

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Penelitian Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari sampai bulan Februari 2016.

C. Populasi dan Sampel

Subjek penelitian ini berupa tikus putih jantan galur Wistar umur 2-3 minggu disiapkan sebanyak 25 ekor dengan berat badan 100-150 gram. Dibagi menjadi lima kelompok masing-masing 5 ekor. Kelompok I sebagai kontrol negatif diberikan air suling 2 mL/100 g BB tikus. Kelompok II sebagai kontrol positif diberikan Na diklofenak dosis 13,5 mg/Kg BB. Kelompok III diberikan isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB. Kelompok IV diberikan isolat alkaloid lada dosis 10 mg/Kg BB. Kelompok V diberikan isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB, pemberian sediaan terhadap kelima kelompok tersebut diberikan secara oral.

D. Variabel Penelitian

- Variabel Bebas : Dosis isolat alkaloid yang diberikan pada tikus yang mengalami edema dengan induksi karagenin, senyawa aktif pada *Piper nigrum* L, dan reseptor COX-2
- Variabel Tergantung : Penghambatan volume edema yang dinyatakan dalam % daya antiinflamasi dan skor *docking*.
- Variabel Kendali : Galur tikus, umur tikus, berat badan tikus, jenis kelamin tikus, pakan, dan kondisi fisik tikus dan perangkat system *molecular docking*.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

a. Alat yang digunakan untuk uji *in silico*:

Seperangkat *Personal Computer* (PC/Laptop) SAMSUNG RV409 yang dilengkapi dengan perangkat lunak seperti sistem operasi dan aplikasi pendukung. Sistem operasi yang digunakan adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit dan Windows 8 Pro 64-bit, dan aplikasi pendukung yang digunakan adalah *Microsoft Office* 2013, *AutoDockTools* 4.2, *AutoDock Vina*, *DS Visualizer*, *Python*, *Open Babel* dan *MarvinSketch*.

b. Alat yang digunakan untuk uji *in vivo*:

Soxhlet, *rotary evaporator*, *Plestimometer UGO BASILE*, pipa kapiler, alat timbang hewan uji, *stopwatch*, alat-alat gelas, spuit injeksi ukuran 1 ml, spuit injeksi per oral ukuran 5 ml, dan komputer dengan

dilengkapi piranti lunak *Microsoft Excel* dan *SPSS for Windows* versi 16.00.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk uji *in silico* pada penelitian ini adalah protein 3PGH dalam bentuk berkas (*file*) dengan kode protein FLP yang diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org), senyawa *marker* lada (*Piper nigrum*), dan senyawa dari natrium diklofenak dalam bentuk berkas (*file*) untuk pembandingan.

Bahan yang digunakan untuk uji *in vivo* pada penelitian ini:

a. Bahan utama

Bahan untuk pembuatan ekstrak adalah serbuk lada yang berasal dari Herbal Anugrah Alam, Mayungan RT 04, Potorono, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta.

b. Bahan pembuatan ekstrak, isolasi dan identifikasi piperin

Pelarut etilasetat, etanol 96%, CMC 0,5%, silika gel 60 F₂₅₄, etilasetat : n-heksan (1:4), dan pereaksi *Dragendorf*.

c. Bahan uji antiinflamasi

Karagenin 1%, Natrium diklofenak, NaCl fisiologis dan aquades.

d. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar umur 2-3 minggu disiapkan sebanyak 25 ekor dengan berat badan 100-150 gram.

F. Cara Kerja

1. Uji *In Vivo*

a. Pengumpulan Simplisia dan Pembuatan Serbuk

Serbuk Lada Putih diperoleh dari distributor simplisia yaitu Herbal Anugrah Alam, yang berada di Mayungan RT 04, Potorono, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta

b. Pembuatan Ekstrak

1) Metode Sokletasi

Serbuk simplisia lada sebanyak 100 mg dibungkus dengan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi pada *Soxhlet*. Pelarut etilasetat sebanyak 300 ml dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Kemudian *soxhlet* diletakkan di atas pemanas dan dibagian atas dihubungkan dengan pendingin (kondensor) yang dialiri air. Proses ekstraksi dilakukan hingga pelarut yang merendam ekstrak terlihat bening selama ± 5 jam. Filtrat yang tertampung pada labu alas bulat kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm.

c. Isolasi Kristal Piperin

Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan terlindung dari sinar matahari selama 2 hari. Kristal yang terbentuk, kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh kristal berwarna kuning.

d. Identifikasi Piperin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah etilasetat : n-heksan (1:4) serta pembanding *quinine*. Identifikasi dengan KLT dilakukan dengan cara menotolkan pembanding dan kristal yang telah dilarutkan dengan etilasetat pada plat dengan bantuan pipa kapiler kemudian dielusi dengan fase gerak di dalam bejana tertutup rapat yang telah dijenuhkan dengan fase gerak tersebut. Elusi dihentikan pada saat fase gerak mencapai batas yang telah ditentukan yaitu 1 cm sebelum ujung akhir plat kemudian plat dikeluarkan dari bejana. Pengamatan bercak dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan pereaksi *Dragendorf*.

e. Uji Antiinflamasi

1) Pembuatan pereaksi dan sediaan uji

a) Pembuatan larutan karagenin 1%

Suspensi karagenin dibuat dengan kadar 1% dalam larutan NaCl fisiologis. Karagenin ditimbang seksama sebanyak 0,1 gram kemudian dilarutkan ke dalam NaCl fisiologis sampai volume 10 ml hingga diperoleh suspensi karagenin dengan kadar 1%. Volume suspensi karagenin yang disuntikkan pada telapak kaki belakang tikus sebanyak 0,1 mL.

b) Pembuatan larutan Na diklofenak

Dosis yang diberikan berdasarkan dosis harian orang dewasa 100-200 mg per hari, jika dikonversikan pada pemberian tikus adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} 150 \text{ mg} \times 0,018 &= 2,7 \text{ mg} / 200 \text{ gram kg BB} \\ &= 13,5 \text{ mg/kg BB} \end{aligned}$$

Sediaan uji Natrium diklofenak diberikan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%. Sejumlah 60 mg Na diklofenak dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 10 mL dengan bantuan pengadukan dan vortex hingga didapatkan larutan yang homogen, sehingga didapatkan larutan 6 mg/mL.

f. Uji utama daya antiinflamasi

Metode yang dipakai adalah metode udemata terinduksi pada telapak kaki tikus (*rat hind paw*). Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar, umur 2-3 minggu, berat badan 100-150 g sebanyak 25 ekor dibagi menjadi lima kelompok masing-masing 5 ekor, yakni sebagai berikut :

- 1) Kelompok I (kontrol negatif) diberikan air suling 2 mL/100 g BB tikus secara oral.
- 2) Kelompok II (pembanding) diberikan Na diklofenak dosis 13,5 mg/Kg BB secara oral.
- 3) Kelompok III diberikan isolat alkaloid lada dosis 5 mg/Kg BB secara oral.

4) Kelompok IV diberikan isolat alkaloid lada dosis 10 mg/Kg BB secara oral.

5) Kelompok V diberikan isolat alkaloid lada dosis 15 mg/Kg BB secara oral.

Karagenin diberikan pada waktu optimal yang dapat menimbulkan efek antiinflamasi. Larutan karagenin 1% diberikan secara subplantar untuk tiap-tiap tikus. Pengukuran volume edema kaki segera dilakukan dengan mencelupkan kaki (sampai tanda) ke dalam *plestimometer*, dan dicatat sebagai menit ke-0. Kemudian pengukuran dilakukan setiap 30 menit selama enam jam. Pemberian bahan uji menggunakan rute oral karena rute yang dipilih disesuaikan dengan rute yang digunakan pada manusia.

2. Uji *In Silico*

a. Pengunduhan Aplikasi *Autodock Vina* dan Aplikasi Pendukung

Aplikasi *Autodock Vina* merupakan aplikasi *molecular docking* yang bersifat *multiplatform* yang bisa didapatkan secara gratis. Untuk melakukan kegiatan *molecular docking* dengan *Autodock Vina*, diperlukan beberapa aplikasi seperti *DS Visualizer* untuk preparasi reseptor target dan ligan yang akan diuji, dapat juga digunakan untuk visualisasi hasil *molecular docking*, *AutodockTools* untuk mengolah reseptor target dan ligan uji agar dapat dieksekusi oleh aplikasi *Autodock Vina* serta untuk menyiapkan parameter-parameter docking, *Python* untuk menjalankan aplikasi-aplikasi yang pada umumnya dibuat

dengan menggunakan bahasa pemrograman *Python*, *YASARA* untuk preparasi reseptor target dan ligan uji, namun pada kegiatan ini digunakan untuk mengukur nilai RMSD, dan *Open Babel* yang digunakan untuk mengkonversi hasil docking dari format PDBQT menjadi PDB sehingga dapat divisualisasi dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*.

b. Pengunduhan Reseptor Target

Reseptor uji yang dibutuhkan untuk melakukan *molecular docking* yang dapat diunduh secara gratis pada *website* khusus yang menampung basis data protein-protein www.rcsb.org. Dengan mengunjunginya dari aplikasi *browser* dan menetik kode reseptor atau nama reseptor yang diinginkan pada tombol *Search*. Kemudian mengunduh reseptor tersebut dengan *PDB Format* untuk mendapatkan reseptor uji dengan format PDB. Senyawa uji dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggunakan aplikasi *MarvinSketch* pada sistem operasi *Linux*.

c. Preparasi Reseptor Target dan Ligand Uji

Setelah mendapatkan reseptor target dengan format PDB, dapat dilakukan preparasi protein dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dan menghapus semua ligan yang ada pada reseptor tersebut, pastikan juga bebas dari molekul air, hemoglobin dan sebagainya. Kemudian menyimpan reseptor yang sudah dipreparasi dengan format PDB. Untuk preparasi ligan asli sebagai ligan uji, buka kembali *file*

reseptor dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*, kemudian menghapus residu protein dan menyisakan bagian ligan serta disimpan dengan nama *ligand.pdb*.

d. Konversi File Reseptor dan Ligand dalam Bentuk PDBQT

Untuk menjalankan fungsi aplikasi *Autodock Vina*, file reseptor target dan ligan uji harus dikonversi terlebih dahulu dengan menggunakan aplikasi *MGLTools* atau nama lainnya yaitu *Autodock Tools*, kemudian pilih file reseptor yang sudah dipreparasi. Setelah itu tambahkan atom Hydrogen pada reseptor uji, kemudian simpan reseptor uji dalam bentuk PDBQT. Kemudian atur grid (bagian residu yang mana saja yang ingin dijadikan sasaran ligan untuk berinteraksi). Setelah itu konversi file ligan ke dalam bentuk PDBQT, dan disimpan dengan format *ligand.pdbqt*.

e. *Molecular Docking* dengan Autodock Vina

Sebelum menjalankan fungsi *docking*, pastikan file reseptor.pdbqt dan ligand.pdbqt berada pada folder yang sama, yaitu pada Drive C: >Vina. Kemudian buat file *text* baru dan diberi nama conf.txt. Pada file conf.txt tersebut, mengisi form yang sesuai dan disimpan pada folder yang sama. Selanjutnya membuka *Command Prompt Windows* dan masukan kode kemudian tunggu sampai prosesnya selesai. Setelah selesai, untuk memudahkan visualisasi, *file output.pdbqt* dibuat terpisah pada masing-masing konformasinya dengan mengetik kode pada gambar di Command Prompt > Enter. Pada folder vina akan muncul

beberapa *file* konformasi hasil *docking*, sehingga lebih mudah untuk dianalisis dan divisualisasi.

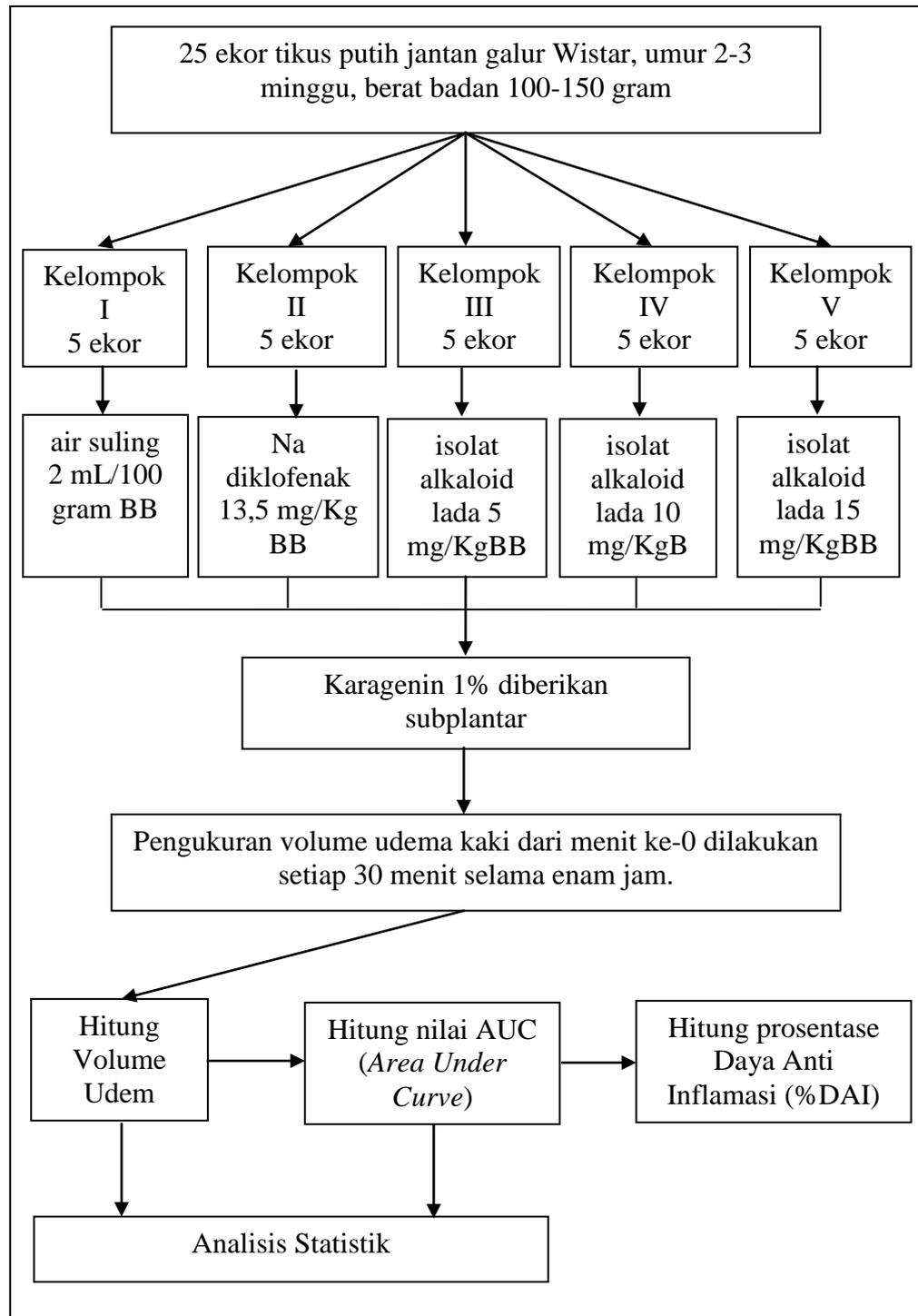
f. Visualisasi Hasil *Docking*

Hasil dari *molecular docking* dapat divisualisasikan untuk analisis lebih lanjut dengan menggunakan aplikasi *DS Visualizer*. Sebelum visualisasi file hasil *docking* dengan format PDBQT dikonversikan menjadi file PDB dengan menggunakan aplikasi *Open Babel*, tujuannya agar file hasil *docking* dapat terbaca oleh aplikasi *DS Visualizer*.

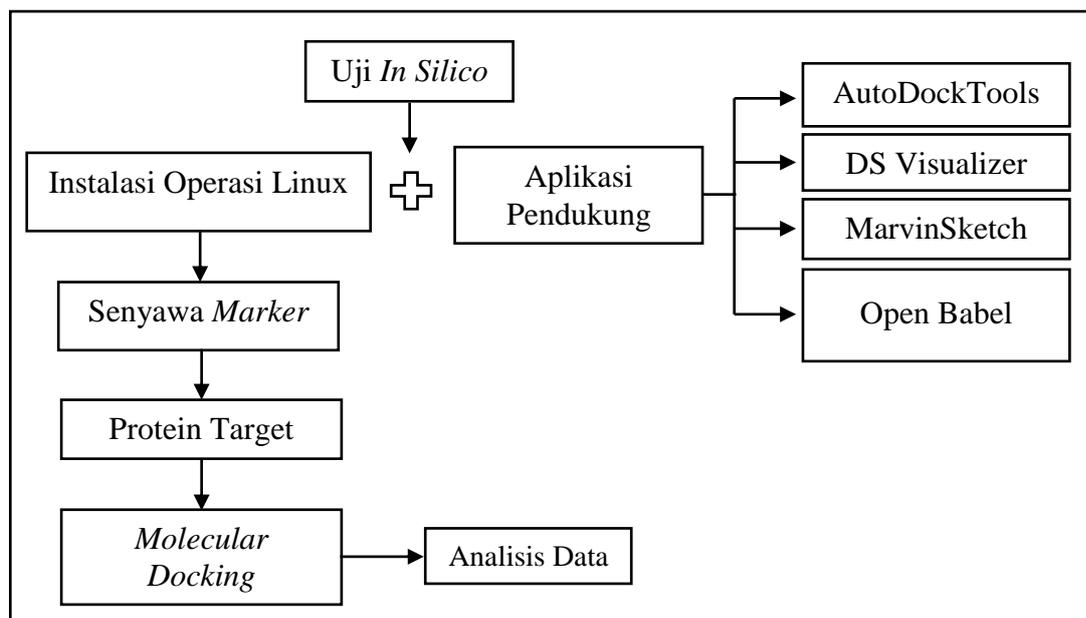
g. Validasi Molecular Docking

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 RMSD. Nilai RMSD yang dikatakan valid adalah $<2.00 \text{ \AA}$.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja Uji *In Vivo*



Gambar 2. Skema Langkah Kerja Uji *In Silico*

H. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari uji efek antiinflamasi adalah data volume kaki tikus yang diberi perlakuan. Volume udem merupakan selisih dari volume kaki sebelum dan sesudah diradangkan dengan karagenin 1%. Perhitungan dapat dilakukan dengan rumus:

$$V_u = V_t - V_o$$

Keterangan:

V_u : Volume udem kaki tikus tiap waktu t

V_t : Volume kaki tikus setelah diradangkan dengan karagenin 1% pada waktu tertentu

V_o : Volume awal kaki tikus sebelum diradangkan dengan karagenin 1%.

Nilai AUC (*Area Under the Curve*) yaitu luas daerah rata-rata di bawah kurva yang merupakan hubungan volume udem rata-rata tiap satuan waktu dengan rumus:

$$AUC = \frac{V_{t_{n-1}} + V_{t_n}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan :

AUC : *Area Under Curve* (Luas di bawah kurva)

$V_{t_{n-1}}$: volume udem rata-rata pada waktu t_{n-1} (setengah jam sebelumnya)

V_{t_n} : volume udem rata-rata pada waktu ke- t_n

t_n : waktu

t_{n-1} : waktu, saat setengah jam sebelum

Hasil perhitungan AUC digunakan untuk mengetahui prosentase Daya Anti Inflamasi (%DAI). Prosentase Daya Anti Inflamasi (%DAI) dihitung dengan membandingkan AUC_{0-6} perlakuan terhadap kontrol, dengan rumus sebagai berikut :

$$\%DAI = \frac{AUC_k - AUC_p}{AUC_k} \times 100\%$$

Keterangan :

%DAI : Prosentase Daya Anti Inflamasi

AUC_k : *Area Under Curve* kelompok kontrol

AUC_p : *Area Under Curve* kelompok perlakuan

Baik hasil perhitungan nilai persen inflamasi maupun AUC kemudian dianalisis menggunakan metode statistik. Analisis statistik didahului dengan analisis homogenitas varian dengan *Levene test* dan uji normalitas dengan

Kolmogorov-Smirnov. Jika hasil analisis terbukti terdistribusi normal dan varian telah homogen maka analisis dilanjutkan dengan *one way ANNOVA*. Apabila ada perbedaan yang bermakna antara kelompok satu dengan kelompok yang lain maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji Tukey HSD, taraf kepercayaan 95%.

Pada *output* uji Tukey HSD akan diperoleh dua macam *output* yaitu *output descriptive statistic* dan *homogeneous subsets*. Analisis dilakukan menggunakan *homogenous subsets*. Perbedaan dari keduanya adalah *descriptive statistic* digunakan untuk menguji kelompok mana saja yang berbeda secara nyata, sedangkan *homogenous subsets* akan mencari grup/subsets yang mempunyai perbedaan rata-rata yang tidak berbeda secara signifikan. Subsets yang nilai perbedaan rata-ratanya tidak berbeda secara signifikan pada $p < 0,05$ akan berada dalam satu kolom/subsets dan juga sebaliknya. Jika tidak homogen dan tidak terdistribusi normal, maka analisis dilanjutkan dengan analisis non-parametrik.

Hasil uji *molecular docking* menggunakan aplikasi AutoDockTools 4.2 diperoleh *data file* dengan format *.pdb. *File* dengan format *.pdb dibuka melalui aplikasi AutoDockTools 4.2 dan berisi konformasi ikatan antara ligan dan protein target. Dari konformasi yang terbentuk pada kompleks ikatan ligan dan protein, selanjutnya semua kompleks dihapus kecuali kompleks yang diketahui memiliki hasil yang terbaik. Dari hasil tersebut kemudian dipilih 1 konformasi yang memiliki energi ikatan yang paling rendah untuk kemudian dianalisa interaksinya.

Uji *molecular docking* ini dilakukan pada senyawa *marker* dari isolat alkaloid lada (*Piper nigrum* L.) sebagai antiinflamasi. Analisis dilakukan dengan membandingkan energi ikatan (*binding energy*) dari konformasi terbaik masing-masing senyawa *marker* isolat alkaloid lada dengan senyawa pembanding yaitu natrium diklofenak dan *ref ligand*/ ligan referensi. Untuk validasi hasil *docking* digunakan aplikasi AutoDock Vina. Hasil *docking* dinyatakan valid apabila menghasilkan nilai RMSD $< 2.00 \text{ \AA}$.