

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan tema farmakologi molekuler.

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 Februari 2017- Juni 2017.

C. SUBJEK PENELITIAN

Subjek penelitian ini menggunakan organ trakea pada marmut (*Cavia porcellus*) jantan sebagai hewan uji dengan umur ≥ 3 bulan, kondisi fisik marmut yang sehat dan lincah menjadi dasar pertimbangan dalam pemilihan sebagai subjek penelitian.

D. IDENTIFIKASI VARIABEL

1. Variabel Bebas

Konsentrasi Isolat Alkaloid, konsentrasi histamin

2. Variabel Tergantung

Respon kontraksi organ trakea marmut

3. Variabel Kendali

Jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kondisi fisik marmut, *organbath*

E. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat alkaloid *Piper nigrum* Linn. yang didapatkan dari peneliti sebelumnya. Piperin didapatkan melalui metode sokletasi dengan pelarut etil asetat. Hasil sokhletasi akan mengendap membentuk kristal yang selanjutnya dicuci menggunakan etanol 96%, selanjutnya melewati beberapa uji diantaranya uji KLT, uji spektro UV, uji FTIR, dan uji titik lebur (Amaliah, 2016).

Hewan percobaan yang digunakan adalah marmut jantan, berat badan antara 400 – 500 gram. Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer krebs*, gas karbogen (Samator®), agonis reseptor histamin (Sigma Aldrich®), dan aquades (Bratacho®).

2. Alat

- a. Satu set alat untuk preparasi organ (scalpel, pinset, cawan petri, pipet tetes, jarum, benang, gunting bedah)
- b. Pengaduk magnet termostat tipe 141916
- d. Transduser (Ugo basille®), Rekorder (Ugo basille®), Bridge *amplifier* (Ugo basille®)
- e. Dua set *organ bath* volume 20 ml
- f. Pipet mikro 100 µl, 1000 µl (Eppendorf®)

F. PROSEDUR KERJA DAN ALUR PENELITIAN

1. Penyiapan larutan *Buffer Krebs*

Larutan *buffer krebs* terdiri atas dua macam larutan, yaitu larutan A dan B.

Komposisi larutan Buffer Krebs adalah sebagai berikut :

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		

Tabel 1. Komposisi larutan buffer krebs

Formula B sebanyak 100 mL dilarutkan dalam aquades sebanyak 800 mL, kemudian Formula A sebanyak 100 mL ditambahkan ke dalam larutan Formula B. Glukosa 1 g/L ditambahkan ke dalam larutan *buffer krebs* pada saat akan digunakan.

2. Penyiapan Larutan Alkaloid *Piper nigrum* Linn.

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-2} M, untuk membuat larutan tersebut, alkaloid *Piper nigrum* Linn. ditimbang seksama seberat 28,534 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan alkaloid *Piper nigrum* Linn. 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 1000 μ L ke dalam organ bath yang telah berisi organ trakea dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum* Linn. konsentrasi 10 μ M dan 100 μ M.

1. Penyiapan seri konsentrasi histamin

Larutan histamin dibuat sebagai larutan stok histamin konsentrasi 2×10^{-1} M dalam akuades. Histamin memiliki bobot molekul 184,1 g/mol. Pengenceran larutan stok histamin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok histamin 2×10^{-1} M sehingga diperoleh larutan histamin konsentrasi 2×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} M.

2. Preparasi Organ Trakea

Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan dilakukan pembedahan pada bagian leher dan abdomen, kemudian bagian trakea dipisahkan. Trakea yang telah diambil kemudian diletakan ke dalam cawan fiksasi yang telah diisi dengan larutan *buffer krebs* dan selanjutnya dibersihkan dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel. Setelah bersih, trakea dipotong-potong dengan arah melintang berlawanan arah diantara ruas-ruas cincin tulang rawan dengan panjang 6-7 cincin (sesuai panjang *organ bath* ukuran 20 mL). Bagian yang berhadapan dengan otot polos dipotong sedemikian rupa, sehingga jarak otot polos dengan kedua ujung potongan lebih kurang sama. Kedua ujung tulang rawan otot polos diikat dengan benang, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas organ bath dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser. (Anas, 2011).

3. Uji Aktivitas Alkaloid *Piper Nigrum* Linn. terhadap Agonis Reseptor H₁

Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid yang diketahui memiliki efek menghambat degranulasi pada kultur sel mast melalui penghambatan *phosphatidylinositol 4-kinase* (Bojjireddy *et al.*, 2014). Pengujian campuran ekstrak biji mengandung *Piper nigrum* L. menunjukkan efek bronkodilatasi pada tikus yang diinduksi ovalbumin (Antony, 2010). Penelitian ini untuk menelusur mekanisme aktivitas antagonisme lada pada reseptor tersebut lebih lanjut.

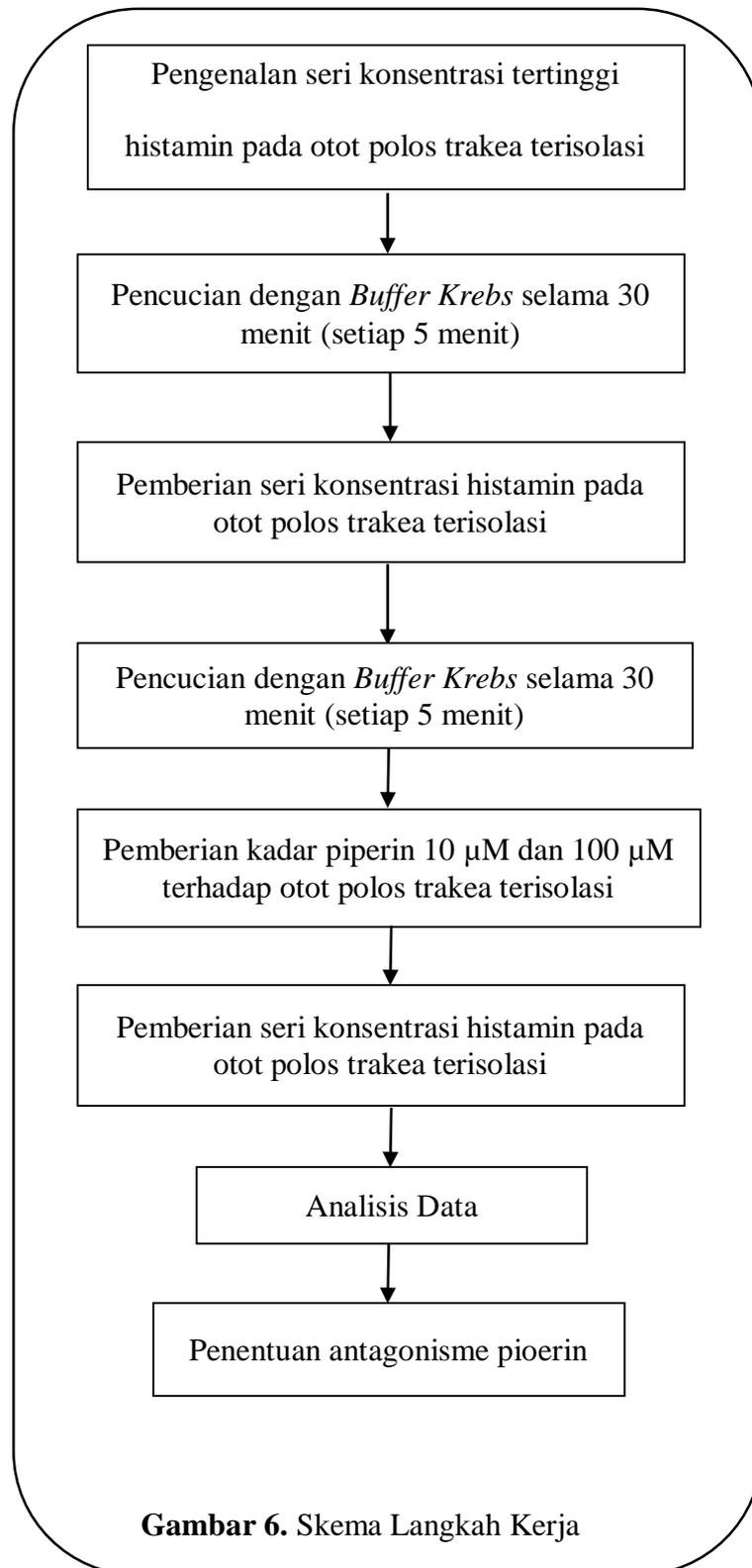
Mekanisme terjadinya kontraksi oleh histamin ketika berinteraksi dengan reseptor H₁ trakea adalah melalui rangsangan pada reseptor H₁ yang terhubung pada protein G atau disebut dengan *G-protein-coupled Receptor (GPCR)* melalui jalur fosfolipase C (PLC). Selanjutnya PLC yang telah teraktivasi akan mengkatalis reaksi hidrolisis fosfoinositol 4,5-difosfat (PIP₂), membentuk inositol 1,4,5-trifosfat (IP₃) dan diasil gliserol (DAG). IP₃ yang telah terbentuk akan berikatan dengan reseptor IP₃ pada permukaan retikulum endoplasma dan membuka *Transient Receptor Potential Channels (TRPC)* dan mengakibatkan pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* sehingga konsentrasi Ca²⁺ intraseluler meningkat. Peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler dapat mengaktifkan kanal kalsium 43 di permukaan membran sel (Sanders, 2001). Aktifnya kanal kalsium menyebabkan influks Ca²⁺ ekstraseluler dan secara keseluruhan akan meningkatkan kadar Ca²⁺ intraseluler yang menginduksi terjadinya kontraksi

otot polos (Gosens *et al.*, 2006). Mekanisme peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler yang berasal dari aktivasi *GPCR* atau kanal ion dapat menyebabkan kontraksi pada otot polos adalah dengan cara Ca^{2+} berikatan dengan reseptor calmodulin (CaM). Calmodulin merupakan suatu protein pengikat Ca yang tidak memiliki aktivitas enzim. Calmodulin akan bekerja setelah membentuk kompleks dengan Ca^{2+} . Selanjutnya kompleks tersebut mengaktifkan *myosin light-chain kinase (MLCK)* yang akan memfosforilasi myosin. Myosin yang terfosforilasi akan berinteraksi dengan filamen aktin sehingga terjadi kontraksi (Lodish, 2000).

Pemberian seri konsentrasi bertingkat agonis histamin dapat dilihat pada (Tabel 2).

Urutan pemberian	Waktu pemberian (menit)	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)
1	1	0,100	2.10^{-8}	10^{-10}
2	2	0,200	2.10^{-8}	3.10^{-10}
3	1	0,070	2.10^{-7}	10^{-9}
4	2	0,200	2.10^{-7}	3.10^{-9}
5	1	0,070	2.10^{-6}	10^{-8}
6	2	0,200	2.10^{-6}	3.10^{-8}
7	1	0,070	2.10^{-5}	10^{-7}
8	2	0,200	2.10^{-5}	3.10^{-7}
9	1	0,070	2.10^{-4}	10^{-6}
10	2	0,200	2.10^{-4}	3.10^{-6}
11	1	0,070	2.10^{-3}	10^{-5}
12	2	0,200	2.10^{-3}	3.10^{-5}
13	1	0,070	2.10^{-2}	10^{-4}
14	2	0,200	2.10^{-2}	3.10^{-4}

Tabel 2. Cara pemberian seri konsentrasi agonis histamin

G.SKEMA LANGKAH KERJA

H. DATA DAN ANALISIS DATA

1. Data

Data yang diperoleh dalam penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi otot polos trakea pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Selanjutnya, data persentase (%) respon dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap persentase (%) 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* Linn. dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan (persamaan 2). Nilai EC_{50} ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD_2 , dimana pD_2 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* Linn.) dan nilai rata-rata pD_2 agonis \pm *Standard Error* ($pD_2 \pm SE$).

Pergeseran nilai pD_2 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 :

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

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

Y1 : % respon tepat di bawah 50%

Y2 : % respon tepat di atas 50%

pD2 = -Log. EC₅₀..... (3)

3. Statistika

Alkaloid *Piper nigrum* Linn. ditetapkan sebagai antagonis reseptor H₁ apabila inkubasi otot polos trakea marmut terisolasi dengan alkaloid *Piper nigrum* Linn. mengakibatkan penurunan nilai pD2 histamin. Distribusi data pD2 histamin dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode *Shapiro-Wilk*). Penurunan nilai pD2 selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji *one-way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.