

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman biota laut banyak ditemukan dan sangat beragam pada perairan di Indonesia. Keberagaman tersebut tentunya menyimpan banyak manfaat bagi kehidupan. varian alga laut sekitar 550 tersebar di seluruh perairan di Indonesia dari 8000 jenis alga laut di dunia. Alga laut yang terdapat di Sulawesi Selatan sebanyak 167 varian dari 550 varian di Indonesia. Varian alga laut tersebut terdiri dari 110 jenis alga merah, 21 jenis alga hijau dan 36 jenis alga coklat (KBRI, 2021).

Alga laut merupakan reservoir penting karena memiliki senyawa bioaktif diantaranya alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin. Selain itu, alga laut juga mengandung banyak asam amino esensial dan kaya akan asam aspartat dan asam glutamat (Ramu Ganesan et al., 2020). Alga laut menjadi salah satu sumber senyawa alami yang paling menarik, karena memiliki potensi tinggi dalam pengembangan produk terapeutik dan nutraceutical baru. Alga laut memberikan keunggulan dibandingkan sumber senyawa bioaktif lainnya ditinjau dari segi biaya, kelayakan, proses produksi yang ramah lingkungan, serta hasil ekstraksinya yang tinggi dan yang terpenting ketersediaan biomassa pada ekosistem alami. Efek menguntungkan alga laut sebagian besar karena adanya kandungan mineral dan vitamin (El-Beltagi et al., 2022).

A. spicifera sebagai salah satu alga laut yang kaya akan senyawa bioaktif dengan berbagai potensi untuk dimanfaatkan. Alga laut *A. spicifera* diketahui mengandung senyawa alkaloid, fitosterol, flavonoid, saponin, fenol, steroid dan diterpen (Shankhadarwar, 2015, Narayanamurthy et al., 2022, dan Zeng et al., 2001). Berbagai penelitian juga telah banyak dilakukan baik berupa ekstrak maupun senyawa murni hasil isolasi untuk mengetahui beragam aktivitasnya. Aktivitas yang pernah dilakukan diantaranya sebagai antidiabetes, antioksidan, antiinflamasi, antitumor, antikanker dan antimikroba (Babu et al., 2020). Penelitian mengenai alga laut *A. spicifera* sebagai antihistamin atau anti alergi masih terbatas. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Zeng et al (2001) ditemukan berbagai senyawa flavonoid pada alga laut *Acanthophora spicifera* diantaranya acanthophorin A, acanthophorin B, tilimside, katekin dan kuersetin. Kuersetin diklaim merupakan salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antihistamin (Jafarinia et al., 2020). Selain itu, polifenol yaitu *fucodiphloroethol G*, *phlorofucofuroeckol A* dan *eckol* dari alga laut *Enteromorpha flexilis* (Y. Li et al., 2008), *phlorotannin 2-[2-(3,5-dihydroxyphenoxy)-5-*y*-1,3,5-benzenetriol,2,2'-[2-(3,5-dihydroxy phenoxy)-5-*ie*]bis(oxy)]bis(1,3,5-benzenetriol)*, dan *2-[2-[4-[2-(3,5-dihydroxyphenoxy)-3,5-dihydroxyphenoxy]-3,5 dihydroxyphenoxy]-3,5 dihydroxyphenoxy]* dari *Sargassum carpophyllum* (Matsui et al., 2022), (Ko et al., 2017 dan Hong et al., 2017), polipeptida (Ko et al., 2016), aldehida) (Xie et al., 2017), dan alkaloid quinoline (Viridicatinol



(Shu et al., 2020) juga memiliki aktivitas sebagai antihistamin yang dapat mencegah timbulnya reaksi alergi (N. Chen et al., 2023).

Alergi menurut *American Academy of Allergy Asthma and Immunology Allergy Statistics* (2024) merupakan respon imun tubuh yang berlebihan terhadap paparan alergen. Reaksi alergi dapat menimbulkan berbagai gejala, seperti rinitis, angioedema, urtikaria dan anafilaksis. Mediator utama yang berperan dalam proses terjadinya reaksi alergi adalah histamin yang dilepaskan oleh sel *mast* dan *basophil*. Faktor umum penyebab terjadinya reaksi hipersensitifitas yaitu makanan (susu, gandum dan kedelai), obat-obatan (antibiotik, vaksin dan kemoterapi) dan racun (sengatan lebah, tawon dan bisa ular). Mekanisme terjadinya reaksi alergi yaitu alergen yang masuk akan diserap/difagosit oleh APC dan dipresentasikan ke sel Th0. Sel Th0 akan mengalami polarisasi menjadi sel Th2 dan menghasilkan sitokin (IL-4, IL-5 dan IL-13). Sitokin akan merangsang sel limfosit B untuk memproduksi IgE yang akan berikatan dengan alergen membentuk kompleks imun. Kompleks imun akan mengaktifasi sel *mast* sehingga terjadi degranulasi dengan melepaskan mediator alergi seperti histamin, leukotrien, dan prostaglandin yang sudah tersimpan sebelumnya. Mediator alergi kemudian diterima oleh reseptor yang akan menimbulkan gejala hipersensitifitas (Krishnasamy G et.al, 2001).

Antihistamin mengacu pada obat yang bekerja pada reseptor histamin. Antihistamin merupakan kebalikan dari reseptor histamin yang aktif secara konstitusional, menurunkan aktivitas histamin dengan menstabilkan reseptor histamin dalam konformasi tidak aktifnya (Waller, D. G., & Hitchings, A. W. (2021). Reseptor histamin bertanggung jawab atas tindakan defensif dan tindakan imunoregulasi histamin, bersama dengan peradangan alergi akut dan kronis. Reseptor histamin diekspresikan di banyak jaringan dan sel, termasuk saraf, sel endotel, sel otot polos pembuluh darah, epitel pernapasan, sel hati, sel dendritik, dan limfosit. Ketika histamin berikatan dengan reseptornya pada vena kapiler kecil, dapat menyebabkan pembentukan bintil edema dan eritematosa atau pembengkakan berwarna pada kulit (angioedema) (Duangmee et al., 2022).

Obat antihistamin yang ada saat ini dikategorikan ke dalam dua generasi yaitu antihistamin generasi pertama (fg-AH) dan antihistamin generasi kedua (sg-AH). Fg-AH diantaranya klorfeniramin, difenhidramin, hidroksizin, siproheptadin, clemastine, promethazine, dan doxepin sedangkan sg-AH antara lain bilastine, cetirizine, levocetirizine, ebastine, fexofenadine, loratadine, desloratadine, mizolastine dan rupatadine. Antihistamin generasi pertama dianggap kurang selektif terhadap reseptor histamin dan menimbulkan beberapa efek samping seperti sembelit, mulut kering, dan penglihatan kabur, serta berpotensi berakibat fatal.



fg-AH, misalnya difenhidramin, dapat menyebabkan efek ti demam, muka memerah, takikardia, hipotensi, kejang, dilatasi pupil, retensi urin, depresi pernafasan dan koma, in generasi kedua lebih selektif dan efek samping lebih ringan asi pertama, sehingga, sg-AH lebih direkomendasikan a pasien. Namun, keterbatasan uji klinis terhadap obat sg-AH

mengindikasikan pentingnya alternatif dan pengembangan pengobatan antihistamin yang bersumber dari bahan alam seperti alga laut (Xiang et al., 2024).

Alga laut *A. spicifera* diketahui memiliki berbagai metabolit sekunder potensial, salah satunya sebagai antihistamin. Potensi alga laut ini dapat diketahui dengan uji aktivitas secara komprehensif menggunakan metode uji *in vivo*, *in vitro* dan *in silico*. Uji *in vivo* dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan mencit BALB/c untuk mengetahui efektivitas ekstrak dalam mengurangi reaksi tanda-tanda alergi seperti urtikaria, edema dan anafilaksis. Uji *in vitro* dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak terhadap kadar histamin pada mencit. Sementara itu uji *in silico* melalui *molecular docking* dapat memprediksi interaksi senyawa bioaktif dalam ekstrak dengan reseptor histamin.

Berdasarkan latar belakang tersebut dilakukan penelitian ini untuk mengetahui potensi ekstrak alga laut *A. spicifera* sebagai antihistamin secara *in vivo*, *in vitro* dan *in silico*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi alga laut *A. spicifera* sebagai sumber senyawa antihistamin alami yang dapat dimanfaatkan dalam pengembangan obat herbal untuk menangani reaksi alergi.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Berapakah persentase rendemen ekstrak alga laut *A. spicifera* yang diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol?
2. Senyawa apakah yang terkandung dalam alga laut *A. spicifera* berdasarkan uji fitokimia dan analisis GC-MS?
3. Bagaimana pengaruh ekstrak alga laut *A. spicifera* terhadap mencit yang diinduksi dengan ovalbumin pada metode uji *in vivo*?
4. Bagaimana pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari alga laut *A. spicifera* terhadap kadar histamin darah mencit pada uji *in vitro* sebagai kandidat antihistamin?
5. Senyawa metabolit sekunder apakah yang terdapat pada ekstrak alga laut *A. spicifera* yang memiliki daya hambat terbaik terhadap reseptor histamin pada metode *in silico*?

1.3 Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menganalisis perbandingan rendemen ekstrak alga laut *A. spicifera* yang lengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut til asetat dan metanol.
kandungan senyawa dalam alga laut *A. spicifera* berdasarkan an analisis GC-MS.



3. Menguji pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari alga laut *A. spicifera* terhadap mencit yang diinduksi dengan ovalbumin pada metode uji *in vivo*.
4. Membandingkan pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari alga laut *A. spicifera* terhadap kadar histamin darah mencit pada uji *in vitro* sebagai kandidat antihistamin.
5. Mengaplikasikan metode *in silico* untuk memperoleh jenis senyawa metabolit sekunder pada ekstrak alga laut *A. spicifera* yang memiliki daya hambat terbaik terhadap reseptor histamin.

1.4 Manfaat penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Memberikan informasi mengenai potensi ekstrak alga laut *A. spicifera* sebagai antihistamin.
2. Memberikan acuan kepada peneliti selanjutnya untuk menggali lebih dalam mengenai senyawa yang berpotensi sebagai antihistamin pada alga laut *A. spicifera*

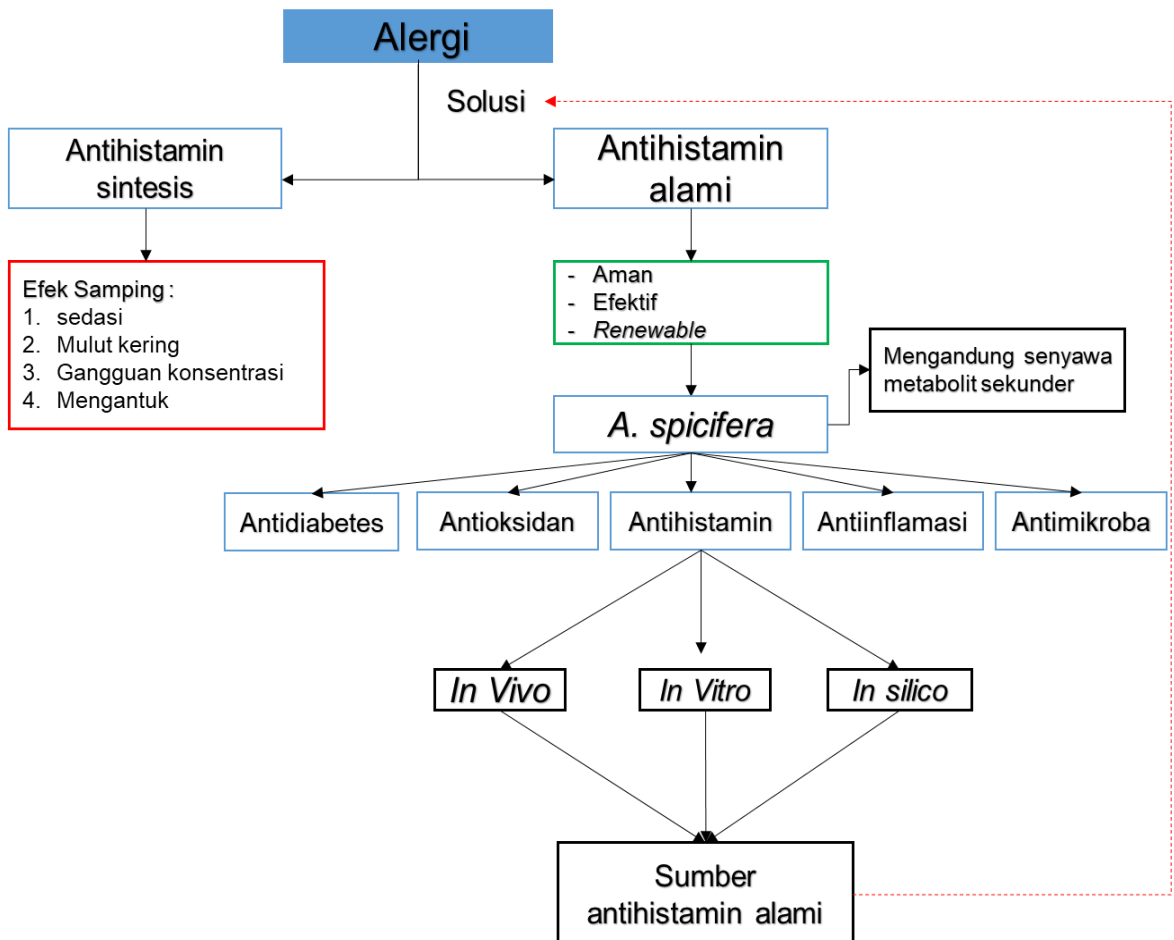
1.5 Kerangka Fikir Penelitian

Kasus alergi merupakan gangguan imunologis yang prevalensinya terus meningkat secara global dan menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang signifikan, termasuk di Indonesia. Menurut laporan *World Allergy Organization*, lebih dari 20% populasi dunia memiliki satu atau lebih bentuk penyakit alergi, dan jumlah ini terus bertambah akibat perubahan gaya hidup dan paparan lingkungan yang meningkat. Gejala seperti gatal, kemerahan, dan sesak napas akibat alergi dapat mengganggu kualitas hidup penderita. Saat ini, penggunaan antihistamin sintesis memang menjadi solusi utama, namun tidak jarang menimbulkan efek samping seperti sedasi, mulut kering, dan gangguan konsentrasi membatasi penggunaannya secara luas, khususnya pada pasien dengan kebutuhan pengobatan jangka panjang. Apabila tidak ditangani maka akan menimbulkan gejala yang lebih kronis seperti risiko hepatoksisitas, aritmia ventrikel dan resiko peningkatan demensia pada lansia. Oleh karena itu, pencarian alternatif antihistamin berbasis bahan alam menjadi semakin relevan, terutama yang menawarkan profil keamanan dan efektivitas yang lebih baik. Beberapa senyawa alami yang berpotensi sebagai antihistamin diantaranya kuarsetin, polifenol, terpenoid, polipeptida, alkaloid (indol-3-karbaldehida), dan alkaloid quinoline (Viridicatinol). Alga merah *A. spicifera*, diketahui kaya akan metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, fenolik,



ipun potensi biologinya telah dikaji dalam berbagai konteks, penelitian yang secara khusus mengeksplorasi potensi *A. spicifera* tamin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi alga bagai antihistamin menggunakan metode *in vivo*, *in vitro* dan *in* harapkan dapat memberikan informasi terkait antihistamin yang

bersumber dari bahan alam. Adapun kerangka fikir pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 1. Kerangka Fikir Penelitian

1.6 Hipotesis penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak alga laut *A. spicifera* yang diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol dapat persentase rendemennya.
 a. alga laut *A. spicifera* memiliki karakteristik fisik dan kimia tertentu
 b. uji fitokimia dan analisis GC-MS.
 c. pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari alga *A. spicifera* terhadap berat badan dan gejala alergi pada mencit selama pemaparan (P<0,05).



4. Terdapat pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari alga laut *A. spicifera* terhadap kadar histamin mencit ($P < 0,05$).
5. Ekstrak alga laut *A. spicifera* mengandung senyawa metabolit sekunder yang memiliki daya hambat terhadap reseptor histamin pada metode *in silico*.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan September 2024 – Januari 2025 di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi dan laboratorium HUMRC Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan sampel alga laut dilakukan di Barrang Lompo, Kepulauan Sangkarrang, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan pada titik koordinat 5°02'58"S 119°19'16"E oleh Mahasiswa Kelautan Universitas Hasanuddin. Sampel dihaluskan di Laboratorium preparasi PT. Halmahera Sukses Mineral.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu peralatan gelas, corong *Buchner*, alat cukur hewan *by kimei*, jarum suntik spuit 3 cc dan 5 cc *onemade*, kanula *onemade*, tabung EDTA *onemed vaculab* 3 ml, timbangan digital *ohaus*, *rotary vacum evaporator hahn shin HS-2000NS*, sentrifuge *PLC series*, plat microtiter, mikropipet, *GC-MS- QP2010 ultra shimadzu*, Elisa reader *thermo scientific multiskan FC*, *pulverizer KME*, inkubator *Heidolph Unimax 1010*, dan seperangkat computer/laptop untuk analisis *molecular docking*.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel alga laut *A. spicifera*, pelarut metanol (teknis), n-heksana (teknis), etil asetat (teknis), aseton (teknis), plat KLT, aquades (*onemade waterone*), aluminium foil, ovalbumin (putih telur ayam ras), cetirizine HCl 10 mg (generik), alkohol 70% (*onemed*), NaCl Fisiologis 0,9 % infus (OEM), asam sulfat p.a, bubuk aluminium hidroksida (*chhalco*), asam klorida p.a, FeCl₃ 10%, bubuk Mg, bubuk NaCMC (tylose), pereaksi mayer (merck), pereaksi dragendorf (merck), pereaksi wagner (merck), asam asetat anhidrat, pakan ADII, kloroform dan reagen ELISA dari *Bioassay Technology Laboratory* no. katalog E0248MO.

2.3 Prosedur Penelitian



Sampel

an ini sampel yang digunakan adalah alga laut *A. spicifera* yang di Barrang Lompo. Alga laut yang diperoleh dibersihkan mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Sampel dibersihkan kemudian dikeringkan anginkan selama beberapa yang terhindar dari paparan sinar matahari secara langsung adanya kerusakan senyawa bioaktif yang terkandung dalam

sampel alga laut. Proses penghalusan sampel dilakukan dengan menggunakan alat pulverizer ukuran 200 mesh.

2.3.2 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Semua ekstrak kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya rendemen setiap sampel dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (gr)}}{\text{bobot awal sampel (gr)}} \times 100 \% \quad (1)$$

2.3.3 Uji Fitokimia

Uji Fitokimia Senyawa yang terkandung di dalam ekstrak ditentukan dengan metode kolorimetri menggunakan pereaksi kimia. Pengujian dilakukan dengan pereaksi spesifik.

2.3.3.1 Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara ekstrak dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL HCl 1 M dan 1 mL pereaksi Mayer. Setelah itu diamati perubahan warna yang terbentuk (Harbone, A.J, 1998).

2.3.3.2 Uji Steroid/Terpenoid

Uji steroid/terpenoid dilakukan dengan cara ekstrak dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan masing-masing 1 mL kloroform dan asam asetat Anhidrat, selanjutnya ditetesi H_2SO_4 pekat sebanyak 1 mL. apabila terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan hasil positif senyawa steroid dan apabila terbentuk warna merah menunjukkan hasil positif senyawa terpenoid (Harbone, A.J, 1998).

2.3.3.3 Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara ekstrak 1 mL ditambahkan dengan air panas sebanyak 5 mL kemudian didinginkan, setelah itu dikocok selama 15 detik. Apabila terbentuk buih yang stabil selama ± 15 menit maka ekstrak tersebut positif mengandung senyawa saponin (Harbone, A.J, 1998).

2.3.3.4 Uji Fenolik



akukan dengan cara ekstrak dipipet sebanyak 1 mL ke dalam dian ditambahkan 2 mL FeCl_3 10%. Hasil positif ditunjukkan warna biru tua (Harbone, A.J, 1998).

2.3.3.5 Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL, selanjutnya ditambahkan etanol, kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg, kemudian ditambahkan 3 tetes HCl pekat atau asam pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah tua (Harbone, A.J, 1998).

2.3.4 Analisis GC-MS

Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak yang memiliki bioaktivitas antihistamin paling baik berdasarkan uji *in vitro* dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*. Ekstrak yang terpilih dibuat dengan konsentrasi 1% dengan pelarut pro analis. Larutan kemudian disaring dan dimasukkan kedalam vial 2 mL. selanjutnya, diinjeksikan pada sistem GC-MS.

2.3.5 Uji Aktivitas Antihistamin

2.3.5.1 Pembuatan sediaan NaCMC 0,5%

NaCMC ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dilarutkan dalam aquades sebanyak 100 mL yang telah dipanaskan hingga suhu 70°C.

2.3.5.2 Pembuatan sediaan adjuvat $\text{Al}(\text{OH})_3$ 1%

$\text{Al}(\text{OH})_3$ ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL NaCl fisiologis 9%.

2.3.5.3 Pembuatan sediaan oral kontrol positif

Cetirizine HCl ditimbang sebanyak 0,0079 gram, kemudian dilarutkan dalam 5 mL NaCMC 0,5%.

2.3.5.4 Pembuatan sediaan oral ovalbumin 25%

Sebanyak 2,5 mL ovalbumin putih telur dilarutkan kedalam 7,5 mL NaCMC 0,5%.

2.3.5.5 Pembuatan sediaan injeksi ovalbumin 25%

Sebanyak 0,2 ml ovalbumin putih telur dilarutkan dalam 7,5 mL larutan adjuvat $\text{Al}(\text{OH})_3$ 1%.

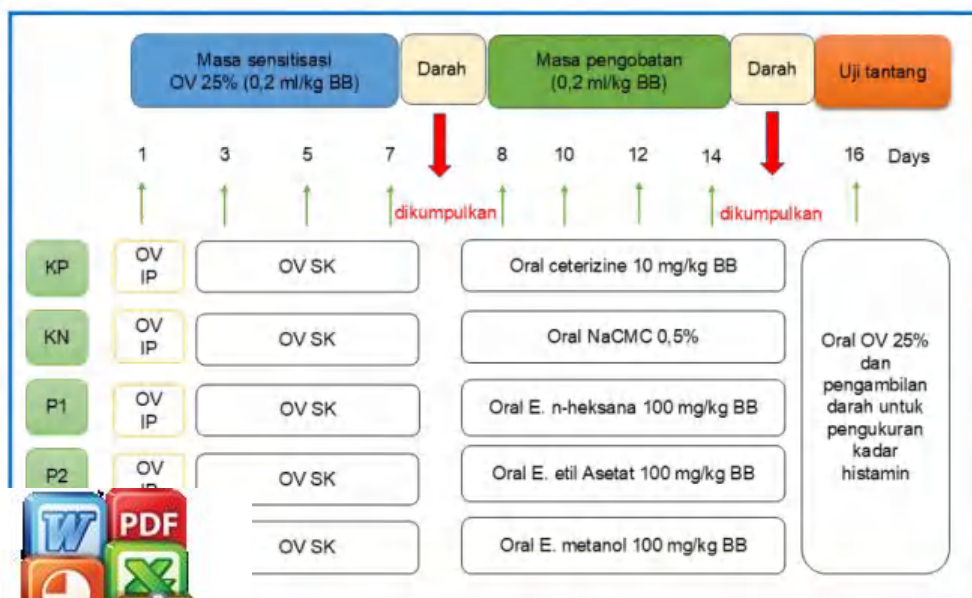
2.3.5.6 Pembuatan sediaan ekstrak 100mg/KgBB



imbang sebanyak 0,05 gram, kemudian dilarutkan dalam volume 5 mL.

ekor mencit BALB/c diberikan pakan dan air minum standar kemudian dilakukan uji. Mencit jantan kemudian ditimbang bobotnya kelompok. Kelompok 1 (kontrol positif), kelompok 2 (kontrol

negative) dan kelompok 3,4,5 (kelompok uji). Pada hari pertama semua mencit diinduksi ovalbumin 25% 0,2 mL/kg BB dengan injeksi intraperitoneal dan pada hari ke-3,5,7 dilanjutkan pemberian antigen ovalbumin secara subkutan hingga muncul gejala alergi yaitu timbul warna kemerahan atau bentol-bentol di sekitar tempat injeksi. Darah dari setiap mencit kemudian dikumpulkan melalui sinus orbita. Selanjutnya pada hari ke-8 sampai hari ke-14 kelompok kontrol positif diberikan cetirizine 10 mg/kg BB, kelompok kontrol negatif diberikan NaCMC, kelompok 3 diberikan ekstrak n-heksana 100 mg/kg BB, kelompok 4 diberikan ekstrak etil asetat 100 mg/kg BB dan kelompok 5 diberikan ekstrak metanol 100 mg/kg BB selama 6 hari (data perhitungan dosis disajikan pada lampiran 11). Darah dari setiap mencit kemudian dikumpulkan melalui sinus orbita. Selanjutnya pada hari ke-16 semua mencit diuji tantang dengan ovalbumin 25% secara oral. Selanjutnya, dilakukan pengamatan secara fisiologis tanda-tanda alergi selama 5 jam. Parameter fisiologis yang diukur meliputi gejala klinis yang diberi skor. 0 = tidak ada tanda-tanda; 1 = menggaruk berulang-ulang, menggosok-gosok sekitar moncong dan kepala; 2 = bengkak di sekitar mata dan moncong, diare, pilar erecti, penurunan aktivitas dan atau penurunan aktivitas disertai peningkatan frekuensi pernapasan; 3 = mengi, sesak napas, sianosis di sekitar mulut dan ekor; 4 = gemetar dan kejang dan 5 = kematian. Pengamatan dilakukan selama 30 menit setelah induksi ovalbumin. Skor total untuk setiap hewan diperoleh dengan menambahkan skor rata-rata untuk tanda-tanda klinis individu. Darah dari setiap mencit kemudian dikumpulkan melalui sinus orbita untuk selanjutnya dilakukan penentuan kadar histamin dengan Metode ELISA (Aldi et al., 2013, Aldi et al., 2012, dan Aswar et al., 2015, dan (Mine et al., 2020).



eksperimental. 5 kelompok (KP) kontrol positif, (KN) kontrol (P1) pengobatan dengan ekstrak n-heksana, (P2) pengobatan

dengan ekstrak etil asetat dan (P3) pengobatan dengan ekstrak metanol (n=5/kelompok).

2.3.6 Uji Aktivitas Antihistamin secara *In Vitro*

Darah segar mencit yang telah dikumpulkan disentrifugasi 1500 rpm selama 15 menit untuk memperoleh plasmanya. Persiapan uji ELISA dilakukan berdasarkan standar prosedur yang disarankan Perusahaan BT LAB (*Bioassay Technology Laboratory*). Preparasi semua reagen, sampel dan standar. Standar dibuat dengan konsentrasi 7,5 ng/mL, 15 ng/mL, 30 ng/mL, 60 ng/mL, dan 120 ng/mL. Masukkan deret standar pada sumur baris pertama dan juga blanko masing-masing sebanyak 50 μ L. Selanjutnya, sampel serum ditambahkan ke dalam sumur sebanyak 40 μ L. Tambahkan biotin antibodi sebanyak 10 μ L ke dalam setiap sumur kecuali standar. Selanjutnya, tambahkan 50 μ L larutan kerja HRP. Inkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian buang cairannya, lalu cuci plate sebanyak 5 kali dengan cairan pembersih. Tambahkan 50 μ L substrat larutan A dan 50 μ L substrat larutan B pada setiap sumur. Inkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C dalam suasana gelap. Selanjutnya, tambahkan *stop solution* pada setiap sumur kemudian ukur nilai absorbansi menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 450 nm.

2.3.7 Analisis Data

Analisis data statistik ditentukan dengan metode parametrik menggunakan *repeated measures analysis of variance* (ANOVA) untuk melihat pengaruh kelompok perlakuan selama masa sensititasi, pengobatan dan setelah uji tantang yang diikuti dengan uji *post hoc* perbandingan perkalian Tukey (Mine et al., 2020). Analisis dengan metode non parametrik yaitu friedman untuk melihat adanya pengaruh gejala alergi terhadap rentang waktu pengukuan yang diikuti dengan uji wilcoxon untuk melihat secara spesifik terhadap waktu yang memiliki pengaruh signifikan, dilanjutkan dengan uji kruskal wallis untuk melihat pengaruh antar kelompok perlakuan yang diikuti dengan uji Mann-Whitney U untuk membandingkan dua kelompok perlakuan pada satu waktu pengukuran yang memberikan nilai signifikan (Zhang et al., 2019).

2.3.8 Uji Aktivitas Antihistamin secara *In Silico*

2.3.8.1 Preparasi Protein Reseptor H1 dan Ligan Standar

Struktur 3D makromolekul protein reseptor H1 diperoleh dari *database* (PDB) *Protein Data Bank* (<https://rcsb.org/structure>) dengan PDB ID: 3RZE. Selanjutnya digunakan *software chimera 1.17.3* untuk menghilangkan semua residu pada struktur dari struktur kompleks protein diambil kemudian dipreparasi le yang sama dengan protein. Protein dan ligan yang telah dengan format .pdb (Akram et al., 2024).



2.3.8.2 Preparasi Ligan Senyawa Hasil GC-MS dan Cetirizine sebagai Pemanding

Struktur 3D senyawa dominan dari ekstrak metanol (tabel 3.) diunduh pada laman *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kemudian digunakan *software chimera 1.17.3* untuk optimasi ligan dengan metode AMBER ff14SB dan menyimpan ligan dalam format .pdb. Prosedur yang sama dilakukan pada ligan cetirizine (Pettersen et al., 2004).

2.3.8.3 Penambatan Molekul

Setiap ligan ditambatkan pada sisi aktif protein menggunakan *software Autodock Tools 1.5.7*. Parameter penambatan dibuat pada titik koordinat grid box maps 27.017, 27.64 dan 45.951 dengan *grid box* 40x40x40 Å kemudian disimpan dalam format pdbqt. Algoritma sampling yang digunakan yaitu *Lamarckian genetic algorithm* untuk memprediksi konstanta inhibisi dan data energi ikatan. Parameter *docking* ditentukan dengan menggunakan *genetic algorithm* (GA) dengan jumlah run sebanyak 10 kali, ukuran populasi 150 dan jumlah maksimal evaluasi 2500000 (sedang). Berbagai parameter yang digunakan sebelumnya telah divalidasi dengan melakukan *docking* ulang terhadap ligan alami (doxepin) dengan nilai RMSD 0,83 Å (< 2 Å) (Morris et al., 2009). Visualisasi hasil penambatan diamati dengan menggunakan *software diccovery studio visualizer*

2.3.8.4 Parameter Farmakologi

Parameter *Lipinski's Rule of Five* pada semua ligan yaitu meliputi berat molekul <500 g/mol, logP <5, donor ikatan hidrogen <5, akseptor ikatan hidrogen <10, refractory molar antara 40 – 130 (Lipinski, 2004) dan analisis ADME (*Adsorption, Distribution, Metabolism, and Excretion*) dilakukan dengan menggunakan laman *Swissadme* (<http://www.swissadme.ch>) (Daina et al., 2017). Prediksi toksisitas dilakukan menggunakan *ProTox-3.0* (<https://tox.charite.de/prottox3/>) (Banerjee et al., 2018).

