

BAB III

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode *in vitro* dengan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan tema farmakologi molekuler.

B. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Dasar dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2017.

C. POPULASI DAN SAMPEL

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kelompok uji:

1. Kelompok kontrol negatif :
Seri konsentrasi *Acetyl-β-Methylcholine*
2. Kelompok perlakuan :
 - a. Alkaloid *Piperin* 10 μM + Seri *Acetyl-β-Methylcholine*
 - b. Alkaloid *Piperin* 50 μM + Seri *Acetyl-β-Methylcholine*
3. Kelompok kontrol positif :
 - a. Atropin 0,1μM + Seri *Acetyl-β-Methylcholine*
 - b. Atropin 0,5μM + Seri *Acetyl-β-Methylcholine*

D. IDENTIFIKASI VARIABEL

1. Variabel bebas:

Konsentrasi piperin, konsentrasi atropin, dan konsentrasi *acetyl-β-methylcholine*.

2. Variabel kendali:

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

3. Variabel tergantung:

Respon kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi.

E. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan Penelitian

Bahan dari penelitian ini adalah piperin yang diisolasi dari buah *Piper nigrum* (diperoleh dari Ratih Dwi Amaliah mahasiswa Farmasi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, angkatan 2012). Piperin tersebut diisolasi dari buah lada yang didapatkan dari Yogyakarta dan sekitarnya. Sebelum penelitian ini dilaksanakan, uji identifikasi dari piperin telah dikonfirmasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan fase diam Silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck®) dan fase gerak Etilasetat : n-heksan (1:4), ditemukan warna merah yang menandakan adanya senyawa alkaloid.

Hewan uji menggunakan marmut jantan dengan berat badan antara 400 – 500 gram. Bahan kimia menggunakan larutan *buffer krebs*, gas karbogen (terdiri dari 95% oksigen dan 5% karbon dioksida, yang diperoleh dari PT. Putra Kembar Refill Oxygen, Condong Catur, Yogyakarta), *Acetyl-*

β-Methylcholine (Sigma Aldrich[®]), Atropin (PT. Ethica), Aquades (diperoleh dari Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta).

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan meliputi satu set alat preparasi organ, pengaduk magnet thermostat, transduser isotonik (Ugo Basile[®]), *software* rekorder *Labscribe*[®], dua set *chamber organ bath* volume 20 mL (Ugo Basile[®]), *bridge amplifier* (Ugo Basile[®]), pipet mikro 200 µL, 1000 µL (Eppendorf[®]).

F. PROSEDUR KERJA DAN ALUR PENELITIAN

1. Penyiapan Larutan *Buffer Krebs*

Larutan *buffer krebs* terdiri dari dua macam larutan, larutan A dan B, formula masing-masing larutan dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 1. Komposisi Buffer Krebs (Vogel, 2002)

Formula A (1,0 L)		Formula B (1,0 L)	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	68,7 g	NaHCO ₃	21 g
KCl	4,2 g		
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,9 g		
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,7 g		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,0 g		

Untuk membuat larutan baku, bahan-bahan pada larutan A masing-masing ditimbang, kemudian dimasukkan kedalam labu takar larutan dalam akuades, tambahkan hingga 1 L. Bahan pada tabel formula B ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam labu takar dan dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 L. Saat akan digunakan, 100,0 mL larutan formula A dilarutkan ke dalam aquades 800,0 mL, kemudian

larutan formula B sebanyak 100,0 mL ditambahkan kedalam larutan formula A. Kemudian ditambahkan Glukosa sebanyak 1,0 g/L.

2. Penyiapan Larutan Piperin

Piperin memiliki berat molekul sebesar 285,33766 g/mol. Larutan stok piperin dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-1} M. Untuk membuat larutan tersebut, piperin ditimbang seksama seberat 285 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan piperin 2×10^{-1} M diencerkan 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 trakea dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa piperin konsentrasi 10 μ M dan 50 μ M.

3. Pembuatan Larutan *Acetyl- β -Methylcholine*

Acetyl- β -Methylcholine Chloride memiliki berat molekul 195,69 g/mol. Pengenceran larutan stok Asetilkolin dibuat dengan konsentrasi 2×10^{-1} M dalam Aquades. Setelah itu dilakukan pengenceran hingga diperoleh larutan asetilkolin dengan konsentrasi 2×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} ; 2×10^{-5} ; 2×10^{-6} M, 2×10^{-7} M, 2×10^{-8} M. Pemberian seri konsentrasi dapat dilihat pada tabel 2. Konsentrasi asetilkolin sebesar 10^{-10} M diperoleh dengan cara menginjeksikan 100 μ L larutan stok *acetyl- β -methylcholine* 2×10^{-8} M ke dalam *chamber organbath* yang berisi larutan *buffer krebs* 20,0mL.

4. Pembuatan Larutan Atropin

Atropin digunakan sebagai senyawa pembanding memiliki berat molekul sebesar 289,37 g/mol. Dibuat larutan baku dengan konsentrasi 2×10^{-4} M. Setelah itu dilakukan pengenceran hingga diperoleh larutan atropin dengan konsentrasi 2×10^{-5} M. Larutan atropin 2×10^{-5} M ditambahkan kedalam pada *chamber organ bath* yang berisi trakea dan larutan *buffer krebs* 20 mL. Larutan ditambahkan sebanyak 100 μ L dan 500 μ L untuk mencapai atropin dengan konsentrasi 0,1 μ M dan 0,5 μ M.

5. Preparasi Organ Trakea

Marmut jantan dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang leher (*cervical*). Dilakukan pembedahan pada bagian leher untuk diambil trakea sepanjang 2 cm. Trakea yang telah diambil kemudian diletakkan pada cawan fiksasi yang sebelumnya telah diberi larutan *buffer krebs*. Pada cawan fiksasi dilakukan pembersihan trakea dari jaringan lain yang masih menempel (jaringan lemak). Pada bagian trakea dilakukan penyayatan secara silang dari bagian atas hingga bagian bawah. Selanjutnya, pada kedua ujung trakea tersebut diikat pada benang. Ujung bagian bawah diikat pada bagian tuas *organ bath*, sedangkan ujung bagian atas diikatkan pada bagian transduser. *Organ bath* dikondisikan pada suhu 37°C.

6. Uji Aktivitas Piperin

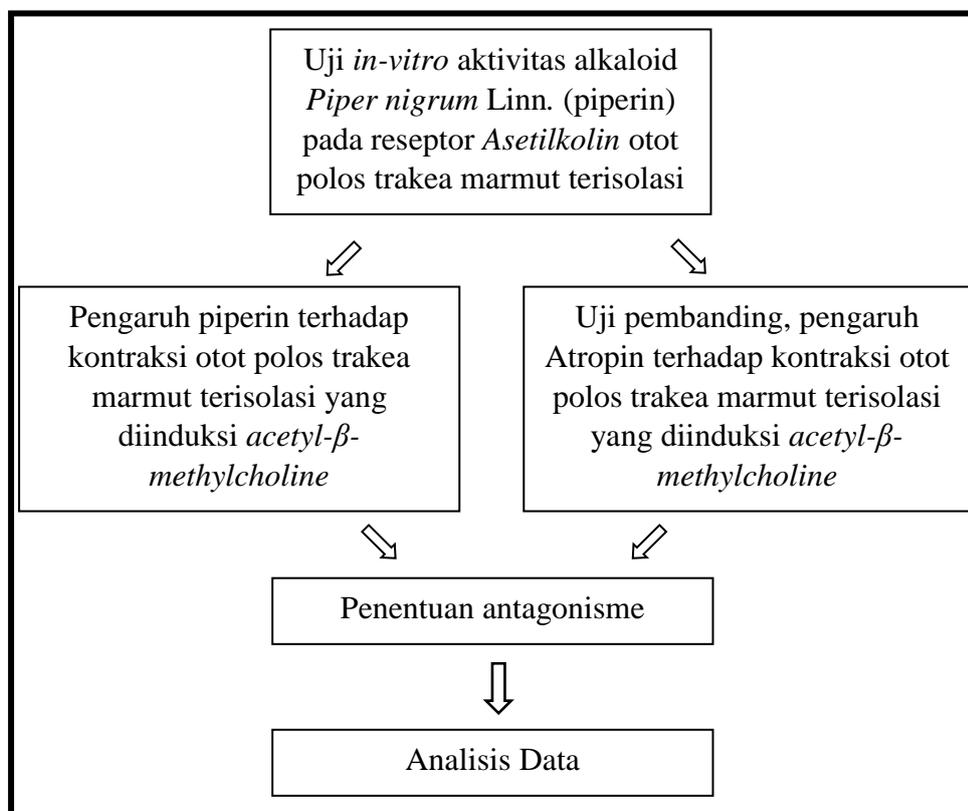
Uji aktivitas pengaruh piperin terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi otot polos trakea marmut yang telah diisolasi. Pengujian dilakukan setelah organ terisolasi mendapatkan perlakuan

pengenalan terhadap agonis reseptor. *Organ bath* diisi dengan larutan *buffer krebs* sebanyak 20 mL, kemudian organ yang telah disiapkan dimasukkan kedalam *organ bath* dengan cara mengaitkan bagian bawah pada pengait *chamber* dan bagian atas pada *transducer*. Setelah organ direndam dalam *organ bath*, dilakukan ekuilibrase organ sampai diperoleh kondisi stabil. Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis pada *organ bath* dan didapatkan respon kontraksi yang akan tercatat pada rekorder (software *labscribe*[®]). Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (100%). Pemberian seri agonis secara bertingkat dilakukan untuk pengukuran kontraksi. Pengukuran kontraksi dilakukan sebanyak dua kali, dimana antara pengukuran pertama dan kedua diberi jeda pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer krebs* setiap lima menit. Setelah dilakukan pencucian organ, sebelum dilakukan pengukuran kontraksi yang kedua, dilakukan ekuilibrase organ sampai diperoleh kondisi stabil. Selanjutnya dilakukan pemberian piperin dengan konsentrasi 10 μM dan 50 μM . Setelah itu, diberikan konsentrasi agonis secara bertingkat kedalam *organ bath*. Respon kontraksi yang muncul akan tercatat pada rekorder. Kurva hubungan konsentrasi dan % (persen) respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh piperin yang kemudian dibandingkan.

Tabel 2. Cara Pemberian Dosis Agonis *Acetyl-β-Methylcholine*

Volume Larutan yang ditambahkan dalam <i>organ bath</i> (mL)	Konsentrasi Agonis yang ditambahkan (M)	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}
0,200	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-5}$
0,070	$2 \cdot 10^{-2}$	10^{-4}
0,200	$2 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$

G. SKEMA LANGKAH KERJA



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. DATA DAN ANALISIS DATA

1. Data

Penelitian *in vitro* antagonisme piperin terhadap otot polos trakea marmut terisolasi yang diinduksi *acetyl-β-methylcholine* diperoleh data kontraksi otot polos trakea pada rekorder *software* Labscribe®. Data tersebut kemudian dirubah kedalam bentuk % (persentase) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap % (persentase) respon kontraksi.

2. Analisis Data

Nilai konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum pada agonis reseptor (EC_{50}) dengan atau tanpa pengaruh dari piperin dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon EC_{50} . Nilai EC_{50} dihitung berdasarkan persamaan 2. Selanjutnya, nilai dari EC_{50} dirubah menjadi nilai $-\text{Log } EC_{50}$ yang berarti merupakan nilai pD_2 (persamaan 3). Data yang didapatkan kemudian disajikan kedalam tabel kelompok perlakuan dan nilai rata-rata pD_2 agonis \pm *Standard Error* ($pD_2 \pm SE$). Tabel kelompok perlakuan agonis merupakan data dengan atau tanpa pengaruh piperin.

$$\text{Log } EC_{50} = \left[\frac{50-y_1}{y_2-y_1} x (x_2 - x_1) \right] + x_1 \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

X1 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat dibawah 50%

X2 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat diatas 50%

Y1 = % respon tepat dibawah 50%

Y2 = % respon tepat diatas 50%

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

3. Statistika

Piperin ditetapkan sebagai antagonis reseptor asetilkolin apabila inkubasi otot polos trakea marmut terisolasi dengan piperin mengakibatkan penurunan nilai pD2 *acetyl-β-methylcholine*. Uji normalitas menggunakan metode *shapiro-wilk* untuk mengetahui kenormalan sebaran distribusi data nilai pD2 *acetyl-β-methylcholine*. Penurunan nilai pD2 dianalisis dengan metode statistik parametrik menggunakan uji *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan LSD dengan taraf kepercayaan 95%.