

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Identifikasi Tanaman dan Isolasi Ekstrak

##### 1. Determinasi tanaman

Determinasi dari suatu tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas dari suatu tanaman apakah itu benar tanaman yang diinginkan. Identifikasi tanaman kencur dengan determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Hasilnya menunjukkan bahwa tanaman yang dilakukan determinasi merupakan *Kaempferia galanga* L. atau yang sering kita kenal dengan nama kencur. Determinasi tanaman ini menggunakan buku literature Flora of Java vol. 1 (Backer, 1965) yang hasilnya dapat dilihat pada lampiran 2.

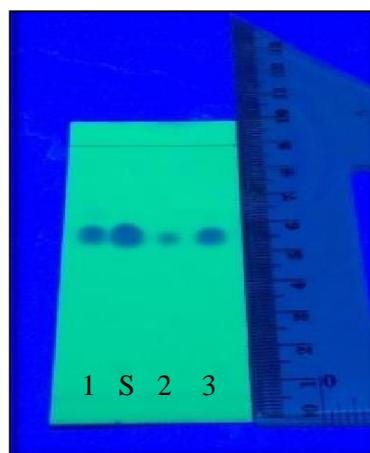
##### 2. Isolasi ekstrak

Serbuk kencur yang sudah halus di ekstraksi menggunakan metode maserasi. Metode ini mempunyai keuntungan yaitu preparasinya menggunakan alat yang sederhana dan tidak sulit dalam proses pengerjaannya. Dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2L dan 400g serbuk kencur dilakukan maserasi selama 6x24 jam. Hasil maserasi disaring dipisahkan filtrat dengan ampasnya menggunakan kertas saring setelah didapat filtrat di pekatkan dengan menggunakan rotary evaporator didapatkan hasil filtrat yang kental untuk kemudian dilakukan pencucian menggunakan n-heksan agar didapatkan kristal bening tidak berbau (Mayasari, 2011). Rekrystalisasi dilakukan dari kristal berwarna kuning berubah menjadi warna putih bersih. Tujuan rekrystalisasi yaitu untuk memisahkan kristal

dari senyawa target dengan zat ballast yang ikut terekstraksi sehingga memaksimalkan kemurnian senyawa aktif yang diinginkan (Caesaria, *et al.*, 2009).

### 3. Uji Identifikasi EPMS Dengan Metode KLT

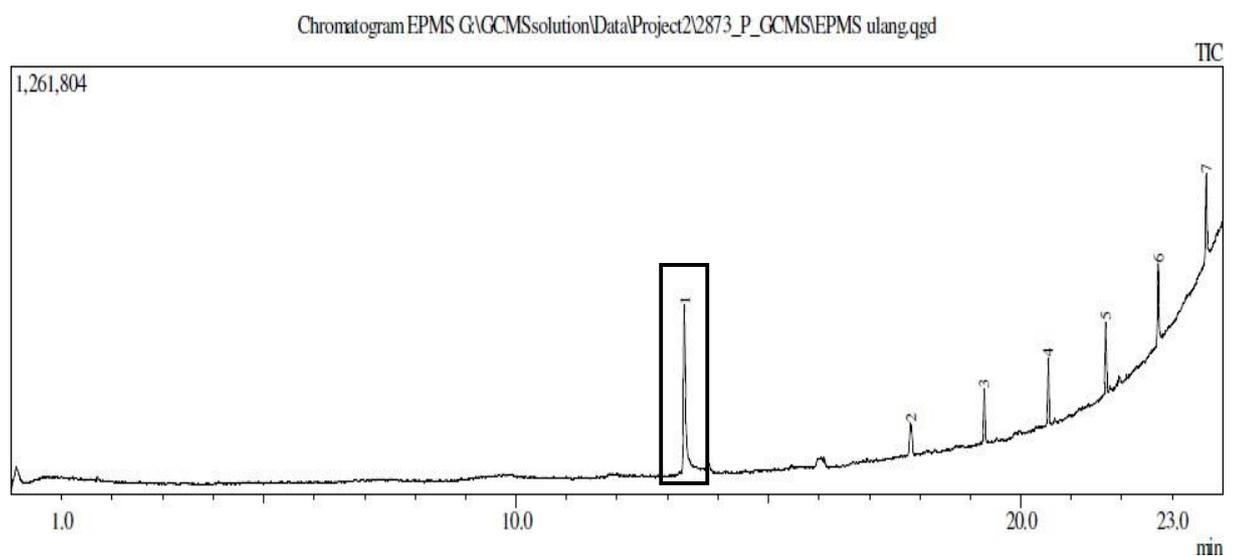
Uji dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dilakukan dengan tujuan melihat kemurnian isolat EPMS, menggunakan plat silica gel 60F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak digunakan toluen : etil asetat dengan perbandingan 19:1. Sedikit kristal dari EPMS dilarutkan dalam n-heksana. Ditotolkan dengan urutan yang pertama EPMS, lalu EPMS standar, EPMS 2 dan EPMS 3 kemudian dielusikan ke dalam fase gerak. Perbedaan antara EPMS 1 sampai 3 adalah pada tahap pencuciannya EPMS 1 melalui proses pencucian menggunakan n-heksan sebanyak 7x, sedangkan EPMS 2 pencucian 8x dan EPMS 3 pencucian 6x. Semakin banyak pencucian dilakukan maka didapatkan hasil kristal yang murni dengan kriteria kristal berwarna putih bersih (Caesaria, *et al.*, 2009). Dideteksi dengan sinar UV 254 nm dan hasil yang diperoleh nilai bercak EPMS berada di titik yang sama dengan pembandingnya EPMS standar dengan nilai  $R_f = 0,68$ . Hasil ini menandakan bahwa proses isolasi dari EPMS berhasil dilihat dari gambar 6.



**Gambar 6.** Uji Identifikasi KLT Senyawa EPMS pada sinar UV 254nm Nilai  $R_f$  0,68, S (standar) 1,2,3 (senyawa EPMS)

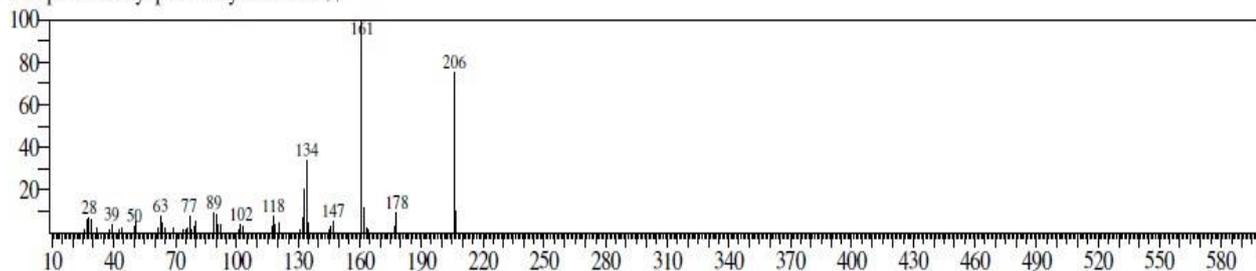
#### 4. Uji Identifikasi EPMS Dengan Metode GC-MS

Uji identifikasi dengan metode GC-MS ini dilakukan untuk mengetahui apakah kandungan EPMS terdapat dalam isolat kencur (Setyawan, 2012). Data yang diperoleh akan berupa kromatogram dengan puncak (*peak*), waktu retensi (tR) dan luas puncak (Darmapatni, *et al.*, 2016). Uji GC-MS dilakukan pada Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia Yogyakarta menggunakan pelarut metanol. Menurut literatur senyawa EPMS muncul pada waktu retensi 9,90 dengan berat molekul 206,4 g/mol dan memiliki fragmentasi massa pada 161, 134, 118, 103, 69, 63, 39 (Umar *et al.*, 2012). Hasil uji menunjukkan bahwa EPMS memiliki BM 206,0 g/mol dan muncul pada waktu retensi 13,30 dan memiliki fragmentasi massa 161, 134, 118, 63, 39 yang berarti senyawa yang diujikan benar senyawa EPMS. Menurut Nurmeilis (2016), meneliti kemurnian senyawa EPMS menggunakan uji GC-MS menyatakan bahwa EPMS muncul pada waktu retensi 12,714 dengan BM 206,0 g/mol dan senyawa tersebut dikonfirmasi adalah EPMS

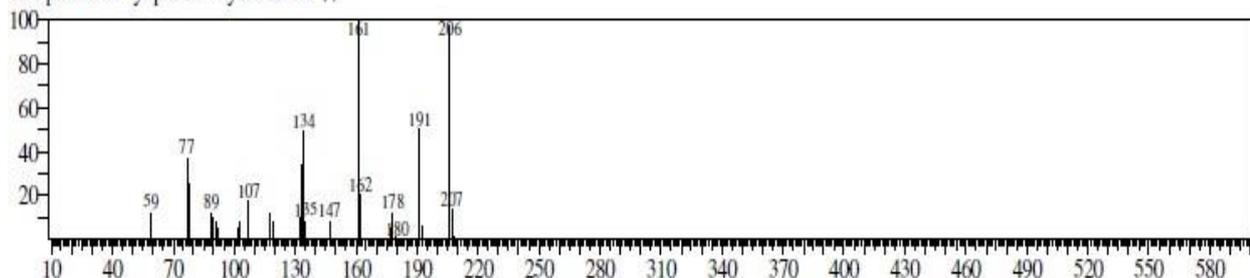


**Gambar 7.** Spektrum GC senyawa EPMS. Peak pertama adalah senyawa EPMS dan peak 2 hingga 7 merupakan peak dari pelarut yaitu metanol

Hit#:2 Entry:103525 Library:WILEY7.LIB  
 SE:91 Formula:C12 H14 O3 CAS:24393-56-4 MolWeight:206 RetIndex:0  
 CompName:Ethyl p-methoxycinnamate \$\$



Hit#:4 Entry:103526 Library:WILEY7.LIB  
 SE:82 Formula:C12 H14 O3 CAS:24393-56-4 MolWeight:206 RetIndex:0  
 CompName:Ethyl p-methoxycinnamate \$\$



**Gambar 8.** Fragmentasi MS senyawa EPMS. Peak yang muncul pada 161, 134, 118, 63, 39 merupakan peak EPMS dengan BM 206,4 g/mol

## 5. Uji *In Vitro* Aktivitas Etil *p*-metoksi sinamat *Kaempferia galanga* Linn.

### Penyiapan *Buffer Krebs*

*Buffer Krebs* terdiri dari dua formula, formula A dan formula B. Setiap formula memiliki komposisinya masing-masing. Formula A terdiri dari *Sodium chloride*, *Potassium chloride*, *Magnesium sulfate heptahydrate*, *Calcium chloride dihydrate*, *Sodium phosphate dihydrate* sedangkan formula B mengandung *Sodium bicarbonate*. Komposisi tersebut dibuat dengan masing-masing formula dilarutkan ke dalam 1,0 L aquades, selanjutnya masing-masing formula diambil 100 mL untuk dilarutkan ke dalam aquades 800 mL. Proses pencampuran kedua formula dimulai dari 100 mL formula B dilarutkan terlebih dahulu ke dalam aquades 800 mL selanjutnya 100 mL formula A dituangkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran awal dan ditambahkan glukosa 1 g, proses pelarutan diaduk menggunakan

pengaduk magnet thermostat dengan suhu 30°C. Digunakannya *Buffer Krebs* karena memiliki kandungan cairan yang hampir sama dengan cairan di dalam tubuh hewan uji (Wijaya, 2017).

#### **6. Penyiapan alat *organ bath***

Satu set alat *organ bath* memiliki berbagai komponen seperti; *tranduser isotonic*, *bridge amplifier*, dan seperangkat komputer yang sudah terinstal *software LabScribe*. Masing-masing alat dihidupkan secara manual. Penyesuaian keadaan fisiologis organ trakea marmut perlu diperhatikan yaitu pada pengaturan suhu diatur pada suhu 36,5-37,5°C agar organ trakea masih tetap dalam keadaan hidup dan juga diberikan gas karbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) yang dapat mempertahankan kondisi trakea dalam keadaan hidup selama proses pengambilan data selesai.

#### **7. Preparasi Organ Trakea Marmut**

Marmut dikorbankan dengan dislokasi tulang di bagian belakang kepala (*cervix*) yang kemudian diguyur air mengalir dibagian mulut untuk memastikan marmut sudah benar-benar dalam keadaan tidak sadar. Pembedahan dilakukan dibagian leher, ambil bagian trakea masukkan ke dalam cawan fiksasi yang berisikan *buffer krebs* dan dibersihkan dari lemak dan darah atau jaringan lain yang masih menempel. Setelah trakea bersih dipotong dengan arah melintang dan berlawanan arah tanpa mengenai ruas cincin tulang rawan. Bagian yang menghadap otot polos dipotong dengan jarak kedua ujung potongan dan otot polos sama besar. Kemudian kedua ujung otot polos diikat menggunakan benang untuk dikaitkan pada bagian tuas organ bath dengan bantuan ring kecil pada ujung bawah trakea dan ujung atas dikaitkan pada bagian yang terhubung dengan tranduser.

### **8. Penyiapan Larutan Etil *p*-metoksi sinamat *Kaempferia galanga* Linn. (EPMS)**

Larutan stok yang sudah tersedia dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M mula-mula diencerkan dengan cara mengambil 1 mL stok konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M dimasukkan ke dalam labu takar berukuran 5 mL kemudian ditambahkan larutan DMSO 5 mL, digojog perlahan dan larutan stok konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M siap digunakan. DMSO atau *dimethylsulfoxide* merupakan bahan yang digunakan sebagai pelarut bahan organik maupun anorganik yang biasa digunakan dalam industri obat. DMSO dapat digunakan untuk senyawa polar maupun nonpolar. Larutan konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  ditambahkan 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L ke dalam organ bath yang telah berisi organ trakea dan larutan fisiologis *buffer krebs* 20 mL kemudian di rekam dalam *software* yang tersambung yaitu *labscribe*.

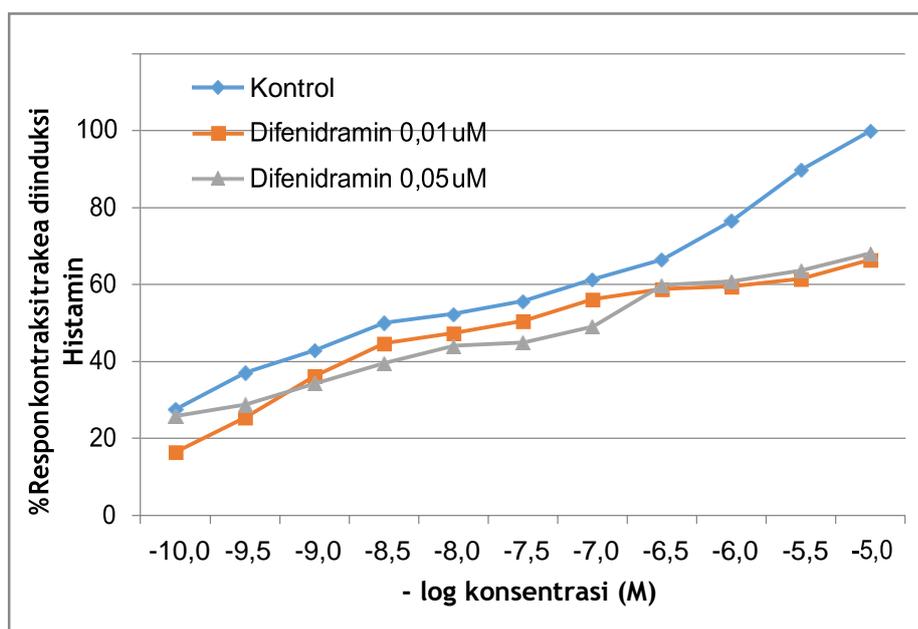
### **9. Uji *In Vitro* Aktivitas Senyawa EPMS dalam *Kaempferia galanga* Linn.**

EPMS merupakan salah satu senyawa ester yang mengandung cincin benzena, gugus metoksi dan gugus karbonil yang terkandung dalam kencur yang pernah diteliti sebagai obat asma tetapi tidak disebutkan secara spesifik mekanisme aksinya (Setyawan, *et al.*, 2012). Mekanisme kerja antagonis histamin telah banyak diuji dan dibahas secara mendetail. Maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan aktivitas antagonis EPMS terhadap reseptor  $H_1$ .

### **10. Uji Pembandingan Menggunakan Difenhidramin Sebagai Kontrol Positif**

Reseptor histamin  $H_1$  terdapat pada sistem saraf pusat, endotelium dan jaringan otot, yang akan mengakibatkan vasodilatasi, bronkokonstriksi, nyeri dan gatal pada manusia dan juga marmut. Antihistamin pengeblok reseptor  $H_1$  salah satunya yaitu Etanolamin eter yang termasuk kedalam golongannya adalah difenhidramin. Difenhidramin merupakan golongan antihistamin generasi pertama dengan cara kerja menghambat pelepasan histamin  $H_1$ .

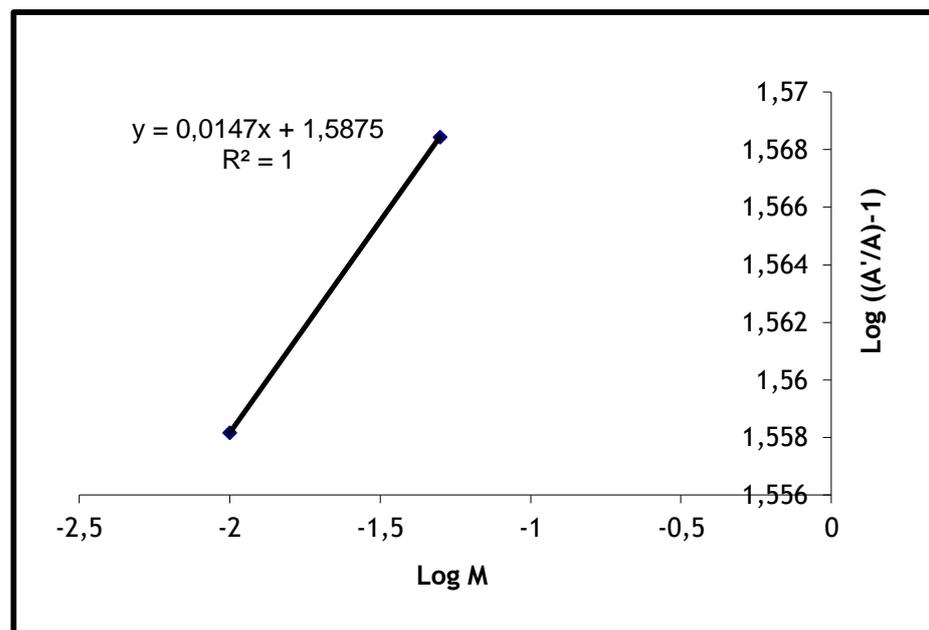
Difenhidramin digunakan sebagai uji pembanding. Tujuan dilakukannya uji dengan difenhidramin ini untuk melihat aktivitas EPMS dapat menimbulkan efek yang sama dengan difenidramin atau tidak. Juga sebagai uji validasi penelitian, bahwa difenhidramin terbukti *valid* memiliki aktivitas antagonisme reseptor H<sub>1</sub> (Amaliah, 2016).



**Gambar 9.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi, dengan pra perlakuan difenhidramin 0,01 dan 0,05  $\mu$ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM (n = 5 – 10)

Kurva menunjukkan respon kontraksi (Emaks) setelah diberikan antagonis histamin yaitu difenidramin. Berdasarkan kurva yang diperoleh, dihitung nilai EC<sub>50</sub>. Nilai EC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi dari agonis yang bisa memberikan respon kontraksi 50%. (Tabel 2). Nilai EC<sub>50</sub> kemudian diubah menjadi nilai pD<sub>2</sub> yang diperoleh dari -Log. EC<sub>50</sub>. Penambahan konsentrasi agonis setelah diberikan antagonis adalah

untuk tercapainya  $EC_{50}$  sehingga respon maksimal menjadi 100% atau sama seperti saat belum diberikan antagonis. Maka tipe antagonis disebut antagonis kompetitif. Sedangkan antagonis nonkompetitif jika hambatan efek agonis tidak bisa ditangani dengan meningkatkan kadar agonis mengakibatkan efeknya tidak maksimal ditandai dengan nilai  $EC_{50}$  tidak kembali 100% (Ikawati, 2012). Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa difenhidramin merupakan antagonis nonkompetitif terhadap reseptor  $H_1$  karena respon maksimal ( $E_{maks}$ ) yang diberikan kedua konsentrasi difenhidramin tidak sampai 100%. Diperkuat dengan nilai *slope* dari analisis kurva *schild-plot* yang mana jika mendekati angka 1,00 merupakan antagonis kompetitif dan jika tidak mendekati 1,00 maka jenis antagonis adalah non kompetitif dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 10.** Kurva *Schild-Plot* perhitungan parameter antagonis ( $pA_2$ ) difenhidramin terhadap reseptor  $H_1$ . Sumbu x sebagai nilai logaritma konsentrasi difenhidramin ( $\text{Log } M$ ) dan sumbu y sebagai nilai logaritma  $((A'/A)-1)$ , dimana  $A$  adalah nilai  $D_{50}$  histamin tanpa pemberian difenhidramin dan  $A'$  adalah nilai  $D_{50}$  histamin dengan pemberian difenhidramin.

Tipe antagonis difenhidramin dapat diketahui dari kurva *Schild-Plot* (Gambar 10) perhitungan parameter antagonis (pA<sub>2</sub>) difenhidramin terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Dari kurva tersebut didapatkan persamaan *Schild-Plot*  $y = 0,0147x + 1,5875$ . Nilai *slope* persamaan *Schild-Plot* adalah sebesar 0,0147 (tidak mendekati angka 1,00) dan intersep (nilai pA<sub>2</sub>) sebesar 1,5875. Nilai pA<sub>2</sub> (parameter afinitas) menunjukkan kadar antagonis yang dapat menyebabkan agonis dilipatkan kadarnya menjadi 2 kali untuk mendapatkan efek yang sama dengan efek sebelum diberikan antagonis. Dari uji tersebut dapat disimpulkan bahwa difenhidramin bertindak sebagai antagonis nonkompetitif terhadap reseptor H<sub>1</sub>.

**Tabel 3.** Kenaikan EC<sub>50</sub> setelah pemberian praperlakuan difenhidramin

No.	Kelompok perlakuan	EC <sub>50</sub> (M)
1	Kontrol Histamin	$8.83 \pm 7,68 \times 10^{-8}$
2	Difenhidramin 0,01 $\mu$ M	$2.57 \pm 1,47 \times 10^{-6}$
3	Difenhidramin 0,05 $\mu$ M	$1.18 \pm 1,08 \times 10^{-6}$

Keterangan : Nilai EC<sub>50</sub> disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM

Hasil ini menunjukkan efek relaksasi ditunjukkan dengan menurunnya nilai pD<sub>2</sub> dan melandainya kurva. Profil kurva menandakan adanya pergeseran penurunan kurva hubungan seri konsentrasi histamin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos trakea marmut. Pergeseran kurva setelah pemberian difenhidramin 0,01 dan 0,05  $\mu$ M pada saat uji menggambarkan adanya penurunan respon kontraksi yang disebabkan oleh pemberian histamin ditunjukkan dengan menurunnya nilai pD<sub>2</sub> histamin (Putra, 2018).

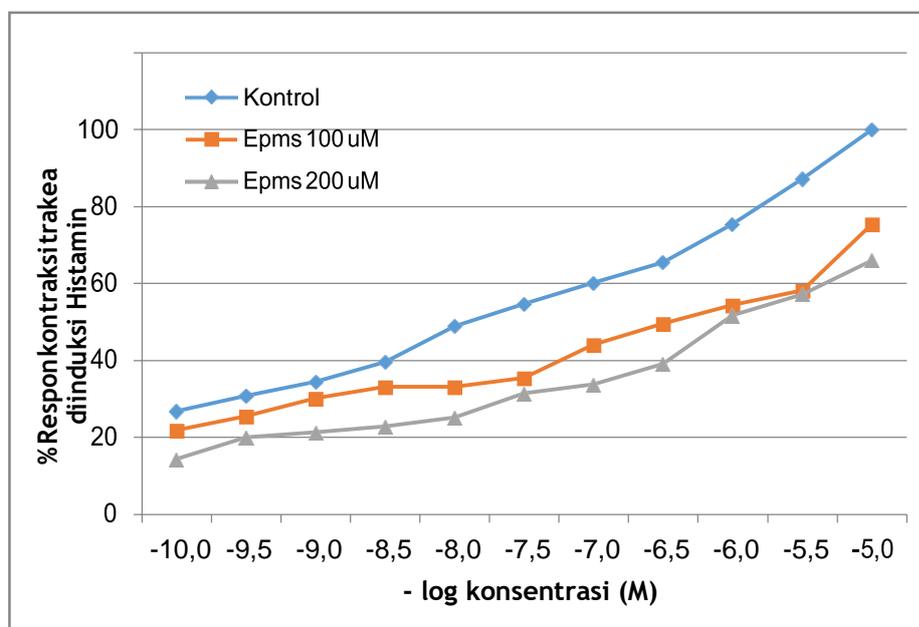
**Tabel 4.** Nilai pD<sub>2</sub> histamin praperlakuan difenhidramin 0,01 dan 0,05  $\mu$ M

No.	Kelompok perlakuan	pD <sub>2</sub>	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	$8,41 \pm 0,37$	$100 \pm 0,00$
2	Difenhidramin 0,01 $\mu$ M	$6,84 \pm 0,61$	$66,57 \pm 9,32$
3	Difenhidramin 0,05 $\mu$ M	$6,83 \pm 0,34$	$68,16 \pm 6,08$

Keterangan : Rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 10$ ) menunjukkan nilai pD<sub>2</sub>. Hasil statistik menunjukkan tidak adanya perbedaan secara signifikan ( $p > 0,05$ ) terhadap nilai pD<sub>2</sub> kontrol histamin setelah di uji dengan Uji *One-Way* Anova dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

## 11. Pengaruh EPMS Terhadap Reseptor H<sub>1</sub> Otot Polos Trakea

Pengaruh EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub> dilakukan dengan menganalisa perubahan profil kurva hubungan seri konsentrasi histamin dengan % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi dalam media larutan *buffer krebs*. EPMS pada isolat kencur mempunyai potensi sebagai antagonis reseptor H<sub>1</sub> diketahui dari perbandingan nilai pD<sub>2</sub> histamin dengan pemberian EPMS atau tanpa pemberian EPMS. Praperlakuan otot polos trakea dengan beberapa konsentrasi EPMS harus bisa menurunkan nilai pD<sub>2</sub> histamin. Untuk tipe antagonis jika kompetitif maka nilai parameter antagonis (pA<sub>2</sub>) EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub> dapat dilihat dan diukur dengan menggunakan analisa *Schild-Plot*. Kontraksi dapat dipicu oleh histamin saat berikatan dengan reseptor H<sub>1</sub> pada otot polos trakea. Diberikannya histamin dengan konsentrasi bertingkat menyebabkan peningkatan % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi.



**Gambar 11.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (Molar) terhadap % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi, untuk yang dengan pemberian EPMS konsentrasi 100 dan 200 µM ataupun yang tanpa pemberian. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol).

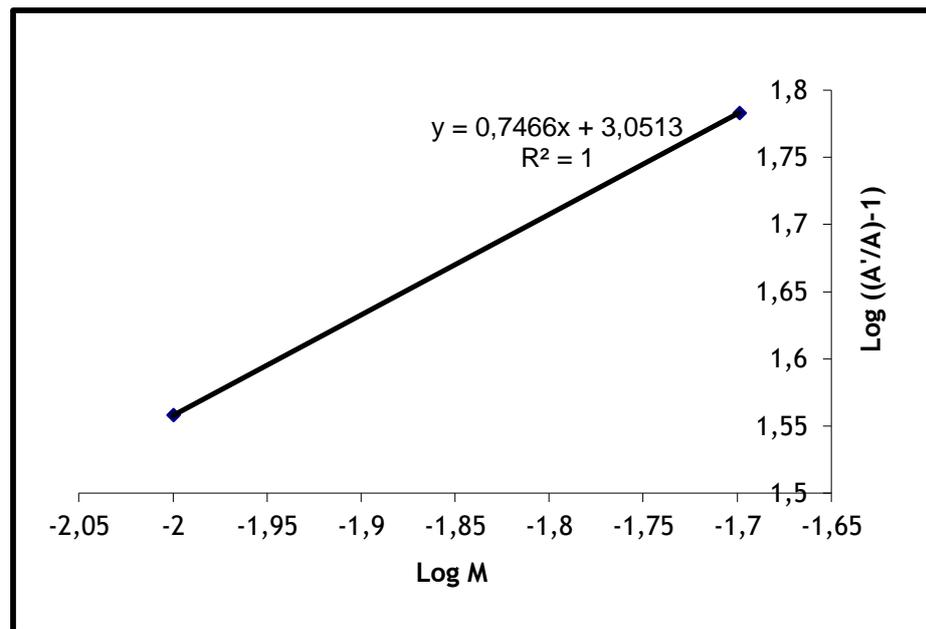
Hasil uji dengan pemberian EPMS konsentrasi 100 dan 200  $\mu\text{M}$  diketahui mampu mengurangi respon kontraksi otot polos trakea terisolasi yang diinduksi oleh histamin dengan konsentrasi bertingkat. Respon kontraksi menurun pada pemberian histamin konsentrasi rendah. Kurva pada Gambar 7 menunjukkan terjadinya penurunan atau melandainya grafik yaitu antara hubungan seri konsentrasi kontrol histamin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos trakea terisolasi.

**Tabel 5.** Kenaikan  $\text{EC}_{50}$  setelah pemberian praperlakuan EPMS

No.	Kelompok perlakuan	$\text{EC}_{50}$ (M)
1	Kontrol Histamin	$1.33 \pm 9,79 \times 10^{-8}$
2	EPMS 100 $\mu\text{M}$	$1.95 \pm 1,02 \times 10^{-6}$
3	EPMS 200 $\mu\text{M}$	$2.83 \pm 1,56 \times 10^{-6}$

Keterangan : Nilai  $\text{EC}_{50}$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM

Penurunan kurva menandakan terjadinya penurunan respon kontraksi otot polos trakea yang disebabkan oleh histamin sebagai pemicu setelah diberikan EPMS 100 dan 200  $\mu\text{M}$ , dari hasil kurva dapat dihitung nilai  $\text{EC}_{50}$ . Nilai konsentrasi setelah ditambahkan EPMS terjadi kenaikan (Tabel 4), sehingga agar respon kontraksi mencapai nilai  $\text{EC}_{50}$  yang sama tanpa diberikan difenhidramin, konsentrasi agonis perlu ditingkatkan. Nilai  $\text{EC}_{50}$  selanjutnya di ubah menjadi nilai  $\text{pD}_2$  dengan menghitung  $-\text{Log. EC}_{50}$  (Putra, 2018). Nilai  $\text{pD}_2$  histamin pada perlakuan kontrol, EPMS 100 dan 200  $\mu\text{M}$  berturut-turut adalah sebesar 7,76, 6,19, dan 5,97. Penurunan nilai  $\text{pD}_2$  EPMS bermakna secara statistik dengan nilai sig ( $p < 0,05$ )



**Gambar 12.** Kurva *Schild-Plot* perhitungan parameter antagonis (pA2) EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Sumbu x sebagai nilai logaritma konsentrasi EPMS (Log M) dan sumbu y sebagai nilai logaritma ((A'/A)-1), dimana A adalah nilai D<sub>50</sub> histamin tanpa pemberian EPMS dan A' adalah nilai D<sub>50</sub> histamin dengan pemberian EPMS.

Tipe antagonis EPMS dapat diketahui dari kurva *Schild-Plot* (Gambar 10) perhitungan parameter antagonis (pA2) EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Dari kurva tersebut didapatkan persamaan *Schild-Plot*  $y = 0,7466x + 3,0513$ . Nilai *slope* persamaan *Schild-Plot* adalah sebesar 0,7466 (mendekati angka 1,00) dan intersep (nilai pA2) sebesar 3,0513. Nilai pA2 (parameter afinitas) menunjukkan kadar antagonis yang dapat menyebabkan agonis dilipatkan kadarnya menjadi 3 kali untuk mendapatkan efek yang sama dengan efek sebelum diberikan antagonis. Dari uji tersebut dapat disimpulkan bahwa EPMS bertindak sebagai antagonis kompetitif terhadap reseptor H<sub>1</sub>.

**Tabel 6.** Nilai pD2 histamin setelah perlakuan EPMS 100 dan 200  $\mu\text{M}$ 

No.	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	$7,76 \pm 0,30$	$100 \pm 0,00$
2	EPMS 100 $\mu\text{M}$	$6,19 \pm 0,28$	$75,44 \pm 7,37$
3	EPMS 200 $\mu\text{M}$	$5,97 \pm 0,24$	$66,05 \pm 8,75$

Keterangan : Rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 10$ ) menunjukkan nilai pD2. Hasil statistik menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai pD2 kontrol histamin setelah di uji dengan Uji *One-Way* Anova dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

Nilai pD2 histamin menurun disebabkan pengaruh dari praperlakuan EPMS yang membuktikan bahwa EPMS mempunyai efek antagonis terhadap reseptor H1 otot polos trakea terisolasi. Untuk penetapan tipe antagonis EPMS, dianalisa pada bentuk kurva hubungan konsentrasi kontrol histamin terhadap % respon kontraksi otot polos trakea yang diberikan EPMS 100 dan 200  $\mu\text{M}$ . Pemberian otot polos trakea dengan EPMS tidak dapat mengembalikan respon kontraksi (Emaks) menjadi 100%. Pemberian EPMS 100  $\mu\text{M}$  hanya mencapai Emaks 75,44% dan pemberian EPMS 200  $\mu\text{M}$  mencapai Emaks 66,05%. Jenis antagonis EPMS adalah antagonis kompetitif dilihat dari nilai *slope* yang mendekati angka 1,00 dimana tipe ini mengikat reseptor ditempat ikatan agonis secara reversibel sehingga dapat digeser dengan agonis kadar tinggi. Hambatan kadar agonis dapat diatasi dengan meningkatkan kadar agonis sampai akhir dicapai efek maksimal yang sama. (Ikawati, 2012).

## B. Uji *In Silico* Senyawa EPMS pada Reseptor H<sub>1</sub>

### 1. Validasi Protokol *Docking*

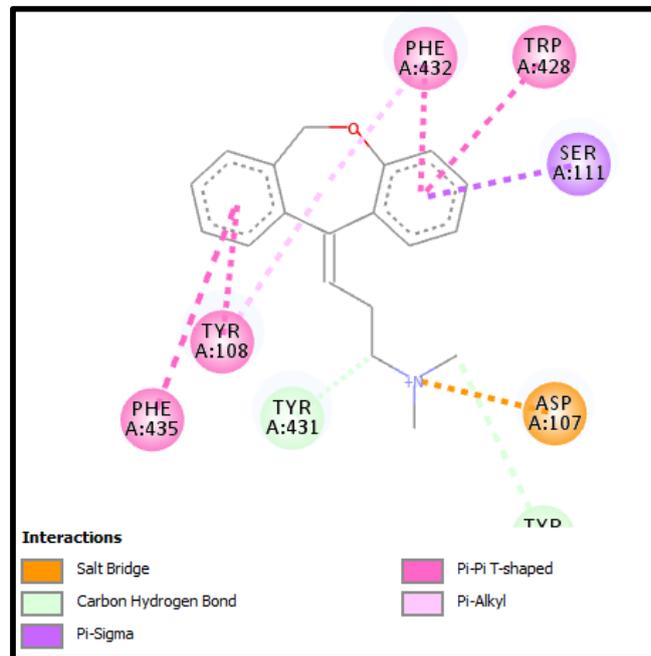
Validasi protokol *docking* bertujuan untuk membuktikan bahwa protokol yang dijalankan sudah valid. Dengan melihat nilai *RMSD* (*Root Mean Square Distance*). Apabila nilai *RMSD* kurang dari 2,000 Å maka dikatakan bahwa

tidak ada pergeseran yang bermakna pada proses *redocking* ligan asli yang artinya protokol *docking* tersebut valid (Paul & Rognan, 2002). Doksepin (5EH) digunakan sebagai *native ligand* pada tahap validasi dan diperoleh nilai *RMSD* adalah 1,740 ( $< 2,000 \text{ \AA}$ ) dengan skor *docking* -4,6 (Tabel 6), sehingga dapat dipastikan protokol *docking* pada reseptor H<sub>1</sub> ini bersifat valid.

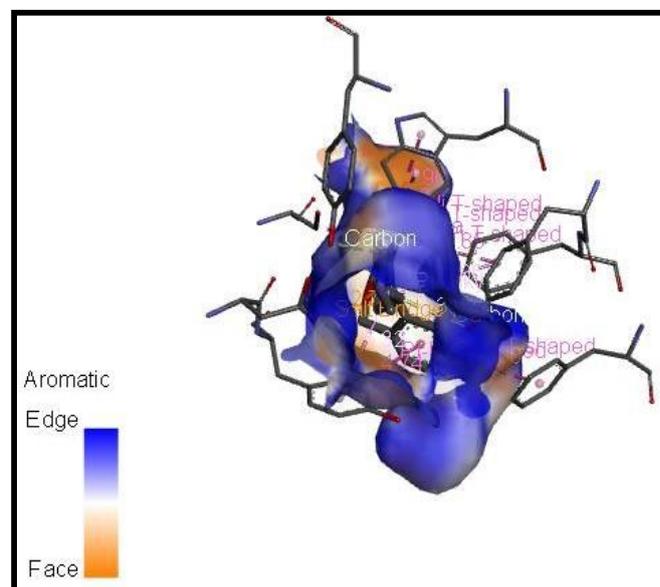
## 2. Hasil *Molecular Docking*

Aktivitas EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub> dianalisa menggunakan uji *in silico* dengan metode *docking molecular*. Adapaun aplikasi atau software yang digunakan untuk uji ini adalah *AutodockTools 4.2*, dan *DS Visualizer*. 3RZE merupakan protein reseptor H<sub>1</sub> pada manusia yang digunakan sebagai protein target.

Proses *docking* menghasilkan 9 konformasi. Dari hasil 9 konformasi tersebut dipilih konformasi terbaik dari ikatan energinya untuk menggambarkan kekuatan ikatan antara ligan dengan protein yang diikat. Jika energi ikatan semakin negatif, maka semakin besar kekuatan ikatannya terhadap reseptor. Nilai *RMSD* yang didapatkan adalah untuk *Lower bond* 1,740  $\text{\AA}$  ( $< 2,000 \text{ \AA}$ ) dan nilai *Upper bond* 2,719  $\text{\AA}$  dengan skor afinitas yang didapatkan adalah -4,6 Kkl/mol. Interaksi masing-masing ligan dengan reseptor dan nilai energi ikatannya ditunjukkan dalam gambar 13 yaitu senyawa doksepin yang terikat pada 8 residu dari protein antara lain: PHE 432, TRP 428, SER 111, TYR 108, PHE 435, TYR 431, ASP 107, TYR 458

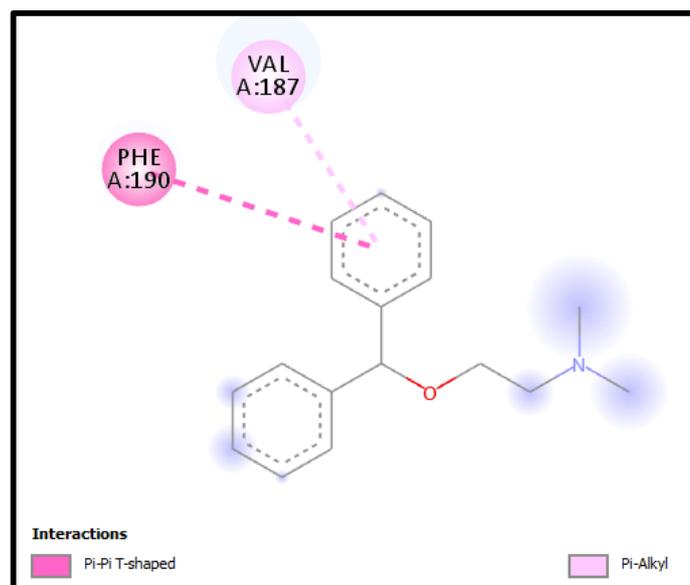


**Gambar 13.** Hasil visualisasi 2D Doksepin terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Menunjukkan asam amino protein berikatan dengan ligand dan jenis ikatan yang terjadi

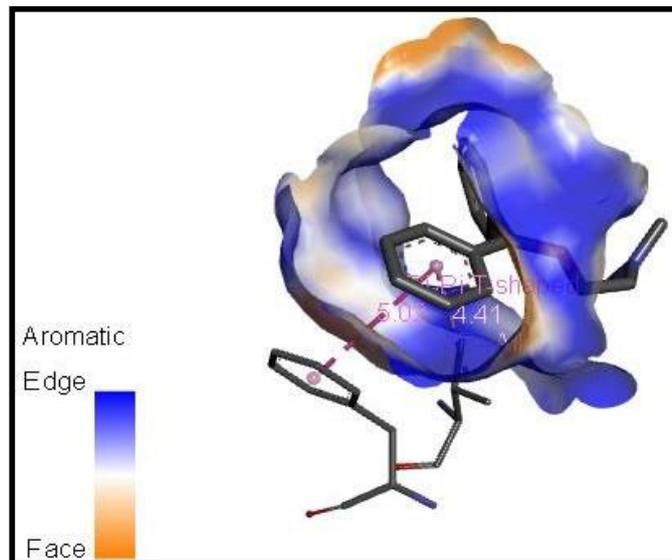


**Gambar 14.** Hasil visualisasi 3D Doksepin terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Gambar tersebut menunjukkan jenis ikatan yang terjadi

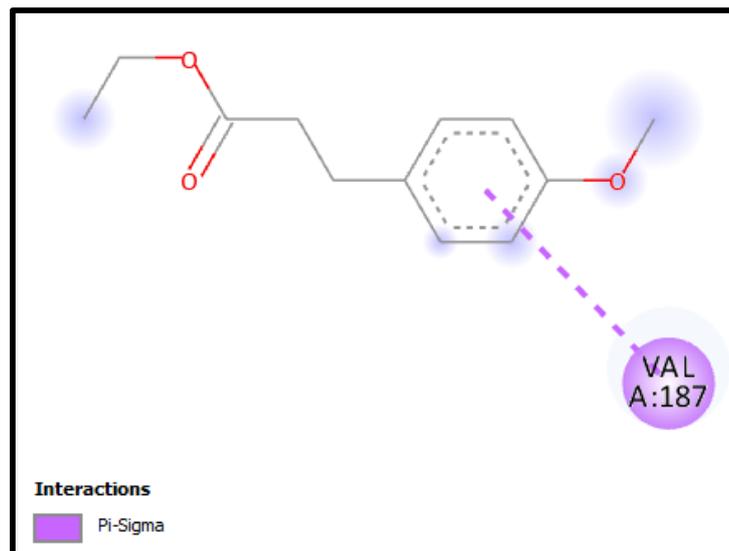
Difenhidramin merupakan obat golongan antihistamin generasi pertama yang tidak hanya bekerja sebagai antihistamin tetapi juga bekerja pada reseptor muskarinik,  $\alpha$ -adrenergik, serotonin dan *cardiac ion channels*. Difenhidramin mempunyai efek sedasi yang tinggi. Proses *docking* difenhidramin terhadap reseptor H<sub>1</sub> yang sudah dilakukan menghasilkan 9 konformasi kemudian dilihat nilai *RMSD* dibawah 2 dan juga skor afinitasnya. Dari ke 9 konformasi, urutan no 2 memiliki nilai *RMSD* (<2,000 Å) dengan nilai *lower bond* 1,214 Å dan nilai *upper bond* 2,349 Å dan skor afinitas sebesar -4,9 Kkl/mol. Native ligand mengikat asam amino antara lain VAL 187 dan PHE 190 seperti terlihat pada gambar 15.



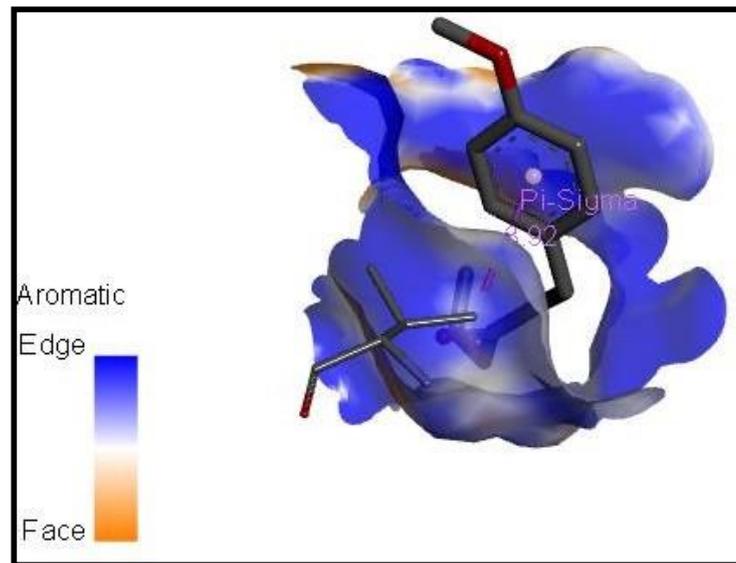
**Gambar 15.** Hasil Visualisasi 2D Difenhidramin terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Menunjukkan asam amino protein berikatan dengan ligand dan jenis ikatan yang terjadi



**Gambar 16.** Hasil visualisasi 3D Difenhidramin terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Gambar tersebut menunjukkan jenis ikatan yang terjadi



**Gambar 17.** Hasil Visualisasi 2D EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Menunjukkan asam amino protein berikatan dengan ligand dan jenis ikatan yang terjadi



**Gambar 18.** Hasil visualisasi 3D EPMS terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Gambar tersebut menunjukkan jenis ikatan yang terjadi

Hasil visualisasi dengan aplikasi *DS Visualizer* menunjukkan skor *docking* senyawa EPMS dalam *Kaempferia galanga* Linn. adalah -3,9 Kkl/mol dengan nilai *RMSD Lower bond* 1,852 Å (<2,000 Å) dan nilai *Upper bond* 3,100 Å yang letaknya pada konformasi ke-8. Hasil visualisasi menunjukkan EPMS hanya mengikat 1 residu asam amino yaitu VAL 187 seperti terlihat pada gambar 17.

**Tabel 7.** Interaksi ligan pada residu protein target dan nilai energi ikatan

Ligand	Energi ikatan (kkl/mol)	Residu protein
Doksepin (5EH) sebagai ligan asli	-4,6	<i>Phenylalanine 432</i> <i>Tryptophan 428</i> <i>Serine 111</i> <i>Tyrosine 108</i> <i>Phenylalanine 435</i> <i>Tyrosine 431</i> <i>Aspartic acid 107</i> <i>Tyrosine 458</i>
Difenhidramin	-4,9	<i>Valine 187</i> <i>Phenylalanine 190</i>
EPMS	-3,9	<i>Valine 187</i>

Hasil uji *in silico* tersebut difenhidramin dan EPMS pada uji *in vitro* sebelumnya terbukti sebagai antagonis non-kompetitif, berikatan pada sisi protein *Val187 dan Phe190* untuk difenidramin dan *Val187* untuk EPMS yang artinya dari kedua senyawa tersebut asam amino *Val187* yang dimiliki oleh kedua senyawa dapat menghambat reseptor H<sub>1</sub>. Maka uji *insilico* tersebut telah membuktikan bahwa EPMS memiliki sifat antagonis histamin untuk menghambat bronkokonstriksi. EPMS sebagai antagonis non-kompetitif reseptor H<sub>1</sub> perlu diteliti lebih lanjut bagaimana mekanismenya dalam mengurangi potensi histamin sehingga menghasilkan respon kontraksi pada otot polos.