

**UJI AKTIVITAS ANTAGONISME ETIL P-METOKSISINAMAT SENYAWAAKTIF
KENCUR (*Kaempferia galanga L*) TERHADAP RESEPTOR ASETILKOLIN
MUSKARINIK 3 PADA ORGAN ILEUM *Cavia porcellus* TERISOLASI: STUDI IN
VITRO DAN IN SILICO**

INTISARI

Etil p-metoksi sinamat (EPMS) merupakan senyawa terbesar kedua yang terdapat di tanaman kencur (*Kaempferia galanga L.*) yaitu sebanyak 31,36 %. EPMS telah dilaporkan memiliki efek anti diare dan antiinflamasi. Tujuan penelitian ini adalah penggunaan EPMS sebagai antagonisme terhadap reseptor asetilkolin muskarinik 3 (Ach M₃) yang menyebabkan terjadinya kontraksi otot polos pada *ileum*.

Macerasi digunakan untuk mendapatkan EPMS dari ekstraksi kencur. EPMS diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase gerak toluene etil:asetat(19:1). Uji aktivitas antagonisme ileum terhadap asetilkolin menggunakan organ ileum marmut terisolasi secara *in vitro* dengan dosis EPMS 100µM dan 200 µM. Hasil yang diperoleh akan dianalisa menjadi nilai pD2 dan hasil analisa akan di hitung secara statistik menggunakan One Way ANOVA serta dilakukan tes LSD dengan tingkat kepercayaan 95%. Perangkat AutoDock digunakan sebagai uji *in silico* terhadap reseptor Ach M₃.

Hasil menunjukkan bahwa EPMS 100µM dan 200µM mampu menghambat Ach M₃ ditunjukkan dengan hambatan pergeseran kurva kontraksi *ileum* marmut terhadap agonis asetilkolin. Nilai pD2 yang ditampilkan EPMS dosis 100 µM menghasilkan nilai sebesar 7.12 sedangkan dosis 200 µM menghasilkan nilai sebesar 6.98, bergeser secara signifikan ($p < 0.5$) terhadap pD2 agonis asetilkolin dengan nilai sebesar 8.16. Nilai afinitas menunjukkan angka -5.2.

Kata kunci: etil p-metoksi sinamat, Ach M₃, *in vitro*, *in silico*

ABSTRACT

Etil p-metoxycynamate (EPMC) is the second largest compound in *Kaempferia galanga L.* It contains about 31,36% of the EPMC. EPMC has been reported to have anti-diarrhea and anti-inflammatory effects. The purpose of this research is the use of EPMC as an antagonism by inhibiting a muscarinic acetylcholine 3 receptor (Ach M₃) which causes smooth muscle contraction at ileum.

Maceration is used to obtain an EPMC extract from *Kaempferia galanga L.* EPMC are identified using Thin Layer Chromatography with the motion phase toluene ethyl : acetate (19:1). The activity of ileum antagonism against acetylcholine test using ileum of hamster isolated *in vitro* with a dose of EPMC 100 µM and 200 µM. The results obtained will be processed into the value of pD2 and analyzed statistically using One Way ANOVA and carried out to LSD test using trusted level 95%. The AutoDock device is used as a test *In Silico* against the Ach M₃ receptor.

Final results showed that EPMC 100 µM and 200 µM were able to inject the Ach M₃ indicated by shifting barriers of hamster ileum contraction curves against the acetylcholine agonist. The pD2 value displayed EPMC 100 µM is 7,1 and 200 µM is 6,98 shifted significantly ($p < 0,5$) against pD2 acetylcholine agonists is 8,16. The value of affinity shows the number -5,2.

Keywords: ethyl p-Metoxy Cynamate, Ach M3, *in vitro*, *in silico*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil rempah-rempah terbesar di dunia. Kekayaan alam yang luar biasa membuat rempah-rempah yang ada di Indonesia memiliki jumlah yang sangat melimpah. Pada abad 16 hingga abad 17, wilayah Indonesia khususnya daerah Maluku diperebutkan oleh bangsa Portugis dan Spanyol. Hal ini disebabkan banyaknya rempah-rempah yang ada di daerah tersebut. Manfaat yang didapatkan dari olahan rempah-rempah sangat banyak. Hasil olahan akan digunakan untuk menunjang kesehatan manusia, namun saat itu olahan rempah hanya dijadikan sebagai bahan minuman yang sederhana.

Salah satu rempah-rempah yang ada di Indonesia adalah kencur. Kencur (*Kaempferia galanga* Linn) merupakan tanaman obat famili Zingiberaceae. Salah satu jenis *Kaempferia* ini merupakan tumbuhan tropis yang tersebar di Indonesia. Tidak hanya tumbuh sebagai tumbuhan liar, tetapi tumbuhan ini juga banyak dibudidayakan oleh petani. Bagian tumbuhan ini yang sering digunakan yaitu bagian akar atau yang sering disebut rhizoma (Soeprapto, 1986).

Senyawa yang terkandung dalam kencur antara lain etil sinamat, Ethyl p-methoxycinnamate, p-metoksistiren, kamfen, dan borneol. Diantara kandungan kimia ini, etil p-metoksisinamat merupakan komponen utama yang terdapat dalam kencur (Afriastini, 1990). Herbert (2009) mengemukakan komponen minyak atsiri dari simplisia kencur yang dianalisis secara GC-MS antara lain etil sinamat 43,47%, Ethyl p-methoxycinnamate 31,36%, penta dekan 3,35%, borneol 3,35%, delta 3-karen 2,86%, α -pinen 2,47%, kamfen 2,22%.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah minyak atsiri dari kencur yaitu Ethyl p-metoxhy cinnamate memiliki aktivitas sebagai anti-spasmodik terhadap kontraksi dan relaksasi otot polos ileum. Efek EPMS sebagai anti-spasmodik

dapat dilihat berdasarkan selektifitasnya terhadap reseptor yang diduduki oleh asetilkolin.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2019.

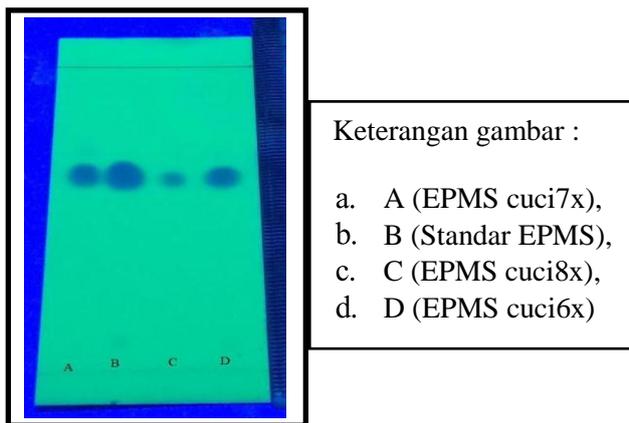
1. Kelompok ileum uji agonis asetilkolin
 - a. Kelompok uji seri kadar asetilkolin dimulai dari konsentrasi 2×10^{-2} M hingga 2×10^{-8} M.
2. Kelompok ileum uji antagonis asetilkolin
 - a. Kelompok uji seri kadar asetilkolin.
 - b. Kelompok perlakuan (EPMS + seri kadar asetilkolin)
3. Kelompok ileum uji pembanding (kontrol positif)
 - a. Kelompok uji seri kadar asetilkolin.
 - b. Kelompok perlakuan (atropin + seri kadar asetilkolin)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kristal EPMS didapatkan dari hasil proses ekstraksi simplisia kencur. Metode yang digunakan dalam pengambilan ekstrak adalah metode maserasi. Metode maserasi umum digunakan dan proses ekstraksi tergolong mudah. Mekanisme metode maserasi ialah pelarut organik sebagai penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel melalui rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam penyari di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi ke luar sel. Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi adalah pelarut alkohol 96%. Proses ini dilakukan selama 7 hari dengan pengadukan setiap hari.

Uji identifikasi EPMS dengan metode KLT pada Kencur

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 (A) cuci 7x sebesar 0,68, EPMS (B) sebesar 0,68, EPMS (C) cuci 6x sebesar 0,68 dan EPMS (D) cuci 8x sebesar 0,68. Nilai Rf adalah factor retensi yang digunakan dalam identifikasi senyawa organic. Nilai Rf dihitung dengan mengukur jarak relative yang ditempuh oleh senyawa EPMS sehubungan dengan fase gerak.



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 dengan hasil perbandingan menunjukkan pada posisi spot yang mirip sama.

Uji In Vitro dengan metode Organ Bath

Larutan *buffer tyrode* terdiri dari dua macam larutan yaitu larutan A 100 ml dan larutan B 100 ml. Larutan A terdiri dari

natrium klorida, kalium klorida, magnesium klorida, kalsium klorida, dan monosodium fosfat yang telah ditimbang sesuai ukuran, dicampur dalam labu takar, dan dilarutkan menggunakan *aquades* hingga 1 L . Larutan B terdiri dari natrium bikarbonat yang telah ditimbang dan dilarutkan dalam 1L *aquades*. Kemudian untuk membuat larutan *buffer tyrode* larutan diambil masing- masing 100 ml dan ditambahkan glukosa sebanyak 1,00 gr selanjutnya dilarutkan dalam *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.

Set alat Organ bath yang disiapkan telah terhubung dengan perangkat komputer yang memiliki software LabScribe2, organ *bath*, transducer isotonic dan *bridge amplifier*. Organ bath terisi oleh larutan *aquades* sesuai batas tampungan dan dihangatkan hingga suhu 37°C. *Aquades* digunakan sebagai mediator untuk mempertahankan suhu sesuai yang diinginkan.

Organ ileum diambil dari marmut jantan dengan bobot kisaran 350-500 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, atropin dan EPMS yang akan diinduksikan. Setelah dilakukan pembersihan dilakukan pengikatan dikedua ujung ileum secara bersilangan menggunakan benang tipis yang telah dibersihkan. Kemudian ileum dimasukan

kedalam chamber 20 ml berisi larutan buffer tyrode , dengan posisi tergantung benang bagian atas dan bawah. Bagian atas dikaitkan dengan detector dan bagian bawah sebagai penahan. Ileum dibiarkan terendam seluruhnya oleh *buffer* dalam *chamber*.

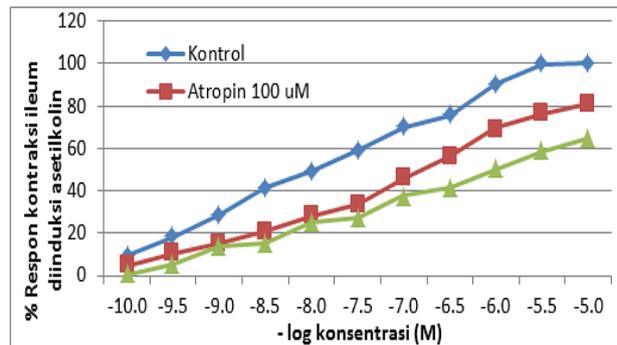
EPMS merupakan senyawa yang terdapat didalam *Kaempferia galanga L* yang belum secara spesifik diteliti sebagai anti mual muntah pada ileum. EPMS sendiri telah diteliti memiliki efek sebagai sedative-hipnotik dibandingkan dengan kontrol diazepam (Nurmeilis, 2016)

Syaraf utama yang mengatur sistem pencernaan adalah syaraf parasimpatis. Semua aktivitas rangsangan syaraf parasimpatis berawal dari aktivasi reseptor muskarinik yang terdapat di otot polos, sedangkan ileum terdiri dari kumpulan otot polos sehingga asetilkolin merupakan neurotransmitter utama syaraf parasimpatis yang mengatur system pencernaan (Wessler dan Kirkpatrick, 2001).

Reseptor Asetilkolin terdapat pada otot polos, endotelium dan otak. Atropin merupakan prototipe antagonis dari asetilkolin. Atropine merupakan golongan antikolinergik yang bekerja pada reseptor muskarinik sebagai antimuskarinik. Atropine menghambat proses kontraksi oleh asetilkolin melalui reseptor muskarinik. Hambatan bersifat reversible dan dapat kembali dengan pemberian asetilkolinesterase. Pada saluran cerna asetilkolin menghambat *peristaltic* lambung dan usus.

Uji perbandingan dilakukan menggunakan atropin dengan metode yang sama saat perlakuan menggunakan EPMS. Atropine diketahui memiliki efek anti mabuk perjalanan dan digunakan juga

sebagai penghambat (*used for management*) dari obat- obat kemoterapi yang menginduksi terjadinya mual dan muntah.



Gambar 2. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap% respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan atropin 0.01 dan 0.02 M.

Tabel 1. Kenaikan EC₅₀ akibat perlakuan atropine

No.	Kelompok Perlakuan	EC ₅₀ (M)
1	Kontrol Atropin	3.92 ± 1.35 x 10 ⁻⁸
2	Atropin 0.01 µM	1.66 ± 3.10 x 10 ⁻⁷
3	Atropin 0.02 µM	7.25 ± 1.56 x 10 ⁻⁶

Hasil perlakuan uji atropin dosis 100 µL dan 200 µL menunjukkan adanya efek relaksasi terhadap otot polos ileum marmut, ditandai dengan pergeseran kurva pD₂ ke bawah. Pergeseran kurva pD₂ ke bawah menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian atropin dosis 0.01 µM dan 0.02 µM, hal tersebut ditandai dengan menurunnya nilai pD₂. Nilai rata-rata pD₂ berturut-turut yang dihasilkan adalah 8,02, 6,78, dan 6,08 (Tabel 4). Penurunan pD₂ atropin juga bermakna secara statistik dimana p<0.05.

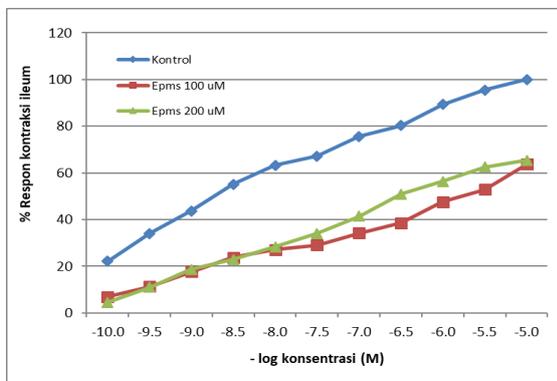
Tabel 2. Pergeseran nilai pD₂ karena pengaruh perlakuan atropin 0.01 µM dan 0.02µM

No	Kelompok perlakuan	pD ₂	Emaks (%)
1	Kontrol atropin	8.02 ± 0.12	100 ± 0.00
2	Atropin 0.01µM	6.78 ± 0.17	75.36 ± 6.88
3	Atropin 0.02µM	6.08 ± 0.20	71.86 ± 5.14

No.	Kelompok Perlakuan	EC ₅₀ (M)
1	Kontrol Asetilkolin	3.29 ± 1.14 x 10 ⁻⁹
2	EPMS 100µM	2.60 ± 9.99 x 10 ⁻⁶
3	EPMS 200 µM	4.55 ± 1.87 x 10 ⁻⁷

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

Pengaruh aktivitas EPMS terhadap reseptor asetilkolin M3 diuji dengan mengamati perubahan profil kurva seri kadar agonis yaitu asetilkolin dengan % kontraksi otot polos ileum yang terisolasi dalam larutan *buffer tyrode*. EPMS menunjukkan efekvasorelaksasi dengan cara menghambat kontraksi tonik yang diinduksi oleh Ca⁺ pada reseptor asetilkolin muskarinik 3 (ACH M₃) (Othman dkk., 2002).



Gambar 3. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan EPMS 100 µM dan 200 µM.

Berdasarkan kurva tersebut dapat dihitung nilai EC50. Nilai EC50 adalah konsentrasi dari agonis yang dapat memberikan respon kontraksi 50%. Nilai EC50 selanjutnya diubah menjadi nilai pD2 yang diperoleh dari -Log EC50.

Tabel 3. Kenaikan EC₅₀ akibat perlakuan EPMS

Keterangan : Nilai EC₅₀ disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM

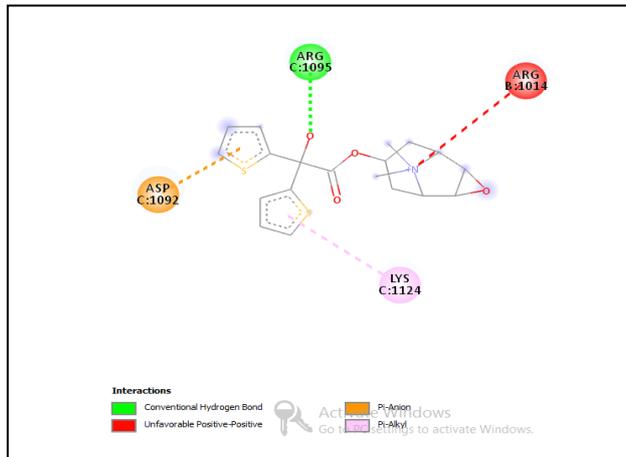
Tabel 6. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh perlakuan EPMS 100 dan 200 µM

No.	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol asetilkolin	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 ± SEM. Ada perbedaan bermakna (p >0.05) terhadap nilai pD2 kontrol asetilkolin, setelah diuji statistik dengan *one-way Anova*, dilanjutkan dengan uji LSD dengan tingkat kepercayaan 95%.

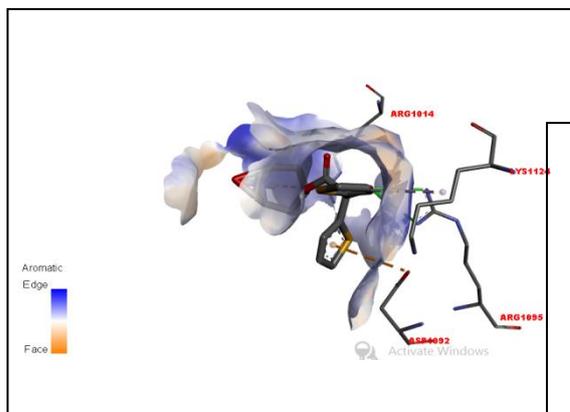
Validasi protokol *docking* dilakukan untuk membuktikan jika penelitian yang dilakukan valid. Pada direktori target-virtual dilakukan preparasi ligan pembanding untuk dilakukan *re-dock* (ligan pembanding dengan konformasi yang memiliki energi terendah). Validasi ini dilihat dari nilai *Root Mean Square Distance* (RMSD). Perhitungan RMSD dilakukan konversi file baik ligan pembanding dalam geometri aslinya dari mol2 ke pdb, setelah itu dikonversi hasil docking dari mol2 ke pdb, dilakukan perhitungan RMSD pada target virtual_0001 sampai target virtual_1000. Setelah langkah ini selesai, dari 1000 pengulangan tersebut dipilih protocol dengan nilai RMSD yang paling optimal. Sebuah protokol diterima bila RMSD *heavy atoms* hasil *docking* dibandingkan dengan referensinya menunjukkan hasil dibawah 2,000 Å. Hasil RMSD yang menunjukkan angka 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

tiotropium dengan nilai RMSD 1,769 Å (<2,000 Å) dengan nilai afinitasnya -5,9, sehingga dapat diketahui bahwa protokol *docking* yang dilakukan valid.



Gambar 4. Hasil Visualisasi 2D tiotropium dengan reseptor Asetilkolin.

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

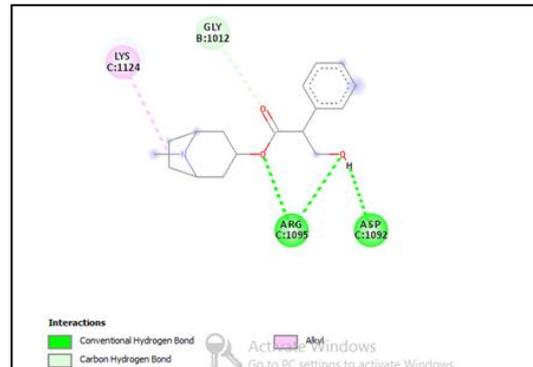


Gambar 5. Hasil visualisasi 3D tiotropium dengan reseptor Asetilkolin.

Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

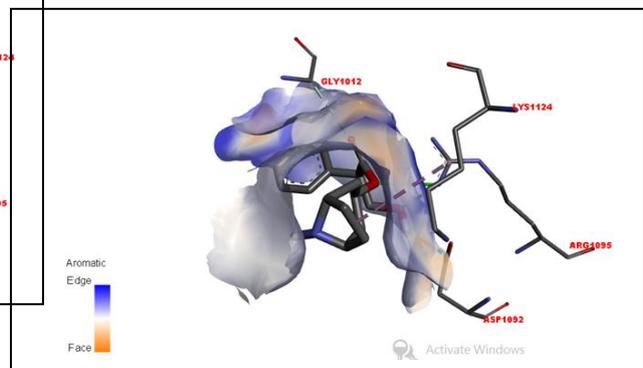
Aktivitas EPMS terhadap reseptor asetilkolin dapat diteliti melalui uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. Aplikasi yang digunakan adalah AutoDockTools, DS Visualizer16 dan OpenBabel. Protein yang digunakan ialah *native ligan* dari ACH M3 yaitu Tiotropium. Tiotropium adalah senyawa yang berperan spesifik terhadap

muskarinik. Tiotropium bekerja pada reseptor yaitu di dalam reseptor Asetilkolin Muskarinik 3 (Ach M₃). Fungsi utama dari Tiotropium sebagai *vasorelaxant* pada otot polos, sehingga tiotropium menyebabkan relaksasi otot polos. Hal inilah yang menjadikan tiotropium sebagai *native ligan* pada reseptor Ach M₃ (Beeh, 2003)



Gambar 6. Hasil Visualisasi 2D atropin dengan reseptor Ach M3.

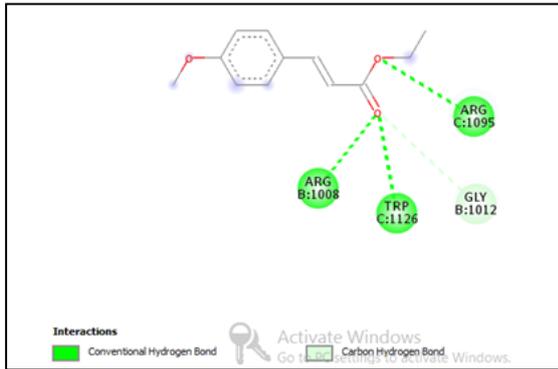
Gambar diatas menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.



Gambar 7. Hasil Visualiasi 3D atropin dengan reseptor Ach M3.

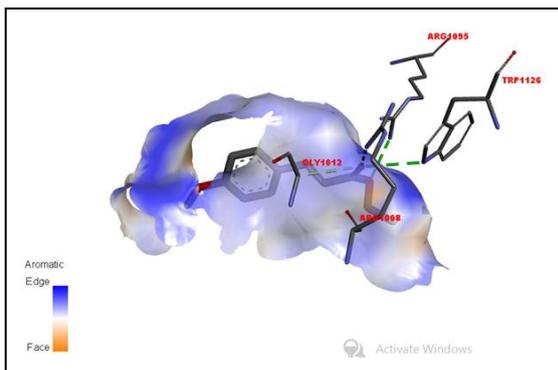
Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

Atropin merupakan antiasetilkolin yang selektif terhadap muskarinik. Fungsi dari atropine salah satunya adalah sebagai antispasmodic dengan cara menghambat peristaltic lambung dan usus (Achmad, 1989). Dalam penelitian ini atropin digunakan sebagai ligan pembanding dengan EPMS.



Gambar 8. Hasil Visualisasi 2D Ethyl p-methoxy cinnamate dengan reseptor asetilkolin M3.

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 asetilkolin M3.

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 - 5,2 pada konformasi nomor 9 dengan nilai RMSD lower bond 1,613 Å dan upper bond 5,988 Å. Asam amino yang berikatan adalah ARG B, TRP C, ARG C, dan GLY B.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Etil p-metoksi sinamat (EPMS) terbukti memiliki aktivitas antagonisme spesifik terhadap ACH

M₃, yang dibuktikan dengan penurunan nilai pD₂ EPMS terhadap nilai pD₂ agonis asetilkolin.

2. Dosis EPMS yang dapat digunakan sebagai antagonisme asetilkolin M₃ adalah 100 µM berdasarkan penelitian yang dilakukan karena sudah memiliki efek antagonisme terhadap asetilkolin muskarinik.
3. Uji *in silico* menunjukkan EPMS dapat berikatan dengan reseptor asetilkolin dengan menduduki asam amino yang sama seperti atropin yaitu ARG C 1095 (*Arginin*). Nilai afinitas dari EPMS yaitu -5,2 dan RMSD 1,613 Å, hal ini membuktikan bahwa terjadi ikatan antara ligan EPMS dengan reseptor asetilkolin dan ikatannya cukup kuat dan stabil.

Perlu dilakukan uji aktivitas antagonisme terhadap organ dan reseptor lain selain asetilkolin.

DAFTAR PUSTAKA

Achmad, S.A. 1989. *Analisis Metabolit Sekunder*. Yogyakarta : UGM Press

Afriastini,J.J. 1990. *Bertanam Kencur*. Jakarta: Wakarta Penebar Swadaya

Alonso, H., Bliznyuk, A.A., Gredy, J.E. 2006. *Combining docking and molecular dynamic simulation in drug design*. Wiley Interscience. *Doi: 10.1002/med.20067*

Backer, C.A.R.C.B, Van deen Briak. 1968. *Flora of Java vol.2*. Walters Noordhoff.N.V. Groningen. P.33

Barus, R.2009. *Amidasi Etil P-Metoksi Sinamat yang Diisolasi dari kencur(Kaempferia galanga L.)*.Tesis. Medan : Universitas Sumatera Utara.

Beeh K.M. 2003. *Tiotropium a Long Acting inhaled anticholinergic for the treatment of COPD*. Jerman: Pneumologie

Buels, K.S., Fryer, A.D. 2012. *Muscarinic Receptor Antagonists : Effects on Pulmonary Function*. USA : Oregon Health and Science University.

- B. Liu, F. Liu, C. Chen and H. Gao. 2010. Supercritical carbon dioxide extraction of ethyl p-methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* L. rhizome and its apoptotic induction in human HepG2 cells. *Nat. Prod. Res.*, 24, 1927–1932
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Colombia University Press
- Fajeriyyati, Noor. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga* L.) Pada Bakteri *Bacillus Subtilis* Dan *Escherichia Colli*. *Skripsi*. Banjarmasin: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Banjarmasin
- Gandjar, I dan A. Rohman. 2007. *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.
- Harmita. 2006. *Analisis Fisiko Kimia*. Jakarta: FMIPA UI.
- H. Hart, L.E. Craine, D.J. Hart, and T.K. Vinod 13th ed. 2012. *Organic Chemistry: A Short Course*. Boston :Houghton-Mifflin
- Herbert, R. 2009. Minyak Atsiri Rimpang Kencur Karakterisasi Simplisia, Isolasi dan Analisis Komponen Minyak Atsiri secara GC-MS. *Skripsi*. Fakultas Farmasi. Universitas Sumatera Utara. Medan
- Inayatullah. M. S. 1997. Standarisasi Rimpang Kencur dengan Parameter Etil Para Metoksi Sinamat. *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Surabaya
- Jani. 1993. Uji Aktifitas Tabir Matahari Seenyawa Para Metoksi Transinamat dari Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga* L.). *Skripsi*. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Surabaya
- Jankovic, S. M., Milankovic, D.R., & Jankovic S.V. 1999. Schild's equation and the best estimate of pA2 value and dissociation constant of an antagonist. *Croat Med J.* 40(1),67-70
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. 2012. *Basic and Clinical Pharmacology 12th Edition*. Mc Graw Hill Company, Inc. USA.
- Kellenberger, et al. 2004. *Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening accuracy*. Proteins
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Farmakoterapi Herbal Indonesia Edisi 1*. Jakarta: Kemenkes RI
- Krane, D.E. dan Raymer, Michel L. 2003. *Fundamental concept of bioinformatics*. London: Pearson Education
- Lakshmanan, J. Werngren, L. Jose, K.P. Suja and S. Mangalam Nair, R.L. Varma, S. Mundayoor, S. Honer and A. Kumar. 2011. Ethyl p-methoxycinnamate isolated from a traditional anti-tuberculosis medicinal herb inhibits drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Fitoterapia*, 82, 757–761
- Lullman, H., Mohr, K., Zielger, A, dan Bieger, D. 2000. *Color Atlas of Pharmacology, 2nd edition*. Thieme New York.
- M.A. Sukari, N.W. Mohd Sharif, A.L.C. Yap, S.W. Tang, B.K. Neoh, M. Rahmani, G.C.L. Ee, Y.H. Taufq-Yap and U.K. Yusof. 2008. Chemical constituents variations of essential oils from rhizome of four Zingiberaceae species. *Te Malaysian J. Analytical Sci.*, 12, 638–644
- Mursito, B. 2003. *Ramuan Tradisional untuk Pelangsing Tubuh*. Jakarta : Swadaya
- Nugroho, P.A., Sukamdi, D.P., Darma, A.P., Jenie, R.I., dan Meiyanto, E. 2010. Penelusuran Mekanisme Flavanoid Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) sebagai Agen Kemopreventif melalui Docking Molekuler pada Protein Target

- CYP1A2. *Laporan Penelitian*. Yogyakarta: UGM
- Nurmeilis, Azrifitria, Fitriani. N. 2016. Pengujian Senyawa Etil p-metoksi sinamat Hasil Isolasi Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga L*) dan Derivat Amidasinya Sebagai Obat Penenang (Sedatif-Hipnotik). *Disertasi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Jakarta.
- Otman, R., Ibrahim, H., Mustafa, A.M., Awang, K., Gilani, A.H., Mustafa, M.R. 2006. Bioassay-guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kaempferia Galanga L*. *Planta Med*. 68,652-655
- Prabawati, Charina A., 2015. Evaluasi Daya Penetrasi Etil P-Metoksisinamat Hasil Isolasi Dari Rimpang Kencur(*Kaempferia Galanga L*.) Pada Sediaan Salpe, Krim, Dan Gel. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi
- Sadono, Hasmono D. 2000. Ketersediaan Hayati/Profil Farmakokinetika Kristal APMS(Isolat Bahan Aktif Serbuk Rimpang Kencur) pada Hewan Coba Kelinci. *Laporan Penelitian*. Surabaya:Lemlit Universitas Airlangga
- Sisangtragul W, Sripanidkulchai B. 2011. Effects of *Kaempferia galanga L*. and ethyl-p methoxycinnamate (EPMS) on hepatic microsomal cytochrome P450s enzyme activities in mice. *Songklanakarin J Sci Technol* ; 33: 411- 417.
- S. Sahoo, R. Parida, S. Singh, R.N. Padhy and S. Nayak. 2014. Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of in vitro propagated *Kaempferia galanga* Linn. *J. Acute Disease*, 1, 124–130.
- Soeprapto, R. 1986. *Undang-Undang Pokok Agraria Dalam Praktek*. Jakarta: CV. Mitra Sari
- T.K. Hong, S.I. Kim, J.W. Heo, J.K. Lee, D.R. Choi and Y.J. Ahn. 2011. Toxicity of *Kaempferia galanga* rhizome constituents of *Meloidogyne incognita* juveniles and egg. *Nematology*, 13, 235–244
- Umar MI, Asmawi MZB, Sadikun A, Altaf R, Iqbal MA. Phytochemistry and medicinal properties of *Kaempferia galanga L*. (Zingiberaceae) extracts. *Afr J Pharm Pharmacol*; 5: 1638-1647. (2011)
- 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. *PubMed Commons below Clinics (Sao Paulo)*, 69, 134–144 (2014).
- Ward C.W., Lawrence M.C. 2009. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi step process involving structural changes in both the ligand and receptors. *Bioassay*
- Wessler L., Kilbinger H., Bittinger F., Kirkpatrick C.J. 2001. *The Biological Role Of Non-Neuronal Asetylcoline In Plants And Humas*. US Nation Library of Medicine National Institute of Health