

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan tema farmakologi molekuler.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2016.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan berupa marmut jantan dengan berat badan antara 400 – 500 gram dan umur diatas 3 bulan. Dalam penelitian ini subjek dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*), kemudian dilakukan isolasi organ ileum. Selanjutnya organ ileum diletakkan di dalam alat organ bath, lalu diinduksi histamin. Terakhir dilakukan penentuan aktivitas antagonisme.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Dosis senyawa DHPP dan histamin yang diberikan.

b. Variabel kendali

Berat badan, umur, dan jenis kelamin.

c. Variabel tergantung

Respon kontraksi otot polos ileum.

2. Instrumen Penelitian

a. Bahan:

Senyawa yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Bahan kimia yang digunakan adalah buffer tyrode, gas karbogen (m mengandung 95% oksigen dan 5% karbondioksida), agonis reseptor histamin, larutan difenhidramin, akuades.

b. Alat:

Alat yang digunakan adalah satu set alat untuk preparasi organ (scalpel, pinset, cawan petri, pipet tetes, jarum, benang, gunting bedah) kemudian vortex, pengaduk magnet termostat tipe 1419, transduser (Ugo basille[®]), rekorder (Ugo basille[®]), dua set *organ bath* volume 20 ml Bridge amplifier (Ugo basille[®]) dan pipet mikro 100 μ l, 1000 μ l (Eppendorf[®]).

3. Cara Kerja

a. Penyiapan Larutan *Buffer tyrode*

Larutan *buffer tyrode* terdiri atas dua macam larutan, yaitu larutan A dan B. Komposisi larutan dapat dilihat dalam Tabel 1. Bahan-bahan pada tabel larutan A masing-masing ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu takar, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L. Bahan pada tabel larutan B ditimbang, kemudian dimasukkan ke labu takar, dan dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L. Untuk membuat larutan *buffer tyrode*, dibuat campuran antara 100 ml larutan A, 100 ml larutan B, 1,00 g glukosa, kemudian ditambahkan 800 ml akuades (Anonim, 1986)

Tabel 1. Komposisi Buffer Tyrode

Komposisi larutan A		Komposisi larutan B	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	80 g	NaHCO ₃	10 g
KCL	2,00 g		
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,14 g		
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,64 g		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,65 g		

(Sumber: Anonim 1986)

b. Penyiapan Larutan Senyawa DHPP 10 μ M dan 20 μ M.

Larutan DHPP dibuat dalam bentuk stok DHPP konsentrasi 2 x 10⁻³M. Sebagai senyawa uji, diberikan dalam konsentrasi 10 dan 20

μM . Larutan stok konsentrasi $2 \times 10^{-3}\text{M}$ ditambahkan sebanyak 100 atau 1000 μL ke dalam organ bath yang telah berisi organ ileum dan larutan *buffer tyrode* 20,0 mL untuk mencapai senyawa DHPP konsentrasi 10 μM dan 20 μM .

c. Pembuatan Larutan Histamin

Larutan histamin dibuat dalam bentuk stok histamin konsentrasi $2 \times 10^{-1}\text{ M}$ dalam akuades. Histamin memiliki bobot molekul 184,1 g/mol. Pengenceran larutan stok histamin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok histamin $2 \times 10^{-1}\text{ M}$, sehingga diperoleh larutan histamin konsentrasi 2×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} ; 2×10^{-5} dan $2 \times 10^{-6}\text{ M}$. Konsentrasi histamin sebesar 10^{-8} M diperoleh dengan cara menginjeksikan 100 μL larutan stok histamin $2 \times 10^{-6}\text{ M}$ ke dalam *organ bath* yang berisi larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

d. Preparasi Organ Ileum

Marmut jantan yang digunakan memiliki bobot $\pm 450\text{ g}$. Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan dilakukan pembedahan pada bagian perut. Selanjutnya diambil bagian ileumnya sepanjang 2 cm. Ileum yang telah diambil diletakkan ke dalam cawan fiksasi yang diisi larutan *buffer tyrode*, kemudian dibersihkan dari isi ususnya. Setelah itu dibersihkan juga dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel (jaringan lemak). Pada kedua ujung usus ini selanjutnya diikat dengan benang. Ujung

benang bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organ bath* dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser. *Organ bath* sebelumnya telah dikondisikan sehingga suhunya mencapai 37°C dan dialiri gas karbogen. Dengan kondisi tersebut organ dapat bertahan selama 6 jam.

e. Uji Aktivitas Senyawa DHPP Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis (Histamin)

Uji aktivitas senyawa DHPP agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi ileum marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi ini dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan 20 mL larutan *buffer tyrode*, kemudian organ direndam dalam *organ bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrase sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder (kertas *polygraph*). 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 lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian senyawa DHPP konsentrasi 10 dan 100 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 DHPP yang terjadi kemudian dibandingkan.

f. Uji Reversibilitas

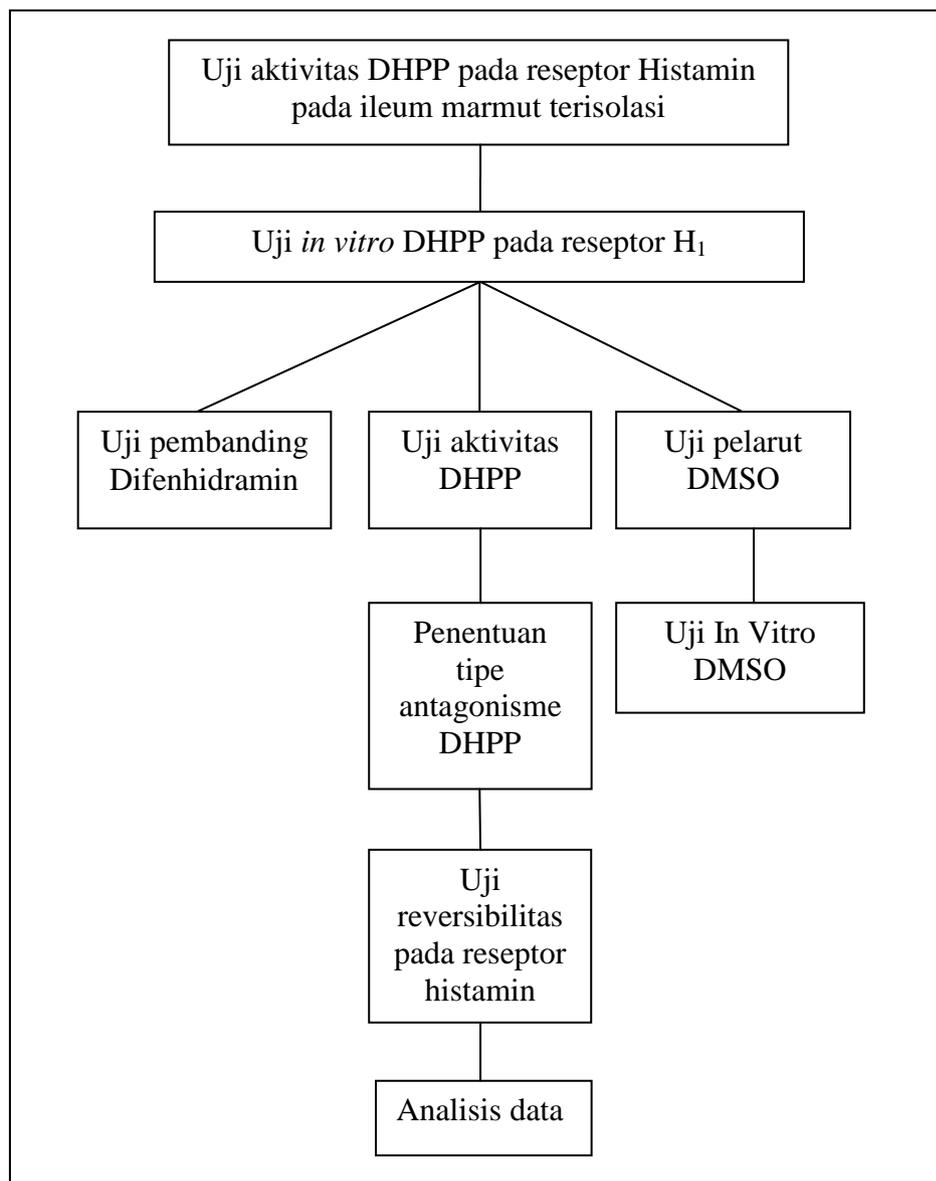
Uji reversibilitas bertujuan untuk melihat kemampuan organ untuk kembali pada kondisi semula, atau pada kondisi sebelum dilakukannya pengenalan agonis reseptor. Uji reversibilitas ini dilakukan pada uji aktivitas agonis reseptor histamin. Uji reversibilitas terhadap ileum dilakukan setelah kontraksi dan pencucian organ akibat pemberian agonis dan senyawa DHPP. Ileum dicuci selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap lima menit. Setelah ileum mencapai kondisi stabil, dilakukan pengukuran kontraksi kembali karena pemberian agonis reseptor dengan konsentrasi yang sama dengan pengukuran kontraksi pengenalan agonis reseptor. Kurva hubungan konsentrasi agonis reseptor yang dihasilkan kemudian dibandingkan antara pengukuran pertama dan kedua.

g. Uji Pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO)

Waktu yang tepat untuk melakukan uji pengaruh DMSO adalah setelah pengenalan agonis reseptor. Ileum dicuci selama 45 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap lima belas

menit. Jumlah DMSO yang diberikan adalah sebanyak 100 μ L dan kemudian dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi agonis. Kemudian dibandingkan antara kurva hubungan konsentrasi agonis terhadap % respon sebelum dan sesudah perlakuan DMSO.

4. Skema Langkah Kerja



E. Analisis Data

1. Data

Data yang dihasilkan pada penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi otot polos ileum pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Kemudian, 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 alkaloid dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan (persamaan 1). Nilai EC_{50} ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD_2 , dimana pD_2 adalah nilai dari $-\text{Log} EC_{50}$ (persamaan 2) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh alkaloid) dan nilai rata-rata pD_2 agonis \pm Standard Error ($pD_2 \pm SE$). 45

$$\text{Log } EC_{50} = \left[\frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} \times (X_2 - X_1) \right] + X_1 \dots \dots \dots (1)$$

Pergeseran nilai pD_2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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%

$pD_2 = -\text{Log. EC}_{50}$ (2)

3. Statistika

a. Analisis senyawa DHPP Sebagai Antagonis Reseptor H_1

DHPP adalah senyawa yang ditetapkan sebagai antagonis reseptor H_1 apabila inkubasi otot polos ileum marmut terisolasi dengan isolat alkaloid mengakibatkan penurunan nilai pD_2 histamin. Semua data pD_2 histamin terdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$). Distribusi data pD_2 histamin dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode Shapiro-Wilk). Penurunan nilai pD_2 selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji *one-Way ANOVA*.

Pertama-tama akan dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal ($P > 0,05$), maka digunakan uji *one-Way ANOVA* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Post Hoc Test*.

Sedangkan bila distribusi datanya tidak normal ($P < 0.05$), maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan *Mann-Whitney U*. Semua analisis statistic tersebut dilakukan dengan menggunakan program computer *SPSS for Windows*.

d. Penetapan Tipe Antagonis Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon Terhadap Reseptor H₁

Penetapan tipe antagonis dilakukan dengan menggunakan Analisis Schild-Plot dalam bentuk analisis regresi. Data rasio EC₅₀ agonis histamin karena pengaruh isolat alkaloid terhadap EC₅₀ tanpa pengaruh antagonis dikurangi dengan satu diplotkan sebagai sumbu Y dan logaritma konsentrasi antagonis di plotkan sebagai sumbu X pada kurva Schild-Plot, dan selanjutnya diperoleh Persamaan Schild-Plot yang merupakan suatu persamaan garis lurus. Tipe antagonis ditentukan berdasarkan nilai *slope* yang dihasilkan oleh persamaan Schild-Plot. Jika nilai *slope* mendekati satu, maka tipe antagonis isolat alkaloid terhadap reseptor adalah sebagai antagonis kompetitif, sedangkan jika nilai *slope* menjauhi angka satu, maka tipe antagonis isolat alkaloid adalah sebagai antagonis non kompetitif. Harga pA₂ (Afinitas isolat alkaloid sebagai antagonis reseptor) merupakan nilai intersep dari persamaan Schild-Plot yang terbentuk (Janković *et al.*, 1999).