

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode 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 (FKIK UMY). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2018.

#### **C. Subjek Penelitian**

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 (adrenalin) mulai dari konsentrasi  $2 \times 10^{-3}$  M hingga  $2 \times 10^{-8}$  M
2. Kelompok perlakuan antagonis (alkaloid *Piper nigrum* L. + adrenalin)
3. Kelompok reversibilitas (adrenalin) mulai dari konsentrasi  $2 \times 10^{-3}$  M hingga  $2 \times 10^{-8}$ .

#### **D. Identifikasi Variabel**

##### **1. Variabel Bebas**

Konsentrasi alkaloid piperin (*Piper nigrum* Linn)

##### **2. Variabel Tergantung**

Respon kontraksi otot polos aorta dan aktifitas reversibilitas.

### 3. Variabel Kendali

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

## E. Alat dan Bahan

### 1. Bahan

Zat aktif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kristal alkaloid lada (*Piper nigrum* Linn) yang telah melalui proses isolasi yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Amaliah, 2016). Kristal alkaloid lada diperoleh melalui metode sokhletasi menggunakan pelarut etilasetat (Brataco<sup>®</sup>) dengan perbandingan serbuk lada dan pelarut (1 : 3). Kristal dicuci dengan *alcohol* 96% (Brataco<sup>®</sup>). Identifikasi piperin telah di konfirmasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan fase diam Silika Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck<sup>®</sup>) dan fase gerak Etilasetat : n-heksan (1 : 4), ditemukan warna jingga yang menandakan adanya senyawa alkaloid.

### 2. Alat

Alat yang digunakan meliputi satu set alat untuk preparasi organ seperti pisau bedah, gunting, benang, jarum untuk menjahit organ yang akan dimasukkan ke dalam organ bath, pengaduk magnet thermostat (Cimarec<sup>®</sup>), dua set *organ bath* volume 20mL (Ugo Basile<sup>®</sup>), *bride amplifier* tipe 336, mikropipet (Socorex<sup>®</sup>), labu takar (Pyrex<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), beker glass (Pyrex<sup>®</sup>), timbangan analitik (Mettler Toledo<sup>®</sup>), pengaduk, cawan porselin, pipet ukur, pipet tetes, kertas saring (Whatman 40), alumunium foil (Brand), dua set organ bath volume 20 ml, transduser (Ugo basille<sup>®</sup>), rekorder (Ugo basille<sup>®</sup>), Bridge amplifier (Ugo basille<sup>®</sup>).

## F. Prosedur Kerja dan Alur Penelitian

### 1. Penyiapan Larutan *buffer krebs*

**Table 1.** Komposisi larutan *buffer krebs*

Formula A (1,0 L)		Formula B (1,0 L)	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	68,70 g/L	NaHCO <sub>3</sub>	21,00 g/L
KCL	4,20 g/L		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,90 g/L		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,70 g/L		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,00 g/L		

Sebelum melakukan preparasi organ, terlebih dahulu *disiapkan buffer krebs* sebagai larutan fisiologis. *Buffer krebs* terdiri dari formula A dan formula B, masing-masing formula memiliki kandungan yang berbeda, formula A mengandung *Sodium chloride*, *Potassium chloride*, *Magnesium sulfate heptahydrate*, *Calcium chloride dihydrate*, *Sodium phospat dihydrate*, sedangkan formula B mengandung *Sodium bicarbonat*. Untuk membuat kedua formula tersebut, masing-masing bahan di timbang terlebih dahulu dengan berat sesuai daftar formula yang tertera pada bab III. Kedua formula tersebut masing-masing dilarutkan kedalam 1,0 L aquadest sampai larut sempurna dan keduanya diambil sebanyak 100mL untuk dilarutkan ke dalam 800mL aquadest, dilakukan penambahan glukosa sebanyak 1 gram, dan dihomogenkan dengan bantuan pengaduk magnet thermostat. *Buffer krebs* dipilih dengan alasan kandungan yang ada di dalamnya hampir sama dengan keadaan tubuh hewan uji, sehingga dapat menjaga organ agar tetap hidup.

### 2. Penyiapan Larutan Piperin

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi  $2 \times 10^{-3}$  M. Untuk membuat larutan tersebut, senyawa piperin ditimbang seksama seberat 28,534 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan alkaloid *Piper nigrum* Linn.. Larutan

$2 \times 10^{-3} \text{ M}$  ditambahkan sebanyak 100 dan 500  $\mu\text{L}$  ke dalam organ bath yang telah berisi organ aorta dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa alkaloid *Piper nigrum* Linn konsentrasi  $10 \mu\text{M}$  dan  $50 \mu\text{M}$ .

### 3. Penyiapan Seri Konsentrasi Adrenalin

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

### 4. Penyiapan Alat *Organbath*

Pada penyiapan alat *organbath* yang pertamakali harus di siapkan adalah mengisi tabung *organbath* dengan aquadest sampai  $\pm$  tinggi aquadest hampir menutupi chamber, kemudian alat dinyalakan dan suhu mulai diatur agar sesuai dengan keadaan fisiologis tubuh hewan uji yaitu sekitar  $36,5^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$ , alat untuk mengatur suhu dalam organ bath disebut juga sebagai *temperature regulator*. Bagian-bagian *organbath* yang dipakai dalam penelitian kali ini diantaranya adalah : *temperature regulator*, *chamber*, *transduser isotonic*, *bridge amplifier*. Juga terpasang *software LabSrice* yang telah terinstal dalam komputer.

Fungsi dari *temperature regulator* adalah untuk mengatur suhu aquadest dalam *organbath* agar tetap dalam keadaan fisiologis hewan uji, hal ini menjadi hal yang harus diperhatikan karena untuk menjaga organ tetap hidup selama perlakuan uji didalam *organbath*. *Chamber* berfungsi sebagai wadah atau tempat organ yang nantinya akan dihubungkan dengan *transduser*, dan *chamber* akan diisi dengan cairan *buffer krebs* sebanyak 20 ml dalam suhu  $36,5^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$  untuk merendam organ aorta terisolasi. *Transduser isotonic* berfungsi sebagai alat

pengukur perubahan ketegangan relaksasi atau kontraksi yang dihasilkan oleh organ. *Bridge amplifier* berfungsi sebagai rekorder data yang berhasil dibaca oleh transduser.

Setelah semua bagian-bagian pada *organbath* sudah dipastikan tidak memiliki masalah apapun, semua dinyalakan dan suhu pada *organbath* diatur hingga 37°C.

## 5. Preparasi Organ Aorta

Marmut dikorbankan dengan cara mendislokasi leher marmut, hingga marmut benar-benar tidak sadarkan diri dan mengalami pendarahan pada bagian hidung marmut, setelah itu darah dibersihkan dengan air mengalir. Alat-alat bedah dan cawan yang telah berisikan *buffer krebs* dengan suhu 37°C sesuai dengan keadaan fisiologis tubuh marmut disiapkan untuk pembedahan marmut.

Marmut diletakkan di atas nampan dan pembedahan mulai dilakukan, dilakukan pengambilan semua organ dalam tubuh marmut untuk memudahkan pengambilan organ aorta marmut. Setelah organ aorta berhasil terangkat, organ diletakkan di atas cawan yang berisi *buffer krebs*, mulai dilakukan proses pembersihan organ dari lemak-lemak yang menempel, pemotongan aorta dengan panjang  $\pm 2$  cm, penyambungan dengan ring untuk menghubungkan organ dengan *chamber*, organ dipotong zigzag berlawanan arah dengan jarak  $\pm 3$  mm setiap potongan zigzagnya, benang dengan panjang 10-15 cm diikatkan pada ujung aorta yang berlawanan dengan ujung yang dipasangkan ring untuk menghubungkan organ dengan *transducer*.

Setelah organ dihubungkan dengan *chamber* dan *transducer*, gas karbogen mulai dialirkan dari arah bawah *chamber* yang terhubung dengan tabung gas.

Fungsi dari gas karbogen adalah untuk menjaga organ agar tetap hidup dan mencegah pengendapan garam-garam yang terdapat dalam larutan *buffer krebs*.

## 6. Uji Aktivitas Alkaloid *Piper nigrum* Linn. Terhadap Agonis Reseptor

### Fisiologis

Uji aktivitas piperin terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi aorta marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organbath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer krebs*, kemudian organ direndam dalam *organbath* tersebut dan dilakukan ekuilibrasi sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organbath* dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. 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 krebs* setiap lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian piperin konsentrasi 10 dan 50  $\mu\text{M}$ . Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam *organbath* dengan konsentrasi bertingkat dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder. Kurva hubungan konsentrasi dan % respon kontraksi agonis dengan atau tanpa pengaruh alkaloid (*Piper nigrum* Linn) yang terjadi kemudian dibandingkan. Cara pemberian agonis asetilkolin tersaji pada Tabel 1.

**Table 1.** Cara Pemberian Agonis

Waktu (menit)	Volume larutan obat yang ditambahkan dalam <i>organbath</i> (ml)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan (M)	Konsentrasi agonis dalam <i>organ bath</i> (faktor kumulatif $\frac{1}{2} \log 10$ ) (M)
---------------	--	---	--

0	0,100	$2 \cdot 10^{-8}$	$10^{-10}$
2	0,200	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-10}$
4	0,070	$2 \cdot 10^{-7}$	$10^{-9}$
6	0,200	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-9}$
8	0,070	$2 \cdot 10^{-6}$	$10^{-8}$
10	0,200	$2 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-8}$
12	0,070	$2 \cdot 10^{-5}$	$10^{-7}$
14	0,200	$2 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-7}$
16	0,070	$2 \cdot 10^{-4}$	$10^{-6}$
18	0,200	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-6}$
20	0,070	$2 \cdot 10^{-3}$	$10^{-5}$

## 7. Uji Reversibilitas

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

## G. Data dan Analisis data

### 1. Data

Data yang diperoleh dalam penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi otot polos aorta 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.

## 2. Analisis Data

Nilai EC<sub>50</sub> (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh piperin dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC<sub>50</sub> dihitung berdasarkan persamaan 2. Nilai EC<sub>50</sub> ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD<sub>2</sub>, dimana pD<sub>2</sub> adalah nilai dari -Log.EC<sub>50</sub> dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh alkaloid *Piper nigrum* Linn.) dan nilai rata-rata pD<sub>2</sub> agonis ± *Standard Error* (pD<sub>2</sub> ± SE). Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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

Keterangan :

X<sub>1</sub> : Log. konsentrasi dengan respon tepat di bawah 50%.

X<sub>2</sub> : Log. konsentrasi dengan respon tepat di atas 50%.

Y<sub>1</sub> : % respon tepat di bawah 50%.

Y<sub>2</sub> : % respon tepat di atas 50%.

$$\text{pD}_2 = -\text{Log. EC}_{50} \dots\dots\dots (3)$$

### 3. Statistika

Alkaloid *Piper nigrum* Linn ditetapkan sebagai antagonis reseptor  $\beta_2$ -adrenergik. Apabila inkubasi otot polos aorta marmut terisolasi dengan alkaloid *Piper nigrum* Linn mengakibatkan penurunan nilai pD<sub>2</sub>  $\beta_2$ -adrenergik. Distribusi data pD<sub>2</sub> reseptor tersebut dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode *Kolmogorov-Smirnov*). Penurunan nilai pD<sub>2</sub> selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji *one-way anova* yang dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

## H. Skema Langkah Kerja

**Gambar 3.** Skema Langkah Kerja Uji *In Vitro*

