

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *post control group design* laboratorium dengan tema farmakologi molekuler.

B. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Farmakologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, pada bulan Juni 2017 sampai Februari 2018.

C. KELOMPOK SAMPEL

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

1. kelompok kontrol agonis (ephineprine) mulai dari konsentrasi 2×10^{-3} M hingga 2×10^{-8} M
2. kelompok perlakuan antagonis (alkaloid *Piper nigrum* L. + ephineprine)
3. kelompok kontrol positif (timolol + ephineprine)

D. IDENTIFIKASI VARIABEL

Pembagian variable pada penelitian ini :

A. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi

sebab perubahannya atau timbulnya variabel tergantung, dalam penelitian ini yaitu : konsentrasi Isolat piperin, konsentrasi agonis dan konsentrasi timolol

B. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah merupakan Variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas, dalam penelitian ini yaitu : respon relaksasi organ aorta marmot, pD2 dan pA2

C. Variabel Kendali

Variabel kendali adalah Variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel bebas terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti yang terdiri dari: berat badan, jenis kelamin, umur, kondisi fisik marmut dan pakan

E. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah piperin dari *Piper nigrum* L. yang dihasilkan pada proses isolasi penelitian sebelumnya oleh Amaliah (2016) menggunakan pelarut etilasetat dengan metode sokletasi . Hasil sokletasi difiltrate lalu dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak yang diperoleh, kemudian disimpan selama 2 hari dan terlindung dari sinar matahari. Kristal yang terbentuk,selanjutnya Kristal dicuci dengan alkohol 96% secukupnya hingga diperoleh kristal berwarna kuning. Identifikasi senyawa piperin dapat dilakukan dengan metode KLT dengan fase gerak BAW (n-butanol : Asam asetat : air = 4:1:5) dan \ silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam.

Pengamatan bercak dapat dilakukan menggunakan sinar UV 254 nm dan dengan disemprotkan Pereaksi *Dragendorff*. Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer krebs*, gas karbogen (Samator), ephineprine (Ephineprine injk.), Timolol (Cendo Timol 0,5%) dan aquades (Bratacho).

2. Alat

Alat yang digunakan meliputi satu set alat untuk preparasi organ, vortex , pengaduk magnet thermostat (Cimarec), transduser isotonic, rekorder, dua set *organ bath* (Ugo Basil) volume 20 mL, bridge amplifier, pipet mikro 100 μ L, 1000 μ L dan 5000 μ L.

F. PROSEDUR KERJA DAN ALUR PENELITIAN

1. Uji *insilico*

a. Instalasi Sistem β Operasi *Linux* dan Aplikasi Pendukung

Instalasi sistem operasi *Linux* dilakukan karena aplikasi yang dibutuhkan untuk melakukan penambatan molekul 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.rscb.org) dalam format “.pdb”. Berkas protein / reseptor yang digunakan adalah reseptor *Histamine H1* dengan kode protein 3RZE.

c. Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa piperin, doksepin (ligan asli) dan difenhidramin. 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 *buffer Krebs*

Larutan *buffer krebs* terdiri atas dua macam larutan. Formula A masing-masing ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L, kemudian formula B ditimbang lalu dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L. Untuk membuat larutan *buffer krebs* dicampurkan formula A dan formula B masing-masing 100 mL, glukosa 1,00 gram kemudian ditambahkan akuades 800 mL pada saat akan digunakan. Komposisi dari larutan *buffer krebs* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Larutan *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		
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,70 g/L		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,00 g/L		

3. Penyiapan Larutan Alkaloid *Piper nigrum L.*

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-2} M. untuk membuat larutan tersebut, alkaloid *Piper nigrum L.* ditimbang seksama seberat 28,534 mg dan

dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan alkaloid *Piper nigrum* L. 2×10^{-2} M diencerkan menggunakan larutan *buffer krebs* 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 dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum* L. konsentrasi 10 μ M dan 50 μ M.

4. Penyiapan seri konsentrasi adrenalin

Larutan adrenalin dibuat sebagai larutan stok adrenalin konsentrasi 2×10^{-3} M dalam akuades. adrenalin memiliki bobot molekul 183,2044 g/mol. Pengenceran larutan stok adrenalin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok Adrenalin 2×10^{-3} M sehingga diperoleh larutan adrenalin konsentrasi 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} ; 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} dan 2×10^{-8} M.

5. Pembuatan Larutan Timolol 2×10^{-3}

Larutan stok timolol (BM : 316,421 g/mol) dibuat pada konsentrasi 2×10^{-3} M. Sebanyak 6,33 mg serbuk timolol dilarutkan dalam akuades hingga 10,0 mL, dikarenakan sediaan yang ada adalah tetes mata 5 mg/ml maka diambil 1,26 ml dari sediaan tetes mata dan diencerkan dengan WFI sampai 10 ml. Larutan dengan konsentrasi 10^{-5} M (10 μ M) didapatkan dengan mengambil larutan timolol 2×10^{-3} M sebanyak 100 μ L kemudian dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *buffer krebs*. Larutan dengan konsentrasi 5×10^{-5} M (50 μ M) didapatkan dengan mengambil larutan timolol 2×10^{-3} M sebanyak 500 μ L lalu dimasukkan ke dalam *organ bath* yang berisi 20 mL larutan *buffer krebs*.

6. Preparasi Organ aorta

Marmut jantan dengan berat 300-400 gram (berumur 3-4 bulan) di tempatkan pada tempat dengan suhu, pencahayaan dan mendapat 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 leher. Selanjutnya, marmut dibedah pada bagian dada untuk memudahkan pengambilan aorta pada organ dalam marmut. Aorta dipisahkan dari jaringan lemak yang menempel. Setelah itu aorta diambil secara hati – hati untuk menghindari kerusakan pada organ tersebut. Pengambilan aorta dilakukan dengan pemotongan pada 6-7 cincin aorta (sesuai ukuran panjang *organ bath* ukuran 20 mL), lalu kedua ujung aorta diikat, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organ bath* dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser.

7. Uji Aktivitas Alkaloid *Piper nigrum* L. Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas alkaloid *Piper nigrum* L. terhadap agonis reseptor β adrenergik pada organ aorta marmut yang terisolasi dengan alat *organ bath* dengan pengenalan agonis pada kadar tertinggi terlebih dahulu. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan larutan *buffer Krebs*, kemudian organ tersebut direndam dan diekuilibrasi sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Kemudian, diberi agonis dan respon kontraksi direkam pada rekorder. Senyawa agonis diberikan sampai

mencapai kontraksi maksimum (100%). Pengukuran kontraksi organ dilakukan sebanyak dua kali. Pengukuran pertama dan kedua dilakukan selama 30 menit, dan tiap lima menit sekali larutan *buffer krebs* diganti. Pada pemberian kedua setelah pencucian dan organ dalam keadaan stabil, kemudian diberikan diberikan alkaloid *Piper nigrum* L. konsentrasi 10 dan 50 μM . Selanjutnya diberikan agonis dengan kadar seri bertingkat dan respon kontraksi akan tercatat pada rekorder. Kemudian kurva hubungan antara konsentrasi dengan % respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* L yang terjadi dibandingkan.

Tabel 2. Cara pemberian dosis agonis adrenalin

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	$2 \cdot 10^{-8}$	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}

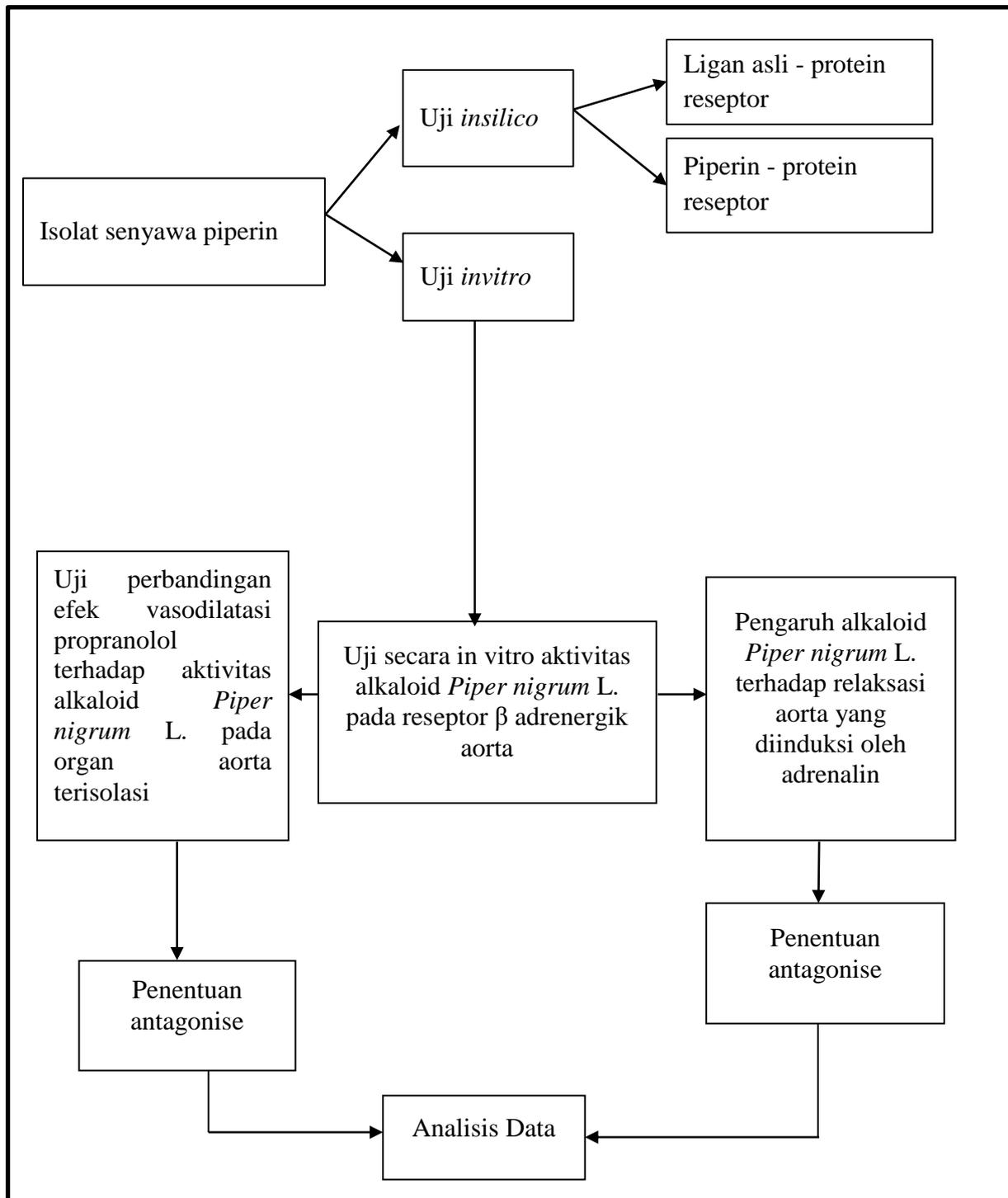
8. Uji Pembanding Timolol

Uji pembanding dengan timolol dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian efek relaksasi senyawa alkaloid *Piper nigrum* L. Organ aorta marmut dikontraksi dengan adrenalin sebelum ditambahkan dengan timolol sebagai

antagonis adrenergik. Kurva hubungan jumlah konsentrasi adrenalin terhadap % respon relaksasi organ aorta kemudian di bandingkan dengan perlakuan yang diberikan senyawa alkaloid *Piper nigrum* L.

Prosedur uji pembanding timolol dilakukan sesuai dengan prosedur pengujian efek vasodilatasi oleh senyawa alkaloid *Piper nigrum* L. Sebelum ditambahkan antagonis adrenergik yaitu timolol, organ aorta marmut dikontraksikan dengan adrenalin. Kurva hubungan jumlah konsentrasi adrenalin terhadap % respon relaksasi organ aorta kemudian, dibandingkan dengan respon dari perlakuan senyawa alkaloid *Piper nigrum* L.

G. SKEMA LANGKAH KERJA



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. DATA DAN ANALISIS DATA

1. Data

Data yang diperoleh dalam penelitian *invitro* berupa data kontraksi atau aorta pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh antagonis. Selanjutnya, data % respon dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi antagonis 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 alkaloid *Piper nigrum* L. 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 alkaloid *Piper nigrum* L.) dan nilai rata-rata pD2 agonis \pm *Standard Error* (pD2 \pm SE). Pergeseran nilai pD2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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

Keterangan :

X1 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di bawah 50%

X2 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di atas 50%

Y1 : % respon tepat di bawah 50%

Y2 : % respon tepat di atas 50%

$$pD2 = -\text{Log. EC}_{50} \dots \dots \dots (3)$$

3. Statistika

Alkaloid *Piper nigrum* L. ditetapkan sebagai antagonis reseptor β adrenergik. Apabila inkubasi organ aorta marmut terisolasi dengan alkaloid *Piper nigrum* L. mengakibatkan penurunan nilai pD2 adrenalin. Distribusi data pD2 adrenalin 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%.