

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium dengan studi *in vitro* dan *in silico*.

#### **B. Tempat Dan Waktu**

Penelitian determinasi tumbuhan telah dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Ahmad Dahlan, dan uji kualitatif senyawa EPMS menggunakan alat GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Islam Indonesia, sedangkan uji *in vitro* dan *in silico* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, dan dilaksanakan pada bulan November 2018 – Juli 2019.

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

Subjek penelitian yang akan digunakan berupa *Cavia porcellus* jantan yang berusia  $\geq 3$  bulan, dengan mempertimbangkan kondisi fisik *Cavia porcellus* yang sehat untuk dijadikan sebagai hewan uji. Pada penelitian subjek akan dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala yang kemudian akan dilakukan pengambilan organ trakea *Cavia porcellus* tersebut sebagai subyek uji.

## D. Identifikasi Variabel

### 1. Variabel Bebas

Konsentrasi isolat etil p-metoksisinamat, konsentrasi AChM<sub>3</sub>.

### 2. Variabel Tergantung

Respon kontraksi organ trakea *Cavia porcellus* yang diinterpretasikan dengan nilai pD<sub>2</sub>, dengan cara pembacaan rekorder pada *organ bath* dalam uji *in vitro*.

### 3. Variabel Kendali

Kondisi fisik *Cavia porcellus*, berat badan, umur, *organ bath*, perangkat sistem *molecular docking*.

## E. Alat Dan Bahan

### 1. Alat

#### a. Uji *In Vitro*

1. Alat preparasi organ (scalpel, cawan petri, pinset, pipet tetes, benang, jarum, gunting bedah)
2. Satu set *Organ Bath* volume 20 mL
3. Rekorder
4. Pipet Mikro

#### b. Uji *In Silico*

1. Aplikasi *Discovery Studio Visualizer*
2. Aplikasi *Autodock Vina*
3. Aplikasi *Marvin Sketch*

## 2. Bahan

### a. Uji *In Vitro*

1. Senyawa etil p-metoksisinamat
2. Trakea *Cavia porcellus* yang berusia  $\geq 3$  bulan
3. Agonis reseptor AChM<sub>3</sub>
4. Akuades
5. Larutan *buffer krebs*
6. Larutan Atropin
7. DMSO

### b. Uji *In Silico*

1. Raw file EPMS
2. Raw file atropin
3. Raw file AChM<sub>3</sub> (PDB ID: 4DAJ)

## F. Prosedur Kerja Dan Alur Penelitian

### 1. Uji Kemurnian Etil P-metoksisinamat (EPMS)

#### a. Pengambilan Sampel

Sampel kencur diambil dari kencur daerah Bima, Nusa Tenggara Barat sebanyak 2 kilogram.

#### b. Pengkristalan Senyawa EPMS dari Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.)

##### A. Preparasi Bahan

Rimpang kencur terlebih dahulu dibersihkan kemudian dikupas kulitnya hingga tersisa bagian putih, dipotong kecil kemudian dipanaskan pada sinar matahari secara tidak langsung selama 2-3 hari hingga berwarna kecoklatan, kemudian dihaluskan menjadi serbuk.

## **B. Maserasi**

Serbuk kencur sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam maserator, kemudian pelarut etanol 96% ditambahkan kedalamnya sebanyak 2L. Setelah itu dilakukan pengadukan hingga serbuk EPMS terlarut sempurna dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 5 hari. Tiap harinya dilakukan pengadukan. Kemudian ekstrak disaring menggunakan kertas saring sehingga diperoleh larutan berwarna kuning. Setelah itu larutan dipekatkan pada suhu 50°C dengan alat *rotary vacuum evaporator* hingga tersisa kira-kira  $\frac{1}{4}$  dari volume awal dan didinginkan hingga membentuk kristal pada suhu ruang.

Kristal yang didapat dicuci menggunakan n-heksan kemudian dilakukan rekristalisasi hingga didapat kristal jarum tidak berwarna. Setelah itu dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan kristal dengan larutan kemudian disaring, dan padatan kristal dikeringkan lalu ditimbang. Kristal yang diperoleh dianalisis menggunakan uji KLT (Barus, 2009) dan GC-MS.

**c. Uji Identifikasi EPMS dengan KLT**

Uji identifikasi dengan KLT menggunakan fase gerak toluen : etil asetat dengan perbandingan 95:5, dan fase diam *silica gel 60 F<sub>254</sub>* (Farmakope Herbal, 2009). Kristal EPMS yang dilarutkan etanol dan larutan standar sebagai pembanding ditotolkan pada plat *silica gel 3x10 cm* menggunakan pipa kapiler dan di elusidasi dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan sebelumnya oleh fase gerak. Ketika fase gerak telah mencapai gerak rambat maka proses elusidasi dihentikan kemudian plat *silica gel* dikeluarkan dan dikeringkan di udara. Bercak pada plat diamati pada sinar tampak, sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm (Farmakope herbal, 2009).

**d. Uji Identifikasi EPMS Menggunakan *Gas Chromatography - Mass Spectrometry* (GC-MS)**

Kristal EPMS diidentifikasi menggunakan GC-MS dengan cara: kristal dilarutkan dengan pelarut metanol *liquid chromatography* kemudian diinjeksikan ke dalam GC-MS dengan kolom HP-5MS (30 m x 0,25 mm IDE x 0,25  $\mu$ m), suhu awal GC-MS yaitu 70°C selama 2 menit, kemudian dinaikkan menjadi 285°C dengan kecepatan 20°C per menit selama 20 menit. Besar suhu MSD 285°C. Kecepatan alir He 1,2 mL/menit dengan split 1:100. Parameter *scanning* dilakukan dari massa terendah hingga tertinggi (Umar *et al.*, 2012).

## 2. Uji *In Vitro*

### a. Penyiapan Larutan *Buffer* Krebs

Larutan *Buffer* Krebs terdiri dari dua macam larutan, yaitu larutan A dan B.

Komposisi dari masing-masing larutan tersebut dapat di lihat dalam tabel

dibawah ini:

Larutan A (1,00 L)		Larutan B (1,00 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		

**Tabel 1.** komposisi larutan *buffer krebs*

Larutan B sebanyak 100 mL dilarutkan dalam akuades sebanyak 800 mL, kemudian 100 mL larutan A dilarutkan menjadi satu ke dalam larutan B yang telah dilarutkan bersama akuades. Glukosa 1 gram/L ditambahkan ke dalam larutan *buffer krebs* pada saat akan digunakan.

### b. Penyiapan Larutan Etil-P-Metoksisinamat (EPMS)

Larutan stok dibuat dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M, untuk membuat larutan tersebut, isolat EPMS (BM= 206,2) ditimbang seksama sebesar 206,2 mg kemudian dilarutkan ke DMSO sebanyak 5 mL. Setelah itu larutan stok diambil sebanyak 1 mL kemudian diencerkan hingga mencapai konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M. Larutan tersebut masing-masing ditambah ke organ bath yang telah berisi trakea sebanyak 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L. Dalam *organ*

*bath* tersebut juga ditambahkan larutan *buffer krebs* sebanyak 20,0 mL. Tujuan penambahan larutan EPMS dengan konsentrasi 100 dan 200  $\mu\text{L}$  yaitu agar larutan EPMS mencapai konsentrasi masing-masing 100  $\mu\text{M}$  dan 200  $\mu\text{M}$ .

**c. Penyiapan Seri Konsentrasi Larutan Asetilkolin**

Pembuatan larutan awal stok Asetilkolin yaitu konsentrasi  $2 \times 10^{-1}$  M dalam akuades (BM Asetilkolin: 240,1 g/mol), kemudian dilakukan pengenceran secara bertingkat sehingga didapatkan hasil pengencerannya yaitu larutan Asetilkolin dengan konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ , dan  $2 \times 10^{-8}$ . Pengenceran larutan Asetilkolin berdasarkan perhitungan rumus sebagai berikut:

$$V_1 \times K_1 = V_2 \times K_2$$

Keterangan:

$V_1$  : volume larutan mula-mula

$K_1$  : konsentrasi larutan mula-mula

$V_2$  : volume larutan setelah diencerkan

$K_2$  : konsentrasi larutan setelah diencerkan

**d. Pembuatan Larutan Atropin Sulfat  $2 \times 10^{-6}$  M**

Larutan stok atropin sulfat (BM: 676,8 g/mol) dibuat pada konsentrasi  $2 \times 10^{-6}$  M tanpa dilakukan pengenceran. Larutan konsentrasi  $2 \times 10^{-6}$  M didapatkan dengan mengambil larutan atropin sulfat sebanyak 54  $\mu\text{L}$  kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 10 mL. Setelah itu larutan

atropin sulfat dimasukkan ke dalam *chamber organ bath* 20 mL sebanyak 100  $\mu$ L dan 200  $\mu$ L sehingga didapatkan konsentrasi atropin dalam *chamber* sebesar 0,01  $\mu$ M dan 0,05  $\mu$ M.

**e. Preparasi Organ Trakea**

Dalam pengambilan organ trakea, *Cavia porcellus* dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan dibedah bagian leher dan abdomen, yang kemudian bagian trakea dipisahkan. Trakea kemudian diletakan ke dalam cawan fiksasi yang diisi dengan larutan *buffer krebs*, selanjutnya trakea dibersihkan dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel. Setelah bersih, trakea dipotong 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 hingga jarak otot polos dengan kedua ujung potongan lebih kurang sama. Kedua ujung tulang rawan otot polos diikat menggunakan benang, ujung bagian bawah diikat pada bagian tuas *organ bath* dan ujung bagian atas diikat pada bagian yang terhubung dengan transduser.

**f. Uji Aktivitas EPMS terhadap Agonis Reseptor AChM<sub>3</sub>**

Uji aktivitas EPMS yang terdapat dalam kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) terhadap agonis reseptor AChM<sub>3</sub> dilakukan untuk mengukur kontraksi otot polos *Cavia porcellus* menggunakan sampel trakea yang terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis.

Organ trakea direndam dalam *organ bath* yang berisi larutan *buffer* krebs sebanyak 20,0 mL dan dilakukan ekuilibrasi selama 30 menit atau sampai diperoleh kondisi stabil. Setelah itu, ke dalam *organ bath* diberikan agonis dan respon kontraksi akan terekam di kertas *polygraph* pada rekorder.

Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas EPMS terhadap otot polos trakea, terlebih dahulu melakukan pengukuran aktivitas obat pembanding yang telah diketahui aktivitas antagonismenya terhadap reseptor AChM<sub>3</sub>, yaitu atropin sulfat. Perlakuan yang diberikan kepada atropin sulfat sama dengan perlakuan yang akan diberikan kepada EPMS. Pertama dilakukan ekuilibrasi organ selama 30 menit dengan pencucian tiap 5 menit, kemudian diberikan larutan agonis. Konsentrasi agonis diberikan secara bertingkat dan bertahap hingga trakea mengalami kontraksi 100%. Setelah diberikan larutan agonis, trakea dicuci kembali dalam *organ bath* selama 30 menit dengan penggantian *buffer* tiap 5 menit. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas antagonisme atropin sulfat terhadap agonisnya, dengan cara pemberian larutan atropin sulfat dalam *organ bath* sebanyak masing-masing 100 µL dan 200 µL lalu ditunggu kurang lebih satu menit kemudian langsung diberikan larutan agonis dengan konsentrasi bertingkat. Setelah didapatkan data aktivitas antagonismenya maka organ dicuci kembali selama 30 menit dengan penggantian *buffer* krebs tiap lima menit.

Cara uji aktivitas EPMS terhadap agonis sama dengan langkah uji aktivitas antagonis atropin terhadap agonis. Setelah dilakukan pencucian

selama 30 menit maka diberikan kembali larutan agonis secara bertingkat, kemudian dicuci kembali selama 30 menit. Setelah itu baru dilakukan uji aktivitas antagonis EPMS terhadap agonisnya dengan cara yang sama seperti uji atropin. Pada uji ini dilakukan dua tahap pengukuran, yakni dalam tahap pertama (saat diberikan agonis tanpa sebelumnya diberi larutan antagonisnya yaitu EPMS). Trakea dicuci dalam *organ bath* selama 30 menit menggunakan larutan *buffer* krebs yang diganti setiap 5 menitnya. Kemudian untuk kontraksi kedua, setelah trakea dalam keadaan stabil yang dikarenakan telah dilakukan pencucian, ditambahkan larutan EPMS dengan masing-masing konsentrasi 100  $\mu$ M dan 200  $\mu$ M. Berikut merupakan konsentrasi agonis yang akan diberikan kepada organ target:

Volume larutan obat yang ditambahkan ke dalam organ bath (mL)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan (M)	Konsentrasi agonis dalam organ bath (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	$2 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$

**Tabel 2.** Cara pemberian agonis AChM<sub>3</sub>

### 3. Uji *In Silico*

#### a. Penyiapan Senyawa Marker

Senyawa marker dibuat menggunakan aplikasi *Marvin Sketch* pada sistem operasi *Windows*. Senyawa marker pada penelitian ini yaitu EPMS.

#### b. Penyiapan Protein Target

Pada penelitian ini protein yang akan digunakan yaitu reseptor AChM<sub>3</sub>. Protein ini dapat diunduh di *web* resmi *protein data bank*, yaitu [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Protein AChM<sub>3</sub> ini dapat dicari menggunakan kode 4DAJ, kemudian di *download* dalam format *.pdb*.

### c. Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan dalam penelitian kali ini yaitu senyawa *marker* dari EPMS. Ligan tersebut dapat diunduh melalui *major ligand data base* yaitu Pub Chem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan format 3D SDF. File yang telah diunduh dapat dibuka di aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan disimpan dengan format PDB (\*.pdb).

### d. Preparasi Ligan dan Protein Target

Langkah ini bertujuan untuk menyiapkan ligan dan protein target sebagai kebutuhan *docking* dengan format PDBQT. Pada tahap ini digunakan program *Autodock Tools*. Klik *Ligand*, kemudian input. Pada bagian open dipilih file yang sudah di *download* dengan format .pdb. Setelah itu di klik edit, *hydrogen, add polar only*, *NoBonderOrder* (for pdb file) di bagian *Methods* kemudian dipilih *yes* pada *Remember atoms to include hydrogens* lalu klik ok. Kemudian klik *Ligand, Torsion Tree, Chose Torsion Done*. Lalu klik kembali *Ligand, Torsion Tree, Set Number of Torsion* kemudian Klik *Dismiss*. Yang terakhir klik *Ligand, Output* lalu *Save as PDBQT*.

Untuk preparasi protein target dilakukan pada aplikasi yang sama, dengan cara pilih *file, read molecule*, kemudian dicari *file* format pdb yang isinya protein reseptor AChM<sub>3</sub> lalu klik edit. Dipilih opsi *hydrogens add* kemudian diklik *all hydrogens, no BondOrder* pada bagian *Method* dan dipilih *Yes* pada *Renumber atoms to include*, kemudian diklik opsi Ok.

Penambahan atom hidrogen dalam protein target berfungsi untuk memberikan muatan parsial (*partial charges*). Setelah itu diklik Edit, *Hydrogens*, Merge Nonpolar dan diklik bagian *Grid, Macromolecule*. Pada bagian *Choose* dipilih protein yang akan di *docking*. Kemudian akan diarahkan oleh program untuk menyimpan *file* tersebut dalam format PDBQT.

**e. Preparasi Grid**

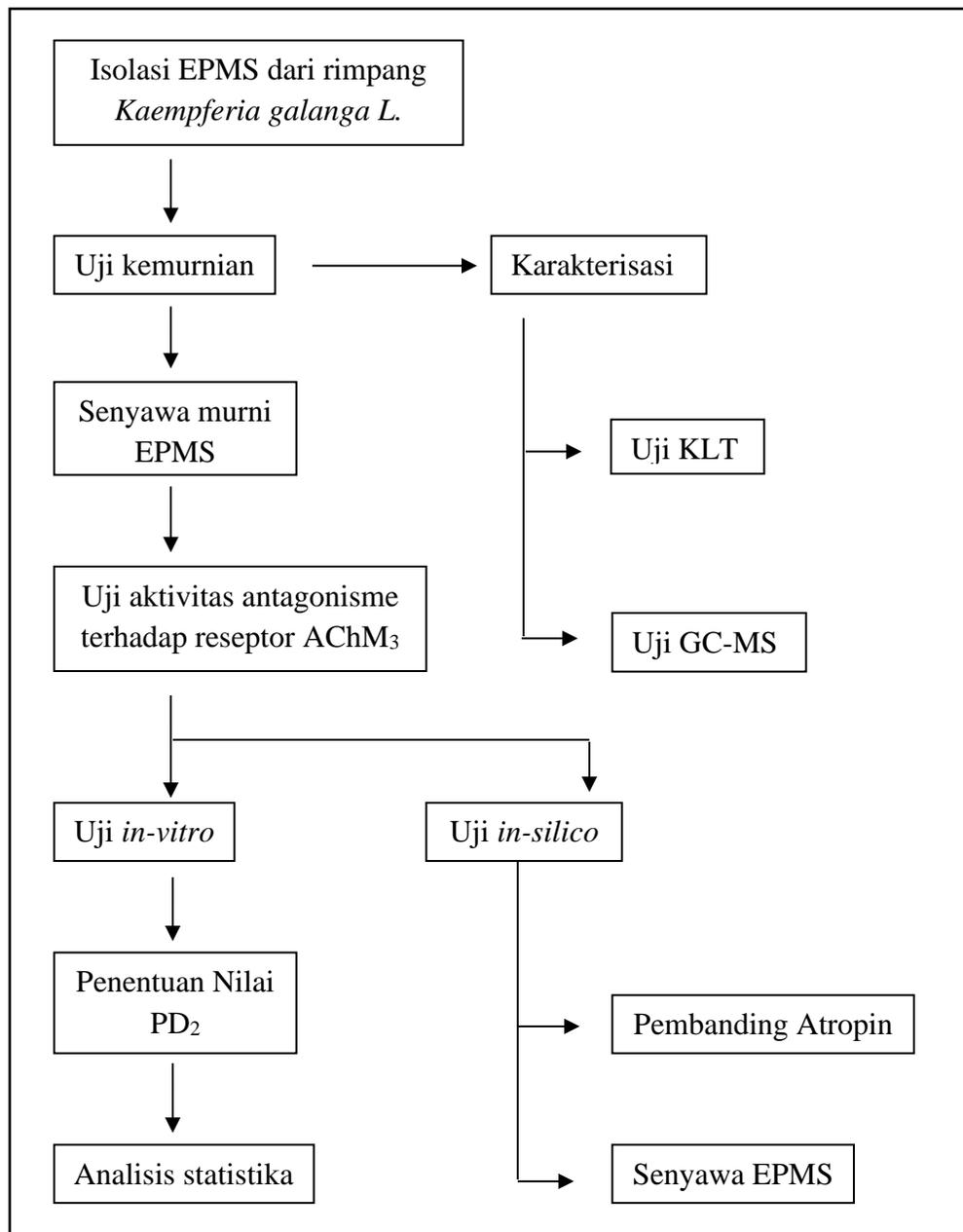
Tahap ini merupakan tahap yang menentukan parameter untuk *docking* yang meliputi posisi dan ukuran dari *grid box*. Tahapannya sebagai berikut: Diklik *Grid, Grid Box* kemudian dipilih *number of point* pada X, Y dan Z yang sesuai dengan ukuran sisi aktif protein, *Spacing* (angstrom) sebesar 1.000, kemudian diletakkan *Center Grid Box* baik untuk X, Y dan Z di posisi *Centre* pada sisi aktif makromolekul. Kemudian diklik *File, Close saving current*. Kemudian diklik *Grid, Output, Save GPF*. Kembali diklik *Grid, edit GPF*, Ok. kemudian diklik *Run* (pada *start program*), diketik *cmd.exe* lalu Ok.

**f. Proses Autodock**

Pada aplikasi *Autodock*, diklik *Docking, Macromolecule, Set Rigid File Name* kemudian dipilih *file Macromolecule*. Diklik kembali *Docking*, kemudian *Ligand, Choose*, dipilih *Ligand*. Kembali diklik *Docking, Search Parameters, Genetic Algorithm, Accept*. Kemudian diklik *Docking, Docking*

*Parameters, Accepts*. Selanjutnya diklik *Docking, Output, Lamarckian GA (42)* dan disimpan *file* dengan format DPF, diklik edit DPF kemudian Ok.

### G. Skema Langkah Kerja



**Gambar 4.** Skema langkah kerja

## H. Data dan Analisis Data

### 1. Uji *In Vitro*

#### a. Data

Pada uji *in vitro*, data yang diperoleh yaitu data kontraksi atau relaksasi otot polos trakea yang didapatkan melalui rekorder akibat pemberian agonis reseptor di *organ bath*. Data yang didapat diubah menjadi dalam bentuk persentase (%) respon terhadap respon maksimal yang dicapai oleh agonis. Kemudian data tersebut dibuat dalam bentuk kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis reseptor terhadap % respon (AChM<sub>3</sub>).

#### b. Analisis Data

Nilai EC<sub>50</sub> (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh senyawa EPMS yang dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. Nilai EC<sub>50</sub> dihitung berdasarkan persamaan 1 yang kemudian ditransformasi kedalam bentuk pD<sub>2</sub>, dimana pD<sub>2</sub> merupakan nilai dari -Log.EC<sub>50</sub> (persamaan 2). Kemudian data disajikan dalam tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh senyawa EPMS) dan nilai rata-rata pD<sub>2</sub> agonis ± Standard Error (pD<sub>2</sub> ± SE).

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

Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> dianalisis secara statistik menggunakan uji One Way ANOVA.

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%

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

Determinasi tipe antagonis ditunjukkan dengan analisis *Schild-plot* dalam bentuk regresi. Tipe antagonis tersebut ditentukan berdasarkan pada nilai *slope* yang dihasilkan oleh persamaan *Schild-plot*. Disebut sebagai antagonis kompetitif apabila nilai *slope* mendekati satu, dan disebut antagonis non kompetitif apabila nilai *slope* menjauhi angka satu. Harga  $pA_2$  (afinitas EPMS sebagai reseptor) merupakan nilai intersep yang terbentuk dari persamaan *Schild-plot*. (Janković *et al.*, 1999).

### c. Statistika

Senyawa EPMS sebagai antagonis AChM<sub>3</sub> apabila otot polos trakea *Cavia porcellus* yang terisolasi dengan senyawa EPMS yang terdapat pada rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) mengakibatkan penurunan nilai  $pD_2$  AChM<sub>3</sub>. Distribusi data  $pD_2$  AChM<sub>3</sub> dianalisis menggunakan uji normalitas (metode *Shapiro-Wilk*). Kemudian penurunan nilai  $pD_2$  dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu one-way ANOVA yang dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95% apabila data tidak terdistribusi normal.

## 2. Uji In Silico

Pada uji in silico data yang didapat yaitu nilai RMSD validasi dan skor *docking* atau *binding score*. Apabila *binding score* nya lebih rendah dari skor ikatan ligan pembanding (AChM<sub>3</sub>) maka EPMS berpotensi untuk dijadikan sebagai agen antagonis AChM<sub>3</sub>.