

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 – Maret 2016.

C. Populasi Dan Sampel

1. Kelompok ileum uji pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO)

- a. Kelompok uji seri kadar histamin.
- b. Kelompok perlakuan (DMSO 100 μ L+ seri kadar histamin).

2. Kelompok ileum uji antagonis histamin

- a. Kelompok uji seri kadar histamin.
- b. Kelompok perlakuan (alkaloid lada + seri kadar histamin).
- c. Kelompok reversibilitas.

3. Kelompok ileum uji pembanding (kontrol positif)

- a. Kelompok uji seri kadar histamin.
- b. Kelompok perlakuan (difenhidramin + seri kadar histamin).

D. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Konsentrasi alkaloid lada.

2. Variabel Kendali

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

3. Variabel Tergantung

Respon kontraksi otot polos ileum.

E. Alat Dan Bahan

1. Bahan

Zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) yang sudah dilakukan determinasi di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (Lampiran 1). Sebelumnya kristal diperoleh dengan menggunakan metode sokhletasi menggunakan pelarut etilasetat (Brataco®) dengan perbandingan serbuk lada dan pelarut (1:3). Filtrat hasil sokhletasi dipekatkan menggunakan evaporator dan didiamkan di suhu ruang terlindung dari cahaya hingga terbentuk kristal. Kristal selanjutnya dicuci dengan alkohol 96% (Brataco®). Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer tyrode*, gas karbogen (mengandung 95% oksigen dan 5% karbondioksida), agonis reseptor histamin (Sigma, USA), larutan difenhidramin (Recodryl®), akuades (Brataco®), dan dimetil sulfoksida (DMSO).

2. Alat

Alat yang digunakan meliputi satu set alat untuk preparasi organ, pengaduk magnet thermostat (Cimarec®), dua set *organ bath* volume 20 mL (Ugo Basile®), *bridge amplifier* tipe 336, mikropipet (Socorex®), labu takar (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), beker glass (Pyrex®), satu set alat sokhletasi, *Rotary Evaporator* (IKA®RV10), timbangan analitik (Mettler Toledo®), pengaduk, corong, cawan porselin, penggaris, pipa kapiler, pipet ukur, pipet tetes, kertas saring (Whatman 40), aluminium foil (Brand), plat silika gel 60 GF₂₅₄ (Merck®), Spektroskopi FTIR 8201PC (Shimadzu®), Spektrofotometer Uv-Vis mini-1240 (Shimadzu®), komputer yang terinstal software *molecular docking Autodock* dan *LabScribe2*.

F. Prosedur Kerja Dan Alur Penelitian

1. Uji identifikasi kristal alkaloid lada menggunakan KLT

Kristal alkaloid lada dilarutkan dengan metanol untuk selanjutnya ditotolkan pada plat Silika dengan fase gerak BAW (4:1:5). Pembanding menggunakan kinin sulfat yang dilarutkan dengan metanol dan ditotolkan pada sisi sebelah kanan tempat penotolan alkaloid lada. Bercak selanjutnya diamati dengan sinar UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi *dragendorff*.

2. Identifikasi piperin pada kristal alkaloid lada menggunakan FTIR

Sampel dicampur dengan KBr kemudian dimasukkan dalam wadah uji dan spektra serapannya direkam pada bilangan gelombang 500-4000 cm⁻¹.

3. Identifikasi piperin pada alkaloid lada dengan spektrofotometri UV-Vis

Sebanyak 10 mg kristal dilarutkan dalam 10 ml methanol kemudian diencerkan hingga konsentrasi 10 μ g/ml. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

4. Identifikasi kemurnian kristal alkaloid lada dengan uji titik lebur

Sampel diletakan pada pipa kapiler pada termometer dan mikroskop diatur hingga sampel tampak jelas. *Auto thermal controller* diatur pada temperatur yang lebih tinggi dari titik lebur senyawa uji. Alat pengontrol diatur dengan kenaikan temperatur mula-mula kecepatan 5 $^{\circ}$ C/menit, ketika mendekati titik lebur senyawa uji, kecepatan diturunkan menjadi 2 $^{\circ}$ C/menit. Temperatur dicatat saat kristal mulai meleleh hingga semua kristal meleleh.

5. Penyiapan larutan *buffer tyrode*

Larutan *buffer tyrode* terdiri atas dua 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 *buffer tyrode*

Komposisi larutan A		Komposisi larutan B	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	80,0 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		

Cara membuat larutan *buffer tyrode* adalah dengan mencampur antara 100 ml larutan A, 100 ml larutan B, 100 gram glukosa, kemudian ditambahkan 800 ml akuades (Anonim, 1986).

6. Penyiapan larutan alkaloid lada (1000 μM dan 5000 μM)

Larutan alkaloid lada dibuat dalam bentuk stok alkaloid lada konsentrasi 2×10^{-1} M. Alkaloid lada (menggunakan BM piperin : 285,33766 g/mol) ditimbang seberat 285 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan alkaloid lada 2×10^{-1} M ditambahkan sebanyak 100 μL dan 500 μL ke dalam organ *bath* yang telah berisi organ ileum dan larutan *buffer tyrode* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid lada konsentrasi 1000 μM dan 5000 μM .

7. Pembuatan larutan histamin

Larutan histamin dibuat dalam bentuk stok histamin konsentrasi 2×10^{-1} M dalam akuades (BM Histamin : 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} dan 2×10^{-8} M. Pemberian seri konsentrasi agonis dapat dilihat pada Tabel 2. Konsentrasi histamin sebesar 10^{-10} diperoleh dengan cara menginjeksikan 100 μL larutan stok histamin 2×10^{-8} M ke dalam organ *bath* yang berisi larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

$$[\text{Histamin}] = \frac{100 \mu\text{L}}{20000 \mu\text{L}} \times 2 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$[\text{Histamin}] = 10^{-10} \text{ M}$$

8. Pembuatan larutan difenhidramin (1×10^{-8} M dan 5×10^{-6} M)

Larutan stok dibuat konsentrasi 2×10^{-2} M. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga konsentrasi larutan difenhidramin 2×10^{-6} M. Larutan dengan konsentrasi 0,01 μ M dan 0,05 μ M didapatkan dengan mengambil larutan difenhidramin 2×10^{-6} M sebanyak 100 μ L dan 500 μ L kemudian dimasukkan ke dalam organ *bath* yang berisi 20 mL larutan *buffer tyrode*.

9. Preparasi organ ileum

Marmut jantan dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervical*) dan dilakukan pembedahan pada bagian abdomen, kemudian bagian ileum dipisahkan. Ileum diambil dari bagian perut sepanjang 2 cm. Ileum yang telah diambil diletakkan di cawan fiksasi dan diisi dengan larutan *buffer tyrode*, kemudian dibersihkan dari isi usus dan jaringan-jaringan (lemak) yang masih menempel. Pada kedua ujung usus ini kemudian diikat dengan benang. Ujung bagian bawah benang diikatkan pada tuas organ *bath* dan ujung bagian atas ileum diikatkan pada transduser. Organ *bath* dikondisikan terlebih dahulu pada suhu 37°C .

10. Uji aktivitas alkaloid lada terhadap agonis reseptor fisiologis

Uji aktivitas alkaloid lada 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* tersebut dan dilakukan ekuilibrase sampai diperoleh kondisi stabil. Pengukuran kontraksi dilakukan

dalam dua tahap dimana antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap 5 menit. Kontraksi diukur secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis ke dalam organ *bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Pemberian agonis dilakukan sampai dicapai kontraksi maksimum (100%). Pada pengukuran kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian alkaloid lada konsentrasi 1000 μL dan 5000 μL . Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam organ *bath* seperti pada pengukuran pertama.

Tabel 2. Cara pemberian dosis agonis histamin

Volume larutan obat yang ditambahkan dalam organbath (ml)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan	Konsentrasi agonis dalam organ bath 20 mL (faktor kumulatif) (M)
0,100	2.10^{-8}	10^{-10}
0,200	2.10^{-8}	3.10^{-10}
0,070	2.10^{-7}	10^{-9}
0,200	2.10^{-7}	3.10^{-9}
0,070	2.10^{-6}	10^{-8}
0,200	2.10^{-6}	3.10^{-8}
0,070	2.10^{-5}	10^{-7}
0,200	2.10^{-5}	3.10^{-7}
0,070	2.10^{-4}	10^{-6}
0,200	2.10^{-4}	3.10^{-6}
0,070	2.10^{-3}	10^{-5}
0,200	2.10^{-3}	3.10^{-5}
0,070	2.10^{-2}	10^{-4}
0,200	2.10^{-2}	3.10^{-4}

11. Uji *in silico*

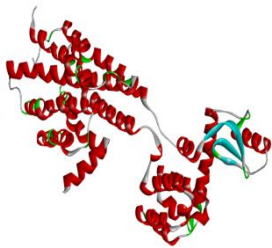
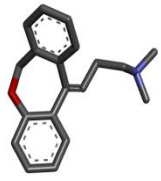
a. Instalasi Sistem Operasi *Linux* dan Aplikasi Pendukung

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.rcsb.org) dalam format “.*pdb*”. Berkas protein / reseptor yang digunakan adalah reseptor *Histamine H₁* dengan kode protein 3RZE.

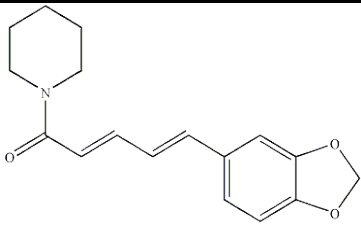
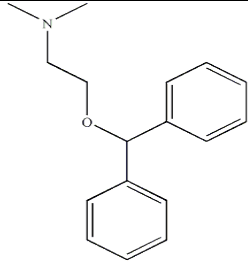
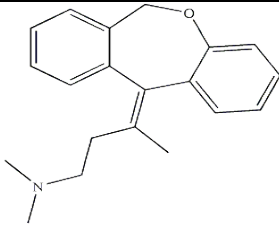
Tabel 3. Kode dan struktur protein Histamin H₁

Kode Protein	Ligan Asli	Struktur Reseptor	Struktur <i>Native Ligand</i>
3RZE	Doksepin <chem>C19H21NO</chem>		

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).

Tabel 4. Visualisasi Ligan

No.	Ligan	Struktur
1	Piperin	
2	Difenhidramin	
3	Doksepin	

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).

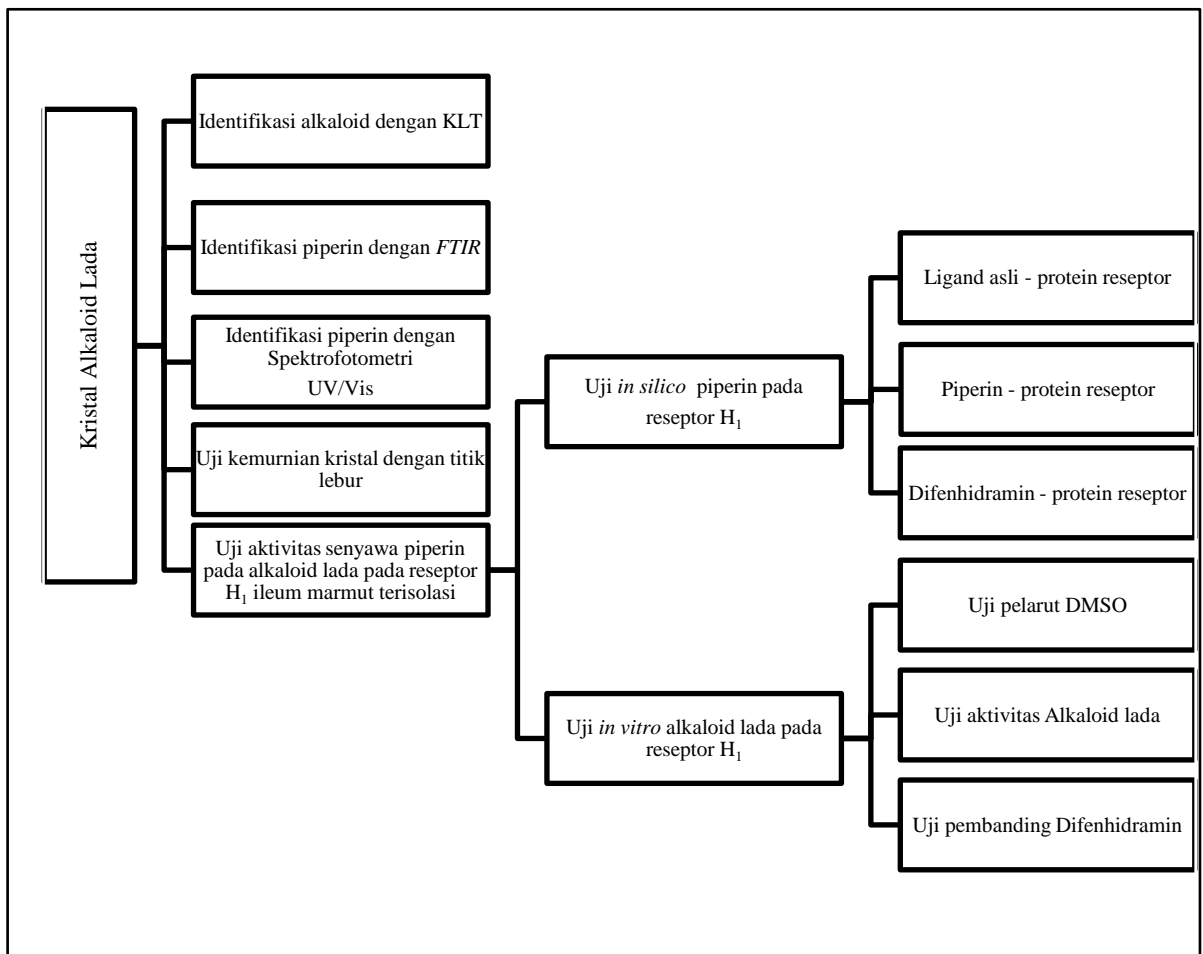
g. Simulasi *Docking*

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.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema langkah kerja

H. Data Dan Analisis Data

1. Identifikasi kristal alkaloid lada dengan KLT

Hasil KLT yang diperoleh dilihat dibawah sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm dan disemprotkan dengan pereaksi *dragendorff*.

2. Identifikasi piperin pada kristal alkaloid lada dengan FTIR

Hasil yang diperoleh adalah berupa spektra serapan. Spektra serapan yang diperoleh kemudian dianalisis dengan melihat pada data daerah gugus fungsi alkaloid lada dengan standar serapan IR pada acuan.

3. Identifikasi piperin pada kristal alkaloid dengan spektrofotometer UV-Vis

Hasil yang diperoleh adalah berupa spektra panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang yang diperoleh dibandingkan dengan spektra panjang gelombang maksimum dari acuan.

4. Identifikasi kemurnian kristal alkaloid lada dengan uji titik lebur

Hasil yang diperoleh adalah berupa rentang temperatur dari pertama kali kristal dari meleleh hingga kristal tersebut meleleh seluruhnya. Kristal solid yang murni memiliki rentang titik lebur yang sempit yaitu 1-2°C

5. Uji *In Vitro* alkaloid lada pada reseptor H₁

a. 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 % respon dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap % respon.

b. Analisis Data

Nilai EC₅₀ (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh alkaloid lada dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC₅₀ dihitung berdasarkan Persamaan 1. Nilai EC₅₀ ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD₂, dimana pD₂ adalah nilai dari $-\text{Log}.EC_{50}$ (Persamaan 2) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk

tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh Alkaloid lada) dan nilai rata-rata pD2 agonis \pm *Standard Error* (pD2 \pm SE). Pergeseran nilai pD2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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

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%

$$\text{pD2} = -\text{Log. EC}_{50} \dots\dots\dots (2)$$

Alkaloid lada ditetapkan sebagai antagonis reseptor H₁ apabila inkubasi otot polos ileum marmut terisolasi dengan alkaloid lada 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%.

Determinasi tipe antagonis ditunjukkan menggunakan analisis *Schild-plot* dalam bentuk analisis regresi. Tipe antagonis ditentukan berdasarkan nilai *slope* yang dihasilkan oleh persamaan *Schild-Plot*. Jika nilai *slope* mendekati satu, maka tipe antagonis alkaloid lada terhadap reseptor adalah sebagai antagonis kompetitif. Sedangkan jika nilai *slope*

menjauhi angka satu, maka tipe antagonis alkaloid lada adalah sebagai antagonis non-kompetitif. Harga pA_2 (afinitas sebagai antagonis reseptor) merupakan nilai intersep dari persamaan *Schild-Plot* yang terbentuk (Janković *et al.*, 1999).

6. Uji *in silico* (Molecular Docking)

Data yang diperoleh dari uji dengan *Molecular Docking* senyawa piperin dan senyawa pembanding (ligan asli dan difenhidramin) adalah skor ikatan (*binding score*). Jika skor ikatan lebih rendah dibandingkan dengan skor ikatan ligan pembanding maka piperin berpotensi sebagai agen antagonis histamin H_1 .