

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Kristal EPMS

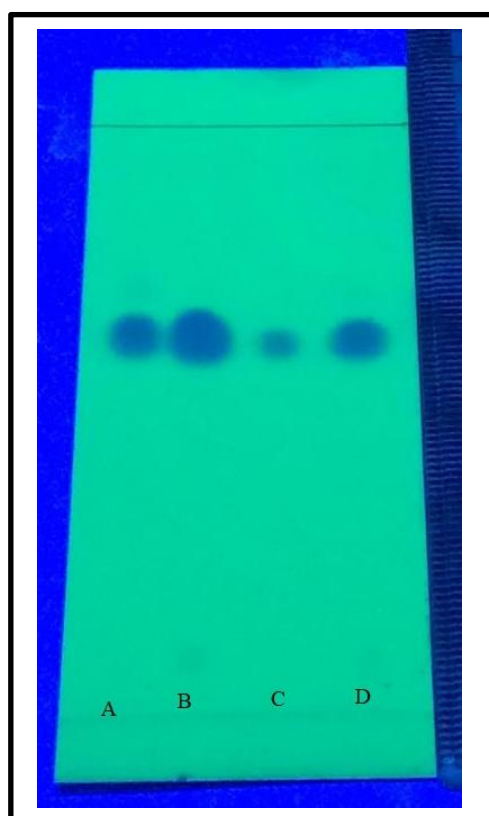
Kencur diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode ini merupakan metode yang umum dan mudah untuk dilakukan. Maserasi dilakukan selama 7 hari dengan pengadukan setiap hari. Kemudian dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰ C hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak tersebut kemudian dicuci menggunakan n-heksana hingga didapatkan kristal EPMS.

1. Uji Identifikasi EPMS Dengan Metode KLT Pada Kencur

Uji identifikasi dengan KLT digunakan mengidentifikasi kandungan EPMS pada kristal yang telah diperoleh. Kristal yang diperoleh kemudian dicuci menggunakan n-heksan hingga berwarna putih. Fase gerak yang digunakan adalah toluena dan etil asetat (95:5) dan fase diam yang digunakan adalah plat silica gel 60 GF254 yang memiliki sifat polar (Farmakope Herbal, 2009 dan Rohman, 2007).

Plat KLT dibuat dengan ukuran 10 cm x 4 cm dengan jarak elusidasi 8 cm. Plat KLT di lihat dibawah sinar UV 254 nm. Pada Gambar 5 hasil yang diperoleh dari perbandingan antara standar EPMS dengan kristal yang telah dimurnikan memberikan nilai Rf berturut-turut untuk standar EPMS (B) sebesar 0,68, EPMS cuci 2x (A) sebesar 0,68, EPMS cuci 3x (C) sebesar 0,68 dan EPMS cuci 4x

(D) sebesar 0,68. Nilai Rf dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi suatu senyawa. Jika senyawa yang dimurnikan memiliki nilai Rf yang sama dengan Rf standar maka senyawa tersebut dapat dikatakan sama atau mirip dengan standar yang digunakan sebagai pembanding (Parmeswaran, 2013).



Keterangan gambar :

- a. A (EPMS cuci 7x),
- b. B (Standar EPMS),
- c. C (EPMS cuci 8x),
- d. D (EPMS cuci 6x)

Gambar 1. Uji KLT senyawa EPMS yang dilihat dibawah sinar UV 254nm.

Nilai Rf yang didapatkan setelah KLT menunjukkan bahwa senyawa yang dimurnikan telah murni dan dapat dikatakan bahwa senyawa tersebut adalah EPMS.

B. Uji *In Vitro* Dengan Metode *Organ Bath*

1. Penyiapan *Buffer Tyrode*

Buffer tyrode disiapkan dengan cara mencampur larutan A 100 ml dan larutan B 100 ml kemudian ditambahkan glukosa sebanyak 1,00 gr. Larutan A terdiri dari natrium klorida, kalium klorida, magnesium klorida, kalsium klorida, dan monosodium fosfat. Larutan B terdiri dari natrium bikarbonat masing-masing bahan kemudian ditimbang dan dilarutkan dalam 1L aquades. Setelahnya larutan diambil masing-masing 100 ml, berikan glukosa sebanyak 1,00 gr ditambahkan aquades hingga 1L. Larutan *buffer tyrode* merupakan larutan pengganti cairan fisiologis tubuh. *Buffer tyrode* yang digunakan berada pada suhu 37° C untuk menyesuaikan dengan suhu tubuh marmut.

2. Penyiapan Alat *Organ Bath*

Set alat *Organ bath* yang disiapkan telah terhubung dengan perangkat komputer yang memiliki *software LabScribe2, organ bath, transducer isotonic* dan *bridge amplifier*. *Organ bath* yang disiapkan sebelumnya terisi dengan aquades hingga pada tanda batas, aquades sebagai mediator pada *organ bath* untuk mempertahankan suhu 37° C.

3. Preparasi Organ Ileum Marmut

Marmut jantan dipilih sebagai hewan uji dengan berat sekitar 500 – 400 gram. Marmut didislokasi di leher bagian belakang, kemudian

dilakukan pembedahan di area perut dan diambil bagian ileum sekitar 2 – 3 cm. Ileum dibersihkan dari jaringan lemak dan kotoran yang menempel agar dapat memudahkan absorpsi senyawa agonis, difenhidramin dan EPMS yang akan diinduksikan. Setelah dilakukan pembersihan dilakukan pengikatan dikedua ujung ileum secara bersilangan. Kemudian ileum dimasukkan kedalam *chamber* 20 ml berisi larutan *buffer tyrode* , sehingga diharapkan seluruh organ ileum terendam oleh *buffer*.

4. Uji *In Vitro* Aktivitas Senyawa EPMS Dalam *Kaempferia galangal* L.

EPMS merupakan senyawa yang terdapat didalam *Kaempferia galangal* L yang belum secara spesifik diteliti sebagai anti muntah pada *ileum*. EPMS sendiri telah diteliti memiliki efek sebagai sedative-hipnotik dibandingkan dengan kontrol dan diazepam (Nurmeilis, 2016)

Mekanisme kerja dari agonis histamin sendiri sudah banyak dilakukan dan dikaji. Reseptor histamin dibagi menjadi 4 yaitu histamin H₁, H₂, H₃, dan H₄ dimana semua dari reseptor tersebut terikat oleh *G protein-coupled receptor* (GPCR). Reseptor H₁ termasuk dalam reseptor yang terikat GPCR. Aktivitas dari reseptor H₁ ini diperantarai oleh protein berpasangan Gq. Protein berpasangan Gq ini merupakan jenis dari GPCR yang apabila protein Gq teraktivasi akan menstimulasi proses sel melalui jalur fosfolipase C. Setelah

distimulasi melalui jalur fosfolipase C, reseptor mengarah pada reaksi hidrolisis fosfatidlinositol 4,5-bisfosfat, menghasilkan peningkatan level inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) dan 1,2-diasilgliserol.

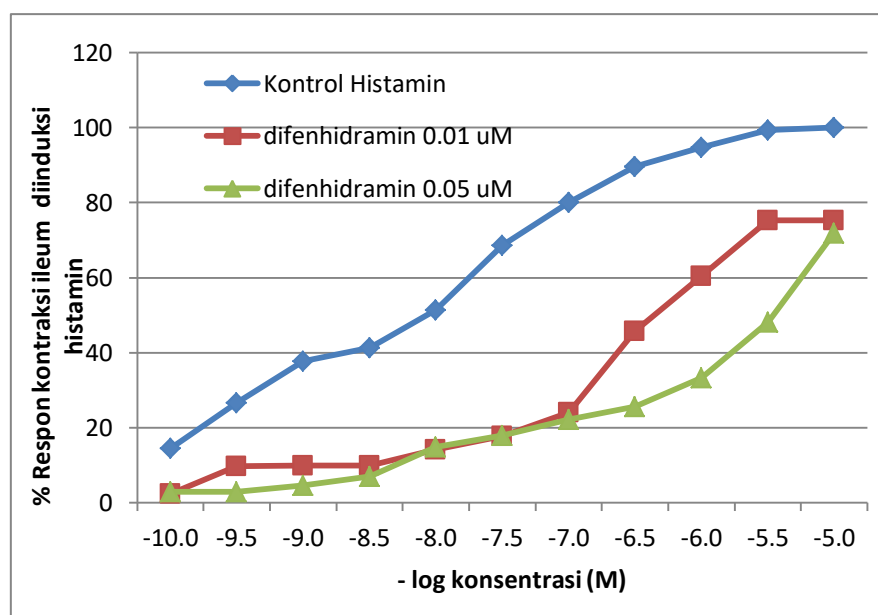
IP3 yang terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP3 di retikulum endoplasma dimana kalsium disimpan. IP3 akan mengaktifasi kanal kalsium sehingga menyebabkan pelepasan Ca^{2+} ke *intraseluler* dan meningkatkan kadar Ca^{2+} (Berridge, 2009). Kalsium merupakan dasar dari *second messenger* sel otot polos. Pelepasan Ca^{2+} mengakibatkan konsentrasi Ca^{2+} di sel meningkat menyebabkan aktivitas dari *calmodulin sensitive-enzym* yaitu mengaktifasi *Myosin light chain Kinase* yang merupakan stimulus kontraksi otot (Sander, 2001).

Reseptor H_1 merupakan perantara dari histamin yang terdapat dalam otot polos gastrointestinal sehingga menyebabkan kontraksi dari otot polos. Aktivitas Histamin juga menginduksi kontraksi dari otot polos marmut, dimana ileum marmut memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi daripada manusia (Katzung, 2011).

5. Uji Pembandingan Menggunakan Difenhidramin (Kontrol Positif)

Reseptor Histamin terdapat pada otot polos, endotelium dan otak. Difenhidramin merupakan prototipe antagonis dari histamin. Difenhidramin merupakan generasi pertama dari antagonis histamin yang memiliki *sedative agent* yang tinggi dengan efek blokir reseptor otonom yang signifikan (Katzung, 2011).

Uji pembandingan dilakukan menggunakan difenhidramin dengan metode yang sama saat perlakuan menggunakan EPMS. Difenhidramin diketahui memiliki efek anti mabuk perjalanan dan digunakan juga sebagai penghambat (*used for management*) dari obat-obat kemoterapi yang menginduksi terjadinya muntah. Tujuan dilakukan uji difenhidramin untuk melihat bahwa EPMS memiliki aktivitas yang sama seperti difenhidramin dalam menangani mual-muntah. Selain itu juga sebagai validasi penelitian, jika uji difenhidramin valid memiliki aktivasi antagonisme histamin H_1 .



Gambar 2. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan difenhidramin 0.01 dan 0.05 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM.

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

kontraksi 50%. Nilai EC_{50} selanjutnya diubah menjadi nilai pD2 yang diperoleh dari $-\text{Log } EC_{50}$ (Tabel 4). Kenaikan nilai EC_{50} dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Kenaikan EC_{50} akibat perlakuan difenhidramin

No	Kelompok Perlakuan	EC_{50} (M)
1	Kontrol Histamin	$2.14 \pm 0.69 \times 10^{-8}$
2	Difenhidramin 0.01 μM	$6.97 \pm 3.39 \times 10^{-7}$
3	Difenhidramin 0.05 μM	$3.37 \pm 0.66 \times 10^{-6}$

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

Hasil perlakuan uji difenhidramin dosis 100 dan 500 μM menunjukkan adanya efek relaksasi terhadap otot polos ileum marmut, ditandai dengan pergeseran kurva pD2 ke bawah. Pergeseran kurva pD2 kebawah menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian difenhidramin dosis 0.01 dan 0.05 μM , hal tersebut ditandai dengan menurunnya nilai pD2. Nilai rata-rata pD2 berturut-turut yang dihasilkan adalah 8,07, 6,34, dan 5,46 (Tabel 4). Penurunan pD2 difenhidramin juga bermakna secara statistik dimana $p < 0.05$.

Tabel 1. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh perlakuan difenhidramin 0.01 μM dan 0.05 μM

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol histamine	8.07 ± 0.26	100 ± 0.00
2	Difenhidramin 0.01 μM	6.34 ± 0.14	75.36 ± 6.88
3	Difenhidramin 0.05 μM	5.46 ± 0.06	71.86 ± 5.14

Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM. Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) terhadap nilai pD2 kontrol histamin, setelah diuji statistik dengan *one-way Anova*, dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

Difenhidramin merupakan antagonis kompetitif berdasarkan nilai slope yang dihasilkan yaitu sebesar 1,2691x. Antagonis kompetitif merupakan antagonis yang bersaing secara kompetitif dalam meduduki reseptor histamin. Pemberian antagonis kompetitif dapat mengurangi potensi dari agonis namun tidak bekerja efektif secara maksimal (Neubig, 2003).

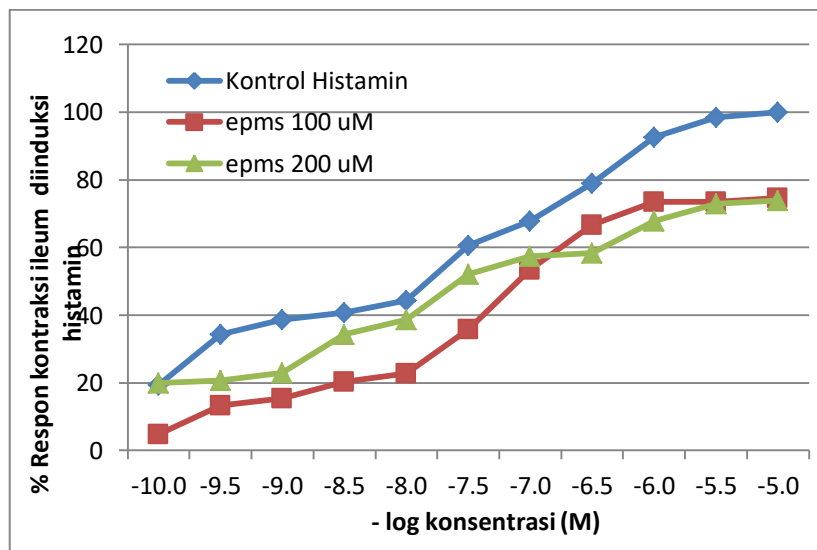
Penambahan konsentrasi dari agonis terhadap perlakuan ini tidak mampu menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh perlakuan antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai E_{max} tidak dapat mencapai 100% (Putra, 2018).

6. Pengaruh EPMS Terhadap Reseptor Histamin H_1 Ileum Marmut

Pengaruh aktivitas EPMS terhadap reseptor histamin H_1 diuji dengan mengamati perubahan profil kurva seri kadar agonis yaitu histamin dengan % kontraksi otot polos ileum yang terisolasi dalam larutan *buffer tyrode*.

EPMS diduga memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor histamin H_1 . Dugaan tersebut diukur dengan membandingkan nilai pD_2 antara histamin dengan perlakuan EPMS dan tanpa perlakuan EPMS. Nilai pD_2 yang ditunjukkan akan mengalami penurunan jika terjadi aktivitas antagonisme dibandingkan dengan perlakuan tanpa EPMS. Selanjutnya dilihat apakah EPMS memiliki efek antagonisme kompetitif atau tidak dengan menggunakan nilai pD_2 EPMS terhadap reseptor histamin H_1 dengan menggunakan persamaan *Schild-Plot*

dengan syarat respon maksimal antara perlakuan kontrol dan sebelum perlakuan EPMS harus sama (Kenakin, 1982).



Gambar 3. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan EPMS 100 dan 200 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM.

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai EC_{50} . Nilai EC_{50} adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50%. Nilai EC_{50} selanjutnya diubah menjadi nilai pD_2 yang diperoleh dari $-\text{Log EC}_{50}$.

Tabel 2. Kenaikan EC_{50} akibat perlakuan EPMS

No	Kelompok Perlakuan	EC_{50} (M)
1	Kontrol Histamin	$11.7 \pm 7.09 \times 10^{-8}$
2	EPMS 100 μM	$9.55 \pm 3.52 \times 10^{-8}$
3	EPMS 200 μM	$2.04 \pm 1.00 \times 10^{-7}$

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

Terjadi efek relaksasi otot polos ileum yang diinduksi oleh seri histamin akibat perlakuan EPMS dosis 100 dan 200 μM . Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran kurva grafik bergeser ke bawah dan ditandai dengan menurunnya nilai pD2. Penurunan kurva mengindikasikan adanya penurunan kemampuan histamin dalam mengkontraksi ileum marmut akibat pemberian EPMS dosis 100 dan 200 μM , hal tersebut ditandai dengan penurunan nilai pD2. Nilai rata-rata pD2 secara berturut-turut 8,16, 7,12, dan 6,98. Penurunan pD2 secara bermakna secara statistik $p < 0,05$. Pada perlakuan dosis 100 dan 200 μM tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, sehingga pada penggunaan dosis 100 μM sudah memberikan efek relaksasi pada kontraksi otot polos ileum.

Tabel 3. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh perlakuan EPMS 100 dan 200 μM

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol histamin	8.16 ± 0.45	100 ± 0.00
2	EPMS 100 μM	7.12 ± 0.10	74.60 ± 5.24
3	EPMS 200 μM	6.98 ± 0.19	73.89 ± 5.67

Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks (%) disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM. Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) terhadap nilai pD2 kontrol histamin, setelah diuji statistik dengan *one-way Anova*, dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

EPMS merupakan antagonis non-kompetitif dimana hal tersebut ditunjukkan dengan nilai slope pada metode *Schild-Plot* tidak mendekati satu. Antagonis non-kompetitif merupakan antagonis yang berikatan dengan reseptor namun tidak bersaing secara kompetitif dengan ligan asli dalam menduduki reseptor tersebut, sehingga mengurangi efektifitas dari agonis. Penambahan konsentrasi dari agonis

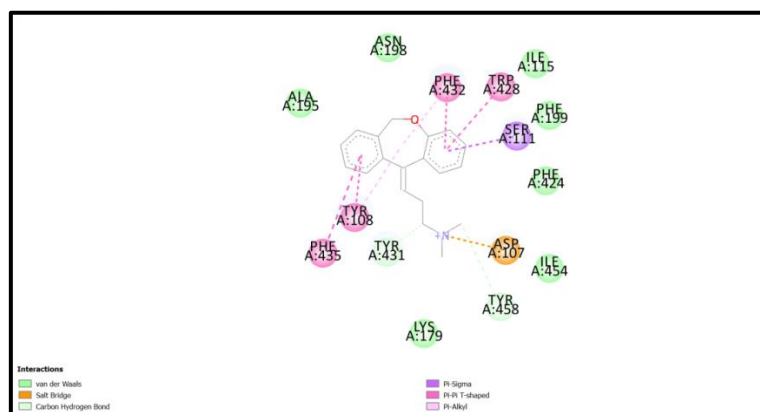
terhadap perlakuan ini tidak mampu menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh perlakuan antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai E-maks tidak dapat mencapai 100% (Putra, 2018).

C. Uji *In Silico* Senyawa EPMS Pada Reseptor Histamin H₁

1. Validasi Protokol *Docking*

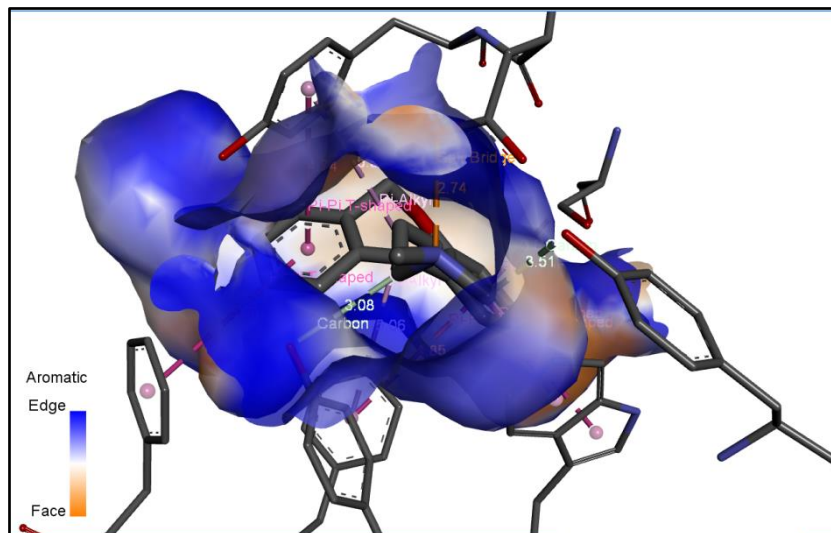
Validasi protokol *docking* dilakukan untuk membuktikan jika penelitian yang dilakukan valid. Validasi ini dilihat dari nilai *Root Mean Square Distance* (RMSD) yang berada dibawah 2,000Å. Jika nilai RMSD berada dibawah 2,000 Å maka dapat dipastikan jaraknya memungkinkan membentuk suatu ikatan karena jaraknya cukup dekat antara reseptor dengan ligan (Bursulaya, 2003). *Native ligand* yang digunakan adalah doksepin (5HE) dengan nilai RMSD 1,740 Å (<2,000 Å) dengan nilai afinitasnya -4,6, sehingga dapat diketahui bahwa protokol *docking* yang dilakukan valid.

2. Hasil Molecular Docking



Gambar 4. Hasil Visualisasi 2D doksepin dengan reseptor H₁.

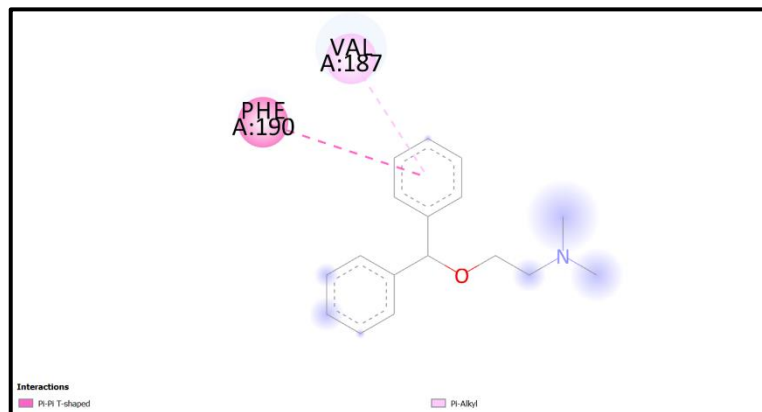
Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.



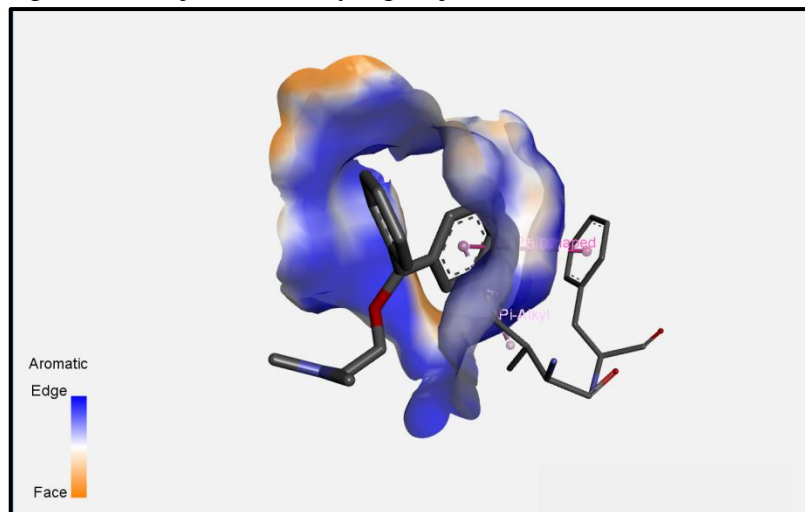
Gambar 5. Hasil visualisasi 3D doksepin dengan reseptor H₁. Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

Aktivitas EPMS terhadap reseptor histamin dapat diteliti melalui uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Aplikasi yang digunakan adalah *AutoDockTools*, *DS Visualizer16* dan *OpenBabel*. Protein yang digunakan sebagai adalah 3RZE dengan *native ligand* 5HE yang merupakan protein reseptor H₁ pada manusia. Proses *docking* menghasilkan 9 konformasi dengan nilai afinitas yang berbeda yang kemudian dipilih yang terbaik yaitu dengan nilai afinitas terendah dengan RMSD < 2,000 Å. Nilai afinitas merupakan energi ikatan yang terbentuk antara ligan terhadap protein dimana semakin rendah nilai afinitas maka semakin besar kekuatan ikatan yang terbentuk terhadap reseptor. Nilai RMSD yang diperoleh adalah nilai *lower bond* 1.740 Å (< 2,000 Å) dan *upper bond* 2.719 dengan nilai afinitasnya -4.6. Nilai energi ikatan dan interaksi antara masing-

masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada gambar. Senyawa doksepin diketahui berikatan dengan residu protein *PHE 435*, *TYR 108*, *TYR 431*, *ASP 107*, *TYR 458*, *PHE 432*, *TRP 428* dan *SER 111*.



Gambar 6. Hasil Visualisasi 2D difenhidramin dengan reseptor H_1 . Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.

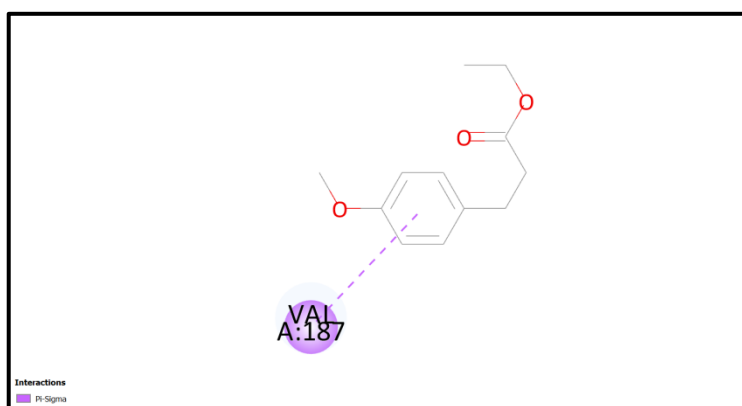


Gambar 7. Hasil Visualiasi 3D difenhidramin dengann reseptor H_1 . Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

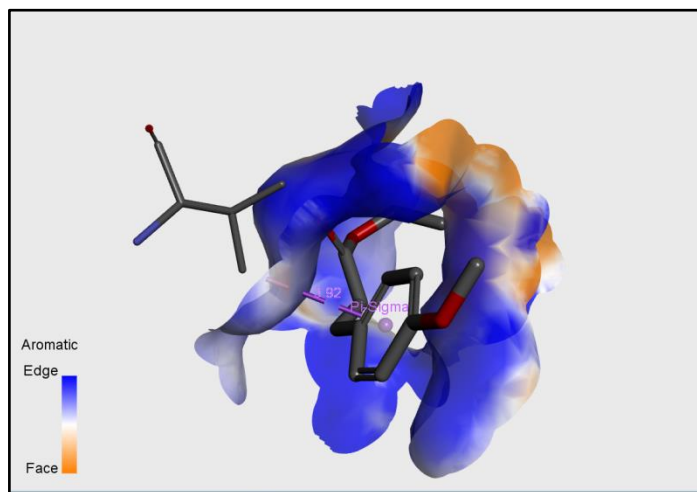
Difenhidramin merupakan antihistamin golongan pertama. Selain sebagai antitusif yang meringankan batuk, difenhidramin juga efektif dalam mencegah dan menangani mual, muntah, dan vertigo yang berhubungan dengan mabuk perjalanan (Kasim, 2010). Dalam

penelitian ini difenhidramin digunakan sebagai ligan pembanding dengan EPMS.

Proses *docking* difenhidramin terhadap reseptor histamin menghasilkan 9 konformasi. Dimana dari kesembilan konformasi tersebut dilihat nilai RMSD $< 2,000 \text{ \AA}$ dengan skor afinitas terendah. Dari hasil *docking* didapatkan konformasi nomor 2 dengan nilai RMSD *lower bond* 1.124 \AA dan *upper bond* 2.349 \AA dengan skor afinitas -4.9 . Asam amino yang berikatan adalah *phenylalanine 190* dan *valine 187*.



Gambar 8. Hasil Visualisasi 2D *Ethyl p-methoxy cinnamate* dengan reseptor histamin H_1 . Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.



Gambar 9. Hasil Visualisasi 3D *Ethyl p-methoxy cinnamate* dengan reseptor histamin H₁. Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor afinitas dari senyawa EPMS pada reseptor yang paling baik adalah -3,9 pada konformasi nomor 9 dengan nilai RMSD *lower bond* 1.852 Å dan *upper bond* 3.100 Å. Asam amino yang berikatan adalah *Valine187*.

Tabel 4. Nilai energi ikatan dan interaksi ligan dengan residu protein target

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

Berdasarkan hasil *docking* yang menghasilkan residu asam amino yang mengikat ligan untuk menghasilkan aktivitas farmakologi. Pada Tabel 7 bisa dilihat jika senyawa EPMS memiliki residu asam amino yang sama seperti difenhidramin yaitu *Valine 187*. Dapat dikatakan jika asam amino yang diduduki oleh difenhidramin dalam menghambat reseptor histamin diduduki juga oleh EPMS. Sehingga pada uji *in silico* ini membuktikan bahwa EPMS memiliki sifat yang sama sebagai antagonis histamin untuk menghambat mual muntah. Namun energi ikatan yang terbentuk antara EPMS (skor docking -3,9) dengan reseptor lebih rendah dibandingkan dengan difenhidramin dengan skor afinitasnya -4,9.