

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Lada diekstraksi menggunakan metode sokhletasi dengan pelarut etil asetat. Keuntungan metode ini salah satunya karena pelarut yang digunakan sedikit. Pelarut etil asetat merupakan pelarut semi polar dengan indeks polaritas 4,4 sehingga piperin yang merupakan senyawa alkaloid semi polar dapat ditarik. Nilai indeks polaritas etil asetat 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.

Proses ekstraksi dilakukan terhadap 100 g serbuk simplisia dengan 300 ml etil asetat (1:3). Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak yang lebih kental. Ekstrak kental disimpan dalam wadah tertutup dan didiamkan selama 7 hari sampai terbentuk kristal alkaloid lada *Piper nigrum* Linn.



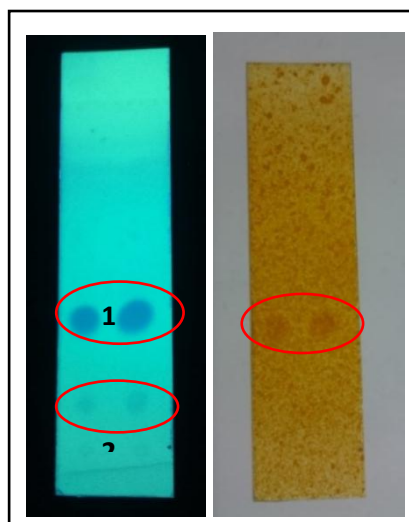
Gambar 1. Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Kristal yang terbentuk dicuci dengan etanol 96% untuk menghilangkan zat-zat pengotor yang ada di permukaan kristal. Pencucian dilakukan 3 kali dengan 20 ml etanol hingga diperoleh kristal berwarna kuning keputihan. Hasil pencucian kristal dapat dilihat pada Gambar 6.

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

Analisis dengan KLT digunakan untuk mengetahui kandungan piperin dalam kristal yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah heksana:etilasetat (4:1) dan fase diam yang digunakan adalah silika gel. 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 7 (a)).

Gambar 7, nomor 1 diduga bercak senyawa piperin sedangkan nomor 2 menunjukkan bercak pengotor. Kemudian dilakukan Penampakan bercak menggunakan pereaksi *dragendorff*. Hasil penampakan bercak pada cahaya tampak dapat dilihat pada Gambar 7 (b).

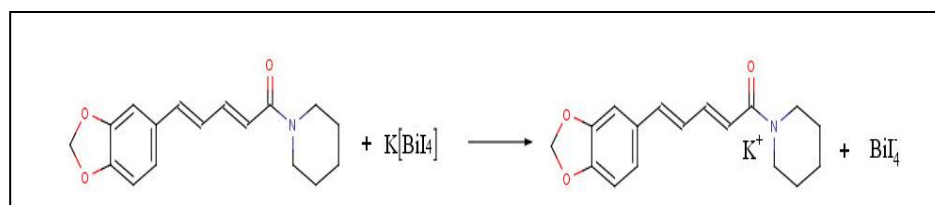


(a) (b)

Gambar 2. Uji Pendahuluan KLT Senyawa Alkaloid Lada Piper nigrum Linn diamati dengan (a) Sinar UV 254 (b) Pereaksi Dragendorf.

Uji dengan pereaksi *dragendorf* memberikan hasil yang positif jika terbentuk endapan coklat muda sampai kuning (jingga) (Marliana *et al*, 2005). Hasil pada Gambar 7 menunjukkan bahwa kristal yang diperoleh merupakan alkaloid. Hasil penampakan bercak pada analisis KLT dengan eluen heksana:etil asetat (4:1) menunjukkan bahwa pengotor yang terdapat dalam kristal piperin bukan golongan alkaloid ditunjukkan dengan penampakan bercak pereaksi *dragendorf* bercak pengotor yang terlihat pada sinar UV 254 tidak tampak.

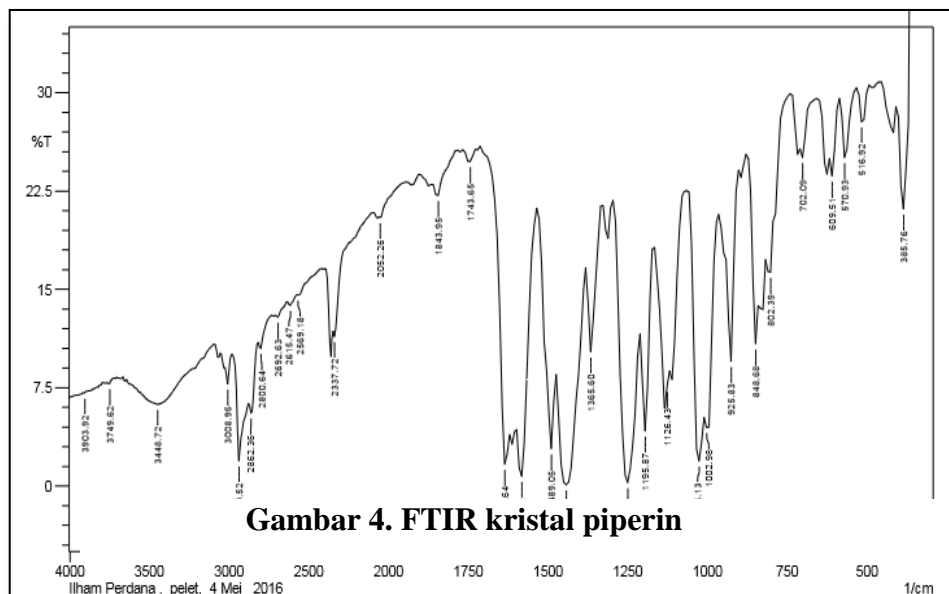
Pada uji alkaloid dengan pereaksi *dragendorf*, nitrogen membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam sehingga terbentuk endapan coklat muda sampai kuning (Marliana *et al*, 2005) sedangkan pada plat KLT terbentuk bercak coklat muda sampai kuning. Reaksi antara piperin dengan pereaksi *dragendorf* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 3. Reaksi Antara Piperin Dan Dragendorf

2. Uji FTIR Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Uji FTIR bertujuan untuk mengidentifikasi kristal piperin berdasarkan serapan infra red gugus fungsinya. Hasil FTIR dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. FTIR Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Tabel 1. Perbandingan Nilai Serapan IR Gugus Ikatan Senyawa Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

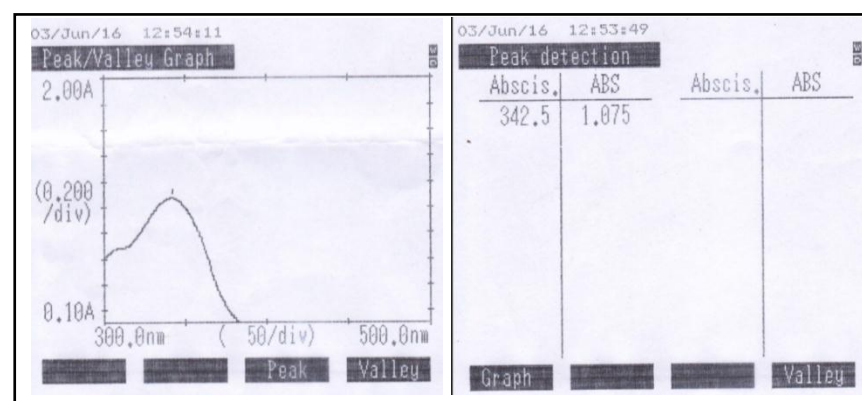
Tipe ikatan	Nilai standar IR	Nilai IR Isolasi Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn.
C-H aromatic	3000	3008,95
C=C asimetrik dan simetrik (diene)	1635	1635,4
C=C aromatik (cincin benzen)	1580	1581.63
-C-O-N-	1635	1635,4
C-O (karakteristik terbanyak)	930	925,83
=C-O-C	1250	1249.87

Spektra serapan yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan nilai standar serapan IR oleh gugus tertentu pada penelitian Shingate *et al* (2013). Seperti yang ditunjukkan Tabel 3, spektra serapan gugus yang ada pada kristal piperin mendekati nilai standar IR dari masing-masing gugus fungsional.

3. Uji Spektrofotometer UV Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Uji spektrofotometer UV dilakukan untuk mengidentifikasi spektra panjang gelombang maksimum kristal yang diperoleh. Spektra panjang gelombang maksimum yang diperoleh dibandingkan dengan spektra panjang gelombang maksimum pada penelitian (Vishnath G, *et al.*, 2011) yaitu 342,5 nm. Hasil uji spektrofotometer UV dapat dilihat pada Gambar 10.

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



Gambar 5. Hasil Uji Spektrofotometri UV (*kiri*) Peak : (*kanan*) Nilai Absorbansi

4. Uji Titik Lebur

Uji titik lebur digunakan untuk mengidentifikasi dan mengetahui kemurnian kristal alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 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 sesuai pada acuan yaitu 128-130 °C (Adosraku, *et al.*, 2013). Namun, kristal yang murni memiliki rentang temperatur sempit yaitu 1-2 °C (Hart H, *et al.*, 2012) sedangkan kristal yang diperoleh memiliki rentang yang lebar, yaitu 122-132°C. Pelebaran rentang temperatur di atas 5°C mengindikasikan kristal kurang murni. Kontaminan mengacaukan konsistensi dan bentuk ikatan kristal pada level molekuler. Gangguan tersebut melemahkan struktur ikatan lebih mudah terurai sehingga batas bawah temperatur turun dan rentang temperatur menjadi melebar (Hart H, *et al.*, 2012).

B. Uji *In vitro* Aktivitas Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn.

Penelitian yang dilakukan oleh (Bojjireddy *et al.*, 2014) piperin diketahui memiliki efek menghambat degranulasi pada kultur sel mast melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase*. Pengujian campuran ekstrak biji mengandung *Piper nigrum* L. menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin (Antony, 2010). Beberapa hasil penelitian ini, memungkinkan piperin juga memiliki mekanisme spasmolitik dengan cara menghambat aktivasi dari reseptor ACh M3 yang berada pada otot polos

ileum. Penelitian ini untuk membuktikan aktivitas antagonisme lada pada reseptor tersebut.

1. Uji Pendahuluan Pengaruh DMSO Terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum

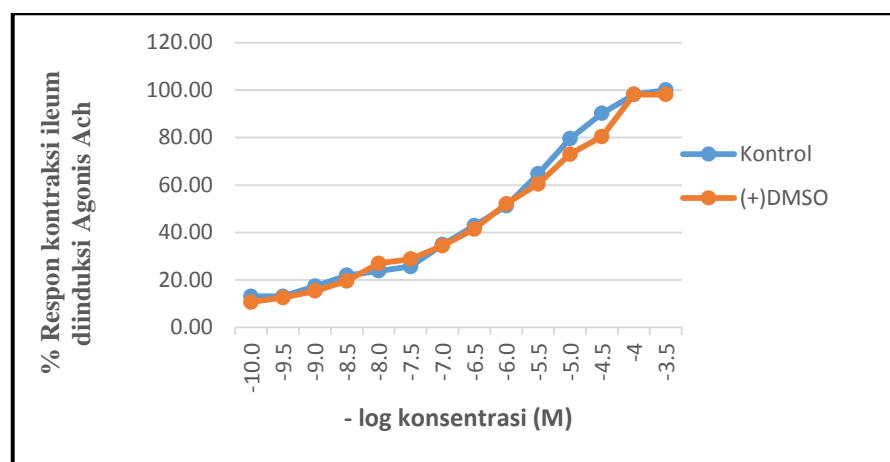
Uji *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas yang diduga memiliki efek sebagai antagonis reseptor. Pada uji ini digunakan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. konsentrasi 1000 μM dan 5000 μM . Dimetil sulfoksida (DMSO) digunakan sebagai pelarut kristal alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. pada penelitian ini, sehingga DMSO perlu di uji efeknya terhadap kontraksi otot polos. Dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai pelarut alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. diharapkan tidak memiliki efek menurunkan kontraksi untuk menjamin bahwa penurunan efek kontraksi hanya disebabkan oleh alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. saja. Dimetil sulfoksida (DMSO) yang digunakan adalah sebesar 100 μL sesuai dengan volume pemberian alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. pada *organ bath*.

Tabel 2. Nilai rata-rata pD2 asetilkolin karena pengaruh DMSO 100 μL (n=6, rata-rata \pm SEM). Berdasarkan uji signifikansi menggunakan paired t-test dengan kepercayaan 95 %, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p > 0,05$) antara perlakuan pD2 kontrol dan DMSO.

No	T Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Asetilkolin	4,28 \pm 0,45	100 \pm 0,00
a 2	DMSO 1000 μM	4,22 \pm 0,45	100 \pm 0,00

bel 4 menunjukkan pada pemberian agonis didapatkan nilai pD2 kontrol asetilkolin dan DMSO tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$). Nilai pD2 kontrol asetilkolin adalah 4,28 dan DMSO 4,22. Hasil ini menunjukkan bahwa DMSO dapat digunakan sebagai pelarut alkaloid lada *Piper nigrum* Linn.

Gambar 11 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 alkaloid lada *Piper nigrum* Linn.



Gambar 6. Pengaruh DMSO terhadap respon kontraksi otot polos ileum yang diinduksi asetilkolin. Kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap respon kontraksi otot polos ileum, dengan atau tanpa pengaruh DMSO 100 μ L ($n=6$, rata-rata \pm SEM).

2. Pengaruh Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Terhadap Reseptor ACh Otot Polos Ileum

Reseptor yang ikut berperan dalam kontraksi otot polos ileum baik pada manusia dan marmut yaitu ACh M3. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh piperin terhadap reseptor ACh M3. Asetilkolin akan berkontraksi apabila berinteraksi dengan reseptor ACh M3. Kontraksi terjadi karena ada rangsangan pada reseptor ACh M3 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 (PIP₂), membentuk inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). IP₃ yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP₃ pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potential Channels* (TRPC) dan mengakibatkan pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca²⁺ intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium di permukaan membran sel. Aktifnya kanal kalsium menyebabkan influks Ca²⁺ ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar Ca²⁺ intraseluler yang menginduksi terjadinya kontraksi otot polos (Gosens *et al.*, 2006).

Peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler yang berasal dari aktivasi GPCR atau kanal ion dapat menyebabkan kontraksi pada otot polos adalah dengan cara Ca²⁺ berikatan dengan reseptor calmodulin (CaM). Calmodulin merupakan suatu protein pengikat Ca yang tidak memiliki aktivitas enzim. Calmodulin akan bekerja setelah membentuk kompleks dengan Ca²⁺/calmodulin. Selanjutnya kompleks tersebut mengaktifkan *myosin light-chain kinase* (MLCK) yang akan memfosforilasi myosin. Myosin yang terfosforilasi akan berinteraksi dengan filamen aktin sehingga terjadi kontraksi (Lodish, 2000).

Alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor ACh M3 apabila dapat mengurangi potensi asetilkolin pada kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi.

a) Pengaruh Terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum Akibat Pemberian Seri Konsentrasi ACh

Konsentrasi alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. yang digunakan dalam uji ini adalah 1000 μM dan 5000 μM . Data yg diperoleh dari uji ini adalah kurva hubungan antara seri konsentrasi asetilkolin dengan % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi dalam larutan *buffer Tyrode*. Alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh M3 apabila terjadi pergeseran respon % respon kontraksi otot polos ileum akibat pemberian piperin. Perbandingan nilai pD2 piperin digunakan untuk mengukur aktivitas antagonisnya, semakin kecil nilai pD2 maka semakin kecil kontraksi yang dihasilkan agonis. Tipe antagonis terhadap reseptor ACh M3 dapat diidentifikasi dan diukur dengan menggunakan analisa Schild-Plot.

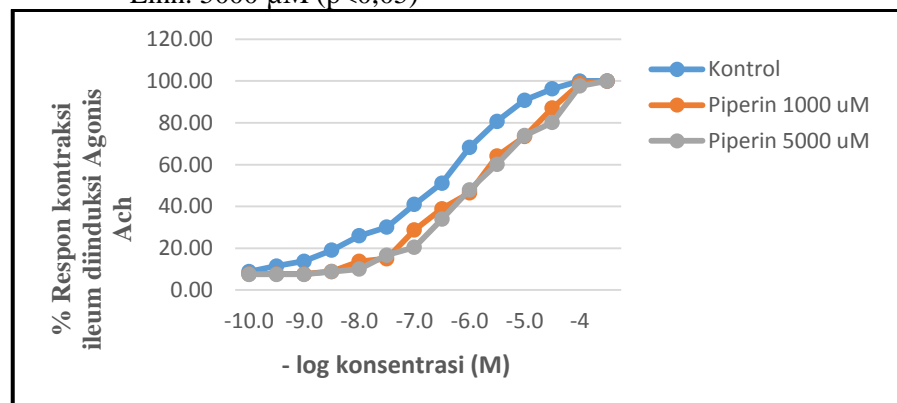
Tabel 5 menunjukkan nilai pD2 piperin mengalami penurunan % respon terhadap kontraksi otot polos ileum. Semakin kecil nilai pD2, semakin besar efek penurunan kontraksinya. Konsentrasi 1000 μM piperin mengalami penurunan pD2 lebih kecil, yaitu 3,89 dibandingkan dengan konsentrasi 5000 μM sebesar 3,94. Uji LSD menunjukkan antara dua dosis ini tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa dosis 1000 μM piperin sudah mampu menurunkan kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi.

Tabel 3. Pergeseran Nilai pD_2 Asetilkolin Karena Pengaruh Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. 1000 μ M dan 5000 μ M.

No	Kelompok Perlakuan	$pD_2 \pm SEM$	$C_{maks} (\%) \pm SEM$
1	Kontrol ACh	$4,74 \pm 0,17^{b,c}$	$100 \pm 0,00$
2	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 1000 μ M	$3,89 \pm 0,24^a$	$100 \pm 0,00$
3	Alkaloid Lada <i>Piper nigrum</i> Linn. 5000 μ M	$3,94 \pm 0,15^a$	$100 \pm 0,00$

Keterangan :

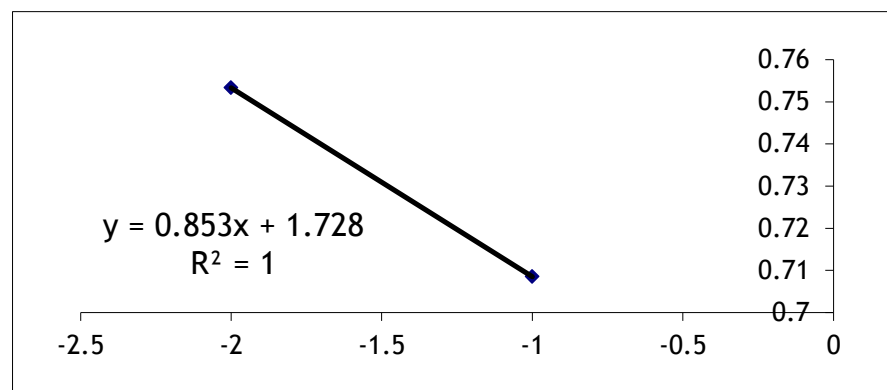
- berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ACh ($p < 0,05$)
- berbeda bermakna dengan kelompok alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 1000 μ M ($p < 0,05$)
- berbeda bermakna dengan kelompok alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 5000 μ M ($p < 0,05$)



Gambar 7. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 1000 dan 5000 μ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi

Tipe antagonis alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. dapat diketahui dari bentuk kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum menggunakan konsentrasi alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 1000 μ M dan 5000 μ M. Pemberian masing-masing konsentrasi alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. mampu menaikkan kembali $Emaks$ 100% setelah dilakukan

penambahan agonis asetilkolin. Cara lain yang dapat digunakan, yaitu dengan melihat nilai parameter antagonis (pA_2) pada *schild-plot* (Gambar 12). Persamaan *schild-plot* $y = 0,853x + 1,728$ menyatakan bahwa alkaloid lada bertindak sebagai antagonis kompetitif pada reseptor ACh, dilihat dari nilai slope 0,853 yang mendekati 1,00.



Gambar 8. Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis (pA_2) alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. terhadap reseptor ACh M3. Sebagai sumbu x adalah nilai logaritma konsentrasi piperin (Log. M) dan sumbu y adalah nilai logaritma $((A'/A)-1)$, dimana A adalah nilai D_{50} asetilkolin tanpa pemberian piperin dan A' adalah nilai D_{50} asetilkolin dengan pemberian piperin.

Selanjutnya dilakukan *docking* molekuler menggunakan program *AUTODOCK* untuk memastikan kekuatan interaksi antara alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. dengan reseptor ACh M3 sebagai antagonis kompetitifnya.

b) Uji Reversibilitas Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Terhadap Reseptor ACh Otot Polos Ileum

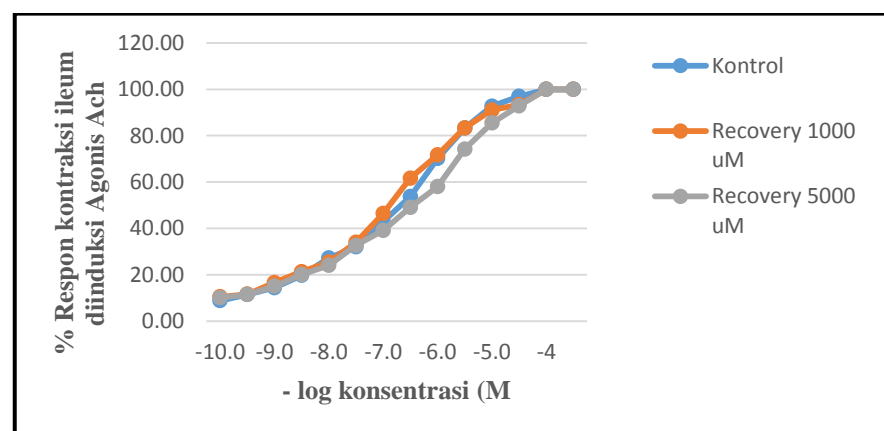
Untuk mengetahui kemampuan ikatan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. terhadap reseptor ACh M3 otot polos ileum, maka dilakukan uji reversibilitas. Penggunaan *buffer Tyrode* digunakan

untuk pencucian otot polos ileum untuk melepaskan ikatan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. selama 30 menit tiap 10 menit.

Tabel 4. 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 6 menunjukkan nilai pD₂ tidak jauh berbeda dan secara statistik tidak beda signifikan antara kontrol dan kelompok uji reversibilitas alkaloid lada 1000 µM dan 5000 µM ($p < 0,005$). Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ikatan alkaloid lada dapat terlepas setelah pencucian setiap 10 menit selama 30 menit. Ikatan alkaloid lada dengan reseptor ACh M3 bersifat reversibel.



Gambar 9. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau

dengan pemberian alkaloid Lada *Piper nigrum Linn.* 1000 μM dan 5000 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 6 - 12$).

Gambar 14 menunjukkan kurva tidak mengalami pergeseran kurva kekanan secara signifikan. Respon kontraksi uji reversibilitas piperin 1000 μM dan 5000 μM tidak menunjukkan penurunan pD₂. Pada uji statistik dapat dikatakan bahwa antara kontrol dan alkaloid lada tidak beda signifikan ($p > 0,005$).

3. Uji Pembandingan Menggunakan Atropin (Kontrol Positif)

Uji pembandingan dilakukan menggunakan atropin dengan metode yang sama persis dengan perlakuan. Atropin merupakan agen preanestesi yang digolongkan sebagai antikolinergik atau parasimpatolitik. Atropine sebagai antimuskarinik mempunyai kerja menghambat efek asetilkolin pada saraf postganglionic kolinergik dan otot polos. Hambatan ini bersifat *reversible* dan dapat diatasi dengan pemberian asetilkolin dalam jumlah berlebihan atau pemberian antikolinesterase (Achmad, 1986).

Tujuan dilakukannya uji atropin sebagai pembandingan adalah untuk melihat apakah zat uji bisa berefek sama dengan obat asetilkolin yang digunakan sebagai kontrol positif.

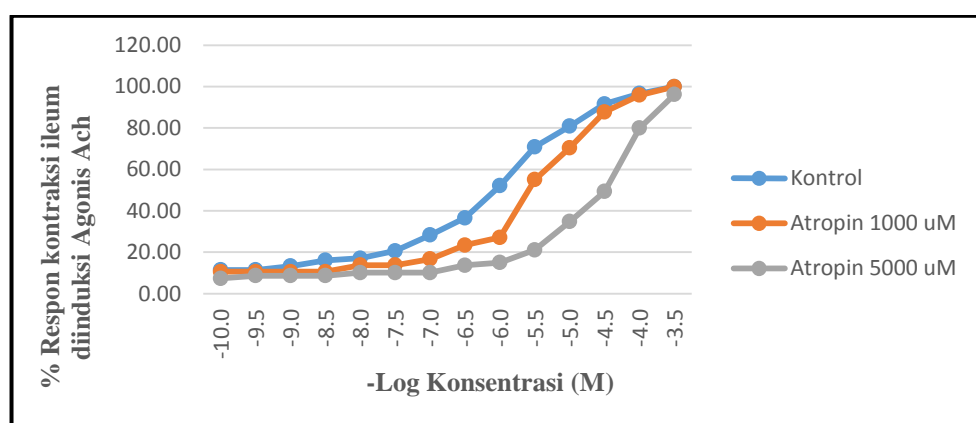
Tabel 7 menunjukkan nilai pD₂ mengalami penurunan % respon terhadap kontraksi otot polos ileum. Konsentrasi 5000 μM atropin memberikan efek lebih besar terhadap penurunan pD₂ sebesar 2,71 pada otot polos ileum. Hal tersebut membuktikan dosis 5000 μM atropin lebih

efektif dalam menurunkan % respon kontraksi otot polos ileum dibandingkan dengan 1000 μM atropin.

Tabel 5. Pergeseran nilai pD2 asetilkolin karena pengaruh atropin 1000 μM dan 5000 μM . nilai pD2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 5 – 10). Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap nilai pD2 asetilkolin/kontrol (*), setelah diuji dengan ANAVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Asetilkolin	4,74 \pm 0,17	100 \pm 0,00
2	Atropin 1000 μM	3,89 \pm 0,24	100 \pm 0,00
3	Atropin 5000 μM	3,94 \pm 0,15	100 \pm 0,00

Gambar 15 menunjukkan uji atropin memberikan efek relaksasi dilihat dari pergeseran pada kurva. Bentuk kurva atropin pada dosis 1000 μM dan 5000 μM mencapai *Emax* 100%. Hal ini menandakan atropin merupakan antagonis kompetitif terhadap reseptor ACh.



Gambar 10. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian atropine 100 dan 500 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin

(kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 6 – 12).

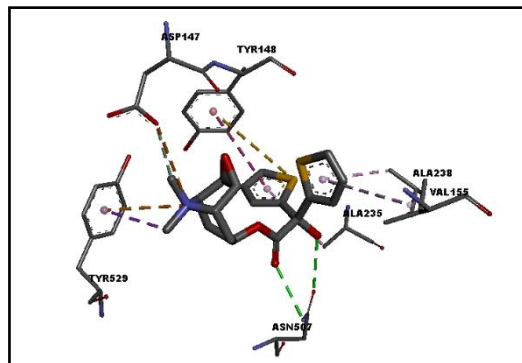
C. Uji *In silico* Senyawa Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Pada Reseptor ACh

1. Validasi protokol *docking*

Validasi dilakukan untuk melihat validitas dari senyawa yang diukur dengan menunjukkan 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. *Docking* aplikasi yang digunakan untuk uji *in silico* pada penelitian ini adalah *AutoDockTools*. Protein yang diunduh adalah protein asetilkolin dengan kode protein 4DAJ.

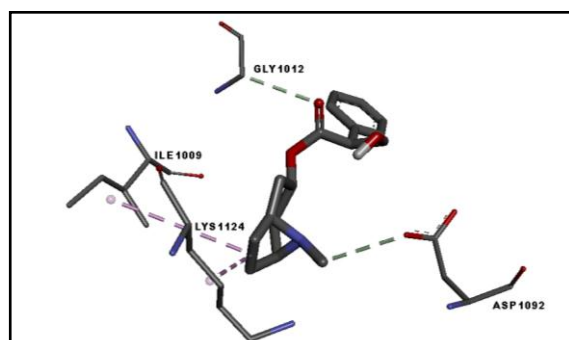
2. Hasil *Molecular Docking*

Validasi *Native Ligand* (tiotropium) terhadap reseptor ACh M3 dan diperoleh nilai *RMSD* sebesar 0,913 pada konformasi 2 (<2,00 Å). Protokol *docking* pada reseptor ACh M3 ini bersifat valid. Gambar 16 menunjukkan hasil visualisasi tiopropium menggunakan *DS Visualizer* dan menghasilkan skor *docking* yang terbaik yaitu sebesar -9,1. Senyawa tiopropium 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 11. Posisi Senyawa Tiotropium Ketika Terikat Ke Reseptor ACh M3

Tiotropium adalah obat yang bersifat *long-acting* selama 24 jam, bronkodilator antikolinergik yang digunakan dalam penanganan Penyakit Paru Obstruksi Kronik (PPOK). Tiotropium merupakan antagonis reseptor muskarinik, pada pemberian topikal bertindak terutama pada reseptor muskarinik M2 dan M3 yang terletak di jalan napas untuk merelaksasi otot polos, sehingga menghasilkan efek bronkodilator. Obat ini bisa dijadikan *native ligan* terhadap reseptor ACh M3.

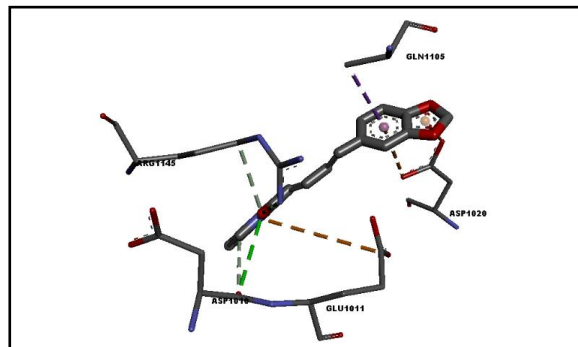


Gambar 12. Posisi Senyawa Atropin Ketika Terikat Ke Reseptor ACh M3

Hasil visualisasi menggunakan aplikasi DS *Visualizer*, skor doking dari senyawa *Atropine Sulfate* pada reseptor ACh M3 yang paling baik yaitu -5,7 yang terletak pada konformasi ke 5. Pada hasil visualisasi (Gambar 17)

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

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor doking dari senyawa alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 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 alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. mengikat pada beberapa residu dari protein target (Gambar 18) yaitu *ARG1145*, *ASP1010*, *GLU1011*, *GLN11105*, DAN *ASP 1020*.



Gambar 13. Posisi Senyawa Alkaloid Lada *Piper nigrum* L. Ketika Terikat Ke Reseptor ACh M3