

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. ISOLASI KRISTAL PIPERIN LADA *Piper nigrum* L.

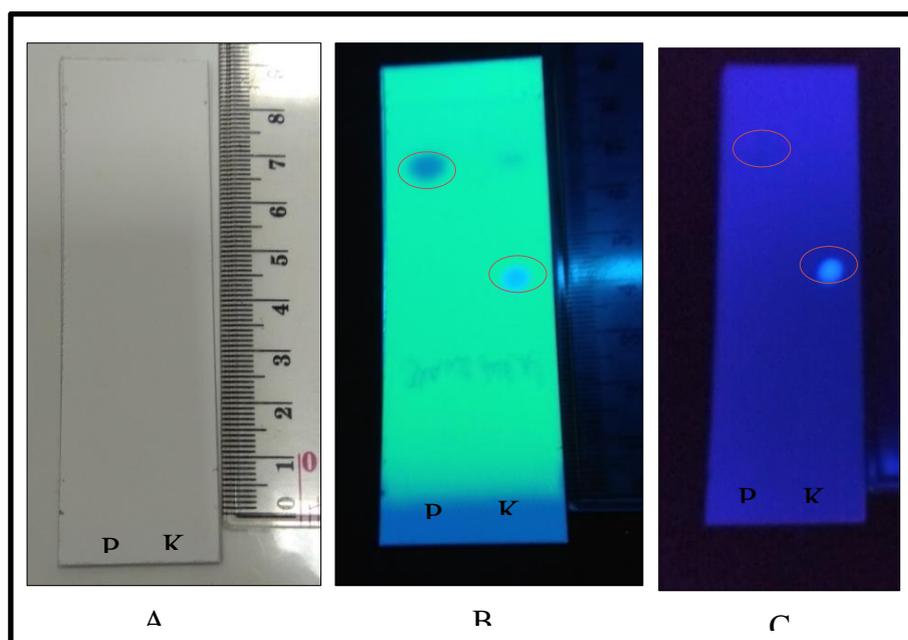
Lada diekstraksi dengan metode sokhletasi dengan pelarut etil asetat. Metode ini memiliki keuntungan pelarut yang digunakan sedikit sehingga lebih efektif dan efisien. Etil asetat merupakan pelarut yang semi polar dan memiliki indeks polaritas 4,4 dengan demikian senyawa piperin dapat ditarik karena 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* L.)

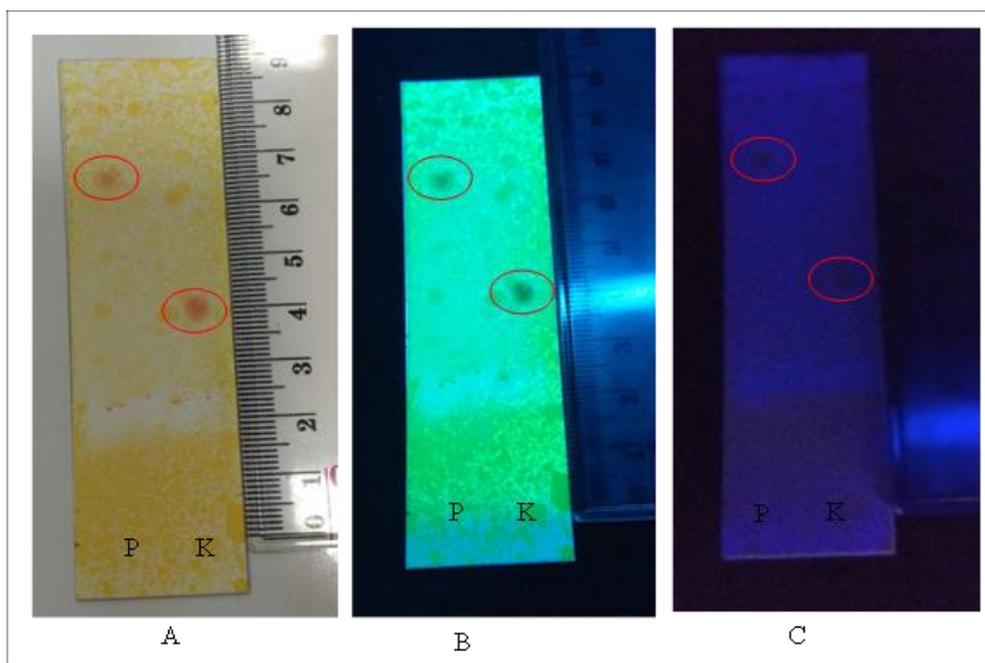
Uji identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) digunakan untuk mengidentifikasi kandungan piperin pada kristal yang telah diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah BAW (n-butanol : asam asetat : air = 4:1:5) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 GF254 yang memiliki sifat polar (Gandjar & Abdul Rohman, 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 ($R_f = 0,50$) 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. 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 7.). 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 8. menunjukkan adanya perubahan warna menjadi bercak jingga pada senyawa piperin (P), begitu juga pada larutan kinin sulfat (K) yang berfungsi sebagai pembanding.



Gambar 1. 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 ($R_f = 0,50$)



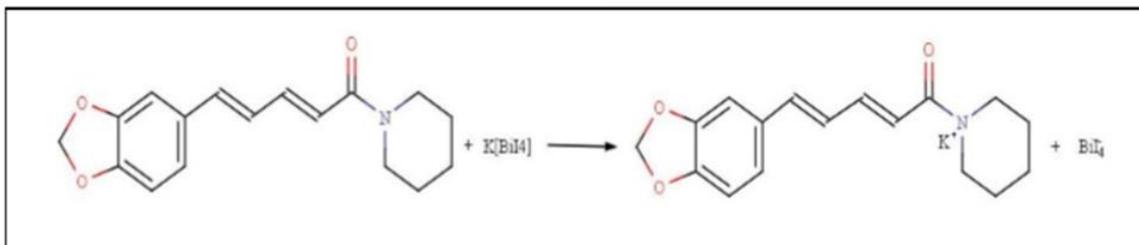
Gambar 2. Uji identifikasi KLT senyawa piperin setelah disemprot *dragendorff*.
Keterangan: (A) sinar tampak, (B) sinar UV 254, (C) sinar UV 366, (P) piperin ($R_f = 0,78$), (K) sebagai pembanding kinin sulfat ($R_f = 0,50$)

Tabel 3. 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			
Kinin SO ₄	Tak nampak	Biru	Biru berpen dar	jingga	coklat	Coklat gelap	8	4	0,5
Piperin	Tak nampak	Biru	Tak Nampak	jingga	coklat	Coklat 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 coklat hingga kuning (jingga) (Marliana *et al*, 2005), sedangkan pada plat KLT terbentuk

warna jingga hingga coklat. Reaksi yang terjadi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff* dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 3. Reaksi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff*

B. UJI *INVITRO* DENGAN METODE *ORGAN BATH*

Uji *invitro* dengan metode *organ bath* menggunakan jaringan atau organ yang terisolasi dan dimasukkan dalam *organ bath* untuk dipertahankan hampir sesuai dengan kondisi fisiologis dari jaringan atau organ tersebut. Menggunakan pendekatan ini, organ dapat hidup dalam beberapa jam, dengan demikian dapat mengetahui respon yang terjadi akibat perlakuan yang telah dilakukan. Penelitian yang biasa dilakukan adalah mempelajari aksi obat secara *invitro* untuk mengkarakterisasi aktivitasnya sebagai agonis atau antanonis (Kitchen, 1984).

1. Penyiapan *buffer krebs*

Buffer krebs terdiri dari dua larutan yaitu larutan A dan larutan B. Kedua larutan tersebut memiliki komposisi yang berbeda. Kandungan larutan A adalah *sodium chloride*, *potassium chloride*, *magnesium sulfat heptahydrate*, *calcium chloride dihydrate*, *sodium phosphate 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 *buffer krebs* yang telah jadi kemudian diatur suhunya 10°C pada *magnetic. Buffer krebs* dipilih karena *buffer* tersebut secara alami ada pada darah hewan mamalia. Larutan *buffer* tersebut akan efektif dalam keadaan setimbang apabila dialiri dengan gas carbogen (campuran 95% oksigen dan 5% karbondioksida).

2. Penyiapan alat *organ bath*

Pada satu set alat *organ bath* terdiri dari seperangkat komputer yang telah terinstal software *LabScribe 2*, *organ bath*, *tranduser isotonic* dan *bridge amplifier*. Sebelum dihidupkan *organ bath* diisi dengan aquades hingga indikator tidak berbunyi, air sebagai mediator 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.

3. Preparasi organ aorta marmut

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 sebanyak 5 ml.

4. Uji *Invitro* Aktivitas senyawa *piperin* dalam *Piper Nigrum L.*

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

Mekanisme kerja dari agonis beta telah banyak dilakukan dan dikaji secara mendetail. Aktivitas ketiga sub-tipe reseptor (β 1,2,3) mengaktivasi adenilil siklase yang menyebabkan disosiasi subunit α nya dengan GTP dan kenaikan perubahan ATP menjadi cAMP. Aktivitas enzim siklase ini diperantarai oleh pemacu pasangan protein Gs. Protein Gs tersebut merupakan jenis dari *G-protein-coupled Receptor* (GPCR). Protein Gs apabila teraktivasi akan menstimulasi proses normal sel 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).

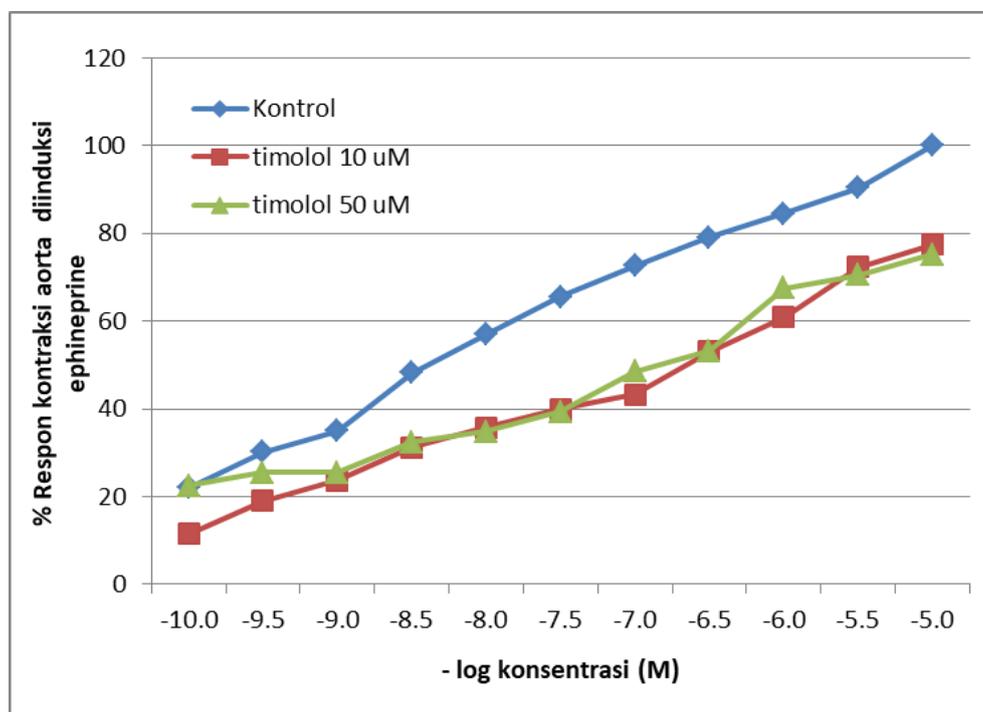
IP₃ yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP₃ pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potential Channels* (TRPC) dan mengakibatkan pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca²⁺ intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium di permukaan membran sel (Sanders, 2001). Dengan 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). Reseptor β₂ adrenergik terdapat pada saluran pernafasan dan pembuluh darah. Aktivitas agonis β₂ adrenergik pada pembuluh darah akan menyebabkan kontraksi otot polos pembuluh darah pada manusia maupun marmut akibat adanya aktivitas Ca²⁺ yang teraktivasi oleh GCPR.

5. Uji Pembandingan Menggunakan Timolol (Kontrol Positif)

Reseptor β₂ adrenergik terdapat pada saluran pernafasan dan pembuluh darah. Aktivitas agonis β₂ adrenergik pada pembuluh darah akan menyebabkan kontraksi otot polos pembuluh darah pada manusia maupun marmut.

Uji pembandingan dilakukan menggunakan timolol dengan menggunakan metode yang sama persis dengan perlakuan dengan piperin. Timolol telah diketahui sebagai antagonis β adrenergik nonspesifik sehingga akan menimbulkan efek dilatasi otot polos pembuluh darah. Biasanya

digunakan sebagai tetes mata untuk menurunkan tegangan mata dengan cara memvasodilatasi pembuluh darah pada mata. Tujuan dilakukannya uji timolol sebagai pembanding adalah untuk melihat aktivitas piperin dapat menunjukkan hasil yang hampir sama dengan timolol atau tidak. Selain itu juga sebagai validasi penelitian, jika uji timolol telah terbukti *valid* memiliki aktivitas antagonisme reseptor β_2 adrenergik.



Gambar 4. Kurva hubungan logaritma konsentrasi adrenalin terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, dengan pra perlakuan timolol 10 dan 50 μ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi adrenalin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 5 - 10$)

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai EC_{50} . Nilai EC_{50} adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50% (Tabel 4.). Nilai EC_{50} selanjutnya ditransformasikan menjadi nilai pD_2 yang diperoleh dari $-\text{Log. } EC_{50}$.

Table 1. Kenaikan EC_{50} akibat pemberian praperlakuan timolol

No.	Kelompok Perlakuan	EC_{50} (M)
1	Kontrol Adrenalin	$1.46 \pm 0,61 \times 10^{-8}$
2	Timolol 10 μ M	$5.71 \pm 2,2 \times 10^{-7}$
3	Timolol 50 μ M	$7.94 \pm 4,3 \times 10^{-7}$

Keterangan : Nilai EC_{50} disajikan dalam bentuk rata – rata \pm SEM

Hasil uji praperlakuan dengan timolol dosis 10 dan 50 μ M menunjukkan efek relaksasi dengan melandainya kurva dan terjadi penurunan nilai pD2. Profil kurva menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi adrenalin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos aorta terisolasi. Pergeseran kuva akibat pemberian timolol 10 dan 50 μ M pada saat praperlakuan menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian adrenalin, hal tersebut ditandai dengan penurunan nilai pD2 Adrenalin. Nilai rata-rata pD2 adrenalin untuk perlakuan kontrol, timolol konsentrasi 10 μ M dan 50 μ M berturut-turut adalah 8,15, 6,47 dan 6,34. Penurunan nilai pD2 adrenalin pada pemberian timolol timolol 10 dan 50 μ M bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Tetapi konsentrasi timolol 10 dan 50 μ M tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga pada pemberian timolol dosis 10 μ M sudah mampu memberikan efek vasodilatasi pada otot polos aorta.

Tabel 2. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh timolol 10 dan 50 μ M

No.	Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Adrenalin	$8,15 \pm 0.17$	100.00 ± 0.00
2	Timolol 10 μ M	$6,47 \pm 0.18(*)$	$77,46 \pm 6.86$
3	Timolol 50 μ M	$6,34 \pm 0.16(*)$	$75,09 \pm 7.81$

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 Adrenalin kontrol(*)

Antagonis non kompetitif memiliki sifat tak terbalikkan (irreversibel) dengan ditunjukkan pada nilai Emaks yang tidak mencapai 100% pada praperlakuan timolol. Praperlakuan aorta dengan timolol 10 μM hanya dapat mencapai Emaks 77.46 % dan pada pemberian timolol 50 μM mencapai Emaks 75.09 %. 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 Emaks tidak dapat mencapai 100 %..

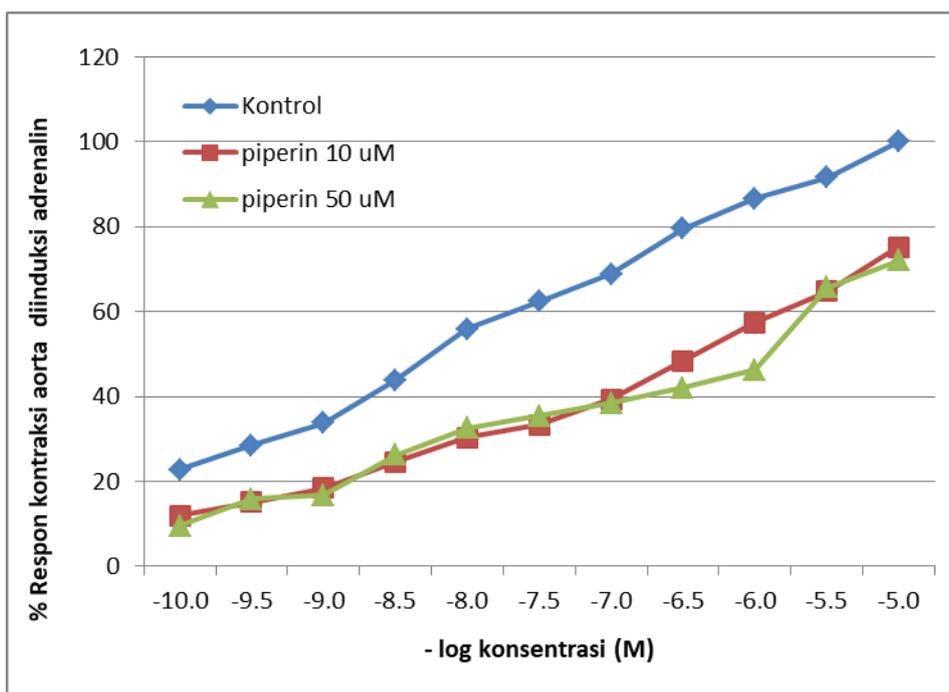
6. Pengaruh Piperin Terhadap Reseptor β_2 Adrenergik Otot Polos Aorta.

Pengaruh aktivitas piperin terhadap reseptor β_2 adrenergik diuji dengan mengamati perubahan profil kurva seri konsentrasi agonis yaitu ephineprine dengan % kontraksi 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 ephinerprine dengan praperlakuan piperin dan tanpa praperlakuan piperin. Praperlakuan dengan piperin seharusnya menunjukkan hasil penurunan nilai pD₂ dibandingkan dengan praperlakuan 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).

Ephineprine memiliki aktivitas memicu kontraksi setelah berikatan dengan reseptor β_2 adrenergik pada otot polos aorta. Pemberian seri konsentrasi bertingkat ephineprine eksogen menunjukkan peningkatan % respon kontraksi otot polos aorta yang terisolasi. Respon kontraksi maksimal (100%) otot polos aorta tercapai pada pemberian ephineprin eksogen dengan konsentrasi 1×10^{-5} .



Gambar 5. Kurva hubungan logaritma konsentrasi adrenalin terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, dengan pra perlakuan piperin 10 dan 50 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi adrenalin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 5 – 10)

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai EC_{50} . Nilai EC_{50} adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50%.

Nilai konsentrasi dengan praperlakuan piperin menunjukkan kenaikan (tabel 6.), sehingga agar dapat memberikan respon kontraksi yang sama pada Nilai EC_{50} tanpa praperlakuan timolol perlu adanya peningkatan konsentrasi agonis. Nilai EC_{50} selanjutnya ditransformasikan menjadi nilai pD2 yang diperoleh dari $-\text{Log. } EC_{50}$.

Tabel 3. Kenaikan EC_{50} akibat pemberian praperlakuan piperin

No.	Kelompok Perlakuan	EC_{50} (M)
1	Kontrol Adrenalin	$1.18 \pm 0,61 \times 10^{-8}$
2	Piperin 10 μM	$1.79 \pm 0,97 \times 10^{-6}$
3	Piperin 50 μM	$1.26 \pm 0,25 \times 10^{-6}$

Keterangan : Nilai EC_{50} disajikan dalam bentuk rata – rata \pm SEM

Terjadi aktivitas relaksasi pada aorta marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri adenalin eksogen akibat praperlakuan piperin dosis 10 dan 50 μM . Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran grafik ke bawah dan dengan penurunan nilai pD2. Profil kurva (gambar.8) menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi adrenalin terhadap rata – rata % respon kontraksi aorta marmut terisolasi.

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. Nilai pD2 adrenalin sebagai kontrol, praperlakuan 10 dan 50 μM secara berturut-turut adalah 8.20, 6.20 dan 5.95. Penurunan nilai pD2 adrenalin pada pemberian piperin 10 dan 50 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Tetapi praperlakuan konsentrasi 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 4. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh piperin 10 dan 50 μM

No.	Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Adrenalin	8.20 \pm 0.14	100.00 \pm 0.00
2	Piperin 10 μM	6.20 \pm 0.26	75.16 \pm 7.01
3	Piperin 50 μM	5.95 \pm 0.08	71.99 \pm 7.35

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 Adrenaline(*)

Antagonis non kompetitif memiliki sifat tak terbalikkan (irreversibel) dengan ditunjukkan pada nilai Emaks yang tidak mencapai 100% pada praperlakuan piperin. Praperlakuan aorta dengan piperin 10 μM hanya dapat mencapai Emaks 75.16% dan pada pemberian timolol 50 μM mencapai Emaks 71.99%. Antagonis non kompetitif 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 untuk menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai Emaks tidak dapat mencapai 100 %.

C. UJI INSILICO SENYAWA PIPERIN PADA RESEPTOR β_2

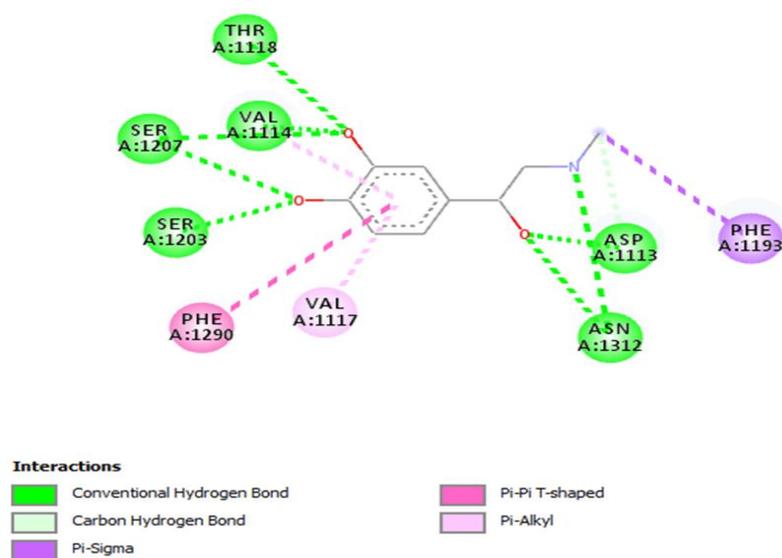
ADRENERGIK

1. Validasi protokol *docking*

Validasi protokol *docking* dilakukan untuk membuktikan bahwa protokol yang telah dilakukan valid. Langkah yang dilakukan adalah dengan melihat nilai *Root Mean Square Distance* (RMSD). Jika nilai RMSD dibawah 2,000 Å , maka dapat disimpulkan tidak adanya pergeseran yang bermakna

pada saat proses *docking* dan proses *docking* tersebut valid (Paul & Rognan, 2002). *Native ligand* yang digunakan pada tahapan validasi ini adalah L-Ephineprine (ALE). Nilai RMSD yang diperoleh adalah 0.953 ($< 2,0000$) dengan skor afinitas yang dihasilkan adalah -7.1, sehingga proses docking yang telah dilakukan adalah valid.

2. Hasil Docking Molecular

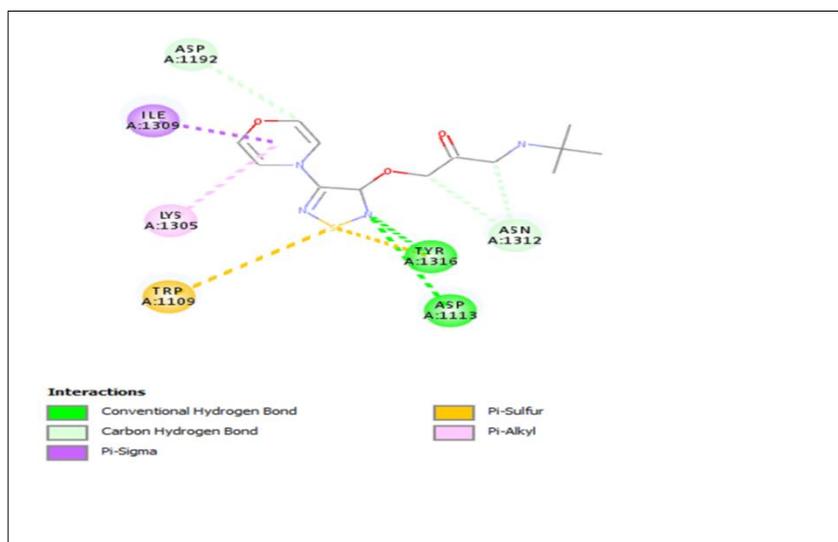


Gambar 6. Hasil Visualisasi 2D Timolol terhadap reseptor β_2 adrenergik. Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligand beserta jenis ikatan yang terjadi.

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*, *Marvinskech*. *Docking* dilakukan pada reseptor β_2 adrenergik pada manusia (PDBQT:4LDO). 4LDO merupakan data protein dari reseptor β_2 adrenergik

yang memiliki *native ligand* Ephineprine (ALE), sehingga dipilih untuk *docking molecular*.

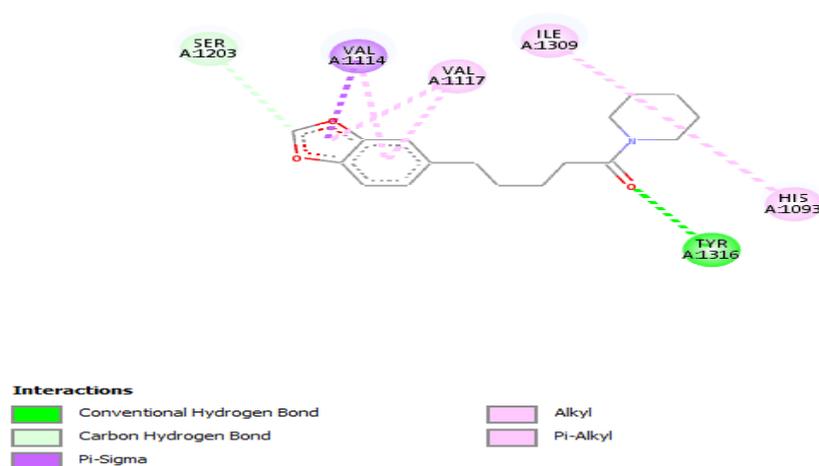
Proses *docking* yang dilakukan menghasilkan 9 konformasi. Berdasarkan hasil 9 konformasi tersebut dilihat pada nilai energi ikatannya untuk memilih yang terbaik karena nilai energi konformasi menggambarkan kekuatan ikatan antara ligan terhadap protein yang diikat. Nilai energi ikatan yang semakin negatif, maka kekuatan ikatannya semakin besar terhadap reseptor. Nilai RMSD yang diperoleh adalah *Lower bond* 0.953 \AA ($< 2,0000 \text{ \AA}$) dan *upper bond* $1,911 \text{ \AA}$ dengan skor affinitas yang dihasilkan adalah -7.1 . Nilai energi ikatan dan interaksi antara masing-masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada gambar Senyawa ephineprine diketahui terikat pada beberapa residu dari protein, yaitu *THR 1118*, *VAL 1114*, *SER 1207*, *SER 1203*, *PHE 1290*, *VAL 1117*, *ASP 1113*, *ASN 1312* dan *PHE 1193*



Gambar 7. Hasil Visualisasi 2D Timolol terhadap reseptor β_2 adrenergik. Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi

Timolol adalah obat golongan beta bloker dalam bentuk sediaan tetes mata. Obat ini memiliki efek menurunkan tekanan di dalam bola mata dengan cara mengurangi cairan yang menumpuk pada permukaan lensa mata. Hal inilah yang dapat mencegah kebutaan pada matar. Mekanismenya dengan cara memblok reseptor reseptor β_2 adrenergik pada pembuluh darah mata. Obat ini dijadikan sebagai ligan pembanding dengan piperin.

Proses *docking* timolol terhadap reseptor β_2 adrenergik yang telah dilakukan menghasilkan 9 konformasi. Berdasarkan hasil 9 konformasi tersebut dilihat pada nilai RMSD dibawah 2 dan nilai afinitas paling negatif dan dipilih pada konformasi nomor 2, dikarenakan hanya pada konformasi nomor 2 yang memiliki nilai RMSD dibawah 2 yaitu nilai RMSD *Lower bond* 0,984 Å (< 2,0000 Å) dan *upper bond* 1,559 Å dan nilai afinitasnya -6,9. Asam amino yang sama berikatan dengan native ligan adalah ASP 1113 dan ASN 1312.



Gambar 8. Hasil Visualisasi 2D Piperin terhadap reseptor β_2 adrenergik. Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligand beserta jenis ikatan yang terjadi.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer, skor docking dari senyawa alkaloid lada *Piper nigrum* L. pada reseptor yg paling baik yaitu -9,1 dengan nilai RMSD *Lower bond* 1,438 Å ($< 2,0000$ Å) dan *upper bond* 2,186 Å yang terletak pada konformasi ke 4. Pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa alkaloid lada *Piper nigrum* L. mengikat pada beberapa residu dari protein target. Asam amino yang mengikat sama dengan yang terikat pada native ligan adalah *VAL 1114*, *VAL 1117*, dan *SER 1203*

Tabel 5. Nilai energi ikatan dan interaksi ligan dengan residu protein target

Ligand	Energi ikatan (kkl/mol)	Residu Protein
Ephineprine (ALE) sebagai ligan asli	-7,1	<i>Threonine 1118</i> <i>Valine 1114</i> (*) <i>Serine 1207</i> <i>Serine 1203</i> (*) <i>Phenylalanine 1290</i> <i>Valine 1117</i> (*) <i>Aspartic acid 1113</i> (**) <i>Asparagine 1312</i> (**) <i>Phenylalanine 1193</i>
Timolol	-6,9	<i>Aspartic acid 1192</i> <i>Isoleucine 1309</i> <i>Lysine 1305</i> <i>Tryptophan 1109</i> <i>Tyrosine 1316</i> <i>Aspartic acid 1113</i> (**) <i>Asparagine 1312</i> (**)
Piperin	-9,1	<i>Serine 1203</i> (*) <i>Valine 1114</i> (*) <i>Valine 1117</i> (*) <i>Isoleucine 1309</i> <i>Tyrosine 1316</i> <i>Histidine 1093</i>

Keterangan : (*) memiliki jenis asam amino yang sama dalam mengikat ligan yaitu antara ligan asli dengan piperin. (**) memiliki jenis asam amino yang sama dalam mengikat ligan yaitu antara ligan asli dengan Timolol

Berdasarkan hasil *docking* menghasilkan residu protein yang mengikat ligan untuk menghasilkan aktivitas farmalogi. Berdasarkan tabel 3. Terlihat

bahwa timolol sebagai ligan pembanding berikatan dengan 2 asam amino yang sama dengan ligan asli. Kedua asam amino ini berperan penting dalam ikatan antara timolol dengan reseptor β_2 adrenergik sebagai antagonis. Kedua asam amino tersebut adalah *Aspartic acid 1113 (ASP 1113)* dan *Asparagine 1312(ASN 1312)*. ASP 1113 berikatan pada gugus amina dengan ikatan hidrogen konvensional, sedangkan ASN 1312 berikatan pada gugus CH_2 membentuk ikatan hidrogen karbon.

Pada piperin sebagai ligan yang diujikan berikatan dengan 3 asam amino yang sama dengan ligan asli. Asam amino tersebut *Valine 1114*, *Valine 1117* dan *Serine 1203* adalah Asam amino yang berikatan antara ligan asli dengan timolol dan ligan asli dengan piperin menunjukkan perbedaan sisi aktif dari molekul dalam berikatan dengan reseptor. Asam amino *Valine 1114* dan *Valine 1117* berikatan dengan piperin dan membentuk ikatan pi-sigma dan ikatan pi-alkil. Sedangkan *Serine 1203* berikatan dengan piperin membentuk ikatan karbon hidrogen. Berdasarkan hasil tersebut, piperin dan timolol memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor β_2 -adrenergik dengan cara berikatan dengan reseptor tetapi memiliki sisi aktif yang berbeda.