

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium dengan studi *in vitro* dan *in silico*

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Dilaksanakan dalam waktu kurang lebih 1 bulan masa penelitian.

C. Populasi dan Sampel (Subyek Penelitian)

Subyek penelitian yang akan digunakan berupa marmut betina yang tidak sedang hamil dengan berat badan antara 400 – 500 gram. Dan umur diatas 3 bulan. Dalam penelitian ini subjek dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*), kemudian dilakukan isolasi organ uterus. Selanjutnya organ uterus diletakkan di dalam alat *organ bath*, lalu diinduksi asetilkolin. Selanjutnya, dilakukan penentuan aktivitas antagonisme.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

- 1) Dosis senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dan asetilkolin yang diberikan.

b. Variabel perancu

- 1) Dapat dikendalikan: berat badan, umur, dan jenis kelamin, perangkat *system molecular docking*.
- 2) Tidak dapat dikendalikan: Variasi kepekaan marmut terhadap suatu zat.

c. Variabel tergantung

Nilai EC_{50} , pD_2 , dan pA_2 senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan penelitian :

- a. Marmut betina yang sedang tidak hamil dengan berat badan antara 400 – 500 gram
- b. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon
- c. *Buffer tyrode* dengan kualitas farmasetis (Merch[®])
- d. Gas karbogen (mengandung 95% oksigen dan 5% karbondioksida) (Samator[®])
- e. Agonis reseptor asetilkolin (ACh-M₃) (Sigma Aldrich[®])
- f. Akuades

2. Alat penelitian :

- a. Satu *set alat* untuk preparasi organ (scalpel, pinset, cawan petri, pipet tetes, jarum, benang, gunting bedah)
- b. *Vortex*
- c. Pengaduk magnet termostat tipe 1419

- d. Transduser (Ugo basille[®])
- e. Rekorder (Ugo basille[®])
- f. Dua set *organ bath* volume 20 ml
- g. Bridge *amplifier* (Ugo basille[®])
- h. Pipet mikro 100 μ l, 1000 μ l (Eppendorf[®])

F. Cara Kerja

1. 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 masing-masing ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam labu takar, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga volume 1L. Bahan pada tabel larutan B ditimbang, kemudian dimasukkan ke 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, 1,00 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		

2. Penyiapan Larutan Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μ M dan 20 μ M

Penelitian ini menggunakan sebagai senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Larutan stok senyawa obat dibuat dalam konsentrasi 2×10^{-3} M. Sebagai senyawa uji, diberikan dalam konsentrasi 10 dan 20 μ M. Larutan stok konsentrasi 2×10^{-3} M ditambahkan sebanyak 100 atau 1000 μ L ke dalam *organ bath* yang telah berisi organ uterus dan larutan *buffer tyrode* 20,0 mL untuk mencapai senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon konsentrasi 10 μ M dan 20 μ M.

3. Pembuatan Larutan Asetilkolin Bromida

Asetilkolin bromida memiliki bobot molekul 240,1 g/mol. Digunakan asetilkolin dengan konsentrasi 2×10^{-1} M dalam akuades sebagai larutan stok asetilkolin. Pengenceran larutan stok asetilkolin dilakukan dengan cara bertingkat dari larutan stok asetilkolin 2×10^{-1} M sehingga diperoleh larutan asetilkolin konsentrasi (2×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 2×10^{-4} dan 2×10^{-5}) M.

4. Preparasi organ Uterus

Digunakan marmut betina yang tidak sedang hamil dengan rentang bobot 400 – 500 g. Marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan selanjutnya, dilakukan pembedahan pada bagian perut. Kemudian diambil bagian uterus dari perut marmut tersebut sepanjang 2 cm. Uterus yang telah diambil diletakan ke dalam cawan fiksasi yang telah diisi larutan *buffer tyrode*, kemudian uterus dibersihkan

dari isi yang ada di dalamnya. Selain itu dibersihkan juga dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel (jaringan lemak). Pada kedua ujung uterus ini selanjutnya diikat dengan benang. Kemudian ujung benang bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organ bath* dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser. sebelumnya *Organ bath* telah dikondisikan sehingga suhunya mencapai 37° C.

5. Uji aktivitas alkaloid terhadap agonis reseptor fisiologis (asetilkolin)

Uji aktivitas terhadap agonis reseptor dilakukan untuk mengukur kontraksi uterus 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 *ekuilibrase* sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organ bath* dan respon kontraksi yang terjadi 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 lima menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, dilakukan pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan konsentrasi 20 dan 10 µM. Selanjutnya, 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 obat yang terjadi kemudian dibandingkan.

6. 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 uterus dilakukan setelah kontraksi dan pencucian organ akibat pemberian agonis dan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Uterus dicuci selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap lima menit. Setelah uterus 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.

7. Uji pelarut dimetil sulfoksida (DMSO)

Waktu yang tepat untuk melakukan uji pengaruh DMSO adalah setelah pengenalan agonis reseptor. Uterus dicuci selama 45 menit dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap lima belas menit. Jumlah DMSO yang diberikan adalah sebanyak 100 μ L dan kemudian dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi agonis. Kemudian dibandingkan antara kurva

hubungan konsentrasi agonis terhadap % respon sebelum dan sesudah perlakuan DMSO.

8. Docking menggunakan Autodock4

a. Persiapan ligan

Pada tahap persiapan ligan dengan tahapan sebagai berikut:

Menggambar struktur 2D senyawa menggunakan program *ChemDraw* 2D. Kemudian diubah menjadi bentuk 3D dengan menggunakan *software ChemDraw 3D*, *save* ke dalam format *.mol. Buka *softwareOpenBabelGUI*. (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*, *Hydrogen*, *add*, *Polar Only*, *noBonderOrder* (for pdb file) pada *Methods* dan pilih *yes* pada *Renumber atoms to include hydrogens*. Klik *Ok*. Klik *Ligand*, *Torsion Tree*, *Chose Torsion*. *Done*. Klik *Ligand*, klik *Torsion Tree*, *Set Number of Torsion* kemudian Klik *Dismiss*. Klik *Ligand*, *Output*, *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.

Tahapan persiapan makromolekul dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

Klik *File*, pilih *Read Molecule*, pilih file pdb struktur protein dari hasil pemodelan pada penelitian sebelumnya. Klik *Edit*, pilih *Hydrogens Add* kemudian *All Hydrogens, no BondOrder* pada *Method* dan *Yes* pada *Renumber atoms to include*, Klik OK. Klik *Edit, Hydrogens, Merge Nonpolar*. Klik *Grid, Macromolecule, Choose* dipilih protein yang akan di *docking*. Kemudian 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*. Tahapan *autogrid* dilakukan sebagai berikut :

Klik *Grid*, pilih *Grid Box* kemudian 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)[nama file][enter]dir [enter]`. Kemudian tahap *autogrid* dilakukan dengan *script* sebagai berikut:`Autogrid4(spasi)p(spasi)[namafilename].gpf(spasi)l(spasi)[namafilename].glg(spasi)&[enter]`

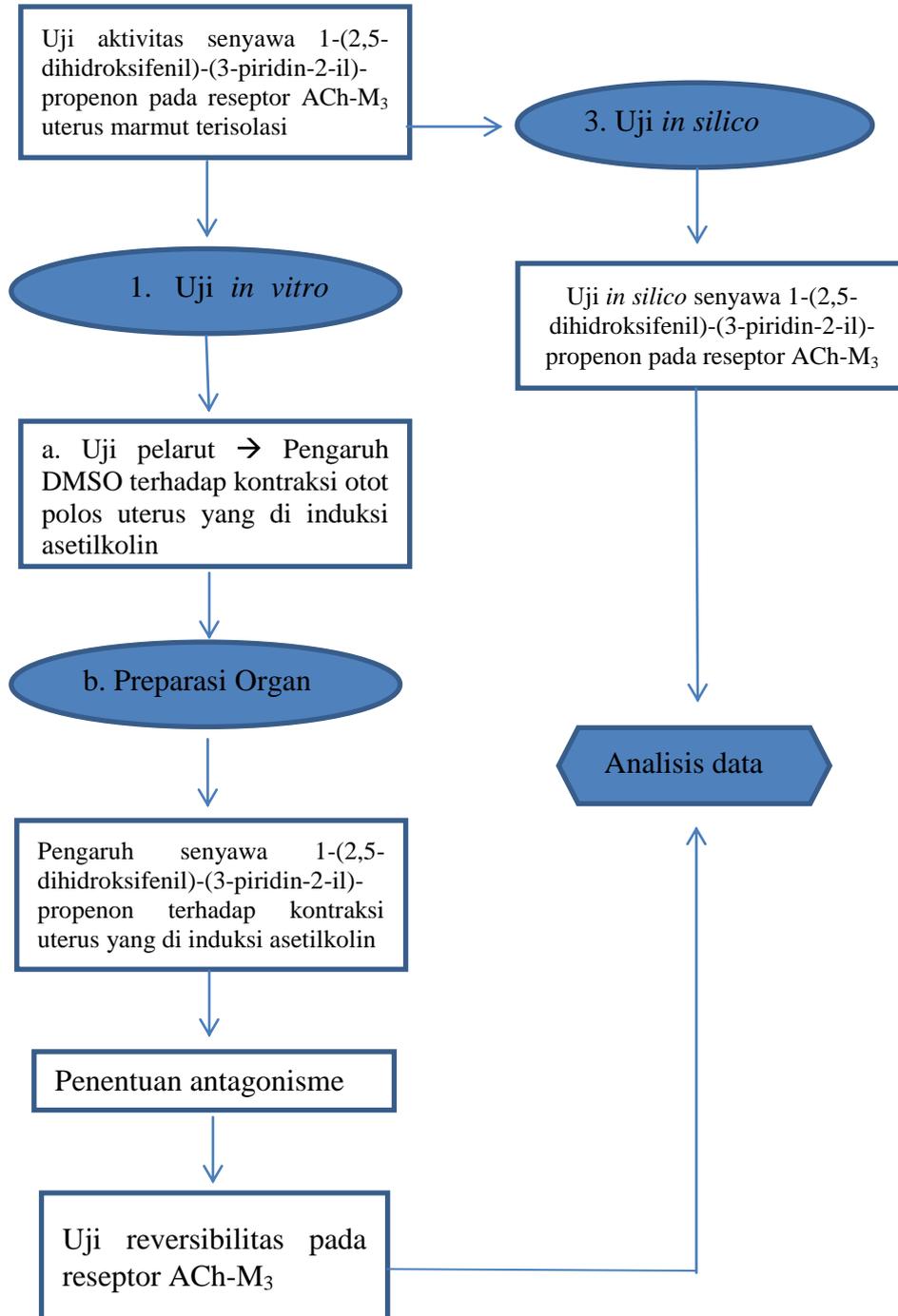
d. *Autodock*

Pada tahap *autodock* merupakan proses *docking* yang dilakukan dengan tahapan sebagai berikut :

Klik *Docking*, *Macromolecule*, pilih *Set Rigid File Name* dipilih file *macromolecule*. Klik *Docking*, pilih *Ligand*, *Choose*, dipilih ligan. Klik *Docking*, *Search Parameters*, klik *Genetic Algorithm*, *Accept*. 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)[nama file].dpf(spasi)-l(spasi)[nama file].dlg(spasi)&[enter]`

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

1. Data

Data yang diperoleh dalam penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi otot polos uterus yang terekam pada rekorder akibat pemberian agonis reseptor. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon terhadap respon maksimum yang dicapai oleh agonis. Selanjutnya, data tersebut dibuat dalam bentuk kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis reseptor terhadap % respon (asetilkolin). Data yang diperoleh dalam penelitian *in silico* adalah nilai RMSD validasi dan skor *docking*.

2. Analisis data

Nilai EC_{50} (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon. EC_{50} dihitung berdasarkan (persamaan 1). Nilai EC_{50} ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD_2 , dimana pD_2 adalah nilai dari $-\text{Log}.EC_{50}$ (persamaan 2) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon) dan nilai rata-rata pD_2 agonis \pm Standard Error ($pD_2 \pm SE$).

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

Pergeseran nilai pD_2 dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan.

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%

$pD_2 = -\text{Log. EC}_{50} \dots \dots \dots (2)$

I. Statistika

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ditetapkan sebagai antagonis reseptor ACh-M₃, apabila inkubasi otot polos uterus marmut terisolasi dengan senyawa tersebut mengakibatkan penurunan nilai pD_2 asetilkolin. Semua data pD_2 asetilkolin terdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen ($p > 0,05$). Distribusi data pD_2 asetilkolin dianalisis dengan menggunakan uji normalitas (metode Shapiro-wilk). Penurunan nilai pD_2 Selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametrik, yaitu menggunakan uji ANOVA satu jalan yang dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.