

# KAJIAN REVERSIBILITAS INTERAKSI MARMIN TERHADAP RESEPTOR HISTAMIN H<sub>1</sub>, ASETILKOLIN MUSKARINIK Ach-M<sub>3</sub> dan β<sub>2</sub>-ADRENERGIK

Yance Anas<sup>1)</sup>, Agung Endro Nugroho<sup>2)</sup>, Sugeng Riyanto<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

<sup>2)</sup> Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

<sup>3)</sup> Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

## ABSTRAK

Penelitian terdahulu menyimpulkan bahwa marmin (7-(6',7'-dihidroksigeranil-oksi) kumarin) dapat menghambat kontraksi otot polos trachea marmut terisolasi melalui efeknya sebagai antagonis reseptor H<sub>1</sub> dan Ach-M<sub>3</sub>. Marmin juga sedikit meningkatkan efek relaksasi otot polos trachea yang diinduksi oleh isoproterenol melalui interaksinya terhadap reseptor β<sub>2</sub>-adrenergik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek reversibilitas interaksi marmin terhadap reseptor H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub> dan β<sub>2</sub>-adrenergik. Penelitian ini menggunakan metode percobaan organ terisolasi. Uji reversibilitas dilakukan setelah perlakuan marmin (10 dan 100 μM) terhadap kontraksi/relaksasi otot polos trachea yang diinduksi oleh agonis (histamin, metakolin dan isoproterenol). Otot polos trachea dicuci selama 30 menit dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit. Setelah dicapai kondisi yang stabil, selanjutnya dilakukan pengukuran kontraksi atau relaksasi kembali dengan pemberian konsentrasi bertingkat histamin ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$ ) M, metakolin ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$ ) M dan isoproterenol ( $1 \times 10^{-7}$  –  $3 \times 10^{-3}$  M). Data disajikan dalam bentuk nilai pD<sub>2</sub> (rata-rata ± SEM) yang diperoleh dari kurva hubungan negatif logaritma konsentrasi agonis yang menghasilkan setengah respon (kontraksi/relaksasi) maksimal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi marmin terhadap protein reseptor H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub>, dan β<sub>2</sub>-adrenergik otot polos trachea bersifat reversibel. Hasil analisis varian satu jalan menyimpulkan perbedaan nilai pD<sub>2</sub> histamin, metakolin dan isoproterenol sebelum dan setelah perlakuan marmin tidak bermakna secara statistik (p>0,05).

**Kata Kunci :** Farmakodinamik marmin, uji reversibilitas, reseptor H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub> dan β<sub>2</sub>-adrenergik, percobaan organ terisolasi

## ABSTRACT

Previous studies concluded that amarmin(7 - (6', 7'-dihydroxygeranyl-oxy) coumarin) shown to inhibit isolated guinea-pig tracheal smooth muscle contraction through its effect as an H<sub>1</sub>and Ach-M<sub>3</sub>receptor's antagonist. Marmin also slightly increases tracheal smooth muscle relaxation induced by isoproterenol through its interaction on β<sub>2</sub>-adrenergic receptor. The purpose of this experimental study was to evaluate the reversibility of marmin interaction on H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub> and β<sub>2</sub>-adrenergic receptors.The study conducted using in vitro isolated-trachea experimental. Reversibility studies performed after marmin (10 and 100) μM treatment on tracheal smooth muscle contraction/relaxation induced by agonists (histamine, methacholine and isoproterenol). Trachea was washed for 30minuteswith Krebs buffer solution replacement every five minutes. Furthermore, trachea contracted or relaxed with series histamine ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$ ) M; methacholine ( $10^{-8}$  –  $10^{-3}$ ) M and isoproterenol ( $10^{-7}$  –  $3.10^{-3}$ ) M. Data were expressed as mean±SEM. The pD<sub>2</sub>values are derived from the negative logarithm to base 10 of the agonist's concentration which cause a half maximal response to the contraction or relaxation.The results showed that the marmin interaction on H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub>, and β<sub>2</sub>-adrenergic receptors are reversible. One-way Anova concluded that histamine, metacholine and isoproterenol pD<sub>2</sub> value before and after marmin (10 and 100) μM treatments are not different statistically (p>0.05).

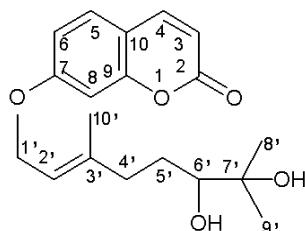
**Key Word :** Marmin reversibility studies, H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub> and β<sub>2</sub>-adrenergic receptors, isolated organ experimen

## PENDAHULUAN

Salah satu gejala alergi adalah kontraksi otot polos trachea yang mengakibatkan penyempitan saluran pernafasan. Histamin dan asetilkolin memainkan peranan penting dalam kontraksi otot polos saluran pernafasan. Aktivasi reseptor histamin ( $H_1$ ) oleh histamin dapat menginduksi penyumbatan saluran pernafasan pada subjek manusia sehat (Taylor-Clark, et.al. 2005). Begitu juga dengan asetilkolin, efek asetilkolin yang dilepaskan oleh ujung syaraf parasimpatis dan berbagai sel epitel bronkus adalah terjadinya hipereaktivitas saluran pernafasan, kontraksi otot polos, bronkokonstriksi, peningkatan sintesis dan sekresi mukus selama reaksi inflamasi, seperti yang dialami oleh para penderita asma alergi dan *chronic obstruction pulmonary disease* (COPD) (Sonar dan Renz, 2009). Oleh karena itu, salah satu strategi terapi yang dapat dilakukan dalam mengatasi gejala alergi pada saluran pernafasan adalah dengan menghambat interaksi histamin dan atau asetilkolin dengan reseptornya spesifiknya, yaitu dengan antagonis reseptor histamin (antihistamin) dan antagonis reseptor asetilkolin muskarinik (antikolinergik). Selanjutnya, untuk mempercepat efek pemulihan saluran pernafasan, otot polos saluran pernafasan direlaksasi dengan

menggunakan agonis reseptor  $\beta_2$ -adrenergik (Barnes, 1989).

Marmin (gambar 1) merupakan salah satu senyawa turunan kumarin dengan subsitusi atom O pada atom C nomor 7 struktur induk kumarin. Marmin dilaporkan sangat poten menghambat pelepasan histamin dari kultur sel RBL-2H3 melalui penghambatan  $Ca^{2+}$  uptake secara *in vitro*. Marmin juga diduga memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai antagonis reseptor histamin  $H_1$  dan antagonis reseptor asetilkolin muskarinik (Ach- $M_3$ ). Isolat marmin dari *Aurantii Fructus Immaturus* memiliki efek relaksasi terhadap ileum marmut terisolasi yang dikontraksi oleh asetilkolin dan histamin (Takase, et.al., 1994). Marmin dilaporkan menghambat kontraksi otot polos trachea marmut terisolasi melalui efeknya sebagai antagonis reseptor  $H_1$  dan Ach- $M_3$ . Marmin juga sedikit meningkatkan efek relaksasi otot polos trachea yang diinduksi oleh isoproterenol melalui interaksinya dengan reseptor  $\beta_2$ -adrenergik (Nugroho, et.al., 2011). Penelitian ini mencoba untuk menelusuri lebih lanjut tentang interaksi marmin terhadap reseptor  $H_1$ , Ach- $M_3$  dan  $\beta_2$ -adrenergik otot polos trachea terisolasi dengan cara melihat kemampuan disosiasi ikatan marmin dengan ketiga reseptor tersebut setelah dilakukannya pencucian otot polos trachea dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit.



Gambar 1. Struktur Kimia marmin atau atau (7-(6',7'-dihidroksigeranyl-oksi) kumarin)

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah marmin yang diisolasi dari kulit batang *Aegle marmelos* Correa pemberian Prof. Dr. Sugeng Riyanto, M.S., Apt., (Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta). Hewan percobaan yang digunakan adalah marmut jantan (*Cavia*

*porcellus*), berat badan antara 400 – 500 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi UGM. Bahan kimia yang digunakan adalah bufer Krebs dengan kualitas farmasetis, gas karbogen mengandung 95% oksigen dan 5% karbondioksida (PT. Aneka Gas dan Industri Semarang Cabang Yogyakarta), agonis reseptor histamin, metakolin, isoproterenol (Sigma, USA), dan akuades

(Laboratorium Kimia Instrumental, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada).

### Cara Penelitian

Penyediaan larutan uji, marmin dibuat dalam larutan stok  $2 \times 10^{-2}$  M, yaitu dengan cara menimbang marmin (BM : 332,38 g/mol) secara seksama seberat 33,2 mg dan dilarutkan ke dalam 4,994 mL DMSO. Larutan stok marmin  $2 \times 10^{-3}$  M dibuat dengan mengencerkan larutan stok marmin  $2 \times 10^{-2}$  M dipreparasi sedemikian rupa dimasukkan ke dalam alat organ bath 20,0 mL yang telah berisi larutan bufer Krebs. Uji reversibilitas dilakukan untuk melihat kemampuan organ untuk kembali pada kondisi semula, atau pada kondisi sebelum dilakukannya pengenalan histamin, metakolin dan isoproterenol (agonis reseptor).

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah mengukur respon kontraksi otot polos trachea yang diinduksi oleh seri konsentrasi histamin dan metakolin ( $10^{-8} - 10^{-3}$  M), serta respon relaksasi otot polos trachea yang diinduksi oleh isoproterenol ( $10^{-7} - 3.10^{-3}$  M) setelah dikontraksi dengan metakolin  $10^{-4}$  M. Respon kontraksi/relaksasi otot polos trachea tercatat pada rekorder. Pada tahap ini didapatkan data kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin, metakolin dan isoproterenol terhadap % respon kontraksi/relaksasi otot polos trachea (kontrol). Selanjutnya, dilakukan pencucian otot polos trachea selama 30 menit dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit.

Tahap kedua, dilakukan uji aktivitas marmin (10 dan 100  $\mu$ M). Marmin diberikan 5 menit sebelum pemberian seri konsentrasi agonis reseptor (histamin, metakolin dan isoproterenol) dan dilanjutkan dengan pemberian seri konsentrasi agonis reseptor dengan konsentrasi dan cara yang sama dengan pengukuran pertama kalinya. Tahap selanjutnya, kembali dilakukan pencucian otot polos trachea selama 30 menit dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit.

Tahap ketiga adalah uji reversibelitas marmin. Setelah dicapai kondisi yang stabil pada pencucian otot polos trachea tahap kedua, selanjutnya dilakukan pengukuran kontraksi/relaksasi otot polos trachea kembali melalui pemberian seri konsentrasi histamin, asetilkolin dan isoproterenol dengan konsentrasi dan cara yang sama pada saat

dengan larutan bufer Krebs. Sebagai senyawa uji, marmin diberikan dalam konsentrasi 10 dan 100  $\mu$ M. Larutan stok marmin konsentrasi  $2 \times 10^{-2}$  M diinjeksikan sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam *organ bath* yang telah berisi organ trachea dan larutan bufer Krebs 20,0 mL untuk mencapai marmin konsentrasi 100  $\mu$ M.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode organ terisolasi, otot polos trachea yang telah

pengukuran respon kontraksi otot polos trachea pertama kali. Pada uji reversibilitas ini, didapatkan data kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin, metakolin dan isoproterenol terhadap % respon kontraksi/relaksasi otot polos trachea. Data kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin, metakolin dan isoproterenol dengan % respon kontraksi/relaksasi otot polos trachea sebelum dan setelah perlakuan marmin (10 dan 100  $\mu$ M) kemudian dibandingkan secara statistik.

### Analisa Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini berupa data kontraksi atau relaksasi otot polos trachea yang terekam pada rekorder akibat pemberian agonis reseptor. Data tersebut diubah menjadi data persentase (%) respon kontraksi atau relaksasi terhadap respon maksimum yang dicapai kontrol. Selanjutnya, data tersebut disajikan dalam bentuk kurva hubungan antara logaritma konsentrasi agonis reseptor (histamin, metakolin, dan isoproterenol) terhadap % respon kontraksi atau relaksasi otot polos trachea. Dari kurva tersebut dihitung  $pD_2$  histamin,  $pD_2$  metakolin,  $pD_2$  isoproterenol sebelum dan setelah perlakuan marmin dan dibandingkan secara statistik. Analisa statistik yang digunakan adalah analisa varian satu jalan yang dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95%.

## HASIL PENELITIAN

Marmin telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor  $H_1$  dan  $Ach-M_3$ , dan mampu meningkatkan efek relaksasi isoproterenol pada otot polos trachea marmot terisolasi. Penelitian ini ditujukan untuk mengamati kemampuan dissosiasi ikatan marmin dengan reseptor  $H_1$ ,  $Ach-M_3$  dan  $\beta_2$ -adrenergik otot polos trachea setelah dilakukannya pencucian otot polos trachea

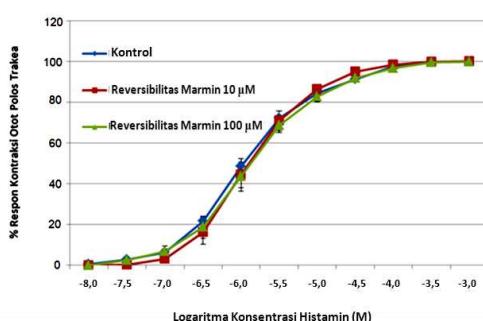
dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit.

### **Uji Reversibilitas Marmin terhadap Reseptor H<sub>1</sub> Otot Polos Trachea**

Tujuan uji reversibilitas marmin terhadap reseptor H<sub>1</sub> adalah untuk melihat kemampuan disosiasi ikatan marmin dengan reseptor H<sub>1</sub> otot polos trachea setelah dilakukannya pencucian otot polos trachea dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit. Sifat antagonisme marmin dikatakan reversibel apabila pemberian seri konsentrasi histamin setelah praperlakuan otot polos trachea terisolasi dengan marmin menghasilkan profil kurva % respon kontraksi yang persis sama dengan profil kurva sebelum praperlakuan marmin. Kurva % respon kontraksi otot polos trachea pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  dapat dilihat pada gambar 2.

Hasil uji reversibilitas menunjukkan bentuk profil kurva hubungan respon kontraksi otot polos trachea terisolasi histamin (kontrol), reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  yang

relatif sama, sehingga dapat disimpulkan marmin memiliki kemampuan disosiasi yang baik setelah berinteraksi dengan reseptor H<sub>1</sub> dan interaksi marmin dengan reseptor H<sub>1</sub> bersifat reversibel. Tidak adanya penurunan respon kontraksi maksimal otot polos trachea pada saat uji reversibilitas marmin menunjukkan bahwa pencucian otot polos trachea dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit mampu melepaskan semua ikatan marmin dengan reseptor H<sub>1</sub> otot polos trachea. Selain itu, interaksi marmin dengan reseptor H<sub>1</sub> tidak mengakibatkan kerusakan atau berkurangnya jumlah reseptor H<sub>1</sub> yang aktif pada otot polos trachea. Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> histamin pada uji reversibilitas marmin tersaji pada gambar 3. Dari hasil uji statistik, disimpulkan bahwa nilai pD<sub>2</sub> histamin tidak mengalami penurunan yang bermakna pada saat uji reversibilitas marmin, sehingga secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa marmin bertindak sebagai reversibel antagonis kompetitif terhadap reseptor H<sub>1</sub>.



**Gambar 2.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trachea terisolasi pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 8$ )

### **Uji Reversibilitas Marmin terhadap Reseptor Ach-M<sub>3</sub> Otot Polos Trachea**

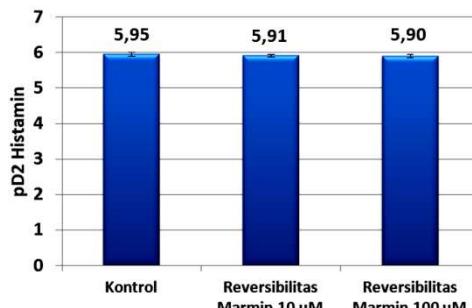
Uji reversibilitas marmin terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub> dilakukan setelah uji pengaruh praperlakuan marmin terhadap respon kontraksi otot polos trachea terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi metakolin. Sebelum uji reversibilitas dimulai, otot polos trachea dicuci dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit. Tujuan uji reversibilitas marmin terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub> adalah untuk

melihat kemampuan disosiasi ikatan marmin dengan reseptor Ach-M<sub>3</sub> otot polos trachea setelah dilakukannya pencucian otot polos trachea. Kurva % respon kontraksi otot polos trachea pada uji reversibilitas marmin (10 dan 100)  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub> dapat dilihat pada gambar 4. Pergeseran nilai pD<sub>2</sub> metakolin pada uji reversibilitas marmin terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub> tersaji pada gambar 5.

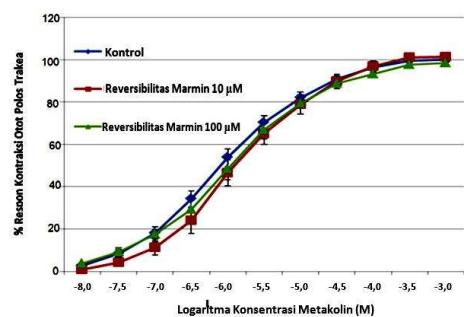
Hasil uji reversibilitas menunjukkan bahwa profil kurva hubungan respon kontraksi

otot polos trachea terisolasi uji reversibilitas marmin (10 dan 100)  $\mu\text{M}$  sedikit bergeser ke arah kanan dibandingkan profil kurva metakolin (kontrol), dan pergeseran kurva tersebut mengakibatkan penurunan harga  $\text{pD}_2$  metakolin. Hasil uji statistik dengan Anova satu jalan menyimpulkan bahwa tidak terdapat

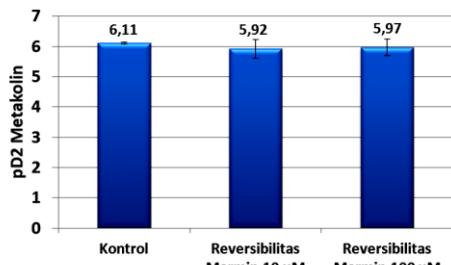
perbedaan yang bermakna antara nilai  $\text{pD}_2$  metakolin (kontrol) dengan nilai  $\text{pD}_2$  metakolin hasil uji reversibilitas marmin (10 dan 100)  $\mu\text{M}$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa interaksi marmin dengan protein reseptor Ach-M<sub>3</sub> otot polos trachea bersifat reversibel.



**Gambar 3.** Pergeseran nilai  $\text{pD}_2$  histamin pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor H<sub>1</sub>. Nilai  $\text{pD}_2$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5-8$ ). Hasil analisa varian satu jalan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p>0,05$ ) terhadap nilai  $\text{pD}_2$  histamin/control



**Gambar 4.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi metakolin (M) terhadap % respon kontraksi otot polos trachea terisolasi pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub>. Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 8$ ).



**Gambar 5.** Pergeseran nilai  $\text{pD}_2$  metakolin pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor asetilkolin Ach-M<sub>3</sub>. Nilai  $\text{pD}_2$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 8$ ). Analisa varian satu jalan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p>0,05$ ) terhadap nilai  $\text{pD}_2$  metakolin/control

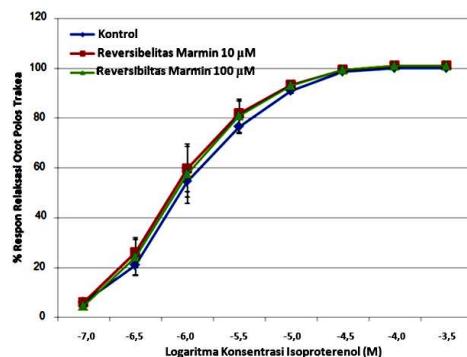
#### Uji Reversibilitas Marmin terhadap Reseptor $\beta_2$ -Adrenergik Otot Polos Trachea

Uji reversibilitas marmin terhadap reseptor  $\beta_2$ -adrenergik dilakukan setelah uji pengaruh praperlakuan marmin terhadap

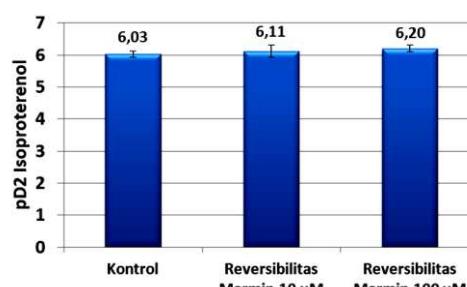
respon relaksasi otot polos trachea terisolasi yang diinduksi oleh seri konsentrasi isoproterenol. Sebelum uji reversibilitas dimulai, otot polos trachea dicuci dengan penggantian larutan bufer Krebs setiap lima menit selama 30 menit. Kurva % respon relaksasi otot polos trachea pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor  $\beta_2$ -adrenergik dapat dilihat pada gambar 6. Pergeseran nilai  $pD_2$  metakolin pada uji reversibilitas marmin terhadap reseptor Ach-M<sub>3</sub> tersaji pada gambar 7.

Hasil uji reversibilitas menunjukkan bahwa profil kurva hubungan respon kontraksi

otot polos trachea terisolasi pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terlihat hampir berhimpitan dengan profil kurva kontrol. Hasil uji statistik dengan Anova satu jalan menyimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara nilai  $pD_2$  isoproterenol (kontrol) dengan nilai  $pD_2$  isoproterenol pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa interaksi marmin dengan protein reseptor  $\beta_2$ -adrenergik otot polos trachea bersifat reversibel.



**Gambar 6.** Kurva hubungan logaritma konsentrasi isoproterenol (M) terhadap % respon relaksasi otot polos trachea terisolasi pada uji reversibilitas karena pengaruh marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor  $\beta_2$ -adrenergik. Persentase respon kontraksi disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5-8$ ).



**Gambar 7.** Pergeseran nilai  $pD_2$  isoproterenol pada uji reversibilitas marmin 10 dan 100  $\mu\text{M}$  terhadap reseptor  $\beta_2$ -adrenergik. Nilai  $pD_2$  disajikan dalam bentuk rata-rata  $\pm$  SEM ( $n = 5-8$ ). Analisa varian satu jalan tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p>0,05$ ) terhadap nilai  $pD_2$  isoproterenol/kontrol

### Diskusi dan Pembahasan

Takase, *et.al.* (1994) melaporkan bahwa marmin memiliki efek relaksasi terhadap otot polos ileum marmut terisolasi yang diinduksi oleh histamin dan asetilkolin. Penelitian sebelumnya mengungkap marmin dapat menghambat kontraksi otot polos trachea marmut terisolasi melalui efeknya sebagai

antagonis reseptor H<sub>1</sub> dan Ach-M<sub>3</sub>. Marmin juga sedikit meningkatkan efek relaksasi otot polos trachea yang diinduksi oleh isoproterenol melalui interaksinya dengan reseptor  $\beta_2$ -adrenergik (Nugroho, *et.al.*, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek reversibilitas interaksi marmin dengan reseptor H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub> dan  $\beta_2$ -adrenergik.

Penelitian kajian reversibelitas marmin terhadap reseptor  $H_1$ , Ach- $M_3$  dan  $\beta_2$ -adrenergik ini dilakukan dengan menggunakan preparat otot polos trachea dalam media larutan buffer Krebs pada alat organ terisolasi. Metode organ terisolasi merupakan metode klasik dalam percobaan farmakologi yang dapat digunakan untuk menganalisa hubungan dosis-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 itu, metode ini juga dapat mengukur konsentrasi agonis terkecil yang dapat menginduksi respon biologis.

Metode ini memiliki beberapa kelemahan dan kurang menggambarkan kondisi di dalam tubuh manusia yang sebenarnya. Larutan bufer Krebs yang digunakan tidak sepenuhnya sama dengan cairan fisiologis dalam tubuh, sehingga lama kelamaan akan berpengaruh buruk terhadap jaringan. Selain itu, isolasi organ dalam alat ini akan mengakibatkan hilangnya fungsi regulasi fisiologis pada organ tersebut (Lullmann, *et.al.*, 2000). Pencucian otot polos trachea dengan pergantian larutan bufer Krebs selama 45 menit pada fase ekuilibrasi akan menghilangkan pengaruh senyawa relaksan seperti nitrogen oksida (NO) dan berbagai enzim yang dilepaskan oleh sel epitel trachea terhadap rangsangan senyawa spasmogen (Barnes, 1989). Fungsi regulasi dari enzim yang terlibat dalam degradasi histamin dan asetilkolin (induktor kontraksi otot polos trachea) juga akan hilang pada fase ekuilibrasi ini. Pada akhirnya, respon kontraksi-relaksasi otot polos trachea yang merupakan fungsi homeostasis normal pada organ ini tidak terbaca lagi pada detektor.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa interaksi marmin dengan reseptor  $H_1$  bersifat reversibel. Uji reversibilitas menghasilkan profil kurva hubungan logaritma konsentrasi histamin terhadap % respon kontraksi otot polos trachea yang mirip dengan profil kurva sebelum dilakukan uji pengaruh marmin (kontrol) dan perbedaan nilai  $pD_2$  histamin pada uji reversibilitas marmin (10 dan 100)  $\mu M$  tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol. Penelitian Nugroho, *et.al.* (2011)

menyimpulkan bahwa marmin memiliki afinitas yang relatif lemah terhadap reseptor  $H_1$  dengan nilai  $pA_2$  sebesar 2,302 sehingga diperkirakan potensi marmin sebagai antagonis reseptor  $H_1$  tidak terlalu tinggi. Hal ini dapat diketahui lebih jelas dengan cara melihat bentuk ikatan dan kekuatan ikatan antara marmin dengan reseptor  $H_1$ , sehingga memerlukan data penelitian lebih lanjut. Walaupun demikian, potensi marmin sebagai antihistamin dalam mengurangi gejala alergi secara *in vivo* perlu dilakukan karena marmin juga telah diketahui mampu menekan pelepasan histamin dari kultur sel mast (Nugroho, *et.al.*, 2008).

Berdasarkan berbagai laporan hasil penelitian terdahulu, antihistamin generasi pertama juga memiliki aktivitas sebagai antikolinergik (Repka-Ramirez dan Baraniuk, 2002). Reseptor Ach- $M_3$  adalah reseptor terikat protein  $G_q$  dan merupakan subtipen reseptor asetilkolin muskarinik utama yang bertanggung jawab terhadap kontraksi otot polos saluran pernafasan (Gosens, *et.al.*, 2006).

Penelitian Nugroho, *et.al.* (2011) juga menyimpulkan bahwa marmin memiliki aktivitas sebagai antagonis reseptor Ach- $M_3$ . Marmin 10 dan 100  $\mu M$  mampu menurunkan nilai  $pD_2$  metakolin secara berturut turut dari 6,18 menjadi 5,71 dan 5,59 ( $p<0,05$ ). Akan tetapi, peningkatan konsentrasi marmin tidak dapat menurunkan  $pD_2$  metakolin secara bermakna ( $p>0,05$ ). Analisa Shild-Plot menghasilkan nilai *slope* sebesar 0, 1906 (menjauhi angka satu) sehingga dapat disimpulkan bahwa mekanisme antagonisme marmin terhadap reseptor Ach- $M_3$  bukan melalui mekanisme antagonism secara kompetitif. Marmin mungkin menghambat efek metakolin dengan cara berikanan pada bagian lain di luar sisi aktif reseptor Ach- $M_3$ , sehingga akan menghambat fungsi reseptor tersebut, atau bisa diakibatkan karena marmin memediasi perubahan reaktivitas reseptor terhadap metakolin. Hasil uji reversibilitas ini menyimpulkan bahwa interaksi marmin dengan reseptor Ach- $M_3$  bersifat reversibel dimana profil kurva respon kontraksi otot polos trachea kembali menyerupai profil kurva kontrol setelah dilakukan pencucian otot polos trachea dengan penggantian larutan bufer Krebs tiap lima menit selama 30 menit.

Aktivasi reseptor  $\beta_2$ -adrenergik yang terdapat pada otot polos trachea akan

menginduksi respon relaksasi yang dapat melonggarkan saluran pernafasan. Agonis reseptor  $\beta_2$ -adrenergik merupakan salah satu obat yang digunakan dalam gangguan saluran pernafasan, termasuk dalam mengobati kontraksi saluran nafas karena asma dan alergi (Johnson, 2006). Penelitian Nugroho, *et.al.* (2011) menunjukkan bahwa marmin marmin memiliki afinitas yang lemah terhadap reseptor  $\beta_2$ -adrenergik, sehingga peningkatan efek relaksasi otot polos trachea terisolasi karena pemberian seri konsentrasi isoproterenol belum terlihat signifikan. Penelitian ini juga memperlihatkan bahwa interaksi marmin dengan reseptor  $\beta_2$ -adrenergik bersifat reversibel dimana profil kurva respon kontraksi otot polos trachea kembali menyerupai profil kurva kontrol setelah dilakukan pencucian otot polos trachea dengan penggantian larutan bufer Krebs tiap lima menit selama 30 menit.

### KESIMPULAN

Interaksi marmin terhadap protein reseptor H<sub>1</sub>, Ach-M<sub>3</sub>, dan  $\beta_2$ -adrenergik otot polos trachea bersifat reversibel. Kurva hubungan respon kontraksi / relaksasi otot polos trachea marmut terisolasi hasil uji reversibelitas marmin 10 dan 100  $\mu$ M memiliki profil yang hampir sama dengan kurva kelompok kontrol (histamin, metakolin dan isoproterenol). Hasil analisis varian satu jalan menyimpulkan perubahan nilai pD<sub>2</sub> histamin, metakolin dan isoproterenol sebelum dan setelah perlakuan marmin tidak bermakna secara statistik ( $p>0,05$ ).

### DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, P.J., 1989, Airway Receptors, *Postgrad. Med. J.*, **65** : 532- 542
- Gosens, R., Zaagsma, J., Meurs, H. and Halayko, A.J., 2006, Muscarinic Receptor Signaling in the Pathophysiology of Asthma and COPD, *Respir. Res.* **7**(1) : 73-87
- Johnson, M., 2006, Molecular Mechanisms of Beta(2)-adrenergic Receptor Function, Response, and Regulation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**(1) : 18-24
- Lullmann, H., Mohr, K., Ziegler, A. and Bieger, D., 2000, *Color Atlas of Pharmacology*, Second Edition., Thieme, New York
- Johnson, M., 2006, Molecular Mechanisms of Beta(2)-adrenergic Receptor Function, Response, and Regulation, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **117**(1) : 18-24
- Nugroho, A.E., Anas, Y., Arsito N.P., Wibowo, J.T., Riyanto, S. and Sukari, M.A. 2011, Effects of Marmin, a Compound Isolated from *Aegle Marmelos* Correa, on Contraction of The Guinea Pig-Isolated Trachea, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **24**(4) : 427-433
- Repka-Ramirez, M.S. and Baraniuk, J.N., 2002, *Histamine in Health and Disease*, in Simmons, F.E.R, Histamine and H<sub>1</sub>-antihistamines in Allergic Disease, Second Edition Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc, New York
- Sonar, S. and Renz, H., 2009, *Biology of Neurotrophins, Neuropeptides, and Muscarinic Receptors in Asthma*, in Allergy Frontiers : Classification and Pathomechanism, Vol. 2, 469-491, Springer, Tokyo., 2009.
- Takase, H., Yamamoto, K., Hirano, H., Saito, Y. and Yamashita, A., 1994, Pharmacological Profile of Gastric Mucosal Protection by Marmin and Nobiletin from a Traditional Herbal Medicine, *Aurantii fructus immaturus*, *Jpn. J. Pharmacol.*, **66**(1) : 139-147
- Taylor-Clark, T., Sodha, R., Warner, B. and Foreman, J., 2005, Histamine Receptors that Influence Blockage of the Normal Human Nasal Airway, *Br. J. Pharmacol.*, **144**(6) : 867-874