

UJI AKTIVITAS ANTAGONISME PIPERIN (*Piper nigrum* L.) PADA RESEPTOR β_2 -ADRENERGIK ORGAN AORTA MARMUT TERISOLASI : STUDI *INVITRO* DAN *INSILICO*

TEST OF PIPERINE ANTAGONISM ACTIVITY (*Piper nigrum* L.) AT THE β_2 -ADRENERGIC RECEPTOR ON ISOLATED GUINEA PIG AORTA : *INVITRO* AND *INSILICO* STUDIES

Nanda Priatmoko Pamuji Indra Putra* Puguh Novi Arsito, M.Sc., Apt**
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta *
Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta**
nandapriatmoko@gmail.com

INTISARI

Piperin adalah salah satu senyawa alkaloid yang terkandung di dalam lada (*Piper nigrum* L.). Kontraksi pembuluh darah terjadi apabila adrenalin yang berikatan pada β -*adrenoreceptors*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian alkaloid piperin dari *Piper Nigrum* L. terhadap β -*adrenoreceptors* dan aktivitas antagonisme pada aorta marmut terisolasi serta nilai Afinitas piperin dari hasil *docking molecular*.

Penelitian dilaksanakan secara *invitro* menggunakan instrumen *organ bath* dan *insilico* menggunakan metode *docking molecular*. Pengujian piperin menggunakan dosis 10 μ M dan 50 μ M terhadap organ marmut terisolasi. Data yang diperoleh adalah jumlah persen kontraksi aorta terhadap pemberian seri konsentrasi agonis yang akan diubah menjadi pD2. Nilai pD2 dianalisis secara statistik menggunakan *One-way* Anova dan dilanjutkan dengan *post-hoc test* LSD dengan taraf kepercayaan 95%. Penelitian *insilico* dilakukan menggunakan piperin sebagai *ligand* dan reseptor β_2 -adrenergik pada manusia (PDB ID: 4LDO).

Hasil menunjukkan bahwa piperin dosis 10 μ M dan 50 μ M mampu menggeser kurva persentase respon kontraksi terhadap pemberian seri agonis. Pemberian piperin dosis 10 μ M dan 50 μ M tidak mampu mengembalikan nilai E_{maks} kembali seperti semula (100%). Nilai E_{maks} pemberian piperin dosis 10 μ M dan 50 μ M secara berturut-turut adalah 75.16 % dan 71.99 %. Sedangkan nilai pD2 kontrol sebesar 8.20, nilai pD2 piperin dosis 10 μ M 6.22 dan nilai pD2 piperin dosis 50 μ M adalah 5.95. Nilai Afinitas piperin dari hasil *docking molecular* terhadap reseptor β_2 -adrenergik adalah sebesar -9,1.

Kata kunci : piperin, *invitro*, *insilico*, isolasi organ, antagonis β_2 adrenergik

ABSTRACT

*Piperin is one of the alkaloid compounds contained in pepper (*Piper nigrum L.*). Blood vessel contraction occurs when adrenaline binds to β -adrenoreceptors. The purpose of this study was to determine the effect of piperine alkaloid from *Piper nigrum L.* against β -adrenoreceptors and antagonism activity in isolated marmot aorta and piperine affinity values from molecular docking results.*

The study was conducted in an invitro using instruments organ bath and insilico using molecular docking method. Piperin tests used a dose of 10 μ M and 50 μ M and toward isolated guinea pig organs. The data obtained is the number of percent of aortic contraction of the agonist concentration series that will be converted to pD2. The pD2 values were statistically analyzed using One-way Anova and followed by a post-hoc LSD test with 95% confidence level. Insilico studies were performed using piperin as a ligand and β_2 adrenergic receptor in humans (GDP ID: 4LDO).

The results showed that piperin doses of 10 μ M and 50 μ M were able to shift the contraction response percentage curve to the agonist series administration. The administration of piperin doses of 10 μ M and 50 μ M was not able to return the value of E_{max} back to normal (100%). Emerging values of piperin dose of 10 μ M and 50 μ M were 75.16% and 71.99%, respectively. While the value of pD2 control of 8.20, pD2 piperin value dose 10 μ M 6.22 and pD2 piperin dose 50 μ M is 5.95. The value of piperine affinity from the molecular docking result on β_2 adrenergic receptor is -9.11.

Keywords: piperine, invitro, insilico, organ isolation, β_2 adrenergic antagonist

Pendahuluan

Lada (*Piper nigrum L.*) merupakan salah satu tanaman yang digolongkan famili *Piperaceae*. Lada terbukti memiliki aktivitas antipiretik, analgesik, antiinflamasi, antibakteri, antikonvulsan, antioksidan, anti tumor, penekan sistem syaraf pusat dan memiliki aktivitas hepatoprotektif (Pei Y Q, 1983).

Beberapa senyawa yang terkandung di dalam lada adalah piperin 5–9 %, piperonal 2,5 %, kariofilen 8,8 % dan amilum 50 % (Claus, *et al.*, 1970). Menurut Stahl (1985) dari beberapa

senyawa tersebut yang diduga memiliki aktivitas biologi adalah piperin. Pengujian yang dilakukan secara *invivo* terhadap piperin menunjukan khasiat sebagai antiinflamasi, antiarthritis dengan cara menghambat beberapa mediator inflamasi dan sebagai antinosiseptif (Bang *et al*, 2009).

Penelitian mengenai aktivitas senyawa piperin telah banyak dilakukan, salah satunya adalah Piperin diketahui tidak memiliki efek langsung terhadap jantung, meskipun menunjukan adanya aktivitas inotropik dan konotropik positif yang dimediasi melalui

pelepasan peptida yang terkait pada gen kalsitonin dari saraf *nonadrenergic* dan *noncholinergic* pada atrium tikus yang terisolasi (Miyachi,1989). Piperin diketahui memiliki aktivitas spasmolitik dalam bentuk isolat. Efek spasmolitik dari senyawa piperin yang diinduksikan pada uterus tikus dimediasi melalui kanal kalsium dan β -*adrenoreceptors*. Hasil ini dapat membuktikan bahwa penggunaan lada hitam dalam pengobatan tradisional dapat digunakan sebagai pereda menorrhagia (Kazem dan Yahyavi, 2007).

Metode penelitian

Alat : alat yang digunakan meliputi satu set alat untuk preparasi organ, vortex , pengaduk magnet thermostat (Cimarec), transduser isotonic, rekorder, dua set *organ bath* (Ugo Basil) volume 20 mL, bridge amplifier, pipet mikro 100 μ L, 1000 μ L dan 5000 μ L.

Bahan : Isolasi piperin dengan menggunakan sokletasi, *buffer krebs*, gas karbogen (Samator), ephineprine (Ephineprine injk.), Timolol (Cendo Timol 0,5%) dan aquades (Bratacho).

Prosedur Kerja Dan Alur Penelitian

Uji insilico : uji insilico dilakukan dengan menggunakan metode *docking molecular*. Metode ini hanya menggambarkan proses ikatan antara reseptor dengan ligannya beserta skor dockingnya.

Penyiapan *buffer krebs*

Larutan *buffer krebs* terdiri atas dua macam larutan. Formula A masing-masing ditimbang lalu dilarutkan

dengan akuades hingga volume 1L, kemudian formula B ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L. Untuk membuat larutan *buffer krebs* dicampurkan formula A dan formula B masing-masing 100 mL, glukosa 1,00 gram kemudian ditambahkan akuades 800 mL pada saat akan digunakan.

Penyiapan Larutan Alkaloid *Piper nigrum L.*

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-2} M. untuk membuat larutan tersebut, alkaloid *Piper nigrum L.* ditimbang seksama seberat 28,534 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan alkaloid *Piper nigrum L.* 2×10^{-2} M diencerkan menggunakan larutan *buffer krebs* hingga diperoleh konsentrasi 2×10^{-3} M. Larutan 2×10^{-3} M ditambahkan sebanyak 100 dan 500 μ L ke dalam *organ bath* yang telah berisi organ aorta dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum L.* konsentrasi 10 μ M dan 50 μ M.

Penyiapan seri konsentrasi adrenalin

Larutan adrenalin dibuat sebagai larutan stok adrenalin konsentrasi 2×10^{-3} M dalam akuades. adrenalin memiliki bobot molekul 183,2044 g/mol. Pengenceran larutan stok adrenalin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok Adrenalin 2×10^{-3} M sehingga diperoleh larutan adrenalin konsentrasi 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} ; 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} dan 2×10^{-8} M.

Pembuatan Larutan Timolol 2×10^{-3}

Larutan stok timolol (BM : 316,421 g/mol) dibuat pada konsentrasi 2×10^{-3} M. Sebanyak 6,33 mg serbuk timolol dilarutkan dalam akuades

hingga 10,0 mL, dikarenakan sediaan yang ada adalah tetes mata 5 mg/ml maka diambil 1,26 ml dari sediaan tetes mata dan diencerkan dengan WFI sampai 10 ml. Larutan dengan konsentrasi 10^{-5} M ($10\mu\text{M}$) didapatkan dengan mengambil larutan timolol 2×10^{-3} M sebanyak 100 μL kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *bufe krebs*. Larutan dengan konsentrasi 5×10^{-5} M ($50\mu\text{M}$) didapatkan dengan mengambil larutan timolol 2×10^{-3} M sebanyak 500 μL lalu dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *buffer krebs*.

Uji Aktivitas Alkaloid *Piper nigrum* L. Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas alkaloid *Piper nigrum* L. terhadap agonis reseptor β adrenergik pada organ aorta marmut yang terisolasi dengan alat *organ bath* dengan pengenalan agonis pada kadar tertinggi terlebih dahulu. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan larutan *buffer Krebs*, kemudian organ tersebut direndam dan diekuilibrasi sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Kemudian, diberi agonis dan respon kontraksi direkam pada rekorder. Senyawa agonis diberikan sampai mencapai kontraksi maksimum (100%). Pengukuran kontraksi organ dilakukan sebanyak dua kali. Pengukuran pertama dan kedua dilakukan selama 30 menit, dan tiap lima menit sekali larutan *buffer krebs* diganti. Pada pemberian kedua setelah pencucian dan organ dalam keadaan stabil, kemudian diberikan diberikan alkaloid *Piper nigrum* L. konsentrasi 10 dan 50 μM . Selanjutnya diberikan agonis dengan kadar seri bertingkat dan

respon kontraksi akan tercatat pada rekorder. Kemudian kurva hubungan antara konsentrasi dengan % respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* L yang terjadi dibandingkan.

Uji Pembanding Timolol

Uji pembanding dengan timolol dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian efek relaksasi senyawa alkaloid *Piper nigrum* L. Organ aorta marmut dikontraksi dengan adrenalin sebelum ditambahkan dengan timolol sebagai antagonis adrenergik. Kurva hubungan jumlah konsentrasi adrenalin terhadap % respon relaksasi organ aorta kemudian di bandingkan dengan perlakuan yang diberikan senyawa alkaloid *Piper nigrum* L.

Prosedur uji pembanding timolol dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian efek vasodilatasi oleh senyawa alkaloid *Piper nigrum* L. Sebelum ditambahkan antagonis adrenergik yaitu timolol, organ aorta marmut dikontraksikan dengan adrenalin. Kurva hubungan jumlah konsentrasi adrenalin terhadap % respon relaksasi organ aorta kemudian, dibandingkan dengan respon dari perlakuan senyawa alkaloid *Piper nigrum* L.

Analisis data

Nilai EC_{50} (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* L. dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan persamaan 2.

Nilai EC_{50} ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk $pD2$, dimana $pD2$ adalah nilai dari $-\text{Log. } EC_{50}$ (persamaan 3) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* L.) dan nilai rata-rata $pD2$ agonis \pm *Standard Error* ($pD2 \pm SE$). Pergeseran nilai $pD2$ dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

$$\text{Log}EC_{50} = \left[\frac{50-Y_1}{Y_2-Y_1} \times (X_2 - X_1) \right] + X_1 \dots \dots (2)$$

Keterangan :

X_1 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di bawah 50%

X_2 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di atas 50%

Y_1 : % respon tepat di bawah 50%

Y_2 : % respon tepat di atas 50%

$pD2 = -\text{Log. } EC_{50} \dots \dots \dots (3)$

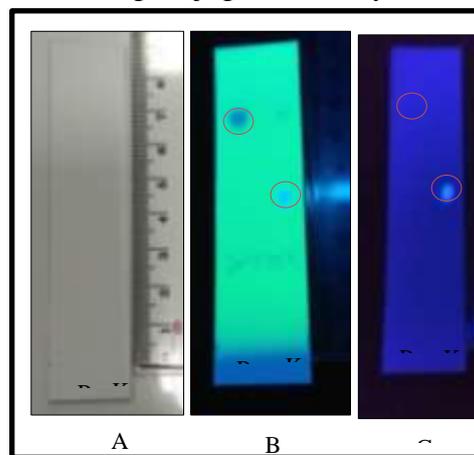
Distribusi data $pD2$ adrenalin dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode *Kolmogorov-Smirnov*). Penurunan nilai $pD2$ selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji *one-way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *LSD* pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Identifikasi Piperin Dengan Metode KLT

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,

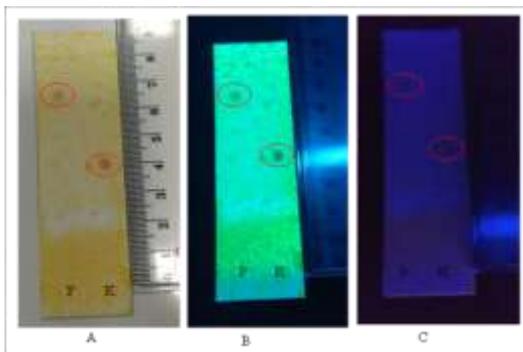
sinar uv 254 nm, sinar uv 366 nm sebelum dan sesudah diberi pereaksi *dragendorff*. Hasil yang diperoleh adalah nilai bercak piperin berada di atas ($R_f = 0,78$) sedangkan pembandingnya kinin ($R_f = 0,50$) berada pada tengah jalur elusidasi. Nilai R_f yang semakin tinggi menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki sifat kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal ini



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 ($R_f = 0,50$)

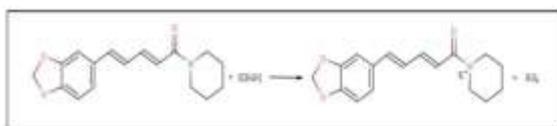
dikarenakan fase diam yang digunakan bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan memiliki nilai R_f yang lebih rendah karena senyawa tersebut tertahan oleh fase diam yang bersifat polar. Kinin sulfat bersifat lebih polar dikarenakan dalam bentuk garamnya sehingga memiliki nilai R_f yang lebih rendah dibandingkan piperin dalam bentuk bebas.

Deteksi alkaloid selanjutnya dilakukan melalui penampakan bercak menggunakan menggunakan pereaksi *dragendorff*. Hasil yang diperoleh adalah penampakan bercak pada



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 ($R_f = 0,50$)

cahaya tampak. 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 2. menunjukkan adanya perubahan warna menjadi bercak jingga pada senyawa piperin (P), begitu juga pada larutan kinin sulfat (K) yang berfungsi sebagai pembanding. Hasil uji dengan menggunakan pereaksi *dragendorff*, pada gugus nitrogen akan berikatan dengan K^+ yang merupakan ion logam akan membentuk ikatan kovalen sehingga



gambar 3. Reaksi antara piperin dengan pereaksi *dragendorff*

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 3.

Uji aktivitas *invitro* dengan senyawa piperin

Campuran antara piperin dan piperidine menunjukkan efek farmakologis sebagai antihipertensi, tanpa menyebutkan mekanismenya secara spesifik. (Miyuchi,1989).

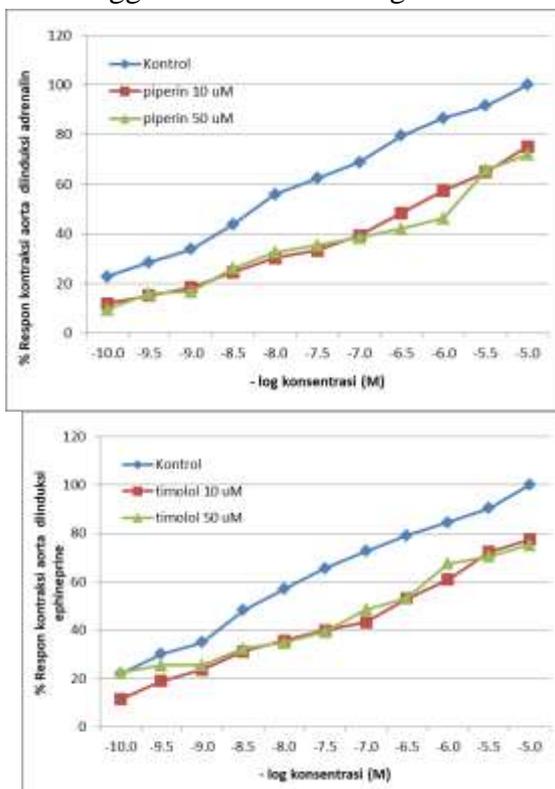
Mekanisme kerja dari agonis beta telah banyak dilakukan dan dikaji secara mendetail. Aktivitas ketiga sub-tipe reseptor ($\beta 1,2,3$) mengaktifasi adenilil siklase yang menyebabkan disosiasi subunit nya dengan GTP dan kenaikan perubahan ATP menjadi cAMP. Aktivitas enzim siklase ini diperantarai oleh 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 Potensial Channels* (TRPC) dan mengakibatkan pelepasan Ca^{2+} dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca^{2+} intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium di permukaan membran sel (Sanders, 2001). Dengan aktifnya kanal kalsium menyebabkan influks Ca^{2+} ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar Ca^{2+} instaseluler yang menginduksi

terjadinya kontraksi otot polos (Gosens et al., 2006). Reseptor β_2 adrenergik terdapat pada saluran pernafasan dan pembuluh darah. Aktivitas agonis β_2 adrenergik pada pembuluh darah akan menyebabkan kontraksi otot polos pembuluh darah pada manusia maupun marmut akibat adanya aktivitas Ca^{2+} yang teraktivasi oleh GCPR.

Uji Pembeding Menggunakan Timolol (Kontrol Positif)

Uji pembeding dilakukan menggunakan timolol dengan



Gambar 2. Kurva hubungan logaritma konsentrasi adrenalin terhadap % respon kontraksi otot polos aorta marmut terisolasi, dengan pra perlakuan piperin dan 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)

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. Tujuan dilakukannya uji timolol sebagai pembeding 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. 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 kurva 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.

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 konsentras 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 %.

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*. Terjadi aktivitas relaksasi pada aorta marmut teriolasi yang diinduksi oleh seri adenalin eksogen akibat praperlakuan piperin dosis 10 dan 50 μM .

Table 1. Pergeseran nilai pD2

No.	Kelompok Perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Adrenalin	8,15 \pm 0.17	100.00 \pm 0.00
2	Timolol 10 μM	6,47 \pm 0.18(*)	77,46 \pm 6.86
3	Timolol 50 μM	6,34 \pm 0.16(*)	75,09 \pm 7.81
4	Piperin 10 μM	6.20 \pm 0.26	75.16 \pm 7.01
5	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(*)

Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran grafik ke bawah dan dengan penurunan nilai pD2. Profil kurva (gambar .2) 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.

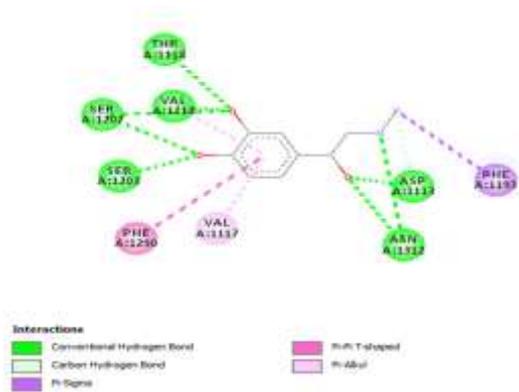
Antagonis non kompetitif memiliki sifat tak terbalikkan (irreversibel) dengan ditunjukkan pada nilai Emaks yang tidak mencapai 100% pada praperlakuan piperin. Praperlakuan aorta dengan piperin 10 μM hanya dapat mencapai Emaks 75.16% dan pada pemberian timolol 50 μM mencapai Emaks 71.99%. Antagonis non kompetitif merupakan

suatus 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 %.

UJI *INSILICO* SENYAWA PIPERIN PADA RESEPTOR B₂-ADRENERGIK

Validasi protokol *docking*

Validasi protokol *docking*

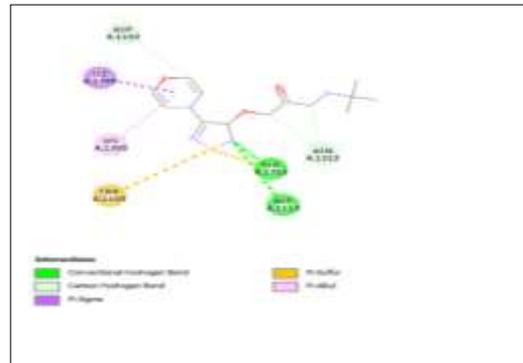


Gambar 3. Hasil Visualisasi 2D Timolol terhadap reseptor β_2 adrenergik.

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 Å) dengan skor affinitas yang dihasilkan adalah -7.1,

sehingga proses *docking* yang telah dilakukan adalah valid.

Hasil *Docking Molecular*



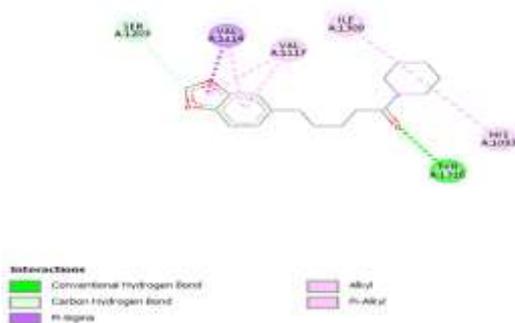
Gambar 4. Hasil Visualisasi 2D Timolol terhadap reseptor β_2 adrenergik.

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 Å (< 2,0000 Å) dan *upper bond* 1,911 Å 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 119*.

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 5. Hasil Visualisasi 2D Piperin terhadap reseptor β_2 adrenergik.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer, skor doking 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*

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 CH₂ 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.

KESIMPULAN

Alkaloid *Piper nigrum* L memiliki aktivitas antagonisme yang dapat dilihat pada penurunan nilai pD₂. Dosis optimal Alkaloid *Piper nigrum* L. yang dapat digunakan sebagai antagonisme adalah 10 µM. Hal ini berdasarkan penurunan nilai pD₂ agonis reseptor β₂ adrenergik pada dosis 10 dan 50 µM tidak berbeda signifikan pada uji LSD. Uji *Insilico* menunjukkan piperin dapat berikatan pada reseptor β₂ adrenergik dengan lebih baik (skor *docking* : -9,1) dibandingkan dengan Ephineprine (skor : -7,1) dan timolol (skor : -6,9).

Journal Of Pharmacology & Therapeutics 6:35-40.

Marliana, Soerya Dewi, Venty, S., Suyono, (2005), *Skринing Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, Biofarmasi* 3 (1): 2631, Februari 2005, ISSN: 1693-2242.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 piperine in human interleukin 1β-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis research & therapy*, 11(2), R49.
- Claus, Edward P., Varro E. Tyler, and Lynn R. Brady, 1970, *Pharmacognosy*, 6th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, 247.
- Gandjar, I.G., & Abdul Rohman, (2007), *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Gosens, R., Zaagsma, J, Meurs, H. and Halayko, A.J., (2006), Muscarinic Receptor Signaling in the Pathophysiology of Asthma and COPD, *Respir.Res.*7(1) : 73-87.
- Kazem , Mohammad G. N., Yahyavi, Hoda. 2008. Spasmolytic Activity of Piper Nigrum Fruit Aqueous Extract on Rat Non-Pregnant Uterus. *Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics* 6:35-40.
- Miyauchi T, Ishikawa T, Sugishita Y, Sugishita Y, Saito A, Goto K., 1989, Involvement of calcitonin gene-related peptide in the positive chronotropic and inotropic effects of piperine and development of cross-tachyphylaxis between piperine and capsaicin in the isolated rat atria. *J Pharmacol Exp Ther.*;248: 816–824.
- Pei, Y. Q., (1983), A review of pharmacology and clinical use of alkaloid ladae and its derivatives, *Epilepsia*, 24(2), 177-182.
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, Edisi terjemahan (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro),
- Sanders, K.M., (2001), Invited Review: Mechanisms of Calcium Handling in Smooth muscles, *J.Appl .Physiol* 91: 1438–1449

Paul, N., & Rognan, D., (2002),
ConsDock: A new program for
the consensus analysis of
protein–ligand interactions,
Proteins: Structure, Function,
and Bioinformatics, 47(4), 521-
53

