

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksploratif (*in silico* dan GC-MS) dan eksperimental laboratoris (*in vitro*) dari minyak atsiri jahe (*Zingiber officinale*) sebagai anti-emetik.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat

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

2. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Februari - April 2016.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Uji *In Vitro*

Variabel Bebas : Kadar minyak atsiri

Variabel Tergantung : Frekuensi kontraksi dan relaksasi dari organ terisolasi

Variabel Terkendali : *Organbath*, *buffer Tyrode*, Aplikasi *Labscribe2*

2. Definisi Operasional

- a. Konformasi adalah bentuk perubahan rotasi pada atom-atom yang terdapat pada senyawa tertentu akibat perubahan energi.
- b. Skor Penambatan adalah nilai ikatan energi suatu senyawa terhadap proteinnya yang semakin minimum nilainya dianggap semakin baik dan memiliki afinitas yang lebih tinggi.
- c. Kontraksi adalah keadaan dimana otot mengalami penegangan dan relaksasi adalah keadaan dimana otot kembali tenang.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk uji GC-MS pada penelitian ini adalah GCMS-QP2010S SHIMADZU. Alat yang digunakan untuk uji *in silico* adalah 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, *ChemDraw* 2010, *AutoDockTools* 4.2, *DS Visualizer*, *Molegro Molecular Viewer*, dan *MarvinSketch*. Alat yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah 4400-*Four-Chamber Isolated Organbath*, aplikasi *iWorx LabScribe2 Data Recording and Analysis*, alat bedah seperti gunting, pisau, pinset dan cawan petri.

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk uji GC-MS pada penelitian ini adalah minyak atsiri jahe yang diperoleh dari *supplier* Lansida *Essential Oil*, gas pembawa Helium. Bahan yang digunakan untuk uji *in silico* adalah protein asetilkolin dalam bentuk berkas (*file*) dengan kode protein 4DAJ yang diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org), *native ligand* dari reseptor asetilkolin muskarinik3 (Tiotropium), senyawa *marker* minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*), dan senyawa dari Atropin dalam bentuk berkas (*file*) untuk pembandingan. Bahan yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah marmut (*Cavia cobaya*), otot polos ileum marmut terisolasi, larutan fisiologis *buffer Tyrode* (NaCl, KCl, MgCl₂.6H₂O, CaCl₂.2H₂O, NaH₂PO₄.2H₂O, NaHCO₃) *grade p.a (pro analys)* yang diperoleh dari pabrik Merck Germany *supplier* CV. General Labora Yogyakarta, glukosa, aquadest, Dimetil Sulfoksida (DMSO), gas karbogen (95% O₂ dan 5% CO₂), minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*), asetilkolin, dan obat pembandingan *Atropine Sulfate*.

E. Cara Kerja

1. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis ini dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa yang ada dalam minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) sebagai antiemetik. Instrumen ini berupa GC dengan detektor MS. Pemisahan senyawa dengan GC menggunakan kolom AGILENT HP 5MS dengan panjang 30 meter serta memiliki ketebalan internal 0,25 mm. Fase gerak

(*carrier gas*) digunakan gas helium dengan kecepatan 0,54 ml/menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 50 hingga 100°C dengan peningkatan sebesar 5°C setiap menit. Dalam instrumen MS digunakan energi ionisasi sebesar 70 eV dengan metode *electron impact* (EI).

Sampel uji mula-mula dilarutkan dengan pelarut yang sesuai (methanol/etilasetat/n-heksan) secukupnya hingga diperoleh konsentrasi 1%. Selanjutnya 1 µl sampel tersebut diinjeksikan ke dalam instrumen GC. Hasilnya akan diamati melalui spektrum yang diinterpretasikan berdasarkan berat molekul dan waktu retensi (Rt) dari minyak atsiri jahe.

2. 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 aplikasi 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 Senyawa *Marker*

Senyawa *marker* dibuat dalam bentuk berkas (*file*) dengan menggambar struktur senyawa *marker* menggunakan aplikasi *MarvinSketch* pada sistem operasi *Linux*.

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 dalam penelitian ini adalah asetilkolin dengan kode protein yaitu 4DAJ. Setelah protein diunduh lalu dilakukan preparasi protein target dalam format PDBQT. Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan protein target. Hasil preparasi protein dilakukan preparasi lebih lanjut dengan aplikasi *AutoDockTools* 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*.

d. Preparasi Ligan dalam Format PDBQT

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa *marker* dari minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) yang akan diteliti sebagai antiemetik. 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.

e. Preparasi *Grid Parameter File*

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi AutoDockTools 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).

f. Preparasi *Docking Parameter File*

Proses ini diawali dengan memilih protein target dan 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).

g. 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*, *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.

h. 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 $<2.00 \text{ \AA}$.

3. Uji *In Vitro* pada Organ Terisolasi

a. Penyiapan Larutan *Buffer Tyrode*

Larutan *buffer Tyrode* dibuat berdasarkan formula A dan B (Vogel, 2002). Komposisi larutan dapat dilihat dalam tabel 1 berikut. Bahan-bahan pada tabel larutan A masing-masing ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar, dan 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, kemudian ditambahkan 800 ml akuades, 1,00 g glukosa pada saat akan digunakan (Lammers *et al*, 2002; Grasa *et al*, 2005).

Tabel 1. Komposisi *buffer Tyrode*

Komposisi larutan A		Komposisi larutan B	
Bahan	Jumlah	Bahan	Jumlah
NaCl	80 g/L	NaHCO ₃	10 g/L
KCl	2,00 g/L		
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,14 g/L		
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,64 g/L		
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,65 g/L		

b. Penyiapan Larutan Minyak Atsiri Jahe 1 ppm dan 1,25 ppm (*part per million*)

Penelitian ini menggunakan minyak atsiri jahe sebagai senyawa uji. Larutan minyak atsiri jahe dibuat dalam konsentrasi 1% dalam pelarut DMSO. Sebagai senyawa uji, larutan jahe diberikan dalam dosis 1 ppm dan 1,25 ppm dan dimasukkan ke dalam *organbath* yang berisi 20,0 mL larutan *buffer Tyrode*.

c. Pembuatan Larutan Asetilkolin Bromida

Larutan asetilkolin dibuat sebagai larutan stok asetilkolin konsentrasi 2×10^{-1} M dalam akuades. Asetilkolin memiliki bobot molekul sebesar 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} ; dan 2×10^{-5}) M.

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

Larutan atropin (BM: 255,35) dibuat pada konsentrasi 2×10^{-2} M. Sebanyak 25,5 mg serbuk atropin ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dilarutkan dalam akuades hingga 5,0 mL

kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga konsentrasi larutan atropin 2×10^{-4} M. larutan dengan konsentrasi 10^{-6} M (1 μ M) didapatkan dengan mengambil larutan atropin 2×10^{-4} M sebanyak 100 μ L kemudian dimasukkan ke dalam *organbath* yang berisi 20 mL larutan *buffer Tyrode*.

e. Preparasi Organ Ileum

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan hewan uji marmut (*Cavia cobaya*). Selanjutnya marmut dikorbankan dengan cara dislokasi tulang belakang kepala (*cervix*) dan dilakukan pembedahan. Kemudian diambil bagian ileum dari marmut tersebut. Ileum yang telah diambil diletakkan ke dalam cawan fiksasi yang diisi larutan *buffer Tyrode*, kemudian dibersihkan. Setelah itu dibersihkan juga dari jaringan-jaringan lain yang masih menempel (jaringan lemak). Lalu pada ileum ini selanjutnya diikat dengan benang. Ujung benang bagian bawah diikatkan pada bagian tuas *organbath* dan ujung bagian atas diikatkan pada bagian yang terhubung dengan transduser. *Organbath* sebelumnya telah dikondisikan sehingga suhunya mencapai 37°C.

f. Uji Aktivitas Minyak Atsiri Jahe Terhadap Agonis Reseptor Fisiologis

Uji aktivitas minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) 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. *Organbath* diisi dengan 20,0 mL larutan *buffer Tyrode*, kemudian organ direndam dalam *organbath* tersebut dan dilakukan ekuilibrasi sampai diperoleh kondisi stabil (30 menit). Selanjutnya, dilakukan pemberian agonis ke dalam *organbath* 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 5 menit. Pada kontraksi kedua, setelah dilakukan pencucian organ dan kondisi organ telah stabil, selanjutnya dilakukan pemberian minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) dosis 1 ppm dan 1,25 ppm. 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 minyak atsiri jahe yang terjadi kemudian dibandingkan. Cara pemberian agonis asetilkolin tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Cara pemberian dosis agonis asetilkolin

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

g. Uji Reversibilitas

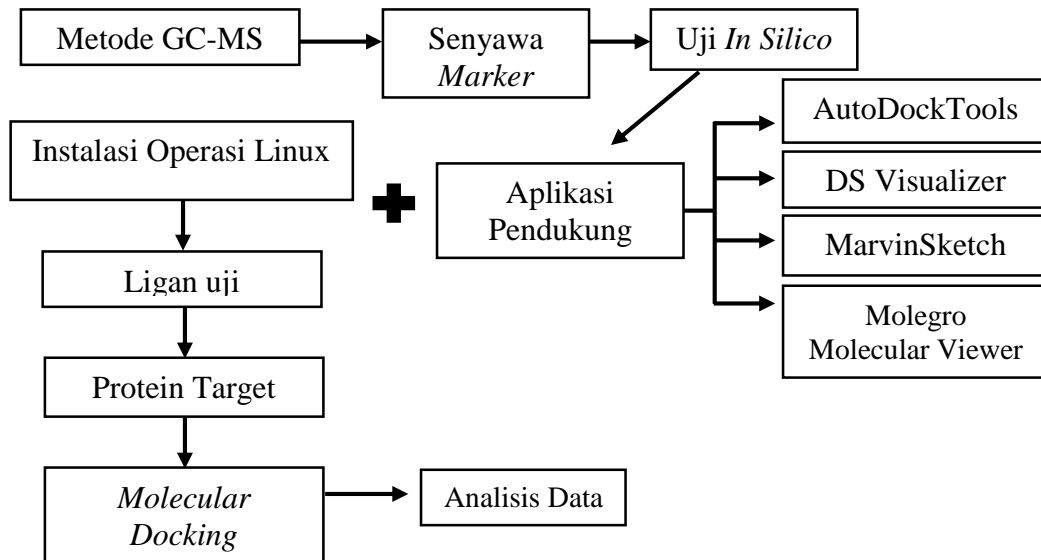
Uji reversibilitas dilakukan untuk melihat kemampuan organ untuk kembali pada kondisi semula, atau pada kondisi sebelum dilakukannya pengenalan agonis reseptor. Uji reversibilitas ini dilakukan pada setiap uji aktivitas agonis reseptor (histamin, asetilkolin, β_2 -adrenergik dan serotonin). Uji reversibilitas terhadap ileum dilakukan setelah kontraksi dan pencucian organ akibat pemberian agonis dan minyak atsiri. Ileum dicuci selama 30 menit dengan penggantian larutan *buffer Tyrode* setiap 5 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.

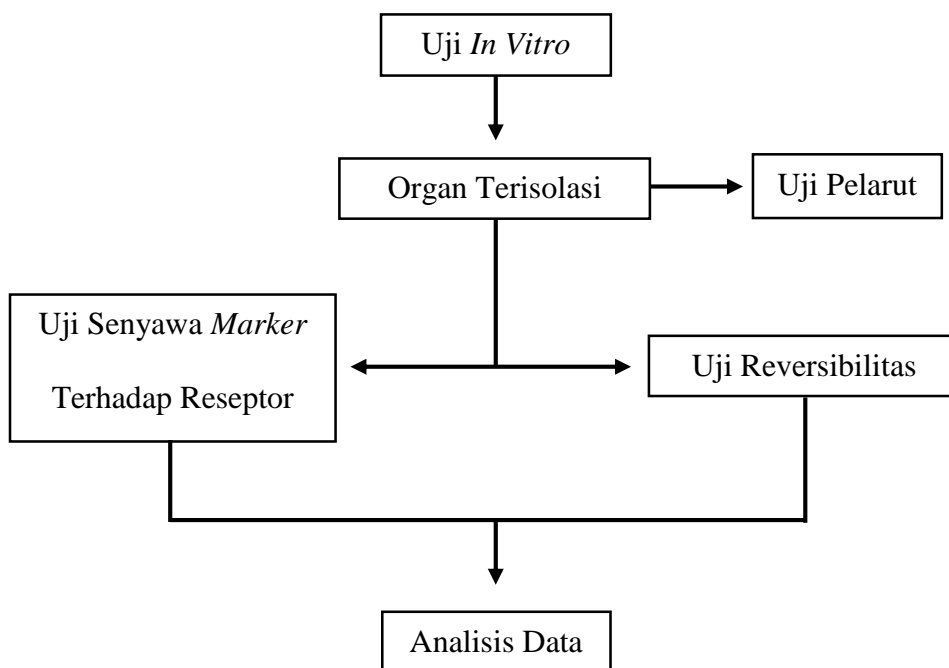
h. Uji Pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO)

Uji pengaruh DMSO dilakukan setelah pengenalan agonis reseptor asetilkolin. Sebelumnya, organ yang telah dicuci selama 30 menit dengan pengganti larutan *buffer Tyrode* setiap 5 menit. Jumlah DMSO yang diberikan adalah sebanyak 100 μL dan kemudian dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi asetilkolin. Kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap % respon sebelum dan sesudah perlakuan DMSO kemudian dibandingkan.

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema Langkah Kerja Uji *In Silico* dan GC-MS



Gambar 2. Skema Langkah Kerja Uji *In Vitro*

G. Analisis Data

1. Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Analisis golongan antiemetik dari senyawa *marker* minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) yang telah terbukti memiliki aktivitas pada reseptor asetilkolin dilakukan dengan cara melihat spektrum hasil pemisahan instrumen GC yang berupa *peak* berdasarkan nilai waktu retensi (Rt). Selanjutnya dalam output MS, *peak* masing-masing nilai waktu retensi (Rt) yang muncul diinterpretasikan berdasarkan nilai m/z senyawa-senyawa yang diperoleh.

2. Uji *Molecular Docking* dengan AutoDockTools 4.2

Hasil uji *molecular docking* menggunakan aplikasi AutoDockTools 4.2 diperoleh *data file* dengan format *.dlg dan *file complex.pdb*. *File* dengan format *.dlg dibuka melalui aplikasi AutoDockTools 4.2 dan berisi 10 konformasi ikatan antara ligan dan protein target. Dari 10 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 minyak atsiri Jahe (*Zingiber officinale*) sebagai antiemetik pada reseptor asetilkolin. Analisis dilakukan dengan membandingkan energi ikatan (*binding energy*) dari konformasi terbaik masing-masing senyawa *marker*

minyak atsiri dengan senyawa pembanding yaitu Atropin dan *ref ligand*/ligan referensi.

Untuk validasi hasil *docking* digunakan aplikasi AutoDock Vina. Hasil *docking* dinyatakan valid apabila menghasilkan nilai RMSD <2.00 Å.

3. Uji *In Vitro* Ileum Organ Terisolasi

Data yang diperoleh dalam penelitian *in vitro* berupa data kontraksi atau relaksasi 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 antagonis terhadap % respon.

Nilai EC₅₀ (konsentrasi agonis yang dapat menghasilkan respon sebesar 50% dari respon maksimum) agonis reseptor, dengan atau tanpa pengaruh minyak atsiri jahe dihitung berdasarkan kurva hubungan konsentrasi terhadap % respon/ EC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan 3. Nilai EC₅₀ ini selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk pD₂, dimana pD₂ adalah nilai dari - log EC₅₀ (persamaan 4) dan selanjutnya data disajikan dalam bentuk tabel kelompok perlakuan agonis (dengan atau tanpa pengaruh minyak atsiri jahe) dan nilai rata-rata pD₂ agonis ± *Standard Error* (pD₂ ± SE). Pergeseran nilai pD₂ dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji t berpasangan (*paired sample t test*).

$$\text{Log } EC_{50} = \left[\frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} \times (X_2 - X_1) \right] + X_1 \dots \dots \dots (3)$$

Keterangan:

X_1 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di bawah 50%

X_2 : Log. konsentrasi dengan respon tepat di atas 50%

Y_1 : % respon tepat di bawah 50%

Y_2 : % respon tepat di atas 50%

$$pD_2 = -\text{Log. } EC_{50} \dots \dots \dots (4)$$

4. Analisis Statistika Minyak Atsiri Jahe sebagai Antagonis Reseptor Asetilkolin

Minyak atsiri jahe ditetapkan sebagai antagonis reseptor asetilkolin muskarinik 3 apabila inkubasi otot polos ileum marmut terisolasi dengan minyak atsiri jahe 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 Kolmogorov-Smirnov). Penurunan nilai pD_2 selanjutnya dianalisis dengan metode statistik parametric, yaitu menggunakan uji *One Way* ANOVA yang dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%