

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Kristal EPMS

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.

Kemudian untuk mendapatkan ekstrak kental, pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50° C. Setelah dilakukan evaporasi dan didapatkan ekstrak kental, selanjutnya ekstrak kental dicuci menggunakan n-heksan hingga didapatkan kristal EPMS. Pencucian dilakukan berulang kali hingga didapatkan kristal EPMS berwarna putih.

1. Uji identifikasi EPMS dengan metode KLT pada Kencur

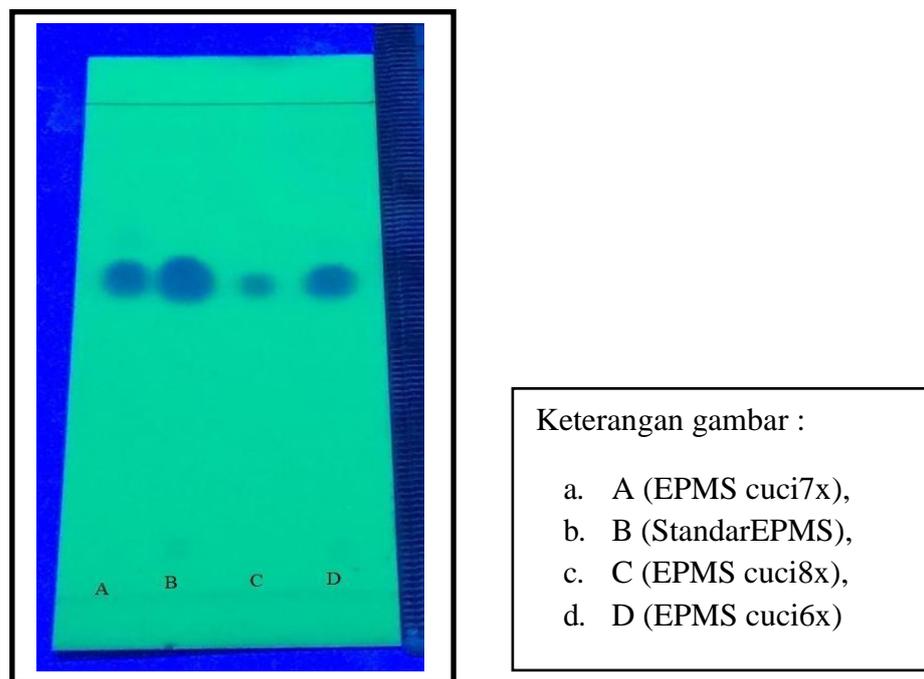
Uji identifikasi EPMS dilakukan menggunakan metode KLT. KLT didasarkan pada proses adsorbs dimana pemisahan terjadi karena adanya penyebaran daya serap terhadap adsorben dan kelarutan komponen kimia terhadap cairan pengelusi. Prinsip kerja dari KLT ialah memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dan pelarut.

Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin mudah terbawa oleh fase gerak. .

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 (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.

Nilai Rf digunakan sebagai penentu suatu senyawa organic di dalam larutan tersebut. 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).

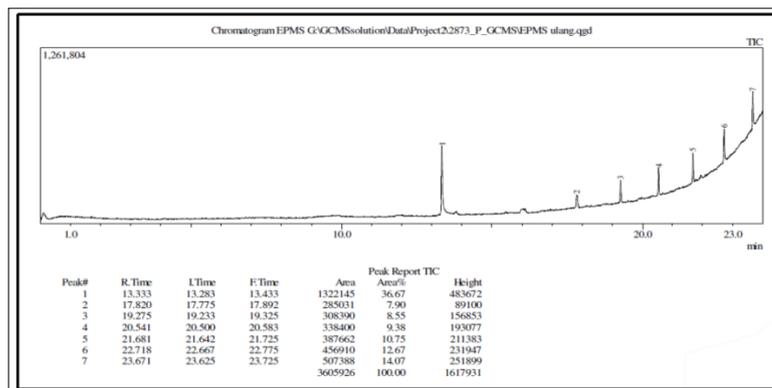


Gambar 6. Uji KLT senyawa EPMS yang dilihat dibawah sinar UV 254nm.

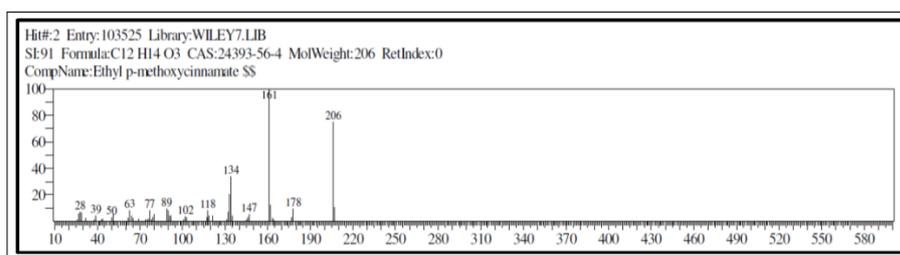
Nilai Rf yang didapatkan setelah KLT menunjukkan bahwa senyawa yang dimurnikan telah murni dan dapat dikatakan bahwa senyawa tersebut adalah EPMS dengan hasil perbandingan menunjukkan pada posisi spot yang mirip hampir sama.

2. Uji Identifikasi menggunakan GCMS

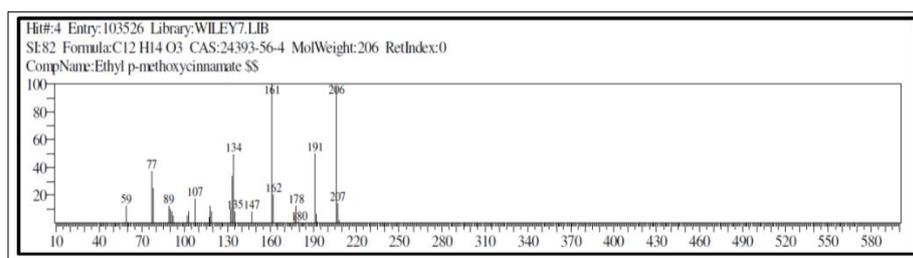
Senyawa EPMS di analisis lebih lanjut dengan Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS). Interpretasi hasil GC-MS menunjukkan bahwa senyawa EPMS muncul pada waktu retensi 13,33 menit dengan BM 206,0. Berdasarkan hasil penelitian, senyawa EPMS mempunyai fragmentasi massa pada 161, 134, 118, 89, 63. Spektrum yang didapatkan relatif sama dengan spektrum GC-MS dari EPMS yang telah dipublikasikan oleh Umar dkk. (2012).



Gambar 7. Hasil uji isolat senyawa uji pada Gas Chromatography menggunakan pelarut metanol. Peak pertama menunjukkan senyawa EPMS, peak setelahnya menunjukkan pelarut.



Gambar 8. Hasil uji isolat senyawa uji pada Mass Spectrometry menggunakan pelarut metanol



Gambar 9. Hasil uji isolat senyawa uji pada Mass Spectrometry menggunakan pelarut methanol

B. Uji *In Vitro* dengan metode *Organ Bath*

1. Penyiapan *buffer tyrode*

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.

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 terisi oleh larutan *aquades* sesuai batas tampungan dan dihangatkan hingga suhu 37°C. *Aquades* digunakan sebagai mediator untuk mempertahankan suhu sesuai yang diinginkan.

3. Preparasi organ ileum marmut

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*.

4. Uji *in vitro* aktivitas seyawa EPMS dalam *Kaempferia galanga L*.

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 sedatif-hipnotik dibandingkan dengan kontrol diazepam (Nurmeilis, 2016)

Mekanisme kerja dari agonis asetilkolin sendiri sudah banyak dilakukan dan dikaji. Reseptor asetilkolin dibagi menjadi 2 yaitu asetilkolin muskarinik dan nikotik. Asetilkolin merupakan neurotransmitter yang berfungsi untuk mentransfer sinyal dari sel syaraf ke sel lainnya seperti neuron, sel otot, dan kelenjar sel. Asetilkolin berasal dari turunan senyawa ester asam asetat dan kolin. Bagian tubuh yang digunakan atau dipengaruhi oleh asetilkolin mengacu pada kolinergik.

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

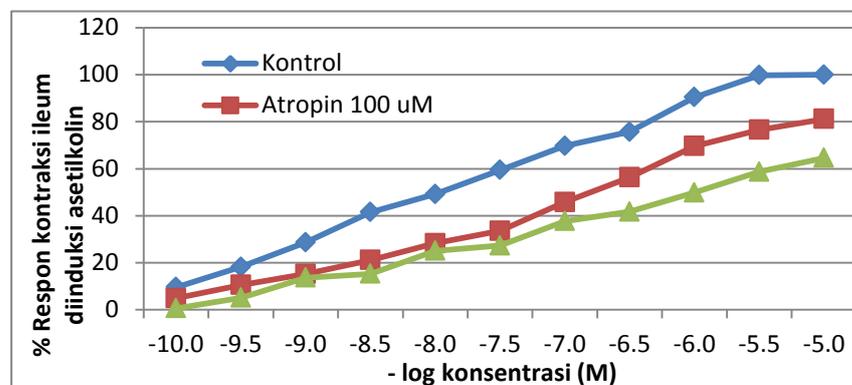
neurotransmitter utama syaraf parasimpatis yang mengatur system pencernaan (Wessler dan Kirkpatrick, 2001). Reseptor asetilkolin muskarinik dibagi menjadi 5 subtipe (M_1 - M_5). Reseptor M_1 , M_3 , dan M_5 terhubung dengan protein Gq sedangkan M_2 dan M_4 terhubung dengan protein Gi dan kanal ion K^+ . Pada penelitian ini mengacu pada reseptor Asetilkolin M_3 . Aktivasi reseptor ACH M_3 oleh asetilkolin akan memicu aktivasi sistem fosfatidil inositol (fosfolipase) dan kemudian akan memicu kontraksi otot polos pada saluran cerna.

5. Uji pembandingan menggunakan Atropin (Kontrol Positif)

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 pembandingan 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. Tujuan dilakukan uji asetilkolin untuk melihat bahwa EPMS memiliki aktivitas yang sama seperti asetilkolin dalam menangani mual dan muntah. Selain itu juga sebagai

validasi penelitian, jika uji asetilkolin terbukti valid memiliki aktivisasi antagonisme Asetilkolin M₃.



Gambar 10. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap% respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan atropin 0.01 dan 0.02 M.

Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM.

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 $-\text{Log EC}_{50}$ (**Tabel 4**). Kenaikan nilai EC₅₀ dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kenaikan EC₅₀ akibat perlakuan atropin

No.	Kelompok Perlakuan	EC ₅₀ (M)
1	Kontrol Atropin	$3.92 \pm 1.35 \times 10^{-8}$
2	Atropin 0.01 μM	$1.66 \pm 3.10 \times 10^{-7}$
3	Atropin 0.02 μM	$7.25 \pm 1.56 \times 10^{-6}$

Keterangan : Nilai EC₅₀ disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM

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

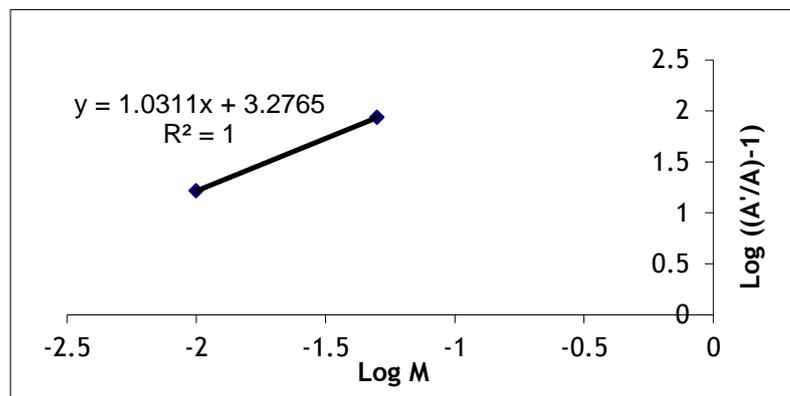
menunjukkan adanya penurunan respon kontraksi yang dipicu dengan pemberian atropin dosis 0.01 μM dan 0.02 μM , hal tersebut ditandai dengan menurunnya nilai pD2. Nilai rata-rata pD2 berturut-turut yang dihasilkan adalah 8,02, 6,78, dan 6,08 (Tabel 4). Penurunan pD2 atropin juga bermakna secara statistik dimana $p < 0.05$.

Tabel 4. Pergeseran nilai pD2 karena pengaruh perlakuan atropin 0.01 μM dan 0.02 μM

No	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol atropin	8.02 \pm 0.12	100 \pm 0.00
2	Atropin 0.01 μM	6.78 \pm 0.17	75.36 \pm 6.88
3	Atropin 0.02 μM	6.08 \pm 0.20	71.86 \pm 5.14

Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks disajikan dalam bentuk rata-rata \pm 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%.

Atropin merupakan antagonis kompetitif berdasarkan nilai slope yang dihasilkan yaitu sebesar 1,0311x (Gambar 11). Nilai slope yang mendekati 1x maka hasil menunjukkan bahwa senyawa tersebut antagonis kompetitif. Antagonis kompetitif merupakan antagonis yang bersaing secara kompetitif dalam menduduki reseptor asetilkolin. Pemberian antagonis kompetitif dapat mengurangi potensi dari agonis namun tidak bekerja efektif secara maksimal (Neubig, 2003).



Gambar 11. Kurva hasil perhitungan nilai slope Atropin

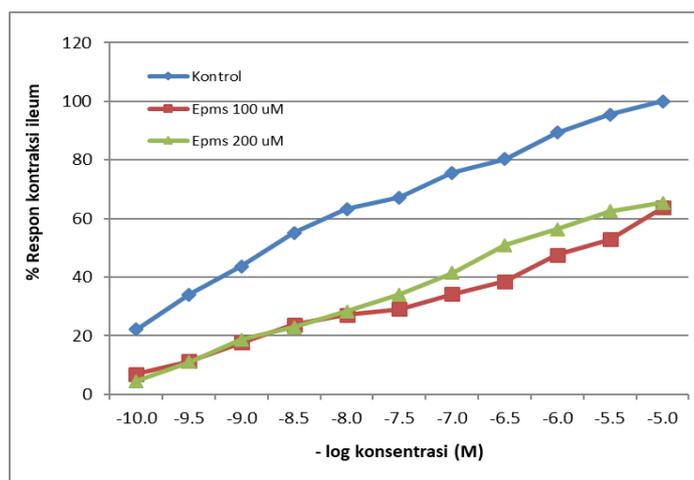
Penambahan konsentrasi dari agonis terhadap perlakuan ini tidak mampu menggeser dan mengatasi efek yang ditimbulkan oleh perlakuan antagonis tersebut yang mengakibatkan nilai Emaks tidak dapat mencapai 100% (Putra, 2018).

6. Pengaruh EPMS terhadap Reseptor Asetilkolin M3 ileum marmut

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).

EPMS diduga memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor asetilkolin muskarinik. Dugaan tersebut dilihat dari perbandingan nilai pD₂ antara asetilkolin dengan perlakuan EPMS dan tanpa perlakuan EPMS. Nilai pD₂ yang dihasilkan 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 asetilkolin dengan menggunakan persamaan *Schild-Plot* dengan syarat respon maksimal antara perlakuan kontrol dan sebelum perlakuan EPMS harus sama (Kenakin, 1982).



Gambar 12. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi dengan perlakuan EPMS 100 μ M dan 200 μ M.

Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (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 5. Kenaikan EC_{50} akibat perlakuan EPMS

No.	Kelompok Perlakuan	EC_{50} (M)
1	Kontrol Asetilkolin	$3.29 \pm 1.14 \times 10^{-9}$
2	EPMS 100 μ M	$2.60 \pm 9.99 \times 10^{-6}$
3	EPMS 200 μ M	$4.55 \pm 1.87 \times 10^{-7}$

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

Terjadi efek relaksasi otot polos ileum yang diinduksi oleh seri asetilkolin akibat perlakuan EPMS dosis 100 μ L dan 200 μ L. Efek relaksasi ditunjukkan dengan pergeseran kurva grafik bergeser ke bawah dan ditandai dengan menurunnya nilai pD2. Penurunan kurva mengindikasikan adanya penurunan kemampuan asetilkolin dalam memberikan efek kontraksi terhadap ileum marmut setelah diberikan EPMS dosis 100 μ M dan 200 μ M.

Penurunan kurva pada grafik juga disertai dengan penurunan nilai pD2. Nilai rata-rata pD2 secara berturut-turut 8,75, 5,74, dan 6,47. Penurunan pD2 secara bermakna secara statistik $p > 0,05$. Pada perlakuan dosis 100 dan 200 μ M menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara EPMS dengan control asetilkolin sehingga pada penggunaan dosis 100 μ M sudah memberikan efek relaksasi pada kontraksi otot polos ileum.

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

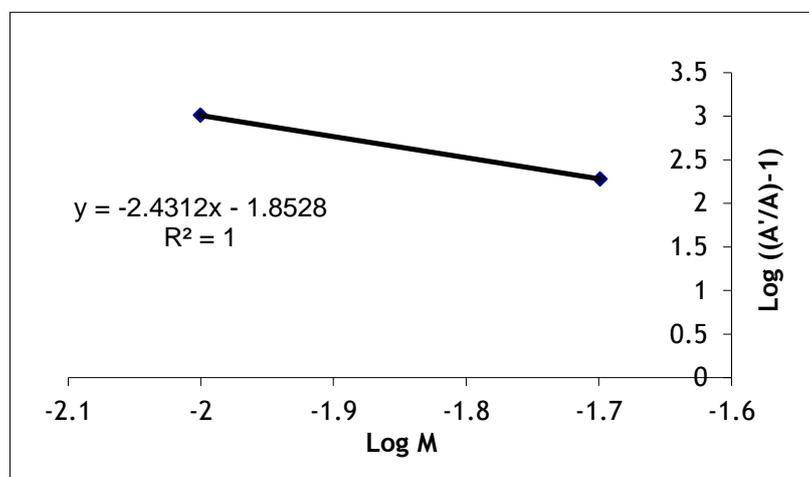
No.	Kelompok perlakuan	pD2	Emaks (%)
1	Kontrol asetilkolin	8.16 \pm 0.45	100 \pm 0.00
2	EPMS 100 μ M	7.12 \pm 0.10	74.60 \pm 5.24
3	EPMS 200 μ M	6.98 \pm 0.19	73.89 \pm 5.67

Keterangan : Nilai pD2 dan Emaks (%) disajikan dalam bentuk rata-rata \pm 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%.

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).

Hasil dari perhitungan slope pada senyawa EPMS menunjukkan hasil $-2,4132x$ (Gambar 12). Nilai tersebut tidak mendekati angka $1x$, dimana hasil nilai slope yang mendekati angka $1x$ maka senyawa uji tersebut adalah senyawa antagonis kompetitif. Dari hasil yang ditunjukkan oleh senyawa EPMS, maka senyawa tersebut adalah senyawa antagonis non-kompetitif dikarenakan nilai slope tidak mendekati angka $1x$.



Gambar 13. Kurva hasil perhitungan nilai slope EPMS

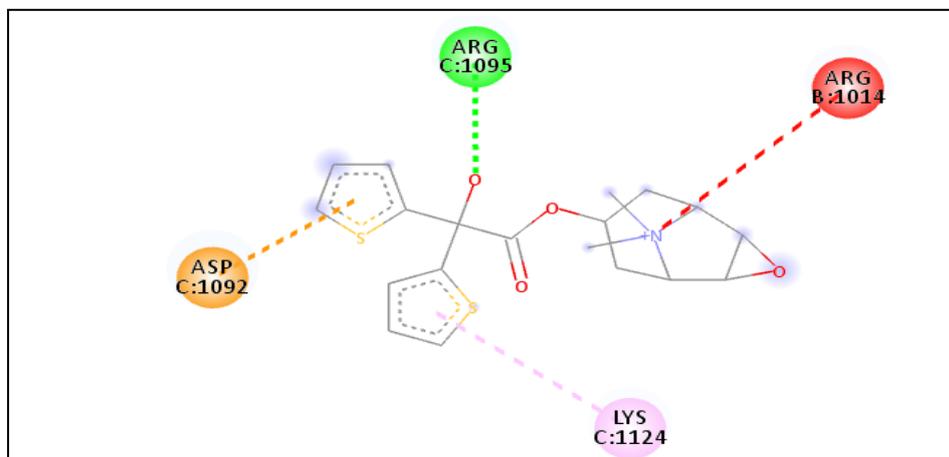
C. Uji *in silico* senyawa EPMS pada reseptor Asetilkolin Muskarinik M₃

1. Validasi Protokol *Docking*

Validasi protokol *docking* dilakukan untuk membuktikan jika penelitian yang dilakukan valid. Pada direktori target-virtual dilakukan

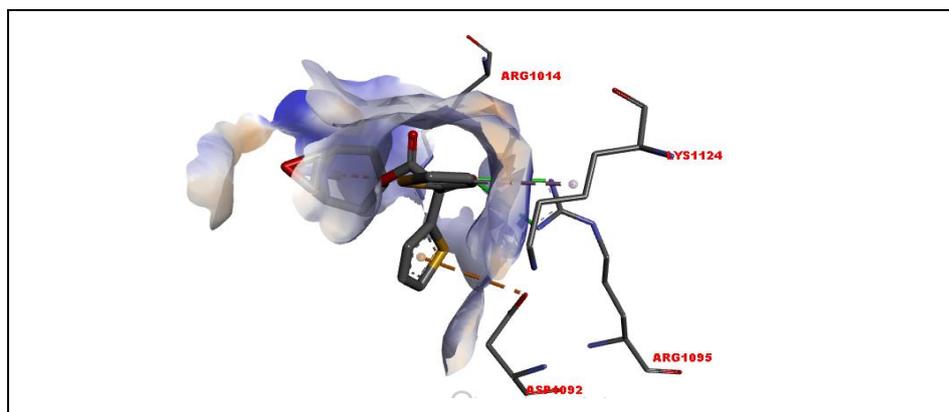
preparasi ligan pembanding untuk dilakukan *re-dock* (ligan pembanding dengan konformasi yang memiliki energi terendah). Validasi ini dilihat dari nilai *Root Mean Square Distance* (RMSD). Perhitungan RMSD dilakukan konversi file baik ligan pembanding dalam geometri aslinya dari mol2 ke pdb, setelah 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.

2. Hasil *Molecular Docking*



Gambar 14. Hasil Visualisasi 2D tiotropium dengan reseptor Asetilkolin.

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



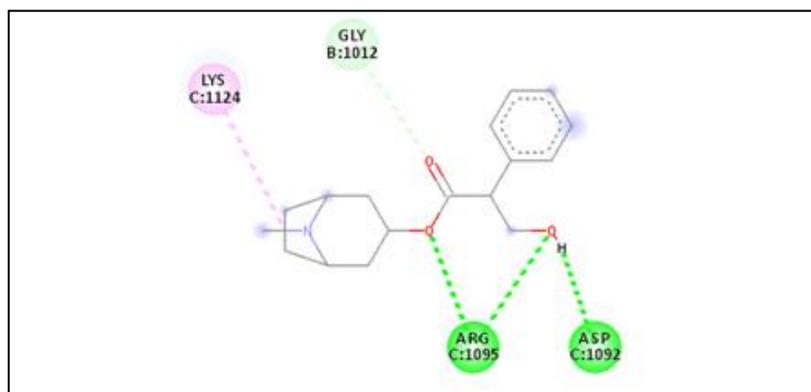
Gambar 15. Hasil visualisasi 3D tiotropium dengan reseptor Asetilkolin.

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 ligand* dari ACH M3 yaitu Tiotropium. Tiotropium adalah senyawa yang berperan spesifik terhadap muskarinik.

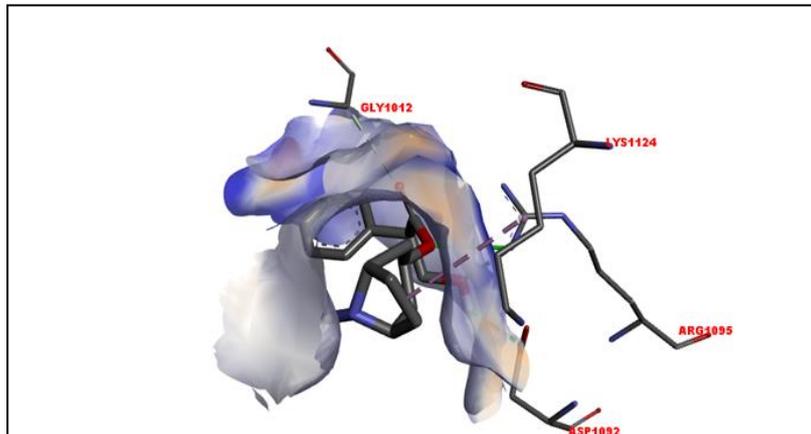
Tiotropium bekerja pada reseptor yaitu di dalam reseptor Asetilkolin Muskarinik 3 (Ach M₃). Fungsi utama dari Tiotropium sebagai *vasorelaxant* pada otot polos, sehingga tiotropum menyebabkan relaksasi otot polos. Hal inilah yang menjadikan tiotropium sebagai native ligan pada reseptor Ach M₃ (Beeh,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

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* 1.769 Å (< 2,000 Å) dan *upper bond* 3.637 dengan nilai afinitasnya -6,2. Nilai energi ikatan dan interaksi antara masing- masing ligan dengan protein target dapat dilihat pada gambar. Senyawa tiotropium diketahui berikatan dengan residu protein TYR B, TRP C, ARG C, ARG B, ASP C, dan LYS C.



Gambar 16. Hasil Visualisasi 2D atropin dengan reseptor Ach M₃.

Gambar 16 menunjukkan asam amino yang berikatan dengan ligan beserta jenis ikatan yang terjadi.

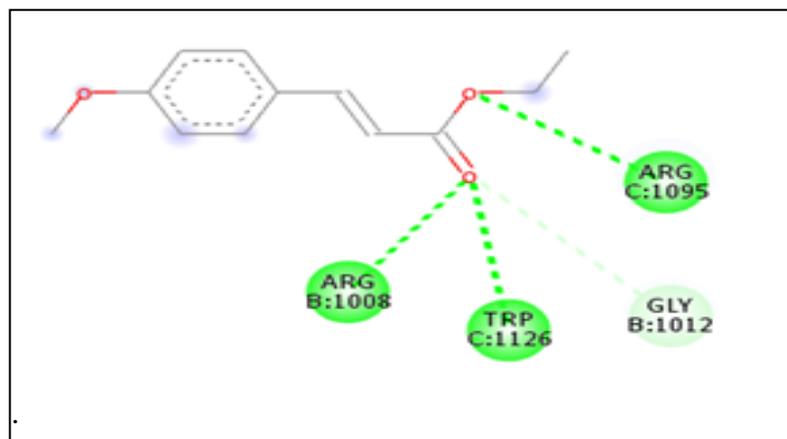


Gambar 17. Hasil Visualiasi 3D atropin dengan reseptor Ach M3.

Gambar diatas menunjukkan jenis ikatan yang terjadi.

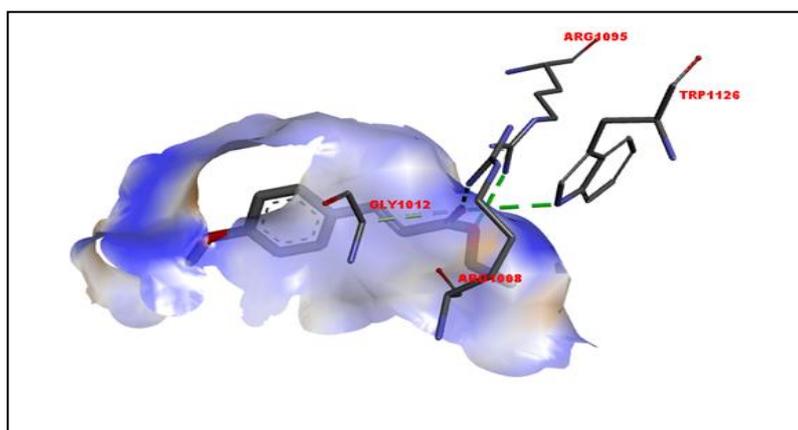
Atropin merupakan antiasetilkolin yang selektif terhadap muskarinik. Fungsi dari atropine salah satunya adalah sebagai antispasmodic dengan cara menghambat peristaltic lambung dan usus (Achmad, 1989). Dalam penelitian ini atropin digunakan sebagai ligan pembanding dengan EPMS.

Proses docking atropin terhadap reseptor asetilkolin menghasilkan 9 konformasi. Dimana dari kesembilan konformasi tersebut dilihat nilai RMSD <math><2,000 \text{ \AA}</math> dengan skor afinitas terendah. Dari hasil docking didapatkan konformasi nomor 2 dengan nilai RMSD lower bond 1,227 \AA dan upper bond 5,015 \AA dengan skor afinitas -6,1. Asam amino yang berikatan adalah ARG C, ASP C, dan LYS C



Gambar 18. 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 19. 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 $1,613 \text{ \AA}$ dan upper bond $5,988 \text{ \AA}$. Asam amino yang berikatan adalah ARG B, TRP C, ARG C, dan GLY B.

Tabel 7. Nilai energi ikatan dan interaksi ligan dengan residu protein target

<u>Ligan</u>	<u>Energi ikatan (kcal/mol)</u>	<u>Residu protein</u>
<u>Tiotropium</u>	-5,9	<i>TYR B 1018</i> <i>TRP C 1126</i>
<u>Sebagai ligan asli</u>		<i>ARG C 1095</i> <i>ARG B 1014</i> <i>ASP C 1092</i> <i>LYS C 1124</i>
<u>EPMS</u>	-5,2	<i>ARG B 1008</i> <i>TRP C 1126</i> <i>ARG C 1095</i> <i>GLY B 1012</i>
<u>Atropin</u>	-6,1	<i>ARG C 1095</i> <i>ASP C 1092</i> <i>LYS C 1124</i> <i>GLY B 1012</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 atropin dan ligan asli yaitu sama-sama memiliki residu protein *ARG C 1095*. Dapat dikatakan jika asam amino yang diduduki oleh EPMS memiliki aktivitas yang sama seperti atropin terhadap residu protein *ARG C 1095*.

EPMS dan atropin juga memiliki aktivitas yang sama dalam menghambat ACH M₃. Dilihat dari skor afinitasnya, skor afinitas atropine lebih negative daripada EPMS, itu berarti bahwa atropin lebih stabil dan kuat dalam ikatan terhadap ligan dan reseptor. Nugroho (2010) mengatakan bahwa semakin negative skor afinitas *docking* senyawa, semakin stabil dan kuat pula ikatan antara ligan dan reseptor. Hal pendukung lainnya adalah jumlah ikatan hidrogen dalam molekul

senyawa. Jumlah ikatan hidrogen pada atropin adalah 2 ikatan hidrogen, sedangkan EPMS hanya 1 ikatan hidrogen. Jumlah ikatan hidrogen memiliki korelasi dengan skor afinitas, dimana semakin banyak ikatan hidrogen maka semakin negatif pula skor afinitas ligan (Nugroho,2010).

Sehingga pada uji *in silico* ini membuktikan bahwa EPMS memiliki sifat yang sama sebagai antagonis asetilkolin untuk menghambat proses kontraksi otot polos yang mengakibatkan *spasmodic*. Hal ini dapat berfungsi sebagai acuan untuk mengurangi efek mual dan muntah. Namun energi ikatan yang terbentuk antara EPMS (skor *docking* -5,2) dengan reseptor lebih rendah dibandingkan dengan atropin dengan skor afinitasnya -6,1.