

**UJI AKTIVITAS ANTAGONISME ETIL P-METOKSISINAMAT (EPMS)
SENYAWA AKTIF KENCUR (*Kaempferia galanga* L.) TERHADAP RESEPTOR
ACHM₃ PADA ORGAN TRAKEA *Cavia porcellus* TERISOLASI: STUDI *IN VITRO*
DAN *IN SILICO***

*Puguh Novi Arsito, **Siska Nurjannah
Lecturer, Muhammadiyah University of Yogyakarta*
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta**
Email: puguh.arsito@gmail.com

INTISARI

Kencur (*Kaempferia galanga* L.) merupakan salah satu tanaman yang kandungan senyawa aktifnya berpotensi untuk dijadikan sebagai *lead compound*. Salah satu kandungan utama dari kencur adalah Etil p-metoksisinamat (EPMS). Secara empiris kencur digunakan sebagai obat asma. Target reseptor penyakit asma salah satunya adalah AChM₃. Terkait kandungan utama dan kegunaannya secara empiris, maka perlu diadakan penelitian mengenai sifat antagonisme EPMS terhadap reseptor AChM₃.

Penelitian ini menggunakan studi *in vitro* dan *in silico*. Studi *in vitro* dilakukan pengamatan persentase kontraksi dan relaksasi otot polos trakea *Cavia porcellus* terisolasi saat dilakukan pemberian EPMS dengan konsentrasi 100 µM dan 200 µM. Uji ini menggunakan obat pembanding yaitu Atropin dengan perlakuan yang sama. Hasil uji dilihat dari nilai pD₂ kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Uji *in silico* dilakukan dengan *docking* molekuler menggunakan aplikasi *Autodock Vina* dengan ligan EPMS dan reseptor AChM₃. Hasil uji *in silico* dilihat dari skor *docking* dan jenis ikatan yang mengikat pada ligan dan reseptor. Uji ini menggunakan pembanding Atropin dan *native ligand* Tiotropium.

Hasil penelitian menunjukkan EPMS terbukti memiliki aktivitas antagonisme non kompetitif terhadap reseptor AChM₃ baik dari uji *in vitro* maupun *in silico*. Nilai pD₂ mengalami penurunan signifikan mulai dari pemberian konsentrasi 100 µM. Terdapat satu ikatan sama yang mengikat AChM₃ dengan ketiga ligan uji, yaitu ARG C:1095. Skor *docking* dari EPMS (-5,2) lebih tinggi dibandingkan dengan skor Atropin (-6,1) dan *native ligand* Tiotropium (-5,9). Hal ini menunjukkan EPMS memiliki aktivitas antagonisme terhadap AChM₃ namun daya ikat dari EPMS tidak lebih kuat dibandingkan Atropin dan Tiotropium. Kesimpulan dari penelitian ini EPMS memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM₃ pada trakea *Cavia porcellus*, namun senyawa ini memiliki aktivitas yang tidak lebih kuat dari Atropin.

Kata Kunci: Asetilkolin, *in vitro*, *in silico*, etil p-metoksisinamat, trakea.

ABSTRACT

Kencur (*Kaempferia galanga* L.) is one of the plants that has an active compound. The active compound has the potential to be used as a lead compound. One of the main compounds of kencur is Ethyl p-methoxycinnamate (EPMS). Empirically, kencur is used as an asthma medication. One of the asthma receptor targets is AChM3. Regarding its main content and empirically use, it is necessary to conduct research on the antagonism nature of EPMS towards AChM3 receptors.

This research implemented in vitro and in silico studies. In vitro studies were carried out by observing the percentage of contraction and relaxation of isolated *Cavia porcellus* tracheal smooth muscle when given EPMS with concentrations of 100 μ M and 200 μ M. This test utilized a comparison drug, namely Atropine with the same treatment. The test results could be seen from the pD2 value which then were statistically analyzed using the One Way ANOVA test with a 95% confidence level. In silico test was carried out by doing the molecular docking using the Autodock Vina application with EPMS ligands and AChM3 receptors. In silico test results could be seen from the docking score and the type of bond that binds to the ligand and receptor. This test applied comparison of Atropine and Tiotropium native ligands.

The results showed that EPMS was proven to have non-competitive antagonistic activity against AChM3 receptors from both in vitro and in silico tests. The pD2 value decreased significantly starting from administering a concentration of 100 μ M. There was one same bond that bound AChM3 with the three test ligands, namely ARG C: 1095. The docking score of EPMS (-5.2) was higher compared to the score of Atropine (-6.1) and Tiotropium native ligand (-5.9). It indicated that EPMS had antagonistic activity against AChM3. However, the binding capacity of EPMS was not stronger than Atropine and Tiotropium. This study concluded that EPMS had an antagonistic activity against AChM3 receptors on the *Cavia porcellus* trachea, but this compound had an activity that was not stronger than Atropine.

Keywords: Acetylcholine, in vitro, in silico, ethyl p-methoxycinnamate, trachea.

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang kandungan senyawa aktifnya mempunyai potensi untuk dijadikan sebagai obat adalah kencur (*Kaempferia galanga* L.). Kencur merupakan obat herbal dan tanaman aromatik yang bernilai tinggi dari famili Zingiberaceae. Ekstrak metanol dari rimpang kencur mengandung sineol, 3-karen, borneol, kaempferol, kamphene, sinamaldehyd, asam p-metoksisinamat dan etil p-metoksisinamat¹. Dalam pengobatan tradisional kencur digunakan untuk mengatasi hipertensi, rematik dan asma². Asma merupakan salah satu penyakit inflamasi saluran nafas yang ditandai dengan inflamasi, bronkokonstriksi, serta

respon berlebih terhadap rangsangan (hyperresponsiveness)³. Mediator inflamasi utama yang berperan dalam penyakit asma adalah Histamin, Leukotrien dan beberapa Sitokin (Interleukin (IL)-3, IL-4, dan IL-5). Mediator yang berperan dalam asma non atopik adalah asetilkolin³, dan reseptor yang berperan dalam kontraksi otot polos pernapasan adalah AChM₃⁴. Penelitian terdahulu melaporkan bahwa Etil p-Metoksisinamat (EPMS) dalam bentuk asam memiliki aktivitas antikolinergik secara tidak langsung pada anti amnesia⁵.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah EPMS memiliki pengaruh terhadap kontraksi dan relaksasi otot polos trakea. Efek tersebut diamati

berdasarkan selektifitasnya terhadap reseptor yang diduduki asetilkolin. Uji ini dilakukan melalui dua pendekatan yaitu secara *in vitro* melalui metode organ trakea *Cavia porcellus* terisolasi, dan secara *in silico* menggunakan *molecular docking*. Diharapkan dari penelitian ini dapat menghasilkan data-data yang dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada uji *in vitro* meliputi scalpel, cawan petri, pinset, pipet tetes, benang, jarum, gunting bedah, satu set *Organ Bath* volume 20mL, rekorder, pipet mikro. Uji *in silico* menggunakan aplikasi *Discovery Studio Visualizer*, *Autodock Vina*, dan *Marvin Sketch*. Bahan yang dibutuhkan untuk uji *in vitro* adalah senyawa Etil p-Metoksisinamat, trakea *Cavia porcellus* jantan berusia ≥ 3 bulan, agonis reseptor AChM₃, akuades, larutan *Buffer Krebs*, larutan Atropin, dan DMSO. Uji *in silico* membutuhkan bahan *raw file* EPMS, Atropin, dan reseptor AChM₃ (PDB IDE: 4DAJ).

Zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal isolat Etil p-Metoksisinamat dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) yang telah dilakukan determinasi di laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Ahmad Dahlan. Perolehan kristal dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 95% kemudian maserat dikentalkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga agak mengental dan didiamkan di suhu ruang terlindung dari cahaya hingga terbentuk padatan kristal. Padatan tersebut kemudian dilakukan rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksan.

Bahan kimia yang digunakan adalah larutan *buffer krebs*, oksigen medis (Oksigen (O₂): >99,5%, Karbon Dioksida (CO₂) <5,0 v.p.m, Karbon Monoksida (CO): <5,0 v.p.m, Nitrogen (N₂): <100,0 v.p.m, Argon (AR): <0,5 v.p.m, Methane (CH₄): <50,0 v.p.m, Hidrogen (H₂) <5,0 v.p.m, Nitrat Oksida (N₂O): <5,0 v.p.m, H₂O: <25,0 v.p.m), agonis reseptor asetilkolin, larutan atropin, akuades (Brataco®), pelarut dimetil sulfoksida (DMSO).

Uji identifikasi kristal EPMS menggunakan KLT

Kristal EPMS dan pembanding (kristal EPMS murni) dilarutkan dengan etanol kemudian ditotolkan pada plat silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak toluen:etil asetat dengan perbandingan 95:5. Bercak selanjutnya diamati dengan sinar UV 254 nm.

Identifikasi EPMS menggunakan *gas chromatography – mass spectrometry* (GC-MS)

Kristal EPMS dilarutkan dalam metanol kemudian diinjeksikan ke GC-MS dengan kolom HP-5MS (30 m x 0,25 mm IDE x 0,25 μ m). Parameter *scanning* dilakukan dari massa terendah hingga tertinggi⁶.

Uji *In Vitro*

Aktivitas EPMS sebagai antagonis reseptor AChM₃ diamati dari pergeseran kurva respon kontraksi trakea yang diinduksi asetilkolin. Kontraksi diinduksi dengan pemberian seri kadar asetilkolin 2×10^{-8} sampai dengan 2×10^{-2} M.

Organ bath diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer krebs*, kemudian trakea direndam dalam *organ bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrisasi sampai diperoleh kondisi stabil. Pengukuran kontraksi dilakukan dalam dua tahap dimana antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan

pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan buffer tyrode setiap 5 menit. Kontraksi diukur secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada recorder. Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (100%). Pada pengukuran kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian EPMS dengan konsentrasi 100 μM dan 200 μM . Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam organ bath seperti pada pengukuran pertama.

Uji perbandingan juga dilakukan dengan metode yang sama persis dengan EPMS menggunakan antimuskarinik atropin. Uji ini untuk melihat apakah metode sudah valid dengan mengamati kurva respon kontraksi trakea tanpa dan dengan pemberian antimuskarinik atropin.

Uji *In Silico*

Proses docking dilakukan menggunakan AutoDock 4.2 dan *Marvin Sketch*. File hasil preparasi sebelumnya yang meliputi reseptor.pdbqt, out.pdbqt disimpan dalam 1 folder pada *Autodock Vina*. Hasil simulasi *docking* ini berupa file dengan format out.pdbqt yang berisi informasi 10 konformasi dan file

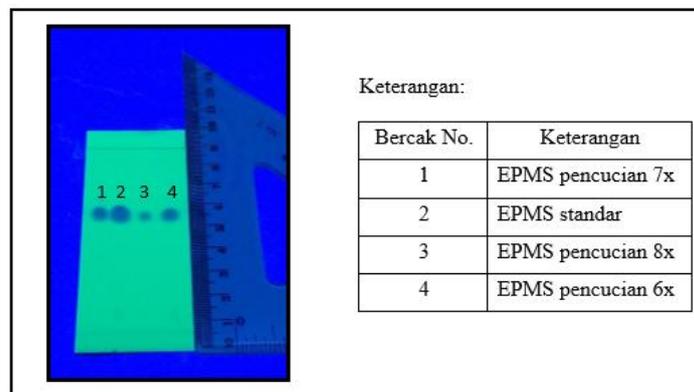
visualisasi.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil.

Setelah didapatkan skor penambatan yang terbaik dari beberapa konformasi, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Aplikasi *DS Visualizer* akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji identifikasi kandungan EPMS

Analisis dengan KLT digunakan untuk mengidentifikasi kandungan EPMS dalam kristal yang diperoleh. Fase gerak yang digunakan adalah toluen:etil asetat (95:5) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 GF254. Plat KLT dibuat dengan panjang 10 cm dengan jarak elusidasi 8 cm. Deteksi bercak dilakukan dengan sinar UV 254 nm, lempeng akan berfluoresensi dan bercak sampel akan tampak berwarna gelap (Gambar 1). Pada fase gerak toluen:etil asetat, baik bercak EPMS standar dengan bercak kristal isolat kencur mendapatkan nilai R_f yang sama (R_f : 0,68). Semakin tinggi nilai R_f maka senyawa tersebut bersifat semakin non polar, dikarenakan fase diam yang bersifat polar sehingga senyawa yang bersifat polar akan tertahan di fase diam, dan menghasilkan nilai R_f yang rendah

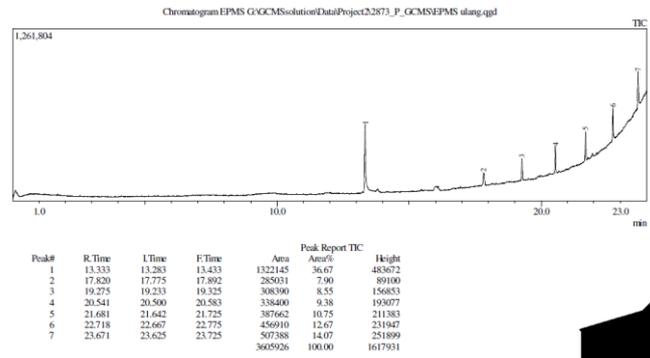


Gambar 1. Uji identifikasi KLT senyawa EPMS

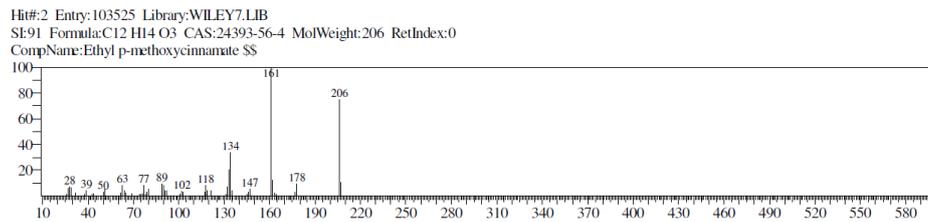
Uji identifikasi EPMS menggunakan GC-MS

Senyawa EPMS di analisis lebih lanjut dengan Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). Interpretasi hasil GC-MS menunjukkan bahwa senyawa EPMS muncul pada waktu retensi 13,33

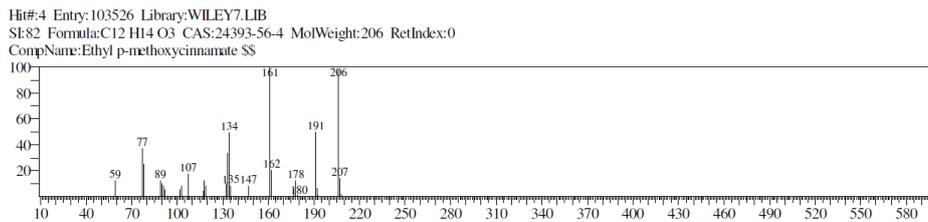
menit dengan BM 206,0. Berdasarkan hasil penelitian, senyawa EPMS mempunyai fragmentasi massa pada 161, 134, 118, 89, 63. Spektrum yang didapatkan relatif sama dengan spektrum GC-MS dari EPMS yang telah dipublikasikan oleh Umar *et al.* (2012).



Gambar 2. Hasil uji isolat senyawa uji pada *Gas Chromatography* menggunakan pelarut metanol. Peak pertama menunjukkan senyawa EPMS, peak setelahnya menunjukkan pelarut.



Gambar 3. Hasil uji isolat senyawa uji pada *Mass Spectrometry* menggunakan pelarut metanol



Gambar 4. Hasil uji isolat senyawa uji pada *Mass Spectrometry* menggunakan pelarut metanol

Uji In Vitro

Penelitian aktivitas antagonisme senyawa Etil P-Metoksisinamat (EPMS) terhadap reseptor AChM₃ dilakukan menggunakan otot polos trakea *Cavia porcellus* dalam media larutan *Buffer Krebs* secara terisolasi pada alat *organ bath*. Metode organ terisolasi merupakan metode analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan konsentrasi dan respon suatu

senyawa obat, sehingga dapat diketahui secara pasti konsentrasi agonis dan antagonis reseptor pada tingkat jaringan.

Reseptor yang berperan dalam kontraksi otot polos trakea baik pada *Cavia porcellus* maupun manusia adalah AChM₃. Studi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa EPMS terhadap reseptor AChM₃. Apabila asetilkolin berinteraksi dengan reseptor AChM₃, maka akan terjadi

kontraksi asetilkolin. Kontraksi terjadi karena terjadi rangsangan pada reseptor AChM₃ yang terhubung protein G atau dapat disebut *G-protein-coupled-receptor* (GPCR) melalui jalur fosfolipase C (PLC)⁷.

Setelah PLC teraktivasi maka akan mengkatalis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat (PIP₂), kemudian memproduksi *second messenger* inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). IP₃ yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptornya pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potential Channels* (TRPC) dan mengakibatkan pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* sehingga mengalami peningkatan Ca²⁺ intraseluler yang kemudian 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 polos⁸.

Terjadinya kontraksi pada otot polos karena peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler adalah dengan cara Ca²⁺ membentuk ikatan 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 kontraksi⁹.

Uji *in vitro* bertujuan untuk mengetahui aktivitas senyawa EPMS yang diduga memiliki efek sebagai antagonis reseptor AChM₃. Pada uji ini digunakan EPMS konsentrasi 100 µM dan 200 µM.

1. Pengaruh EPMS terhadap reseptor AChM₃

Pengaruh EPMS terhadap reseptor AChM₃ diuji dengan mengamati perubahan profil kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin dengan % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi dalam media larutan *buffer tyrode*.

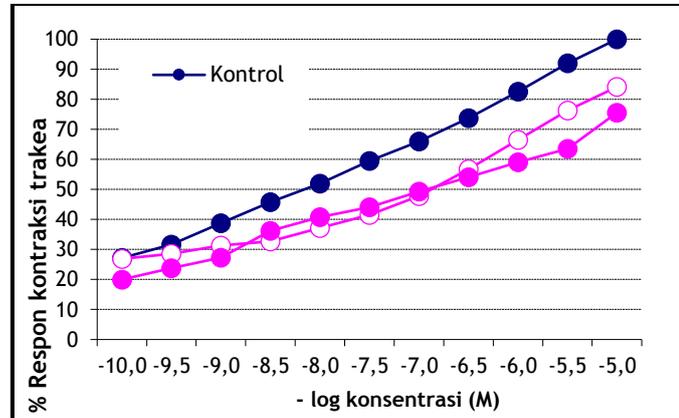
EPMS dari rimpang kencur diduga memiliki potensi sebagai antagonis reseptor AChM₃. Potensi tersebut dapat diukur dengan respon kontraksi otot polos trakea terisolasi memiliki penurunan persentase kontraksi pada pemberian asetilkolin 100 µM.

Pengurangan respons kontraksi ini terjadi terutama pada pemberian asetilkolin konsentrasi rendah. Profil kurva (Gambar 5) menunjukkan adanya pergeseran menurun kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi.

Pergeseran kurva menunjukkan adanya penurunan kemampuan asetilkolin dalam memicu respon kontraksi otot polos trakea karena pengaruh praperlakuan EPMS 100 dan 200 µM, keadaan tersebut ditandai dengan terjadinya penurunan nilai pD₂ asetilkolin (Tabel 1). Nilai pD₂ asetilkolin untuk perlakuan kontrol, EPMS 100 µM dan 200 µM berturut-turut adalah sebesar 8,40, 6,98 dan 6,82.

Tabel 1. Pergeseran pD₂ asetilkolin karena pengaruh EPMS 100 dan 200 μM

No.	Kelompok Perlakuan	pD ₂ ± SEM	Cmaks (%) ± SEM
1	Kontrol Asetilkolin	8,40 ± 0,39	100,00 ± 0,00
2	EPMS 100 μM	6,98 ± 0,17	84,12 ± 5,91
3	EPMS 200 μM	6,82 ± 0,43	75,55 ± 9,15



Gambar 5. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea, baik tanpa atau dengan pemberian EPMS 100 μM dan 200 μM. Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi kontrol asetilkolin.

Penurunan nilai pD₂ asetilkolin karena pengaruh praperlakuan EPMS membuktikan bahwa EPMS memiliki efek antagonis terhadap reseptor AChM₃ otot polos trakea. Untuk menetapkan tipe antagonis EPMS, dapat dilihat pada bentuk kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos trakea yang mengalami praperlakuan dengan EPMS 100 dan 200 μM. Praperlakuan otot polos trakea dengan EPMS tidak dapat mengembalikan respon kontraksi (Emaks) menjadi 100%. Pemberian EPMS 100 μM hanya mencapai Emaks 84,12% dan pemberian alkaloid lada 200 μM mencapai

2. Uji atropin sebagai pembanding (kontrol positif)

Atropin digunakan sebagai uji pembanding dengan perlakuan yang sama seperti uji EPMS. Atropin digolongkan sebagai parasimpatolitik

Emaks 75,55 %. Antagonis non-kompetitif merupakan antagonis yang mampu mengurangi efektifitas suatu agonis melalui mekanisme selain berikatan dengan tempat ikatan agonis. Penambahan konsentrasi agonis pada mekanisme jenis ini tidak mampu menggeser kedudukan antagonis dan mengatasi efek *blocking*-nya. Akibatnya, respon maksimal (Emaks) tidak dapat mencapai 100% kembali.

Argumen ini diperkuat dengan hasil kurva *Schild Plot* yang menghasilkan nilai $y = 0,2364x + 1,876$ menyatakan bahwa EPMS bertindak sebagai antagonis non kompetitif dilihat dari nilai slope 0,2364 yang tidak mendekati 1.

atau antikolinergik, yang merupakan agen preanestesi. Atropin mempunyai mekanisme menghambat efek asetilkolin muskarinik pada saraf postganglion kolinergik dan otot polos. Hambatan bersifat *reversible* dan bisa

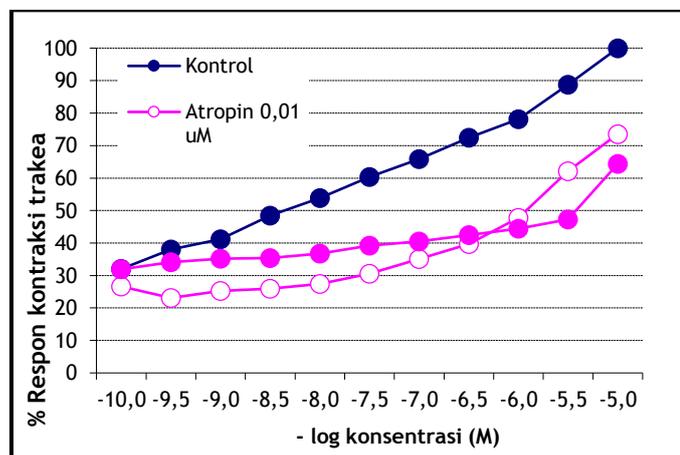
diatasi dengan pemberian asetilkolin secara berlebih atau dengan memberikan asetilkolinesterase. Atropin dapat memblokir asetilkolin baik secara endogen maupun eksogen, namun daya hambatnya lebih dominan eksogen¹⁰. Tujuan dilakukan uji perbandingan yaitu untuk melihat apakah EPMS dapat berefek sama dengan obat antagonis asetilkolin yang digunakan sebagai kontrol positif, dalam percobaan ini menggunakan Atropin.

Pada percobaan ini menggunakan Atropin dengan konsentrasi 0,01 μM dan 0,05 μM . Media yang digunakan untuk menggantikan cairan fisiologis adalah *buffer krebs*. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa pemberian

atropin konsentrasi 0,01 μM dan 0,05 μM dapat menggeser kurva hubungan konsentrasi agonis dengan persentase respon kontraksi ke arah kanan. Yang artinya apabila mengalami pergeseran ke kanan maka Atropin memiliki efek antagonis dan dapat menghambat kontraksi otot polos trakea. Pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi agonis terhadap rata-rata persentase respon kontraksi otot polos trakea tersaji dalam tabel 4 apabila dibandingkan dengan kontrol positif, nilai pD_2 Atropin konsentrasi mengalami 0,01 μM dan 0,05 μM penurunan, yang artinya Atropin memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM3.

Tabel 2. Penurunan nilai pD_2 karena pengaruh pemberian Atropin 0,01 μM dan 0,05 μM

No.	Kelompok Perlakuan	$\text{pD}_2 \pm \text{SEM}$	$\text{Emaks} \pm \text{SEM}$
1	Kontrol asetilkolin	$8,25 \pm 0,37$	$100,0 \pm 0,00$
2	Atropin 0,01 μM	$6,22 \pm 0,26$	$73,57 \pm 5,45$
3	Atropin 0,05 μM	$5,46 \pm 0,07$	$64,38 \pm 5,10$



Gambar 6. Kurva hubungan log konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea baik dengan atau tanpa pemberian atropin konsentrasi 0,01 μM dan 0,05 μM

Berdasarkan kurva dan nilai Emaks yang didapatkan, respon kontraksi setelah pemberian Atropin konsentrasi 0,01 μM dan 0,05 μM tidak mencapai 100%. Hal ini menunjukkan Atropin

memiliki sifat antagonisme non kompetitif. Namun diketahui bahwa mekanisme kerja Atropin yaitu berkompetisi dengan agonis muskarinik lainnya untuk mengikat reseptor

muskarinik¹¹. Akan tetapi berdasarkan persamaan *Schild-Plot* yang didapatkan yaitu $y=1,0921x+4,2102$, menunjukkan bahwa Atropin memiliki sifat antagonisme kompetitif dilihat dari nilai *slope* yang mendekati 1 yaitu 1,0921.

3. Uji Statistik

Uji yang dilakukan pada penelitian ini adalah One Way ANOVA, yang mana menggunakan 5 kelompok uji, yaitu kelompok 1 untuk kelompok kontrol, kelompok 2 untuk atropin konsentrasi 0,01 μM , kelompok 3 untuk atropin 0,05 μM , kelompok 4 untuk EPMS 100 μM dan kelompok 5 untuk EPMS 200 μM .

Sebelum melakukan analisis statistik perlu uji normalitas terlebih dahulu guna mengetahui data terdistribusi normal atau tidak. Pada uji normalitas dilihat nilai signifikansi dari *Shapiro-Wilk*. Digunakan data *Saphiro-Wilk* karena jumlah data keseluruhan kurang dari 50 data, sedangkan total data yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 30 data. Pada gambar 7 didapat nilai signifikansi dari kelima kelompok data lebih dari 0,05. Sehingga dapat diartikan bahwa data terdistribusi normal.

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nilai PD2 kontrol	,186	10	,200(*)	,918	10	,339
atropin 100	,299	5	,164	,819	5	,115
atropin 500	,226	5	,200(*)	,969	5	,869
epmc 100	,256	5	,200(*)	,851	5	,197
epmc 200	,154	5	,200(*)	,990	5	,978

* This is a lower bound of the true significance.
a Lilliefors Significance Correction.

Gambar 7. Uji normalitas 5 kelompok uji

Kemudian dilakukan uji homogenitas guna mengetahui apakah sebaran data pada lima kelompok uji tersebar homogen atau tidak. Berdasarkan hasil yang didapat, nilai signifikansi dari uji homogenitas yaitu 0,054. Yang artinya apabila nilai signifikansi di atas 0,05 maka data tersebar secara homogen.

Setelah ketiga syarat terpenuhi, maka dapat dilakukan uji *One Way ANOVA*. uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian EPMS mempunyai hasil yang signifikan dibandingkan dengan pemberian Atropin atau tidak. Berdasarkan hasil yang didapat, nilai signifikansi dari uji ANOVA memberikan nilai 0,000. Apabila nilai signifikansi <0,05 maka dapat dikatakan kelompok tersebut memiliki perbedaan yang bermakna, yang berarti baik

pemberian Atropin ataupun EPMS memiliki perbedaan efek yang bermakna dibandingkan dengan pemberian kontrol positif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian seri konsentrasi EPMS memberikan efek antagonisme terhadap reseptor AChM₃.

Uji *In Silico*

1. Validasi Protokol

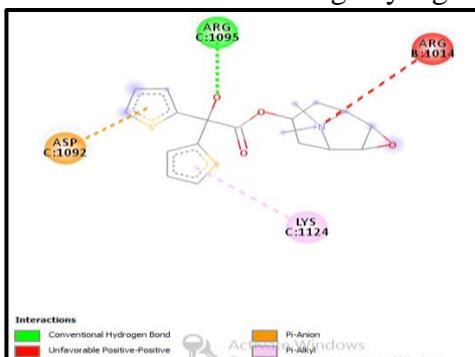
Sebelum dilakukan docking senyawa, maka perlu dilakukan validasi terlebih dahulu menggunakan *native ligand* dari AChM₃ yaitu Tiotropium. Tujuan dilakukan validasi yaitu untuk melihat validitas senyawa yang diukur, dengan menunjukkan nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Apabila nilai RMSD

senyawa di bawah 2,00 Å maka dapat diartikan saat dilakukan *redocking* ligan asli tidak memiliki pergeseran yang signifikan sehingga protokol tersebut valid. Dari hasil validasi yang diperoleh nilai RMSD 1,769. Hal ini dapat disimpulkan protokol *docking* pada reseptor asetilkolin valid karena nilai RMSD kurang dari 2,00 Å.

2. Uji *In Silico*

Untuk mengetahui kekuatan ikatan senyawa EPMS pada reseptor AChM₃, maka dilakukan perbandingan skor *docking* pada beberapa jenis ligan AChM₃. Selain itu dapat dilihat jenis asam amino residu yang berikatan dengan masing-masing ligan. Apabila terdapat ikatan asam amino residu yang sama, maka dapat dikatakan ligan EPMS mempunyai aktivitas sama seperti ligan pembanding lainnya terhadap reseptor AChM₃.

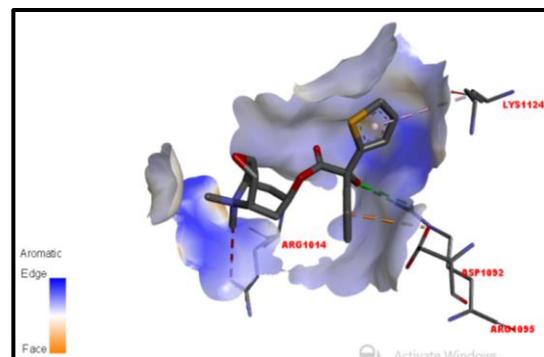
Hasil penelitian menunjukkan nilai afinitas EPMS (-5,2) memiliki nilai tertinggi dibandingkan dengan nilai afinitas native ligand tiotropium (-5,9) dan atropin (-6,1). Apabila harga *scoring* semakin kecil, maka ikatan ligan dengan reseptor akan semakin stabil¹². Sehingga dapat diartikan bahwa ikatan antara ligan EPMS dengan reseptor AChM₃ kurang stabil di antara ikatan kedua ligan yang lain.



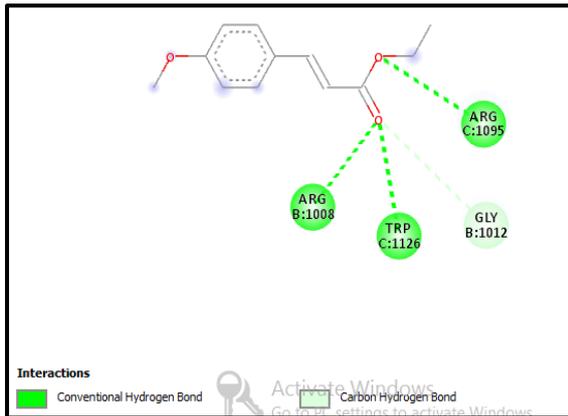
Gambar 8. Hasil visualisasi 2 dimensi dari *Native Ligand* (Tiotropium) yang mengikat reseptor AChM₃

Berdasarkan asam amino residu yang berikatan dengan ligan, terdapat satu asam amino residu yang sama berikatan dengan semua ligan uji, yaitu jenis ARG C:1095 dengan jenis ikatan sama yaitu ikatan hidrogen. Sehingga dapat diartikan bahwa EPMS memiliki aktivitas yang sama dengan atropin, pada ikatan asam amino residu ARG C:1095, dan dapat disimpulkan EPMS memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM₃.

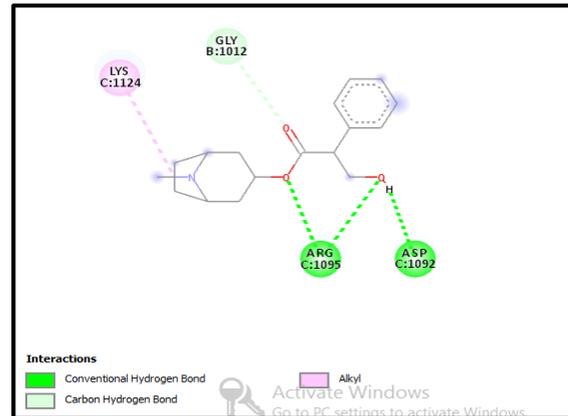
Jumlah ikatan hidrogen yang mengikat asam amino residu pada ligan atropin dengan ligan asli yaitu 2 ikatan hidrogen, sedangkan jumlah ikatan hidrogen pada ligan EPMS yang mengikat residu asam amino sebanyak 1 ikatan hidrogen. Hal ini dapat dikorelasikan dengan nilai skor *docking* yang rendah dengan banyaknya ikatan hidrogen¹². Apabila skor *docking* rendah dan ikatan hidrogen semakin banyak, maka kekuatan ikatan tersebut semakin besar dan stabil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ikatan ligan EPMS terhadap reseptor AChM₃ tidak lebih kuat dari ligan pembanding yang lainnya, yaitu atropin dan ligan asli (tiotropium).



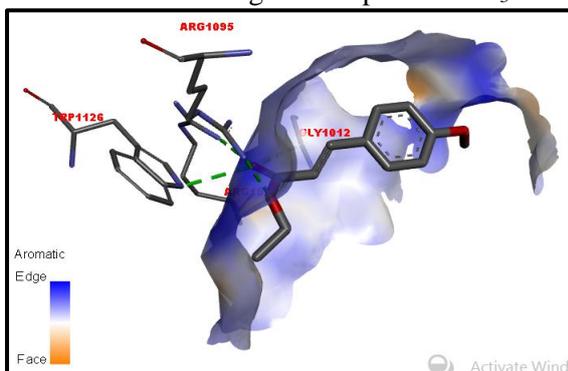
Gambar 9. Hasil visualisasi 3 dimensi dari *Native Ligand* (Tiotropium) yang mengikat reseptor AChM₃



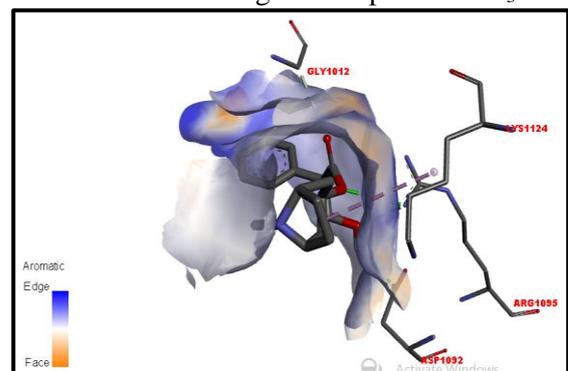
Gambar 10. Hasil visualisasi 2 dimensi dari Ligan EPMS yang mengikat reseptor AChM₃



Gambar 12. Hasil visualisasi 2 dimensi dari Ligan Atropin yang mengikat reseptor AChM₃



Gambar 11. Hasil visualisasi 3 dimensi dari Ligan EPMS yang mengikat reseptor AChM₃



Gambar 13. Hasil visualisasi 3 dimensi dari Ligan Atropin yang mengikat reseptor AChM₃

KESIMPULAN

1. Senyawa Etil P-Metoksisinamat memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM₃ pada otot polos trakea *Cavia porcellus* terisolasi, dengan sifat antagonis non kompetitif.
2. Dosis yang dapat digunakan agar EPMS memiliki aktivitas menghambat kontraksi otot polos trakea yaitu mulai dari 0,4124 mg yang terkandung dalam 100 μ L larutan kristal EPMS dengan konsentrasi 100 μ M.
3. Hasil uji in silico antara ligan EPMS terhadap reseptor AChM₃ memiliki skor docking sebesar -5,2. Hasil ini lebih rendah daripada native ligand (Tiotropium) dengan Atropin, sehingga dapat disimpulkan bahwa

aktivitas EPMS tidak lebih kuat daripada Atropin, namun tetap memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM₃.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Dhandpani, A., Kumar, S., Kadarkarai, M. 2011. Larvacidal, Pupicidal and Smoke Toxicity Effect of *Kaempferia galanga* L to the Malarial Vector, and *Anopheles stephensi*. *The bioscan*. 6(2): 329-333.
- ²Zakaria, M., Mustafa, A.M., 1994. *Traditional Malay Medicinal Plants*. Fajar Bakti, Kuala Lumpur, p. 129.
- ³Ikawati, Zullies. 2016. *Penatalaksanaan Terapi Penyakit Sistem Pernafasan*. Bursa Ilmu. Yogyakarta.

- ⁴Oenema, Alida, T. 2013. *Muscarinis Receptor in Airway Smooth Muscle*. University of Groningen. Belanda.
- ⁵Kim, S.R., Kang, S.Y., Lee, K.Y., Kim, S.H., Markelonis, G.J., Oh, T.H., *et al.* 2003. Anti-amnestic Activity of E-p-methoxycinnamic Acid from *Schophularia buergeriana*. *Cognitive Brain Research*. 17 (2003) 454-461.
- ⁶Umar, M.I., Asnawi, M.Z., Sadikun, A., Atangwho, I.J., Yam, M.F., Altaf, R., *et al.* 2012. Bioactivity-Guided Isolation of Ethyl-p-Methoxycinnamate, an Anti-inflammatory Constituent, from *Kaempferia Galanga* L. Extract. *Molecules*. 17: 8720-8734
- ⁷Mutiara, Indah. 2016. Uji Aktivitas Antagonisme Isolat Alkaloid Lada (*Piper Nigrum* Linn.) Pada Reseptor Asetilkolin Otot Polos Ileum Marmut Terisolasi: Studi In Vitro Dan In Silico. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
- ⁸Gosens, 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.
- ⁹Lodish, H., Arnold, B., Lawrence, Z., Paul, M., David B., 2000, *Molecular Cell Biology*. New York: WH Freeman Company.
- ¹⁰Achmad, S. A. 1989. *Analisis Metabolit Sekunder*. UGM Press. Yogyakarta.
- ¹¹Sukohar, Asep. 2014. *Buku Ajar Farmakologi: Neurofarmakologi – Asetilkolin dan Norepinefrin*. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Lampung.
- ¹²Nugroho, P.A., Sukamdi, D.P., Darma, A.P., Jenie, R.I., dan Meiyanto, E. 2010. Penelusuran Mekanisme Flavonoid Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) sebagai Agen Kemopreventif melalui Docking Molekuler pada Protein Target CYP1A2. *Laporan penelitian*. Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.