

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Desain penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental laboratoris secara *in silico* dari senyawa penanda daun salam (*Syzygium polyanthum wight*) terhadap *COX-2* menggunakan aplikasi *molecular docking* Autodock Vina disertai dengan pengujian secara *in vivo* terhadap tikus terinduksi karagenan.

#### **B. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **C. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2015 - Februari 2016

#### **D. Variabel Penelitian**

Variabel Bebas	:Konsentrasi ekstrak etanolik daun salam <i>(Syzygium polyanthum wight)</i>
Variabel Tergantung	: Penurunan udem pada kaki tikus
Variabel Terkendali	: Tikus putih jantan galur <i>wistar</i> berumur 3 bulan dengan berat 130 - 200 g dan sehat, natrium diklofenak, karagenan

## **E. Definisi Operasional**

### 1. Konformasi

Konformasi adalah bentuk perubahan rotasi pada atom-atom yang terdapat pada suatu senyawa akibat perubahan energi.

### 2. Skor Penambatan

Berdasarkan teori energi bebas Gibbs yaitu nilai energi bebas yang kecil menunjukkan bahwa konformasi tersebut stabil sedangkan nilai energi bebas yang besar menunjukkan kompleks yang terbentuk tidak stabil (Funkhouser, 2007). Hal itu menandakan bahwa semakin kecil nilai energinya maka ikatan tersebut akan semakin stabil senyawa tersebut.

### 3. Penurunan Udem

Edema atau udem adalah penimbunan cairan secara berlebihan di antara sel-sel tubuh atau di dalam berbagai rongga tubuh. Pada penelitian ini digunakan iritan atau bahan penginduksi udem yaitu karagenan. Penelitian ini dilakukan dengan mengukur penurunan atau pengurangan volume edema. Perlakuan dengan penurunan volume edema yang lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif (natrium diklofenak) dianggap potensial sebagai antiinflamasi.

## **F. Instrumen Penelitian**

### 1. Alat Penelitian

- a. Alat yang digunakan untuk penambatan molekul:

Personal Computer (*PC/Laptop*) Toshiba Satellite C-40 B yang dilengkapi dengan perangkat lunak seperti sistem *operasi dan*

*aplikasi pendukung. Sistem operasi yang digunakan adalah Windows 7 dan aplikasi pendukung yang digunakan adalah ChemDraw 2010, AutoDock 4.2, Autodock Vina, Accelrys Discovery Studio 4.1.*

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

Plethysmometer 37140 UGO BASILE yaitu alat yang digunakan untuk mengukur perubahan volume pada bagian tubuh, timbangan tikus (Lion Star), spuit injeksi untuk insulin 1,0 ml (Terumo), spuit oral ukuran 18 gauge (Terumo) untuk tikus serta *SPSS versi 15 sebagai pengolah data.*

c. Alat yang digunakan untuk ekstraksi:

Bejana *stainless steel*, penangas air (*waterbath* Memmert), *vaccum rotary evaporator* (IKA® RV 10 basic), alat-alat gelas (Iwaki Pyrex®), timbangan analitik (Mettler Toledo AL-204), cawan porselen.

2. Bahan Penelitian

a. Uji *in silico*

Protein *6COX* dalam bentuk *file* yang diunduh dari situs resmi protein data bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), senyawa penanda daun salam (*Syzygium polyanthum wight*) dan senyawa natrium diklofenak dalam bentuk *file* sebagai pembanding.

b. Uji *in vivo*

Tikus putih jantan galur Wistar dengan berat badan 150 - 200 gram, karagenan kappa (Lansida), larutan saline (NaCl 0,9%), CMC Na (Lansida), ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum wight*) serta Natrium Diklofenak (Voltaren) dalam bentuk sediaan tablet.

c. Ekstraksi dengan metode maserasi

Etanol 70% (Brataco), simplisia serbuk daun salam (Herbal Anugrah Alam).

## G. Cara Kerja

### Uji In Silico

a. Penyiapan senyawa penanda

Senyawa penanda dibuat dalam bentuk berkas dengan menggambar ligan secara manual menggunakan aplikasi *ChemDraw 2010* kemudian disimpan dengan format *file .cdx*.

b. Penyiapan Protein dan Ligan Uji

Sebelum dilakukan uji penambatan molekul, protein dan ligan pembanding terlebih dahulu diunduh dalam berkas *.pdb* pada situs [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) untuk protein dan situs [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) untuk ligan pembanding. Pada penelitian ini protein yang diunduh adalah protein COX-2 (*6COX*) yang dimana penghambatan protein ini mengakibatkan tidak timbulnya reaksi inflamasi.

Setelah berkas protein sudah terunduh, dilakukan penggambaran senyawa ligan yang akan diuji dengan menggunakan aplikasi

*ChemDraw* yang kemudian disimpan dalam bentuk berkas *.cdx*. Dalam penelitian ini ligan yang digunakan untuk pembandingan adalah ligan dari senyawa natrium diklofenak. Ligan diunduh pada situs resmi yaitu <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> atau <http://www.drugbank.ca/> dalam bentuk konformasi 3D dengan berkas *SDF*. Hasil dari unduhan tersebut dibuka dengan menggunakan DS Visualizer kemudian berkas tersebut diubah dalam bentuk format *file .pdb*.

#### c. Seleksi dan Validasi Protein

##### 1) Preparasi Protein Uji dan Ligan Asli

Preparasi protein uji menggunakan aplikasi *Accelrys Discovery Studio 4.1* (DS Visualizer), tahapan ini bertujuan untuk mendapatkan ligan yang akan digunakan untuk tempat uji senyawa yang lain pada saat dilakukan proses penambatan molekul (*molecular docking*). Berkas unduhan *6COX* dalam format *file.gz* diubah menjadi berkas dengan format *6COX.pdb* dengan menggunakan DS Visualizer. Berkas *6COX.pdb* dibuka kembali menggunakan DS Visualizer, pengotor dihapus pada residu protein dan disimpan kembali dengan nama berkas *target.pdb* setelah itu lakukan preparasi kembali untuk menseleksi ligan asli (S58). Autodock hanya membaca berkas dengan format

berkas.*pdb* sehingga target dan ligan harus dengan format *file.pdb*.

## 2) Menjalankan Proses Penambatan Molekul

Setelah berkas ligan asli, ligan dan protein target sudah disiapkan, berkas tersebut dikumpulkan ke dalam satu *folder*. Aplikasi Autodock vina dijalankan pada windows melalui terminal dengan mengetik “cd ../vina” kemudian pada terminal diketik perintah “vina –config conf.txt –log log.txt” dan ditekan “enter” pada *keyboard*.

### Maserasi Simplisia Daun Salam (*Syzygium polyanthum wight*)

Sebelum dilakukan maserasi, simplisia terlebih dahulu diidentifikasi untuk memastikan bahwa bahan yang digunakan terbukti murni. Identifikasi dilakukan oleh Laboran yang terpercaya di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Langkah selanjutnya yaitu melakukan ekstraksi dengan metode maserasi untuk mendapatkan ekstrak dari daun salam (*Syzygium polyanthum wight*). Simplisia serbuk ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 (Atsani & Sri, 2015). Maserasi pertama dengan perbandingan 1:7,5 bagian. Sebanyak 500 gram serbuk ditambahkan etanol 3,75 L etanol 70%. Dilakukan pengadukan setiap hari selama 5 hari, campuran disaring menggunakan kain flanel sehingga diperoleh filtrat yang jernih (maserat), ampas penyarian diremaserasi dengan

menggunakan etanol 1:2,5 atau etanol sisa sebanyak 1,25 L selama 2 hari dengan tetap melakukan pengadukan setiap hari, setelah itu campuran tersebut disaring kembali. Ekstrak dikentalkan dengan menguapkan ekstrak cair dengan *waterbath* 50°C agar kandungan senyawa tidak rusak (Anief,2000).

#### Uji *In Vivo*

##### a. Penyiapan Hewan Uji

Tikus dikondisikan terlebih dahulu dengan lingkungan baru, kurang lebih 7 hari dalam kandang Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY. Selama masa pengkondisian, dilakukan pemberian makanan dan dilakukan penimbangan berat badan rutin. Tikus yang kondisinya menurun (sakit) memiliki ciri-ciri bulu berdiri, kurang aktif dan warna mata gelap/ tidak jernih tidak digunakan dalam penelitian.

##### b. Penetapan Dosis Bahan Uji

Berdasarkan penelitian sebelumnya, dosis ekstrak etanol daun salam yang digunakan yaitu 100 mg/kgbb, dosis ini sudah cukup menurunkan inflamasi pada tikus sebesar 20-30% (Sugarlini *et al*, 2001). Sehingga berdasarkan penelitian tersebut, pada penelitian ini dosis ekstrak daun salam yang digunakan dibuat dalam tiga perlakuan dengan dosis berbeda.

##### c. Pembuatan Suspensi Karagenan 1%

Sejumlah 0,1 gram karagenan ditimbang lalu dilarutkan dalam 10 ml larutan Natrium Klorida 0,9% steril di dalam beaker glass. Kemudian diaduk dengan vortex selama  $\pm$  5 menit untuk menghomogenkan suspensi.

d. Pembuatan Suspensi CMC Na 0,5%

Sebanyak 0,5 gram CMC Na ditimbang kemudian suspensikan dengan larutan NaCl 0,9% sebanyak 100 ml. Kemudian diaduk dengan vortex selama  $\pm$  5 menit untuk menghomogenkan suspensi.

e. Pembuatan Suspensi Natrium Diklofenak

Untuk pembuatan suspensi natriumdiklofenak, digunakan dosis sekali pemberian sebagai acuan yaitu 50 mg/70 KgBB. Langkah perhitungan yaitu dosis yang ditetapkan sebesar 50 mg dikalikan dengan konversi dosis manusia ke hewan uji dalam hal ini tikus mempunyai konversi sebesar 0,018/200 gram bobot Tikus sehingga didapatkan dosis sebesar 0,9 mg/200 gram yaitu 0,0045 mg/gram atau 4,5 mg/KgBB.

f. Perlakuan Terhadap hewan uji

Pada awalnya hewan uji dipuasakan selama 6–8 jam. Pengosongan lambung bermanfaat terhadap proses absorpsi, adanya makanan dalam gastrik dapat mengganggu proses absorpsi sehingga dapat membuat terjadinya manipulasi obat. Perlakuan yang diberikan kepada masing- masing kelompok yaitu:

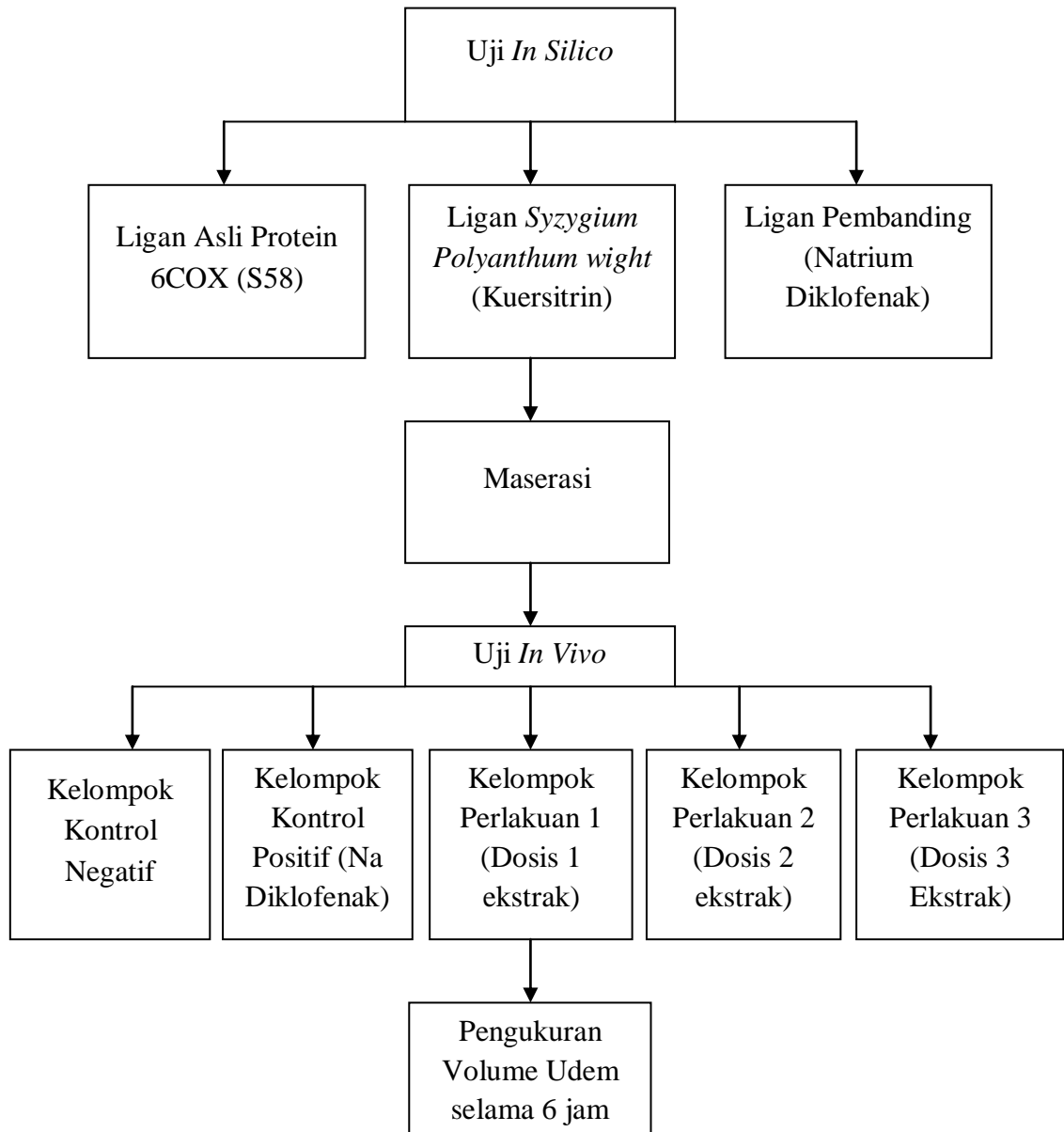
- 1) Kontrol Negatif CMC Na 0,5% (Plasebo)



- 2) Kontrol Positif Natrium Diklofenak 4,5 mg/KgBB
- 3) Ekstrak Etanol Daun Salam 33,3 mg/KgBB
- 4) Ekstrak Etanol Daun Salam 100 mg/KgBB
- 5) Ekstrak Etanol Daun Salam 300 mg/KgBB

Masing- masing tikus diberikan bahan uji dengan dosis yang sudah dihitung sesuai dengan berat badan tikus. Setelah 10-15 menit kemudian masing-masing tikus diberi induksi edema menggunakan suspensi karagenin 1% sebanyak 0,1 ml yang diinjeksikan secara subkutan pada telapak kaki tikus. Volume kaki tikus diukur tiap interval 30 menit selama 6 jam.

## H. Skema Langkah Kerja



## I. Analisis Data

### 1. Analisis Skor Penambatan Senyawa Uji dan Senyawa Pembanding

Data yang didapat pada uji *in silico* dari senyawa penanda daun salam (*Syzygium polyanthum wight*) yaitu kuersitrin dan senyawa pembanding berupa skor penambatan senyawa terhadap protein 6COX. Hasil penambatan dari kuersitrin dianggap lebih baik dan berpotensi sebagai inhibitor COX-2 jika skor penambatan lebih rendah dibandingkan dengan skor penambatan senyawa pembanding dalam hal ini natrium diklofenak.

### 2. Analisis Data *In Vivo*

Data yang diperoleh dari uji *in vivo* tikus galur Wistar terinduksi karagenan yaitu berupa waktu penurunan edema pada kaki tikus yang sudah diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya. Data tersebut akan dianalisis menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 15, jika data tersebut terdistribusi normal maka akan dilanjutkan dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% dan uji LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok (Destyka, 2012).

Menurut Imam Ghazali (2011) dalam Apriyono & Taman (2013) uji normalitas adalah pengujian untuk melihat suatu populasi data terdistribusi normal atau tidak. Suatu populasi data dinyatakan terdistribusi normal jika nilai *Sig* lebih besar dari *level of significant* 0,05 sedangkan jika lebih kecil dari 0,05 maka distribusi data tersebut

dinyatakan tidak normal (Apriyono & Taman, 2013). Analisis data ini bertujuan untuk memvalidasi hasil dari data in vivoyang sudah yang dilakukan.