

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Determinasi Tumbuhan**

Determinasi tumbuhan bertujuan untuk mengetahui identitas tanaman tersebut, yang mana untuk membuktikan apakah tanaman yang di determinasi benar-benar yang diinginkan atau bukan. Selain itu determinasi tumbuhan bertujuan untuk menghindari kesalahan pengambilan tanaman yang akan diteliti. Pada penelitian ini dilakukan determinasi tumbuhan kencur (*Kaempferia galanga* L.) di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Tanaman kencur yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Bima, Nusa Tenggara Barat. Berdasarkan surat keterangan determinasi bernomor 007/Lab.Bio/B/I/2019 yang menyatakan bahwa tanaman yang di determinasi terbukti sebagai tanaman kencur.

#### **B. Isolasi Senyawa Aktif Kencur**

Metode penyarian yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Kelebihan metode maserasi ini yaitu proses pengerjaannya yang sederhana dan menggunakan alat yang sederhana. Namun metode ini membutuhkan pelarut yang banyak dan waktu yang lama, serta senyawa aktif yang terlarut dalam penyarian terdapat kemungkinan mengalami kerusakan.

Mekanisme penyarian maserasi yaitu pelarut organik akan menembus ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif melalui dinding sel, kemudian pelarut organik akan melarutkan zat aktif di luar sel sehingga larutan terpekat akan berdifusi keluar sel. proses ini akan terus berulang hingga konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel terjadi keseimbangan (Salamah, dkk, 2017). Tujuan dilakukannya maserasi ialah untuk menarik seluruh komponen zat aktif pada rimpang kencur menggunakan pelarut yang sesuai. Sebelum dicampur dengan pelarut organik, rimpang kencur di iris-iris terlebih dahulu hingga berukuran kecil. Tujuan pengirisan rimpang guna memperbesar luas permukaan kontak rimpang kencur dengan pelarut agar proses penyarian zat aktif lebih optimal.

Penyari yang digunakan untuk melarutkan rimpang kencur sebanyak 400 gram ialah etanol 96% sebanyak 2 liter yang bersifat semi polar. Digunakan pelarut yang bersifat semi polar karena kandungan EPMS merupakan ester yang terdapat cincin benzena dan gugus metoksi yang bersifat non polar dan terdapat gugus karbonil yang mengikat etil yang bersifat agak polar sehingga EPMS dapat larut pada pelarut dengan sifat kepolaran yang bervariasi seperti etanol, etil asetat, metanol, air, dan n-heksan. Hal yang harus diperhatikan dalam ekstraksi senyawa yaitu kepolaran antara senyawa ekstrak dan pelarut yang digunakan. Keduanya harus memiliki tingkat kepolaran yang sama atau mendekati sama (Firdausi, 2009).

Simplisia yang telah dicampur dengan pelarut kemudian didiamkan selama lima hari sembari di aduk sesekali setiap harinya. Proses pendiaman ini bertujuan untuk memberikan waktu pada pelarut untuk berpenetrasi ke dalam sel kemudian

menyari zat aktif dan berdifusi keluar hingga mencapai kesetimbangan dan penyari jenuh oleh zat aktif (Salamah, dkk, 2017). Ukuran simplisia sangat mempengaruhi dimana semakin kecil ukurannya maka luas permukaan akan semakin besar, semakin banyak kontak dengan pelarut dan semakin banyak pula senyawa aktif yang tersari. Oleh karena itu, rimpang kencur di haluskan terlebih dahulu untuk memperluas luas permukaan sehingga senyawa aktif kencur yang tersari akan lebih optimal.

Setelah proses maserasi, dilakukan proses penyaringan yang bertujuan untuk memisahkan antara filtrat dan simplisia kencur beserta pengotornya. Proses penyaringan ini menghasilkan filtrat berwarna kuning kecokelatan. Setelah itu filtrat diuapkan untuk menghilangkan pelarut sehingga akan tersisa ekstrak dari kencur saja. Proses penguapan ini menggunakan alat evaporator pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dimana titik didih etanol 96% yaitu  $78,92^{\circ}\text{C}$ . Proses pemanasan dilakukan hingga volume filtrat berkurang dan pelarut tidak dapat menguap dan menyisakan ekstrak kental. Saat dilakukan pemanasan tidak boleh terlalu lama bila pelarut sudah menguap untuk mencegah terjadinya penggosongan ekstrak.

Ekstrak yang telah dikentalkan kemudian di simpan dan didinginkan guna mengkristalkan senyawa yang didapat dan memisahkan kristal dari pelarut dan pengotor yang tersisa. Setelah dingin kristal dicuci menggunakan n-heksan hingga tersisa kristal EPMS murni. Pada tahap pencucian ini menggunakan n-heksan karena kepolaran EPMS lebih mendekati ke n-heksan karena EPMS memiliki 2 gugus bersifat non polar, yaitu ester dan cincin benzen, sedangkan gugus yang

mengarah ke polar hanya satu yaitu karbonil. Sehingga EPMS memiliki sifat kepolaran semipolar cenderung ke non polar (Taufikurohmah dkk., 2008).

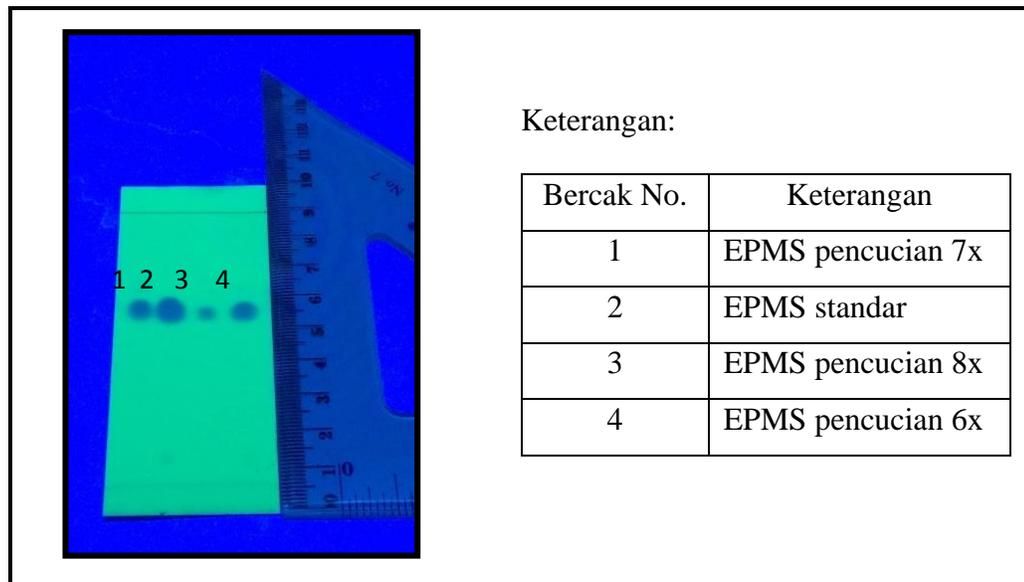
### **C. Identifikasi Senyawa EPMS**

#### **1. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Uji KLT bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam kristal kencur dan untuk mengetahui kemurnian dari senyawa EPMS itu sendiri. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu toluen : etil asetat dengan perbandingan 95:5 dan fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 F<sub>254</sub>. Toluene : etil asetat digunakan sebagai eluen bertujuan untuk menarik senyawa yang bersifat semi polar cenderung ke non polar, yang mana senyawa EPMS mempunyai sifat kepolaran yang sama dengan pelarut. Semakin dekat sifat kepolaran antara sampel dengan eluen / fase gerak maka sampel akan semakin terbawa dengan fase gerak. Menurut Nuria, dkk (2014), uji KLT senyawa EPMS menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan fase gerak toluen-etil asetat yaitu untuk identifikasi terpenoid. Terpenoid ini juga terdapat dalam senyawa EPMS sehingga baik fase diam dan fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini dapat mendeteksi senyawa EPMS.

Pada gambar 5 bercak nomor 1, 3 dan 4 merupakan larutan kristal EPMS dari hasil maserasi, sedangkan toluen nomor 2 merupakan EPMS standar. Deteksi bercak menggunakan sinar UV 254 nm. Didapatkan jarak untuk tiap bercak sama, yaitu 5,5 cm dengan nilai R<sub>f</sub> 0,68. Nilai R<sub>f</sub> EPMS yaitu 0,65 (Taufikurohmah, 2005). Perbedaan nilai R<sub>f</sub> ini kemungkinan disebabkan

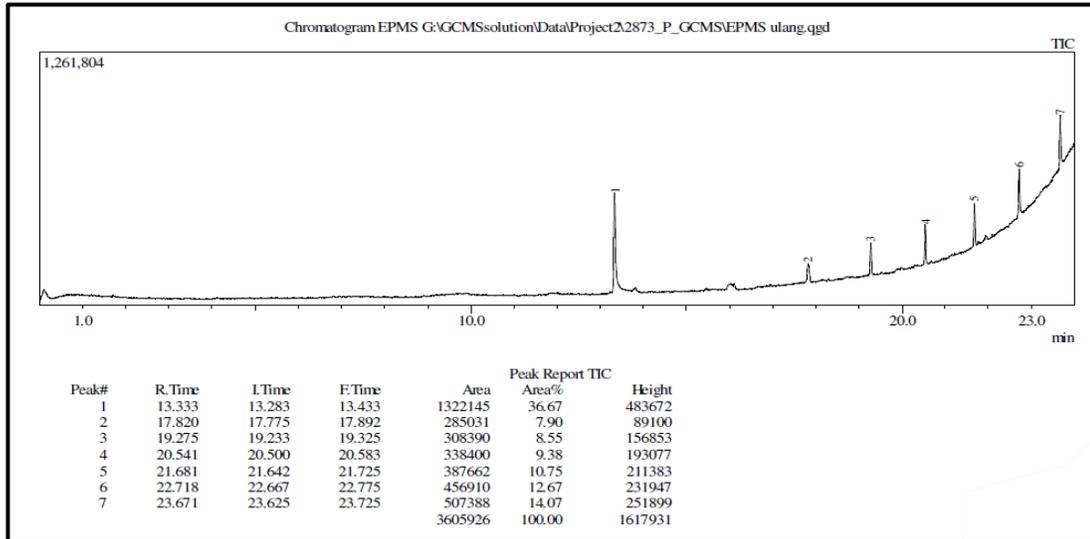
oleh perbandingan jumlah fase gerak yang berbeda. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa kristal yang didapatkan dari ekstraksi murni terdapat senyawa EPMS.



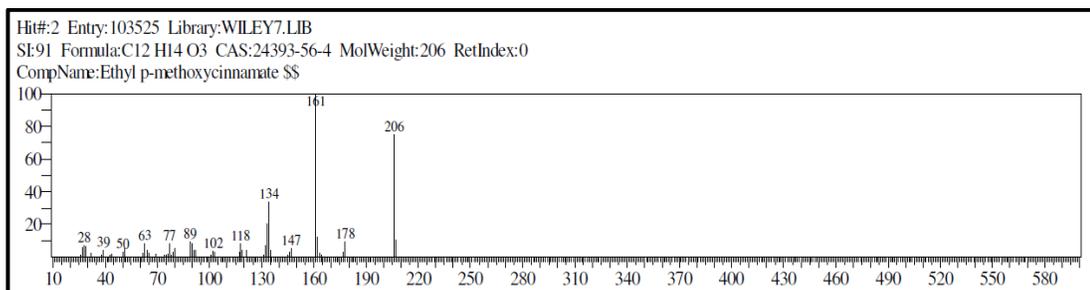
**Gambar 5.** Uji KLT senyawa EPMS.

## 2. Uji *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* (GC-MS)

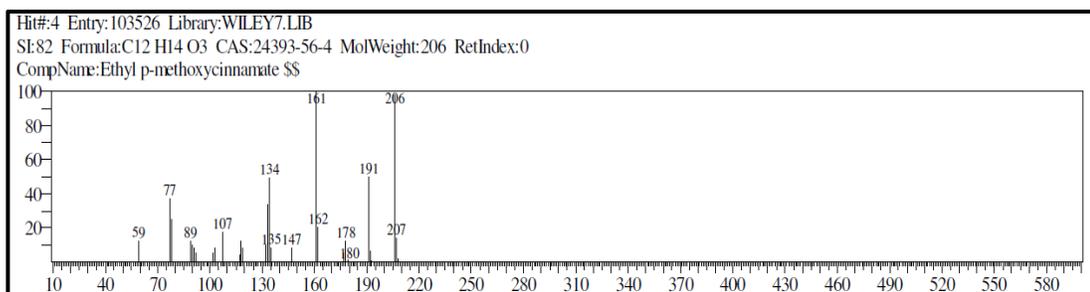
Senyawa EPMS di analisis lebih lanjut dengan *Gas Chromatography – Mass Spectrometry* (GC-MS). Interpretasi hasil GC-MS menunjukkan bahwa senyawa EPMS muncul pada waktu retensi 13,33 menit dengan BM 206,0. Berdasarkan hasil penelitian, senyawa EPMS mempunyai fragmentasi massa pada 161, 134, 118, 89, 63. Spektrum yang didapatkan relatif sama dengan spektrum GC-MS dari EPMS yang telah dipublikasikan oleh Umar, *et al.* (2012).



**Gambar 6.** Hasil uji isolat senyawa uji pada *Gas Chromatography* menggunakan pelarut metanol. *Peak* pertama menunjukkan senyawa EPMS, *peak* setelahnya menunjukkan pelarut.



**Gambar 7.** Hasil uji isolat senyawa uji pada *Mass Spectrometry* menggunakan pelarut metanol



**Gambar 8.** Hasil uji isolat senyawa uji pada *Mass Spectrometry* menggunakan pelarut metanol

#### **D. Uji *In Vitro***

Penelitian aktivitas antagonisme senyawa Etil P-Metoksisinamat (EPMS) terhadap reseptor AChM<sub>3</sub> 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. Kelebihan dari metode ini yaitu *organ bath* dapat mengukur efek kontraksi hingga maksimum, yang hal tersebut tidak sepenuhnya dapat diteliti pada metode *in vivo* (menggunakan organisme utuh), selain itu metode ini memiliki kekurangan yaitu larutan fisiologis pengganti (*buffer krebs*) yang digunakan tidak sepenuhnya sesuai dengan cairan fisiologis tubuh asli, sehingga apabila digunakan terlalu lama dengan tidak dilakukan penggantian larutan, maka akan dapat mematikan jaringan. Selain itu, isolasi dalam *organ bath* akan mengakibatkan hilangnya fungsi regulasi fisiologis pada organ (Lullman *et al*, 2000).

##### **1. Penyiapan Alat dan Bahan**

Sebelum melakukan uji, diperlukan penyiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam uji. Alat yang digunakan untuk uji *in vitro* yaitu *organ bath*. Rangkaian *organ bath* terdiri dari Transduser (Ugo basille®), Bridge amplifier (Ugo basille®), organ bath volume 20 ml. Untuk pemberian seri konsentrasi agonis dan antagonis menggunakan mikro pipet 20-200 µl dan

200-1000  $\mu$ l (Eppendorf®). Pengaturan suhu pada organ bath diatur sesuai dengan suhu tubuh normal, yaitu  $36,5^{\circ}\text{C} - 37,5^{\circ}\text{C}$ . Dalam percobaan menggunakan gas oksigen medis (Oksigen ( $\text{O}_2$ ):  $>99,5\%$ , Karbon Dioksida ( $\text{CO}_2$ )  $<5,0$  v.p.m, Karbon Monoksida (CO):  $<5,0$  v.p.m, Nitrogen ( $\text{N}_2$ ):  $<100,0$  v.p.m, Argon (AR):  $<0,5$  v.p.m, Methane ( $\text{CH}_4$ ):  $<50,0$  v.p.m, Hidrogen ( $\text{H}_2$ )  $<5,0$  v.p.m, Nitrat Oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ ):  $<5,0$  v.p.m,  $\text{H}_2\text{O}$ :  $<25,0$  v.p.m) guna mempertahankan organ trakea tetap hidup di luar tubuh aslinya saat pengambilan data.

Pengganti cairan fisiologis yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan *buffer krebs*. Larutan ini digunakan sebagai pengganti cairan fisiologis karena memiliki kemiripan kandungan cairan dengan cairan tubuh hewan uji (Wijaya, 2017). *Buffer Krebs* terdiri dari dua formula, yaitu formula A dan B. Formula A terdiri dari sodium fosfat dihidrat, kalsium klorida dihidrat, pottasium klorida, magnesium sulfat heptahidrat, dan sodium klorida. Sedangkan formula B mengandung sodium bikarbonat. Pembuatan larutan *Buffer Krebs* dilakukan dengan cara masing-masing formula dilarutkan dalam 1 liter akuades, kemudian apabila ingin digunakan maka masing-masing formula diambil sebanyak 100 mL kemudian dicampurkan ke dalam akuades 800 mL dengan penambahan glukosa sebanyak 1 gram. Cara pencampuran kedua formula perlu diperhatikan, terlebih dahulu 100 mL formula B dilarutkan terlebih dahulu ke dalam 800 mL akuades kemudian formula A

dituangkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran tersebut selanjutnya ditambah glukosa sebanyak 1 gram.

Preparasi selanjutnya ialah preparasi organ trakea *Cavia porcellus*. Pertama hewan dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) kemudian diguyur air mengalir pada bagian mulutnya agar memastikan hewan tersebut sudah tidak sadarkan diri. Setelah itu mengambil organ trakea dengan cara membedah bagian leher dan diambil organ trakea, kemudian organ tersebut diletakkan di cawan fiksasi yang telah terisi larutan *Buffer Krebs* hangat, dengan tujuan menyesuaikan suhu agar mirip dengan suhu tubuh asli *Cavia porcellus*. Kemudian organ dibersihkan dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel. Setelah bersih, organ dibelah memanjang searah dengan otot polos sehingga otot polos berada di bagian tengah, dan sisi kanan dan kiri dari otot polos dipotong secara zig-zag dengan jarak 6-7 cincin (menyesuaikan panjang organ yang dipotong dan *organ bath* 20 mL) dengan jarak kurang lebih sama. Kemudian kedua ujung tulang rawan yang berlawanan diikat dengan benang, dan salah satu ikatan diikat bersamaan dengan cincin. Benang tersebut dikaitkan ke bagian yang menghubungkan dengan bagian transduser dan tuas *Organ Bath*, pada bagian tuas diikat dengan mengaitkan cincin.

Senyawa yang akan diteliti pada penelitian ini yaitu Etil P-Metoksisinamat, dengan menggunakan obat pembanding yaitu Atropin. Penyiapan larutan EPMS dengan cara sebanyak 206,2 mg kristal EPMS

dilartukan kedalam 5 mL DMSO sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M sebagai larutan stok, kemudian diambil 1 mL dengan ditambah DMSO ad 10 mL sehingga didapatkan larutan konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M. Larutan tersebut kemudian masing-masing diambil sebanyak 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L dan dimasukkan ke dalam larutan *buffer krebs* yang berada dalam *organ bath*.

## 2. Pengaruh EPMS terhadap aktivitas kontraksi otot polos trakea

Reseptor yang berperan dalam kontraksi otot polos trakea baik pada *Cavia porcellus* maupun manusia adalah AChM<sub>3</sub>. Studi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa EPMS terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>. Apabila asetilkolin berinteraksi dengan reseptor AChM<sub>3</sub>, maka akan terjadi kontraksi asetilkolin. Kontraksi terjadi karena terjadi rangsangan pada reseptor AChM<sub>3</sub> yang terhubung protein G atau dapat disebut *G-protein-coupled-receptor* (GPCR) melalui jalur fosfolipase C (PLC) (Mutiara, 2016).

Setelah PLC teraktivasi maka akan mengkatalis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat (PIP<sub>2</sub>), kemudian memproduksi *second messenger* inositol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) dan diasil gliserol (DAG). IP<sub>3</sub> yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptornya pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potensial Channels* (TRPC) dan mengakibatkan pelepasan Ca<sup>2+</sup> dari *calcium-store* sehingga mengalami peningkatan Ca<sup>2+</sup> intraseluler yang kemudian dapat mengaktifkan kanal kalsium di permukaan membran sel. Aktifnya kanal kalsium menyebabkan

influks  $\text{Ca}^{2+}$  ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler yang menginduksi terjadinya kontraksi otot polos (Gosens *et al.*, 2006).

Terjadinya kontraksi pada otot polos karena peningkatan kadar  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler adalah dengan cara  $\text{Ca}^{2+}$  membentuk ikatan dengan reseptor calmodulin (CaM). Calmodulin merupakan suatu protein pengikat Ca yang tidak memiliki aktivitas enzim. Calmodulin akan bekerja setelah membentuk kompleks dengan  $\text{Ca}^{2+}$ /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 *et al.*, 2000).

Pemberian asetilkolin akan mengaktifkan reseptor asetilkolin yang terdapat di trakea. Asetilkolin akan berdifusi dari celah sinaps dan mengikat reseptor post sinaps pada sel sasaran dan pre sinaps pada membran neuron yang melepas asetilkolin. Reseptor asetilkolin yang terdapat dalam trakea adalah asetilkolin muskarinik tipe  $M_2$  dan  $M_3$  dengan perbandingan jumlah 4:1. Masing-masing reseptor tersebut memiliki peran yang berbeda. Meskipun jumlah reseptor  $M_2$  lebih banyak daripada  $M_3$ , yang berperan dalam kontraksi otot polos trakea adalah reseptor  $\text{AChM}_3$  (Oenema dan Alida, 2013), sehingga apabila saat pemberian asetilkolin pada organ bath kemudian trakea mengalami kontraksi maka dapat dipastikan bahwa reseptor sasaran yang berikatan dengan neurotransmitter asetilkolin adalah reseptor  $\text{AChM}_3$ .

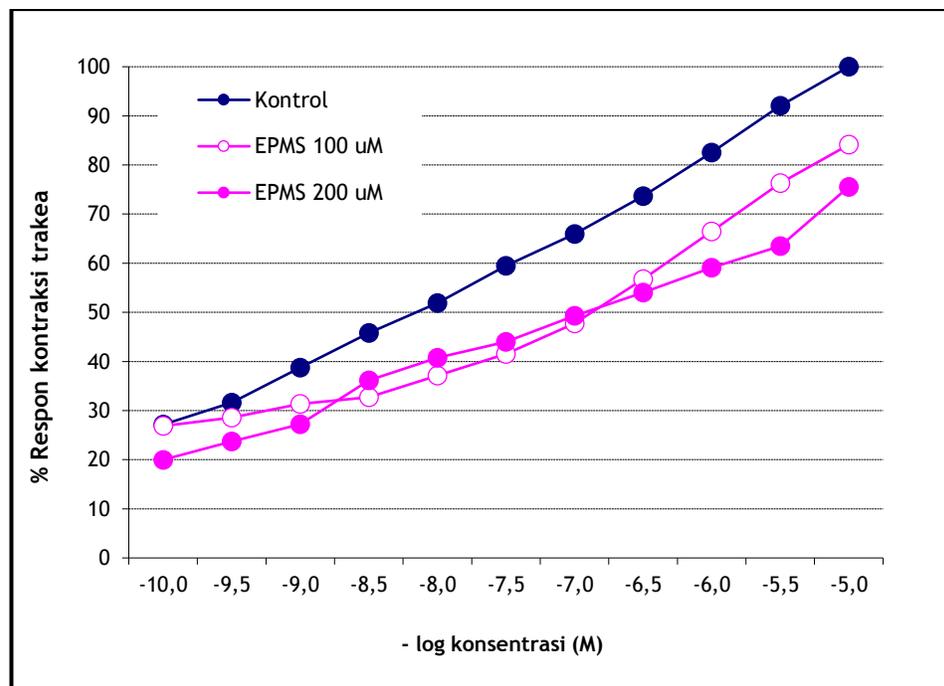
Senyawa EPMS dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor AChM<sub>3</sub> apabila dapat mengurangi potensi asetilkolin pada kontraksi otot polos trakea *Cavia porcellus* terisolasi.

Konsentrasi larutan EPMS yang digunakan yaitu 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M. Larutan ini diberikan sesaat sebelum pemberian seri konsentrasi agonis Asetilkolin. Dari uji ini akan didapat kurva hubungan seri konsentrasi agonis dengan % respon kontraksi otot polos trakea dalam media larutan *buffer krebs*. Jika terjadi perubahan persentase respon kontraksi otot polos trakea akibat pemberian EPMS, maka senyawa tersebut kemungkinan memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor AChM<sub>3</sub>. Aktivitas antagonisme dapat diukur dengan nilai pD<sub>2</sub> Asetilkolin tanpa dan dengan pemberian EPMS. Untuk mengukur aktivitas antagonismenya, dapat dilihat dari perbandingan nilai pD<sub>2</sub> EPMS. Apabila nilai pD<sub>2</sub> semakin kecil maka konsentrasi yang dihasilkan agonis semakin kecil. Tipe aktivitas antagonis dapat diukur menggunakan analisis *Schild-Plot*.

Tabel 3 menunjukkan nilai pD<sub>2</sub> EPMS mengalami penurunan persentase respon kontraksi otot polos trakea. Apabila nilai pD<sub>2</sub> semakin kecil maka semakin besar efek penurunan kontraksinya. Berdasarkan data yang didapatkan, penurunan nilai pD<sub>2</sub> mulai terlihat dari pemberian EPMS konsentrasi 100  $\mu$ M dengan nilai 6,98, maka dapat disimpulkan dosis EPMS 100  $\mu$ M sudah dapat memberikan efek antagonisme terhadap AChM<sub>3</sub> dan menurunkan kontraksi otot polos trakea.

**Tabel 3.** Pergeseran nilai  $pD_2$  Asetilkolin karena pengaruh EPMS *Kaempferia galanga* L. 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M

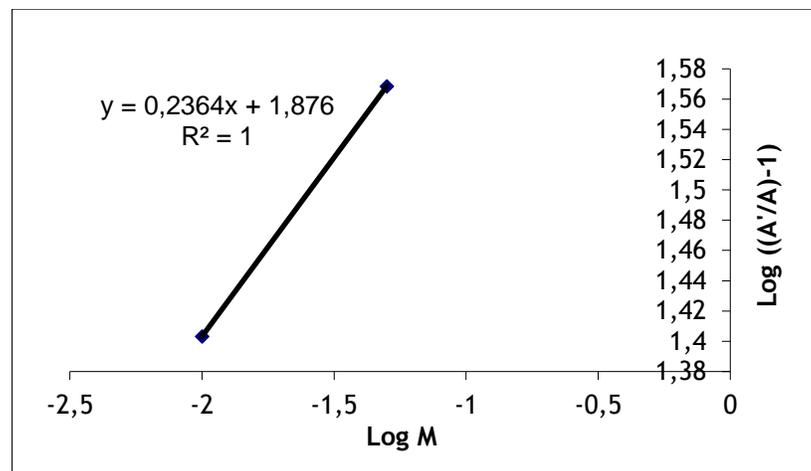
No.	Kelompok Perlakuan	$pD_2 \pm SEM$	$C_{maks} (\%) \pm SEM$
1	Kontrol Asetilkolin	$8,40 \pm 0,39$	$100,00 \pm 0,00$
2	EPMS 100 $\mu$ M	$6,98 \pm 0,17$	$84,12 \pm 5,91$
3	EPMS 200 $\mu$ M	$6,82 \pm 0,43$	$75,55 \pm 9,15$



**Gambar 9.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea, baik tanpa atau dengan pemberian EPMS 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M. Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi kontrol asetilkolin.

Penentuan tipe antagonis EPMS dapat diketahui dari bentuk kurva hubungan konsentrasi AChM<sub>3</sub> terhadap persentase respon kontraksi otot polos trakea menggunakan EPMS konsentrasi 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M. Masing-masing

pemberian konsentrasi EPMS tidak dapat menaikkan kontraksi otot polos trakea hingga 100% setelah dilakukan penambahan seri konsentrasi AChM<sub>3</sub>. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sifat antagonisme dari EPMS adalah antagonis non kompetitif. Cara lain yang dapat digunakan untuk melihat tipe antagonis dari EPMS yaitu dengan melihat nilai pA<sub>2</sub> (parameter antagonis) pada persamaan *Schild-Plot* (gambar 10). Persamaan *Schild-Plot*  $y = 0,2364x + 1,876$  menyatakan bahwa EPMS bertindak sebagai antagonis non kompetitif dilihat dari nilai slope 0,2364 yang tidak mendekati 1.



**Gambar 10.** Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis (pA<sub>2</sub>) EPMS terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>. Sumbu x adalah nilai logaritma konsentrasi EPMS (Log M) dan sumbu y adalah  $\text{Log} \left( \frac{A'}{A} - 1 \right)$ , dimana A merupakan nilai D<sub>50</sub> AChM<sub>3</sub> tanpa pemberian EPMS, dan A' merupakan nilai D<sub>50</sub> AChM<sub>3</sub> dengan pemberian EPMS.

### 3. Uji Atropin sebagai pembanding (kontrol positif)

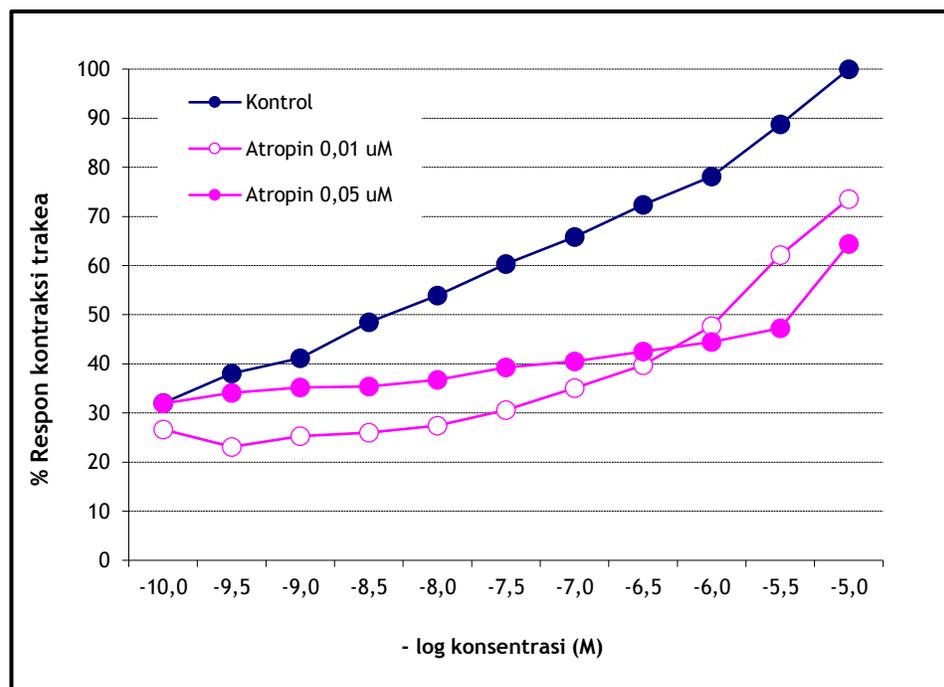
Atropin digunakan sebagai uji pembanding dengan perlakuan yang sama seperti uji EPMS. Atropin digolongkan sebagai parasimpatolitik atau antikolinergik, yang merupakan agen preanestesi. Atropin mempunyai

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 eksogen (Achmad, 1989). Tujuan dilakukan uji pembandingan 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  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$ . Media yang digunakan untuk menggantikan cairan fisiologis adalah *buffer krebs*. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa pemberian atropin konsentrasi 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$  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  $\text{pD}_2$  Atropin konsentrasi mengalami 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$  penurunan, yang artinya Atropin memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>.

**Tabel 4.** Penurunan nilai  $pD_2$  karena pengaruh pemberian Atropin 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$

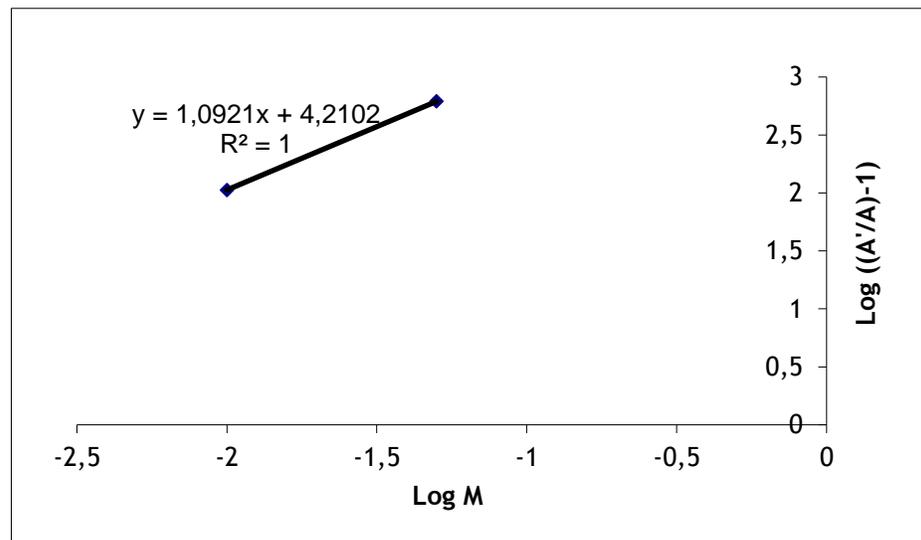
No.	Kelompok Perlakuan	$pD_2 \pm \text{SEM}$	Emaks $\pm \text{SEM}$
1	Kontrol asetilkolin	$8,25 \pm 0,37$	$100,0 \pm 0,00$
2	Atropin 0,01 $\mu\text{M}$	$6,22 \pm 0,26$	$73,57 \pm 5,45$
3	Atropin 0,05 $\mu\text{M}$	$5,46 \pm 0,07$	$64,38 \pm 5,10$



**Gambar 11.** Kurva hubungan log konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea baik dengan atau tanpa pemberian atropin konsentrasi 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$

Berdasarkan kurva dan nilai Emaks yang didapatkan, respon kontraksi setelah pemberian Atropin konsentrasi 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,05  $\mu\text{M}$  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

muskarinik (Sukohar, 2014). 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.



**Gambar 12.** Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis ( $pA_2$ ) Atropin terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>. Sumbu X adalah nilai log konsentrasi Atropin (log M) dan sumbu Y adalah nilai log  $((A'/A)-1)$ , dimana A merupakan nilai  $D_{50}$  ACh tanpa pemberian Atropin dan A' merupakan nilai  $D_{50}$  ACh dengan pemberian Atropin.

### E. Uji Statistik

Uji yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji One Way ANOVA. Dimana syarat untuk melakukan uji tersebut adalah data lebih dari 2 kelompok, data terdistribusi normal dan sebaran data homogen. Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok uji yaitu kelompok 1 untuk kelompok kontrol, kelompok 2 untuk atropin konsentrasi 0,01  $\mu$ M, kelompok 3 untuk atropin 0,05  $\mu$ M, kelompok 4 untuk EPMS 100  $\mu$ M dan kelompok 5 untuk EPMS 200  $\mu$ M. 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 13 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 13.** 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 AChM<sub>3</sub>.

## F. Uji In Silico

### 1. Validasi Protokol

Sebelum dilakukan docking senyawa, maka perlu dilakukan validasi terlebih dahulu menggunakan *native ligand* dari AChM<sub>3</sub> yaitu Tiotropium. Tiotropium merupakan bronkodilator antikolinergik yang digunakan untuk menangani Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK). Obat ini bersifat *long-acting* selama 24 jam. Obat ini merupakan antagonis muskarinik, pada pemberian topikal bertindak terutama pada reseptor muskarinik tipe M<sub>2</sub> dan M<sub>3</sub> pada jalan napas yang bertindak untuk merelaksasi otot polos sehingga menghasilkan efek bronkodilator. Sehingga Tiotropium dapat dijadikan sebagai *native ligand* reseptor AChM<sub>3</sub> (Mutiara, 2016). 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. Apabila nilai RMSD semakin kecil maka dapat diartikan posisi ligan hasil docking semakin mirip dengan posisi ligan hasil kristalografi (Artinda, 2016). 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. Selanjutnya protokol tersebut dapat digunakan untuk *docking ligand* AChM<sub>3</sub> yang lain terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>.

## 2. Hasil dan Pembahasan

Untuk mengetahui kekuatan ikatan senyawa EPMS pada reseptor AChM<sub>3</sub>, maka dilakukan perbandingan skor *docking* pada beberapa jenis ligan AChM<sub>3</sub>. 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 AChM<sub>3</sub>. Pada penelitian ini skor *docking* EPMS dibandingkan dengan dua jenis ligan, yaitu *native ligand* AChM<sub>3</sub> (Tiotropium) dan Atropin. Pada tabel 5 berikut hasil skor *docking* masing-masing ligan terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>:

**Tabel 5.** Skor *docking* ligan terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>

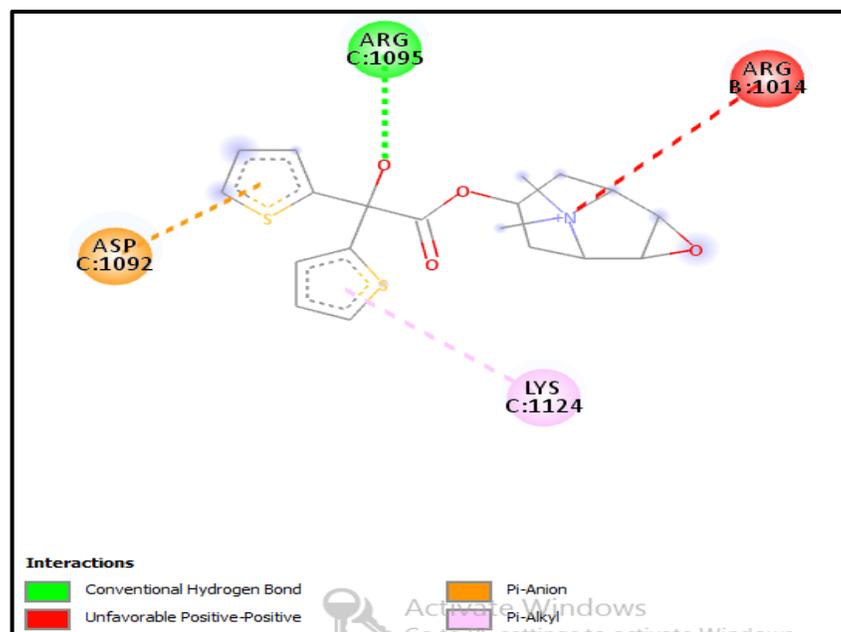
No.	Jenis Ligan	Nilai RMSD	Skor <i>Docking</i>	Konformasi	Jenis Ikatan	Jenis Asam Amino Residu yang Berikatan
1	<i>Native Ligand</i> (Tiotropium)	1,769	-5,9	5	1 ikatan van der Waals 1 ikatan van der Waals 2 ikatan hidrogen 1 ikatan unfavorable positive-positive 1 ikatan Pi-anion 1 ikatan Pi-alkyl	TYR B:1018  TRP C: 1126  <b>ARG C: 1095</b> ARG B:1014  ASP C:1092 LYS C:1124
2	<i>Ethyl P-Methoxycinnamate</i>	1,613	-5,2	2	1 ikatan hidrogen 1 ikatan hidrogen 1 ikatan hidrogen 1 ikatan CH	ARG B:1008 TRP C:1126 <b>ARG C:1095</b> GLY B: 1012
3	Atropin	1,227	-6,1	5	2 ikatan hidrogen 1 ikatan hidrogen 1 ikatan alkyl 1 ikatan CH	<b>ARG C:1095</b> ASP C:1092 LYS C: 1124 GLY B: 1012

Berdasarkan data di atas, apabila dibandingkan antara skor *docking* EPMS dengan tiotropium dan atropin, maka skor docking EPMS memiliki nilai yang terbesar. Apabila harga *scoring* semakin kecil, maka ikatan ligan dengan reseptor akan semakin stabil (Nugroho, dkk, 2010). Sehingga dapat diartikan bahwa ikatan antara ligan EPMS dengan reseptor AChM<sub>3</sub> kurang stabil di antara ikatan kedua ligan yang lain. Sedangkan ikatan paling stabil yaitu ikatan antara Atropin dengan AChM<sub>3</sub> melebihi ikatan *native ligand* dengan reseptor AChM<sub>3</sub>.

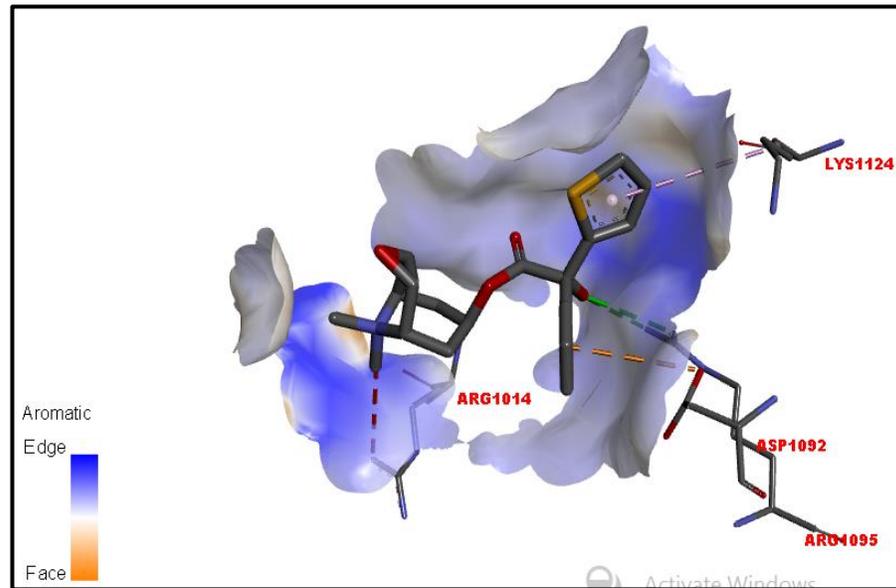
Ligan berikatan dengan reseptor melalui berbagai ikatan. Analisis hasil interaksi ligan dapat menunjukkan berbagai ikatan yang terjadi antara ligan dengan reseptor atau protein target. Parameter *score docking* ditentukan oleh jenis dan kekuatan ikatan serta kesesuaian pose dengan *native* ligan. *Score docking* merupakan kekuatan ikatan hidrogen, ikatan Van der Waals, interaksi antara atom polar-polar, interaksi antara atom polar dan non polar, ikatan hidrofobik dengan meningkatkan pengaruh torsi ikatan dan penurunan induksi. Apabila skor *docking* semakin negatif, maka ikatan antara ligan dan protein semakin stabil dan afinitas semakin meningkat (Nugroho, dkk, 2010).

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,

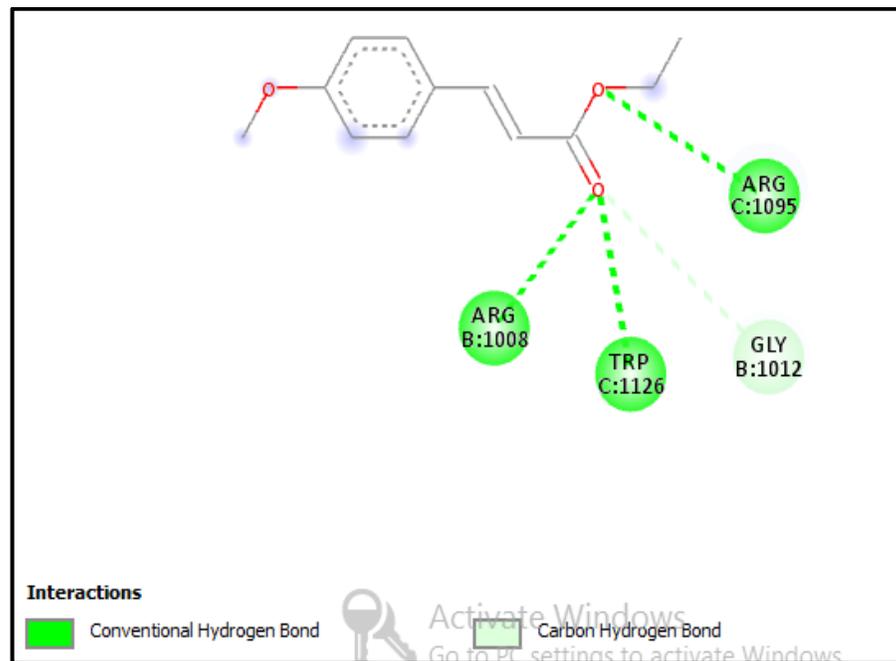
pada ikatan asam amino residu ARG C:1095, dan dapat disimpulkan EPMS memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>. Jumlah ikatan hidrogen yang mengikat asam amino residu pada ligan atropin dengan ligan asli yaitu 2 ikatan hidrogen, sedangkan jumlah ikatan hidrogen pada ligan EPMS yang mengikat residu asam amino sebanyak 1 ikatan hidrogen. Hal ini dapat dikorelasikan dengan nilai skor *docking* yang rendah dengan banyaknya ikatan hidrogen (Nugroho, dkk, 2010). 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 AChM<sub>3</sub> tidak lebih kuat dari ligan pembanding yang lainnya, yaitu atropin dan ligan asli (tiotropium).



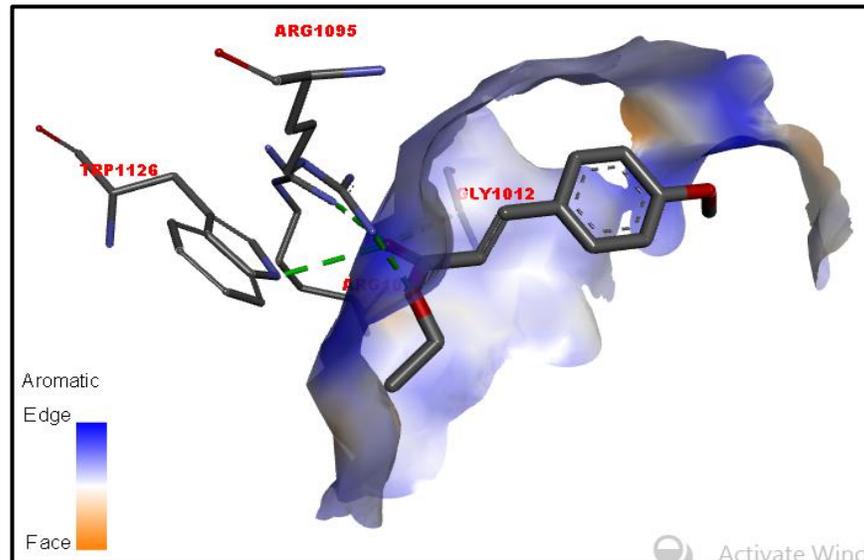
**Gambar 14.** Hasil visualisasi 2 dimensi dari *Native Ligand* (Tiotropium) yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>



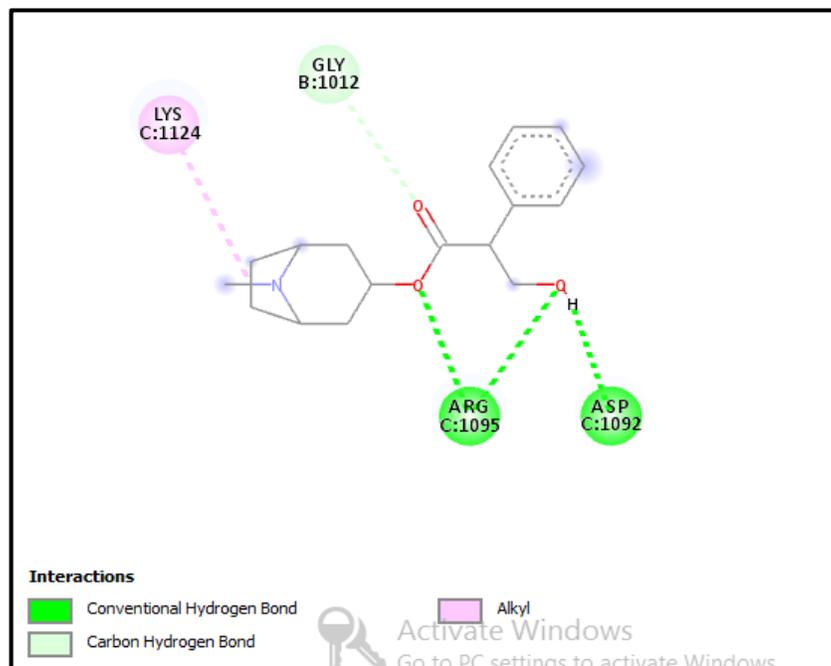
**Gambar 15.** Hasil visualisasi 3 dimensi dari *Native Ligand* (Tiotropium) yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>



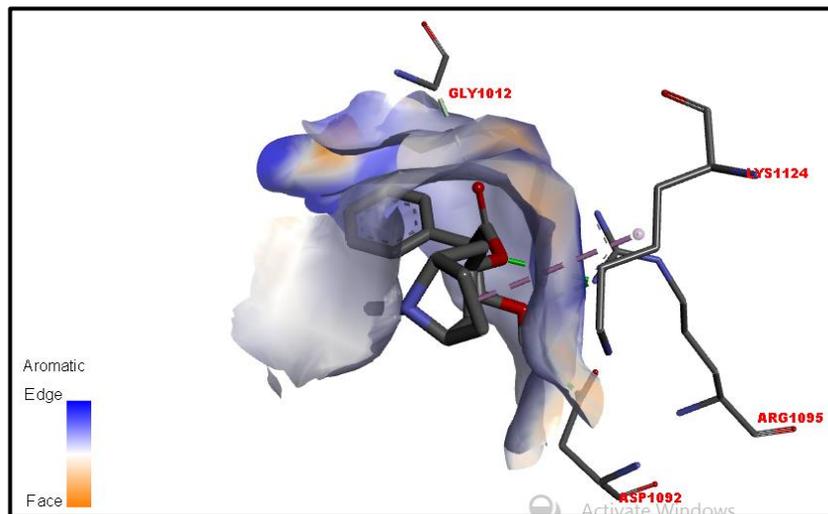
**Gambar 16.** Hasil visualisasi 2 dimensi dari Ligan EPMS yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>



**Gambar 17.** Hasil visualisasi 3 dimensi dari Ligan EPMS yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>



**Gambar 18.** Hasil visualisasi 2 dimensi dari Ligan Atropin yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>



**Gambar 19.** Hasil visualisasi 3 dimensi dari Ligan Atropin yang mengikat reseptor AChM<sub>3</sub>