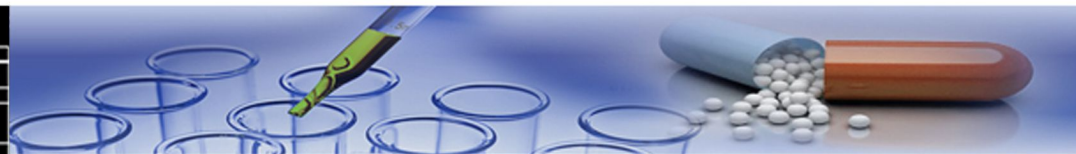


2020



[ISSN: 2356-1971]
[e-ISSN: 2406-856X]

I JPST.or.id

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology

Jurnal Ilmu dan Teknologi Farmasi Indonesia

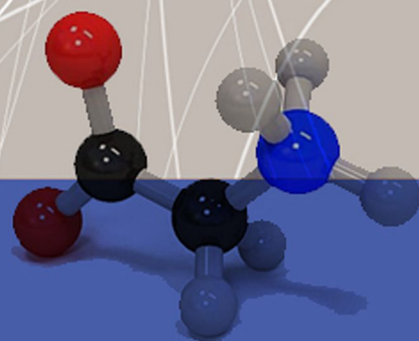
Volume

7

No.1

February 2020

<http://ijpst.or.id>





Differences of Respiratory Rate between Salbutamol and Aminophylline in Exacerbation Asthma

Amelia Lorensia^{1*}, Zullies Ikawati², Tri M. Andayani², Daniel Maranatha³

¹Department of Clinical Pharmacy-Community, Faculty of Pharmacy, University of Surabaya, Indonesia

²Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Indonesia

³Department of Pulmonology and Respiratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Airlangga, Surabaya

Submitted 12 June 2018; Revised 13 May 2019; Accepted 21 August 2019; Published 03 February 2020

*Corresponding author: amelia.lorensia@gmail.com

Abstract

Exacerbation of asthma is a progressive step in progressive breathing, coughing, wheezing, breathing. In Indonesia salbutamol nebulation is used for the therapy of the first exacerbation attack. The effectiveness of asthma exacerbation therapy needs to be monitored and one of the monitoring parameters that is easily seen is the rate of breath. The aim of this study was to investigate the difference in respiratory rate values using salbutamol nebulisation and intravenous aminophylline in patients with asthma exacerbations in hospitals in Surabaya. The research was conducted by using quasi experimental method and data collection by purposive sampling. Analysis of the data to be used is a independent t-test. The results showed that the salbutamol group decreased respiratory rate by 50.00%, there were also patients who experienced an increase of breath rate of 13.64%. In the aminophylline group experienced a decrease in respiratory rate of 43.75% with an increase of breath rate of 18.75%. From the results of the study, it is necessary to monitor the effectiveness and the need to monitor the unwanted reactions of both treatments so that the therapies produced in the treatment of asthma exacerbations are more effective.

Keywords: Aminophylline, exacerbation asthma, respiratory rate, salbutamol

Perbedaan Nilai Laju Nafas antara Salbutamol dan Aminofilin pada Eksaserbasi Asma

Abstrak

Eksaserbasi asma merupakan tahap peningkatan sesak napas secara progresif, batuk, mengi, sesaknapas. Di Indonesia salbutamol nebulasi digunakan untuk terapi serangan eksaserbasi pertama. Efektifitas terapi eksaserbasi asma perlu monitoring dan salah satu parameter monitoring yang mudah dilihat adalah laju nafas. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan nilai laju nafas yang menggunakan salbutamol nebulasi dan aminofilin intravena pada pasien dengan eksaserbasi asma di rumah sakit di Surabaya. Penelitian dilakukan menggunakan metode kuasi eksperimental dan pengambilan data dengan cara purposive sampling. Analisa data yang akan digunakan adalah uji t-test bebas. Hasil penelitian menunjukkan kelompok salbutamol yang mengalami penurunan nilai laju nafas sebanyak 50,00%, terdapat juga pasien yang mengalami kenaikan nilai laju nafas sebanyak 13,64%. Pada kelompok aminofilin yang mengalami penurunan nilai laju nafas sebanyak 43,75% yang mengalami kenaikan nilai laju nafas sebanyak 18,75%. Dari hasil penelitian menunjukkan, perlu adanya monitoring efektifitas dan perlu adanya monitoring reaksi yang tidak dikehendaki dari kedua pengobatan tersebut supaya terapi yang dihasilkan dalam penanganan eksaserbasi asma lebih efektif.

Kata Kunci: Aminofilin, eksaserbasi asma, laju nafas, salbutamol

1. Pendahuluan

Asma memiliki gejala mengi, sesak nafas, dada terasa tertekan benda berat, dan batuk. Gejala asma dapat menyebabkan eksaserbasi asma yang merupakan tahap peningkatan gejala yang perlu penanganan cepat karena dapat berisiko menyebabkan kematian.¹

Efektifitas terapi eksaserbasi asma perlu pemantauan secara terus menerus, dan salah satu parameter yang paling mudah adalah laju nafas, yang akan mengalami peningkatan pada eksaserbasi asma. Laju nafas merupakan salah satu tanda vital dalam pemeriksaan fisik saat eksaserbasi asma.¹ Peningkatan laju nafas merupakan proses kompensasi paru-paru supaya mendapatkan oksigen dalam jumlah yang dibutuhkan.^{2,3} Peningkatan laju nafas menjadi salah satu indikator kebutuhan perawatan darurat.^{4,5} Namun perubahan laju nafas juga dapat disebabkan pengobatan asma seperti terapi asma dengan golongan kortikosteroid,⁶ beta-2 agonis (salbutamol),⁷⁻⁹ atau metilsantin.¹⁰⁻¹²

Salbutamol nebulasi dikenal sebagai lini pertama pengobatan eksaserbasi asma.^{1,13} Selain salbutamol nebulasi, aminofilin/teofilin merupakan obat yang sering digunakan pada serangan asma,¹⁴⁻¹⁸ dan terdaftar dalam DOEN (2013) sebagai salah satu terapi eksaserbasi asma dengan pemberian intravena.¹³ Aminofilin merupakan *pro-drug* teofilin, memiliki efek bronkodilator dan anti inflamasi dalam mengatasi gejala asma.¹⁹ Aminofilin terbukti aman dan efektif dalam pengobatan eksaserbasi asma.¹⁴⁻¹⁸

Aminofilin merupakan obat dengan rentang terapi sempit yang berisiko menyebabkan efek samping.^{20,21} Oleh karena itu penggunaannya di luar negeri sudah jarang digunakan karena efek samping yang ditimbulkan dan efektifitas cenderung kecil dibandingkan salbutamol.¹

Berbeda di Indonesia, aminofilin justru memberikan efektifitas baik dan kejadian efek samping yang jarang,¹⁴⁻¹⁸ bahkan cenderung tidak berbeda.^{18,22} Hal ini dapat disebabkan efek obat yang bersifat individual, dimana faktor genetik akan sangat berpengaruh dalam respon obat di dalam tubuh.²

Pada penelitian ini nilai laju nafas dibagi menjadi beberapa kategori: bradipnea (<12x/menit), takipnea (>20 x/menit), dan normal (12-20 x/menit).²³ Namun selain karena tingkat keparahan eksaserbasi asma, obat yang digunakan untuk terapi asma juga dapat menyebabkan efek samping berupa peningkatan laju nafas, baik pada salbutamol nebulasi^{24,25} dan aminofilin intravena.^{26,27}

Efek obat ini dapat mengganggu pemantauan efektifitas terapi eksaserbasi asma pada parameter laju nafas. Sehingga diperlukan penelitian untuk mengetahui perbedaan terapi aminofilin intravena dibandingkan dengan salbutamol nebulasi dalam mempengaruhi nilai laju nafas pada eksaserbasi asma.

2. Metode

2.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah kuasi eksperimental. Setiap rumah sakit hanya mendapatkan satu perlakuan untuk terapi eksaserbasi asma yang sama pada semua subjek, yaitu terapi asma dengan nebulasi salbutamol (terapi B) atau terapi aminofilin intravena (terapi A). Penelitian ini dilakukan pada Januari 2014 sampai Juni 2016.

2.2. Populasi dan Sampel (Subjek) Penelitian

Populasi adalah semua pasien yang mengalami eksaserbasi asma di rumah sakit di Surabaya. Sampel penelitian (subjek penelitian) adalah semua pasien dengan eksaserbasi asma di semua rumah sakit di Surabaya yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

Kriteria inklusi: usia dewasa (≥ 18 tahun)²⁸ dan tingkat eksaserbasi asma ringan-sedang.¹ Sedangkan kriteria eksklusi: menggunakan kontrasepsi oral; hamil/menyusui; gangguan fungsi ginjal/hati kronis; perokok; dan memiliki gangguan pernafasan lain.

2.3. Prosedur Kerja

Subjek penelitian terbagi menjadi dua kelompok yang masing-masing subjek akan mendapatkan terapi eksaserbasi asma selama

1 jam,¹ yaitu:

Kelompok A. Pada kelompok ini, diberikan aminofilin intravena, *loading dose* 6mg/kg/jam selama 20 secara perlahan, kemudian dilanjutkan dosis pemeliharaan dengan infus (NaCl 0,9%) sebesar 5 mcg/kg/jam.²⁹⁻³¹

Kelompok B. Pada kelompok ini, diberikan salbutamol nebulasi dosis 2,5 mg atau 2 ml dari 0,5% (+ 2 ml saline).¹

Penghitungan *respiratory rate* dilakukan sebelum pasien mendapatkan terapi (t_0) dan satu jam setelah mendapatkan terapi (t_1).

Analisa data yang akan digunakan adalah uji t-test bebas, untuk membandingkan laju nafas saat jam ke-0 (t_0) dan jam ke-1 (t_1) antara kelompok A dan B. Penelitian ini telah mendapatkan izin etik dari rumah sakit terkait dengan nomor 01/EC/KERS/2014.

3. Hasil

Terdapat pasien eksaserbasi asma yang menolak atau tidak dapat terlibat di dalam

penelitian dengan alasan yang dapat dilihat pada Tabel 1. Penelitian ini melibatkan 27 orang subjek penelitian pada kelompok A (aminofilin intravena) dan 30 orang pada kelompok B (salbutamol nebulasi), dengan deskriptif lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 2.

Baseline awal laju nafas antara kelompok A (rata-rata: 21,30) dan kelompok B (rata-rata: 24,37) sama-sama diatas rentang normal. Setelah mendapatkan terapi eksaserbasi asma selama 1 jam, kedua kelompok mengalami peningkatan nilai laju nafas, pada kelompok A rata-rata meningkat 0,59 poin dan kelompok B meningkat 2,37 poin (Tabel 3).

Tabel 3 menggambarkan perincian perubahan laju. Perubahan laju nafas yang paling banyak dialami subjek penelitian adalah peningkatan laju nafas baik pada kelompok A (44,44%) dan kelompok B (53,33%). Tabulasi silang kaitan antara karakteristik dan perubahan laju nafas dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 1. Kriteria Eksklusi dan *Drop Out*

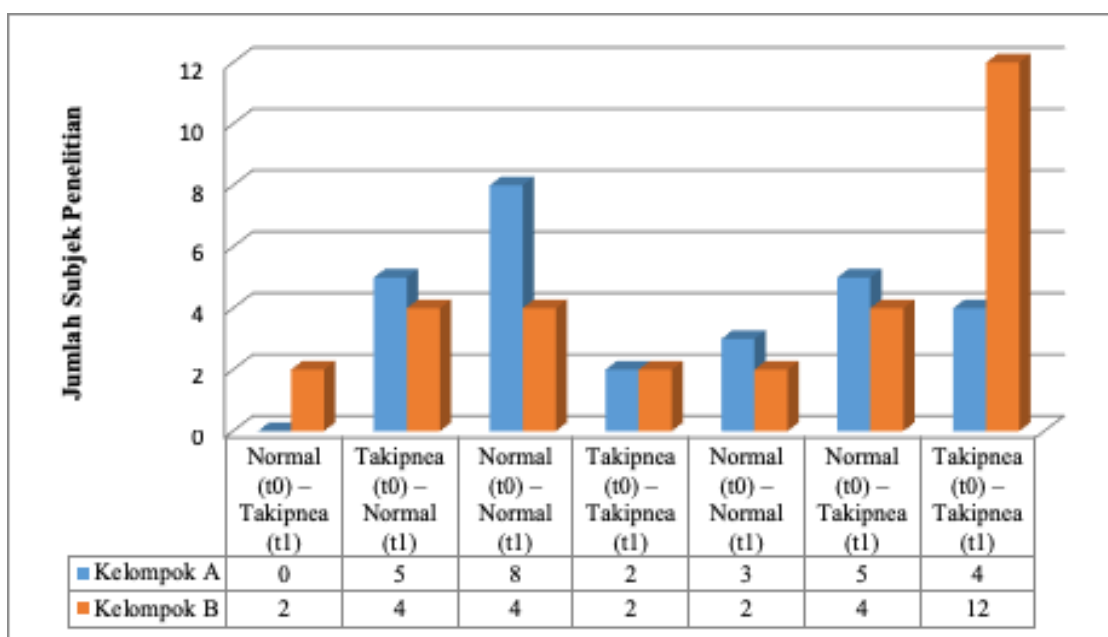
Kriteria Eksklusi	Jumlah Pasien
Hamil	4
usia ≤ 18 tahun	5
Mempunyai penyakit hati kronis	4
Mempunyai penyakit jantung koroner	3
Mempunyai penyakit PPOK (Penyakit Paru Obstruktif Kronis)	9
Mempunyai penyakit tuberkulosis	3
Perokok	2
Total	30
Kriteria Drop Out	Jumlah Pasien
Mendapat terapi asma lain	2
Tidak dapat diinjeksi	2
Total	4
Alasan Pasien menolak	Jumlah Pasien
Takut jarum suntik	10
Buru-buru	5
Tidak diijinkan keluarga	7
Pasien tidak memberi alasan jelas	2
Total	24

Tabel 2. Karakteristik

Karakter <i>Baseline</i>	Keterangan	Kelompok A (n=27)		Kelompok B (n=30)		Homogenitas Nilai p
		Jumlah	Persentase (%)	Jumlah	Persentase (%)	
Jenis Kelamin	Perempuan	14	50,85	19	63,33	0,176
	Laki-laki	13	48,15	11	36,67	
Usia (tahun)	Remaja akhir(17-25)	5	18,52	7	23,33	0,075
	Dewasa awal(26-35)	5	18,52	5	16,67	
	Dewasa akhir(36-45)	7	25,93	5	16,67	
	Lansia awal(46-55)	8	29,63	6	20,00	
	Lansia akhir(56-65)	2	7,41	6	20,00	
	>65	0	0,00	1	3,33	
	Rata-rata	40,11		40,83		
Penyakit Penyerta	dislipidemia, diabetes tipe 2	0	0,00	1	3,33	0,000
	dislipidemia, hiperurisemia	0	0,00	1	3,33	
	diabetes tipe 2, gastritis	0	0,00	1	3,33	
	gastritis	0	0,00	1	3,33	
	Tidak ada	27	100,00	26	86,67	
Pekerjaan	Ibu rumah tangga	10	37,04	10	33,33	0,854
	Wiraswasata	9	33,33	10	33,33	
	Karyawan	4	14,81	5	16,67	
	pelajar-mahasiswa	4	14,81	4	13,33	
	tidak bekerja	0	0,00	1	3,33	

Keterangan:

Bila nilai $p > 0,05$ artinya data tidak ada perbedaan antara kelompok A dan kelompok B

**Gambar 1.** Perubahan laju nafas

Tabel 3. Nilai Laju Nafas

	Klasifikasi Perubahan Laju Nafas (x/menit)	Kelompok				Total	Uji Beda Nilai p
		Kelompok A (n=27)		Kelompok B (n=30)			
		Jumlah	Persentase (%)	Jumlah	Persentase (%)		
t_0	Bradipnea	0	0,00	0	0,00	0	0,235
	Normal	16	59,26	12	40,00	28	
	Takipnea	11	40,74	18	60,00	29	
	Rata-rata	21,30		24,37			
t_1	Bradipnea	0	0,00	0	0,00	0	0,141
	Normal	16	59,26	12	40,00	28	
	Takipnea	11	40,74	18	60,00	29	
	Rata-rata	20,70		22,00			
$t_0 - t_1$	Turun	5	18,52	8	26,67	13	0,245
	Tetap	10	37,04	6	20,00	16	
	Naik	12	44,44	16	53,33	28	

Keterangan:

Bila nilai $p > 0,05$ artinya data tidak ada perbedaan antara kelompok A dan kelompok B

t_0 = waktu awal sebelum diberikan terapi eksaserbasi asma (aminofilin intravena atau salbutamol nebulasi)

t_1 = waktu awal sesudah diberikan terapi eksaserbasi asma (aminofilin intravena atau salbutamol nebulasi)

$t_0 - t_1$ = perubahan/ selisih sesudah dengan sebelum diberikan terapi eksaserbasi asma (aminofilin intravena atau salbutamol nebulasi)

4. Pembahasan

Aminofilin merupakan penghambat sintesis dan sekresi mediator inflamasi yang mempunyai efektif melemaskan otot polos saluran napas, sehingga dapat mengurangi inflamasi kronik saluran napas. Gejala asma

yang timbul seperti sesak napas dan rasa sesak di dada dapat terlihat dari kenaikan nilai laju nafas pada pasien yang mengalami eksaserbasi asma. Obat golongan *Short-Acting Beta2 Agonis* (SABA) termasuk salbutamol merupakan pilihan terapi yang

Tabel 4. Perubahan Laju Nafas

	Klasifikasi Perubahan Laju Nafas (t_1-t_0)	Kelompok				Total
		Kelompok A (n=27)		Kelompok B (n=30)		
		Jumlah	Persentase (%)	Jumlah	Persentase (%)	
Turun	Normal(t_0)–Takipnea(t_1)	0	0,00	2	6,67	2
	Takipnea(t_0)–Normal(t_1)	5	18,52	4	13,33	9
	TOTAL	5	18,52	8	26,67	13
Tetap	Normal(t_0)–Normal(t_1)	8	29,63	4	13,33	12
	Takipnea(t_0)–Takipnea(t_1)	2	7,41	2	6,67	4
	TOTAL	10	37,04	6	20,00	16
Naik	Normal(t_0)–Normal(t_1)	3	11,11	2	6,67	5
	Normal(t_0)–Takipnea(t_1)	5	18,52	4	13,33	9
	Takipnea(t_0)–Takipnea(t_1)	4	14,81	12	40,00	16
	TOTAL	12	44,44	16	53,33	28

Tabel 5. Tabulasi Silang Karakteristik dan Perubahan Laju Nafas

Karakter <i>Baseline</i>	Keterangan	Kelompok					
		Kelompok A (n=27)			Kelompok B (n=30)		
		Perubahan Nilai Laju Nafas t_0-t_1			Perubahan Nilai Laju Nafas t_0-t_1		
		Turun	Tetap	Naik	Turun	Tetap	Naik
Jenis Kelamin	Perempuan	6	4	1	8	2	3
	Laki-laki	1	2	2	6	2	1
Usia (tahun)	Remaja akhir(17-25)	2	1	0	3	1	2
	Dewasa awal(26-35)	0	2	1	2	0	0
	Dewasa akhir(36-45)	2	1	1	3	0	1
	Lansia awal(46-55)	2	2	1	2	2	0
	Lansia akhir(56-65)	1	0	0	4	0	1
>65	0	0	0	1	0	0	

digunakan untuk mengurangi gejala-gejala asma tersebut.^{1,19}

Faktor-faktor yang mempengaruhi perubahan nilai laju nafas adalah jenis kelamin dan usia. Pada umumnya laki-laki melakukan kegiatan lebih banyak daripada perempuan, sehingga tingginya energi yang dibutuhkan membutuhkan banyak oksigen supaya laju metabolisme tubuh meningkat sehingga laki-laki memiliki nilai laju nafas yang lebih tinggi daripada perempuan. Dan semakin bertambahnya usia seseorang nilai laju nafas mengalami penurunan hal ini berhubungan dengan kebutuhan energi yang semakin berkurang balita, anak-anak, dan remaja adalah masa pertumbuhan fisik yang butuh energi yang banyak. Sehingga laju metabolisme di dalam tubuh lebih cepat sehingga oksigen yang dibutuhkan lebih banyak.³² Adapun faktor lain yang dapat mempengaruhi perubahan laju nafas seperti stress dan keadaan cemas.^{33,34}

Hasil penelitian ini tidak terdapat perbedaan signifikan nilai laju nafas yang antara kedua kelompok. Pada kelompok A, yang mengalami penurunan nilai laju nafas (membaik) sebanyak 43,75% sedangkan pasien dengan nilai tetap sebanyak 33,33%. Sebaliknya pada kelompok B yang mengalami peningkatan nilai laju nafas sebanyak 53,33% dan 2 orang diantaranya mengalami peningkatan nilai hingga >20x/menit. Hal ini diduga pasien mengalami efek samping salbutamol.

Laju nafas merupakan salah satu tanda vital dalam pemeriksaan fisik saat eksaserbsi asma.¹ Terdapat penelitian terdahulu yang melibatkan laju nafas sebagai parameter penelitian, Hardasmalani et al. (2005)³⁵ yang membandingkan levalbuterol dan albuterol nebulasi untuk pengobatan eksaserbsi asma pada pasien anak. Peningkatan laju nafas merupakan proses kompensasi paru-paru supaya tetap mendapatkan oksigen dalam jumlah yang dibutuhkan.³⁶

5. Simpulan

Tidak ada perbedaan nilai laju nafas pada penggunaan terapi aminofilin intravena dan salbutamol nebulasi pada eksaserbsi asma.

Daftar Pustaka

1. The Global Initiative for Asthma. Update of the GINA report:Global strategy for asthma management and prevention,2017.
2. Roden DM, Wilke RA, Kroemer HK, Stein CM. Pharmacogenomics:The Genetics of Variable Drug Responses. *Circulation*.2011;123(15):1661-1670.
3. Smith I, Mackay J, Fahrid N, Krucke D. Respiratory Rate Measurement:a Comparison of Methods. *British Journal of Helahcare Assistants*.2011;5(1):18-23.
4. Adams JY, Sutter ME, Albertson TE. The Patient with Athma in the Emergency Departement. *Clinic Rev Allerg Immunol*.2012;43(2-1):14-29.

5. Soubra SH, Kalapalatha K, Guntupalli. Acute Respiratory Failure in Asthma. 2009;9(4):225-234.
6. Stroeder J, Evans C, Mansell H. Corticosteroid-induced bradycardia. *Can Pharm J (Ott)*.2015;148(5):235–240.
7. Khorfan FM, Smith P, Watt S, Barber KR. Effects of nebulized bronchodilator therapy on heart rate and arrhythmias in critically ill adult patients.*Chest*. 2011;140(6):1466-1472.
8. Kenyon CC, Fieldston ES, Luan X, Keren R, Zorc JJ. Safety and Effectiveness of Continuous Aerosolized Albuterol in the Non-Intensive Care Setting. *Pediatrics*.2014;134(4):e976-e982.
9. Prakash S, Sharma S, Miglani S, Gogia AR. Management of Intraoperative Penile Erection with Salbutamol Aerosol. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*.2012;28(3):402-403.
10. Henderson-Smart DJ, De Paoli AG. Prophylactic methylxanthine for prevention of apnoea in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*.2010;(12):CD000432.
11. Schoen K, Yu T, Stockmann C, Spigarelli MG, Sherwin CMT. Use of Methylxanthine Therapies for the Treatment and Prevention of Apnea of Prematurity. *Paediatr Drugs*.2014; 16(2):169-177.
12. Bioh G, Gallagher MM, Prasad U. Survival of a Highly Toxic Dose of Caffeine. *BMJ Case Rep*.2013; bcr2012007454.
13. Kementerian Kesehatan RI. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 312/MENKES/SK/IX/2013, tentang Daftar Obat Essensial 2013. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
14. Lorensia A, Wahjuningsih E, Canggih B, Lisiska N. Pharmacist's Strategies in Treating Asthma Bronchiale Outpatient. *Jurnal of Tropical Pharmacy and Chemistry*.2011;1(3):177-191.
15. Lorensia A, Amalia RA. Studi Farmakovigilans Pengobatan Asma pada Pasien Rawat Inap di suatu Rumah Sakit di Bojonegoro. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 2015;1(1):8-18.
16. Lorensia A, Wahjuningsih E, Supriadi, 2012. Keamanan Penggunaan Aminofilin pada Asma di Rumah Sakit Delta Surya Sidoarjo. *Indonesia journal of Clinical Pharmacy*.2012;1(4):154-161.
17. Lorensia A, Wijaya RI. Hubungan Jumlah Obat yang Digunakan Terhadap Risiko Terjadinya Drug-Related Problems pada Pasien Asma di Suatu Rumah Sakit di Surabaya. *Jurnal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 2016;3(3):232-238.
18. Lorensia A, Ikawati Z, Andayani TM, Maranatha D, Wahjudi M. Comparison of Electrolyte Disturbance of Using Intravenous Aminophylline Versus Nebulization Salbutamol for Exacerbation Asthma in Surabaya, Indonesia. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*.2016;8(4):221-228.
19. Majumdar S, Mueller-Spaeth, Sloan KB. Prodrugs of theophylline incorporating ethyleneoxy groups in the promoiety: synthesis, characterization, and transdermal delivery.2012;13(3):853-62.
20. Hocaoglu N, Yildiztepe E, Bayram B, Aydin B, Tunçok Y, Kalkan S. Demographic and Clinical Characteristics of Theophylline Exposures between 1993 and 2011. *Balkan Med J*.2014;31(4):322–327.
21. Blix HS, Viktil KK, Moger TA, Reikvam A. Drugs with narrow therapeutic index as indicators in the risk management of hospitalised patients.2010;8(1):50-55.
22. Lorensia A, Ikawati Z, Andayani TM, Maranatha D, Wahjudi M. Analisis Kejadian Leukositosis Pasca Terapi Aminofilin Intravena Dibandingkan dengan Salbutamol Nebulasi pada Pasien Eksaserbasi Asma. *Indonesia journal of Clinical Pharmacy*. 2016;5(3):149-159.
23. Philip KE, Pack E, Cambiano V, Rollmann H, Weil S, O'Beirne J. The Accuracy of Respiratory Rate Assessment by Doctors in a London Teaching Hospital: a Cross-sectional study. *J Clin Monit Comput*. 2015;29(4):455-460.
24. Cekici L, Valipour A, Kohansal R, Burghuber OC. Short-term effects

- of inhaled salbutamol on autonomic cardiovascular control in healthy subjects: a placebo-controlled study. *Br J Clin Pharmacol.*2009;67(4):394–402.
25. Billington CK, Penn RB, Hall IP. B2-Agonists. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;233:23-40.
 26. Mahemuti G, Zhang H, Li J, Tielwaerdi N, Ren L. Efficacy and side effects of intravenous theophylline in acute asthma: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:99–120.
 27. Nair P, Milan SJ, Rowe BH. Addition of intravenous aminophylline to inhaled beta(2)-agonists in adults with acute asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD002742.
 28. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Data source with asthma content: Behavioral risk factor surveillance system (BRFSS); 2011.
 29. National Asthma Council Australia. *Asthma Management Handbook* [diunduh 28 November 2017]. Tersedia dari: <https://www.nationalasthma.org.au/health-professionals/australian-asthma-handbook>
 30. Fong N. Aminophylline/theophylline: Loading and maintenance dose. NHS Trust: East Lancashire Hospitals;2011.
 31. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. British guideline on the management of asthma, British Thoracic Society;2011.
 32. Chester JG, Rudolph JL. Vital Signs in Older Patients: Age-Related Changes. *J Am Med Dir Assoc.*2011;12(5):337-343.
 33. Grassmann M, Vlemincx E, Leupoldt AV, Mittelstadt JM, Bergh OV. Respiratory Changes in Response to Cognitive Load: A Systematic Review. *Neural Plasticity.*2016;8146809:1-16.
 34. Vlemincx E, Diest V, Bergh VD. A sigh following sustained attention and mental stress: effects on respiratory variability. *Physiol Behav.*2012;107(1):1-6.
 35. Hamdasmalani MD, DeBari V, Bithoney WG, Gold N. Levalbuterol versus racemic albuterol in the treatment of acute exacerbation of asthma in children. *Pediatr Emerg Care.*2005;21(7):415-9.
 36. Troosters T, Dupont L, Bott J, Hansen K. Your Lungs and Exercise. *Breathe (Sheff).*2016;12(1):97-100.



Comparison Ability of Polymers Acrycoat S100 and HPMC K4M to Entrapment Efficiency Domperidone in Microspheres

Pratiwi Apridamayanti, Nora N.Sinaga*, Rise Desnita

Pharmacy Study Programme, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Pontianak - Indonesia

Submitted 24 August 2018; Revised 22 January 2019; Accepted 21 August 2019; Published 03 February 2020

*Corresponding author: noranurlina@gmail.com

Abstract

Domperidone is a prokinetic and antiemetic agent which has low bioavailability. To increase the bioavailability of drug, it can be modified into microsphere that can hold drug more longer in gastric to improve the bioavailability. The microsphere preparation requires a polymer that can make matrix system to protect and deliver the drugs. Acrycoat S100 and HPMC K4M are the usual polymers that used for encapsulation and have biodegradable characteristic. The aim of this research is to know the comparison ability of two different polymers to entrapment the drug in microsphere. Microsphere domperidone made by solvent evaporation method in 6 formula. F1, F2 and F3 using 50 mg, 100 mg and 150 mg Acrycoat S100 polymer, while F4, F5 and F6 using 50 mg, 100 mg and 150 mg HPMC K4M polymer. The tests were conducted by the determination of the percentage of entrapment efficiency using UV spectrophotometer and evaluation of organoleptic, particle measurement and surface microsphere morphology. The results showed that F3 with Acrycoat S100 polymer has a greater entrapment efficiency of $78,712\% \pm 4,260\%$ compared to the highest percentage efficiency of HPMC K4M polymer of $4,734 \pm 0,390$.

Keywords: Acrycoat S100, domperidone, entrapment efficiency, HPMC K4M, microsphere

Perbandingan Kemampuan Polimer Acrycoat S100 dan HPMC K4M terhadap Efisiensi Penjerapan Domperidon dalam *Microsphere*

Abstrak

Domperidon merupakan agen prokinetik dan antiemetik yang memiliki bioavailabilitas rendah. Salah satu upaya untuk meningkatkan bioavailabilitas obat dilambung adalah dengan sistem sediaan *microsphere* yang dapat menahan obat lama berada di lambung sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitasnya. Sediaan *microsphere* membutuhkan polimer yang dapat menjadi sistem matriks untuk melindungi dan menghantarkan obat. Acrycoat S100 dan HPMC K4M merupakan polimer yang sering digunakan dalam enkapsulasi dan bersifat *biodegradable*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kemampuan dua jenis polimer berbeda terhadap efisiensi penjerapan domperidon dalam sediaan *microsphere*. *Microsphere* domperidon dibuat dengan menggunakan metode penguapan pelarut (solvent evaporation) dalam enam formula berbeda dengan F1, F2 dan F3 menggunakan polimer Acrycoat S100 sebanyak 50 mg, 100 mg dan 150 mg, sedangkan F4, F5 dan F6 menggunakan polimer HPMC K4M sebanyak 50 mg, 100 mg dan 150 mg. Pengujian yang dilakukan yaitu penetapan kadar persen efisiensi penjerapan dengan menggunakan spektrofotometer UV dan evaluasi sediaan berupa organoleptik, pengukuran partikel dan morfologi permukaan *microsphere*. Hasil penentuan efisiensi penjerapan menunjukkan polimer Acrycoat S100 F3 memiliki efisiensi penjerapan yang lebih besar yaitu $78,712\% \pm 4,260\%$ dibandingkan dengan persen efisiensi penjerapan terbaik dari polimer HPMC K4M yaitu sebesar $4,734 \pm 0,390$.

Kata Kunci: Acrycoat S100, domperidon, efisiensi penjerapan, HPMC K4M, *microsphere*.

1. Pendahuluan

Domperidon merupakan antagonis reseptor dopamin D2 yang digunakan sebagai agen prokinetik dan antiemetik pada pengobatan gastroparesis, mual dan muntah.¹ Domperidon memiliki kelarutan yang buruk dalam air (0,986mg/L) dan bioavailabilitas rendah yang dilaporkan berkisar 13-17%.² Obat ini memiliki kelarutan yang baik pada pH asam tetapi menurun secara signifikan pada pH basa. Saat berada pada cairan intestinal, bentuknya dalam dosis oral pelepasan terkendali dapat menyebabkan obat ini mengendap dalam formulasinya karena kelarutannya yang buruk pada pH basa. Obat yang mengendap tidak mampu dilepaskan dari formulasinya.³ Hal ini menyebabkan rendahnya bioavailabilitas domperidon sehingga cocok untuk dibuat dalam bentuk sediaan yang bertujuan mempertahankan obat lama berada di lambung untuk meningkatkan bioavailabilitasnya.

Microsphere merupakan bagian dari penghantaran obat baru yang sangat potensial dalam sistem penghantaran obat.⁴ *Microsphere* didefinisikan sebagai mikropartikel sferis dengan diameter antara 1-1000 μm . Teknik preparasi *microsphere* menawarkan berbagai peluang untuk mengontrol aspek administrasi obat dan meningkatkan efek terapeutik ke sisi target dengan cara *sustained control release*.⁵ Mikropartikel dapat menjadi penghantaran obat yang akurat, mengurangi konsentrasi obat pada target dan memberikan sistem penghantaran yang efektif untuk zat aktif yang sedikit larut dalam air. Mikropartikel juga dapat meningkatkan bioavailabilitas obat dan memiliki kemampuan baik dalam mengurangi frekuensi pemberian dan menurunkan toksisitas beberapa obat.⁶⁻⁸

Peningkatan konsentrasi polimer diketahui dapat meningkatkan efisiensi penyerapan obat dalam *floating microspheres*.⁹ Hidroksipropilmetil selulosa (HPMC) dan Acrycoat merupakan polimer yang sering digunakan dalam enkapsulasi. Keduanya diketahui bersifat *biodegradable* sehingga dapat digunakan untuk farmasetik. HPMC merupakan polimer polisakarida turunan selulosa yang larut dalam air, sedangkan

acrycoat termasuk dalam polimer latek dan dispersi.¹⁰

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kemampuan dua jenis polimer berbeda yaitu Acrycoat S100 dan HPMC K4M terhadap efisiensi penyerapan Domperidon dalam *microsphere*.

2. Metode

2.1. Alat

Peralatan gelas (Pyrex Iwaki®), neraca digital (Precisa TYP 320-9410-003), hotplate (Schott Instrument®), termometer, mortir dan stamper, mikropipet (CAPP), mikroskop optik, object glass, cover glass, magnetik stirer, desikator, dan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 2450).

2.2. Bahan

Domperidon (Dexa Medica), Acrycoat (Corel Pharm Chem), HPMC K4M (Shanghai Honest Chem), diklorometana (DCM), etanol, poli vinil alkohol (PVA), span 80, aquades, parafin cair, petroleum ether dan metanol (Merck).

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Pembuatan *Microsphere* Domperidon

Microsphere Domperidon dibuat menggunakan metode emulsion solvent evaporation. Domperidon dan polimer dilarutkan dalam pelarut diklorometana:etanol (1:1). Pada pembuatan *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100, larutan domperidon dan polimernya didispersikan dalam aquades mengandung PVA, sedangkan *microsphere* domperidon dengan menggunakan polimer HPMC K4M didispersikan dalam parafin cair mengandung span 80. Campuran diaduk menggunakan magnetik stirer dengan kecepatan 500 rpm selama 2 jam. *Microsphere* yang terbentuk disaring dengan kertas saring Whatman no 42 dan dicuci hingga 3-4 kali dengan aquades untuk *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100, dan dengan petroleum eter untuk *microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M. *Microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100 dikeringkan dalam desikator selama

sehari semalam, sedangkan *microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M di suhu ruang semalaman. Formula dapat dilihat pada Tabel 1.

2.3.2. Penentuan Efisiensi Penjerapan

Ditimbang sejumlah *microsphere* dan digerus halus dalam mortar. Serbuk *microsphere* dilarutkan dalam metanol. Larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Persen efisiensi penjerapan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%EE = \frac{\text{kadar obat terukur dalam } \textit{microspheres}}{\text{kadar awal obat}} \times 100\%$$

2.3.3. Pengamatan Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik meliputi bentuk, warna dan bau pada suhu ruang. Pemeriksaan warna dan bau dilakukan melalui panca-indra, sedangkan pemeriksaan bentuk dilakukan dengan mikroskop optik. Pengamatan dilakukan sekali terhadap masing-masing hasil formula selama 1-2 menit.

2.3.4. Penentuan Ukuran Partikel

Penentuan ukuran partikel *microsphere* dilakukan menggunakan mikroskop optik. Sejumlah *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100 diletakkan pada kaca objek dan didispersikan dengan beberapa tetes aquades. Sedangkan *microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M diletakkan pada kaca objek dan didispersikan dengan olive oil. *Microspheres* domperidon dilihat dibawah mikroskop.

2.3.5. Pengamatan Morfologi Permukaan *Microsphere* Domperidon

Pengamatan morfologi permukaan *microsphere* Domperidon dilakukan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Sejumlah *microspheres* ditempatkan pada sample stub dan di-coating dengan gold (emas) dibawah vakum dengan menggunakan sputter coater. Sampel dianalisis dengan *scanning electron mikroskop*.

2.3.6. Pembuatan Larutan Stok

Domperidon memiliki kelarutan yang sangat buruk di air sehingga pelarut organik dibutuhkan untuk melarutkan obat. Larutan stok domperidon (100 µg/mL) dibuat dengan melarutkan 10 mg domperidon yang ditimbang akurat dalam metanol 100 mL. Campuran diaduk hingga homogen.

2.3.7. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum domperidon dilakukan dengan pengukuran larutan sampel dari rentang panjang gelombang 200-400 nm.

2.3.8. Pembuatan Kurva Baku

Seri kadar dibuat dari larutan stok sebanyak 6 seri kadar diantaranya 8, 12, 16, 20 dan 24 µg/mL. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

3. Hasil

3.1. Karakterisasi Organoleptik *Microsphere* Domperidon

Pengamatan organoleptis *microsphere*

Tabel 1. Formula *microsphere* domperidon

No.	Bahan	Jumlah					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
1.	Domperidon (mg)	50	50	50	50	50	50
2.	Acrycoat S100 (mg)	50	100	150	-	-	-
3.	PVA (mg)	50	50	50	-	-	-
4.	Aquades (ml)	100	100	100	-	-	-
5.	HPMC K4M (mg)	-	-	-	50	100	150
6.	Span 80 (ml)	-	-	-	2	2	2
7.	Paraffin cair (ml)	-	-	-	100	100	100

domperidon yang dilakukan meliputi bentuk, bau dan warna. Pengamatan yang dilakukan dengan panca indra menunjukkan hasil *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100 berupa serbuk putih halus dan tidak berbau sedangkan pada *microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M berupa serbuk putih kasar dan tidak berbau yang dapat dilihat pada Gambar 1.

3.2. Penentuan Ukuran Partikel

Pengukuran ukuran partikel *microspheres* domperidon dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik. Ukuran *microsphere* domperidon yang didapatkan dengan polimer Acrycoat S100 memiliki rentang 31,88 - 319,87 μm , sedangkan dengan polimer HPMC K4M memiliki rentang 83,68 - 218,22 μm .

3.3. Morfologi Permukaan *Microsphere* Domperidon

Analisis SEM dilakukan untuk mengetahui morfologi dari *microsphere* domperidon. Perbesaran yang digunakan pada pengamatan adalah perbesaran 400 kali. Hasil analisis SEM dapat dilihat pada Gambar 2.

3.4. Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum domperidon dalam metanol dilakukan menggunakan spektrofotometri UV pada konsentrasi 8 ppm dan rentang panjang gelombang 250-300 nm. Diperoleh panjang gelombang maksimum domperidon dalam metanol ialah 286,5 nm. Ini mendekati dengan penelitian sebelumnya yaitu 287,2 nm.¹¹

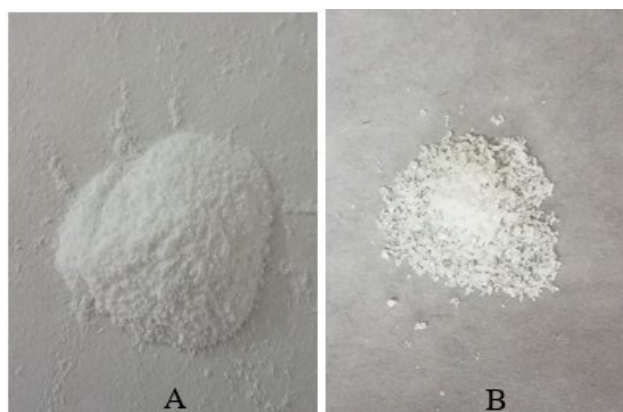
3.5. Efisiensi Penjerapan Domperidon dalam *Microsphere*

Hasil efisiensi penjerapan kedua polimer dapat dilihat pada Tabel 2.

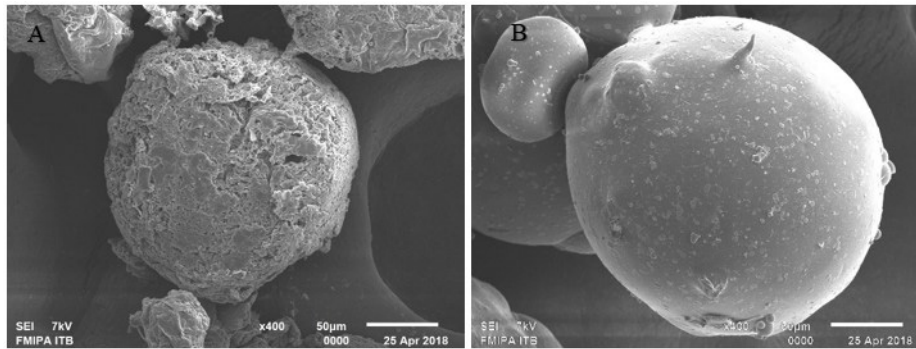
4. Pembahasan

Dari Gambar 2 morfologi permukaan *microsphere* Domperidon dengan SEM, terlihat bahwa *microsphere* domperidon dengan kedua polimer memiliki bentuk yang sferik dan berukuran 172,9 μm pada *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100 serta 218,22 μm pada *microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M. *Microsphere* domperidon dengan polimer HPMC K4M memiliki morfologi permukaan yang lebih halus dibandingkan *microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100. *Microsphere* domperidon dengan polimer Acrycoat S100 terlihat memiliki morfologi permukaan yang bercelah, retak dan keropos. Kondisi permukaan yang retak dan keropos ini dapat membantu dalam pelepasan obat karena dapat memfasilitasi penetrasi dari medium pelarut ke dalam *microsphere*. Morfologi permukaan yang lebih kasar dapat meningkatkan kontak dengan agen pembasahnya dibandingkan dengan morfologi permukaan yang lebih halus.¹²

Hasil persen efisiensi penjerapan pada kedua polimer sangat berbeda signifikan. Persentase efisiensi penjerapan domperidon dalam *microsphere* ditemukan paling optimum pada konsentrasi polimer terbesar pada masing-masing polimer (F3 dan F6). Semakin meningkat jumlah polimer yang digunakan, persentase efisiensi penjerapan



Gambar 1. *Microsphere* Domperidon dengan Polimer Acrycoat S100 (A) dan HPMC K4M (B)



Gambar 2. Pengamatan SEM pada *microsphere* domperidon dengan polimer crycoat S100 (A) dan polimer HPMC K4M (B)

terlihat semakin meningkat pula. Hal ini sesuai dengan penelitian lain yang mengatakan bahwa peningkatan jumlah polimer yang digunakan dapat meningkatkan persentase efisiensi penyerapan zat aktif obat dalam *microsphere*. Hal ini disebabkan peningkatan konsentrasi polimer dapat meningkatkan kapasitas penyerapan obat.¹³ Persentase efisiensi penyerapan terbaik dari polimer Acrycoat S100 dan HPMC K4M kemudian diuji secara statistik dengan menggunakan uji Independent Samples T-Test. Dari nilai signifikan uji T-test $\leq 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada persentase efisiensi penyerapan domperidon dalam *microsphere* dengan menggunakan polimer Acrycoat S100 dan HPMC K4M. Polimer Acrycoat S100 dapat menyerap domperidon lebih baik dan lebih besar dibandingkan dengan polimer HPMC K4M. Hal ini berarti efisiensi penyerapan domperidon dalam sediaan *microsphere* lebih optimum menggunakan polimer Acrycoat S100 daripada menggunakan polimer HPMC K4M.

Rendahnya efisiensi penyerapan oleh *microsphere* Domperidon dengan polimer HPMC K4M dapat disebabkan oleh beberapa hal. Pada proses pembentukan *microsphere*, droplet dengan ukuran lebih besar memerlukan waktu pengerasan atau pemadatan menjadi *microsphere* yang lebih

lama sehingga obat akan cenderung berdifusi menuju fase kontinyu dan menyebabkan penurunan nilai kadar obat.¹⁴ Polimer HPMC K4M lebih viskos dibandingkan dengan polimer Acrycoat S100 sehingga cenderung membuat ukuran droplet yang lebih besar pada saat proses pembentukan *microsphere*. Selain itu sifat hidrofilitas zat aktif dan fase kontinyu yang sama dapat menyebabkan terjadinya proses difusi zat aktif melewati matriks polimer menuju fase kontinyu sesaat setelah penguapan pelarut dan pembentukan *microsphere*.^{15,16} Faktor lainnya ialah dapat disebabkan oleh ketidakcocokan formula *microspheres* yang dibuat dari HPMC sehingga perlu untuk dilakukan uji pemilihan formula *microsphere* dengan HPMC yang baik.

Microsphere domperidon dengan polimer HPMC K4M dikeringkan dengan perlakuan yang berbeda daripada polimer Acrycoat S100 karena pada pembuatannya polimer HPMC K4M menggunakan petroleum ether untuk mencuci *microspheres* sehingga perlu untuk diuapkan di ruang terbuka dan cukup dengan suhu ruang untuk mengeringkannya karena petroleum ether mudah menguap, sedangkan *microspheres* domperidon dengan polimer acrycoat yang menggunakan aquades pada pencucian akhirnya memerlukan desikator dalam

Tabel 2. Hasil persentase efisiensi penyerapan domperidon dalam sediaan *microsphere*

Jumlah Polimer	% EE Polimer Acrycoat S100			% EE Polimer HPMC K4M		
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
50 mg	58,018 ± 6,841			0,497 ± 0,089		
100 mg	63,820 ± 7,813			3,707 ± 0,446		
150 mg	78,712 ± 4,260			4,734 ± 0,390		

pengeringannya. Hasil akhir yang penting dicapai ialah seluruh formula dari kedua polimer dapat benar-benar kering sehingga dapat terbebas dari faktor lain yang mungkin mempengaruhi hasil pengujian. Hasil akhir *microspheres* yang siap dilakukan pengujian (*microspheres* sudah kering) ditandai dengan konstannya berat *microspheres* yang diperoleh pada setiap formula.

5. Simpulan

Microspheres Domperidon yang dibuat dengan metode penguapan pelarut menggunakan polimer Acrycoat S100 memiliki persen efisiensi penyerapan yang lebih besar dibandingkan dengan polimer HPMC K4M.

Daftar Pustaka

- Ahmad N, Ferris JK, Gooden E, Abell T. Making a case for domperidone in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6: 571–576.
- Reena T, Vandana D. Enhancement of solubility and dissolution rate of domperidone using cogrinding and kneading technique. *J Drug Deliv. Therap.* 2012;2(4):152-158
- Patel K, Jain PK, Baghel R, Tagde P, Patil A. Preparation and in vitro evaluation of a microballoon delivery system for domperidone. *Der pharmacia lettre.* 2011;3(6):131-141
- Parida KR, Panda SK, Ravanan P, Roy H, Manickam M, Talwar P. Microparticles based drug delivery systems: preparation and application in cancer therapeutics. *Int Arch Appl Sci Technol.* 2008;4(3):68–75
- Kataria S, Middha A., Sandhu P, Ajay B, Bhawana K. Microsphere: A review. *Inter J Res Pharm Chem.* 2011;1(4):1184-98.
- Parida KR, Kumar S, Ravanan P, Roy H, Manickam M, Talwar P. Microparticles based drug delivery systems: preparation and application in cancer therapeutics. *International archive of applied sciences and technology IAAST.* 2013;4(3):68-75
- Ozeki, T., Kano, Y., Takahashi, N. et al. Improved Bioavailability of a Water-Insoluble Drug by Inhalation of Drug-Containing Maltosyl- β -Cyclodextrin Microspheres Using a Four-Fluid Nozzle Spray Drier. *AAPS PharmSciTech.* 2012; 13: 1130–37
- Afzal Hussain, Abdus Samad, Mohd Usman Mohd Siddique and Sarwar Beg, “Lipid Microparticles for Oral Bioavailability Enhancement”, *Recent Patents on Nanomedicine.* 2015 5: 104.-110.
- Shinde SV, Pawar R, Joshi HP. Domperidone Floating Microspheres: Formulation And In Vitro Evaluation. *Journal of Pharmacy Research.* 2012;5(4): 2235-2238
- Agoes G. Enkapsulasi farmasetik. Bandung: Penerbit ITB; 2010
- Javali B, Sravanthi B, Mohan R B, Gopi K, Vamsi K, et al. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Omeprazole and Domperidone in Capsule Dosage forms. *Glob J Pharmaceu Sci.* 2017; 1(2): 555-560.
- Arefin P, Hasan I, Reza MS. Design, characterization and in vitro evaluation of HPMC K100 M CR loaded Fexofenadine HCl microsphere. *Springer Plus.* 2016;5:691
- Jelvehgari, Mitra, and Seyed Hassan Montazam. “Comparison of microencapsulation by emulsion-solvent extraction/evaporation technique using derivatives cellulose and acrylate-methacrylate copolymer as carriers.” *Jundishapur J Nat. Pharmac. Prod..* 2012; 7(4): 144-52.
- Chella N, Yada KK, Vempati R. Preparation and Evaluation of Ethyl Cellulose Microsphere Containing Diclofenac Sodium by Novel w/o/o Emulsion Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2010:884-888
- Muhaimin. Study of microparticle preparation by the solvent evaporation method using focused beam reflectance measurement (FBRM) (disertasi). Universitas Berlin; 2013



Molecular Docking Studies of Compounds from *Brucea javanica* (L.) Merr. Towards the Discovery of Potential H5N1 Neuraminidase Inhibitors

Rina F. Nuwarda¹, Zelika M. Ramadhania¹, Imam A. Wicaksono¹, Ade R. R. Firdaus²,
 Muhammad Yusuf², Muchtaridi Muchtaridi¹

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, West Java - Indonesia

²Department of Chemistry, Universitas Padjadjaran, West Java - Indonesia

Submitted 11 January 2020; Revised 20 January 2020; Accepted 21 January 2020; Published 03 February 2020

*Corresponding author: rina.nuwarda@unpad.ac.id

Abstract

The occurrences of a highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) type A H5N1 has caused infections in millions of poultry as well as hundreds of human cases and even mortalities. Indonesia has become one of the world's highest casualty rates of H5N1 human infections, with the number of deaths was 167 from a total of 199 cases. The development of viral resistance towards the available anti-influenza drugs neuraminidase (NA) inhibitors required the discovery of new inhibitors. In the recent advance of drug discovery, natural products have been considered as one of the essential sources of medicinal agents, and *Brucea javanica* has been found to possess antiviral activity against H5N1 NA. Thus, this research aimed to investigate the *in silico* activities of compounds from *B. javanica* using molecular docking methods against H5N1 NA. In this study, docking-based virtual screening of compounds from *B. javanica* to quickly select *in silico* hits to be potential NA inhibitors was performed. Subsequently, the intermolecular interactions of the inhibitor compounds with the H5N1 NA were analysed to examine the most preferred interactions. The results showed that brucein G and bruceoside C were found having the lowest binding energy and most preferred interactions with H5N1 NA and therefore, can be proposed for further study as potential NA inhibitors.

Keywords: antiviral, *Brucea javanica*, H5N1, molecular docking, neuraminidase

Studi Penambatan Molekuler Senyawa-senyawa dari *Brucea javanica* (L.) Merr. Menuju Penemuan Inhibitor Potensial Neuraminidase H5N1

Abstrak

Kemunculan virus flu burung tipe A H5N1 yang sangat patogen telah menyebabkan infeksi pada jutaan unggas serta ratusan kasus infeksi pada manusia dan bahkan menyebabkan kematian. Indonesia merupakan salah satu kasus tertinggi infeksi H5N1 pada manusia di dunia, dengan jumlah kematian 167 dari total 199 kasus. Kemunculan resistensi virus terhadap obat anti-influenza neuraminidase (NA) yang tersedia membutuhkan penemuan inhibitor baru. Dalam penemuan obat baru-baru ini, senyawa bahan alam telah dijadikan salah satu sumber penting bahan obat, dan *Brucea javanica* telah diteliti memiliki aktivitas antivirus terhadap NA H5N1. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki aktivitas *in silico* senyawa dari *B. javanica* menggunakan metode penambatan molekuler terhadap NA H5N1. Dalam penelitian ini, dilakukan skrining virtual senyawa-senyawa dari *B. javanica* untuk memilih senyawa yang berpotensi menjadi penghambat NA. Selanjutnya, interaksi antar molekul dari senyawa inhibitor dengan NA H5N1 dianalisis untuk melihat interaksi yang paling disukai. Hasil penelitian menunjukkan bahwa brucein G dan bruceoside C ditemukan memiliki energi ikat terendah dan interaksi yang paling disukai dengan NA H5N1 dan oleh karena itu, dapat diusulkan untuk penelitian lebih lanjut sebagai inhibitor NA yang potensial.

Kata Kunci: antivirus, *Brucea javanica*, H5N1, penambatan molekuler, neuraminidase

1. Introduction

H5N1, a highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus, causes the infection to the human respiratory tracks leading to pneumonia, acute respiratory disease and even death for a specific group of people such as children below five years of age, elderly, pregnant women, and those with chronic medical conditions.^{1,2} This virus remains to circulate amidst avian in some Asian and African countries, causing outbreaks in poultry as well as infections in human with high mortality. Since its recurrence in 2003 to 2019, there have been 861 infection cases of H5N1 reported to WHO, with 455 of these cases are fatal.^{3,4} Indonesia, Vietnam, and Egypt have reported having the maximum number of H5N1 infection cases to date.^{5,6} Indonesia is known to be an endemic country for H5N1 and said to have the highest number worldwide for fatal cases H5N1 infection in human with 199 cases and 168 deaths from 2003 to 2015. The majority of H5N1 human cases have been related to exposure to poultry through close or direct contact with the sick or dead ones. Meanwhile, the mortality cases have been associated with the late handling of health care or hospitalisation, delayed diagnosis and antiviral treatment.⁷

M2-ion channel inhibitors and neuraminidase (NA) inhibitors are the approved classes of antivirals for the treatment of influenza virus infections. NA inhibitors, antiviral drugs that inhibit the action of NA enzyme, were believed to have a higher tolerance, a wide-ranging spectrum of antiviral, and less likelihood for the appearance of viral resistance compared to the M2 inhibitor.^{8,9} Zanamivir and oseltamivir are NA inhibitors drugs which are already approved and commercially available for the treatment of influenza. Nevertheless, the poor oral bioavailability of zanamivir necessitates this drug to be administered by inhalation, whereas oseltamivir-resistant H1N1 viruses have arisen due to the latter extensive use as oral medication. Recently, laninamivir, a quite effective NA inhibitor, has been accepted for use in Japan. Unfortunately, its efficacy against oseltamivir-resistant NA in adults has

not been confirmed. Due to this emerging resistance and reduced potency, more study is needed to find novel and more potent anti-influenza agents.^{10,11}

Natural products, especially those originated from plants, have been found in empirical medicine and generated the strategy for therapeutic of numerous diseases, including influenza, particularly avian flu H5N1. Several studies have demonstrated that some natural compounds possess antiviral activity.^{12,13} *Brucea javanica* L. Merr. is one of indigenous Indonesia plants and has been reported to have activity against H5N1 NA.^{14,15} Several chemical components have been isolated from the *B. javanica*, such as: bruceantin, bruceantanol, bruceantinoside A, bruceine A, bruceine B, bruceine C, bruceine D, bruceine E, bruceine G, bruceoside A, bruceoside B, bruceoside C, daucosterol, dehydrobruceantanol, dehydrobruceine A, dehydrobruceine B, dehydrobrusatol, yadanzolid A, and yadanzolid B.¹⁶⁻¹⁸ Although it has been reported that *B. javanica* possesses antiviral activity, there is still very lack of information regarding the compounds and their interactions with the NA enzyme in the molecular level. Therefore, this research aimed to investigate the *in silico* activities of several compounds from *B. javanica* which are available in the ZINC database using molecular docking methods against H5N1 NA.

2. Methods

2.1. Materials

Molecular docking simulation was performed using AutoDock 4.2 software attained from The Scripps Research Institute website (<http://autodock.scripps.edu/downloads>) running on Linux Ubuntu operating system. The visualization of docking results was carried out using Biovia Discovery Studio Visualizer (www.accelrys.com). *B. javanica* compound structures as ligands were downloaded from the ZINC database (<http://zinc.docking.org/>). For control docking experiment, the crystal structure of H5N1 avian influenza NA (PDB ID: 2HU4) complexed with oseltamivir

carboxylate (OTV) was downloaded from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank website (www.rcsb.org).

2.2. Methods

2.2.1. Positive Control docking

The downloaded PDB (text) format of 2HU4 crystal structure was divided into two separate PDB files using Biovia Discovery Studio Visualizer, one comprising all the atoms of the NA enzyme as target macromolecule, the other comprising those of OTV as a ligand. The structures were then protonated using MGLTools 1.5.6. by adding Gasteiger charge to OTV, and Kollmann charges to NA structure. Both OTV and NA were saved in PDBQT format. OTV was redocked to NA with grid box dimension 60 x 60 x 60, and coordinate $x = 0.324$, $y = 81.366$, and $z = 109.37$. Residues located in the range of 5 Å around which play a significant role in the substrate-binding such as Arg118, Arg152, Arg292, Glu276 and Arg371 were selected. Control docking procedure was performed using following parameters: GA run = 100, maximum number of evaluation = 5,000,000, population size = 150, and maximum generation = 27,000. Control docking results were analysed based on their RMSD value.

2.2.2. Molecular docking simulation

Nineteen of *B. javanica* compound structures were downloaded from the ZINC database. The Kollmann charge was then

added with the aid of MGLTools 1.5.6. The ligands were then saved in PDBQT format and the molecular docking simulation to screen the potential ligands was carried out using validated parameters from control docking. The required python script files for the preparation of compounds and virtual screening in AutoDockTools/Utilities24 were executed using pythonsh command. The visualisation of docking simulations was performed using Biovia Discovery Studio Visualizer, and the results were sorted based on the free energy of binding on the most populated cluster and their intermolecular interactions with NA. For this study, the top five compounds were selected based on their free energy binding and followed by the selection of two compounds with the most preferred interactions.

3. Result

Control docking experiment was carried out to validate the docking parameters which would be used in virtual screening of the *B. javanica* compounds. The best docking position of compounds was selected based on the most populated cluster, then followed by the form of intermolecular interaction taken place between ligand and receptor, subsequently the lowest binding energy after the docking search was completed. The simulation results showed that the structural deviation in term of RMSD value was 1.32 Å (Figure 1) and the docking simulation has generated three clusters in which the first

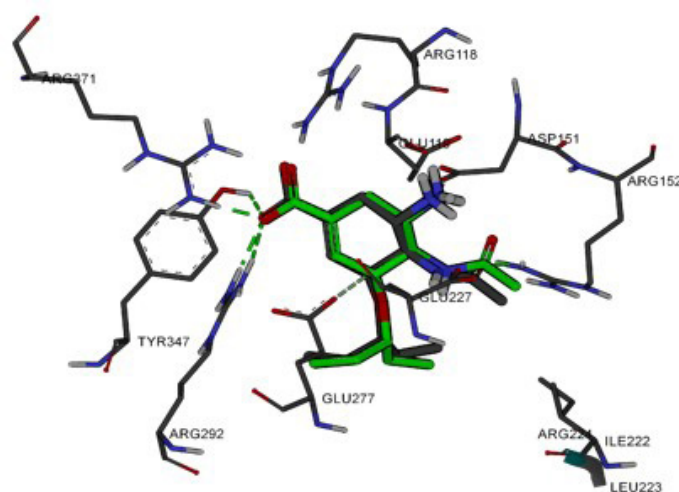


Figure 1. Superposition of the initial pose (grey colour) and the control docking pose (green colour) of OTV (PDB ID 2HU4) with RMSD value 1.32 Å.

cluster was the most populated one with 94 conformations, followed by the second cluster with five conformations and the last cluster with only one conformation. From the most populated cluster, the structures with the lowest predicted free energy of binding (-9.30 kcal/mol), i.e. conformation no. 2 was selected.

Virtual screening was carried out to screen 19 ligands from *B. javanica* plant. The docking scores were then graded energetically, from the lowest to the highest. The results showed that bruceoside B generated the lowest binding energy with the value of -9.1 kcal/mol, followed by bruceantinol, bruceine G, bruceoside C, and bruceantin with the free energy binding value of -8.65, -8.41, -8.39, and -8.17 kcal/mol, respectively (Table 1).

As well as their free energy of binding, the ligands were also analysed based on their intermolecular interactions with the important amino acid residues in NA binding site such as Asp151, Arg152, Glu119, Glu227, Glu277, Arg292, Arg118, Arg371, and Tyr347. The interaction was then observed with the consideration of the similarity interaction

with OTV as the control ligand, as shown in Table 2.

Based on the examination of the hydrogen bonding interaction between the five top compounds with NA binding site, brucein G and bruceoside C were found to have the most preferred interactions (Figure 2 and 3).

4. Discussion

Control docking is a means of choosing a crystal structure of a targeted macromolecule which already in-complex with a previously known ligand, splitting the ligand from the target protein, and docking it back to the "induced-fit" form of the protein. In this experimentation, positive control docking was conducted with the crystal structure of H5N1 NA in-complexed with OTV (PDB ID: 2HU4). The most populated cluster generated 94 conformations and was considered as the representative of the best possible position of OTV interaction with H5N1 NA binding site. The grouping of these docking simulation results was grounded on the RMSD (Root Mean Square Deviation)

Table 1. Docking simulation results of compounds from *B. javanica* demonstrated the binding energy of the compounds.

No.	Name of compound	Free energy binding (kcal/mol)
1	Bruceantin	-8.17
2	Bruceantinol	-8.65
3	Bruceantinoside A	-7.65
4	Bruceine A	-8.06
5	Bruceine B	-7.53
6	Bruceine C	-7.43
7	Bruceine D	-6.43
8	Bruceine E	-5.86
9	Bruceine G	-8.41
10	Bruceoside A	-6.94
11	Bruceoside B	-9.10
12	Bruceoside C	-8.39
13	Daucosterol	-7.24
14	Dehydrobruceantinol	-7.61
15	Dehydrobruceine A	-6.65
16	Dehydrobruceine B	-6.63
17	Dehydrobrusatol	-6.73
18	Yadanziolide A	-6.01
19	Yadanziolide B	-5.81

Table 2. Hydrogen bonding interactions between ligands, including OTV with important residues in NA binding site.

Name of Compound	Residues									Similarity with OTV
	Asp 151	Arg 152	Glu 119	Glu 227	Glu 277	Arg 292	Arg 118	Arg 371	Tyr 347	
OTV	√	√	√	√	√	√	√	√	√	9
Bruceantin	√	√		√		√				4
Bruceantinol	√						√	√		3
Bruceantinoside A	√	√			√					3
Bruceine A	√	√		√		√		√		5
Bruceine B	√	√		√		√		√		5
Bruceine C	√					√		√		3
Bruceine D	√	√				√		√		4
Bruceine E									√	1
Bruceine G	√	√	√		√	√		√		6
Bruceoside A	√				√	√		√	√	5
Bruceoside B									√	1
Bruceoside C	√	√				√		√		4
Daucosterol										0
Dehydrobruceantinol	√					√	√	√		4
Dehydrobruceine A	√					√		√		3
Dehydrobruceine B	√					√		√		3
Dehydrobrusatol	√					√		√		3
Yadanzolid A	√	√				√		√		4
Yadanzolid B	√	√			√	√		√		5

value of each conformation result which was known as the coordinates between the original pose of the ligand in the target binding site and the docked pose after the simulation. RMSD value is applied as a condition to evaluate the validity of the control docking process in which a control docking would be

successful if RMSD obtained is no more than 2 Å.¹⁹ Control docking result demonstrated that the RMSD value observed was 1.32 Å which means that the docking parameters set up were acceptable and therefore could be employed for virtual screening experiments upon compounds from *B. javanica*.

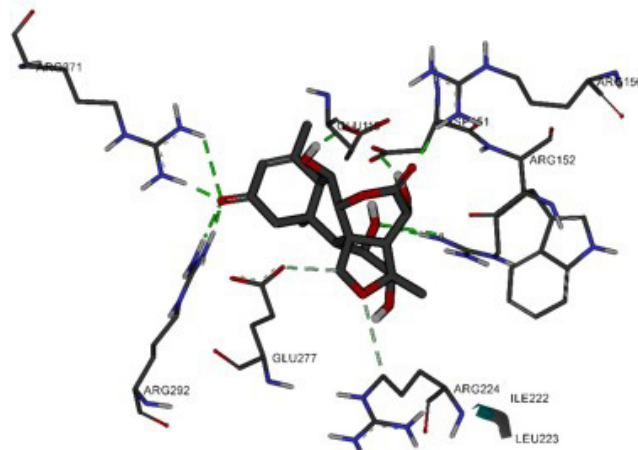


Figure 2. 3D docking pose of brucein G. Hydrogen bonds were presented in dashed lines. The functional group of these compounds interacts via hydrogen bonds with Asp151, Arg152, Glu119, Glu277, Arg292 and Arg371.

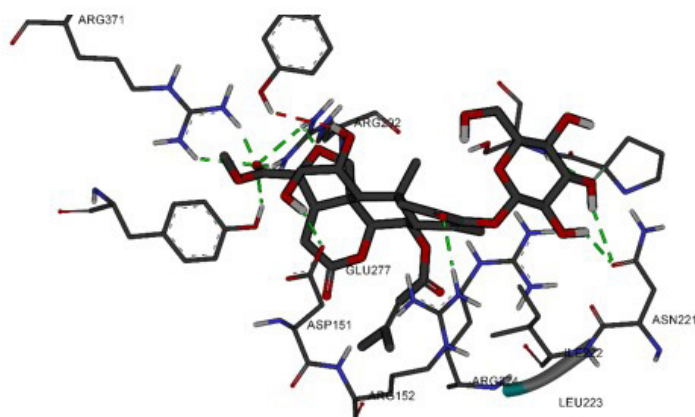


Figure 2. 3D docking pose of bruceoside C. The hydrogen bonds interactions were presented in dashed lines. The functional group of these compounds interacts via hydrogen bonds with Asp151, Arg152, Arg292 and Arg371

The results (Table 1) showed that the free energy of binding of the compounds varies from -9.10 kcal/mol to -5.81 kcal/mol. Top 5 compounds in which values are comparable with the binding free energy of OTV as a control ligand (-9.30 kcal/mol) were chosen. The selected compounds were bruceoside B, bruceantinol, bruceine G, bruceoside C, and bruceantin with the free energy binding value of -8.65, -8.41, -8.39, and -8.17 kcal/mol, respectively. These values may theoretically mean that those selected ligands may demonstrate molecular interactions that are as good as OTV in terms of the binding to NA. Visualization of docked conformation was applied to investigate the hydrogen bonding as it is the most crucial intermolecular interaction between ligand and receptor.

The virtual screening results showed that although bruceoside B possessed the lowest free energy binding, however, it only had one hydrogen bonding with Tyr347 meanwhile bruceantinol with the second-lowest energy binding, had less interaction with the NA binding site compare to bruceine G and bruceoside C. Thus the analysis showed that bruceine G and Bruceoside C gave the lowest binding energy and most preferred interactions. Based on the 3D docking pose of each compound, the activity of brucein G and bruceoside C were predicted by observing the hydrogen bond interactions happened between the ligands and NA active site mainly between their carboxyl and hydroxyl groups

and the binding site (Figure 2 & 3). Brucein G contains a carboxyl group which formed hydrogen bonds with Arg292, Arg371, and Glu227, similar to OTV. On the other hand, bruceoside C included a carboxyl group which interacted via hydrogen bonds with the guanidine group of Arg152, and hydroxyl groups which established hydrogen bonds interaction with Arg292 and Arg371. Arg292 and Arg371 are two of three arginine triad known as highly critical arginine residues in the binding site of NA which enables the conformational change of the ligand and is believed to be very important in the catalysis of substrate.²⁰ Furthermore, brucein G also formed hydrogen bond interactions with Asp151, Arg152, Glu119 and bruceoside C with Asp151, which gave contributions to the total free energy binding between the ligands and NA binding site.

5. Conclusion

Nineteen compounds from *B. javanica* were successfully docked and then analysed based on their free energy binding and intermolecular interactions with NA binding site. Two of the selected ligands, namely bruceine G and bruceoside C, gave the lowest binding energy value with the most preferred interactions. Further study can be conducted to investigate the antiviral activity of these compounds via in vitro bioassay using 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA) as fluorogenic substrate.

Acknowledgements

We want to thank the Directorate of Research, Community Service and Innovation Universitas Padjadjaran for the funding, and Computational Chemistry and Bioinformatics Laboratory Universitas Padjadjaran, to provide computing facilities for this work.

References

1. Wonderlich ER, Swan ZD, Bissel SJ, Hartman AL, Carney JP, O'Malley KJ, et al. Widespread Virus Replication in Alveoli Drives Acute Respiratory Distress Syndrome in Aerosolized H5N1 Influenza Infection of Macaques. *J Immunol.* 2017;198(4):1616-26.
2. Smetana J, Chlibek R, Shaw J, Splino M, Prymula R. Influenza vaccination in the elderly. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2018;14(3):540-9.
3. WHO. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2019 2019 [updated 25 November 2019. Available from: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2019_11_25_tableH5N1.pdf?ua=1.
4. Uyeki TM, Peiris M. Novel Avian Influenza A Virus Infections of Humans. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):907-32.
5. CDC. Highly Pathogenic Asian Avian Influenza A (H5N1) in People 2015 [updated 18 March 2015. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1-people.htm>.
6. Welkers MRA, Pawestri HA, Fonville JM, Sampurno OD, Pater M, Holwerda M, et al. Genetic diversity and host adaptation of avian H5N1 influenza viruses during human infection. *Emerging Microbes & Infections.* 2019;8(1):262-71.
7. Mangiri A, Iuliano AD, Wahyuningrum Y, Praptiningsih CY, Lafond KE, Storms AD, et al. Physician's knowledge, attitudes, and practices regarding seasonal influenza, pandemic influenza, and highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infections of humans in Indonesia. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 2017;11(1):93-9.
8. McKimm-Breschkin JL. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7 Suppl 1:25-36.
9. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet.* 2000;355(9206):827-35.
10. Vavricka CJ, Li Q, Wu Y, Qi J, Wang M, Liu Y, et al. Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002249.
11. Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* 2013;98(2):174-85.
12. Kannan S, Kolandaivel P. Antiviral potential of natural compounds against influenza virus hemagglutinin. *Comput Biol Chem.* 2017;71:207-18.
13. Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, Bragazzi NL, Panatto D. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part II: Future compounds against influenza virus. *J Prev Med Hyg.* 2014;55(4):109-29.
14. Purwitasari N. Aktivitas Antiviral Influenza A Subtipe H5N1 dari Ekstrak *Brucea javanica* L. *Merr. Planta Husada.* 2014;2(2):27-30.
15. Ikram NKK, Durrant JD, Muchtaridi M, Zalaludin AS, Purwitasari N, Mohamed N, et al. A Virtual Screening Approach For Identifying Plants with Anti H5N1 Neuraminidase Activity. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2015;55(2):308-16.
16. Ye Q-M, Bai L-L, Hu S-Z, Tian H-Y, Ruan L-J, Tan Y-F, et al. Isolation, chemotaxonomic significance and cytotoxic effects of quassinoids from *Brucea javanica*. *Fitoterapia.* 2015;105:66-72.
17. Chen YY, Pan QD, Li DP, Liu JL, Wen YX, Huang YL, et al. New pregnane glycosides from *Brucea javanica* and their antifeedant activity. *Chem Biodivers.*

- 2011;8(3):460-6.
18. Liu JH, Jin HZ, Zhang WD, Yan SK, H. SY. Chemical constituents of plants from the genus *Brucea*. *Chemistry & Biodiversity*. 2009;6(1):57-70.
19. Xiao W, Wang D, Shen Z, Li S, Li H. Multi-Body Interactions in Molecular Docking Program Devised with Key Water Molecules in Protein Binding Sites. *Molecules*. 2018;23(9).
20. Gubareva LV, Robinson MJ, Bethell RC, Webster RG. Catalytic and framework mutations in the neuraminidase active site of influenza viruses that are resistant to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *J Virol*. 1997;71(5):3385-90.



Inhibition of Heme Polymerization *In Vitro* Assay of Extract of Sirih Leaf (*Piper Betle* Linn.) and Sunflower Leaves (*Helianthus Annuus* L.)

Ami Tjitraresmi*, Yasmiwar Susilawati, Moelyono Moektiwardoyo

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Indonesia

Submitted 23 December 2019; Revised 7 January 2020; Accepted 22 January 2020; Published 3 February 2020

*Corresponding author: ami.tjitraresmi@unpad.ac.id

Abstract

Malaria is a disease that occurs in tropical countries like Indonesia. The incidence of malaria in the world is still quite high and the occurrence of cases of *Plasmodium* resistance to antimalarial drugs and the widespread of resistance have prompted researchers to look for new antimalarial drugs, especially from natural materials. The people of Indonesia have long used betel leaf (*Piper betle* Linn.) and sunflower leaf (*Helianthus annuus* L.) as an antimalarial drug. The purpose of this study was to determine antimalarial activity through inhibition of heme polymerization and determine secondary metabolite compounds by phytochemical screening from betel leaves and sunflower leaves. The heme polymerization inhibition activity assay was carried out by the *in vitro* method using a microplate reader at 415 nm and 630 nm wavelengths. IC₅₀ values of betel leaf extract and sunflower leaf were 178.67 µg/ml and 160.10 µg/ml, respectively. Phytochemical screening results from betel leaf showed the presence of flavonoids, polyphenols, tannins, quinones, saponins, and monoterpenoids-sesquiterpenoids, while sunflower leaves contain alkaloids, polyphenols, flavonoids, steroids and monoterpenoids-sesquiterpenoids.

Keywords: antimalarial, *Helianthus annuus* L., heme polymerization, *Piper betle* Linn.

Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Heme Secara *In Vitro* Ekstrak Daun Sirih (*Piper Betle* Linn.) dan Daun Bunga Matahari (*Helianthus Annuus* L.)

Abstrak

Malaria adalah penyakit yang ada di negara tropis seperti Indonesia. Angka kejadian malaria di dunia yang masih cukup tinggi dan terjadinya kasus resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria serta penyebaran resistensi yang meluas telah mendorong para peneliti untuk mencari obat antimalaria baru yang lebih efektif terutama dari bahan alam. Daun sirih (*Piper betle* Linn.) dan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) telah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat antimalaria. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antimalaria melalui penghambatan polimerisasi heme dan mengetahui senyawa metabolit sekunder dengan penapisan fitokimia dari daun sirih dan daun bunga matahari. Uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme dilakukan dengan metode *in vitro* dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 415 nm dan 630 nm. Nilai IC₅₀ dari ekstrak daun sirih dan daun bunga matahari berturut-turut sebesar 178,67 µg/ml dan 160,10 µg/ml. Hasil penapisan fitokimia dari daun sirih menunjukkan adanya senyawa flavonoid, polifenol, tannin, kuinon, saponin, dan monoterpenoid-seskuiterpenoid, sedangkan daun bunga matahari mengandung senyawa alkaloid, polifenol, flavonoid, steroid dan monoterpenoid-seskuiterpenoid.

Kata Kunci: antimalaria, *Helianthus annuus* L., *Piper betle* Linn., polimerisasi heme

1. Pendahuluan

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. Parasit menyebar ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* sp. betina yang terinfeksi, yang disebut sebagai "vektor malaria".^{1,2}

Penularan malaria banyak ditemukan di daerah tropis dan subtropis, karena di daerah ini nyamuk *Anopheles* dapat bertahan dan berkembang biak. Namun di negara endemis malaria penularan malaria tidak terjadi di seluruh wilayah negara baik daerah tropis maupun subtropis, dikarenakan transmisi tidak akan terjadi pada daerah dengan ketinggian yang sangat tinggi, selama musim dingin, dan di beberapa negara di mana transmisi telah terganggu melalui program pengendalian malaria.³

Pengendalian penyakit malaria membutuhkan pendekatan terpadu, termasuk pencegahan (terutama pengendalian vektor) dan pengobatan dengan senyawa antimalaria yang efektif. Sejak edisi pertama pedoman untuk pengobatan malaria oleh WHO pada tahun 2006, negara yang merupakan daerah endemik *P. falciparum* telah memperbarui kebijakan pengobatan mereka dari penggunaan monoterapi dengan obat-obatan seperti klorokuin, amodiaquine dan sulfadoxine-pirimetamin (SP) ke terapi kombinasi berbasis artemisinin (ACT) yang saat ini direkomendasikan. ACT umumnya sangat efektif dan ditoleransi dengan baik. Ini telah memberikan kontribusi besar pada pengurangan morbiditas dan mortalitas global akibat malaria.⁴

Saat ini resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap obat-obatan antimalaria menjadi masalah terutama di daerah endemik.⁵ Hal ini dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas akibat malaria. Resistensi terjadi terutama karena adanya mutasi pada gen dari *Plasmodium*.⁶ Banyaknya kasus resistensi *Plasmodium* terhadap obat malaria digunakan saat ini, serta penyebaran resistensi yang meluas telah mendorong para peneliti untuk mencari obat antimalaria baru yang lebih efektif.⁴

Plasmodium sp. mendegradasi hemoglobin dalam eritrosit inang untuk

menggunakan produk katabolik yang dihasilkan sebagai sumber asam amino selama masa perkembangan dan proliferasi. Proses degradasi hemoglobin juga disertai dengan pelepasan heme bebas. Heme bebas bersifat aktif secara oksidatif serta bersifat toksik bagi sel inang dan parasit malaria, dan menyebabkan kematian parasit. Karena tidak adanya enzim heme oksigenase, parasit tidak dapat memotong heme menjadi *tetrapyrrole* rantai terbuka, yang diperlukan untuk ekskresi seluler. Untuk melindungi dirinya, parasit mendetoksifikasi heme bebas melalui netralisasi dengan protein yang kaya histidin, degradasi dengan reduksi glutation, atau kristalisasi menjadi hemozoin, yang merupakan pigmen malaria yang tidak larut dalam air yang diproduksi dalam vakuola makanan. Klorokuin dan obat antimalaria yang telah terbukti menghambat pembentukan kristal heme sintetik, β -hematin, yang secara memiliki struktur yang identik dengan hemozoin, dan menghambat pembentukan hemozoin dalam vakuola makanan parasit malaria. Saat ini uji aktivitas inhibisi pembentukan β -hematin berguna dalam mengidentifikasi beberapa anti malaria baru atau untuk penapisan aktivitas antimalaria.^{7,8}

Penggunaan obat tradisional dan herbal merupakan pilihan alternatif untuk pengobatan di negara-negara endemik malaria, seperti Indonesia. Hal ini dikarenakan Indonesia merupakan salah satu negara terbesar yang kaya akan keanekaragaman hayati serta biota laut. Selain itu, mayoritas masyarakat Indonesia masih menggunakan tanaman sebagai obat tradisional karena dipercaya memiliki khasiat sebagai obat.⁹

Tumbuhan yang secara empiris digunakan sebagai obat malaria di Indonesia diantaranya adalah daun sirih (*Piper betle* Linn.) dan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.).¹⁰ Tumbuhan sirih (*Piper betle* Linn.) adalah tumbuhan yang termasuk ke dalam suku Piperaceae. Tumbuhan ini paling banyak dibudidayakan di wilayah Asia Selatan dan Asia Tenggara.¹¹ Uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* ekstrak metanol daun sirih pada mencit yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* menunjukkan hasil bahwa pada dosis

ekstrak metanol daun sirih 50, 100, 200 dan 400 mg/kg secara berurutan menghasilkan penurunan kadar parasitemia sebesar 37,50%, 45,83%, 66,46% dan 70,63%.¹² Tumbuhan bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) adalah tumbuhan yang termasuk ke dalam suku Asteraceae. Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 menunjukkan bahwa IC₅₀ ekstrak metanol daun bunga matahari adalah 22,18 mg/mL sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetatnya adalah sebesar 16,68 mg/mL.¹³ Walaupun pengujian aktivitas antimalaria dari kedua tumbuhan ini sudah dilakukan akan tetapi aktivitas antimalaria dengan mekanisme penghambatan polimerisasi heme belum diketahui.

2. Metode

2.1. Alat

Maserator, rotavapor (Buchi), plate 96 sumuran (NEST), mikropipet (Thermo), *microplate reader* (EPOCH), alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium fitokimia.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* Linn.) dan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang diperoleh dari daerah Bandung, Jawa Barat, etanol, hemein klorida (SIGMA), dimetil sulfoksida (DMSO) (MERCK), Tween 20 (MERCK), buffer asetat 1 M (pH 4,8).

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan terhadap daun sirih (*Piper betle* Linn.) dan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang telah dikeringkan. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak etanol ditampung dan dikisatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan disimpan di atas penangas air dengan suhu 60°C hingga mencapai berat konstan.

2.3.2. Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia tumbuhan dengan menggunakan metode Farnsworth,¹⁴ yang dimodifikasi.

A. Alkaloid

Bahan yang akan diuji dibasakan dengan amonia 1% kemudian ditambahkan kloroform. Lapisan kloroform diambil dan ditempatkan pada tabung reaksi. Ke dalam filtrat ditambahkan HCl 1N kemudian dikocok kuat dan didiamkan hingga terjadi pemisahan. Lapisan asam dipipet dan dibagi menjadi tiga bagian pada tabung reaksi berbeda. Tabung reaksi 1 ditambahkan larutan pereaksi Dragendorf, tabung reaksi 2 ditambahkan pereaksi Mayer dan tabung reaksi 3 digunakan sebagai blanko. Hasil positif dapat dilihat dari terbentuknya endapan merah kecoklatan pada tabung 1 dan endapan putih pada tabung 2.

B. Polifenol

Bahan dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades kemudian dipanaskan di atas penangas air selama beberapa menit lalu disaring. Filtrat diambil kemudian ditambahkan pelarut besi (III) klorida. Hasil positif dapat dilihat dari terbentuknya warna biru kehitaman pada larutan.

C. Flavonoid

Bahan dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades kemudian dipanaskan di atas penangas air selama beberapa menit lalu disaring. Filtrat diambil dan ditambahkan serbuk Mg dan HCl 2N. Ke dalam larutan kemudian ditambahkan amil alkohol lalu campuran dikocok kuat. Campuran didiamkan selama beberapa menit hingga terpisah. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol.

D. Monoterpenoid dan seskuiterpenoid

Bahan digerus dengan menggunakan eter. Filtrat diambil kemudian diuapkan hingga kering. Ke dalam residu ditetaskan vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna-warna menunjukkan adanya senyawa monoterpen dan seskuiterpen.

E. Steroid dan triterpenoid

Bahan digerus dengan menggunakan eter. Filtrat diambil kemudian diuapkan hingga kering. Ke dalam residu ditetaskan pereaksi Lieberman-Burchard. Adanya

senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu sedangkan senyawa golongan steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan.

F. Kuinon

Bahan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades kemudian dipanaskan di atas penangas air selama beberapa menit lalu disaring. Filtrat diambil kemudian ditambahkan larutan KOH 5%. Hasil positif dapat dilihat dari terbentuknya warna kuning hingga merah pada larutan.

G. Tanin

Bahan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades kemudian dipanaskan di atas penangas air selama beberapa menit lalu disaring. Filtrat diambil dan ditetesi larutan gelatin 1%. Hasil positif dapat dilihat dari terbentuknya endapan putih pada larutan.

H. Saponin

Bahan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades kemudian dipanaskan di atas penangas air selama beberapa menit lalu disaring. Filtrat diambil kemudian dikocok kuat secara vertikal selama sepuluh hingga dua puluh detik. Keberadaan senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa persisten setelah pendiaman selama kurang lebih sepuluh menit atau setelah penambahan asam klorida.

2.3.3. Uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro*

Penapisan aktivitas antimalaria dilakukan terhadap 10 ekstrak tumbuhan uji secara *in vitro* dengan metode inhibisi polimerisasi heme atau metode Huy *et al*,¹⁵ yang dimodifikasi. Pengujian antimalaria dilakukan dengan tahapan penelitian:

- Sebanyak 16,3 mg hemin klorida dilarutkan dalam 1 mL dimetil sulfoksida (DMSO) lalu disaring dengan membran filter berdiameter 0,2 μm .
- Sebanyak 22,2 μL larutan hemin klorida dalam DMSO dilarutkan dengan buffer asetat 1 M (pH 4,8) sampai 5 mL. Larutan ini dipakai sebagai larutan hemin uji.
- Sebanyak masing-masing 20 μL larutan uji berupa ekstrak daun sirih,

ekstrak daun bunga matahari dan ekstrak kulit batang kina sebagai pembanding, dengan masing-masing konsentrasi akhir sebesar 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran. Kemudian ditambahkan sebanyak masing-masing 90 μL larutan hemin uji dan reaksi polimerisasi heme dimulai dengan menambahkan larutan Tween-20 (konsentrasi akhir 0,02 mg/mL). Plate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 250 menit untuk selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang 415 dan 630 nm menggunakan *microplate reader* (EPOCH). Fraksi heme yang diubah menjadi β -hematin dihitung berdasarkan persamaan:¹⁵

$$f = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{min}})$$

Keterangan:

A_{kontrol} = nilai serapan heme tanpa Tween-20 atau ekstrak uji
 A_{sampel} = serapan heme dengan penambahan Tween-20 dan ekstrak uji
 A_{min} = serapan heme dengan penambahan Tween-20 tanpa ekstrak uji

f = fraksi heme yang diubah menjadi β -hematin
 Persentase penghambatan pembentukan β -hematin oleh ekstrak uji ataupun pembanding ekstrak kulit batang kina dihitung berdasarkan persamaan:¹⁵

$$\text{Penghambatan} = (1-f) \times 100\%$$

Keterangan:

f = fraksi heme yang diubah menjadi β -hematin
 F. Data diolah menggunakan analisa probit antara log konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase inhibisi (y) sehingga diperoleh nilai IC_{50} .

3. Hasil

3.1. Ekstraksi

Rendemen ekstrak kental yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan metode

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia simplisia daun sirih dan daun bunga matahari

Golongan senyawa metabolit sekunder	Daun sirih	Daun bunga matahari
Alkaloid	-	+
Flavonoid	+	+
Polifenolat	+	+
Tanin	+	-
Kuinon	+	-
Saponin	+	-
Steroid/ triterpenoid	+	+
Monoterpenoid/ seskuiterpenoid	+	+

maserasi menggunakan pelarut etanol 70% adalah 17,3% untuk ekstrak daun sirih dan 14% untuk ekstrak daun bunga matahari.

3.2. Penapisan fitokimia

Hasil penapisan fitokimia dari simplisia daun sirih (*Piper betle* Linn.) dan daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dapat dilihat pada Tabel 1.

3.3. Uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro*

Hasil uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro* terhadap ekstrak etanol daun sirih dan ekstrak etanol daun bunga matahari dapat dilihat pada Tabel 2.

4. Pembahasan

4.1. Ekstraksi

Ekstrak kental sirih yang diperoleh berwarna hijau dan memiliki yang khas, sedangkan ekstrak daun bunga matahari berwarna hijau dan tidak berbau khas.

4.2. Penapisan fitokimia

Kuinin adalah senyawa alkaloid yang merupakan obat malaria pertama yang diisolasi dari *Cinchona sp.*^{16,17} dan artemisinin adalah senyawa seskuiterpen yang saat ini direkomendasikan oleh WHO sebagai obat malaria.¹⁸ Berdasarkan hasil penapisan fitokimia terhadap kedua bahan tumbuhan uji maka terlihat adanya senyawa monoterpenoid dan seskuiterpenoid dari daun sirih dan daun bunga matahari sedangkan senyawa alkaloid terdapat pada daun bunga matahari. Pan et al,¹⁹ melaporkan bahwa pada kurun waktu 2001-

2017 ada sekitar 175 senyawa antimalaria yang diperoleh dari tumbuhan dan ada sekitar 25 senyawa antimalaria yang diperoleh dari alga. Aktivitas antimalaria dari berbagai ekstrak tumbuhan biasanya dihasilkan dari berbagai macam golongan metabolit sekunder, seperti alkaloid, terpenoid, iridoid, cardenolides, flavonoid, kumarin, senyawa fenolat, poliasetilen, xanton, kuinon, steroid, lignin, tanin dan saponin.

4.3. Uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro*

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari bunga matahari memiliki nilai IC_{50} lebih rendah, yaitu sebesar 160,10 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan ekstrak daun sirih yang memiliki nilai sebesar 178,67 $\mu\text{g/ml}$, akan tetapi aktivitas penghambatan polimerisasi heme dari kulit batang kina yang mengandung alkaloid kuinin, yang sampai saat ini masih digunakan sebagai antimalaria, memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah yaitu sebesar 59,24 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan kedua ekstrak uji. Dilaporkan klorokuin dan sejumlah antimalaria quinolin lainnya seperti amodiakuin, kuinidin, dan kuinin mempunyai kemampuan dalam penghambatan β -hematin.²⁰

Peningkatan konsentrasi heme di dalam vakuola parasit dapat menimbulkan lisis membran parasit, sehingga plasmodium mempunyai mekanisme detoksifikasi heme, yaitu dengan mengubahnya menjadi senyawa hemozoin (pigmen malaria) yang inert bagi parasit.^{21,22} Polimerisasi heme untuk detoksifikasi heme oleh parasit malaria adalah proses yang penting bagi

Tabel 2. Hasil uji aktivitas penghambatan polimerisasi heme secara in vitro ekstrak daun sirih dan sirih merah dibandingkan dengan ekstrak kulit batang kina

Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	f (fraksi β-hematin)	% inhibisi	IC ₅₀ (µg/ml)
Daun sirih	31,25	0,9710	2,90	178,67
	62,5	0,8968	10,32	
	125	0,8645	13,55	
	250	0,2742	72,58	
	500	0,0806	91,94	
Daun bunga matahari	31,25	0,838	16,17	160,10
	62,5	0,785	21,45	
	125	0,746	25,41	
	250	0,604	39,60	
	500	0,050	95,05	
Kulit batang kina	31,25	0,9944	0,55	59,24
	62,5	0,922	7,74	
	125	0,069	93,09	
	250	0,046	95,30	
	500	0,005	99,45	

kehidupan parasit dan bersifat unik untuk *Plasmodium* intraeritrositik, dengan demikian pengujian aktivitas malaria dengan metode penghambatan polimerisasi heme menjadi salah satu pilihan untuk mencari senyawa antimalaria baru.²³

5. Simpulan

Ekstrak daun sirih dan daun bunga matahari mempunyai aktivitas penghambatan polimerisasi heme dan dapat dikembangkan sebagai obat herbal untuk malaria. Ekstrak daun bunga matahari memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme yang lebih baik dari ekstrak daun sirih.

Pustaka

- Murray, C.J.L., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R. & Lopez, A.D. Global Malaria Mortality Between 1980-2010: a Systematic Analysis. *The Lancet*. 2012; 379 (9814): 413–431.
- World Health Organization Malaria. Geneva, Switzerland. 2018; Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> {diakses tanggal : 25 Maret 2018}.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Where Malaria Occurs . 2017; Available at <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html> [Diakses pada tanggal 9 Januari 2019].
- World Health Organization, Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition, 2015; Available at <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/> [diakses tanggal 15 Desember 2018].
- De Villiers, K., Egan, T.J., Recent Advances in the Discovery of Haem-Targeting Drugs for Malaria and Schistosomiasis, *Molecules*, 2009; 14:2868-2887.
- Kurosawa, Y., Dorn, A., Kitsuji-Shirane, M., Shimada, H., Satoh, T., Matile, H., Hofheinz, W., Masciadri, R., Kansy, M. & Ridley, R.G., Hemeatin Polymerization Assay as a High-Throughput Screen for Identification of New Antimalarial Pharmacophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000; 44 (10):2638–2644.
- Hermanto, F, Yenny F, Lilis S A, Tri R S, Uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun cocor bebek (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelln.) pada *Plasmodium*

- falciparum 3D7. *Kartika jurnal ilmiah farmasi*, 2014; 2(2):54-58.
8. Ihwan K, S. H. A. Antimalarial Herbal Plants in Kupang, Indonesia. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 2017; 9(1):95-104.
 9. Al-Adhroey, A.H. Antimalarial Activity of Methanolic Leaf Extract of Piper betle L. *Molecules*, MDPI, 2011;16(1):107-18.
 10. Al-Adhroey, A.H.; Nor, Z.M.; Al-Mekhlafi, H.M.; Mahmud, R. Ethnobotanical study on some Malaysian anti-malarial plants: A community based survey. *J. Ethnopharmacol.* 2010;132:362–364.
 11. Mutiah, R., Activity of Antimalarial Compounds from Ethyl Acetate Fraction of Sunflower Leaves (*Helianthus annuus* L.) against *Plasmodium falciparum* Parasites 3D7, *Asian J. Pharm. Tech.* 2017; 7(2):61-5.
 12. Farnsworth, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1966; 55:259-260.
 13. Huy, N. T., Uyen, D. T., Maeda, A., Trang, D. T., Oida, T., Harada, S., & Kamei, K. Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006; 51(1):350-353.
 14. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* 2011; 17:1217–1220.
 15. Klayman, D. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 1985; 228:1049.
 16. Faurant C., From bark to weed: the history of artemisinin. *Parasite*. 2011;18(3): 215-8.
 17. Pan, Wen-Hui Xu, Xin-Ya Shi, Ni Tsang, Siu Wai Zhang, Hong-Jie. Antimalarial Activity of Plant Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19:1382.
 18. Egan, Timothy J., Kanyile K. Ncokazi. Quinoline Antimalarials Decrease the Rate of β -Hematin Formation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005; 99(7): 1532–1539.
 19. Pisciotta JM, Scholl PF, Shuman JL, Shualev V, Sullivan DJ. Quantitative characterization of hemozoin in *Plasmodium berghei* and *vivax*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2017;7(1):110-119.
 20. Fong, K. Y., Wright, D. W. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*. 2013; 5(12):1437–1450.
 21. Kurosawa, Y., Dorn, A., Kitsuji-Shirane, M., Shimada, H., Satoh, T., Matile, H., Hofheinz, W., Masciadri, R., Kansy, M. & Ridley, R.G.. Hemeatin Polymerization Assay as a High-Throughput Screen for Identification of New Antimalarial Pharmacophores. *Antimicrobial Agents and Chemootherapy*. 2000;. 44 (10):2638–2644.



In Silico Study of Aglycon Curculigoside A and Its Derivatives as α -Amilase Inhibitors

Nursamsiar^{1*}, Maya M. Mangande¹, Akbar Awaluddin¹, Syamsu Nur¹ dan Aiyi Asnawi²

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar, South Sulawesi - Indonesia

²Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, West Java - Indonesia

Submitted 09 August 2019; Revised 24 January 2020; Accepted 27 January 2020; Published 03 February 2020

*Corresponding author: n.siar@yahoo.co.id

Abstract

α -amilase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of starch polysaccharides into oligosaccharides to then produce glucose. Inhibitions of the α -amylase enzyme is an effective strategy in modulating blood sugar levels in diabetes. The aglycon curculigoside A has similar structure to chalcon which is able to inhibit the α -amilase enzyme for the treatment of type 2 diabetes. The aim of this study was to determine the interaction of the curculigoside A aglycone compound and its derivatives with the α -amylase enzyme by using the molecular docking simulation method. It was carried out by using AutoDock 4.2 and α -amilase protein (PDB ID: 1B2Y) as macro molecule. The molecular docking results showed that the aglycone curculigoside A and its derivatives able to interacted into the active site of the α -amylase enzyme. Three best ligands according to the simulation and prediction tests were compound 10, compound 23, and compound 41 has formed hydrogen bonding to Asp197, Glu233 and Asp300 residues with free bonding energy of -7.29, -7.22, dan -7.84 kcal/mol, respectively. In conclusion, three best ligands has the same pattern of hydrogen bonds to the native ligand AC1 (6-methyl-5-(4,5,6-trihydroxy-3-hydroxymethyl-cyclohex-2-enylamino)-tetrahydro-pyran-2,3,4-triol) via amino acids residues of α -amylase that play a role in the substrate by hydrolysis process.

Keywords: aglycon curculigoside A, α -amylase, diabetes, docking

Studi In Silico Aglikon Kurkuligosida A dan Turunannya sebagai Inhibitor α -Amilase

Abstrak

α -amilase merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis polisakarida pati menjadi oligosakarida untuk kemudian dicerna lebih lanjut menghasilkan glukosa. Penghambatan enzim α -amilase menjadi strategi yang efektif dalam memodulasi kadar gula darah penderita diabetes. Aglikon kurkuligosida A memiliki struktur yang mirip dengan kalkon yang mampu menghambat enzim α -amilase untuk pengobatan diabetes tipe 2. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan interaksi antara senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya terhadap enzim α -amilase menggunakan metode simulasi penambatan molekul. Simulasi penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan program AutoDock 4.2 dan protein α -amilase (PDB ID: 1B2Y) sebagai makromolekul. Hasil penambatan molekul menunjukkan semua senyawa dapat berinteraksi dengan sisi aktif enzim α -amilase. Tiga interaksi terbaik ditunjukkan oleh senyawa 10, senyawa 23 dan 41 dengan nilai energi bebas ikatan berturut-turut adalah -7,29; -7,22; dan -7,84 kkal/mol. Ketiga senyawa terbaik memiliki interaksi dengan sisi aktif enzim α -amilase dengan residu asam amino penting yaitu Asp197, Glu233, dan Asp300 yang berperan dalam proses hidrolisis substrat polimerik seperti pati. Semua senyawa turunan aglikon kurkuligosida A yang diuji juga memiliki pola pengikatan yang mirip dengan interaksi ligan alami AC1 (6-metil-5-(4,5,6-trihidroksi-3-hidroksimetil-siklohex-2-enilamino)-tetrahidro-pyran-2,3,4-triol) dengan residu asam amino penting pada enzim α -amilase.

Kata Kunci: aglikon kurkuligosida A, α -amilase, diabetes, penambatan molekul

1. Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit tidak menular yang paling umum terjadi secara global. International Diabetes Federation (IDF) memperkirakan 1 dari 11 orang dewasa usia 20–79 tahun menderita diabetes. Indonesia menempati peringkat ke-6 di dunia dengan jumlah penderita 10,3 miliar dan diprediksi akan mengalami peningkatan pada tahun 2045 sebanyak 16,7 miliar.¹ Diabetes mellitus merupakan penyakit gangguan metabolik menahun akibat pankreas tidak cukup memproduksi insulin atau tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang diproduksi secara efektif. Akibatnya terjadi peningkatan konsentrasi glukosa darah (hiperglikemia). DM dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu DM tipe 1 dan DM tipe 2. DM tipe 2 terjadi pada 90% dari semua kasus diabetes dan lebih disebabkan karena gaya hidup penderita diabetes, lingkungan dan faktor genetik.²

Salah satu strategi terapi untuk pengobatan DM tipe 2 adalah dengan memperlambat penyerapan glukosa melalui penghambatan enzim α -amilase. Penghambatan enzim ini menunda pencernaan karbohidrat dan memperpanjang waktu pencernaan karbohidrat secara keseluruhan, menyebabkan penurunan penyerapan laju glukosa dan akibatnya mengurangi tingkat glukosa plasma postprandial.³ α -Amilase (*alpha-1,4glucan-4-glucanohydrolase*) adalah katalisator yang menghidrolisis alfa-1,4-glikosidik polisakarida pati menjadi oligosakarida untuk kemudian dicerna lebih lanjut menghasilkan glukosa. Agar dapat diserap oleh tubuh, pati akan dihidrolisis menjadi oligosakarida sederhana. Jika terjadi aktivitas enzim α -amilase dan defisiensi insulin atau resistensi terhadap insulin, tingkat glukosa darah akan terus meningkat sehingga menyebabkan DM tipe 2.⁴ Penghambatan enzim ini menunda dan memperpanjang waktu pencernaan karbohidrat secara keseluruhan, menyebabkan penurunan penyerapan laju glukosa dan akibatnya mengurangi tingkat glukosa plasma postprandial.³ Penelitian mengenai senyawa kalkon dan bis-kalkon⁵ menunjukkan bahwa senyawa tersebut

memiliki aktivitas penghambatan yang baik terhadap enzim α -amilase dengan nilai $IC_{50} = 1,25 \pm 1,05$ sampai $2,40 \pm 0,09 \mu M$. Selain itu, *in silico* senyawa trans-kalkon berupa struktur inti bifenolik dari prekursor flavonoid diuji aktivitas penghambatannya terhadap α -amilase, dapat berinteraksi dengan sisi aktif enzim α -amilase melalui ikatan hidrogen dengan residu asam amino Tyr62 dan Trp59.⁶

Kurkuligosida A merupakan senyawa glikosida benzilbenzoat yang termasuk dalam family glikosida kalkon yang diisolasi dari rimpang *Curculigo orchoides*.⁷ Susindran (2014) melaporkan bahwa ekstrak etanol rimpang *Curculigo orchoides* (dosis 300mg/kg berat badan) meningkatkan aktivitas enzim seperti superoksida dismutase (SOD), mengurangi glutathione (GSH), katalase (CAT), dan lipid peroksida (LPO) pada tikus. Senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya memiliki kemiripan struktur dengan senyawa kalkon. Menurut Johnson dan Maggiora (1990) dalam Qomariasih dkk (2016), senyawa yang memiliki struktur kimia yang mirip akan memiliki sifat biologis yang mirip pula dan akan cenderung mengikat protein yang sama.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memodelkan interaksi antara senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya dengan enzim α -amilase. Metode *molecular* penambatan molekul digunakan dikarenakan dapat memberi gambaran awal untuk kandidat senyawa kurkuligosida A dan turunannya yang berpotensi sebagai inhibitor enzim α -amilase.

2. Metode

2.1. Piranti lunak dan keras

ChemOffice 8.0 (www.cambridgesoft.com) dan HyperChem 8.07 release for Windows (Hypercube Inc.) digunakan di Laboratorium Kimia Komputasi, Sekolah Farmasi ITB, Bandung. Untuk menguji interaksi ligan dan protein digunakan AutoDock 4.2 dan Discover Studio Visualizer v4.5.0. Spesifikasi perangkat keras yang digunakan adalah Windows 7, 64 bits sebagai OS; prosesor Intel Core i3-2330 2,2 Ghz, RAM 2GB 1067 MHz DDR3.

2.2. Ligan dan protein

Bahan-bahan yang digunakan yaitu struktur 3D ligand binding domain (LBD) enzim α -amilase (PDB ID : 1B2Y) yang diperoleh dari basis data online Protein Data Bank (www.pdb.org) dan senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya.

2.3. Persiapan ligan

Ligan yang digunakan yaitu senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya sebanyak 57 senyawa. Ligan dibangun dengan membuat struktur 2D dengan menggunakan program ChemDraw Ultra 8.0 dalam paket program ChemOffice v.8.0 kemudian dikonversi menjadi format file *.mol dengan menggunakan Chem3D v.8.0. Struktur ligan 3D tersebut selanjutnya dioptimasi geometri dengan metode semi ampirik Austin Model 1 (AM1) menggunakan program HyperChem Release v8.07. dan disimpan dalam format file PDB.

2.4. Persiapan reseptor α -amilase

Makromolekul α -amilase pankreas manusia yang berisi 6-metil-5-(4,5,6-trihidroksi-3-hidroksimetil-sikloheks-2-enilamino)-tetrahidro-piran-2,3,4-triol sebagai ligan alami (PDB: 1B2Y) diunduh dari situs protein data bank (PDB) yaitu www.rcsb.org. Struktur protein ditampilkan pada paket program Discover Studio Visualizer v4.5. kemudian dipisahkan dari molekul air serta ligan alaminya lalu disimpan dalam format file *.pdb yang diperlakukan sebagai reseptor.

2.5. Validasi metode penambatan molekul

Validasi metode penambatan molekul

dilakukan dengan penambatan molekul ulang ligan alami ke dalam sisi aktif reseptornya. Ukuran grid box adalah (40 x 40 x 40) poin (1 poin: 0,365 Å) dengan koordinat grid box (x,y,z) berturut-turut adalah 18,427 Å; 8,939 Å; dan 48,997 Å. Validitas parameter metode penambatan molekul dievaluasi berdasarkan nilai RMSD (*root mean square deviation*). Validasi metode penambatan molekul dinyatakan valid jika nilai RMSD lebih kecil dari 2,0 Å10.

2.6. Simulasi penambatan molekul

Senyawa Uji selanjutnya ditambahkan ke dalam sisi aktif reseptor dengan grid box dan koordinat yang sama pada saat validasi parameter metode penambatan molekul. Penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan program Autodock tools 1.5.6 dengan format file *.pdbqt. Hasil analisis berupa energi bebas ikatan, ikatan hidrogen, dan pola pengikatan dengan residu asam amino lain pada sisi aktif reseptor.

3. Hasil

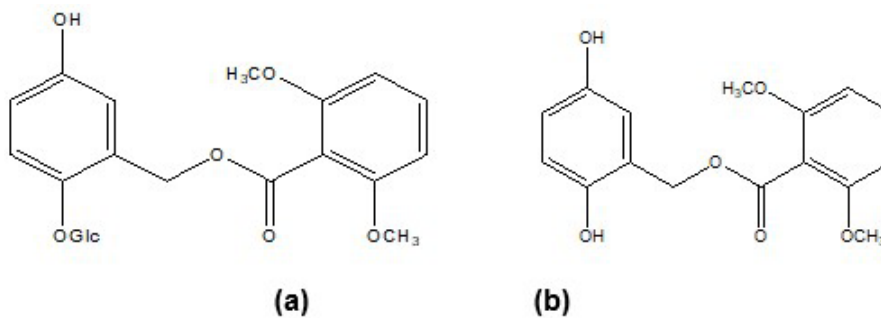
Hasil validasi parameter metode penambatan molekul melalui penambatan molekul ulang ligan alami (AC1) ke dalam sisi aktif reseptor, Parameter metode penambatan molekul dipilih dengan jumlah run 50 dengan grid box (40 x 40 x 40) poin dan koordinat grid box (x,y,z) 18,427 Å, 8,939 Å, 48,997 Å (Tabel 1),

Setelah dilakukan validasi parameter metode penambatan molekul, lalu dilakukan penambatan molekul senyawa aglikon kurkuligosida A dan turunannya pada sisi aktif enzim α -amilase.

Ligan yang digunakan dalam penelitian

Tabel 1. Hasil validasi docking

Ligan Alami	ED (kkal/mol)	Ki (nM)	RMSD (Å)	Residu Asam Amino
6-Metil-5-(4,5,6-Trihidroksi-3-Hidroksimetil-Sikloheks-2-Enilamino)-Tetrahidro-Piran-2,3,4-Triol	-9,14	199,58	0,73	Trp58, Tyr62, Asn100, His101, Asn137, Tyr151, Arg158, Asp167, Arg195, Asp197, Ala198, His201, Glu233, Ile235, Thr254, Asn298, His299, Asp300, Gly306, Arg337



Gambar 1. Struktur Kurkuligosida A (a) dan Aglikon kurkuligosida A (b)

adalah 57 senyawa turunan aglikon kurkuligosida A hasil modifikasi. Energi bebas ikatan (ED) yang diamati merupakan energi interaksi dari ikatan ligan terhadap enzim α -amilase. Hasil penambatan molekul senyawa uji menunjukkan semua senyawa dapat berinteraksi dengan sisi aktif reseptor yang ditandai dengan nilai energi bebas ikatan yang bernilai negatif (Tabel 2).

4. Pembahasan

Penambatan molekul digunakan untuk mengetahui interaksi ligan dengan makromolekul karena kemampuan untuk memprediksi dengan tingkat akurasi tinggi dan konformasi ligan dalam situs pengikatan target yang tepat.¹¹ Pemilihan protein target yang digunakan yakni enzim α -amilase pankreas manusia (HPA) dengan kode PDB 1B2Y yang tersedia pada Protein Data Bank (rcsb.pdb). Kode PDB ini dipilih karena metode pengukuran menggunakan difraksi sinar-X walaupun dengan resolusi agak rendah 3.2 Å tetapi cukup memenuhi untuk pengujian secara *in silico*. Struktur enzim α -amilase dideterminasi menggunakan teknik difraksi sinar-X dan enzim ini ditemukan terdiri dari tiga domain struktural. Domain

terbesar yaitu domain A yang membentuk paralel sentral beruntai delapan yang salah satu ujungnya merupakan sisi aktif enzim dengan residu asam amino Asp197, Glu233, dan Asp300.¹²

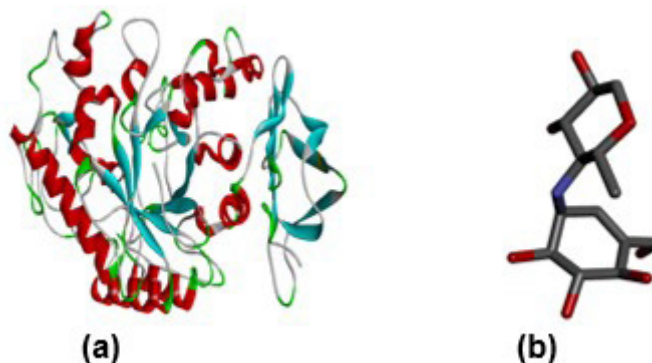
4.1. Validasi metode penambatan molekul

Proses validasi metode penambatan molekul dilakukan dengan cara penambatan molekul ulang ligan alami pada sisi aktif reseptor (PDB ID : 1B2Y). Parameter tahap validasi ini dilihat berdasarkan *Root Mean Squared Deviation* (RMSD). RMSD yang kurang dari 2 Å menunjukkan parameter metode penambatan molekul yang digunakan memberikan hasil yang lebih mendekati hasil eksperimental.

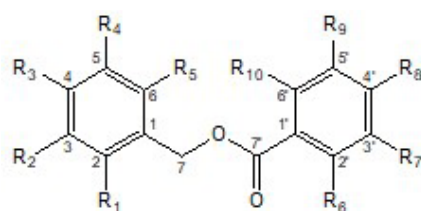
Dari hasil validasi diperoleh nilai RMSD 0,73 Å yang berarti parameter metode penambatan molekul yang digunakan memenuhi syarat. RMSD yang semakin kecil menunjukkan posisi ligan hasil penambatan molekul ulang yang semakin mendekati posisi ligan hasil kristalografi.¹³

4.2. Penambatan molekul senyawa

Proses penambatan molekul terhadap 57 senyawa turunan aglikon kurkuligosida



Gambar 2. Struktur enzim α -amilase (a) dan ligan alami (AC1) (b)

Tabel 2. Senyawa turunan aglikon kurkuligosida A dan nilai energi bebas ikatan ligan terhadap enzim α -amilase

No.	Senyawa	Substituen									ED (Kkal/mol)	Ki (μ M)
		R1	R2	R3	R4	R6	R7	R8	R9	R10		
1	Ligan Alami										-9,14	0,199
2	Senyawa 1	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-5,55	84,96
3	Senyawa 2	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-6,12	32,91
4	Senyawa 3	H	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	-6,66	13,06
5	Senyawa 4	OH	H	H	OH	H	OH	H	OH	H	-6,66	13,12
6	Senyawa 5	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-5,99	40,38
7	Senyawa 6	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,26	25,96
8	Senyawa 7	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-6,30	24,17
9	Senyawa 8	OH	Cl	Cl	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,81	10,28
10	Senyawa 9	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	Cl	Cl	H	OCH ₃	-6,46	18,41
11	Senyawa 10	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	H	Cl	Cl	OCH ₃	-7,29	4,57
12	Senyawa 11	OH	Cl	Cl	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-6,12	32,62
13	Senyawa 12	OH	H	H	OH	OCH ₃	Cl	Cl	H	OCH ₃	-5,91	46,66
14	Senyawa 13	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	Cl	Cl	OCH ₃	-6,04	37,07
15	Senyawa 14	OH	Cl	H	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,44	19,18
16	Senyawa 15	OH	CF ₃	Cl	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-5,41	107,44
17	Senyawa 16	OH	H	H	OH	OCH ₃	CF ₃	Cl	H	OCH ₃	-5,66	70,98
18	Senyawa 17	OH	CF ₃	H	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,18	29,47
19	Senyawa 18	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	CF ₃	H	H	OCH ₃	-6,00	39,77
20	Senyawa 19	OH	CF ₃	Cl	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,00	39,76
21	Senyawa 20	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	CF ₃	Cl	H	OCH ₃	-5,89	48,39
22	Senyawa 21	OH	CF ₃	NO ₂	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-6,88	9,00
23	Senyawa 22	OH	H	H	OH	OCH ₃	CF ₃	NO ₂	H	OCH ₃	-5,76	59,98
24	Senyawa 23	OH	H	Cl	OH	OCH ₃	CF ₃	NO ₂	H	OCH ₃	-7,22	5,14
25	Senyawa 24	OH	CF ₃	NO ₂	OH	OCH ₃	H	Cl	H	OCH ₃	-6,37	21,35
26	Senyawa 25	OH	H	NO ₂	OH	OCH ₃	CF ₃	NO ₂	H	OCH ₃	-6,48	17,81
27	Senyawa 26	OH	H	NO ₂	OH	H	H	NO ₂	H	H	-6,94	8,22
28	Senyawa 27	H	OH	NO ₂	OH	H	OH	NO ₂	OH	H	-5,96	42,60
29	Senyawa 28	OH	H	H	OH	H	H	NO ₂	H	H	-7,11	6,14
30	Senyawa 29	OH	H	H	OH	H	OH	NO ₂	OH	H	-6,69	12,37
31	Senyawa 30	H	OH	H	OH	H	NO ₂	H	H	H	-7,13	5,96
32	Senyawa 31	H	OH	H	OH	H	NO ₂	H	NO ₂	H	-6,95	8,08
33	Senyawa 32	H	OH	H	OH	Cl	H	H	H	H	-6,80	10,32
34	Senyawa 33	H	OH	H	OH	H	Cl	H	H	H	-6,93	8,29
35	Senyawa 34	H	OH	H	OH	H	H	Cl	H	H	-6,94	8,15

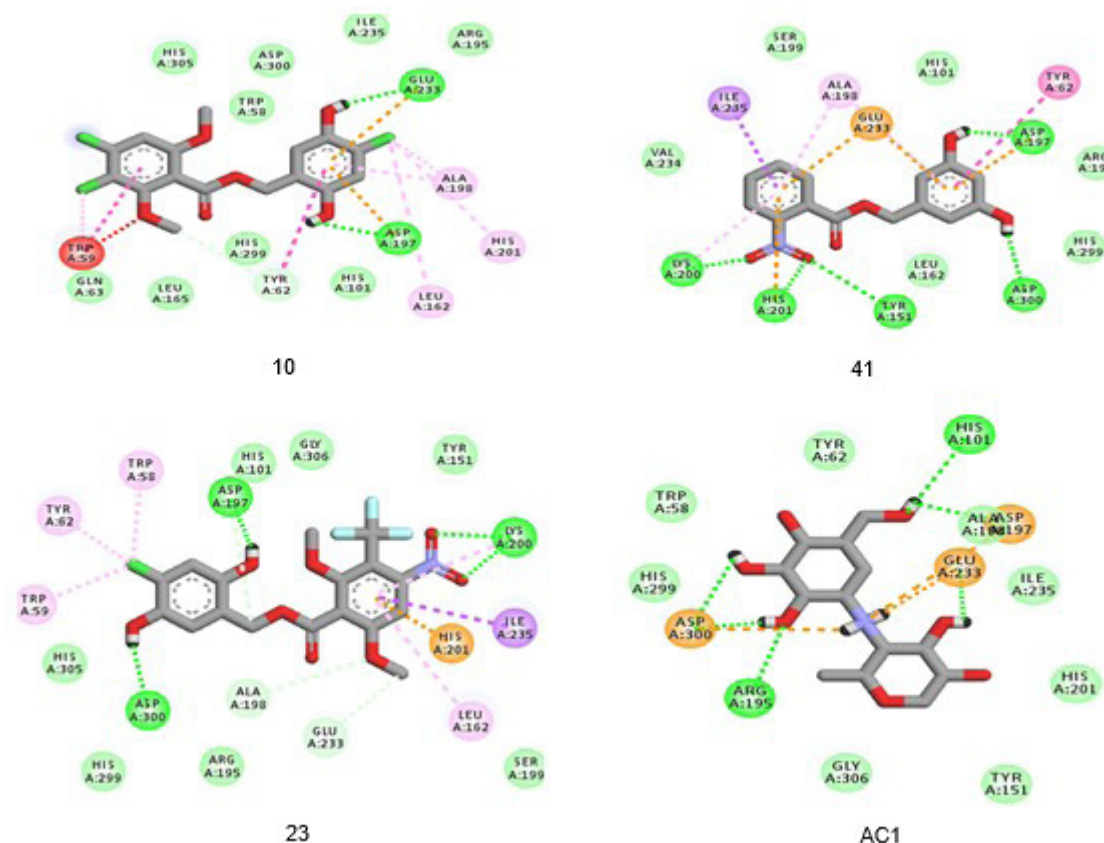
Tabel 2. Senyawa turunan aglikon kurkuligosida A dan nilai energi bebas ikatan ligan terhadap enzim α -amilase (lanjutan)

No.	Senyawa	Subtituen									ED (Kkal/mol)	Ki (μ M)
		R1	R2	R3	R4	R6	R7	R8	R9	R10		
36	Senyawa 35	H	OH	H	OH	H	H	Br	H	H	-6,80	10,35
37	Senyawa 36	H	OH	H	OH	H	H	H	Br	H	-7,08	6,44
38	Senyawa 37	H	OH	H	OH	F	H	H	H	H	-6,20	28,60
39	Senyawa 38	H	OH	H	OH	H	H	F	H	H	-6,32	23,17
40	Senyawa 39	H	OH	H	OH	H	H	NO ₂	H	H	-6,84	9,75
41	Senyawa 40	H	OH	H	OH	H	H	CF ₃	H	H	-6,47	18,07
42	Senyawa 41	H	OH	H	OH	NO ₂	H	H	H	H	-7,84	1,78
43	Senyawa 42	H	OH	H	OH	H	H	C ₂ H ₅	H	H	-6,66	13,04
44	Senyawa 43	H	OH	H	OH	H	H	C(CH ₃) ₃	H	H	-7,27	4,71
45	Senyawa 44	H	H	OH	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	-6,52	16,56
46	Senyawa 45	H	H	OH	H	Cl	H	H	H	H	-6,15	31,08
47	Senyawa 46	H	H	OH	H	H	H	H	Cl	H	-6,33	22,75
48	Senyawa 47	H	H	OH	H	H	H	Cl	H	H	-6,29	24,64
49	Senyawa 48	H	H	OH	H	H	H	Br	H	H	-6,66	13,11
50	Senyawa 49	H	H	OH	H	H	H	H	Br	H	-6,57	15,39
51	Senyawa 50	H	H	OH	H	F	H	H	H	H	-6,19	28,96
52	Senyawa 51	H	H	OH	H	H	H	F	H	H	-6,08	34,65
53	Senyawa 52	H	H	OH	H	H	H	NO ₂	H	H	-6,62	13,99
54	Senyawa 53	H	H	OH	H	H	H	CF ₃	H	H	-5,79	56,75
55	Senyawa 54	H	H	OH	H	H	H	H	H	NO ₂	-7,15	5,75
56	Senyawa 55	H	H	OH	H	H	H	C ₂ H ₅	H	H	-6,44	18,87
57	Senyawa 56	H	H	OH	H	H	H	C(CH ₃) ₃	H	H	-6,75	11,28
58	Senyawa 57	H	H	OH	H	H	CH ₃	H	H	H	-6,24	26,56

A dilakukan sebanyak 50 kali dalam sekali penambatan molekul tiap senyawa, sehingga dihasilkan 50 pose pada ligan dengan energi bebas yang berbeda-beda untuk memperoleh interaksi yang terbaik. Turunan aglikon kurkuligosida A (Tabel 1) didesain dengan memperhatikan aspek kemudahan dalam sintesis dan *Lipinski's rule of five*. Hasil simulasi penambatan molekul kemudian divisualisasi menggunakan Discover Studio

Visualizer v4.5. Parameter yang dianalisis adalah energi bebas ikatan (ΔG), ikatan hidrogen, dan pola interaksi lain dengan residu asam amino pada sisi aktif reseptor. Pengamatan interaksi residu asam amino bertujuan untuk mengidentifikasi interaksi yang terjadi antara ligan dan reseptor. Ikatan hidrogen merupakan interaksi yang dapat menstabilkan ikatan ligan dengan reseptor. Interaksi lain antara ligan yang dapat

**Gambar 3.** Overlay konformasi ligan copy (merah) dengan ligan alami (biru)



Gambar 4. Interaksi senyawa 10, 23, 41 dan ligan alami (AC1) pada sisi aktif enzim α -amilase

meningkatkan kestabilan konformasi adalah interaksi elektrostatik dan interaksi van der Waals.¹⁴

Interaksi melalui ikatan hidrogen antara ligan uji dengan residu asam amino yang sama dengan ligan alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi dalam hal ini menggambarkan kemiripan aktivitas.¹⁵ Semua senyawa uji memiliki nilai energi bebas ikatan (ΔG) yang negatif. Semakin negatif nilai energi bebas ikatan menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara ligan dan protein target (reseptor) sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat.¹⁴

Berdasarkan hasil visualisasi, dapat diketahui bahwa seluruh senyawa turunan aglikon kurkuligosida A mampu berinteraksi dengan enzim α -amilase pada sisi aktif enzim dengan membentuk ikatan dengan asam amino kunci yaitu Asp197, Glu233 dan Asp300. Residu Asp197 bertindak sebagai nukleofilik katalitik dalam reaksi hidrolisis yang dilakukan oleh enzim α -amilase pada substrat polimerik seperti pati makanan. Residu Asp300 sangat penting dalam mengoptimalkan orientasi substrat yang

terikat di situs aktif yang berdekatan dengan residu katalis dan menstabilkan keadaan transisi.¹⁶

Senyawa yang menunjukkan interaksi terbaik yaitu senyawa 10 (4-kloro-2,5-dihidroksibenzil-3,4-dikloro-2,6-dimetoksibenzoat), senyawa 23 (4-kloro-2,5-dihidroksibenzil-2,6-dimetoksi-4-nitro-3-(trifluorometil)benzoat), dan senyawa 41 (3,5-dihidroksibenzil-2-nitrobenzoat) dengan nilai energi bebas ikatan berturut-turut adalah $-7,29$; $-7,22$; dan $-7,84$ kkal/mol (Gambar 4 dan Tabel 1).

Berdasarkan Gambar 4, bagian dari senyawa terbaik yang paling berkontribusi dalam interaksinya dengan reseptor adalah melalui ikatan hidrogen gugus hidroksil (O-H). Selanjutnya gugus hidroksil dari cincin A berinteraksi dengan molekul air nukleofilik yang memainkan peran dalam reaksi hidrolisis substrat sehingga secara efektif menghentikan fungsinya.¹⁶ Ketiga senyawa uji berinteraksi dengan residu asam amino yang sama dengan ligan alami pada sisi aktif reseptor. Ketiga senyawa ini membentuk ikatan hidrogen dengan residu Asp197, Glu233 dan Asp300.

Selain membentuk interaksi dengan residu asam amino penting, senyawa uji juga membentuk interaksi lain dengan residu asam amino pada sisi aktif reseptor.

Senyawa aglikon kurkuligosida A memiliki cincin aromatik berbentuk planar yang memungkinkan adanya interaksi van der Waals dan interaksi π . Sistem aromatik yang kaya elektron dan anion yang kekurangan elektron dapat membentuk interaksi π anion. Interaksi π anion memainkan peran penting dalam stabilitas protein dan pengikatan ligan, serta interaksi ini menguntungkan secara energetik.¹⁷⁻¹⁸

5. Simpulan

Semua senyawa turunan aglikon kurkuligosida A dapat berinteraksi dengan sisi aktif enzim α -amilase. Tiga ligan dengan interaksi terbaik ditunjukkan oleh senyawa 10, 23, dan 41 dengan nilai energi bebas ikatan berturut-turut adalah $-7,29$; $-7,22$; dan $-7,84$ kkal/mol. Ketiga senyawa terbaik membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino penting yaitu Asp197, Glu233 dan Asp300.

Daftar Pustaka

- Zheng, Y., Sylvia, H. L. dan Frank, B. H. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Melitus and Its Complications. Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. 2018; 14: 88
- Proenca C., Freitas, Marisa., Ribeiro D., Oliveria, E.D.F., Sousa, Joana., Tome, Sara M., Ramos, Maria J., et al. α -Glucosidase Inhibition by Flavonoids : an In Vitro and In Silico Structure –Activity Relationship Study. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2017; 32 (1): 1216-1228.
- De Sales, P., de Souza, P., Simeoni, L., Magalhães, P., dan Silveira, D. α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília, Brazil. J Pharm Pharmaceut Sci. 2012; 15(1): 141-183.
- Agarwal, P. dan Gupta, R. Alpha-Amylase Inhibition Can Treat Diabetes Melitus. Research and Reviews Journal of Medical And Health Sciences. 2016; 5(4): 1-8.
- Bale, A., Khan, K., Salar, U., Chigurupati, S., Fasina, T., Ali, F., et al. Chalcones and Bis-Chalcones: As Potential α -Amylase Inhibitors; Synthesis, In Vitro Screening, and Molecular Modelling Studies. Bioorganic Chemistry. 2018; 79: 179–189.
- Najafian, M., Habibi, A., Nastaran H., Parichehreh, Y., Kazem, P. dan Bagher, L. Trans-chalcone: a novel small molecule inhibitor of mammalian alpha-amylase. Springer Science+Business Media B.V: London. 2010.
- Valls, J., Richard, T, Larronde F., Leblais, V., Muller B., Delaunay J.C., et al. Two New Benzylbenzoate Glucosides from Curculigo orchoides. Fitoterapia. 2006; 77: 416-419.
- P. Susindran P., Ramesh N., Anti-diabetic effect of Curculigo orchoides Gaertn extracts in alloxan induced diabetic rats, Journal of Pharmacy Research. 2014; 8(7): 942-947.
- Qomariasih N., Budi S., Farit, M.A. Analisis Gerombol Simultan dan Jejaring Farmakologi antara Senyawa dengan Protein Target pada Penentuan Senyawa Aktif Jamu Anti Diabetes Tipe 2. Jurnal Jamu Indonesia. 2016; 1(2): 30-40.
- Trott, O. dan Olson, A.J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading, J. Comp. Chem., 2010; 31, 455–461.
- Ferreira, L., Santos, R., Glaucius, O., dan Andricopulo, A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies, Molecules. 2015; 20: 13384-13421.
- Withers, S. G, Brayer, G. D., Luo, Y. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. Protein Sci. 1995; 4: 1730–1742.
- Kontoyianni, M., McClellan, Sokol.

- Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithm. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004; 47: 558-565.
14. Syahputra, G. 2014, Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase, Institut Pertanian Bogor: Bogor.
 15. Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A.L., Harris R, Goodsell, D.S, dan Olson, A.J. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2010; 5: 597-607.
 16. Williams, L., Chunmin L., Stephen G., dan Brayer, G. Order and Disorder: The Differential Structural Impacts of Myricetin and Ethyl Caffate on Human Amylase, an Anti-Diabetic Target, *J. Med. Chem.* 2012; 23: 1-37.
 17. Schwans, J. P., Sunden, F., Jonathan, k., Lassila, Gonzalez, A., Tsai, Y., et al. Use Of Anion-Aromatic Interactions Io Position The General Base In The Ketosteroid Isomerase Active Site. *PNAS*. 2013; 110(28): 11308-11313.
 18. Schottel, B. L., Chifotides, H. T., Dumbar, K. R. Anion π Interaction *Chem Soc Rev*. 2007; 37: 68-83.