

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dan *In silico*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium FMIPA Universitas Gadjah Mada pada bulan Februari sampai Maret 2016.

C. Bahan Uji

Piper nigrum Linn. diperoleh dari Herbal Anugrah Alam.

D. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Konsentrasi piperin 1000 μM dan 5000 μM .

2. Variabel Kendali

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

3. Variabel Tergantung

Respon kontraksi otot polos ileum terisolasi didapatkan dari pembacaan rekorder pada *organ bath* uji *in vitro* yang diinterpretasikan ke dalam nilai pD₂.

E. ALAT DAN BAHAN

1. Bahan

- a. *Buffer Tyrode*
- b. Marmut jantan
- c. Gas karbogen mengandung 95% oksigen dan 5% karbon dioksida
- d. Agonis fisiologis (asetilkolin) dan larutan atropine
- e. Aquadest
- f. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. yang didapatkan dari hasil isolasi sokhletasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan (1:3) sehingga menghasilkan filtrat. Kemudian dievaporator hingga mengental dan menghasilkan kristal setelah didiamkan dalam suhu ruang yang terhindar dari cahaya matahari. Kristal yang terbentuk tersebut kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96%.

2. Alat

- a. Satu set alat untuk preparasi organ
- b. Vortex
- c. Pengaduk magnet thermostat tipe 1419 (B. Brawn, W. Germany),
- d. Transduser isonik (Level Transduser Tipe 368, HSE, W. Germany)
- e. Rekorder
- f. Dua set organ bath volume 20 mL
- g. Bridge amplifier tipe 336
- h. Pipet volume mikro 100 μ L, 100 μ L dan 500 μ L

F. PROSEDUR KERJA DAN ALUR PENELITIAN

1. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Menggunakan KLT

Sampel sebanyak 1 mg dilarutkan dengan etil asetat kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada plat silika. Fase gerak yang digunakan etil asetat : heksana (4:1) dan disemprot dengan pereaksi *dragendorf*. Kemudian diamati dengan sinar UV 254 nm.

2. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. Menggunakan FTIR

Sampel sebanyak 1 mg dicampurkan dengan KBr sebanyak 200 mg kemudian dimasukkan ke dalam wadah uji dan rekam spektra serapannya pada bilangan gelombang 500-4000 cm^{-1} . Hasil yang terbentuk berupa spektra serapan yang ada pada kristal piperin dari masing-masing gugus fungsional.

3. Identifikasi Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan Spektrofotometri UV

Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian diencerkan hingga konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya dimasukan ke dalam kuvet dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV dan diamati panjang gelombang maksimumnya.

4. Identifikasi Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan Uji Titik Lebur

Sampel secukupnya dimasukkan ke dalam pipa kapiler dan masukkan ke dalam alat *Melting Point Apparatus* hingga sampel tampak jelas yang sudah dilengkapi dengan *termometer*. Alat pengontrol kenaikan temperatur mula-mula menggunakan kecepatan 5°C/menit, ketika

mendekati titik lebur senyawa uji kecepatan diturunkan menjadi 2°C. 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. Komposisi larutan dapat dilihat dalam tabel 1 berikut. Bahan – bahan pada tabel larutan A dan B masing-masing ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam 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 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		

6. Penyiapan Larutan Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. (1000 µM dan 5000 µM)

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-1} M. Piperin (BM piperin 285,34 g/mol) ditimbang seksama seberat 285 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Kemudian larutan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. 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 Asetilkolin

Larutan asetilkolin dibuat dalam bentuk stok asetilkolin konsentrasi 2×10^{-1} M dalam akuades (BM Asetilkolin : 240,1 g/mol). Pengenceran larutan stok asetilkolin dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat dari larutan stok asetilkolin 2×10^{-1} M, sehingga diperoleh larutan asetilkolin konsentrasi 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} dan 2×10^{-8} M. Konsentrasi asetilkolin sebesar 10^{-8} M diperoleh dengan cara menginjektikan 100 μ L larutan stok asetilkolin 2×10^{-6} M ke dalam organ bath yang berisi larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

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

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

8. Pembuatan Larutan Atropin 10^{-6} (1 μ M)

Larutan stok atropin (BM : 289,3694) dibuat pada konsentrasi 2×10^{-2} M. Pengenceran bertingkat dilakukan hingga konsentrasi larutan atropin 2×10^{-6} M. Larutan dengan konsentrasi 10^{-6} M (1 μ M) didapatkan dengan mengambil larutan atropin 2×10^{-4} M sebanyak 100 μ L dan 500 μ L kemudian dimasukkan ke dalam organ bath yang berisi 20 mL larutan *buffer tyrode* dan mencapai konsentrasi atropin 1000 μ M dan 5000 μ M.

9. Preparasi Organ Ileum (Lee, *et.al.*, 1997)

Marmut jantan dianestesi menggunakan dietil eter sampai mencapai kondisi kesadaran tingkat III. Kemudian, marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (cervix) dan dilakukan

pembedahan. Ileum diambil pada bagian perut sepanjang 2 cm dan diletakkan di cawan fiksasi yang telah diisi dengan larutan *buffer tyrode*, kemudian dibersihkan dari isi usus dan jaringan-jaringan (lemak) yang masih menempel. Otot polos ileum kemudian diikat dengan benang, ujung bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organ bath* dan pada bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser.

10. Uji Aktivitas Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi ileum marmut dengan alat organ terisolasi setelah pengenalan agonis reseptor. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis. *Organ bath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer tyrode*, kemudian organ direndam dalam *organ bath* tersebut dan dilakukan ekuilibrisasi 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, antara pengukuran pertama dan kedua dilakukan pencucian organ selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap 10 menit. Kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian alkaloid lada konsentrasi 1000 μM dan 5000 μM .

Agonis dimasukkan ke dalam *organ bath* dengan konsentrasi bertingkat (Tabel 2) dan respon kontraksi yang terjadi akan tercatat pada rekorder.

Tabel 2. Cara Pemberian Dosis Agonis Asetilkolin

Volume larutan obat yang ditambahkan dalam <i>organbath</i> (ml)	Konsentrasi larutan agonis yang ditambahkan	Konsentrasi agonis dalam <i>organ bath</i> (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	$2 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$

11. 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 asetilkolin. Uji reversibilitas terhadap ileum dilakukan setelah kontraksi dan pencucian organ akibat pemberian agonis dan lada. Ileum dicuci selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap 10 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.

12. Uji Pelarut DMSO (Dimetil Sulfoksida)

Uji pengaruh DMSO dilakukan untuk menjamin bahwa aktivitas kontraksi otot polos ileum hanya disebabkan oleh alkaloid lada *Piper nigrum* Linn saja. DMSO digunakan sebagai pelarut dari alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. Jumlah DMSO yang diberikan adalah sebanyak 100 μ L disesuaikan dengan volume maksimal pemberian alkaloid lada ke dalam *organ bath*. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi agonis. Kurva hubungan konsentrasi agonis terhadap % respon sebelum dan sesudah perlakuan DMSO kemudian dibandingkan.

13. 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 yang akan diuji, *AutoDockTools 4.2* untuk melakukan penambatan molekul, *Molegro Molecular Viewer* untuk preparasi protein dan visualisasi hasil penambatan (*docking*) dalam bentuk virtual 2D dan *DS Visualizer* untuk preparasi protein dan visualisasi hasil penambatan (*docking*) dalam bentuk virtual 3D.

b. Penyiapan Senyawa Marker

Senyawa *marker* tumbuhan obat dikoleksi dari Farmakope Herbal Indonesia. Senyawa *marker* dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggunakan aplikasi *ChemDraw* 2010 pada sistem operasi *Windows*.

c. 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 asetilkolin muskarinik dengan kode *4DAJ*.

d. Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa-senyawa *marker* dari alkaloid yang akan diteliti sebagai agen spasmolitik. 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*).

e. 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 *AutoDock Tools* 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 *AutoDock Tools*. Ligan yang telah masuk kedalam protein target kemudian dilakukan preparasi dalam hal *Torsion Freedan Aromatic Carbons* dan disimpan dalam format *.pdbqt.

f. 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).

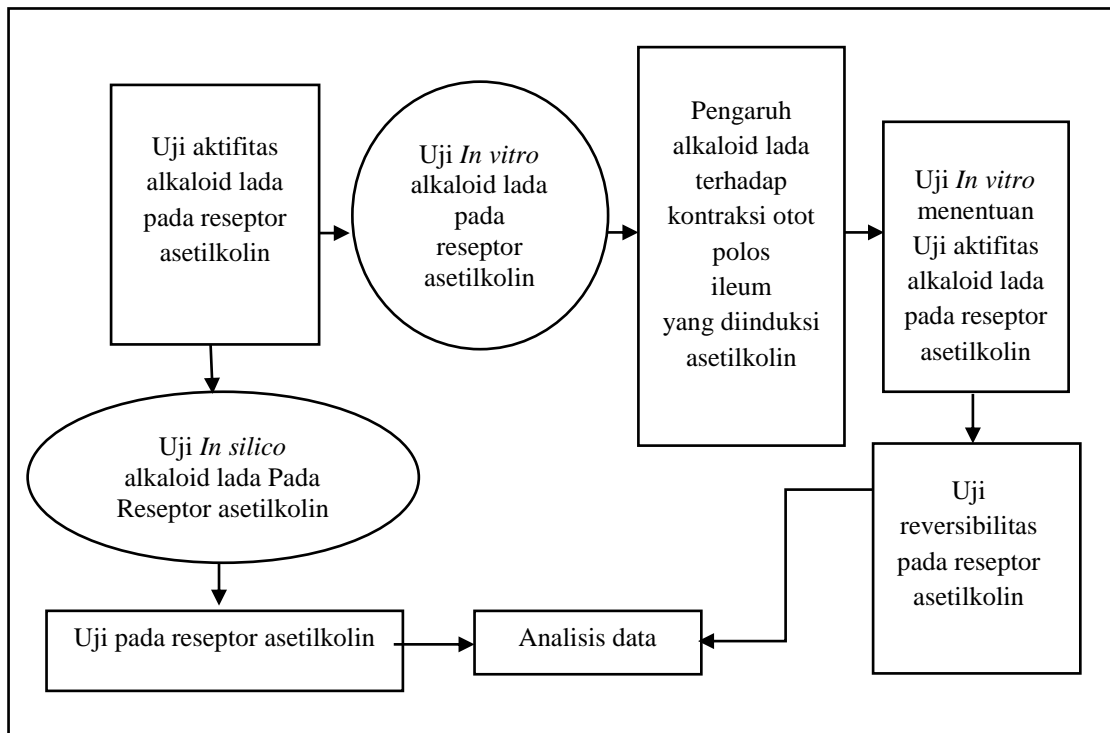
g. Preparasi Docking Parameter File

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).

h. 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.

G. SKEMA LANGKAH KERJA



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. DATA DAN ANALISA DATA

1. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan KLT

Hasil KLT yang diperoleh dilihat dibawah sinar UV 254 dan disemprot dengan pereaksi *dragendorff*. Hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat bercak berwarna bercak coklat muda sampai kuning.

2. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan FTIR

Hasil yang diperoleh adalah berupa spektra serapan. Spektra serapan yang diperoleh kemudian dianalisis dengan melihat pada data daerah gugus fungsi piperin dengan standar serapan IR pada penelitian (Shingate, *et al.*, 2013).

3. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan Spektrofotometri UV

Hasil yang diperoleh adalah berupa spektra panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang yang diperoleh dibandingkan dengan spektra panjang gelombang maksimum pada penelitian (Vishnath G, *et al.*, 2011) yaitu 342,5.

4. Identifikasi Kristal Alkaloid Lada *Piper nigrum* Linn. dengan 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 $1-2^{\circ}$ (Hart H, *et al.*, 2012) sedangkan pada penelitian ini didapatkan rentang titik lebur yang kurang murni dengan temperatur 122-132⁰C.

5. Uji *In Vitro*

a. Data

Data yang diperoleh dalam 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. 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 *Piper nigrum* Linn. dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan persamaan 1. Nilai EC_{50} 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 Piperin) dan nilai rata-rata pD2 agonis \pm *Standard Error* (pD2 \pm SE).

Pergeseran nilai pD2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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

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 *Piper nigrum* Linn. ditetapkan sebagai antagonis reseptor ACh apabila inkubasi otot polos ilium marmut terisolasi dengan alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. mengakibatkan penurunan nilai pD2 asetilkolin. Distribusi data pD2 asetilkolin 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 piperin terhadap reseptor adalah sebagai antagonis kompetitif. Sedangkan jika nilai *slope* menjauhi angka satu, maka tipe antagonis piperin adalah sebagai antagonis non-kompetitif. Harga pA_2 (afinitas piperin sebagai antagonis reseptor) merupakan nilai intersep dari persamaan *Schild-Plot* yang terbentuk (Janković *et al.*, 1999).

6. Uji *In silico*

Data yang diperoleh dari uji dengan *Molecular Docking* senyawa alkaloid lada *Piper nigrum* Linn. dan senyawa pembanding (ligan asli, asetilkolin, atropin) adalah skor ikatan (*Binding Score*). Jika skor ikatan lebih rendah dibandingkan dengan skor ikatan ligan pembanding maka piperin berpotensi sebagai agen antagonis asetilkolin.