

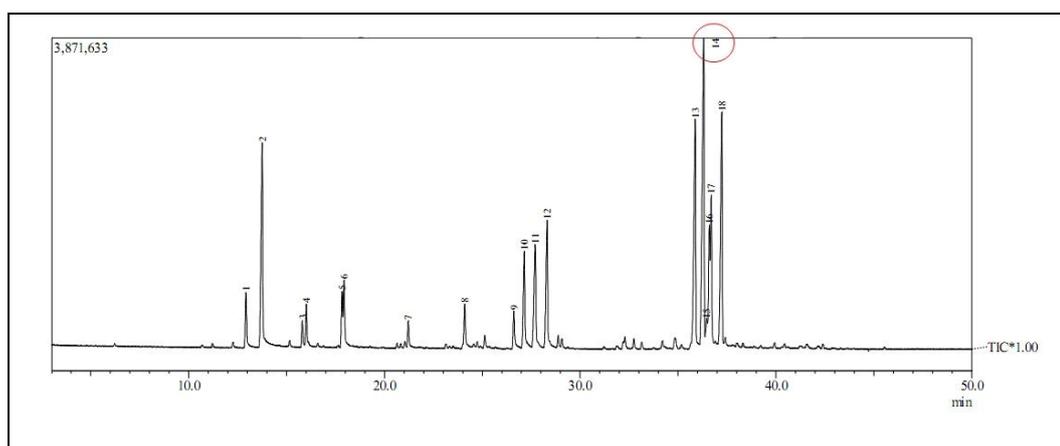
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

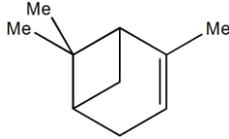
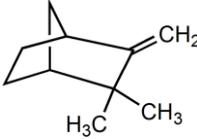
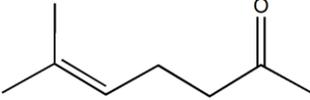
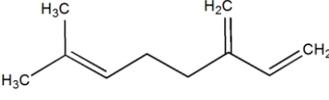
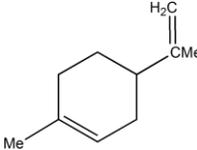
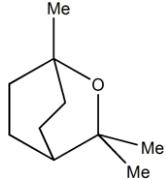
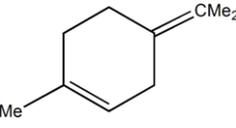
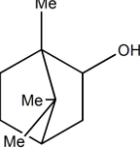
##### 1. Analisis Kandungan Kimia GC-MS

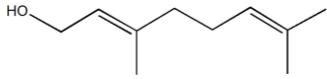
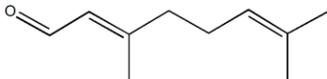
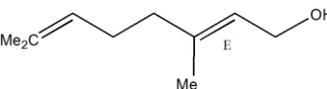
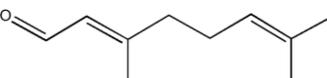
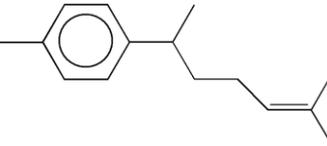
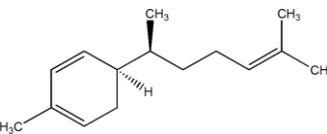
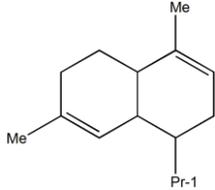
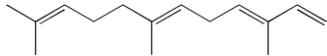
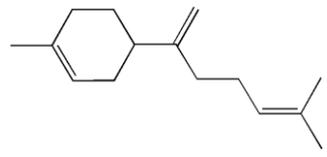
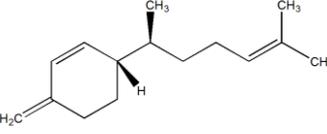
Analisis kandungan kimia metode GC-MS dilakukan untuk identifikasi senyawa yang terdapat pada minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) karena terbukti sebagai anti-emetik. Fase diam yang digunakan adalah AGILENT HP 5MS dengan panjang kolom 30 meter dan diameter internal 0,25 mm. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah Helium dengan kecepatan alir 0,53 mL/menit. Dalam instrumen MS digunakan metode pengion *electron impact* dengan energi 70 Ev. Hasil pengujian GC-MS minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) dinyatakan dalam kromatogram Gambar 8 dan kandungan senyawa dapat dilihat pada Tabel 3.



**Gambar 1.** Kromatogram Minyak Atsiri Jahe (*Zingiber officinale*)

**Tabel 1.** Kandungan kimia senyawa minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*)

No. Peak	Rt (menit)	Area	Nama Senyawa	Struktur Kimia
1	12.929	2870044	$\alpha$ -Pinene	
2	13.756	13400520	Camphene	
3	15.803	1237383	5-Hepten-2-One	
4	16.004	1923625	$\beta$ -Myrcene	
5	17.836	3132269	Limonene	
6	17.938	3220556	1,8-Cineole	
7	21.219	1312800	$\alpha$ -Terpinolene	
8	24.103	2320000	endo-Borneol	

9	26.615	2033197	2,6-Octadien-1-ol	
10	27.147	5828598	2,6-Octadienal	
11	27.706	7200878	trans-Geraniol	
12	28.320	8682446	2,6-Octadienal	
13	35.881	16685386	$\alpha$ -Curcumene	
14	36.317	25358805	Zingiberene	
15	36.450	1805857	$\alpha$ -Amorphene	
16	36.602	6893275	$\alpha$ -Farnesene	
17	36.699	7845261	1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)	
18	37.238	16042618	$\beta$ -Sesquiphellandrene	

Berdasarkan hasil analisis kandungan kimia dengan metode GC-MS (Tabel 3) diketahui bahwa dari 18 *peak* senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) yang memiliki luas area paling besar yaitu sebesar 25358805 terdapat pada nomor *peak* 14 yaitu senyawa *Zingiberene* dengan waktu retensi (menit) 36.317. *Zingiberene* adalah senyawa paling utama dalam minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*).

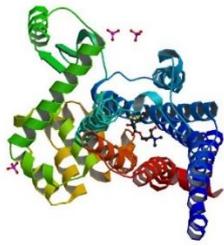
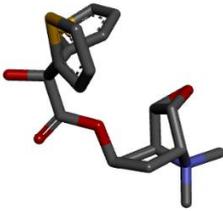
## **2. *Molecular Docking* dengan Aplikasi AutoDock**

Penambatan molekul (*molecular docking*) merupakan penelitian dengan metode komputasi yang bertujuan untuk mendeteksi interaksi suatu ligan dengan suatu reseptor. Hasil dari penambatan molekul ini adalah berupa skor penambatan dan hasil visualisasi secara *virtual* 3D. Skor penambatan yang dianggap baik adalah skor yang nilainya lebih kecil, karena menggambarkan senyawa yang diuji secara penambatan molekul tersebut akan melekat dengan sangat baik dengan reseptornya dan tidak membutuhkan banyak energi untuk berikatan. Setelah didapatkan skor penambatan yang baik, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi VMD (*Visual Molecular Dynamics*). Aplikasi VMD akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D. Aplikasi VMD juga dapat digunakan untuk mendeteksi bentuk ikatan dan jarak dari struktur yang diuji dengan reseptornya.

### **a. Proses Pemilihan Reseptor Target**

Sebelum dilakukan uji penambatan molekul pada senyawa *marker* minyak atsiri, reseptor diunduh terlebih dahulu pada situs [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org).

Protein yang digunakan berupa berkas (*file*) dalam format “.pdb”. Pada penelitian ini reseptor yang diunduh adalah reseptor asetilkolin dengan kode reseptor 4DAJ yang tersaji pada Gambar 9.

Kode Protein	<i>Native Ligand</i>	Struktur Reseptor	Struktur <i>Native Ligand</i>
4DAJ	Tiotropium C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>		

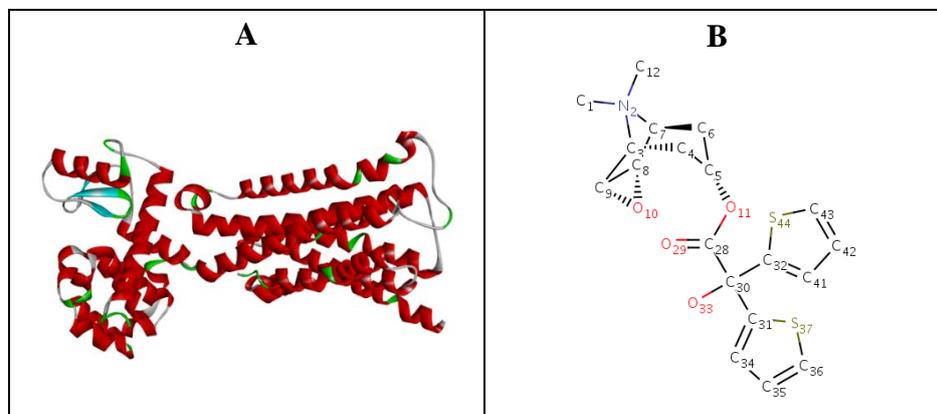
**Gambar 2.** Kode dan Struktur Reseptor Asetilkolin

*Native ligand* yang terdapat pada reseptor asetilkolin muskarinik (ACh M<sub>3</sub>) adalah tiotropium. Senyawa ini merupakan golongan antagonis kolinergik yang memiliki inti tropan.

#### **b. Preparasi Protein dan Ligan Asli (*Native Ligand*)**

Setelah berkas protein diunduh, dilakukan preparasi berkas protein dengan menggunakan aplikasi DS *Visualizer*. Tahap ini merupakan tahap awal untuk melakukan penambatan molekul. Pada umumnya terdapat banyak molekul dengan komponen residu yang sama pada berkas protein, sehingga beberapa molekul yang terdapat pada berkas protein dihapus dan diambil 1 molekul. Setelah itu residu yang dianggap sebagai residu pengganggu (senyawa air dan senyawa detergen) dan senyawa ligan asli dihapus, tujuannya untuk menghindari kemungkinan ligan yang akan diuji melekat pada senyawa pengganggu tersebut seperti pada Gambar 10.

Berkas protein disimpan dalam format “*target.pdb*” agar dapat dijalankan dengan menggunakan aplikasi AutoDock.



**Gambar 3.** (A). Preparasi Protein (B). Ligan 0HK 2D

Senyawa ligan asli diambil dari berkas protein dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dengan cara menghapus seluruh komponen protein dan menyisakan senyawa ligan aslinya. Senyawa ligan asli disimpan dengan format “*ligan.pdb*”. Senyawa ligan asli berfungsi sebagai pembanding untuk senyawa uji maupun senyawa pembanding kontrol positif.

### c. Preparasi Ligan Uji

Preparasi ligan uji dilakukan dengan cara menggambarkan struktur ligan (senyawa *marker*) yang akan diuji dengan menggunakan aplikasi *MarvinSketch*. Ligan uji yang digunakan dalam uji *molecular docking* ini adalah senyawa minyak atsiri *Zingiberene* yang dapat ditemukan pada rimpang jahe (*Zingiber officinale*). Senyawa minyak atsiri *Zingiberene* ini dipilih sebagai ligan uji karena memiliki luas area paling besar dari hasil uji GC-MS yaitu 25358805 dengan waktu retensi (menit) 36.317.

#### **d. Proses *Molecular Docking* dengan AutoDock**

Setelah diperoleh berkas (*file*) ligan dan protein dan disimpan dalam satu *folder*, lalu dilakukan penambatan molekuler menggunakan aplikasi AutoDock. AutoDock adalah program *docking* non-komersial yang sangat baik dan banyak digunakan untuk melakukan penambatan molekuler. AutoDock merupakan sebuah aplikasi yang digunakan untuk menentukan target atau sasaran dari protein yang akan diuji. AutoDock juga digunakan untuk melihat skor ikatan (*binding energy score*) dari senyawa yang diuji terhadap reseptor target.

Pada aplikasi AutoDock, berkas "*target.pdb*" yang sudah dipreparasi dimasukkan dan pada menu **Edit** dan klik submenu **Delete Water** untuk menghapus air pada berkas "*target.pdb*". Kemudian **Edit** lagi dan klik submenu **Hydrogen** untuk menambahkan atom hydrogen pada residu protein (Lampiran 5).

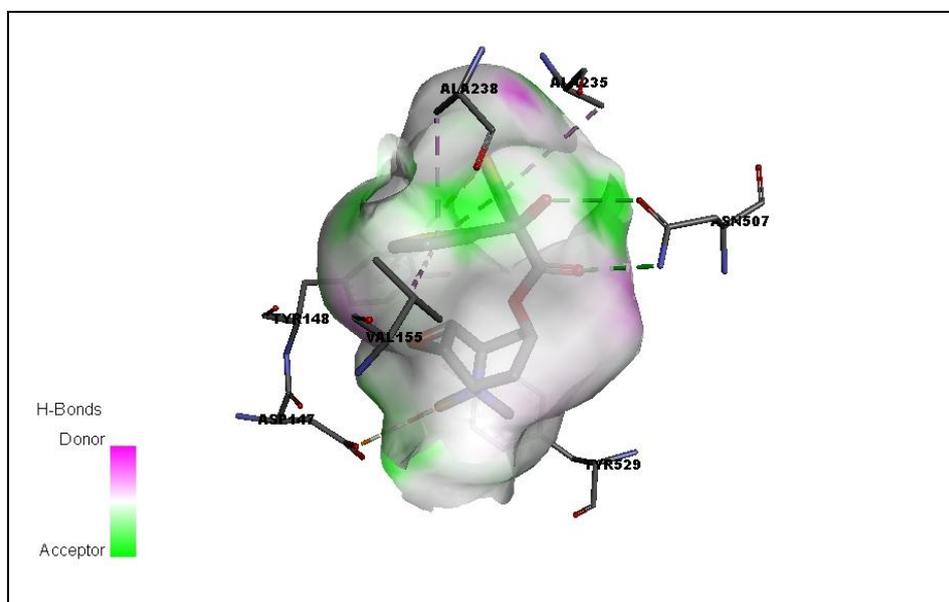
Preparasi parameter *grid* dilakukan untuk membatasi ruang gerak dari ligan yang akan diuji. Ruang *grid* yang digunakan sebesar 1 Å dan untuk membatasi agar ligan tidak keluar dari posisi ligan aslinya maka digunakan besar dimensi dari x, y dan z masing-masing dimensi sebesar 40 (Lampiran 6).

#### **e. Visualisasi Hasil Validasi dan *Molecular Docking***

Setelah didapatkan skor penambatan, kemudian akan dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. *DS Visualizer* merupakan sebuah aplikasi penampil gratis yang digunakan untuk

visualisasi hasil dari penambatan molekuler. Hal ini dirancang agar memberikan suasana interaktif untuk melihat dan mengedit struktur molekul, sekuen, data refleksi X-ray dan data lainnya. Aplikasi ini dapat dioperasikan dalam sistem operasi *Windows* dan *Linux*.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor *docking* ligan asli dari reseptor Asetilkolin Muskarinik (ACh M<sub>3</sub>) yg paling baik yaitu sebesar -9,1 dengan nilai RMSD 0,913 (<2.00Å) yang terletak pada konformasi ke 2. Pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa ligan asli mengikat pada beberapa residu dari protein target (Gambar 11) yaitu *tyrosine* ke 529 (TYR529), *aspartic acid* ke 147 (ASP147), *tyrosine* ke 148 (TYR148), *valine* ke 155 (VAL155), *alanine* ke 238 (ALA238), *alanine* ke 235 (ALA235), *asparagine* ke 507 (ASN507).



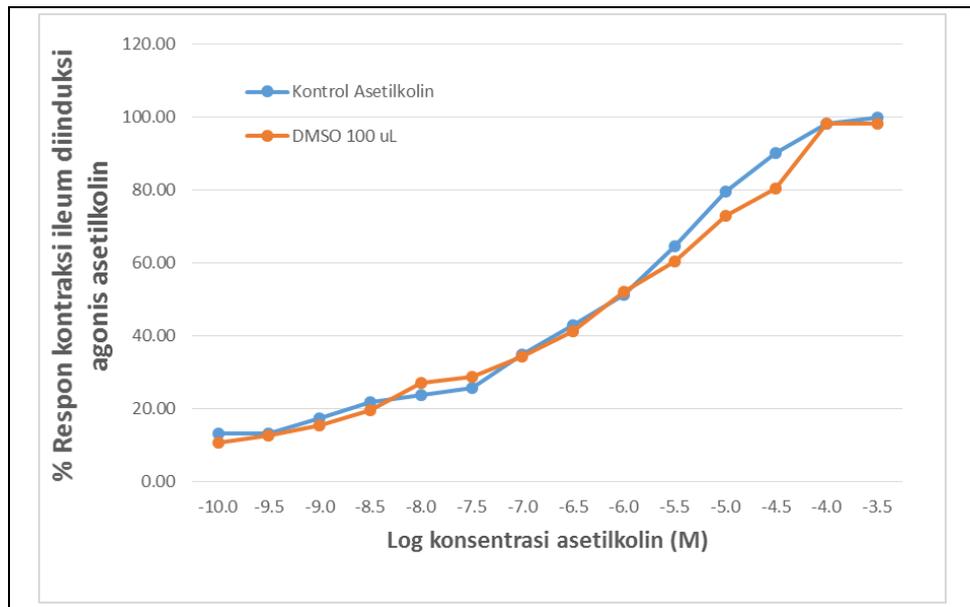
**Gambar 4.** Posisi *Native Ligand* ketika terikat ke reseptor ACh M<sub>3</sub>

### 3. Uji *In Vitro*

#### a. Uji Pelarut DMSO Terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum

Minyak atsiri jahe diduga memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor ACh M<sub>3</sub>, sehingga penelitian ini ditujukan untuk mengamati pengaruh minyak atsiri jahe dosis 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*) terhadap kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi oleh asetilkolin. Minyak atsiri jahe dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO), sehingga penelitian ini memerlukan uji pelarut untuk menjamin bahwa pengaruh minyak atsiri jahe terhadap kontraksi otot polos ileum hanya disebabkan oleh minyak atsiri jahe saja. Sebagai uji pendahuluan dilakukan uji pengaruh DMSO terhadap kontraksi otot polos ileum yang diinduksi oleh asetilkolin. Jumlah DMSO yang digunakan adalah sebanyak 100  $\mu$ L yang disesuaikan dengan volume maksimal pemberian minyak atsiri jahe ke dalam *organbath*. Pengaruh DMSO terhadap otot polos ileum yang diinduksi oleh asetilkolin dan berikut pergeseran nilai pD<sub>2</sub> tersaji pada Gambar 12.

Pemberian DMSO sedikit menggeser kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum dan menaikkan nilai rata-rata pD<sub>2</sub> asetilkolin dari 4.22 menjadi 4.28 (Tabel 4). Walaupun demikian, berdasarkan uji t berpasangan (n=5) penurunan nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin tidak bermakna secara statistik ( $p > 0,05$ ), sehingga disimpulkan pelarut DMSO 100  $\mu$ L tidak mempengaruhi kontraksi otot polos ileum yang diinduksi oleh asetilkolin.



**Gambar 5.** Pengaruh DMSO terhadap respon kontraksi otot polos ileum yang diinduksi asetilkolin. Kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap respon kontraksi otot polos ileum, dengan atau tanpa pengaruh DMSO 100  $\mu$ L (n=6, rata-rata  $\pm$  SEM)

**Tabel 2.** Nilai rata-rata  $pD_2$  asetilkolin karena pengaruh DMSO 100  $\mu$ L (n=6, rata-rata  $\pm$  SEM). Berdasarkan uji signifikansi dengan *One Way ANOVA*, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p > 0.05$ ) antara  $pD_2$  kontrol dan DMSO.

No	Kelompok Perlakuan	$pD_2$	$E_{maks}$ (%)
1	Kontrol Asetilkolin	4,22 $\pm$ 0,41	100 $\pm$ 0,00
2	DMSO 100 $\mu$ L	4,28 $\pm$ 0,45	100 $\pm$ 0,00

**b. Pengaruh Minyak Atsiri Jahe terhadap Reseptor Asetilkolin Kontraksi Otot Polos Ileum**

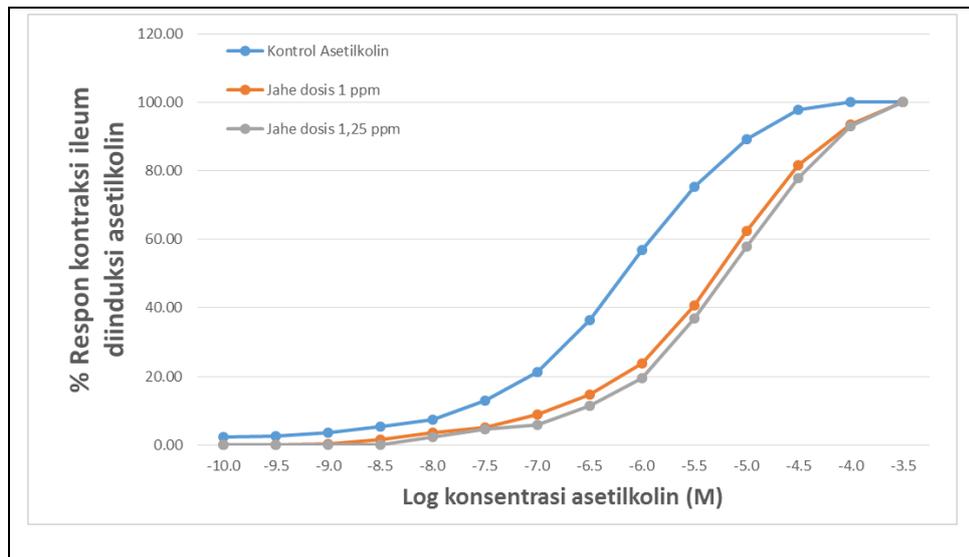
Reseptor ACh  $M_3$  diketahui berperan dalam mekanisme kontraksi otot polos di ileum manusia dan marmut. Reseptor ini banyak ditemukan pada ileum marmut. Oleh karena itu tahapan penelitian selanjutnya adalah mempelajari pengaruh jahe terhadap reseptor ACh  $M_3$ .

**c. Pengaruh terhadap Kontraksi Otot Polos ileum Akibat Pemberian Seri Konsentrasi asetilkolin**

Pada uji ini, dosis minyak atsiri jahe yang dimasukkan ke dalam *organbath* sebesar 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*). Minyak atsiri jahe diberikan 5 menit sebelum pemberian seri kadar asetilkolin ( $10^{-8}$  -  $10^{-2}$  M). Data yang diperoleh dari uji ini adalah kurva hubungan antara seri konsentrasi asetilkolin dengan % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi dalam media larutan fisiologis *buffer Tyrode*. Apabila terjadi pergeseran % respon kontraksi otot polos ileum akibat pemberian minyak atsiri jahe, maka diduga minyak atsiri jahe memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh M<sub>3</sub>. Aktivitas antagonis tersebut dapat diukur dengan membandingkan nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin dengan dan tanpa perlakuan minyak atsiri jahe.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa minyak atsiri jahe (kadar 1 ppm dan 1,25 ppm) mampu menggeser kurva hubungan konsentrasi agonis dengan % respon kontraksi ke kanan. Pergeseran kurva ini bersifat tidak menurunkan efek maksimum ( $E_{max}$ ). Respon kontraksi otot polos ileum terisolasi 100% masih dapat tercapai pada pemberian asetilkolin sebesar  $2 \times 10^{-2}$  M. Pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos ileum tersaji pada Gambar 13. Pada perlakuan minyak atsiri jahe 1,25 ppm, terjadi pergeseran kurva ke kanan apabila dibandingkan dengan kurva seri kadar (kontrol asetilkolin), respon kontraksi belum terlihat sampai pada pemberian asetilkolin kadar sebesar

$2 \times 10^{-6}$  M. Hal yang berbeda dengan perlakuan jahe 1 ppm, kurva hubungan logaritma menunjukkan sedikit pergeseran ke kiri apabila dibandingkan dengan perlakuan jahe 1,25 ppm.



**Gambar 6.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian larutan jahe 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*). Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (seri kadar). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM.

Besar nilai  $pD_2$  kelompok kontrol, jahe 1 ppm, jahe 1,25 ppm tersebut berturut-turut adalah sebesar 6,17; 5,32 dan 5,18. Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, penurunan nilai  $pD_2$  kelompok jahe 1,25 ppm bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ). Sedangkan nilai  $pD_2$  untuk perlakuan jahe 1 ppm tidak berbeda signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Data penurunan nilai  $pD_2$  tersebut tersaji pada Tabel 5. Penurunan nilai  $pD_2$  ini menunjukkan bahwa jahe memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh  $M_3$ .

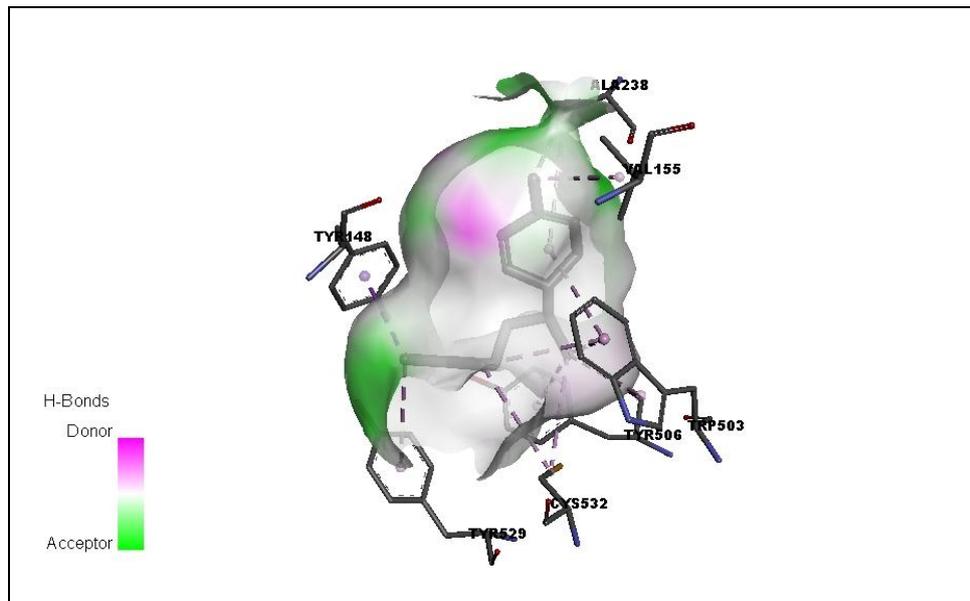
**Tabel 3.** Pergeseran nilai  $pD_2$  asetilkolin karena pengaruh jahe 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*). nilai  $pD_2$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM (n= 4 -10). (\*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai  $pD_2$  asetilkolin/kontrol, setelah diuji dengan *One Way ANOVA*, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

No	Kelompok Perlakuan	$pD_2$	$E_{maks}$ (%)
1	kontrol asetilkolin	$6,17 \pm 0,06$	$100 \pm 0,00$
2	jahe 1 ppm	$5,32 \pm 0,08^*$	$100 \pm 0,00$
3	jahe 1,25 ppm	$5,18 \pm 0,08^*$	$100 \pm 0,00$

Untuk memastikan kekuatan interaksi antara jahe dengan reseptor ACh  $M_3$  sebagai antagonis kompetitif dilakukan *docking* molekuler menggunakan aplikasi Autodock.

#### d. *Docking* Molekuler Jahe pada Reseptor ACh $M_3$

Setelah dilakukan validasi *Native Ligand* (tiotropium) terhadap reseptor ACh  $M_3$  dan diperoleh nilai RMSD sebesar 0,913 pada konformasi 2 ( $< 2,00 \text{ \AA}$ ) sehingga dapat diketahui protokol *docking* pada reseptor ACh  $M_3$  ini bersifat valid. Visualisasi hasil validasi *docking* molekuler pada reseptor ACh  $M_3$  dapat dilihat pada Gambar 14. Protokol *docking* ini selanjutnya dapat digunakan untuk melakukan *docking* ligan senyawa *marker* minyak atsiri jahe yaitu *zingiberene* terhadap reseptor ACh  $M_3$ .



**Gambar 7.** Posisi *Zingiberene* ketika terikat ke reseptor ACh M<sub>3</sub>. Visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, skor doking dari senyawa *zingiberene* pada reseptor ACh M<sub>3</sub> yg paling baik yaitu sebesar -8,0 dengan nilai RMSD 1,048 (<2.00 Å) yang terletak pada konformasi 2. Pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa *zingiberene* mengikat pada beberapa residu dari protein target (Gambar 14) yaitu *tyrosine* ke 529 (TYR529), *tyrosine* ke 148 (TYR148), *tyrosine* ke 506 (TYR506), *valine* ke 155 (VAL155), *alanine* ke 238 (ALA238), *cysteine* ke 532 (CYS532), *tryptophan* ke 503 (TRP503).

**e. Pengaruh Atropin terhadap Reseptor Asetilkolin Kontraksi Otot Polos Ileum**

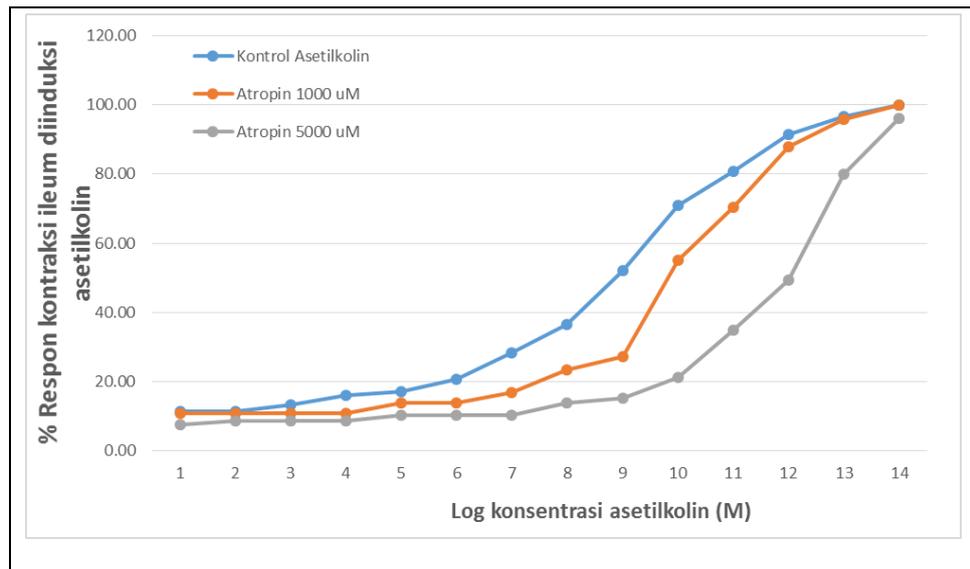
Tujuan dilakukannya uji atropin sebagai pembanding adalah untuk melihat apakah zat uji bisa berefek sama dengan obat asetilkolin yang digunakan sebagai kontrol positif.

Tabel 6 menunjukkan nilai  $pD_2$  mengalami penurunan % respon terhadap kontraksi otot polos ileum. Konsentrasi 5000  $\mu M$  atropin memberikan efek lebih besar terhadap penurunan  $pD_2$  sebesar 2,71 pada otot polos ileum marmut. Hal tersebut membuktikan dosis 5000  $\mu M$  atropin lebih efektif dalam menurunkan % respon kontraksi otot polos ileum dibandingkan dengan 1000  $\mu M$  atropin.

**Tabel 4. Pergeseran nilai  $pD_2$  asetilkolin karena pengaruh atropin 1000 dan 5000  $\mu M$ .** nilai  $pD_2$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM (n= 5 -10). Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) terhadap nilai  $pD_2$  asetilkolin/kontrol (\*), setelah diuji dengan *One Way* ANOVA, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

No	Kelompok Perlakuan	$pD_2$	$E_{maks}$ (%)
1	kontrol asetilkolin	4,19 $\pm$ 0,19	100 $\pm$ 0,00
2	Atropin 1000 $\mu M$	3,56 $\pm$ 0,13	100 $\pm$ 0,00
3	Atropin 5000 $\mu M$	2,71 $\pm$ 0,15*	100 $\pm$ 0,00

Gambar 15 menunjukkan uji atropin memberikan efek relaksasi dilihat dari pergeseran pada kurva. Bentuk kurva atropin pada dosis 1000  $\mu\text{M}$  dan 5000  $\mu\text{M}$  mencapai  $E_{max}$  100 %. Hal ini menandakan atropin merupakan antagonis kompetitif terhadap reseptor asetilkolin.



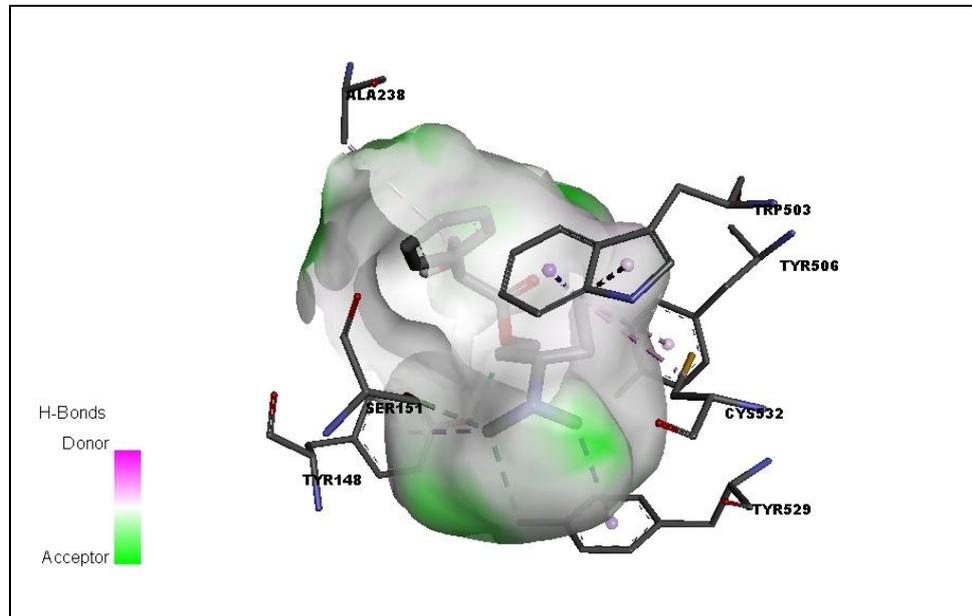
**Gambar 8.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian atropin 1000 dan 5000  $\mu\text{M}$ . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM (n = 6 - 12).

Untuk memastikan kekuatan interaksi antara atropin dengan reseptor ACh  $M_3$  sebagai antagonis kompetitif dilakukan *docking* molekuler menggunakan aplikasi Autodock.

#### f. *Docking* Molekuler Senyawa Pembanding pada Reseptor ACh $M_3$

Senyawa pembanding yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Atropine Sulfate*. Setelah *file* pdb dari senyawa *Atropine Sulfate* diperoleh maka dilakukan proses *docking* molekuler terhadap reseptor ACh  $M_3$ .

Visualisasi hasil validasi *docking* molekuler senyawa atropin pada reseptor ACh M<sub>3</sub> dapat dilihat pada Gambar 16.

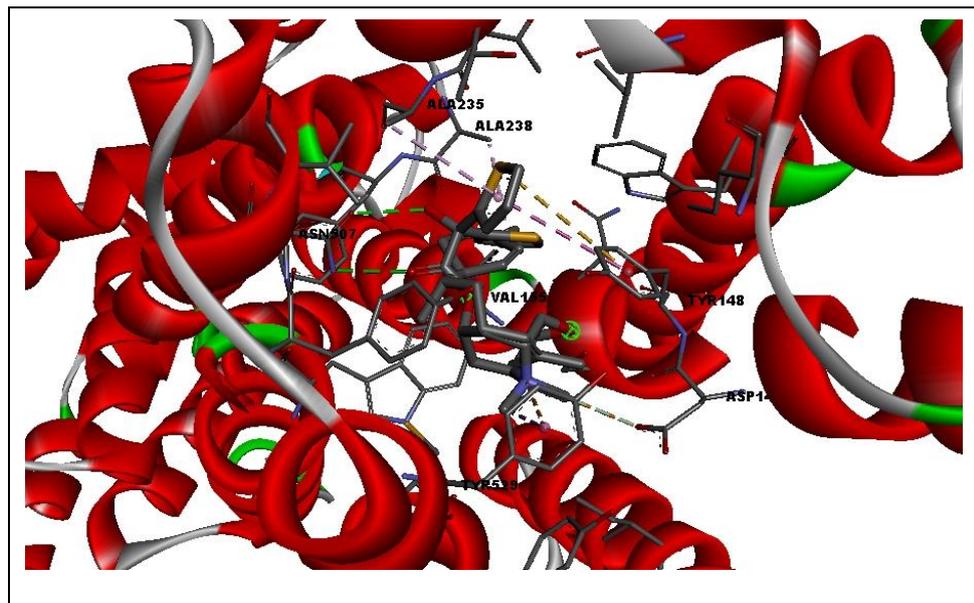


**Gambar 9.** Posisi senyawa Atropin ketika terikat ke reseptor ACh M<sub>3</sub>. Visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer.

Dari hasil visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer, skor *docking* dari senyawa *Atropine Sulfate* pada reseptor ACh M<sub>3</sub> yg paling baik yaitu sebesar -6,3 dengan nilai RMSD 1,498 Å (<2.00 Å) yang terletak pada konformasi ke 2 sehingga dapat diketahui protokol *docking* pada reseptor ACh M<sub>3</sub> ini bersifat valid. Pada hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa *Atropine Sulfate* mengikat pada beberapa residu dari protein target (Gambar 16) yaitu *alanine* ke 238 (ALA238), *tyrosine* ke 148 (TYR148), *tyrosine* ke 506 (TYR506) *tyrosine* ke 529 (TYR529), *serotonin* ke 151 (SER151), *cysteine* ke 532 (CYS532) dan *tryptophan* ke 503 (TRP503).

**g. Visualisasi hasil *docking* pada Reseptor ACh M<sub>3</sub>**

Setelah dilakukan proses *molecular docking* dan diperoleh validasi dan visualisasi dari *native ligand* dan senyawa uji *zingiberene* pada reseptor asetilkolin muskarinik (Kode protein 4DAJ), selanjutnya dilakukan visualisasi untuk melihat ikatan yang dihasilkan dari ligan asli maupun senyawa uji *zingiberene* pada reseptor asetilkolin muskarinik. Pada Gambar 17 dapat diketahui bahwa *native ligand* dan senyawa uji *zingiberene* mengikat pada tempat yang sama dan mengikat beberapa residu protein yang sama.

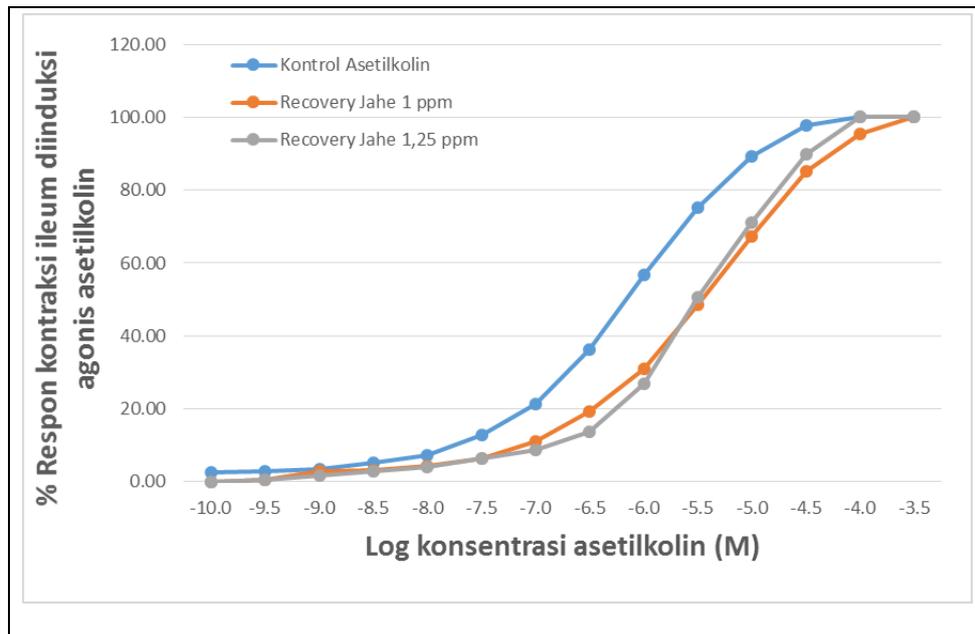


**Gambar 10.** Posisi *native ligand* dan *zingiberene* ketika terikat ke reseptor ACh M<sub>3</sub>. Visualisasi menggunakan aplikasi DS Visualizer.

#### **h. Uji Reversibilitas Jahe pada Reseptor ACh M<sub>3</sub> Otot Polos Ileum**

Uji reversibilitas minyak atsiri jahe terhadap reseptor ACh M<sub>3</sub> dilakukan untuk mengetahui kemampuan disosiasi ikatan minyak atsiri jahe dengan reseptor ACh M<sub>3</sub> otot polos ileum. Untuk melepaskan ikatan minyak atsiri jahe, dilakukan pencucian otot polos ileum dengan penggantian larutan *buffer Tyrode* setiap 5 menit selama 30 menit. Data yang diperoleh dari tahapan ini adalah kurva % respon kontraksi uji reversibilitas jahe 1 ppm dan 1,25 ppm (Gambar 18).

Pada Gambar 18, terlihat profil kurva respon kontraksi kelompok jahe 1 ppm dan 1,25 ppm relatif sama. Kurva kelompok kontrol jika dibandingkan dengan kurva kelompok jahe 1 ppm dan 1,25 ppm terjadi pergeseran kurva ke kanan. Oleh karena itu diketahui bahwa respon kontraksi maksimal otot polos ileum semua kelompok masih dapat dicapai pada konsentrasi asetilkolin  $2 \times 10^{-2}$  M. Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin pada uji reversibilitas jahe tersaji pada Tabel 7. Nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin mengalami penurunan yang signifikan pada saat uji reversibilitas jahe. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa, dengan pencucian setiap 5 menit selama 30 menit ikatan jahe dengan reseptor ACh M<sub>3</sub> masih belum terlepas total.



**Gambar 11.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi pada uji reversibilitas jahe 1 ppm dan 1,25 ppm terhadap reseptor ACh M<sub>3</sub>. Persentase respon kontraksi 100% diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM.

**Tabel 5.** Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin pada uji reversibilitas jahe 1 ppm dan 1,25 ppm terhadap reseptor ACh M<sub>3</sub>. nilai pD<sub>2</sub> disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM (n= 4 -10). (\*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna (p<0,05) terhadap nilai pD<sub>2</sub> asetilkolin/kontrol, setelah diuji dengan *One Way ANOVA*, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

No	Kelompok Perlakuan	pD <sub>2</sub>	E <sub>maks</sub> (%)
1	kontrol asetilkolin	6,17 ± 0,06	100 ± 0,00
2	recovery jahe 1 ppm	5,49 ± 0,10*	100 ± 0,00
3	recovery jahe 1,25 ppm	5,53 ± 0,05*	100 ± 0,00

## **B. Pembahasan**

Pada penelitian terdahulu, telah dilakukan sebuah uji secara *in vitro* mengenai aktivitas antispasmodik dari pemberian Jahe (*Zingiber officinale*). Penelitian ini menggunakan jejunum dari hewan uji tikus. Efek antispasmodik jelas terjadi pada percobaan *in vitro* pada jejunum tikus ini karena mengurangi besarnya kontraksi induksi ACh. Jahe memiliki beberapa efek kardiovaskular dan gastrointestinal sebagai anti ulkus, efek antispasmodik dan anti-emetik. Sebuah penelitian lain juga meneliti tentang pengaruh pemberian ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale roscoe varr Rubrum*) terhadap kadar glukosa darah puasa dan postprandial pada tikus diabetes. Kandungan fenol yang ada dalam ekstrak jahe merah memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi yang akan mengurangi radikal bebas dan proses inflamasi pada pankreas yang disebabkan oleh induksi aloksan. Oleh karena itu, ekstrak jahe merah memiliki kemampuan dalam menurunkan kadar gula darah pada penderita diabetes melitus

Reseptor asetilkolin muskarinik (ACh M<sub>3</sub>) adalah reseptor terikat protein G<sub>q</sub> dan merupakan subtipe reseptor ACh M<sub>3</sub> yang bertanggung jawab terhadap pengaturan motilitas otot polos saluran pencernaan. Selain ditemukan pada saluran gastrointestinal, reseptor ini juga ditemukan pada berbagai otot polos, kelenjar eksokrin, otak dan mata. Atropin diketahui juga memiliki efek antikolinergik (Bousquet, 2002). Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) juga memiliki aktivitas antikolinergik.

Penelitian aktivitas minyak atsiri jahe sebagai antagonis ACh M<sub>3</sub> ini dilakukan dengan menggunakan otot polos ileum dalam media larutan fisiologis

*buffer Tyrode* pada alat organ terisolasi. Metode organ terisolasi adalah suatu metode dalam percobaan farmakologi yang dapat digunakan untuk menganalisis hubungan konsentrasi dengan respon suatu senyawa obat. Dengan metode ini, konsentrasi agonis dan antagonis reseptor pada tingkat jaringan dapat diketahui secara pasti. Metode ini mempunyai kemampuan untuk mengukur efek sampai pada efek dengan intensitas maksimum. Hal ini tidak sepenuhnya dapat dilakukan ketika menggunakan organisme utuh (pengujian secara *in vivo*). Selain itu, metode ini juga dapat mengukur konsentrasi agonis terkecil yang dapat menginduksi respon biologis. Di samping beberapa kelebihan tersebut, metode ini memiliki beberapa kelemahan. Larutan fisiologis *buffer Tyrode* yang digunakan tidak sepenuhnya sama dengan cairan fisiologis dalam tubuh, sehingga lama kelamaan akan mematikan jaringan. Selain itu, isolasi organ dalam alat ini akan mengakibatkan hilangnya fungsi regulasi fisiologis pada organ tersebut. (Lullmann *et al.*, 2000). Fungsi regulasi dari enzim yang terlibat dalam degradasi histamin, asetilkolin, dan serotonin (induktor kontraksi otot polos ileum) juga akan hilang pada saat fase ekuilibriasi metode ini. Pada akhirnya, respon kontraksi-relaksasi otot polos ileum yang merupakan fungsi homeostasis normal pada organ ini tidak terbaca lagi pada detektor.

Penelitian ini dilakukan pada reseptor ACh M<sub>3</sub>. Agonis yang digunakan pada penelitian ini adalah asetilkolin. Asetilkolin dapat terikat pada reseptor ACh M<sub>3</sub> otot polos ileum dan akan memicu terjadinya kontraksi otot polos ileum. Mekanisme molekuler terjadinya kontraksi otot polos diakibatkan oleh pelepasan Ca<sup>2+</sup> dari retikulum sarkoplasma/endoplasma (*calcium-store*). Apabila terjadi

rangsangan suatu agonis terhadap reseptor terhubung protein G, maka akan terjadi pelepasan  $\text{Ca}^{2+}$  dari *calcium-store* terjadi melalui jalur fosfolipase C (PLC). Pelepasan  $\text{Ca}^{2+}$  dari *calcium-store* mengakibatkan peningkatan kadar  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler dan akhirnya akan menginduksi terjadinya kontraksi otot polos.

Dari hasil penelitian diketahui pemberian minyak atsiri jahe dosis 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*) mampu menghambat respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi asetilkolin. Hal ini terlihat dengan terjadinya pergeseran kurva respon kontraksi otot polos ileum terisolasi ke arah kanan dengan pola tergantung dosis. Harga  $\text{pD}_2$  asetilkolin juga mengalami pergeseran akibat praperlakuan dengan minyak atsiri jahe. Harga  $\text{pD}_2$  asetilkolin bergeser signifikan dari 6,17 menjadi 5,18 (dosis minyak atsiri jahe 1,25 ppm). Pada dosis minyak atsiri jahe 1 ppm terjadi pergeseran  $\text{pD}_2$  dari 6,17 menjadi 5,32, namun pergeseran ini bersifat tidak signifikan. Hal ini memperlihatkan pada kadar 1 ppm minyak atsiri jahe belum efektif sebagai antagonis ACh  $\text{M}_3$ , kadar efektifnya adalah 1,25 ppm.

Meskipun minyak atsiri jahe bertindak sebagai antagonis ACh  $\text{M}_3$ , respon maksimum ( $E_{\text{maks}}$ ) tetap dapat tercapai dengan pemberian agonis asetilkolin dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Pemberian asetilkolin dengan konsentrasi tertinggi pada reseptor akan menghasilkan respon maksimum kembali setelah sebelumnya respon kontraksi dihambat oleh minyak atsiri jahe. Dari hasil tersebut diketahui bahwa sifat antagonisme minyak atsiri jahe pada reseptor ACh  $\text{M}_3$  bersifat kompetitif. Hasil uji reversibilitas diketahui bahwa ikatan minyak atsiri jahe terhadap reseptor ACh  $\text{M}_3$  masih belum terdisosiasi total apabila dilakukan

pencucian menggunakan larutan *buffer tyrode* setiap 5 menit selama 30 menit. Untuk mengetahui secara lebih dalam mengenai kekuatan ikatan minyak atsiri jahe pada reseptor ACh M<sub>3</sub>, penelitian ini dilanjutkan dengan *docking* menggunakan aplikasi Autodock.

Struktur molekul ACh M<sub>3</sub> diunduh dari situs [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) berupa berkas pdb (*protein database*) dengan kode protein yaitu 4DAJ. Sebelum proses validasi dilakukan, reseptor ACh M<sub>3</sub> harus dipreparasi terlebih dahulu dengan cara menambahkan atom H. Hal ini dikarenakan *file* reseptor tersebut belum mengandung atom H. *Native ligand* dari reseptor ACh M<sub>3</sub> adalah tiotropium. Senyawa ini merupakan golongan antagonis kolinergik yang memiliki inti tropan. Setelah dilakukan proses validasi diperoleh nilai RMSD sebesar 0,913 dengan skor *docking* -9,1 pada konformasi 2. Nilai RMSD yang dikatakan valid adalah <2.00 Å sehingga dapat dikatakan bahwa sistem *docking* tersebut bersifat valid.

Pada tahapan *docking* senyawa *marker* minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) yaitu senyawa *zingiberene* ke reseptor ACh M<sub>3</sub> diperoleh skor *docking* sebesar -8,0. Skor *docking* ini berada dibawah skor *native ligand* (skor *docking* sebesar -9,1). Sehingga diketahui ikatan *zingiberene* dengan reseptor ACh M<sub>3</sub> bersifat lebih lemah jika dibandingkan dengan tiotropium.

Antagonis ACh M<sub>3</sub> yang digunakan sebagai pembanding adalah *Atropine Sulfate*. Atropin adalah antagonis ACh M<sub>3</sub> yang sering digunakan untuk menimbulkan efek midriasis pada otot mata. Mekanisme kerja atropin adalah memblok aksi kolinomimetik pada reseptor muskarinik secara *reversible* (tergantung jumlahnya) yaitu, hambatan oleh atropin dalam dosis kecil dapat diatasi

oleh asetilkolin atau agonis muskarinik yang setara dalam dosis besar. Hal ini menunjukkan adanya kompetisi untuk memperebutkan tempat ikatan. Hasil ikatan pada reseptor muskarinik adalah mencegah aksi seperti pelepasan IP3 dan hambatan adenilil siklase yang diakibatkan oleh asetilkolin atau antagonis muskarinik lainnya (Jay dan Kirana, 2002).

Apabila dibandingkan skor *docking*nya dengan atropin sebagai senyawa pembanding, ternyata ikatan *zingiberene* dengan reseptor ACh M<sub>3</sub> bersifat lebih kuat (skor *zingiberene*: -8,0). Skor *docking* atropin adalah -6,3, sehingga diprediksi ikatan *zingiberene* ke reseptor ACh M<sub>3</sub> bersifat lebih kuat dibanding ikatan dari senyawa pembanding tersebut ke reseptor ACh M<sub>3</sub>.

Dari uji *in silico* dan *in vitro* yang telah dilakukan dapat dibandingkan hasilnya bahwa minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) diduga berperan sebagai agen anti-emetik. Pada uji *in silico* yaitu *docking* minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) dengan senyawa *marker zingiberene* yang diperoleh dari hasil analisis kandungan dengan metode GC-MS ke reseptor asetilkolin muskarinik (ACh M<sub>3</sub>) memiliki skor *docking* sebesar -8,0 dengan nilai RMSD 1,048 (<2,00Å) dan dibandingkan dengan *docking* ligan asli dari reseptor ACh M<sub>3</sub> (tiotropium) yaitu senyawa *marker zingiberene* (senyawa uji) mengikat residu yang sama dengan tiotropium (*native ligand*) yaitu *tyrosine* ke 529. Begitu pula pada uji *in vitro*, hal ini dibuktikan dengan adanya pergeseran % respon kontraksi otot polos ileum marmut (*Cavia cobaya*) ke arah kanan, maka dapat dikatakan bahwa minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor asetilkolin muskarinik (ACh M<sub>3</sub>).