

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2018.

C. Populasi dan Sampel

1. Kelompok Uji Agonis

- a. Kelompok uji seri kadar histamin dimulai dari konsentrasi 2×10^{-2} M hingga 2×10^{-8} M.

2. Kelompok Uji Antagonis Histamin

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

3. Kelompok Uji Pembanding (Kontrol Positif)

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

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Konsentrasi histamin, konsentrasi difenhidramin, dan konsentrasi EPMS.

2. Variabel Kendali

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

3. Variabel Tergantung

Respon kontraksi otot polos ileum.

E. Instrument Penelitian

1. Alat Penelitian

Seperangkat alat gelas kaca, satu set alat untuk preparasi organ, pengaduk magnet thermostat (Cimarec®), dua *set organ bath* volume 20mL (Ugo Basile®), bridge amplifier tipe 336, mikropipet (Socorex®), labu takar (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®), beker glass (Pyrex®), , neraca analitik (Mettler Toledo®), pengaduk, corong, cawan porselin, penggaris, pipa kapiler, pipet ukur, pipet tetes, kertas saring (Whatman 40), aluminium foil, *rotary evaporator* (IKA®RV10), plat silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck®), blender, komputer yang terinstal *software molecular docking Autodock* dan *LabScribe2*.

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang *Kaempferia galangal* L. yang dibeli di Gamping, Bantul, Yogyakarta, etanol 96%, etil asetat, toluene, n-heksana, aquadest.

F. Cara Kerja

1. Pengambilan Sample

Sampel kencur dibeli di Gamping, Bantul, Yogyakarta.

2. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan kencur (*Kaempferia galanga* L) dilakukan di Laboratorium Biologi UAD.

3. Isolasi Etil P-Metoksi Sinamat Dari Kencur

Serbuk rimpang kencur sebanyak 500 g dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan pengadukan setiap hari selama 7. Setelah 7 hari perendaman dilakukan penyaringan untuk memisahkan ampas dan fitrat menggunakan kertas saring. Seluruh filtrat hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰ C. Kemudian filtrat pekat diendapkan pada suhu kamar sampai terbentuk kristal. Kristal yang terbentuk pada filtrat disaring kemudian dimurnikan dengan pencucian menggunakan n-heksana dan dilakukan rekristalisasi dengan cara melarutkan kristal dalam n-heksana kemudian dibiarkan pada suhu ruang sehingga terbentuk kristal kembali.

4. Penyiapan Larutan *Buffer Tyrode*

Larutan *buffer tyrode* terdiri atas 2 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 larutan *buffer tyrode*

Komposisi Larutan A		Komposisi Larutan B	
Bahan	JumLah	Bahan	JumLah
NaCl	80,0 g	NaHCO ₃	10,0 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		

Pembuatan larutan *buffer tyrode* adalah dengan mencampur 100 mL larutan A, 100 mL larutan B, 1,00 gram glukosa, kemudian ditambahkan 800 mL akuades (Anonim, 1986).

5. Penyiapan Larutan EPMS (100 μ M dan 200 μ M)

Larutan EPMS dibuat dengan stok EPMS konsentrasi 2×10^{-1} M. Senyawa EPMS (menggunakan BM EPMS : 206.241 g/mol) ditimbang seberat 206 mg dan dilarutkan ke dalam 5,0 mL DMSO. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan EPMS 2×10^{-1} M menjadi 2×10^{-2} M, untuk mendapatkan konsentrasi 100 dan 200 μ M diambil larutan EPMS sebanyak 100 dan 200 μ L ke dalam organ *bath* yang telah berisi organ ileum dan larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

6. 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 2×10^{-1} M, sehingga diperoleh konsentrasi larutan histamin 2×10^{-2} , 2×10^{-3} , 2×10^{-4} , 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , dan 2×10^{-8} M. Konsentrasi histamin sebesar 10^{-10} M diperoleh dengan cara menginjeksikan 100 μ L larutan stok histamin 2×10^{-8} M ke dalam organ *bath* yang berisi larutan *buffer tyrode* 20,0 mL.

7. 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 tyrode*.

8. Uji Aktivitas EPMS Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas EPMS 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* sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya dilakukan pemberian agonis ke dalam organ *bath* dan respon kontraksi 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 tyrode* setiap 5 menit. Pada pengukuran kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil kemudian dilakukan pemberian senyawa EPMS dengan konsentrasi 2×10^{-2} M sebanyak 100 μ L dan 200 μ L. Selanjutnya, diberikan agonis ke dalam organ *bath* seperti pada pengukuran pertama. Pengukuran kontraksi dilakukan secara bertingkat dengan pemberian seri konsentrasi agonis yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Cara pemberian dosis agonis histamin

Volume agonis ditambahkan dalam organ bath (ml)	larutan yang ditambahkan dalam organ bath (ml)	Konsentrasi agonis ditambahkan (M)	larutan yang ditambahkan (M)	Konsentrasi agonis dalam organ bath (faktor kumulatif $\frac{1}{2}$ log 10) (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}

9. Identifikasi EPMS dengan KLT

Identifikasi pada EPMS menggunakan KLT dengan fase diam silica gel 60F₂₅₄ dan fase gerak heksana : etil asetat dengan perbandingan 4:1 (Suzana, dkk., 2011 dan Nurul, 2008). Identifikasi dengan KLT dengan 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 di udara. Setelah kering, bercak pada plat dapat diamati dibawah sinar tampak, sinar UV gelombang pendek 254 nm dan sinar UV gelombang panjang 366 nm (Farmakope Herbal, 2009).

10. Preparasi Organ Ileum

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

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 *diinstall* adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit. Setelah instalasi Linux, dilakukan instalasi pendukung seperti *Marvin Sketch* untuk preparasi ligan 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 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 atau reseptor yang digunakan dalam penelitian ini adalah reseptor histamin H₁ dengan kode protein adalah 3RZE. Setelah protein diunduh lalu dilakukan preparasi protein target dalam format PDBQT.

c) Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa etil p-metoksi sinamat dari kencur (*Kaempferia galangal L*). Struktur

ligan didesain melalui aplikasi *ChemDraw* dan dipilih dalam bentuk 3D SDF. File ligan tersebut dibuka melalui aplikasi *Discovery Studio Visualizer* dan disimpan dalam format PDB (*.pdb). 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.

d) Preparasi *Grid Parameter File*

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi *AutoDockTools* yang masih terbuka kemudiann 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).

e) Preparasi *docking* parameter file

Proses ini diawali dengan memilih protein target ligan melalui pilihan *docking* pada aplikasi *AutoDockTools*. 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).

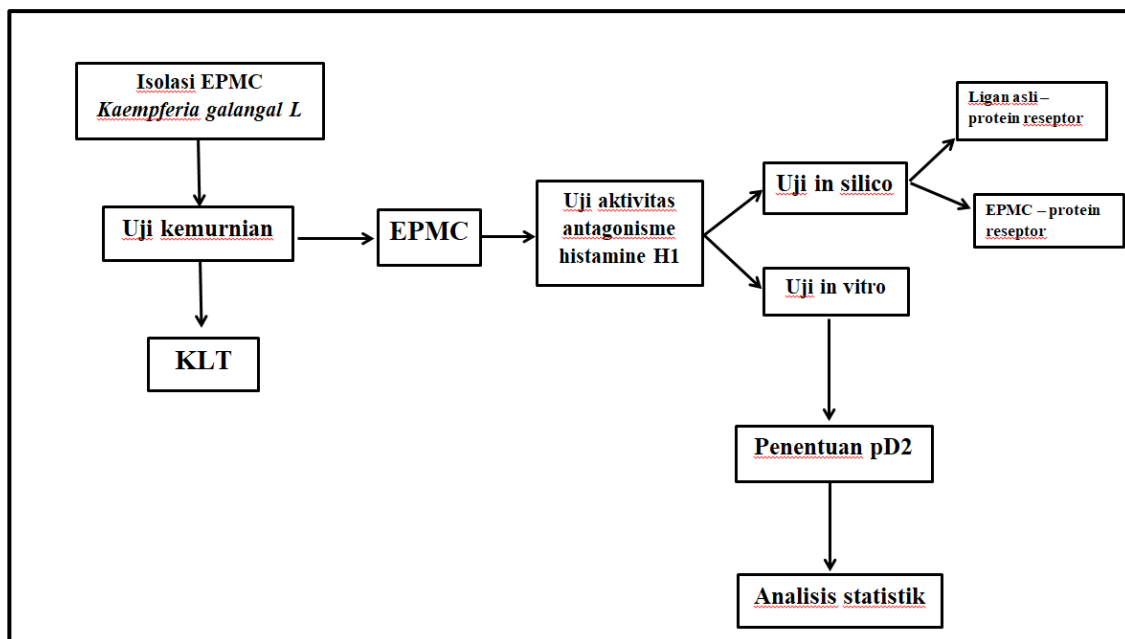
f) Simulasi docking

Proses docking dilakukan dengan menggunakan *AutoGrid 4.2* dan *AutoDock 4.2* melalui *Cygwin Terminal*. File hasil preparasi sebelumnya yang meliputi *Target.pdbqt*, *Ligan.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 hasil visualisasi hasil.

g) Validasi *molecular docking*

Validasi *molecular docking* bertujuan untuk menentukan apakah protein yang digunakan untuk *molecular docking* nya dapat digunakan atau tidak. Validasi *molecular docking* ini dilakukan dengan cara menentukan nilai *Root Mean Square Distance* (RMSD). Nilai RMSD yang dikatakan valid adalah $<2.00 \text{ \AA}$.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja

H. Data dan Analisa Data

1. Data

Data yang diperoleh dari penelitian *in vitro* berupa respon data kontraksi ileum pada rekorder. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh antagonis. Selanjutnya, data % dibuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi antagonis terhadap % respon.

2. Analisis Data

Nilai EC_{50} agonis reseptor dengan atau tanpa pengaruh EPMS dihitung berdasarkan persamaan 2. Nilai EC_{50} selanjutnya ditransformasikan ke dalam bentuk pD_2 , dimana pD_2 adalah nilai dari $-\text{Log } EC_{50}$ (persamaan 3). Selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis dengan atau tanpa pengaruh EPMS

dan nilai rata-rata $pD2 \pm \text{Standard Error (SE)}$. Pergeseran nilai $pD2$ dianalisis secara statistik menggunakan *oneway ANOVA*.

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

Keterangan :

X_1 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat dibawah 50%

X_2 = Log. Konsentrasi dengan respon tepat diatas 50%

Y_1 = % respon tepat dibawah 50%

Y_2 = % respon tepat diatas 50%

$$pD2 = -\text{Log} EC_{50} \dots \dots \dots (3)$$

3. Statistika

Senyawa EPMS ditetapkan sebagai antagonis reseptor histamin H_1 apabila inkubasi organ ileum marmut terisolasi dengan EPMS mengakibatkan penurunan nilai $pD2$ agonis histamin. Distribusi data $pD2$ dianalisis menggunakan uji normalitas (*Kolmogrov-Smirnov*). Penurunan nilai $pD2$ selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95%.