

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain penelitian**

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium.

#### **B. Tempat dan Waktu**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2019.

#### **C. Populasi dan Sampel**

1. Kelompok ileum uji agonis asetilkolin
  - a. Kelompok uji seri kadarasetilkolin dimulai dari konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M hingga  $2 \times 10^{-8}$  M.
2. Kelompok ileum uji antagonis asetilkolin
  - a. Kelompok uji seri kadarasetilkolin.
  - b. Kelompok perlakuan (EPMS + seri kadar asetilkolin)
3. Kelompok ileum uji pembanding (kontrol positif)
  - a. Kelompok uji seri kadarasetilkolin.
  - b. Kelompok perlakuan (atropin + seri kadar asetilkolin)

#### **D. Identifikasi Variabel Penelitian**

1. Variabel Bebas

Konsentrasi asetilkolin, konsentrasi atropine, dan konsentrasi EPMS.

2. Variabel Kendali

Jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, dan kondisi fisik marmut.

### 3. Variabel Tergantung

Respon kontraksi otot polos ileum.

## E. Instrument Penelitian

### 1. Alat Penelitian

Seperangkat alat gelas kaca, satu set alat untuk preparasi organ, pengaduk magnet thermostat (Cimarec®), dua *set organ bath* volume 20mL (Ugo Basile®), bridge amplifier tipe 336, mikropipet (Socorex®), labu takar (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), beker glass (Pyrex®), ayakan 50 mesh, neraca analitik (Mettler Toledo®), pengaduk, corong, cawan porselin, penggaris, pipa kapiler, pipet ukur, pipet tetes, kertas saring (Whatman 40), aluminium foil (Brand), perangkat perkolasi, spektroskopi FTIR 8201PC (Shimadzu®), spektrofotometer UV-Vis mini-1240 (Shimadzu®) , *rotaryevaporator* (IKA®RV10), plat silica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck®) , blender, computer yang terinstal software *molecular docking Autodock* dan *LabScribe2*.

### 2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang *Kaempferia galangal* L. yang dibeli di pasar Gamping, Bantul, Yogyakarta, etanol 96%, etil asetat, *toluene*, *n-heksane*, dan *aquadest*

## F. Cara Kerja

### 1. Pengambilan sample

Sampel kencur dibeli di pasar Gamping, Bantul, Yogyakarta.

### 2. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan kencur (*Kaempferia galangal* L.) dilakukan di Laboratorium Biologi UAD.

### 3. Pembuatan serbuk

Sebanyak 10 kg kencur dibersihkan, dikupas sampai kulit dasar terpisah, menyisakan daging putih. Kemudian kencur diblender sampai halus, setelah itu kencur dijemur selama 3-4 tanpa terkena sinar matahari, hingga kencur berwarna coklat muda (Barus, 2009)

### 4. Isolasi Etil p-metoksisinamat dari kencur

Serbuk rimpang kencur sebanyak 500 g dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perendaman selama 7 hari dan pengadukan dilakukan setiap hari. Setelah 7 hari perendaman dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan fitrat menggunakan kertas saring (Barus,2009). Seluruh filtrat hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50<sup>0</sup> C. Kemudian filtrat pekat diendapkan pada suhu kamar sampai terbentuk kristal. Kristal yang terbentuk pada filtrat disaring kemudian dimurnikan dengan pencucian menggunakan n-heksana dan dilakukanrekristalisasi dengan cara melarutkan kristal dalam n-heksana kemudian dibiarkan dalam suhu ruangan agar mengkristal kembali (Nugraha, 2012). Kristal putih yang diperoleh dianalisis melalui uji KLT dan GCMS (Barus, 2009).

### 5. Penyiapan Larutan *buffer tyrode*

Larutan *buffer tyrode* terdiri atas 2 macam larutan, yaitu larutan A dan B. Bahan-bahan larutan A masing masing ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar, dan dilarutkan dengan akuades hingga

volume 1 L. Bahan larutan B ditimbang, kemudian dimasukkan ke labu takar dan dilarutkan dengan akuades hingga volume 1 L (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi larutan *buffer tyrode*

| Komposisi Larutan A                                 |        | Komposisi Larutan B |        |
|---|--------|---------------------|--------|
| Bahan   | Jumlah | Bahan               | Jumlah |
| NaCl  | 80,0 g | NaHCO <sub>3</sub>  | 10,0 g |
| KCl   | 2,00 g |                     |        |
| MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 2,14 g |                     |        |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                | 2,64 g |                     |        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,65 g |                     |        |

Pembuatan larutan *buffer tyrode* adalah dengan mencampur 100 mL larutan A, 100 mL larutan B, 100 gram glukosa, kemudian ditambahkan 800 mL akuades (Anonim, 1986).

#### 6. Penyiapan Larutan EPMC (100 $\mu$ M dan 200 $\mu$ M)

Larutan EPMC dibuat dengan stok EPMC konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M. Senyawa EPMC (menggunakan BM EPMC : 206.241 g/mol) ditimbang seberat 206 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan EPMS  $2 \times 10^{-1}$  M menjadi  $2 \times 10^{-2}$  M, untuk mendapatkan konsentrasi 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M diambil larutan EPMS sebanyak 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L ke dalam organ *bath* yang telah berisi organ *ileum* dan larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

#### 7. Pembuatan Larutan Seri Asetilkolin

Larutan asetilkolin dibuat dalam bentuk stok asetilkolin konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M dalam akuades (BM asetilkolin : 184,1 g/mol). Pengenceran larutan stok asetilkolin  $2 \times 10^{-1}$  M, sehingga diperoleh konsentrasi larutan asetilkolin  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ , dan  $2 \times 10^{-8}$  M.

Konsentrasi asetilkolin sebesar  $10^{-10}$  diperoleh dengan cara menginjeksikan 100  $\mu\text{L}$  larutan stok asetilkolin  $2 \times 10^{-8}$  M ke dalam organ *bath* yang berisi larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

#### 8. Pembuatan Larutan Atropin

Larutan stok atropin dibuat konsentrasi  $2 \times 10^{-6}$  M dengan cara diambil larutan injeksi atropin sulfat sebanyak 54,16  $\mu\text{L}$  ditambah 10 ml *aquadest*. Larutan dengan konsentrasi 0,01  $\mu\text{M}$  dan 0,02  $\mu\text{M}$  didapatkan dengan mengambil larutan difenhidramin  $2 \times 10^{-6}$  M sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan 200  $\mu\text{L}$  kemudian dimasukkan ke dalam organ *bath* yang berisi 20 mL larutan *buffer tyrode*.

#### 9. Uji Aktivitas EPMS terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas EPMS terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi ileum marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Organ *bath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer tyrode*, kemudian ileum direndam dalam organ bath sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya dilakukan pemberian agonis ke dalam organ *bath* dan respon kontraksi akan tercatat pada rekorder (Kellenberger dkk., 2004).

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 *buffer tyrode* setiap 5 menit. Pada pengukuran kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan

kondisi organ telah stabil kemudian dilakukan pemberian senyawa EPMS dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M sebanyak 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L. Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam organ *bath* seperti pada pengukuran pertama. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Cara pemberian dosis agonis asetilkolin

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

#### 10. Identifikasi EPMS dengan KLT

Identifikasi pada EPMS menggunakan KLT dengan fase diam silica gel 60F<sub>254</sub> dan fase gerak heksana : etil asetat dengan perbandingan 4:1 (Suzana dkk., 2011 dan Nurul, 2008). Identifikasi dengan KLT dengan ukuran plat silica gel 60F 3x10 cm kemudian ditotolkan kristal EPMC yang dilarutkan dengan etanol dan larutan standar sebagai pembanding

menggunakan pipa kapiler kemudian dielusidasi di dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan sebelumnya oleh fase gerak. Proses elusidasi dihentikan ketika fase gerak telah mencapai jarak rambat, kemudian plat dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Setelah kering, bercak pada plat dapat diamati dibawah sinar tampak, sinar UV gelombang pendek 254 nm dan sinar UV gelombang panjang 366 nm (Farmakoterapi Herbal, 2009).

#### 11. Identifikasi Gas Chromatography Mass Spectrometri

Kristal EPMS diidentifikasi menggunakan GC-MS dengan cara: kristal dilarutkan dengan pelarut metanol liquid chromatography kemudian diinjeksikan ke dalam GC-MS dengan kolom HP-5MS (30 m x 0,25 mm ID x 0,25  $\mu$ m), suhu awal GC-MS yaitu 70°C selama 2 menit, kemudian dinaikkan menjadi 285°C dengan kecepatan 20°C per menit selama 20 menit. Besar suhu MSD 285°C. Kecepatan alir He 1,2 mL/menit dengan split 1:100. Parameter scanning dilakukan dari massa terendah hingga tertinggi (Umar dkk., 2012).

#### 12. Preparasi Organ Ileum

Marmut jantan dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala dan dilakukan pembedahan pada bagian abdomen, kemudian bagian ileum dipisahkan. Ileum diambil bagian perut sepanjang 2 cm. Ileum yang telah diambil diletakkan di cawan fiksasi dan diisi dengan larutan *buffer tyroide* dengan suhu 37°C, kemudian dibersihkan dari isi usus dan jaringan lemak yang masih menempel. Diikatkan benang pada kedua ujung usus. Ujung bagian bawah benang diikatkan pada tuas organ

*bath* dan ujung bagian atas ileum diikatkan pada transduser. Organ *bath* dikondisikan pada suhu 37° terlebih dahulu.

### 13. Uji *In Silico*

#### a. Instalasi system operasi Linux dan aplikasi pendukung

Instalasi system operasi Linux dilakukan karena aplikasi yang dibutuhkan untuk melakukan penambatan molekul pada umumnya hanya dapat dioperasikan pada Linux. Sistem operasi yang *diinstall* adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit. Setelah instalasi Linux, dilakukan instalasi pedukung seperti Marvin Sketch untuk preparasi ligan yang akan diuji, AutoDockTools 4.2 untuk melakukan penambataan molekul, Molegro Molecular Viewer untuk preparasi protein dan visualisasi hasil penambatan (*docking*) dalam bentuk virtual 2D dan DS Visualizer untuk preparasi protin dan visualisasi hasil penambatan (*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](http://www.rcsb.org)) dalam format “.pdb”. Berkas protein atau reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah reseptor asetilkolin dengan kode protein adalah 3RZE. Setelah protein diunduh lalu dilakukan preparasi protein target dalam format PDBQT.



c. Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa etil p-metoksisinamat dari minyak atsiri kencur (*Kaempferia galanga L*). Struktur ligan didesain melalui aplikasi ChemDraw dan dipilih dalam bentuk 3D SDF. File ligan tersebut dibuka melalui aplikasi Discovery Studio Visualizer dan disimpan dalam format PDB (\*.pdb). 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 lalu disimpan dalam format \*.pdbqt.

d. Preparasi Grid Parameter File

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi AutoDockTools 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 gridparameter file (\*.gpf).

e. Preparasi *docking* parameter file

Proses ini diawali dengan memilih protein target ligan melalui pilihan *docking* pada aplikasi AutoDockTools. 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).

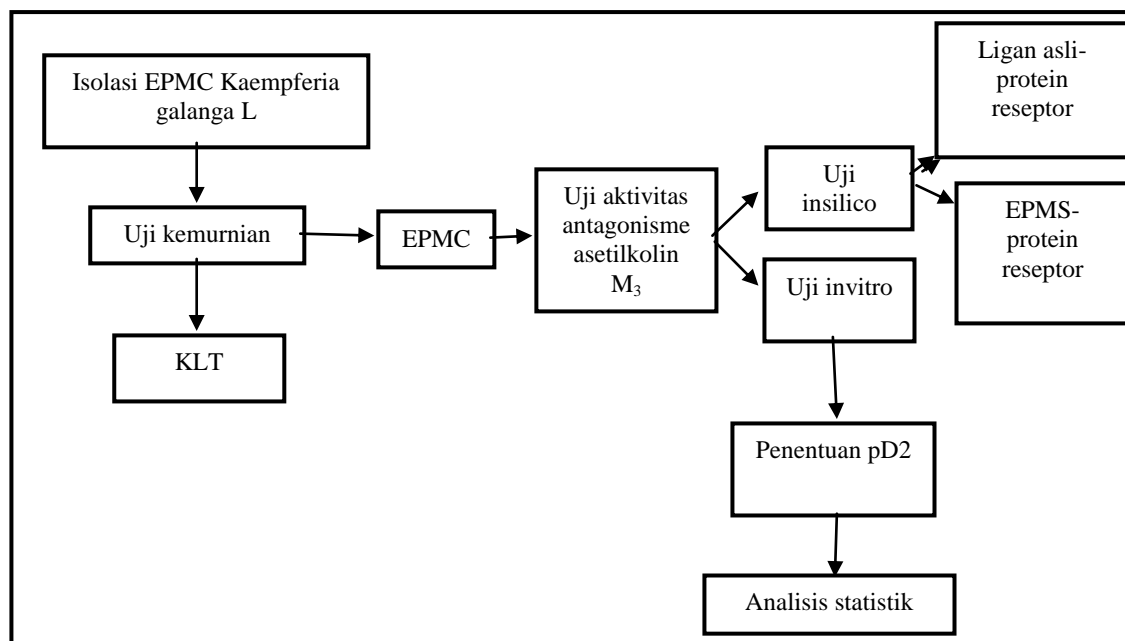
f. Simulasi *docking*

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan AutoDock 4.2 melalui Cygwin Terminal. File hasil preparasi sebelumnya yang meliputi Target.pdbqt, Ligan.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 hasil visualisasi hasil.

g. Validasi *molecular docking*

Validasi *molecular docking* bertujuan untuk menentukan apakah protein yang digunakan untuk molecular dockingnya dapat digunakan atau tidak. Validasi *molecular docking* ini dilakukan dengan cara menentukan nilai RMSD. Nilai RMSD yang dikatakan valid adalah  $<2.00 \text{ \AA}$ .

## G. Skema Langkah Kerja



Gambar 5. Skema Langkah Kerja

## H. Data dan Analisa Data

### 1. Data

Data yang diperoleh dari penelitian *in vitro* berupa respon data kontraksi ileum pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh antagonis. Selanjutnya, data % dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi antagonis terhadap %respon.

### 2. AnalisisData

Nilai EC<sub>50</sub> agonis reseptor dengan atau tanpa pengaruh EPMS dihitung berdasarkan persamaan 2. Nilai EC<sub>50</sub> selanjutnya ditransformasikan ke dalam bentuk pD<sub>2</sub>, dimana pD<sub>2</sub> adalah nilai dari –

Log EC<sub>50</sub> (persamaan 1). Selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis dengan atau tanpa pengaruh EPMS dan nilai rata-rata pD2 ± *Standard Error* (SE). Pergeseran nilai pD2 dianalisis secara statistik menggunakan *oneway ANOVA*.

### 3. Statistika

Senyawa EPMS ditetapkan sebagai antagonis reseptor asetilkolinM3 apabila inkubasi organ ileum marmut terisolasi dengan EPMS mengakibatkan penurunan nilai pD2 agonis asetilkolin. Distribusi data pD2 dianalisis menggunakan uji normalitas (*Saphiro-Wilk*). Penurunan nilai pD2 selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95%.

### 4. Uji *In Silico*

Pada uji *in silico* data yang didapat yaitu nilai RMSD validasi dan skor *docking* atau *binding score*. Apabila *binding score* nya lebih rendah dari skor ikatan ligan pembanding (ACH M<sub>3</sub>) maka EPMS berpotensi untuk dijadikan sebagai agen antagonisme ACH M<sub>3</sub>.