

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Validasi Metode *Docking* dengan Autodock Vina

Sebelum dilakukan proses seleksi ligan pada penelitian ini, terlebih dahulu dilakukan validasi dengan cara menambatkan ulang ligan asli (S58) pada reseptor asal (6COX). 6COX.pdb merupakan kompleks kode protein antara native ligand/ ligan asli dan enzim COX-2. Parameter yang digunakan yaitu RMSD (*Root Mean Square Deviation*), metode *docking* dikatakan valid jika memiliki nilai $RMSD \leq 2\text{\AA}$ (Ruswanto,2015).

Tabel 1. Hasil Validasi Ligan Asli terhadap Protein 6COX

Mode	Affinity (kcal/mol)	Dist from best mode	
		Rmsd l.b	Rmsd u.b
1	-8.5	0.000	0.000
2	-8.3	19.377	20.415
3	-8.2	3.918	5.433
4	-7.9	4.145	5.507
5	-7.7	19.361	20.300
6	-7.4	1.474	2.156
7	-7.3	2.565	3.558
8	-7.3	4.975	6.416
9	-7.3	1.161	1.807

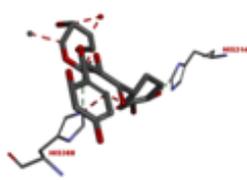
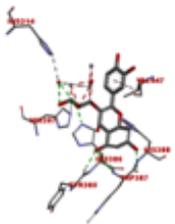
Nilai RMSD dihitung dari konformasi ligan-protein yang terbaik, dua tipe dari RMSD yaitu RMSD l.b (lower bound) dan RMSD u.b (upper bound). RMSD u.b menjelaskan perbedaan nilai dari jarak antara setiap atom pada satu konformasi dengan konformasi yang lainnya, sedangkan RMSD l.b dapat didefinisikan sebagai $RMSD/lb(c1,c2) = \max((rmsd'(c1,c2), rmsd'(c2, c1))$. Diketahui bahwa RMSD' menjelaskan

nilai jarak atom pada satu konformasi dengan atom terdekat yang memiliki tipe yang sama dengan atom tersebut pada konformasi lain (Ferencz & Muntean, 2015).

Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal (Dany *et al.*, 2013). Hasil validasi antara ligan asli yaitu S58 (*1-phenylsulfonamide-3 trifluoromethyl-5-parabromophenylpyrazole*) dengan protein 6COX pada konformasi ke-9 didapatkan nilai RMSD sebesar 1.161 Å dengan energi sebanyak -7.3 kcal/mol yang menandakan bahwa secara teori, ligan dan protein yang divalidasi telah memenuhi kriteria valid.

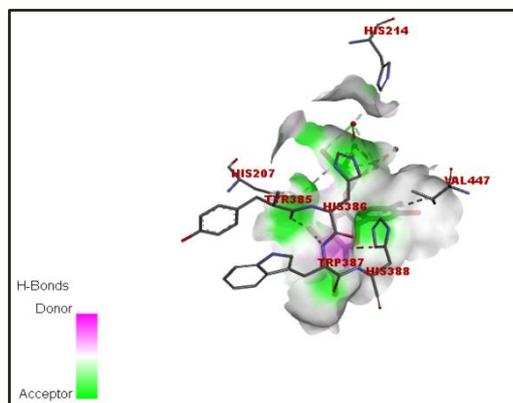
B. Hasil Uji *In Silico* Senyawa Penanda Daun Salam (Kuersitrin) dengan Senyawa Pembanding dan *Native Ligand* Protein 6COX dengan Metode *Molekular Docking Autodock Vina*

Tabel 2. Energi Interaksi Ikatan Ligan dan Protein

Ligan	Energi (kkl/mol)	RMSD (Å)	Residu Protein	Interaksi ikatan
Ligan Asli <i>S58(Native Ligand)</i>	-7.3	1.161	Arg61, Thr62, Arg44, Asn43, Lys468,Lys79	
Ligan Pembanding g (<i>Natrium Diklofenak</i>)	-7.6	1.995	His388, His214	
Kuersitrin (<i>Syzygium polyanthum</i>)	-8.6	1.252	His214, His207, Val447, His386, His388, Trp387, Tyr385	

Hasil dari proses *docking* yaitu prediksi aktivitas interaksi ligan dengan reseptornya berupa nilai energi ikatan antara ligan-reseptor. Menurut teori energi Gibbs apabila semakin kecil energi yang dihasilkan dari ikatan suatu ligan dengan reseptornya maka semakin stabil ikatan antara ligan dan reseptor tersebut. Dari tabel 2 dapat diketahui hasil dari uji *in silico* aktivitas senyawa penanda daun salam yaitu kuersitrin dengan senyawa pembanding dan *native ligand* (S58) protein 6COX memprediksikan bahwa ligan yang lebih stabil terhadap protein 6COX adalah kuersitrin dari daun salam dengan nilai energi ikatan yaitu -8,6

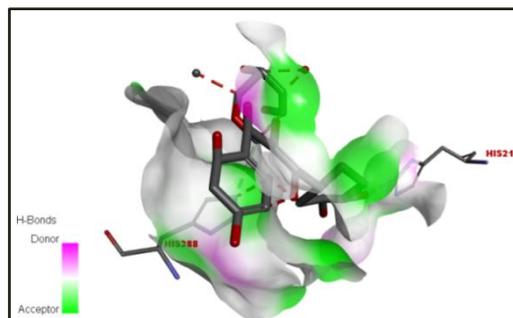
kkal/mol. Posisi kuersitrin ketika berikatan dengan protein 6COX dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Posisi Kuersitrin ketika terikat dengan protein 6COX

Kuersitrin diduga memiliki efek inhibisi inflamasi akut (Taguchi *et al*, 1993) juga diketahui kuersitrin dapat melepaskan kuersetin dalam mekanismenya sebagai antiinflamasi melalui inhibisi jalur NFkB (Monica *et al*, 2005).

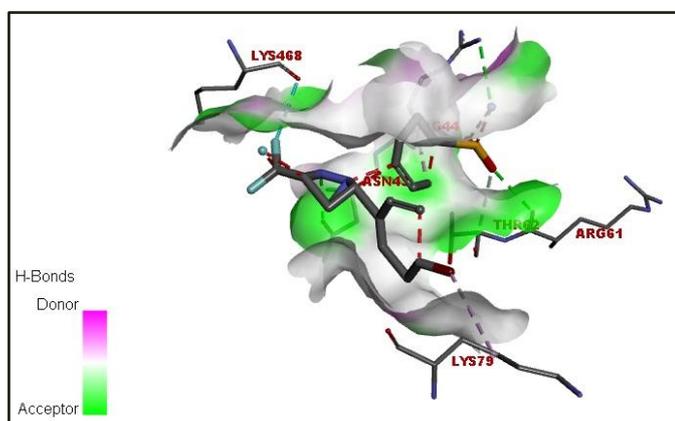
Natrium diklofenak merupakan AINS yang tidak selektif dikarenakan menghambat COX-1 dan COX-2. Pada hasil uji *in silico* yang telah dilakukan, diprediksi energi ikatan natrium diklofenak terhadap COX-2 sebesar -7.6 kkal/mol (gambar 4).



Gambar 4. Posisi Natrium Diklofenak ketika terikat dengan protein 6COX

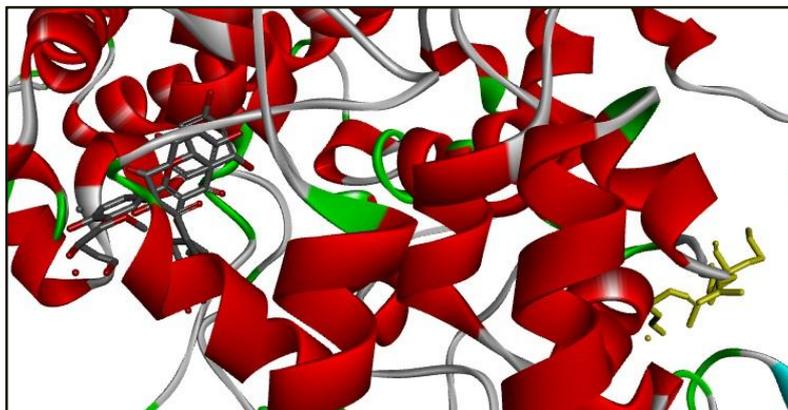
Ligan asli (*native ligand*) diketahui berikatan dengan enzim COX-2 melalui residu asam amino Arg61, Thr62, Arg44, Asn43, Lys468, Lys79

sedangkan natrium diklofenak berikatan dengan residu His388, His214 dan kuersitrin berikatan dengan residu His214, His207, Val447, His386, His388, Trp387, Tyr385 (Tabel 2). Sehingga dapat diketahui bahwa aktivitas kuersitrin sebagai penghambat inflamasi terhadap protein 6COX dapat diprediksi melalui residu asam amino penting yang sama pada kantung ikatan His388 dan His214 sebagaimana ikatan antara protein 6COX dengan natrium diklofenak.



Gambar 5. Posisi Ligan Asli ketika terikat pada protein 6COX

Dibandingkan dengan ligan asli (*native ligand*), energi ikatan natrium diklofenak dan kuersitrin masih lebih rendah, hal tersebut dapat memprediksikan bahwa kompleks antara protein dengan kuersitrin dan natrium diklofenak merupakan kompleks yang lebih stabil sehingga kuersitrin sebagai senyawa identitas dalam daun salam diprediksi memiliki potensi aktivitas yang mirip dengan senyawa pembandingnya yaitu natrium diklofenak namun jika dilihat dari jumlah nilai energi ikatan dari kuersitrin yang lebih kecil dibandingkan natrium diklofenak dapat diprediksi kuersitrin memiliki aktivitas lebih potensial sebagai inhibitor enzim siklooksigenase-2 dibandingkan dengan natrium diklofenak sebagai antiinflamasi secara *in silico* (gambar 6).



Gambar 6. Visualisasi overlay antara ligan asli, kuersitrin dan natrium diklofenak.
Keterangan: ligan asli divisualisasikan dengan warna kuning

C. Hasil Uji *In Vivo* Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum wight*)

Pengujian *in vivo* pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah hasil dari uji *in silico* dapat dibuktikan secara nyata dengan melakukan pengukuran volume udem terhadap kaki tikus yang diberi karagenan secara sublantar sebagai agen induksi iritan.

Berdasarkan data hasil pengukuran volume udem pada setiap perlakuan (lampiran 1) dapat dihitung persen radang tiap interval waktu untuk mengetahui peningkatan radang pada telapak kaki tikus di setiap pengukuran. Rumus Perhitungan Persen Radang dan AUC yaitu sebagai berikut:

Dalam Utami (2011) persentase radang tiap interval waktu ditentukan dengan persamaan1 berikut (Mansjoer,1997):

$$\% \text{radang} = \frac{U_t - U_0}{U_0} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

U_t = Volume telapak kaki tikus pada waktu t

U_0 = Volume telapak kaki tikus pada waktu ke 0

Setelah diperoleh kurva persen radang terhadap waktu, kemudian dihitung AUC (*Area Under Curve*)₀₋₃₆₀ setiap individu dengan persamaan 2:

$$AUC = \frac{R_{t-1} + R_t}{2} \times (t_t - t_{t-1}) \quad (2)$$

Keterangan:

R_{t-1} = persen radang pada waktu t-1

R_t = persen radang pada waktu ke-t

Dari harga AUC₀₋₃₆₀ pada masing - masing kelompok dapat dihitung nilai persen daya antiinflamasi dengan persamaan 3 (Hidayati, 2008):

$$\% \text{Daya Anti inflamasi} = \frac{(AUC_k - AUC_p)}{AUC_k} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

AUC_k = luas daerah dibawah kurva persentase radang terhadap waktu kelompok kontrol

AUC_p = luas daerah di bawah kurva persentase radang terhadap waktu kelompok perlakuan rata – rata

Setelah dilakukan perhitungan dengan rumus tersebut, untuk mengetahui perbedaan persen radang pada setiap perlakuan digunakan uji statistik (*One Way*) ANOVA. Uji (*One Way*) ANOVA memiliki kriteria yaitu data yang diuji harus independen, terdistribusi normal dan homogen.

Hasil dari uji normalitas data menunjukkan bahwa data persen radang pada setiap kelompok pengukuran terdistribusi normal dan homogen (lampiran 3). Data yang normal dan homogen kemudian dilakukan uji selanjutnya menggunakan uji (*One Way*) ANOVA.

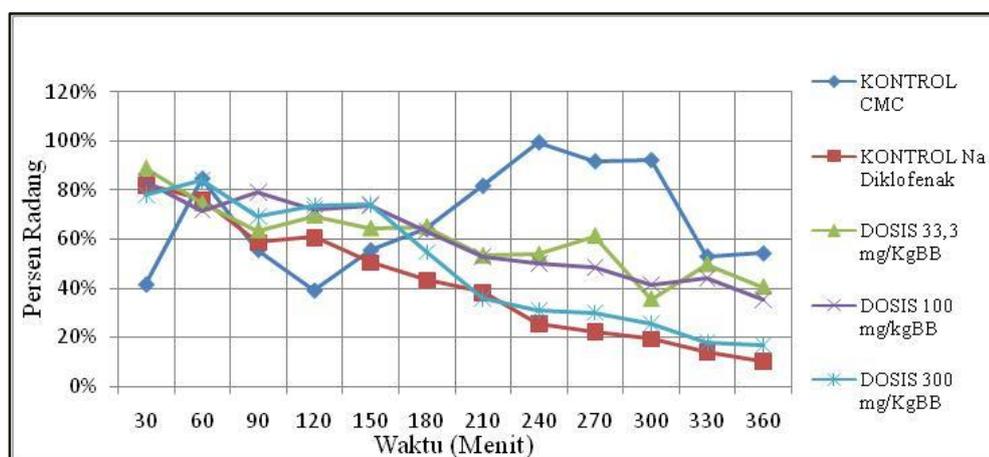
Hasil uji statistik (*One Way*) ANOVA (lampiran 4) pada menit ke 30 hingga menit ke 360 terjadi perbedaan terhadap persen radang telapak kaki tikus yang bermakna antar kelompok dengan nilai *Sig* 0,03 atau ($p < 0,05$) atau pada tingkat kepercayaan 95%. Untuk mengetahui kelompok yang memiliki persamaan atau perbedaan efek dari yang paling kecil ataupun yang paling besar antar kelompok yaitu digunakan uji LSD (Oktiwilianti *et al.*, 2015).

Hasil Uji LSD (lampiran 5) memperlihatkan bahwa persen radang antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif berbeda signifikan ($0,003 < 0,05$). Sedangkan pada kelompok kontrol negatif dibandingkan dengan perlakuan dosis ekstrak 33,3 mg/KgBB dan dosis 100 mg/KgBB tidak berbeda signifikan yaitu ($p > 0,05$) namun pada dosis 300 mg/KgBB memiliki beda signifikan yaitu ($0,032 < 0,05$), hal ini menunjukkan bahwa persen radang antara kontrol positif atau natrium diklofenak dengan dosis 50 mg tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan pemberian dosis ekstrak daun salam 300 mg/KgBB ($0,395 > 0,05$).

Hasil uji (*One Way*) ANOVA untuk rerata AUC dengan tingkat kepercayaan ($P < 0,05$) pada menit ke 30 hingga menit ke 360 (lampiran 9) memiliki hasil berbeda pada tiap kelompok perlakuan yaitu *Sig* ($0,029 < 0,05$). Dijelaskan pada uji LSD untuk nilai AUC pada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan ($0,003 < 0,05$) sedangkan untuk kelompok kontrol positif dengan perlakuan pemberian ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) kelompok perlakuan dosis 33,3 mg/KgBB dan dosis 100 mg/KgBB memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) namun untuk perlakuan

ekstrak daun salam dosis 300 mg/KgBB tidak berbeda signifikan ($0,372 > 0,05$). Sehingga dapat diketahui pada pemberian ekstrak daun salam dosis 300 mg/KgBB memiliki AUC yang tidak berbeda atau mirip dengan kontrol positifnya yaitu pemberian natrium diklofenak 50 mg.

Dari hasil uji tersebut dapat diketahui bahwa penambahan dosis ekstrak daun salam memiliki efek yang berbeda, untuk pemberiandosis ekstrak daun salam sebanyak 300 mg/kgBB memiliki efek yang tidak berbeda signifikan dengan kontrol positifnya sehingga ekstrak daun salam 300 mg/KgBB dianggap cukup untuk menurunkan radang akut yang diinduksi oleh karagenan pada tikus jantan galur wistar.



Gambar 7. Grafik Persen Radang berdasarkan Perlakuan Perkelompok Uji

Dapat dilihat pada gambar 7 bahwa pada kelompok kontrol negatif, injeksi karagenan secara subkutan menghasilkan edema lokal yang meningkat pada menit ke 30 dan terus meningkat pada menit ke 360, hal ini disebabkan pada kelompok perlakuan kontrol negatif tidak dilakukan pemberian agen antiinflamasi.

Persentase radang pada kelompok kontrol positif terus meningkat sampai dengan menit ke 60, kemudian menurun dengan perlahan sampai pada menit

terakhir pengamatan. Persentase radang pada kelompok kontrol positif lebih kecil dibandingkan dengan kelompok negatif karena AINS seperti natrium diklofenak diketahui dapat menekan respon pada fase akhir yaitu fase PG, yang dapat menekan migrasi leukosit mononuklear ke jaringan yang mengalami peradangan (Hidayatiet *al.*, 2008)

Persen radang kelompok perlakuan dosis 300 mg/KgBB secara statistik tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, persen radang terus meningkat hingga menit ke 150 dan mengalami penurunan perlahan hingga menit akhir pengamatan (gambar 7).

Tabel 3. Harga AUC dan Persen Daya Antiinflamasi tiap Perlakuan

Kelompok	Harga AUC (ml/jam) ($\bar{x} \pm SE$)	% Daya Antiinflamasi
Kontrol Negatif	19,65 \pm 1,49	0%
Kontrol Positif	12,41 \pm 1,10	37%
Ekstrak Daun Salam 33,3 mg/KgBB	17,50 \pm 1,29	10,9%
Ekstrak Daun Salam 100 mg/KgBB	17,49 \pm 1,60	11,0%
Ekstrak Daun Salam 300 mg/KgBB	14,53 \pm 1,55	26%

Nilai AUC (*Area Under Curve*) dapat digunakan untuk mengetahui informasi potensi aktivitas kuersitrin dalam daun salam untuk menurunkan edema. Apabila AUC semakin besar maka efek penurunan volume edema menjadi semakin kecil begitu juga sebaliknya yaitu apabila AUC semakin kecil maka efek penurunan volume edema menjadi semakin besar (Wenny, 2008).

Diketahui bahwa AUC pemberian ekstrak daun salam dosis 300 mg/Kg BB secara statistik melalui uji LSD tidak berbeda signifikan dari perlakuan

kontrol positif (tabel 3) sehingga dapat diketahui bahwa penurunan volume edema pada pemberian ekstrak daun salam dapat dikatakan setara dengan pemberian perlakuan kontrol positif yaitu natrium diklofenak 50 mg.

Persen daya antiinflamasi kelompok kontrol positif memiliki persen daya antiinflamasi sebesar 37% lebih besar dibandingkan kelompok ekstrak dosis 33,3 mg/KgBB dan dosis 100 mg/Kg BB yaitu sebesar 11% (tabel 3) namun untuk perlakuan ekstrak dosis 300 mg/kgBB tidak berbeda signifikan dengan kontrol positifnya sehingga daya antiinflamasi yang dimiliki oleh kuersitrin sebagai penanda dalam daun salam (*Syzygium polyanthum wight*) dapat dikatakan berpotensi sebagai antiinflamasi.