcal/mol sehingga nilai RMSD dianggap valid.

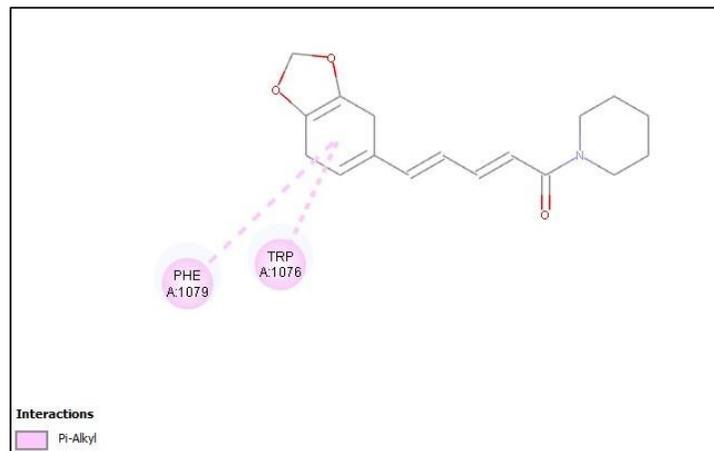
2. Hasil Uji *In Silico* Senyawa Marker *Piper nigrum* L. (Piperin) dengan Senyawa Pembanding dan *Native Ligand* Protein 4MS2 dengan Metode *Molecular Docking* Autodock Vina<sup>®</sup>

Ligand	Afinity (kcal/mol)	RMSD	Residu Protein	Interaksi Ikatan
<i>Native Ligand</i> PX4 (1,2-Dimyrystoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine)	-4.8	1.435	Phenylalanin 1079*, Phenylalanin 1107, Tryptophan 1076*	
<i>Comparative Ligand</i> (Nicardipine)	-7.2	1.325	Arginin 1117, Isoleucin 1124, Lysin 1118, Phenylalanin 1079*, Proline 1075, Serine 1121, Tryptophan 1076*, Valine 1110,	
<b>Piperin</b> ( <i>Piper nigrum</i> Linn.)	-7.1	1.442	Phenylalanin 1079 *, Tryptophan 1076*,	

**Gambar 16.** Energi interaksi ikatan Ligan dan Protein.

Hasil dari *molecular docking* Autodock Vina<sup>®</sup> yaitu prediksi aktivitas interaksi antara ligan dengan reseptor berupa energi ikatan antara ligan dengan reseptor. Parameter yang diamati adalah *Gibbs free energy* ( $-\Delta G$  (kcal/mol)), hasil interaksi antara ligan dengan

reseptor, jarak dan residu antara asam amino yang terdekat dengan ligan ( $< 2.00\text{\AA}$ ) (Adelin,2013). Aktivitas piperin terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  channel dapat diprediksi melalui *molecular docking* Autodock Vina<sup>®</sup>. Protein yang dipilih berdasarkan model  $\text{Ca}^{2+}$  channel teoritis manusia ( $\text{Ca}_v1.2$ ), dari bakteri *Arcobacter butzleri* (PDB ID : 4MS2).

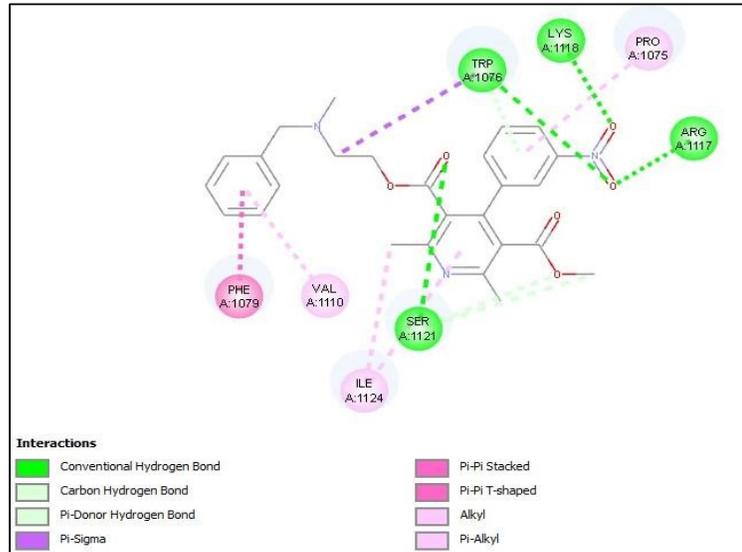


**Gambar 17.** Hasil Visualisasi 2D Piperin terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  Channel menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.

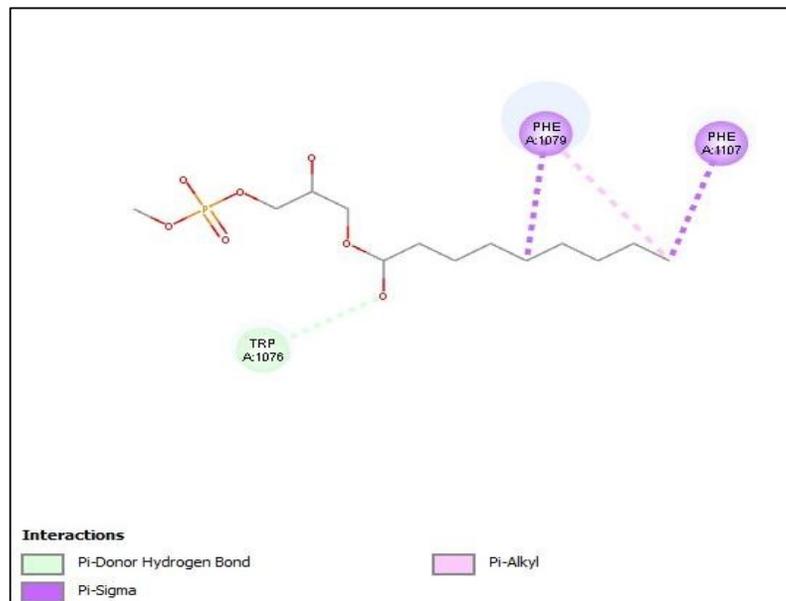
Piperin dilaporkan memberikan efek *cardiodepressant* dan vasodilator yang memberikan dasar farmakologi untuk efek penurunan tekanan darah (Taqvi, 2008).

*Nicardipine* merupakan  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker golongan dihidropiridin yang merupakan *Voltage-Gated Calcium Channels* (VGCCs). *Nicardipine* merupakan *L-Type Voltage-Gated Calcium Channels* yang mengikat subunit  $\text{Ca}_v1.2$  (Lin *et al.*, 2011). Pada hasil *molecular docking* Autodock Vina<sup>®</sup> yang telah dilakukan,

diprediksi energi ikatan *nicardipine* terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  channel sebesar -  
7,2 kcal/mol.

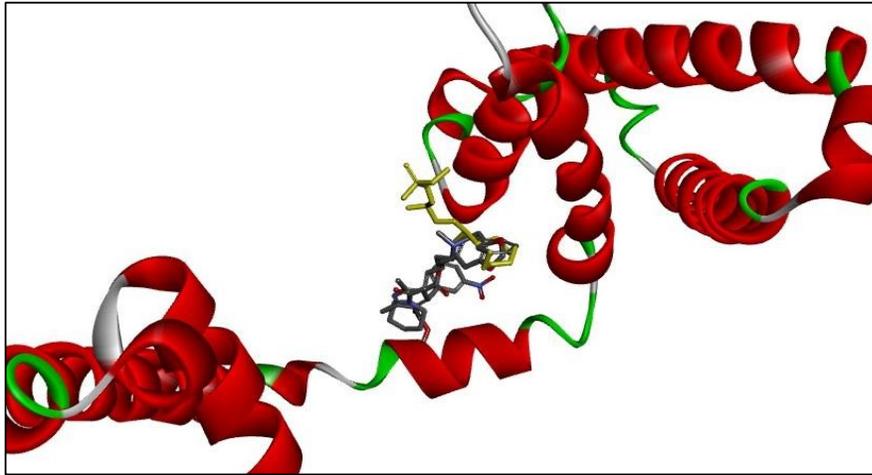


**Gambar 18.** Hasil Visualisasi 2D *nicardipine* terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  Channel menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.



**Gambar 19.** Hasil Visualisasi 2D *native ligand* terhadap  $\text{Ca}^{2+}$  Channel menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.

*Binding site* reseptor diketahui pada residu asam amino Phe1079 dan Trp1076 yang merupakan *binding site*  $\text{Ca}^{2+}$  Channel eksperimental. Menurut *Gibbs energy theory* ( $\Delta G$ ) apabila semakin kecil energi yang dihasilkan dari ikatan antara ligan dengan reseptornya, maka semakin stabil ikatan antara ligan dengan reseptor tersebut. Dari tabel dapat diketahui hasil uji *in silico* aktivitas senyawa marker *Piper nigrum* Linn. yaitu piperin dengan senyawa pembanding yaitu *nicardipine* dan *native ligand* PX4 (*1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine*) protein 4MS2 memprediksikan bahwa piperin dan *nicardipine* mampu menghambat  $\text{Ca}^{2+}$  channel, hal ini dibuktikan dari *Gibbs free energy* ( $-\Delta G$  (kcal/mol)) *nicardipine* (-7,2 kcal/mol) dan piperin (-7,1 kcal/mol) lebih kecil daripada *1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine* (-4,8 kcal/mmol). Artinya,  $\text{Ca}^{2+}$  channel cenderung akan berikatan dengan *nicardipine* dan piperin daripada *1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine* yang merupakan *native ligand* dari  $\text{Ca}^{2+}$  channel itu sendiri.  $\text{Ca}^{2+}$  channel akan lebih stabil berikatan dengan *nicardipine* dan piperin daripada *1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine* karena ikatan ligan dengan reseptor yang terjadi melepaskan energi yang lebih besar. Hal ini dapat diprediksikan bahwa piperin memiliki potensi aktivitas yang mirip dengan senyawa pembandingnya yaitu *nicardipine* secara *in silico*.



**Gambar 20.** Hasil visualisasi *overlay* antara *native ligand*, *nicardipine* dan *piperin*. *Native ligand* divisualisasikan dengan warna kuning

Visualisasi *overlay* antara *piperin*, *native ligand*, dan *nicardipine* menempati tempat yang sama di reseptor kanal  $\text{Ca}^{2+}$  dapat dilihat pada gambar 20. Hal ini membuktikan bahwa *piperin* memiliki efek sama seperti *nicardipine* dan *native ligand*.