

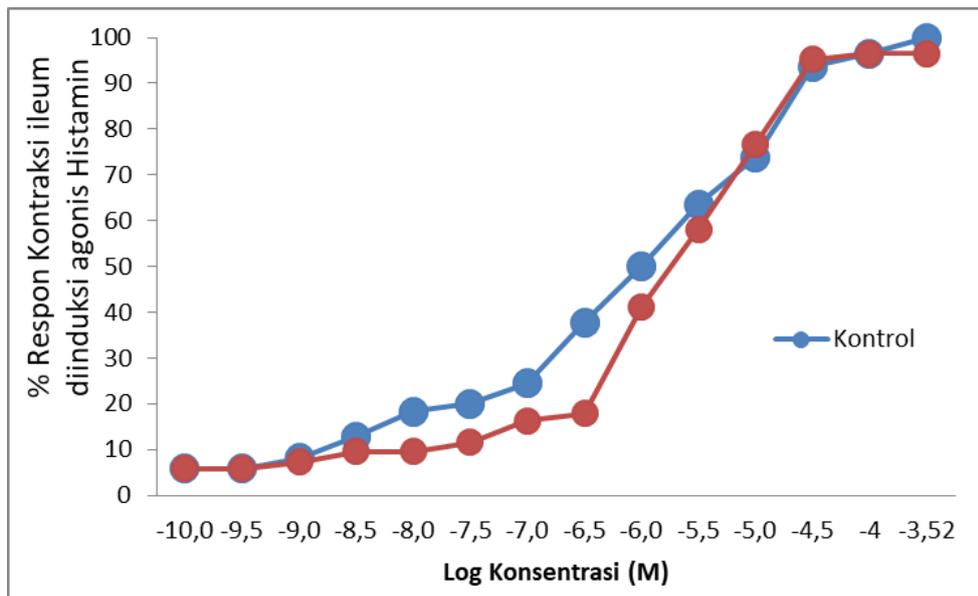
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

F. Hasil Penelitian

1. Uji pelarut DMSO terhadap kontraksi otot polos ileum

Sebagai uji pendahuluan dilakukan uji pengaruh DMSO terhadap kontraksi otot polos ileum yang diinduksi oleh histamin. Jumlah DMSO yang digunakan adalah sebanyak 100 μ L yang disesuaikan dengan volume maksimal pemberian senyawa DHPP ke dalam *organ bath*. Pengaruh DMSO terhadap otot polos ileum yang diinduksi oleh histamin, dan berikut pergeseran nilai pD_2 tersaji pada Tabel 2.



Gambar 3. Pengaruh DMSO terhadap respon kontraksi otot polos ileum yang diinduksi histamin. Kurva hubungan konsentrasi histamin terhadap respon kontraksi otot polos ileum, dengan atau tanpa pengaruh DMSO 100 μ M ($n=5$, rata-rata \pm SEM).

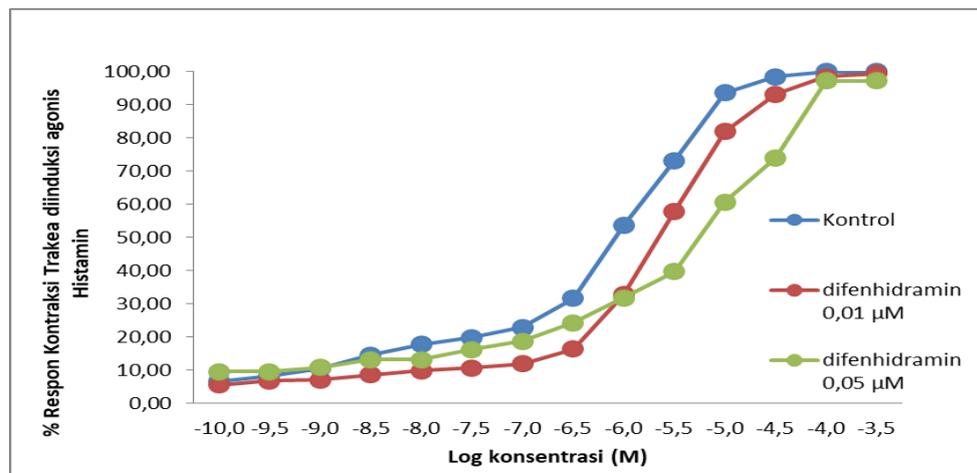
Meskipun demikian, berdasarkan uji t berpasangan (n=5) penurunan nilai pD₂ histamin tidak bermakna secara statistik (p> 0,05), sehingga disimpulkan pelarut DMSO 100 µL tidak mempengaruhi kontraksi otot polos ileum yang diinduksi oleh histamine (Kontrol).

Tabel 2. Nilai rata-rata pD₂ histamin karena pengaruh DMSO 100µL (n=5, rata-rata ± SEM). Berdasarkan uji signifikansi menggunakan paired t-test dengan kepercayaan 95 %, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna (p>0,05) antara perlakuan pD₂ kontrol dan DMSO.

NO	Kelompok Perlakuan	pD ₂	Emaks (%)
1	Kontrol Histamin	5,84 ± 0,12	100 ± 0,00
2	DMSO 100 µM	5,72± 0,13	100 ± 0,00

2. Uji Pembandingan menggunakan Difenhidramin (Kontrol Positif)

Uji pembandingan dilakukan menggunakan difenhidramin dengan metode yang sama persis dengan perlakuan. Difenhidramin merupakan antagonis reseptor H₁ generasi pertama dengan efek sedatif dan anti alergi. Difenhidramin secara kompetitif menghambat reseptor H₁. Biasanya digunakan untuk gejala-gejala yang diakibatkan histamin endogen pada bronkus, pembuluh darah dan otot polos pencernaan. Tujuan dilakukannya uji difenhidramin sebagai pembandingan adalah untuk melihat apakah zat uji bisa berefek sama dengan obat antihistamin yang digunakan sebagai kontrol positif.



Gambar 4. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian difenhidramin 0,01 dan 0,05 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n=5-10$)

Hasil menunjukkan uji difenhidramin memberikan efek relaksasi dilihat dari pergeseran pada kurva (Gambar 4) dan penurunan nilai pD_2 (Tabel 3). Bentuk kurva difenhidramin sama dengan DHPP dimana Emaks tercapai 100% yang menandakan bahwa difenhidramin dan DHPP merupakan antagonis kompetitif terhadap reseptor H_1 .

No	Kelompok perlakuan	pD_2	Emaks(%)
1	Kontrol Histamin	$6,10 \pm 0,16$	$100 \pm 0,00$
2	Difenhidramin 0,01 μM	$5,67 \pm 0,09$	$100 \pm 0,00$
3	Difenhidramin 0,05 μM	$5,15 \pm 0,23^*$	$100 \pm 0,00$

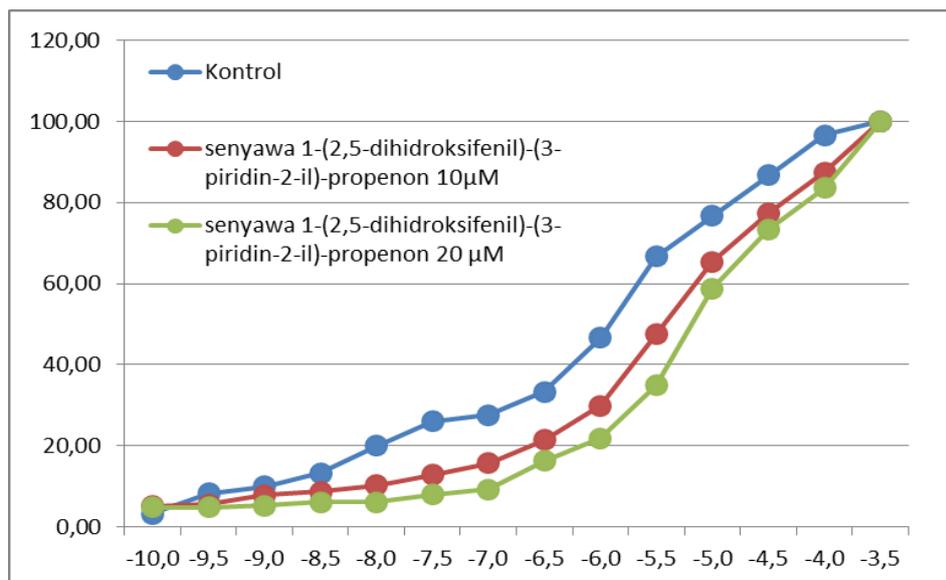
Tabel 3. Pergeseran nilai pD_2 histamin karena pengaruh difenhidramin 0,01 dan 0,05 μM . nilai pD_2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n=5-10$). Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap nilai pD_2 histamin/kontrol (*), setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %.

3. Pengaruh Senyawa DHPP terhadap Kontraksi Otot Polos Ileum Akibat Pemberian Seri Konsentrasi Histamin.

Digunakan senyawa DHPP dengan konsentrasi sebesar 10 dan 20 μM . Senyawa tersebut diberikan 10 menit sebelum pemberian seri kadar histamin. Dari uji ini akan di dapat data berupa kurva hubungan antara seri konsentrasi histamin dengan % respon kontraksi otot polos yang terdapat pada ileum yang terisolasi dalam media larutan berupa buffer tyrode. Apabila terjadi pergeseran % respon kontraksi otot polos ileum akibat pemberian senyawa DHPP, maka diduga senyawa DHPP memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor histamin. Aktivitas antagonisme tersebut dapat diukur dengan membandingkan nilai pD_2 histamin dengan dan tanpa praperlakuan dari senyawa DHPP. Berdasarkan jenis antagonisme dan nilai parameter antagonis (pA_2) senyawa DHPP terhadap reseptor histamin dapat diukur dan diidentifikasi dengan menggunakan analisa Schild-Plot. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa senyawa DHPP dengan kadar 10 dan 20 μM dapat menggeser kurva hubungan konsentrasi agonis dengan % respon kontraksi ke kanan. Pergeseran kurva ke kanan menandakan bahwa senyawa yang diujikan dapat menghambat atau bersifat antagonis.

Respon kontraksi otot polos ileum 100% masih dapat tercapai dalam konsentrasi 3×10^{-4} M. Pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi histamin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos ileum tersaji pada gambar 5. Pada praperlakuan senyawa DHPP 10 μM , respon

kontraksi bahkan belum terlihat sampai pada pemberian histamin kadar 3×10^{-6} M. Hal ini berbeda dengan praperlakuan senyawa DHPP $20 \mu\text{M}$, respon kontraksi mulai terlihat pada kadar histamin lebih rendah yaitu 3×10^{-5} M.



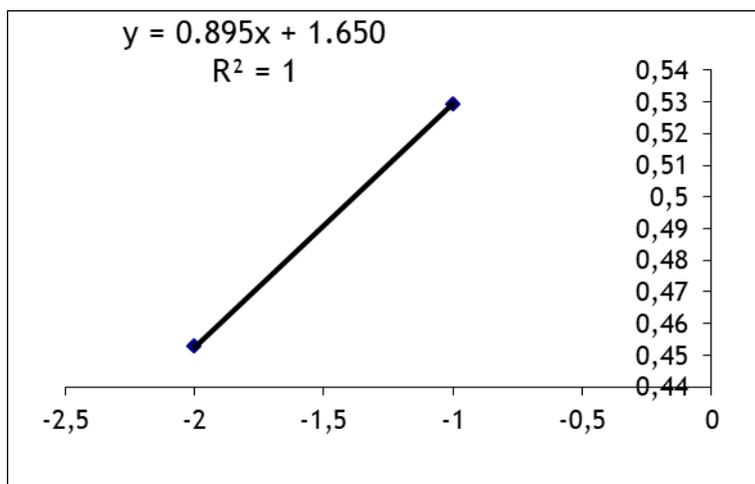
Gambar 5. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian senyawa DHPP 10 dan $20 \mu\text{M}$. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n=5 –8).

Besar nilai pD_2 kelompok kontrol, senyawa DHPP $10 \mu\text{M}$, senyawa DHPP $20 \mu\text{M}$ tersebut berturut-turut adalah sebesar 5,84; 5,54 dan 5,49. Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, Penurunan nilai pD_2 kelompok senyawa DHPP $20 \mu\text{M}$ bermakna signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Sedangkan nilai pD_2 untuk perlakuan senyawa DHPP $10 \mu\text{M}$ tidak berbeda signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Data

penurunan nilai pD_2 tersebut tersaji pada Tabel 4. Penurunan nilai pD_2 ini menunjukkan bahwa senyawa DHPP memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor histamin. Kemudian, dilakukan penetapan tipe antagonisme senyawa DHPP dengan menggunakan analisis Schild-Plot. Dari analisis ini didapatkan persamaan Schild-Plot $y = 0,895x + 1,650$. Berdasarkan nilai slope dari persamaan Schild-Plot (0,895) nilainya mendekati angka 1,00, sehingga diketahui aktivitas antagonisme dari senyawa DHPP pada reseptor histamin bersifat kompetitif. Nilai pA_2 senyawa DHPP sebagai antagonis kompetitif dapat ditentukan dari nilai intersep persamaan *Schild-plot*, yaitu sebesar 1,650. Untuk memastikan kekuatan interaksi antara senyawa DHPP dengan reseptor histamin sebagai antagonis kompetitif.

Tabel 4. Pergeseran nilai pD_2 histamin karena pengaruh senyawa DHPP 10 dan 20 μM . nilai pD_2 disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 4 - 10$). (*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terhadap nilai pD_2 h histamin/kontrol, setelah diuji dengan *ANOVA* satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %.

No	Kelompok perlakuan	pD_2	Emaks
1	Kontrol Histamin	5,84	$100 \pm 0,00$
2	Senyawa DHPP 100 μM	5,54*	$100 \pm 0,00$
3	Senyawa DHPP 200 μM	5,49*	$100 \pm 0,00$



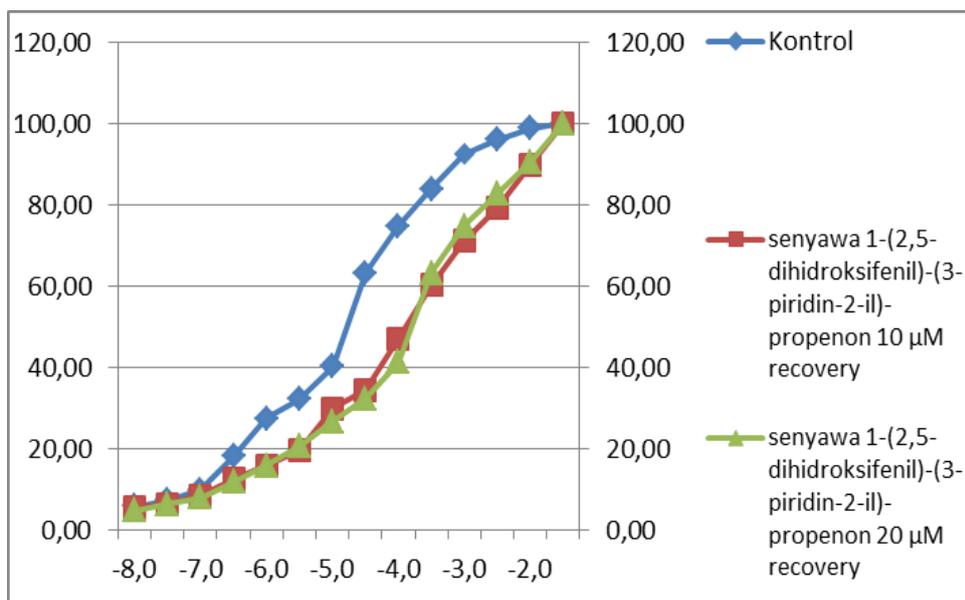
Gambar 6. Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis (pA_2) senyawa DHPP terhadap reseptor histamin. Sebagai sumbu x adalah nilai logaritma konsentrasi senyawa DHPP (Log. M) dan sumbu y adalah nilai logaritma $((A'/A)-1)$, dimana A adalah nilai D50 histamin tanpa pemberian senyawa DHPP dan A' adalah nilai D50 histamin dengan pemberian senyawa DHPP.

4. Uji Reversibilitas senyawa DHPP terhadap Reseptor Histamin Ileum.

Uji reversibilitas senyawa DHPP terhadap reseptor H_1 dilakukan untuk mengetahui kemampuan disosiasi ikatan senyawa obat dengan reseptor H_1 otot polos ileum. Untuk melepaskan ikatan senyawa tersebut, dilakukan pencucian otot polos ileum dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap 10 menit selama 30 menit. Data yang diperoleh dari tahapan ini adalah kurva % respon kontraksi uji reversibilitas dengan konsentrasi 10 μ M dan 20 μ M (Gambar 7). Pada Gambar 7, terlihat profil kurva respon kontraksi kelompok konsentrasi 10 dan 20 μ M relatif sama. Namun kurva kelompok senyawa DHPP 20 μ M berbeda jika dengan kurva kelompok kontrol. Oleh karena itu diketahui bahwa respon kontraksi maksimal otot polos ileum semua kelompok masih dapat dicapai pada konsentrasi

histamin 3×10^{-4} M. Pergeseran nilai pD_2 histamin pada uji reversibilitas senyawa DHPP tersaji Tabel 5. Nilai pD_2 histamin mengalami penurunan yang signifikan pada saat uji reversibilitas senyawa DHPP. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa, dengan pencucian setiap 10 menit selama 30 menit ikatan senyawa DHPP dengan reseptor H_1 masih belum terlepas total.

Gambar 7. Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum terisolasi pada uji reversibilitas senyawa DHPP 10 dan 20 μ M terhadap reseptor H_1 . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi histamine (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n=4-8)



No	Kelompok perlakuan	pD ₂	Emaks
1	Kontrol Histamin	5,84	100 ± 0,00
2	Senyawa DHPP 100 µM	5,87	100 ± 0,00
3	Senyawa DHPP 200 µM	5,71*	100 ± 0,00

Tabel 5. Pergeseran nilai pD₂ histamin karena pengaruh senyawa DHPP 10 dan 20 µM. nilai pD₂ disajikan dalam bentuk rata-rata ± SEM (n = 4 – 10). (*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna (p<0,05) terhadap nilai pD₂ h histamin/kontrol, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %.

G. Pembahasan

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon termasuk senyawa alkaloid. Alkaloid digolongkan berdasarkan struktur kimianya. Alkaloid golongan tropan dapat digunakan sebagai antispasmodik, antikolinergik, antiasma dan midriatik (Wibowo, 2013).

Penelitian ini akan menguji aktivitas farmakologi senyawa DHPP sebagai antispasmodik dengan membuktikan aktivitas antagonis senyawa DHPP pada reseptor H₁. Reseptor tersebut diketahui banyak terdistribusi pada ileum, dan berfungsi mengatur proses kontraksi dan relaksasi. Penelitian aktivitas senyawa DHPP sebagai antagonis reseptor H₁ ini dilakukan dengan menggunakan otot polos ileum dalam media larutan *buffer tyrode* pada alat organ terisolasi. Metode organ terisolasi adalah suatu metode dalam percobaan farmakologi yang dapat digunakan untuk menganalisis hubungan konsentrasi dengan respon suatu senyawa obat. Dengan metode ini, konsentrasi agonis dan antagonis reseptor pada tingkat jaringan dapat diketahui secara pasti. Metode ini mempunyai kemampuan

untuk mengukur efek sampai pada efek dengan intensitas maksimum. Hal ini tidak sepenuhnya dapat dilakukan ketika menggunakan organisme utuh (pengujian secara *in vivo*). Selain memiliki beberapa kelebihan, metode ini memiliki beberapa kelemahan yaitu *buffer tyrode* yang digunakan tidak sepenuhnya sesuai dengan larutan fisiologis tubuh, sehingga apabila terlalu lama maka akan mematikan jaringan (Lullman *et al.*, 2000).

Selain itu, isolasi organ dalam alat ini akan mengakibatkan hilangnya fungsi regulasi fisiologis pada organ tersebut. Fungsi regulasi dari enzim yang terlibat dalam degradasi histamin yang merupakan induktor kontraksi otot polos ileum juga akan hilang pada saat fase ini. Pada akhirnya, respon kontraksi-relaksasi otot polos ileum yang merupakan fungsi homeostasis normal pada organ ini tidak terbaca lagi pada detektor. Ketika histamin berinteraksi dengan reseptor H₁ ileum, maka akan terjadi kontraksi otot polos ileum. Alkaloid senyawa DHPP dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor H₁ apabila mampu mengurangi potensi histamin dalam menginduksi respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi (Lullmann *et al.*, 2000).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa DHPP 10 dan 20 μM mampu menghambat respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi histamin. Hal ini ditandai dengan terjadinya pergeseran histamin kurva respon kontraksi otot polos ileum terisolasi ke arah kanan dengan pola tergantung dosis. Selain itu juga terjadi penurunan harga PD₂ senyawa DHPP dengan dosis 10 μM dan

20 μM secara berturut-turut dari 5,84 menjadi 5,54 dan 5,49. Pada kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos ileum, respon kontraksi maksimum masih dapat tercapai pada pemberian histamin konsentrasi tinggi. meskipun ada pengaruh antagonis, pemberian agonis dengan konsentrasi yang lebih besar akan tetap mampu memicu respon maksimum.

Mekanisme ini memperlihatkan persaingan antara DHPP dengan histamin untuk menduduki reseptor histamin. Senyawa DHPP dapat menduduki tempat ikatan yang sama dengan histamin pada sisi aktif reseptor sel target, tanpa mengakibatkan terjadinya perubahan di dalam sel (kontraksi). Pemberian histamin dengan konsentrasi tertinggi pada reseptor akan menghasilkan respon maksimum setelah sebelumnya diturunkan oleh senyawa DHPP. Hal ini merupakan salah satu ciri khas dari antagonis kompetitif. Aktivitas senyawa DHPP sebagai antagonis kompetitif diperkuat oleh hasil analisa Schild-Plot, dimana nilai *slope* kurva Schild-Plot yang dihasilkan mendekati angka satu (0,895). Berdasarkan percobaan dengan organ terisolasi ini juga diketahui afinitas senyawa DHPP bersifat relatif lemah terhadap reseptor histamin dengan nilai PA_2 sebesar 1,650, sehingga diperkirakan potensi senyawa DHPP sebagai antagonis reseptor H_1 tidak terlalu tinggi. Kemudian dari hasil uji reversibilitas diketahui bahwa ikatan senyawa DHPP terhadap reseptor H_1 masih belum terdisosiasi total apabila dilakukan pencucian menggunakan *buffer tyrode* setiap 10 menit selama 30 menit.