

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil penelitian dan pembahasan

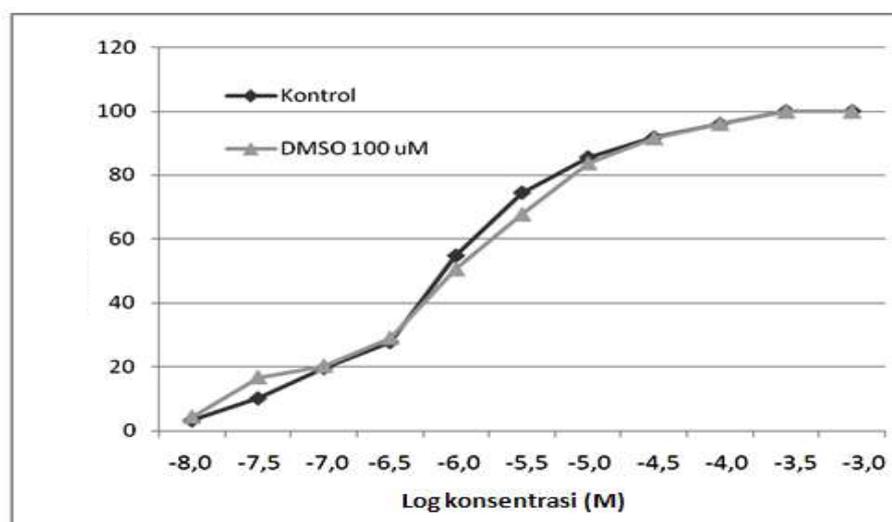
1. Uji pelarut DMSO terhadap kontraksi otot polos uterus

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon adalah senyawa sintetis yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon telah diuji secara *invivo* dengan metode pengukuran volume edema kaki tikus terinduksi karagenin. Metode ini sering digunakan untuk pengujian antiinflamasi secara akut. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon juga diduga memiliki aktivitas antagonisme terhadap reseptor ACh-M₃ sehingga penelitian ini ditujukan untuk mengamati pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon konsentrasi 10 μ M dan 20 μ M terhadap kontraksi otot polos uterus marmut terisolasi yang diinduksi oleh asetilkolin. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO), sehingga penelitian ini memerlukan uji pelarut untuk menjamin bahwa pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap kontraksi otot polos uterus hanya disebabkan oleh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon saja. Sebagai uji pendahuluan dilakukan uji pengaruh DMSO terhadap kontraksi otot polos uterus yang diinduksi oleh asetilkolin. Jumlah DMSO yang digunakan adalah sebanyak 100 μ L yang disesuaikan dengan volume maksimal

pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke dalam *organ bath*. Pengaruh DMSO terhadap otot polos uterus yang diinduksi oleh asetilkolin, dan berikut pergeseran nilai pD_2 tersaji pada tabel 2.

Pemberian DMSO menggeser kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos uterus dan menurunkan nilai rata-rata pD_2 asetilkolin dari 6,12 menjadi 6,09.

Meskipun demikian, berdasarkan uji t berpasangan ($n=5$) penurunan nilai pD_2 asetilkolin tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$), sehingga disimpulkan pelarut DMSO 100 μL tidak mempengaruhi kontraksi otot polos uterus yang diinduksi oleh asetilkolin.



Gambar 5. Pengaruh DMSO terhadap Respon Kontraksi Otot Polos Uterus yang diinduksi Asetilkolin. Kurva hubungan konsentrasi asetilkolin terhadap respon kontraksi otot polos uterus, dengan atau tanpa pengaruh DMSO 100 μM ($n=5$, rata-rata \pm SEM)

Tabel 2. Nilai rata-rata pD_2 asetilkolin karena pengaruh DMSO 100 μ L (n=5, rata-rata \pm SEM). Berdasarkan uji signifikansi dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95 %, tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p>0,05$) antara pD_2 kontrol dan DMSO

No	Kelompok perlakuan	pD_2	Emaks (%)
1.	Kontrol Asetilkolin	6,09 \pm 0,05	100 \pm 0,00
2.	DMSO 100 μ M	6,12 \pm 0,04	100 \pm 0,00

2. Uji Senyawa Atropin

Atropin memiliki afinitas kuat terhadap reseptor muskarinik, dimana obat ini terikat secara kompetitif, sehingga mengantagonis asetilkolin terikat pada tempatnya di reseptor muskarinik. Atropin menyekat reseptor muskarinik baik di sentral maupun di saraf tepi. Kerja obat ini berlangsung sekitar 4 jam kecuali bila ditetaskan ke dalam mata, dapat bekerja sampai berhari-hari.

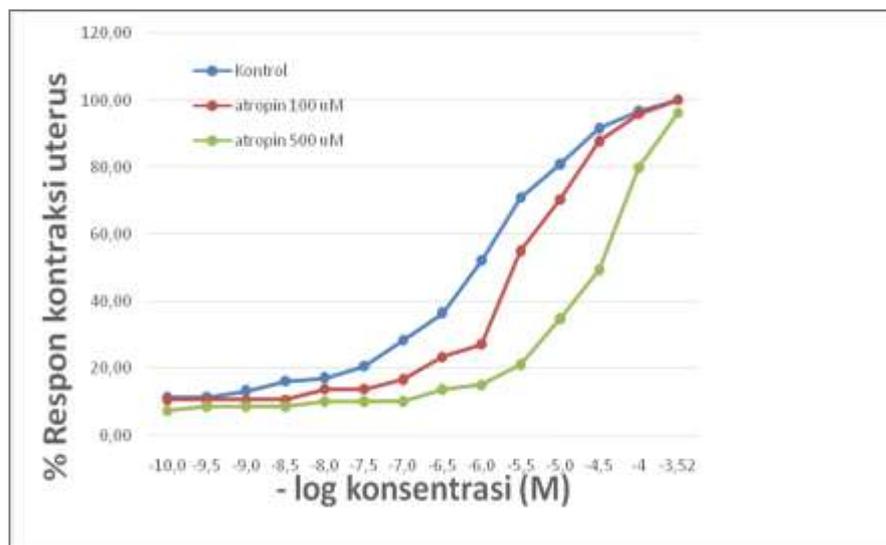
Hambatan oleh atropin bersifat *reversible* dan dapat diatasi dengan pemberian asetilkolin dalam jumlah berlebihan atau pemberian antikolinesterase. Atropin memblok asetilkolin endogen maupun eksogen, tetapi hambatannya jauh lebih kuat terhadap yang eksogen. Pada uterus yang innervasi otonomnya berbeda dari otot polos lainnya, tidak terlihat relaksasi, sehingga atropin hampir tidak bermanfaat untuk pengobatan nyeri haid.

Uji atropin ini bertujuan untuk membandingkan antara atropin dengan senyawa uji yaitu senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon, apakah memiliki aktifitas yang sama dalam menghambat asetilkolin pada resptor ACh-M₃.

a. Aktivitas Atropin

Pada uji kali ini digunakan atropin dengan konsentrasi sebesar 10 μM dan 50 μM . Atropin tersebut diberikan 10 menit sebelum pemberian seri kadar asetilkolin. Dari uji ini akan didapat data berupa kurva hubungan antara seri konsentrasi asetilkolin dengan % respon kontraksi otot polos yang terdapat pada uterus yang terisolasi dalam media larutan berupa *buffer tyrode*. Apabila terjadi pergeseran % respon kontraksi otot polos uterus akibat pemberian Atropin, maka diduga atropin memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh-M₃. Aktivitas antagonisme tersebut dapat diukur dengan membandingkan nilai pD₂ asetilkolin dengan dan tanpa praperlakuan Atropin. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa atropin dengan kadar 10 μM dan 50 μM dapat menggeser kurva hubungan konsentrasi agonis dengan % respon kontraksi ke kanan. Pergeseran kurva ke kanan menandakan bahwa atropin dapat menghambat atau bersifat antagonis. Pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos uterus tersaji pada gambar 6. Besar nilai pD₂ kelompok kontrol, atropin 10 μM , atropin 50 μM tersebut berturut-turut adalah sebesar 6,19; 5,6 dan 4,71. Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, Penurunan nilai pD₂ kelompok atropin 50 μM dan 10 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$) yaitu berbeda signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Data penurunan nilai pD₂ tersebut tersaji pada tabel 3. Penurunan nilai pD₂ ini menunjukkan

bahwa atropin memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh-M₃. Sedangkan berdasarkan uji *docking* molekuler dengan menggunakan *Autodock*, atropin ditopang oleh beberapa ikatan asam amino THR 170, TYR 166, PHE 167, ARG 171.



Gambar 6. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos uterus terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian atropin 10 μ M dan 50 μ M. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 5 – 8).

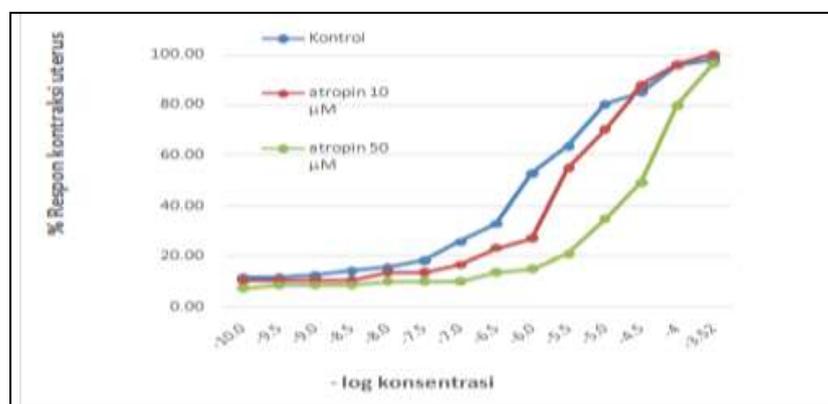
Tabel 3. Pergeseran nilai pD₂ asetilkolin karena pengaruh atropin 10 dan 50 μ M. Nilai pD₂ disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 4 – 10). (*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna (p<0,05) terhadap nilai pD₂ asetilkolin/kontrol, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%

No	Kelompok perlakuan	pD ₂	Emaks
1	Kontrol asetilkolin	6,19	100 \pm 0,00
2	Atropin 10 μ M	5,6*	100 \pm 0,00
3	Atropin 50 μ M	4,71*	100 \pm 0,00

b. Uji Reversibilitas Atropin

Uji reversibilitas atropin terhadap reseptor ACh-M₃ dilakukan untuk mengetahui kemampuan disosiasi ikatan atropin dengan reseptor ACh-M₃ otot polos uterus. Untuk melepaskan ikatan atropin, dilakukan pencucian otot polos uterus dengan penggantian larutan *buffer tyrode* setiap lima menit selama 30 menit. Data yang diperoleh dari tahapan ini adalah kurva % respon kontraksi uji reversibilitas atropin 10 dan 50 μ M (gambar 7).

Pada gambar 7, terlihat profil kurva respon kontraksi kelompok atropin 10 dan 50 μ M relatif sama. Kurva kelompok atropin 10 μ M jika dibandingkan dengan kurva kelompok kontrol juga relatif sama.



Gambar 7. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin reversibilitas terhadap % respon kontraksi otot polos uterus terisolasi pada uji reversibilitas atropin 10 dan 50 μ M terhadap reseptor ACh M₃. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin(kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 4 - 8).

Besar nilai pD_2 kelompok kontrol, atropin 10 μM , atropin 50 μM tersebut berturut-turut adalah sebesar 6,08; 5,6 dan 4,71. Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, Penurunan nilai pD_2 kelompok atropin 50 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$) Nilai pD_2 asetilkolin mengalami penurunan yang signifikan pada saat uji reversibilitas senyawa atropin. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa, dengan pencucian setiap 10 menit selama 30 menit ikatan atropin dengan reseptor ACh- M_3 masih belum terlepas total.

Tabel 4. Pergeseran nilai pD_2 asetilkolin reversibilitas karena pengaruh atropin 10 dan 50 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 asetilkolin/kontrol, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%

No	Kelompok perlakuan	pD_2	Emaks
1	Kontrol asetilkolin	6,08	100 \pm 0,00
2	Atropin 50 μM	4,71 *	100 \pm 0,00
3	Atropin 10 μM	5,6	100 \pm 0,00

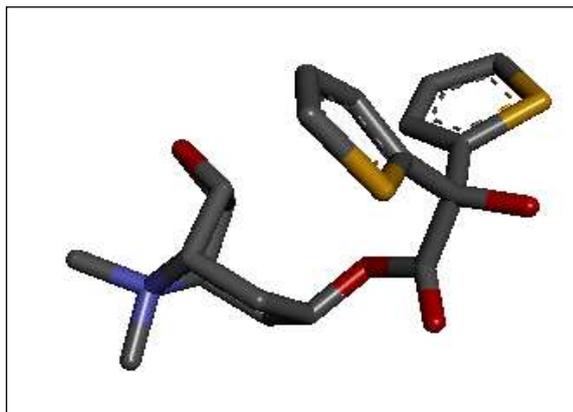
3. Pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor asetilkolin

Reseptor ACh- M_3 diketahui berperan dalam mekanisme kontraksi otot polos, dan reseptor ini dapat ditemukan pada uterus marmut betina.

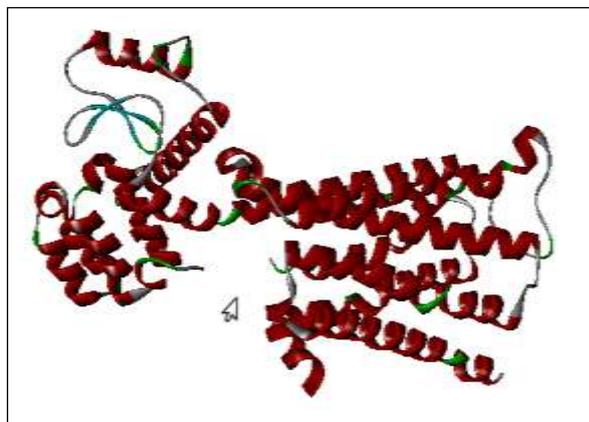
a. *Docking* molekuler senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon pada reseptor ACh- M_3

Tahapan pertama yang harus dipenuhi pada *docking molecular* senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke reseptor

ACh-M₃ adalah validasi *protocol docking* yang akan digunakan. Pada validasi ini dilakukan proses *redocking Native ligand* (Tiotropium) terhadap reseptor ACh-M₃. Dari hasil validasi diperoleh nilai RMSD 1,5000 dengan skor *docking* -9,49. Sehingga dapat diketahui protokol *docking* pada reseptor ACh-M₃ ini bersifat valid. Visualisasi hasil validasi *docking* molekuler pada reseptor ACh-M₃ berikut skor RMSDnya dapat dilihat pada gambar 8. Protokol *docking* ini selanjutnya dapat digunakan untuk melakukan *docking* ligan ACh-M₃ lainnya terhadap reseptor ACh-M₃.

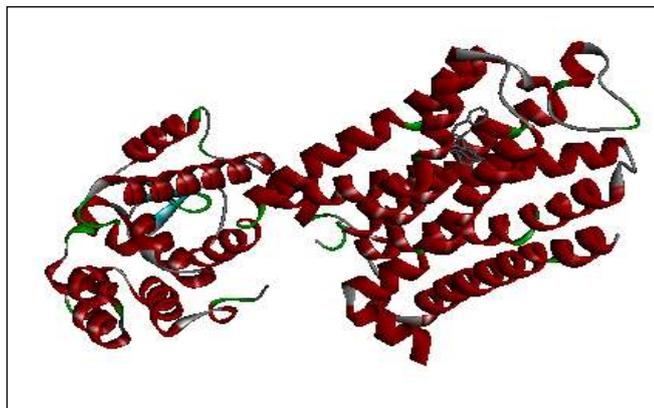


Gambar 8. Visualisasi validasi docking molekuler tiotropium (4DAJ) pada reseptor ACh-M₃. Struktur molekul tiotropium yang saling berhimpitan (*nicely aligned*) menggambarkan *protocol docking* yang digunakan valid (RMSD: 1,5000 ; skor *docking*: -9,49



Gambar 9. Struktur sekunder molekul reseptor ACh-M₃

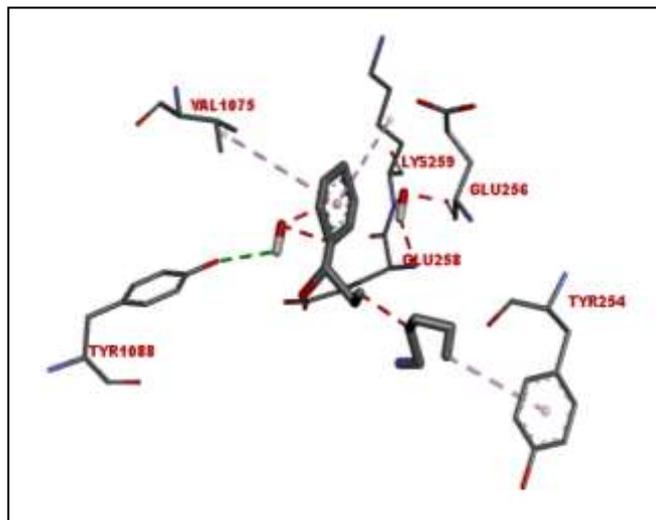
Untuk melihat perbandingan kekuatan ikatan masing-masing ligan terhadap reseptor ACh-M₃, dapat dilakukan dengan membandingkan skor *docking*. Gambar 10 merupakan visualisasi *docking* senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke reseptor ACh-M₃. Rekapitan skor *docking* ligan-ligan ACh- M₃ tersaji pada tabel 5. Nilai skor *docking* yang semakin negatif dari suatu ligan menandakan ikatannya terhadap reseptor ACh-M₃ semakin kuat. Dari data energi ikatan diketahui bahwa energi ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke reseptor agonis ACh-M₃ adalah kuat. Begitu pula apabila dibandingkan dengan atropin energi ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon lebih kuat. Dapat dilihat pada gambar 11 senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon berdasarkan uji *docking* molekuler dengan menggunakan *Autodock*, senyawa tersebut ditopang oleh beberapa ikatan asam amino VAL 1075, LYS 259, GLU 256, GLU 258, TYR 254, TYR 1088. Sedangkan Native ligand ditopang oleh beberapa asam amino ARG 1096, ALA 1093, GLU 258, THR 257, TYR 254, LYS 255.



Gambar 10. Posisi senyawa 1-(2,5- dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)- propenonketika terikat ke reseptor ACh-M₃

Tabel 5. Skor *docking* senyawa 1-(2,5- dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)- propenon dan beberapa antagonis reseptor ACh-M₃. Terlihat energi ikatan senyawa 1-(2,5- dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)- propenon (-7,35) relatif lebih lemah dibandingkannative ligand (-9,49), namun lebih kuat jika dibandingkan dengan atropin (-5,36).

No	Ligan	Keterangan	Energi ikatan ligan pada reseptor ACh--M ₃
1	Asetilkolin	Agonis ACh--M ₃	-2,44
2	Senyawa 1-(2,5 dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il) propenon	Senyawa uji	-7,35
3	Tiotropium	Native ligand	-9,49
4	Atropin	Antagonis ACh--M ₃	-5,36

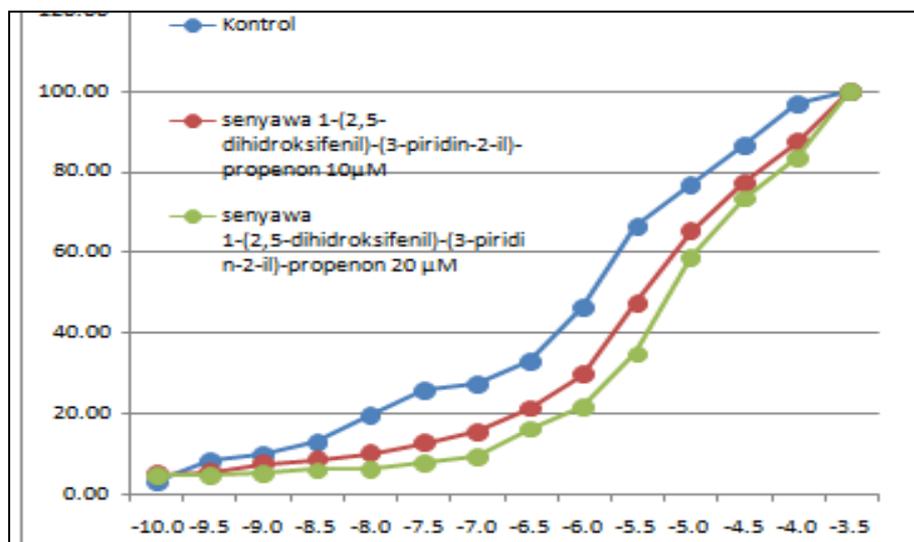


Gambar 11. Posisi senyawa 1-(2,5- dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il) propenon ketika terikat ke reseptor ACh-M₃. Visualisasi menggunakan *software* VMD. Ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon (warna abu) ke reseptor ACh-M₃ ditopang oleh asam amino Val 1075, Tyr 254, Tyr 1088, Glu 256, Glu 258 dan Lys 259.

b. Pengaruh Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap Kontraksi Otot Polos Uterus Akibat Pemberian Seri Konsentrasi Asetilkolin

Digunakan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan konsentrasi sebesar 10 dan 20 μM . Senyawa tersebut diberikan 10 menit sebelum pemberian seri kadar asetilkolin. Dari uji ini akan didapat data berupa kurva hubungan antara seri konsentrasi asetilkolin dengan % respon kontraksi otot polos yang terdapat pada uterus yang terisolasi dalam media larutan berupa *buffer tyrode*. Apabila terjadi pergeseran % respon kontraksi otot polos uterus akibat pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon, maka diduga senyawa tersebut memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh-M₃. Aktivitas antagonisme tersebut dapat diukur dengan

membandingkan nilai pD_2 asetilkolin dengan dan tanpa praperlakuan dari senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Berdasarkan jenis antagonisme dan nilai parameter antagonis (pA_2) senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor asetilkolin dapat diukur dan diidentifikasi dengan menggunakan analisa Schild-Plot. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 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 uterus 100% masih dapat tercapai dalam konsentrasi $3 \times 10^{-4} M$. Pergeseran kurva hubungan seri konsentrasi asetilkolin terhadap rata-rata % respon kontraksi otot polos uterus tersaji pada gambar 12. Pada praperlakuan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μM , respon kontraksi bahkan belum terlihat sampai pada pemberian asetilkolin kadar $3 \times 10^{-6} M$. Hal ini berbeda dengan praperlakuan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM , respon kontraksi mulai terlihat pada kadar asetilkolin lebih rendah yaitu $3 \times 10^{-5} M$.



Gambar 12. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos uterus terisolasi, baik tanpa atau dengan pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 dan 20 μM . Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin (kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM ($n = 5 - 8$).

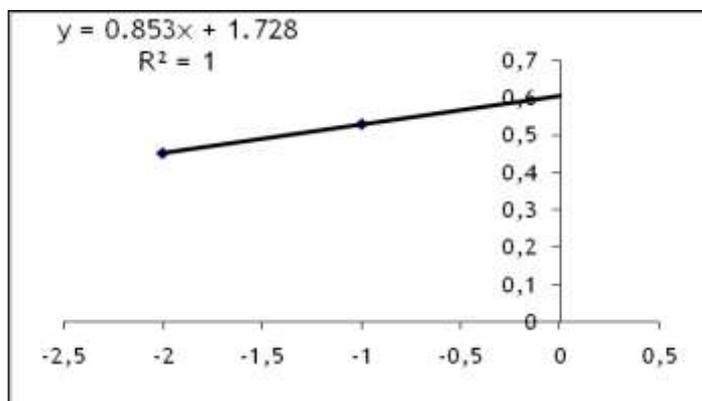
Besar nilai pD_2 kelompok kontrol, senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μM , senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM tersebut berturut-turut adalah sebesar 6,13; 5,54 dan 5,49. Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, Penurunan nilai pD_2 kelompok senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM bermakna signifikan secara statistik ($p < 0,05$). Sedangkan nilai pD_2 untuk perlakuan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μM tidak berbeda signifikan bila dibandingkan dengan kontrol. Data penurunan nilai pD_2 tersebut tersaji pada tabel 6. Penurunan nilai pD_2 ini menunjukkan bahwa senyawa 1-(2,5-

dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh-M₃.

Kemudian, dilakukan penetapan tipe antagonisme senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan menggunakan analisis Schild-Plot. Dari analisis ini didapatkan persamaan Schild-Plot $y = 0,853x + 1,728$. Berdasarkan nilai slope dari persamaan Schild-Plot (0,853) nilainya mendekati angka 1,00, sehingga diketahui aktivitas antagonisme dari senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon pada reseptor ACh-M₃ bersifat kompetitif. Nilai pA₂ senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis kompetitif dapat ditentukan dari nilai intersep persamaan Schild-plot, yaitu sebesar 1,728. Untuk memastikan kekuatan interaksi antara senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan reseptor ACh-M₃ sebagai antagonis kompetitif dilakukan *docking* molekuler menggunakan program *Autodock*.

Tabel 6. Pergeseran nilai pD₂ asetilkolin karena pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 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 asetilkolin atau control, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

No	Kelompok perlakuan	pD ₂	Emaks
1	Kontrol asetilkolin	6,13	100 ± 0,00
2	Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 100 µM	5,54	100 ± 0,00
3	Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 200 µM	5,49*	100 ± 0,00



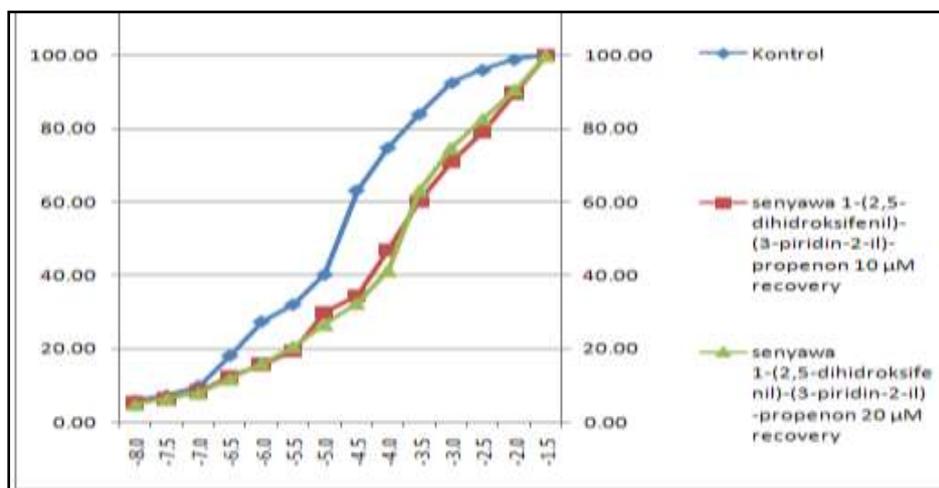
Gambar 13. Kurva Schild-Plot perhitungan parameter antagonis (pA_2) senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor ACh- M_3 . Sebagai sumbu x adalah nilai logaritma konsentrasi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon (Log. M) dan sumbu y adalah nilai logaritma $((A'/A)-1)$, dimana A adalah nilai D50 asetilkolin tanpa pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dan A' adalah nilai D50 asetilkolin dengan pemberian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon.

c. Uji Reversibilitas Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap Reseptor ACh- M_3 uterus

Uji reversibilitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor ACh- M_3 dilakukan untuk mengetahui kemampuan disosiasi ikatan senyawa obat dengan reseptor ACh- M_3 otot polos uterus. Untuk melepaskan ikatan senyawa tersebut, dilakukan pencucian otot polos uterus dengan penggantian larutan *buffer tyrodes* setiap 10 menit selama 30 menit. Data yang diperoleh dari tahapan ini adalah kurva % respon kontraksi uji reversibilitas dengan konsentrasi 10 μM dan 20 μM (gambar 14).

Pada gambar 14, terlihat profil kurva respon kontraksi kelompok konsentrasi 10 dan 20 μM relatif sama. Namun kurva kelompok senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20

μM berbeda jika dengan kurva kelompok kontrol. Oleh karena itu diketahui bahwa, Respon kontraksi maksimal otot polos uterus semua kelompok masih dapat dicapai pada konsentrasi asetilkolin $3 \times 10^{-4} \text{M}$. Pergeseran nilai pD_2 asetilkolin pada uji reversibilitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon tersaji tabel 7. Nilai pD_2 asetilkolin mengalami penurunan yang signifikan pada saat uji reversibilitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa, dengan pencucian setiap 10 menit selama 30 menit ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan reseptor ACh-M₃ masih belum terlepas total.



Gambar 14. Kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin reversibilitas terhadap % respon kontraksi otot polos uterus terisolasi pada uji reversibilitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 dan 20 μM terhadap reseptor ACh M₃. Persentase respon kontraksi 100 % diukur berdasarkan kontraksi maksimal yang dicapai oleh seri konsentrasi asetilkolin(kontrol). Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata \pm SEM (n = 4 - 8)

Tabel 7. Pergeseran nilai pD_2 asetilkolin reversibilitas karena pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 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 asetilkolin atau control, setelah diuji dengan ANOVA satu jalan, dilanjutkan dengan uji LSD pada taraf kepercayaan 95%.

No	Kelompok perlakuan	pD_2	Emaks
1	Kontrol asetilkolin	6,14	$100 \pm 0,00$
2	Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 100 μM	5,87	$100 \pm 0,00$
3	Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 200 μM	5,71*	$100 \pm 0,00$

B. Pembahasan

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon termasuk senyawa sintesis turunan kalkon. Penelitian ini menguji tentang aktivitas farmakologi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antikolinergik dengan membuktikan aktivitas antagonis senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon pada reseptor ACh-M₃. Reseptor tersebut diketahui banyak terdistribusi pada uterus, dan berfungsi mengatur proses kontraksi dan relaksasi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan memperluas informasi mengenai target reseptor untuk mengetahui aktifitas antagonisme terhadap reseptor ACh-M₃ pada otot polos uterus terisolasi dengan metode *in vitro* dan *in silico*.

Penelitian aktivitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis reseptor ACh-M₃ ini dilakukan dengan menggunakan otot polos uterus 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. Larutan *buffer tyrode* yang digunakan tidak sepenuhnya sesuai dengan larutan fisiologis

tubuh, sehingga apabila terlalu lama maka akan mematikan jaringan. Selain itu, isolasi organ dalam alat ini akan mengakibatkan hilangnya fungsi regulasi fisiologis pada organ tersebut (Lullmann *et al.*, 2000).

Ketika asetilkolin berinteraksi dengan reseptor ACh-M₃ uterus, maka akan terjadi kontraksi otot polos uterus. Mekanisme molekuler terjadinya Kontraksi otot polos diakibatkan oleh pelepasan Ca²⁺ dari retikulum sarkoplasma/endoplasma (*calcium-store*). Apabila terjadi rangsangan suatu agonis terhadap reseptor terhubung protein G, maka akan terjadi Pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* terjadi melalui melalui jalur fosfolipase C (PLC). Pelepasan Ca²⁺ dari *calcium-store* mengakibatkan peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler dan akhirnya akan menginduksi terjadinya kontraksi otot polos.

Dilakukan uji pembanding. Obat pembanding yang digunakan adalah atropin. Atropin adalah senyawa alam yang bersifat antagonis reseptor kolinergik (antikolinergik). Salah satu indikasinya adalah meringankan gejala gangguan pada gastrointestinal yang ditandai dengan spasme otot (antispasmodic). Uji pembanding ini bertujuan untuk mengetahui apakah metode yang digunakan valid, sesuai dengan teori bahwa dengan metode ini atropin menunjukkan aktivitas sebagai antikolinergik khususnya pada uterus (antispasmodik). Pada penelitian kali ini dilakukan optimasi dosis untuk mendapatkan dosis optimal yaitu dosis 10 µM dan 50 µM mampu menghambat respon kontraksi otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi asetilkolin. Dari hasil penelitian diketahui besar nilai pD₂ kelompok kontrol sebesar 6,19; Atropin 10 µM sebesar

5,56 dan Atropin 50 μM sebesar 4,71 . Apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, Penurunan nilai pD_2 kelompok Atropin 10 μM dan Atropin 20 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Penurunan nilai pD_2 ini menunjukkan bahwa Atropin memiliki aktivitas antagonisme pada reseptor ACh-M₃ dan metode yang digunakan valid.

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dikatakan memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor ACh-M₃ apabila mampu mengurangi potensi asetilkolin dalam menginduksi respon kontraksi otot polos uterus marmut terisolasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μM dan 20 μM mampu menghambat respon kontraksi otot polos uterus marmut terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi asetilkolin. Hal ini ditandai dengan terjadinya pergeseran asetilkolin kurva respon kontraksi otot polos uterus terisolasi ke arah kanan dengan pola tergantung dosis. Selain itu juga terjadi penurunan harga pD_2 senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan dosis 10 μM dan 20 μM secara berturut-turut dari 6,13 menjadi 5,54 dan 5,49. Pada kurva hubungan logaritma konsentrasi asetilkolin terhadap % respon kontraksi otot polos uterus, respon kontraksi maksimum masih dapat tercapai pada pemberian asetilkolin konsentrasi tinggi. meskipun ada pengaruh antagonis, pemberian agonis dengan konsentrasi yang lebih besar akan tetap mampu memicu respon maksimum.

Mekanisme ini memperlihatkan persaingan antara senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan asetilkolin untuk menduduki

reseptor asetilkolin. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dapat menduduki tempat ikatan yang sama dengan asetilkolin pada sisi aktif reseptor sel target, tanpa mengakibatkan terjadinya perubahan di dalam sel (kontraksi). Pemberian asetilkolin dengan konsentrasi tertinggi pada reseptor akan menghasilkan respon maksimum kembali setelah sebelumnya diturunkan oleh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon. Hal ini merupakan salah satu ciri khas dari antagonis kompetitif. Aktivitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis kompetitif diperkuat oleh hasil analisa Schild-Plot, dimana nilai *slope* kurva Schild-Plot yang dihasilkan mendekati angka satu (0,853). Berdasarkan percobaan dengan organ terisolasi ini juga diketahui afinitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon bersifat relatif lemah terhadap reseptor asetilkolin dengan nilai pA_2 sebesar 1,728, sehingga diperkirakan potensi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis reseptor ACh-M₃ tidak terlalu tinggi. Kemudian dari hasil uji reversibilitas diketahui bahwa ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor ACh-M₃ masih belum terdisosiasi total apabila dilakukan pencucian menggunakan *buffer tyrode* setiap 10 menit selama 30 menit.

Untuk lebih mengetahui lebih dalam mengenai kekuatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor ACh-M₃, penelitian ini dilanjutkan dengan uji *in silico* yaitu *docking* dengan menggunakan program *Autodock*.

Sebelum digunakan untuk proses validasi, reseptor ACh-M₃. *Native ligand* yang digunakan untuk keperluan validasi adalah tiotropium. Senyawa ini merupakan golongan antagonis kolinergik yang memiliki inti tropan. Pada tahapan validasi ini diperoleh nilai RMSD sebesar 1,5000, dengan skor *docking* -9,49.

Apabila nilai RMSD posisi native ligand tersebut kurang dari 2,0000 maka dapat dikatakan sistem *docking* tersebut bersifat valid. Pada tahapan *docking* senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke reseptor ACh-M₃ diperoleh skor *docking* sebesar-7,35. Skor *docking* ini berada dibawah skor *native ligand*. Sehingga diketahui ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan reseptor ACh-M₃ bersifat lebih lemah jika dibandingkan dengan tiotropium.

Untuk mengetahui gambaran kekuatan ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon pada reseptor ACh-M₃ secara lebih jelas, maka dilakukan perbandingan skor *docking* terhadap beberapa antagonis ACh-M₃. Antagonis ACh-M₃ yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah atropin. Atropin adalah antagonis ACh-M₃ yang sering digunakan untuk menimbulkan efek midriasis pada otot mata, sedangkan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon memiliki aktivitas antagonis reseptor ACh-M₃ pada otot polos uterus. Apabila dibandingkan skor *docking* dengan atropin, ternyata ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan reseptor ACh-M₃ bersifat lebih kuat (skor senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon:-7,35). Skor *docking* atropin adalah -

5,36. Sedangkan apabila dibandingkan berdasarkan ikatan asam amino, senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon berikatan dengan asam amino VAL 1075, LYS 259, GLU 256, GLU 258, TYR 254, TYR 1088. *Native ligand* berikatan dengan asam amino ARG 1096, ALA 1093, GLU 258, THR 257, TYR 254, LYS 255. Dan atropin berikatan dengan asam amino THR 170, TYR 166, PHE 167, ARG 171. Berdasarkan ikatan asam amino dapat dilihat bahwa terdapat satu asam amino dengan skor yang sama pada senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dan *native* ligan yaitu asam amino TYR 254. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa dibandingkan dengan pembandingnya yaitu atropin, senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon memiliki ikatan yang lebih kuat karena berikatan dengan ikatan penting pada *native ligand*. Sehingga diprediksi pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon ke reseptor ACh-M₃ bersifat lebih kuat dibanding ikatan atropin ke reseptor ACh-M₃.

Sedangkan apabila dibandingkan dengan hasil penelitian lain yang juga meneliti tentang pengaruh senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan dosis yang sama yaitu 10 dan 20 μM , dalam mengantagonis reseptor asetilkolin otot polos ileum terisolasi. Didapatkan hasil yaitu, besar nilai pD_2 kelompok kontrol sebesar 6,66; senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 10 μM sebesar 6,05 dan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM sebesar 5,28. Penurunan nilai pD_2 kelompok senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon

10 μM dan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Hal ini memperlihatkan bahwa kadar 10 μM dan 20 μM merupakan kadar efektif senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis ACh-M₃. Nilai *slope* kurva Schild-Plot yang dihasilkan mendekati angka satu (0,853). Dari kurva Schild-Plot ini juga diperoleh nilai pA_2 sebesar 1,728. Hal ini menunjukkan afinitas senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap reseptor ACh-M₃ ileum terisolasi bersifat relatif lemah sehingga diperkirakan potensi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon sebagai antagonis reseptor ACh-M₃ tidak terlalu tinggi. Kemudian dari hasil uji reversibilitas diketahui bahwa ikatan senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 20 μM terhadap reseptor ACh M₃ masih belum terdisosiasi total apabila dilakukan pencucian menggunakan *buffer tyrode* setiap 5 menit selama 30 menit. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan dosis 10 μM dan 20 μM memiliki pengaruh atau aktivitas yang sama dalam menghambat reseptor ACh-M₃ pada otot polos uterus maupun ileum yang terisolasi.