

Test of Activity of Antagonism of Ethyl p-methoxy cinnamate (*Kaempferia galangal L*) on H₁ Histamin Receptors : *In Silico* and *In Vitro* Studies on Isolated Guinea Pig Ileum Smooth Muscle

Siti Lathifah Ramdaniah¹, Puguh Novi Arsito²

**¹Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan,
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta**

**²Dosen Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu
Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta**

Abstract

Ethyl p-methoxy cinnamate (EPMC) is the second largest compound contained in *Kaempferia galangal L.*, which is 31.36%. EPMC is reported to have an anti-diarrhea effect. Histamine receptors also play a role in stimulating smooth muscle and widening permeability, giving rise to the effects of vomiting and diarrhea. The purpose of this study was to determine the administration of EPMC from *Kaempferia galangal L.* against H₁ histamine receptors and antagonism activity in isolated guinea pigs ileum and EPMC affinity values from the results of molecular docking.

The maceration method is used to obtain *Kaempferia galangal L* extract, EPMC. EPMC was identified using TLC with the mobile phase toluene : ethyl acetate (19: 1). Antagonism activity test using isolated guinea pig ileum organ in vitro. Use of EPMS doses of 100 and 200 µM. Data obtained in the form of percent contraction of ileum which is converted into pD₂ value. The pD₂ value was statistically analyzed using One-way ANOVA then continued with the LSD test with a confidence level of 95%. The in silico assay of EPMC compounds on the H₁ histamine receptor using AutoDock software.

EPMS shows the antagonism activity of the H₁ histamine receptor discussed by a decrease in the value of pD₂ which is less than the value of pD₂ when histamine agonists are induced. The pD₂ EPMS value of smooth muscle contractions induced by agonists at doses of 100 and 200 µM reduced the decrease significantly (p <0.05). The EPMS affinity value from the molecular docking results for the H₁ histamine receptor is -3.9

Keywords: ethyl p-methoxy cinnamate, in silico, in vitro, histamine H₁ receptors

**Uji Aktivitas Antagonisme Etil P-Metoksi sinamat (*Kaempferia Galangal L*)
Pada Reseptor Histamin H₁ Organ Ileum *Cavia Porcellus*
Terisolasi: Studi *In Vitro* Dan *In Silico***

Intisari

Etil p-metoksi sinamat (EPMS) merupakan senyawa terbesar kedua yang terkandung dalam kencur (*Kaempferia galangal L.*) yaitu sebanyak 31,36%. EPMS dilaporkan memiliki efek sebagai anti diare. Reseptor histamin juga berperan dalam merangsang otot polos dan melebarkan permeabilitas sehingga menimbulkan efek muntah dan diare. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pemberian EPMS dari *Kaempferia galangal L.* terhadap reseptor histamin H₁ dan aktivitas antagonisme pada ileum marmut terisolasi serta nilai afinitas EPMS dari hasil *docking molecular*.

Metode maserasi digunakan untuk mendapatkan ekstrak kencur yaitu EPMS. EPMS diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase gerak toluene:etil asetat (19:1). Uji aktivitas antagonisme menggunakan organ ileum marmut terisolasi secara *in vitro*. Penggunaan dosis EPMS sebesar 100 dan 200 µM. Data yang diperoleh berupa persen kontraksi ileum yang diubah menjadi nilai pD₂. Nilai pD₂ dianalisis secara statistik menggunakan *One-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan *test LSD* dengan taraf kepercayaan 95%. Uji *in silico* senyawa EPMS terhadap reseptor histamin H₁ menggunakan perangkat lunak *AutoDock*.

Hasil menunjukkan bahwa EPMS memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor histamin H₁ yang ditunjukkan oleh penurunan nilai pD₂ yang lebih kecil dari nilai pD₂ saat diinduksi agonis histamine. Nilai pD₂ EPMS terhadap kontraksi otot polos yang diinduksi agonis pada dosis 100 dan 200 µM mengalami penurunan secara signifikan ($p < 0,05$). Nilai afinitas EPMS dari hasil *molecular docking* terhadap reseptor histamin H₁ adalah sebesar -3,9.

Kata kunci : etil p-metoksi sinamat, *in silico*, *in vitro*, reseptor histamin H₁

1. Pendahuluan

Indonesia kaya akan tumbuhan, sebagian besar dari tumbuhan seringkali dijadikan bahan obat oleh nenek moyang zaman dulu. Penggunaan tanaman ini tidak hanya sebagai bahan masakan namun juga dijadikan sebagai obat tradisional. Tersedianya berbagai tanaman di Indonesia ini berpotensi dijadikan senyawa penuntun ataupun penemuan obat baru (Hamida, 2007). Kencur salah satu tanaman yang berasal dari India dan sudah banyak diteliti aktivitas farmakologinya sebagai anti-inflamasi (Umar, 2014), anti-diare (Fajeriyati, 2017), sedative-hipnotik (Nurmeilis, 2016).

Berdasarkan *Handbook of Herbs and Spices*, 2006 Kencur juga digunakan untuk pengobatan gigi dan mual-muntah. Senyawa yang terkandung dalam rimpang kencur yang dianalisis secara GC-MS antara lain etil sinamat 43,47%, etil p-metoksi sinamat 31,36%, penta dekanol 3,35%, borneol 3,35%, delta 3-karen 2,86%, β -pinen 2,47%, kamfen 2,22% (Gholib, 2009).

Percobaan menggunakan menggunakan organ terisolasi metode klasik dalam percobaan farmakologi untuk mengetahui hubungan antara dosis dan respon suatu senyawa obat. Organ-organ yang terisolasi mampu bertahan hidup selama beberapa jam jika ditempatkan dalam cairan fisiologis dengan media nutrisi yang tepat, mendapatkan oksigen yang cukup dan disimpan pada suhu yang tepat. Respons dari persiapan organ terisolasi untuk stimulus fisiologis atau farmakologis dapat ditentukan oleh alat perekam yang tepat.

Docking ditunjukkan untuk meniru interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji *in vitro* (Motiejunas, 2006)

Sejauh ini penelitian penggunaan senyawa EPMS sebagai antagonisme terhadap kontraksi otot polos marmut terisolasi yang diinduksi agonis reseptor histamin belum terdapat penelitian terkait.

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan kelompok uji dibagi menjadi 3 yaitu, kelompok uji agonis, uji antagonisme histamine menggunakan EPMS[<] dan uji pembanding menggunakan difenhidramin. Subjek penelitian menggunakan 15 ekor marmut jantan dengan berat 400-500 gram. Dengan variabel bebas konsentrasi dari agonis histamin, konsentrasi EPMS, dan konsentrasi difenhidramin. Variabel tergantung yaitu respon kontraksi organ otot polos ileum marmut.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini *set organ bath*, *rotary evaporator*, plat KLT silica gel 60 GF₂₅₄, mikropipet, labu takar, cawan porselen, komputer yang terinstal *software AutoDock Vina* dan *LabScribe2*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kencur, etanol 96%, n-heksan, aquades, etil asetat, dan toluene, standard EPMS, difenhidramin, agonis histamin.

Isolasi etil p-metoksi sinamat dari kencur

Serbuk rimpang kencur sebanyak 500 gram dimaserasi menggunakan pelarut etanol dengan perbandingan simplisia : pelarut (1:5). Kemudian diekstraksi dengan metode maserasi selama 7 hari dengan pengadukan setiap harinya. Filtrat dipisahkan menggunakan kertas saring kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰ C. Ekstrak kental didiamkan pada suhu ruangan hingga terbentuk kristal padat. Padatan kristal tersebut dicuci bertingkat menggunakan n-heksan hingga didapatkan kristal EPMS hablur putih.

Tingkat kemurnian dari kristal EPMS diuji dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam plat silica gel 60 GF₂₅₄ dengan fase gerak toluene : etil

asetat (19:1) (Farmakope Herbal, 2009). Spot kromatogram diamati dibawah sinar UV 254 nm kemudian spot kromatogram dibandingkan dengan standar EPMS.

Uji *In Vitro*

Aktivitas EPMS sebagai antagonisme reseptor histamine H₁ dievaluasi dengan cara mengobservasi perubahan dan pergantian pada kurva kontraksi otot polos ileum. Kontraksi otot polos ileum diinduksi dengan konsentrasi kumulatif dari agonis histamin dengan seri konsentrasi 2×10^{-8} hingga 2×10^{-2} M.

Organ bath diisi dengan larutan *buffer tyrode* sebanyak 20 mL kemudian organ ileum ditempatkan dalam *chamber* hingga tercapai kondisi stabil dari organ selama 30 menit. Kemudian, diberikan agonis histamine konsentrasi 2×10^{-2} M sebanyak 200 μ L sebagai pengenalan terhadap *organ bath* dan respon kontraksi tercatat. Setelah kontraksi mencapai kondisi datar dilakukan pencucian organ menggunakan *buffer tyrode* tiap 5 menit selama 30 menit. Setelah itu seri agonis histamin 2×10^{-8} hingga 2×10^{-2} M ditambahkan ke dalam *organ bath* untuk mendapatkan kontraksi maksimal. Dilakukan pencucian kembali dengan *buffer tyrode* tiap 5 menit selama 30 menit. Setelah dicuci, diberikan EPMS konsentrasi 2×10^{-2} M sebanyak 100 dan 200 μ L kemudian diinduksikan seri agonis histamin 2×10^{-8} hingga 2×10^{-2} M. Pencucian dilakukan kembali dan diberikan seri agonis histamin untuk melihat reversibilitasnya. Respon kontraksi yang tercatat antara sebelum dan setelah pemberian EPMS akan dibandingkan keduanya.

Analisis data *in vitro*

Dalam uji *in vitro*, data penelitian terkait kontraksi otot polos ileum. Data respon kontraksi tersebut diubah kedalam bentuk persen dari respon maksimum setelah pemberian agonis. Kemudian, persentase respon kontraksi diplot terhadap logaritma konsentrasi agonis. Nilai EC₅₀ merupakan konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50% dari reseptor berdasarkan kurva perbandingan persentase respon dengan logaritma konsentrasi agonis. Nilai EC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan 1 yang kemudian diubah menjadi nilai pD₂

dengan menggunakan persamaan 2. Data yang didapat berupa rata-rata pD2 agonis \pm SE. Nilai pD2 kemudian di uji statistik dengan metode *one-way ANOVA*.

$$\text{Log}EC_{50} = \left[\frac{50-Y_1}{Y_2-Y_1} \times (X_1 - X_2) \right] + X_1 \dots (1)$$

Keterangan :

X1 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat dibawah 50%

X2 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat diatas 50%

Y1 = % respon tepat dibawah 50%

Y2 = % respon tepat diatas 50%

$$pD2 = -\text{Log} EC_{50} \dots \dots (2)$$

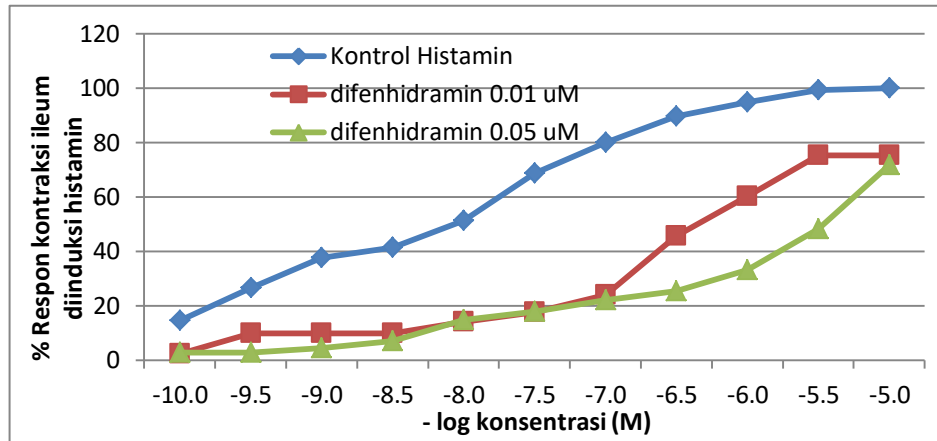
EPMS dikatakan sebagai antagonis reseptor histamine jika terjadi penurunan nilai pD2 dari agonis histamin yang disebabkan oleh EPMS.

Penentuan tipe dari antagonisme dilihat menggunakan analisis *Schild-plot*, dimana nilai slope mendekati 1 menunjukkan bahwa antagonisme tersebut bersifat kompetitif terhadap agonis.

Studi *in silico*

Penyiapan protein dengan mengunduh berkas protein di www.rcsb.org dengan kode reseptor histamin 3RZE. Protein tersebut dipreparasi menggunakan *DS Visualizer* untuk mendapatkan ligand.pdb dan reseptor.pdb. Kemudian dilakukan perubahan format dari PDB ke PDBQT untuk memudahkan simulasi docking protein. Simulasi *docking* menggunakan aplikasi *AutoDock Vina*, senyawa yang akan di docking dengan protein yaitu EPMS, 5EH (doksepin, *native ligand*), dan difenhidramin sebagai pembanding. Setelah proses docking selesai, terdapat 10 konformasi yang berikatan dengan reseptor histamine dengan energi yang berbeda. Sebagai evaluasi dan interpretasi dari docking, konformasi dengan energi terkecil yang terpilih sebagai ikatan yang terjadi antara ligand atau obat dengan reseptor. Uji *in silico* ini berfungsi untuk mengetahui tiruan interaksi suatu molekul atau ligan terhadap reseptor atau protein yang menjadi targetnya.

3. Hasil dan Pembahasan



Gambar 1. 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 pD_2 yang diperoleh dari $-\text{Log } EC_{50}$

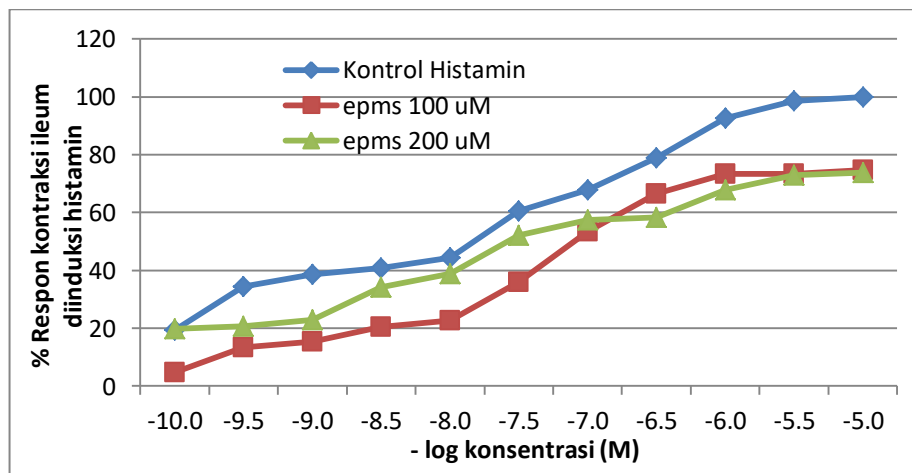
Tabel 1. Pergeseran nilai pD_2 karena pengaruh perlakuan difenhidramin 0.01 μM dan 0.05 μM

No	Kelompok perlakuan	pD_2	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 pD_2 dan Emaks disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM. Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) terhadap nilai pD_2 kontrol histamin, setelah diuji statistik dengan *one-way Anova*, dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil perlakuan uji difenhidramin dosis 100 dan 500 μM menunjukkan adanya efek relaksasi terhadap otot polos ileum marmut, ditandai dengan pergeseran kurva pD_2 ke bawah. Pergeseran kurva pD_2 kebawah menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian difenhidramin dosis 0.01 dan 0.05 μM , hal tersebut ditandai dengan menurunnya nilai pD_2 . Nilai rata-

rata pD2 berturut-turut yang dihasilkan adalah 8,07, 6,34, dan 5,46. Penurunan pD2 difenhidramin juga bermakna secara statistik dimana $p < 0.05$. Difenhidramin merupakan antagonis kompetitif berdasarkan nilai slope yang dihasilkan yaitu sebesar 1,2691x. Antagonis kompetitif merupakan antagonis yang bersaing secara kompetitif dalam menduduki reseptor histamin.



Gambar 2. 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

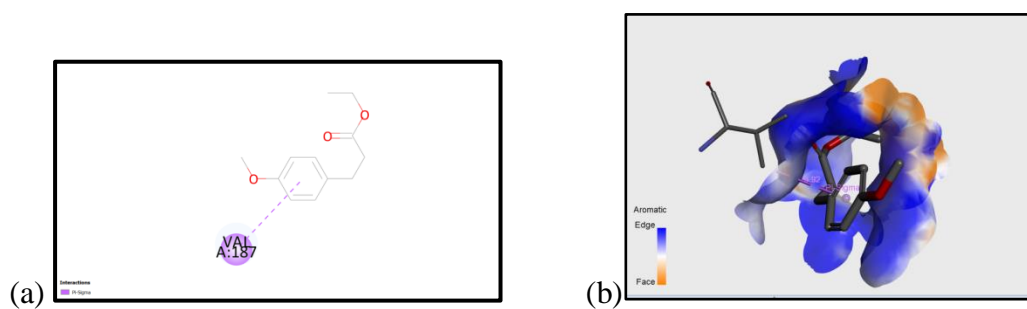
Tabel 2. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh perlakuan EPMS 100 dan 200 μM

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

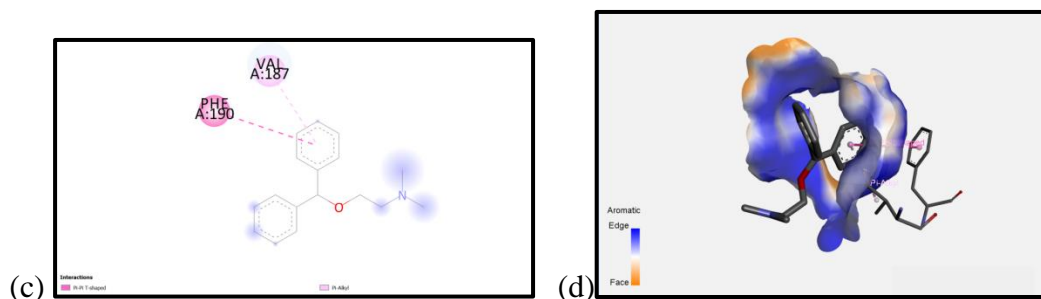
Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks (%) disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM. Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) terhadap nilai pD2 kontrol histamin, setelah diuji statistik dengan *one-way Anova*, dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

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. EPMS merupakan antagonis non-kompetitif dimana hal tersebut ditunjukkan dengan nilai slope pada metode *Schild-Plot* tidak mendekati satu (Kenakin, 1982).



Keterangan: (a) hasil visualisasi 2D EPMS terhadap reseptor histamin. Gambar menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta interaksinya. (b) hasil visualisasi 3D dari *molecular docking*



Keterangan: (c) hasil visualisasi 2D difenhidramin terhadap reseptor histamin. Gambar menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta interaksinya. (d) hasil visualisasi 3D dari *molecular docking* difenhidramin terhadap reseptor histamin

Untuk mengevaluasi kekuatan ikatan antara EPMS dengan reseptor histamin sebagai antagonis dilakukan *molecular docking* menggunakan *software* *AutoDockVina* dan *DSVisualizer*. Berdasarkan langkah validasi, nilai RMSD yang diperoleh 1.740 Å ($< 2,000$ Å) dengan nilai afinitas -4,6 (Tabel 3). Berdasarkan

hasil tersebut, protokol *docking* pada reseptor histamin telah valid dan dapat dilakukan penambatan pada ligan atau molekul lainnya.

Berdasarkan energi ikatan atau afinitas, energi ikatan antara reseptor histamin dengan EPMS memiliki energi ikatan yang lebih lemah dibanding dengan ligan asli maupun dengan difenhidramin sebagai pembandingnya yaitu -3,9.

Tabel 3. 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>

Pada gambar (a) ikatan yang terbentuk antara EPMS dengan reseptor histamine berada pada asam amino *Valine 187* dengan interaksi *phi-sigma*. Pada gambar (c) ikatan yang terbentuk antara difenhidramin dengan reseptor histamine juga berada pada asam amino *valine 187* dan *phenylalanine 190* dengan interaksi yang terjadi yaitu *pi-pi T shaped* dan *pi-alkyl*. Dapat dikatakan, asam amino yang berikatan dengan difenhidramin sebagai antagonis histamine H₁ juga berikatan dengan EPMS pada asam amino yang sama.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa aktivitas EPMS sebagai antagonisme non kompetitif terhadap reseptor histamine H₁. Pada uji *in silico*, diketahui EPMS berikatan dengan reseptor histamine pada asma amino *valine*

187 dan memiliki aktivitas yang sama seperti difenhidramin, meskipun demikian ikatan yang terjadi antara EPMS dengan reseptor histamine lebih rendah dibanding *native logand* dan difenhidramin dengan reseptor histamine.

Daftar pustaka

- Fajeriati N, Andika. Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal L*) Pada Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Eschericia Coli*. Journal of Current Pharmaceutical Sciences. Nov ; Vol. 1 No.1. ISSN : 2598-2095. (2017)
- Gholib, D. *Daya Hambat Ekstrak Kencur Terhadap Trichophyton Mentagrophytes dan Cryptococcus neoformans Jamur Penyebab Penyakit Kurap Pada Kulit dan Penyakit Paru*. Bul. Littro. Col. 20 no. 1, 59-67. (2009).
- Herbert, R. *Minyak Atsiri Rimpang Kencur Karakterisasi Simplisia, Isolasi dan Analisis Komponen Minyak Atsiri secara GC-MS*. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara. Medan. (2009).
- Nurmeilis, Azrifitria, Fitriani. N. *Pengujian Senyawa Etul p-metoksi sinamat Hasil Isolasi Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal L*) dan Derivat Amidasinya Sebagai Obat Penenang (Sedatif-Hipnotik)*. Disertasi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Jakarta. (2016)
- Umar.M , Asmawi. M, Sadikun A, A.M. Majid, F.S. Al-Suede, L.E. Hassan, R. Altf and M.B. Ahamed, *Ethyl-p-methoxycinnamate isolated from Kaempferia galanga inhibits inflammation by suppressing interleukin-1, tumor necrosis factor- α and angiogenesis by blocking endothelial functions*. See comment in PubMed Commons below Clinics (Sao Paulo), **69**, 134–144 (2014).
- Farmakoterapi herbal Indonesia. Edisi I. (2009).
- Kenakin, T. P. *The Schild regressiora in the process of receptor classification*. *Can. J. Physiol. Pharanacol.* 60: 249-265. (1982)