

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Pada penelitian ini digunakan desain penelitian eksperimental laboratoris dengan tema farmakologi molekuler secara *in vitro* terhadap aorta marmut terisolasi dan metode *in silico* pada aktivitas piperin terhadap kanal Ca^{2+} menggunakan aplikasi *molecular docking* Autodock Vina[®].

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2018 hingga Mei 2018.

C. Kelompok Sampel

Subjek uji yang digunakan adalah marmut jantan, berat badan antara 400-500 gram dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing masing kelompok terdiri dari 5 marmut, yaitu :

1. Kelompok kontrol agonis (Ca^{2+}) mulai dari konsentrasi 2×10^{-8} M sampai 2×10^{-3} M.
2. Kelompok perlakuan antagonis (Piperin + Ca^{2+}).
3. Kelompok pembanding antagonis (*Nicardipine* + Ca^{2+}).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel tergantung, dalam penelitian ini adalah konsentrasi piperin, seri kadar obat kontrol positif, dan seri kadar Ca^{2+} .

2. Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dikendalikan sehingga hubungan variabel bebas dan variabel tergantung tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti, meliputi jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kondisi fisik marmut.

3. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas, meliputi respon kontraksi dan relaksasi otot polos aorta marmut, pD2.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Pada penelitian ini digunakan peralatan laboratotium meliputi :

a. Alat Uji Farmakologi

Alat-alat yang digunakan terdiri dari Thermostat tipe 1419 (B. Brawn, W. Germany[®]), *Isotonic Transducer* (Ugo Basille[®]), *Recorder* (Ugo Basille[®]) dua set *Organ Bath* (Ugo Basille[®])

volume 20 mL, *Bridge Amplifier* tipe 336 (Ugo Basille[®]), *Micro pipet* 100 μ L, 1000 μ L dan 5000 μ L (Socorex[®]).

b. Satu Set Peralatan Preparasi

Peralatan yang digunakan adalah gunting, pinset, papan fiksasi hewan, cawan fiksasi organ, jarum fiksasi, skalpel, (Simex Medizintechnik GmbH[®], Germany), dan benang.

c. Alat untuk Penyiapan *Free Ca²⁺ Buffer Krebs*

Alat yang digunakan berupa Vortex (CAT. M. Zippear GmbH. Etzenbach[®], W. Germany), pengaduk magnet thermostat (Cimarec[®]), Timbangan analitik (Mettler Toledo[®]) dan alat- alat gelas (Pyrex[®]).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

a. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian adalah Marmut Jantan galur lokal dengan berat badan antara 400-500 gram yang berasal dari Pasar Hewan PASTY.

b. Bahan Kimia

1. Larutan *buffer* fisiologis yang digunakan adalah larutan *free ca²⁺ buffer krebs* yang terdiri dari bahan-bahan berkualitas pro analisa (p.a) yang terdiri dari natrium klorida, magnesium sulfat heptahidrat, kalium klorida, natrium dihidrogen fosfat monohidrat, natrium hidrogen karbonat dan glukosa monohidrat kualitas farmasetis.

2. Gas Karbogen (*mixed* 95% O₂ dan 5% CO₂) (PT. Aneka Gas dan Industri Semarang cabang Yogyakarta).
3. Agonis Ca²⁺ .
4. Aqua destilata (Bratacho[®]) dan Water For Injection.
5. Dimetil sulfoksida (DMSO).
6. *Nicardipine Inj.* (PT.Bernofarm[®]).
7. Piperin yang dihasilkan pada proses isolasi penelitian sebelumnya oleh Amaliah (2016) menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etil asetat. Filtrat dari hasil maserasi dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm hingga diperoleh ekstrak. Kemudian ekstrak yang diperoleh disimpan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari. Kristal yang terbentuk, kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh kristal berwarna kuning. Identifikasi piperin dilakukan menggunakan uji KLT dengan fase diam silika gel 60 F254 dan fase gerak yang digunakan adalah BAW (*n-butanol: acetic acid : water = 4:1:5*). Pengamatan bercak dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan disemprotkan pereaksi *dragendorff*.

F. Prosedur Kerja dan Alur Penelitian

1. Uji *In Silico*

a. Instalasi Sistem Operasi Linux dan Aplikasi Pendukung

Instalasi sistem operasi Linux dilakukan karena aplikasi yang dibutuhkan untuk melakukan *molecular docking* pada umumnya hanya dapat dioperasikan pada Linux. Sistem operasi yang diinstal adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit. Setelah instalasi Linux, dilakukan instalasi aplikasi pendukung seperti Marvin Sketch untuk preparasi ligan atau senyawa yang akan diuji, AutoDockTools 4.2 untuk melakukan penambatan molekul, dan DS Visualizer untuk preparasi protein dan visualisasi hasil *docking* dalam bentuk virtual 3D.

b. Penyiapan Protein Target dalam Format PDBQT

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi protein data bank (www.rcsb.org) dalam format “.pdb”. Protein yang digunakan adalah protein Ca^{2+} Channel (PDB ID: 4MS2).

c. Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa piperin, *1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine* (ID: PX4) (*native ligand*) dan *nicardipine*. Data ligan diunduh melalui *major ligand data base* seperti Pub Chem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan dipilih dalam bentuk 3D

SDF. File ligan tersebut dibuka melalui aplikasi Discovery Studio Visualizer dan disimpan dalam format PDB (*.pdb).

d. Preparasi Ligan dan Protein Target dalam Format PDBQT

Langkah ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan protein target dalam format PDBQT. Hasil preparasi protein dilakukan preparasi lebih lanjut dengan aplikasi AutoDockTools dengan menambahkan atom hidrogen polar yang berfungsi untuk memberikan muatan parsial (*partial charges*) dalam protein target tersebut. Selain itu target protein perlu ditambahkan muatan melalui pilihan *Kollman Charges* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

Setelah dilakukan preparasi protein target selanjutnya dilakukan *input ligan* melalui perintah *Open Ligand* pada aplikasi AutoDockTools. Ligan yang telah masuk ke dalam protein target kemudian dilakukan preparasi dalam hal *Torsion Free* dan *Aromatic Carbons* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

e. Preparasi *Grid Parameter File*

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi AutoDock Tools yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan penyiapan *Grid Box*. *Grid Box* merupakan penentuan area untuk simulasi *docking*. Kemudian hasil *grid* disimpan dalam format *grid parameter file* (*.gpf).

f. Preparasi *Docking Parameter File*

Proses ini diawali dengan memilih protein target dan ligan melalui pilihan *docking* pada aplikasi AutoDock Tools. Proses *docking* dapat dilakukan pengaturan melalui perintah *Search Parameters* dan *Docking Parameters*. Selanjutnya pada bagian output dipilih *Lamarckian Genetic Algorithm* dan disimpan dalam format *docking parameter file* (*.dpf).

g. Simulasi *Docking*

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan Auto Grid 4.2 dan AutoDock 4.2 melalui Cygwin Terminal. File hasil preparasi sebelumnya yang meliputi Target.pdbqt, Ligand.pdbqt, *parameter file* (*.gpf), dan *docking parameter file* (*.dpf) disimpan dalam 1 folder pada Cygwin Terminal. Hasil simulasi *docking* ini berupa file dengan format *.dlg yang berisi informasi 10 konformasi dan file complex.pdb untuk kebutuhan visualisasi hasil.

h. Visualisasi Hasil *Docking*

Setelah didapatkan skor penambatan yang terbaik dari beberapa konformasi, dilakukan visualisasi dengan menggunakan aplikasi DS Visualizer. Aplikasi DS Visualizer akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D.

2. Penyiapan Larutan *Free Ca²⁺ Buffer Krebs*

Tabel 2. Komposisi larutan *Free Ca²⁺ buffer krebs*.

Formula A (1,0 L)		Formula B (1,0 L)	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	68,70 g/L	NaHCO ₃	21,00 g/L
KCL	4,20 g/L	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,90 g/L	-	-
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,00 g/L	-	-

Larutan *free Ca²⁺ buffer krebs* terdiri atas dua macam formula yang dapat dilihat pada tabel 2. Formula A masing-masing ditimbang lalu dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L, kemudian formula B ditimbang lalu dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L. Untuk membuat larutan *free Ca²⁺ buffer krebs* dicampurkan formula A dan formula B masing-masing 100 mL, glukosa 1,00 gram kemudian diencerkan dengan aquades sampai satu liter pada saat akan digunakan.

3. Penyiapan Larutan Senyawa Piperin

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-2} M. untuk membuat larutan tersebut, piperin ditimbang seksama seberat 28,534 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan senyawa piperin 2×10^{-2} M diencerkan menggunakan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 2×10^{-3} M. Larutan 2×10^{-3} M ditambahkan sebanyak 100 dan 500 μ L ke dalam *organ bath* yang telah berisi organ aorta marmut terisolasi dan larutan *free Ca²⁺ buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa piperin konsentrasi 10 μ M dan 50 μ M.

4. Penyiapan Seri Konsentrasi Ca^{2+}

Larutan Ca^{2+} dibuat sebagai larutan stok Ca^{2+} konsentrasi 2×10^{-1} M dalam aquades. Ca^{2+} memiliki bobot molekul 147.01 g/mol. Pengenceran larutan stok Ca^{2+} dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok Ca^{2+} 2×10^{-1} M sehingga diperoleh larutan Ca^{2+} konsentrasi 2×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} ; dan 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} .

5. Pembuatan Larutan *Nicardipine*

Larutan stok *nicardipine* (BM : 479.525 g/mol) dibuat pada konsentrasi 2×10^{-3} M. Sediaan yang tersedia adalah 1 mg/mL dengan total 10 mL sediaan injeksi. Sebanyak 9.6 ml *nicardipine* dilarutkan dalam WFI hingga 10 mL. Larutan dengan konsentrasi 10^{-5} M (10 μM) didapatkan dengan mengambil larutan *nicardipine* 2×10^{-3} M sebanyak 100 μL kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *free Ca^{2+} buffer krebs*. Larutan dengan konsentrasi 5×10^{-5} M (50 μM) didapatkan dengan mengambil larutan *nicardipine* 2×10^{-3} M sebanyak 500 μL kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *free Ca^{2+} buffer krebs*.

6. Preparasi Organ Aorta

Marmut jantan dengan berat 400-500 gram (berumur 3-4 bulan) di tempatkan pada tempat dengan suhu, pencahayaan dan mendapatkan makan dan minum yang teratur. Penanganan hewan uji ini dilakukan berdasarkan pada kode etik hewan uji yang berlaku di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah

Yogyakarta. Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi pada tulang belakang (*cervix*) pada benda keras. Selanjutnya, darah dan cairan tubuh dibersihkan, kemudian marmut diletakkan pada papan bedah. Kulit bagian dada kemudian dipotong memanjang kebawah sampai daerah *perineal*. Isi perut kemudian disingkirkan dan jaringan yang melekat pada aorta dibersihkan. Aorta yang menempel pada tulang belakang kemudian dipotong mulai dari daerah *perineal* sampai ke dada dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi *free Ca²⁺ buffer krebs*.

Aorta kemudian dibersihkan dari jaringan lemak dan otot. Setelah bersih, organ aorta kemudian dipotong dan diambil ± 1 cm panjangnya dengan kedua ujung aorta diikat, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian *hook* dari *organ bath* dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser. *Organ bath* harus telah terendam dengan larutan *free Ca²⁺ buffer krebs*, serta suhu *organ bath* 37°C dan dialiri dengan gas karbogen.

7. Uji Aktivitas Senyawa Piperin Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas piperin terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi aorta marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan 20,0 mL larutan *free Ca²⁺ buffer krebs*, kemudian organ direndam dalam *organ bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrisasi sampai

diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (100%). Pengukuran kontraksi dilakukan dua kali, dimana antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *free Ca²⁺ buffer krebs* setiap lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian piperin konsentrasi 10 dan 50 μM . Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam *organ bath* dengan konsentrasi bertingkat dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Kurva hubungan konsentrasi dan % respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh senyawa piperin yang terjadi, kemudian dibandingkan.

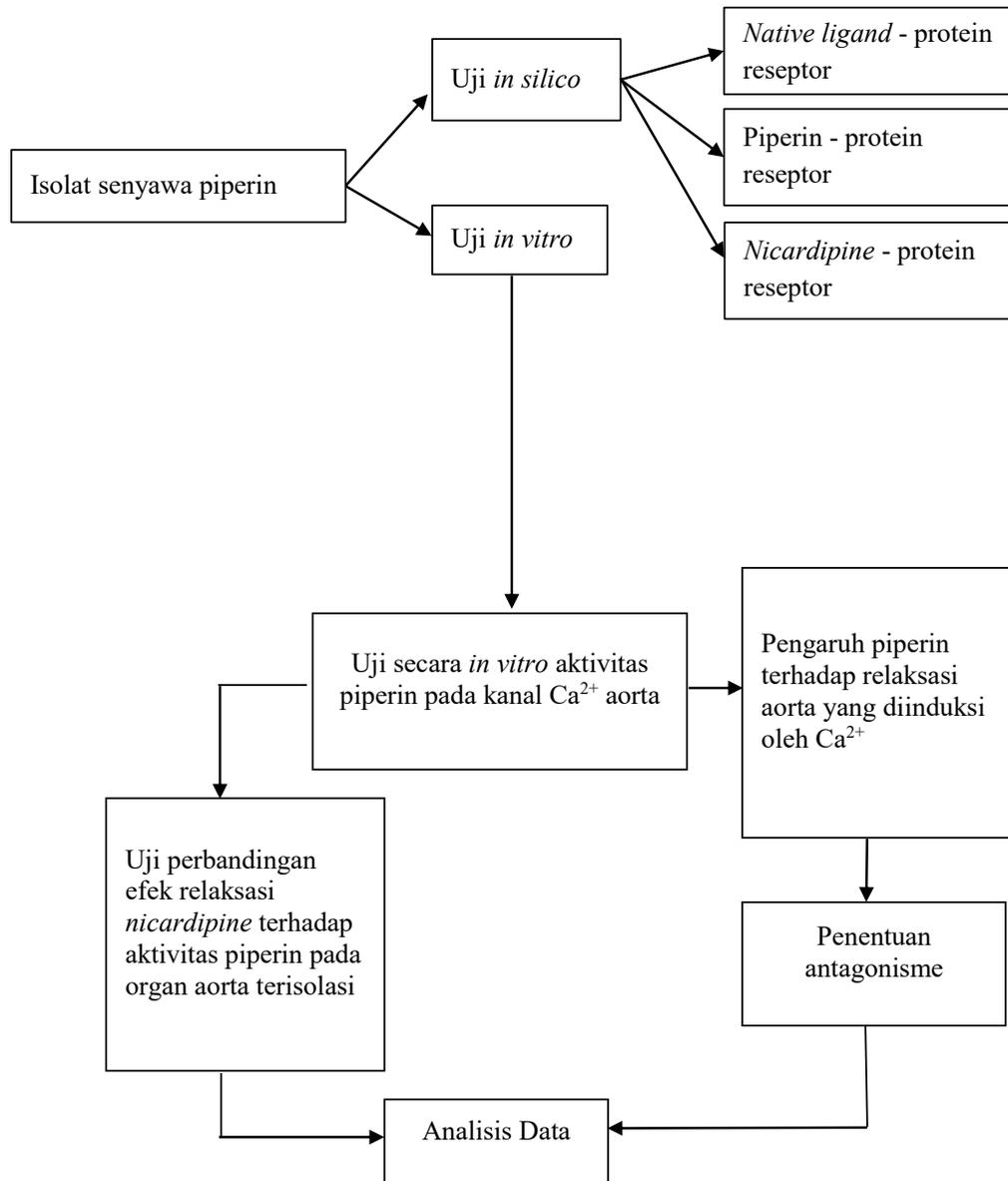
Tabel 3. Cara pemberian dosis agonis Ca^{2+} .

Volume larutan obat yang ditambahkan dalam <i>organbath</i> (ml)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan	Konsentrasi agonis dalam <i>organ bath</i> (faktor kumulatif $\frac{1}{2} \log 10$) (M)
0,100	2.10^{-8}	10^{-10}
0,200	2.10^{-8}	3.10^{-10}
0,070	2.10^{-7}	10^{-9}
0,200	2.10^{-7}	3.10^{-9}
0,070	2.10^{-6}	10^{-8}
0,200	2.10^{-6}	3.10^{-8}
0,070	2.10^{-5}	10^{-7}
0,200	2.10^{-5}	3.10^{-7}
0,070	2.10^{-4}	10^{-6}
0,200	2.10^{-4}	3.10^{-6}
0,070	2.10^{-3}	10^{-5}

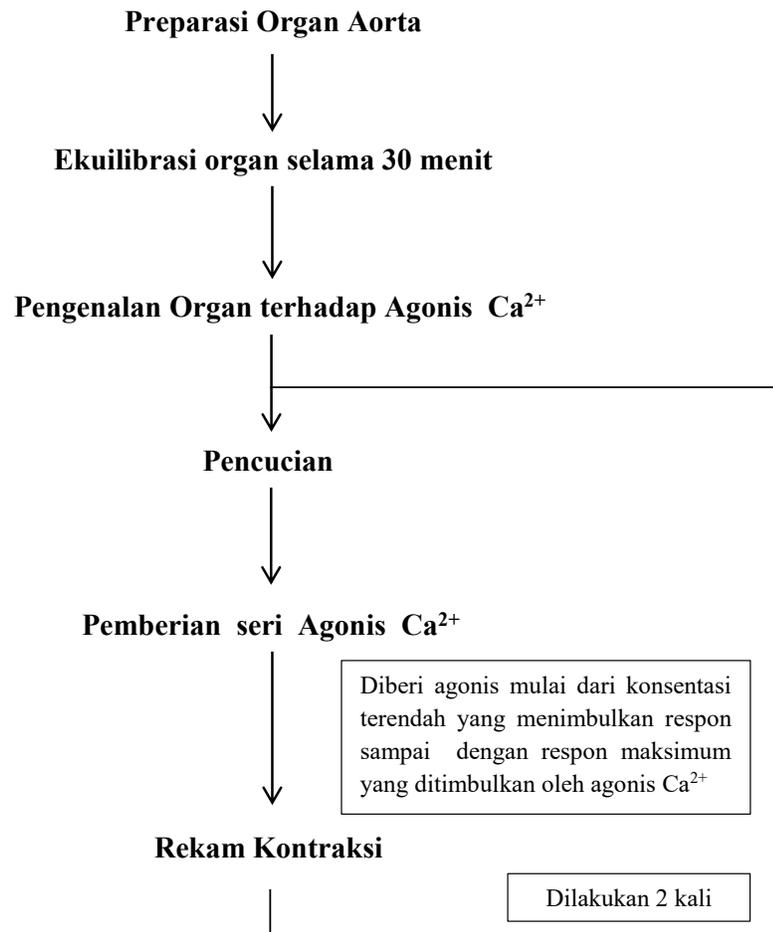
8. Uji Pembanding *Nicardipine*

Uji pembanding dengan *nicardipine* dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian efek relaksasi senyawa piperin. Organ aorta dikontraksi dengan Ca^{2+} sebelum dilakukan penambahan sejumlah konsentrasi *nicardipine*. Kurva hubungan jumlah konsentrasi *nicardipine* terhadap % respon relaksasi otot polos kemudian dibandingkan dengan hasil pada perlakuan dengan pemberian senyawa piperin.

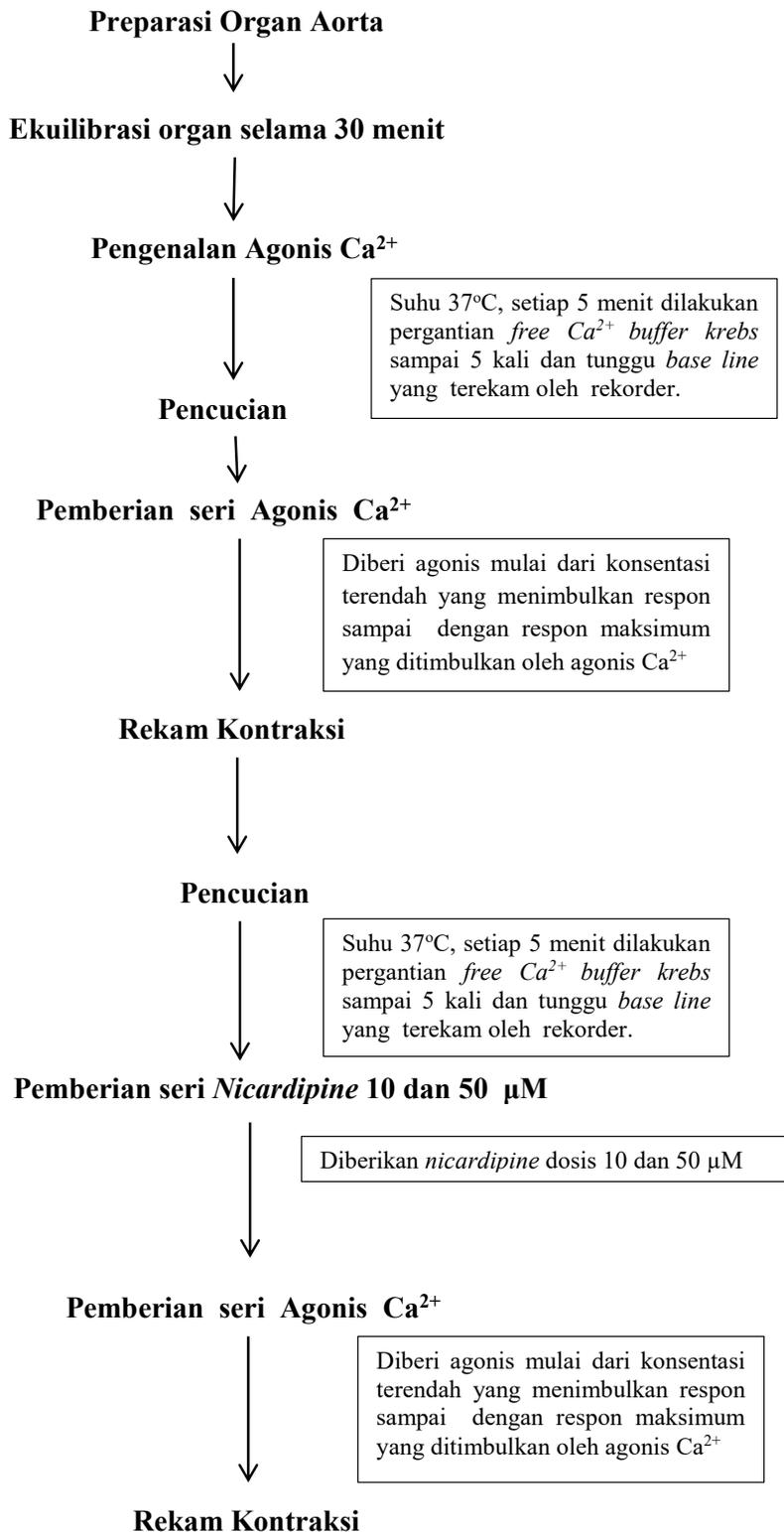
G. Skema Langkah Kerja



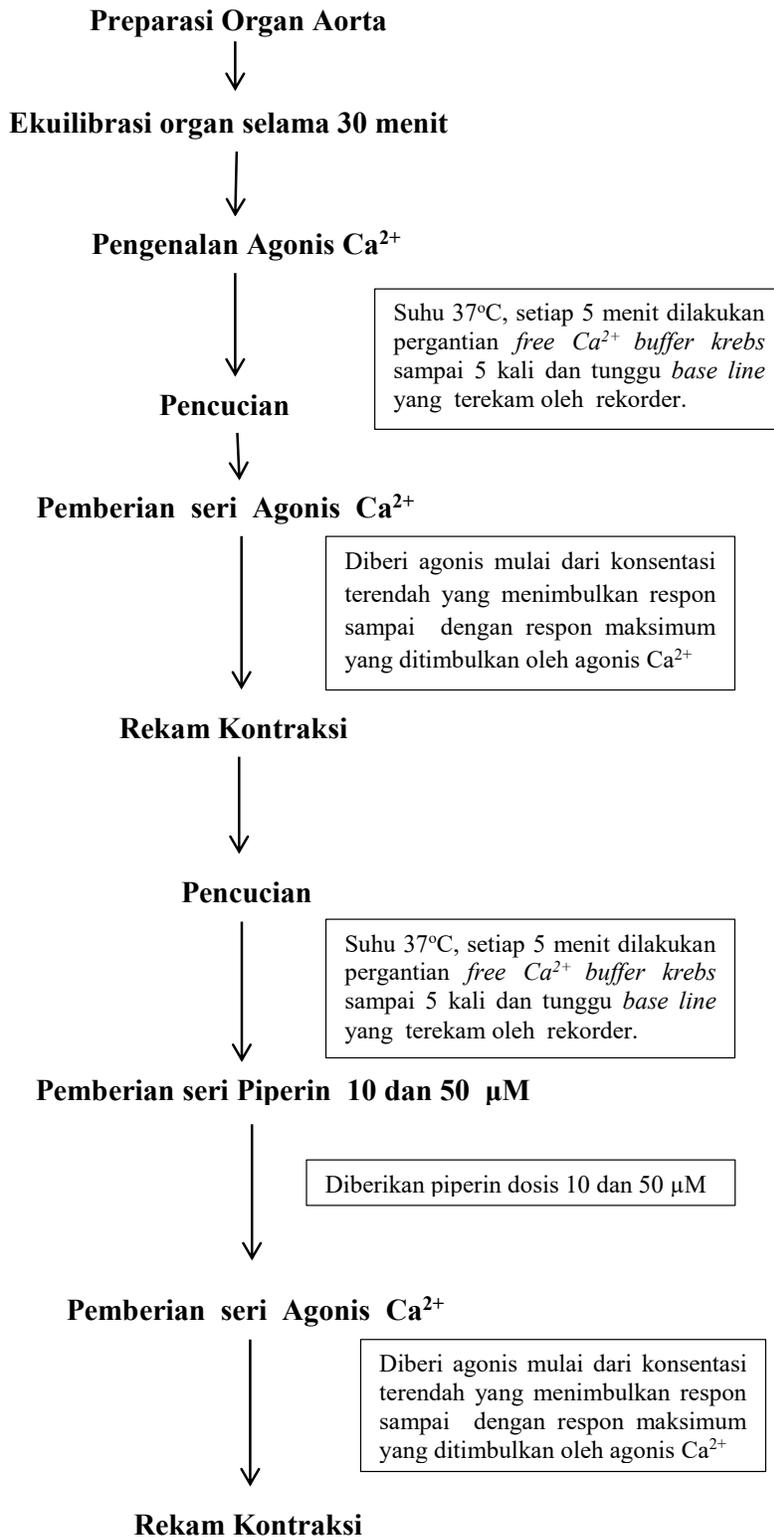
Gambar 6. Skema Langkah Kerja.



Gambar 7. Skema kerja validasi metode.



Gambar 8. Skema uji efek penghambatan kontraksi *nifedipine*.



Gambar 9. Skema uji efek penghambatan kontraksi Piperin.

H. Data dan Analisis Data

1. Data

Data respon biologis organ aorta terisolasi yang diperoleh dalam penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Selanjutnya, data % respon dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap % respon.

2. Analisis Data

Nilai EC_{50} (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh senyawa piperin dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan persamaan 2. Nilai EC_{50} ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD2, dimana pD2 adalah nilai dari $-\text{Log } EC_{50}$ (persamaan 3) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh senyawa piperin.) dan nilai rata-rata pD2 agonis \pm Standard Error (pD2 \pm SE). Pergeseran nilai pD2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *one way* ANOVA.

$$\text{Log}EC_{50} = \left[\frac{50-Y_1}{Y_2-Y_1} \times (X_2 - X_1) \right] + X_1 \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

X_1 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di bawah 50%

X_2 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di atas 50%

Y_1 : % respon tepat di bawah 50%

Y_2 : % respon tepat di atas 50%

$$pD2 = -\text{Log } EC_{50} \dots \dots \dots (3)$$

3. Statistika

Senyawa piperin ditetapkan sebagai antagonis kanal Ca^{2+} apabila inkubasi otot polos aorta marmut terisolasi dengan senyawa piperin mengakibatkan penurunan nilai pD2 Ca^{2+} . Distribusi data pD2 Ca^{2+} dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode *Kolmogorov-Smirnov*). Penurunan nilai pD2 selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji *one way* ANOVA yang dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.