

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 Oktober 2018 - Mei 2019.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan organ trakea pada marmut (*Cavia porcellus*) jantan sebagai hewan uji dengan umur ≥ 3 bulan, kondisi fisik marmut yang sehat dan lincah menjadi dasar pertimbangan dalam pemilihan sebagai subjek penelitian.

D. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Konsentrasi Isolat Etil *p*-metoksi sinamat, konsentrasi histamin

2. Variabel Tergantung

Respon kontraksi organ trakea marmut

3. Variabel Kendali

Jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, kondisi fisik marmut, *organbath*

E. Alat Dan Bahan

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat Etil *p*-metoksi sinamat *Kaempferia galanga* Linn. Etil *p*-metoksi sinamat didapatkan melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi akan mengendap membentuk kristal yang selanjutnya dicuci menggunakan n-heksan, selanjutnya melewati uji diantaranya uji KLT, dan GC-MS.

Hewan percobaan yang digunakan adalah marmut jantan, berat badan antara 400 – 500 gram. Bahan kimia yang digunakan adalah *buffer krebs*, gas karbogen (Samator®), agonis reseptor histamin (Sigma Aldrich®), dan aquades (Bratacho®).

2. Alat

- a. Satu set alat untuk preparasi organ (scalpel, pinset, cawan petri, pipet tetes, jarum, benang, gunting bedah)
- b. Pengaduk magnet termostat tipe 141916
- c. Transduser, Rekorder, *Bridge amplifier*
- d. Dua set *organ bath* volume 20 ml
- e. Pipet mikro 100 µl, 1000 µl

F. Prosedur Kerja Dan Alur Penelitian

1. Pengambilan sampel

Sampel rimpang kencur dibeli di pasar Gamping, Bantul, Yogyakarta.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman kencur (*Kaempferia galanga* L) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan.

3. Pembuatan serbuk

Sebanyak 10 kg kencur dibersihkan, dikupas sampai kulit dasar terpisah, menyisakan daging putih. Setelah itu kencur dijemur selama 3-4 hari tanpa terkena sinar matahari langsung, hingga kencur berwarna coklat muda. Kemudian kencur dihaluskan menggunakan blender sampai halus.

4. Isolasi Etil p-metoksi sinamat dari kencur

Serbuk rimpang kencur sebanyak 400 g di maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang telah dimaserasi dengan waktu perendaman 6 hari sambil sesekali dilakukan pengadukan setiap harinya. Setelah 6 hari rendaman disaring maka didapatkan ampas dan filtrat. Seluruh filtrat hasil maserasi dipekatkan dengan *vacuum evaporator*. Kemudian filtrat pekat diendapkan pada suhu kamar sampai terbentuk kristal. Kristal yang terbentuk pada filtrat disaring kemudian dimurnikan dengan pencucian menggunakan n-heksan dan dilakukan rekristalisasi dengan cara melarutkan kristal dalam n-heksan dan ditambahkan beberapa tetes metanol kemudian dibiarkan pada suhu kamar sehingga terbentuk kristal kembali.

5. Penyiapan larutan *Buffer Krebs*

Larutan *buffer krebs* terdiri dari dua larutan, yaitu larutan A dan B.

Komposisi larutan *buffer krebs* adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Komposisi larutan *buffer krebs*

Formulasi A		Formulasi B	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	68,70 g/L	NaHCO ₃	21,00 g/L
KCl	4,20 g/L		
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,90 g/L		
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,70 g/L		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,00 g/L		

Formula B sebanyak 100 mL dilarutkan dalam aquades sebanyak 800 mL, kemudian Formula A sebanyak 100 mL ditambahkan ke dalam larutan Formula B. Glukosa 1 g/L ditambahkan ke dalam larutan *buffer krebs* pada saat akan digunakan.

6. Penyiapan larutan Etil *p*-metoksi sinamat *Kaempferia galanga* Linn. (EPMS)

Larutan EPMS dibuat dengan stok EPMS konsentrasi 2×10^{-2} M. Senyawa EPMS (menggunakan BM EPMS : 206.241 g/mol) ditimbang terlebih dahulu seberat 206 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya larutan EPMS 2×10^{-2} M diencerkan menggunakan larutan *buffer krebs* hingga diperoleh konsentrasi 2×10^{-3} M. Larutan 2×10^{-3} M ditambahkan sebanyak 100 μ L dan 200 μ L ke dalam organ *bath* yang telah berisi organ trakea dan larutan *buffer krebs* 20,0 mL untuk mencapai senyawa EPMS *Kaempferia galanga* Linn. konsentrasi 100 μ M dan 200 μ M.

7. Penyiapan seri konsentrasi histamin

Larutan histamin dibuat sebagai larutan stok histamin konsentrasi 2×10^{-1} M dalam aquades. Histamin memiliki bobot molekul 184,1 g/mol. Pengenceran larutan stok histamin dilakukan pengenceran bertingkat dari larutan stok histamin 2×10^{-1} M maka didapatkan larutan histamin konsentrasi 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} M.

8. Pembuatan larutan difenhidramin

Larutan stok difenhidramin 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 krebs*.

9. Uji aktivitas Etil *p*-metoksi sinamat *Kaempferia galanga* Linn. terhadap agonis reseptor H₁

Etil *p*-metoksi sinamat (EPMS) adalah salah satu senyawa hasil isolasi rimpang kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) yang digunakan sebagai bahan dasar senyawa tabir surya yaitu pelindung kulit dari sengatan sinar matahari (Caesaria, *et al.*, 2009). Histamin punya peranan penting dalam kontraksi otot polos saluran pernafasan. Reseptor histamin H₁ yang di aktivasi oleh histamin dapat menginduksi penyumbatan saluran pernafasan pada manusia yang sehat (Taylor-Clark, *et al.*, 2005).

Uji aktivitas senyawa etil *p*-metoksi sinamat terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi trakea marmut menggunakan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan 20 mL larutan *buffer krebs*, lalu organ direndam di dalam *organ bath* dan dilakukan ekuilibrase hingga didapatkan kondisi stabil dalam waktu 30 menit. Kemudian dilakukan pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi akan terekam pada rekorder (kertas *polygraph*).

Pemberian agonis dilakukan hingga tercapai 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* di tiap kelipatan lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian senyawa etil *p*-metoksi sinamat. Kemudian 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 etil *p*-metoksi sinamat yang terjadi kemudian dibandingkan. Pemberian seri konsentrasi bertingkat agonis histamin dapat dilihat pada (Tabel 2).

Tabel 2. Pemberian seri konsentrasi agonis histamin

Urutan pemberian	Waktu pemberian	Volume larutan obat yang ditambahkan dalam <i>organ bath</i> (ml)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan	Konsentrasi agonis dalam <i>organ bath</i> (faktor kumulatif $\frac{1}{2}$ log 10) (M)
1	1	0,100	2.10^{-8}	10^{-10}
2	2	0,200	2.10^{-8}	3.10^{-10}
3	1	0,070	2.10^{-7}	10^{-9}
4	2	0,200	2.10^{-7}	3.10^{-9}
5	1	0,070	2.10^{-6}	10^{-8}
6	2	0,200	2.10^{-6}	3.10^{-8}
7	1	0,070	2.10^{-5}	10^{-7}
8	2	0,200	2.10^{-5}	3.10^{-7}
9	1	0,070	2.10^{-4}	10^{-6}
10	2	0,200	2.10^{-4}	3.10^{-6}
11	1	0,070	2.10^{-3}	10^{-5}

10. Identifikasi EPMS dengan KLT

Identifikasi pada EPMS menggunakan metode KLT dengan fase diam silica gel 60F₂₅₄ dan fase gerak heksana : etil asetat dengan perbandingan 4:1. Identifikasi dengan KLT ukuran plat silica gel 60F 3x10 cm kemudian ditotolkan Kristal EPMS yang dilarutkan dengan etanol dan larutan standard sebagai pembanding menggunakan pipa kapiler kemudian dielusidasi di dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan sebelumnya oleh fase gerak. Proses elusidasi dihentikan ketika fase gerak telah mencapai jarak rambat, kemudian plat dikeluarkan dan dikeringkan. Setelah kering, diamati di bawah sinar tampak, sinar UV gelombang pendek 254 nm.

11. Identifikasi dengan GC-MS

GC (*Gas-Chromatography*) merupakan salah satu teknik kromatografi yang dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang *volatile* atau

mudah menguap (Darmapatni, *et al.*, 2016). Prinsip kerja dari GC adalah penyebaran cuplikan pada fase diam dan gas pada fase gerak mengalir di bawah tekanan melalui pipa yang dipanaskan dan disalut pada suatu penyangga padat. Analit kemudian dibawa ke bagian atas kolom melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Ketika analit berada dalam kolom terjadi proses pemisahan antar komponen (Sparkman, *et al.*, 2011).

Instrumen GC digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain yaitu MS (*Mass-Spectrometer*), instrumen MS digunakan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsipnya mengionkan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Terdapat 4 proses dalam spektrometri massa yaitu ionisasi, percepatan, pembelokkan dan pendeteksian (Darmapatni, *et al.*, 2016).

12. Preparasi Organ Trakea

Marmut jantan dengan bobot sekitar 400-500 gram dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan dilakukan pembedahan pada bagian leher dan abdomen, lalu bagian trakea dipisahkan. Trakea diletakkan ke dalam cawan fiksasi yang berisi larutan *buffer krebs* dan selanjutnya dibersihkan jaringan-jaringan lain yang masih menempel. Setelah bersih, trakea dipotong-potong dengan arah melintang berlawanan arah diantara ruas-ruas cincin tulang rawan dengan panjang 6-7 cincin (sesuai panjang *organ bath* ukuran 20 mL). Dipotong bagian yang berhadapan dengan otot polos, sehingga

jarak antara otot polos dengan kedua ujung potongan kurang lebih sama. Kedua ujung tulang rawan otot polos diikat dengan benang, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas organ bath dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser (Anas, 2011).

13. Docking menggunakan Autodock4

a. Persiapan ligan

Tahapan persiapan ligan adalah sebagai berikut:

Menggambar struktur 2D senyawa menggunakan program *ChemDraw 2D*. Lalu diubah menjadi bentuk 3D dengan *software ChemDraw 3D*, save ke dalam format *.mol. buka *software OpenBabelGUI*. (download <http://OpenBabel.sourceforge.net>). Ubah format *.mol ke dalam bentuk format *.pdb. dibuka program *Autodock Tools*. Klik *Ligand*, lalu input. Open, pilih file *.pdb (misal nama ligan A.pdb). klik *Edit* kemudian klik *Hydrogen* lalu klik *add*, klik *Polar Only* dan terakhir klik *noBonderOrder* (for pdb file) pada *Methods* dan pilih *yes* pada *Renumber atoms to include hydrogens*. Klik *Ligand* selanjutnya klik *Torsion Tree* lalu klik *Choose Torsion* dan klik *Done*. Klik *Ligand* lalu klik *Output* terakhir *Save as PDBQT*.

b. Persiapan makromolekul

Pada tahap persiapan makromolekul dilakukan menggunakan program *Autodock Tools*. Protein yang digunakan diperoleh dari hasil pemodelan pada tahap penelitian sebelumnya. Tahapannya adalah sebagai berikut:

Klik *File*, pilih *Read Molecule*, pilih file pdb struktur protein dari hasil pemodelan penelitian sebelumnya. Klik *Edit*, pilih *Hydrogens Add* lalu klik *All*

Hydrogens, *noBondOrder* pada *Method* dan *Yes* pada *Renumber atoms to include*, klik OK. Klik *Edit*, *Hydrogens*, *Merge Nonpolar*. Klik *Grid*, *Macromolecule*, dipilih protein yang akan di *docking*. Setelah itu program akan menginstruksikan untuk menyimpan *file* *pdbqt* struktur protein.

c. *Autogrid*

Tahap *autogrid* merupakan tahapan penentuan parameter yang digunakan untuk *docking* yang meliputi ukuran *grid box* dan posisi *grid box*. Tahapannya adalah sebagai berikut:

Klik *Grid*, pilih *Grid Box* lalu dipilih *number of point in X, Y dan Z* sesuai dengan ukuran sisi aktif protein, *Spacing* (angstrom) 1.000, dan diletakkan *Center Grid Box* untuk *x centre*, *y centre*, dan *z centre* pada sisi aktif makromolekul. Klik *File*, *Close Saving Current*. Klik *Grid*, pilih *Output*, *Save GPF*, klik *Grid*, *Edit GPF*, pilih OK. Klik *Run* (pada start program), ketik *cmd.exe*, OK.

Dituliskan pada layar *script* yang bertujuan untuk masuk ke folder yang berisi file bentuk GPF, ligan dan makromolekul dalam bentuk *pdbqt* dengan *script* : `cd (spasi)[namafile].gpf(spasi)1(spasi)[namafile].glg (spasi)&[enter]`

d. *Autodock*

Tahapan yang dilakukan pada proses *docking* adalah sebagai berikut:

Klik *Docking*, *Macromolecule*, pilih *Set Rigid File Name* dipilih file *macromolecule*. Klik *Docking*, pilih *Ligand*, *Choose*, dipilih ligan. Klik *Docking*, pilih *Docking Parameters*, kemudian *Accept*. Selanjutnya, klik

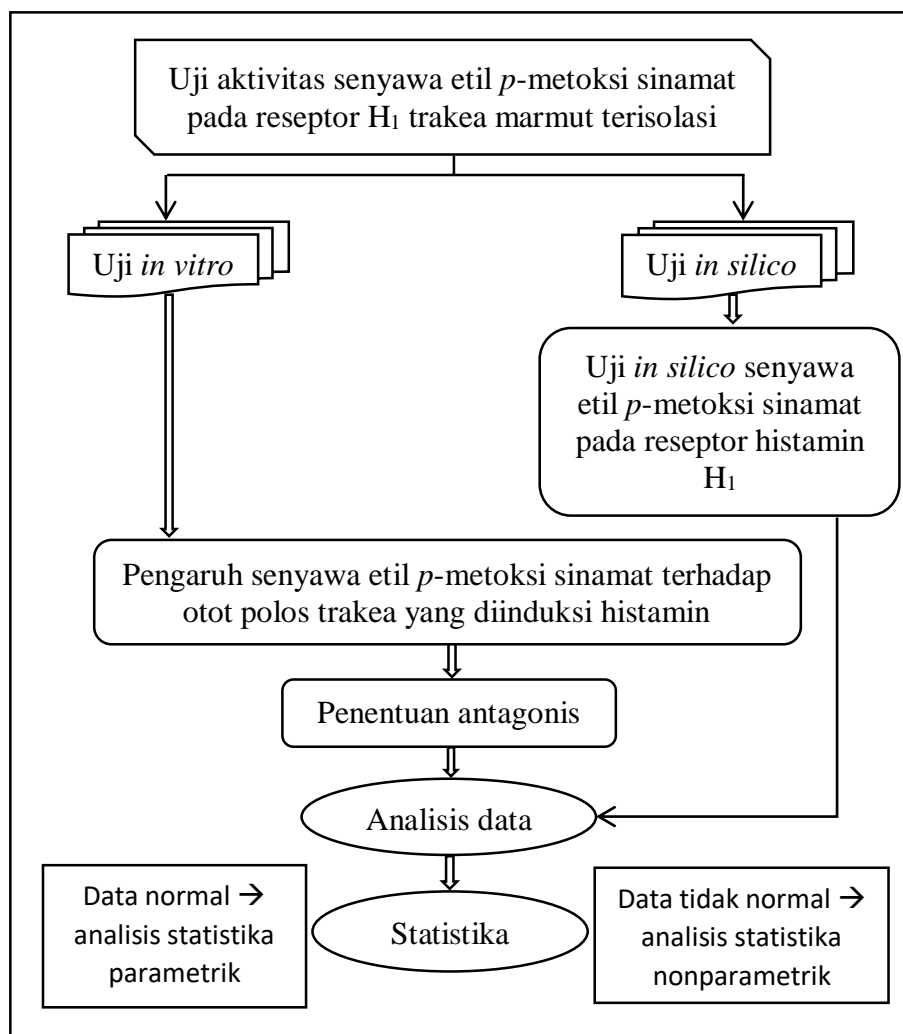
Docking, Output, pilih *Lamarckian GA (42)* kemudian *save file DPF*. Klik *Edit DPF*, pilih *OK*.

Tahap *running docking* dilakukan dengan menulis *script* sebagai berikut:

Autodock4(spasi)-p(spasi)[namafilename].dpf(spasi)l(spasi)[namafilename].dlg(spasi)

[*enter*]

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 5. Skema langkah kerja

H. Analisis Data

1. Data

Data kontraksi atau relaksasi otot polos trakea pada rekorder merupakan data yang diperoleh dalam penelitian *in vitro*. Data tersebut diubah ke data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Kemudian data % respon dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis terhadap % respon. Data yang diperoleh dalam penelitian *in silico* adalah nilai RMSD validasi dan skor *docking*.

2. Analisis data

Nilai EC₅₀ (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh senyawa etil *p*-metoksi sinamat dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC₅₀ dihitung menggunakan (persamaan 1) Nilai EC₅₀ selanjutnya diubah ke dalam bentuk pD₂, di mana pD₂ adalah nilai dari $-\text{Log. EC}_{50}$ (persamaan 2) kemudian data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh senyawa etil *p*-metoksi sinamat) dan nilai rata-rata pD₂ agonis \pm *Standard Error* (pD₂ \pm 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 pD₂ dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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%

$$pD2 = -\text{Log. EC50} \dots \dots \dots (2)$$

3. Statistika

a. Analisis senyawa etil *p*-metoksi sinamat sebagai antagonis reseptor H₁

Senyawa etil *p*-metoksi sinamat ditetapkan sebagai antagonis reseptor H₁ apabila inkubasi otot polos trakea marmut terisolasi dengan senyawa etil *p*-metoksisinamat mengakibatkan penurunan nilai pD₂ histamin. Semua data pD₂ histamin terdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$). Distribusi data pD₂ histamin dianalisis 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%.

b. Penetapan tipe antagonis senyawa etil *p*-metoksi sinamat terhadap reseptor histamin H₁

Penetapan tipe antagonis dilakukan dengan Analisis Schild-Plot dalam bentuk analisis regresi. Data rasio EC₅₀ agonis (histamin) karena pengaruh senyawa etil *p*-metoksi sinamat terhadap EC₅₀ tanpa pengaruh antagonis dikurangi dengan satu di plotkan sebagai sumbu Y dan logaritma konsentrasi antagonis di plotkan sebagai sumbu X pada kurva Schild-Plot, kemudian didapatkan 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

senyawa etil *p*-metoksi sinamat adalah sebagai antagonis non kompetitif. Harga pA_2 (afinitas senyawa etil *p*-metoksi sinamat sebagai antagonis reseptor) adalah nilai intersep dari persamaan Schild-Plot yang terbentuk (Jankovic, *et al.*, 1999).

