

## **EFEK DIKLOFENAK DAN VCO TERHADAP EKSPRESI RESEPTOR EP3 PADA TIKUS STRAIN WISTAR ADIKSI NIKOTIN KONDISI *DEPENDENCE***

Dian Anggraeny<sup>1</sup>, Anggraini Barlian<sup>2</sup>, Kusnandar Anggadiredja<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Unjani Cimahi

<sup>2</sup>Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB Bandung

<sup>3</sup>Sekolah Farmasi ITB Bandung

### **ABSTRAK**

Perilaku ketergantungan rokok timbul akibat adanya nikotin sebagai komponen psikoaktif utama. Salah satu mekanisme yang diduga berperan adalah proses fisiologis yang melibatkan metabolisme asam arakhidonat yang dapat diamati melalui perubahan ekspresi gen reseptor epirostanoid (EP3) di otak. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ekspresi reseptor EP3 pada model tikus adiksi nikotin kondisi *dependence*, dan yang diberi *pre-treatment* dengan diklofenak dan VCO. Tikus-tikus secara random dibagi menjadi: kelompok 1 (N) diberi nikotin saja (0,5mg/kg i.p.), kelompok 2 (Nd) diberi *pre-treatment* diklofenak (3,2mg/kg i.p.) dan kelompok 3 (NVCO) diberi *pre-treatment* VCO (5ml/kg p.o.) sebelum pemberian nikotin. Pengukuran ekspresi dilakukan saat tikus telah mengalami ketergantungan (*dependence*) menggunakan metode *Conditioned Place Preference* (CPP). Tikus-tikus diambil bagian otak hipokampus dan bulbus olfaktoriusnya, kemudian dilakukan isolasi protein, elektroforesis dan ditransfer ke membran PVDF menggunakan metode *Western Blotting*. Selanjutnya dilakukan teknik *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) menggunakan antibodi primer *rabbit polyclonal* anti reseptor EP3 (Abcam) dan antibodi *rabbit polyclonal* anti-actin (Abcam) sebagai kontrol internal. Pita yang terbentuk didedahkan pada film dan dihitung dengan *scion image* secara semi kuantitatif. Ekspresi reseptor EP3 paling tinggi ditemukan pada kelompok tikus yang hanya diberi nikotin, dan menurun pada kelompok tikus yang diberi diklofenak dan VCO. Pada sampel dari tikus yang diberi VCO, teramati penurunan ekspresi reseptor EP3 yang sebanding dengan yang diberi diklofenak. Paparan nikotin secara berulang akan meningkatkan ekspresi reseptor EP3 yang dapat ditekan dengan pemberian diklofenak. Penurunan ekspresi reseptor EP3 dengan pemberian VCO memiliki pola yang mirip dengan pemberian diklofenak.

**Kata kunci:** nikotin, adiksi, asam arakhidonat, reseptor EP3, *virgin coconut oil*

## ABSTRACT

Smoking dependence arises as a result of nicotine as the major psychoactive component in cigarettes. One of the mechanisms that play role in dependence behavior is a mechanism that involved in arachidonic acid metabolism, accompanied by changes in gene expression of EP3 receptors in brain at the molecular level. This study aims to examine the changes in the expression of EP3 receptors from nicotine-dependence rats, and from rats given diclofenac and VCO pre-treatment. The rats were divided randomly into 3 groups, first group (N) was given 0.5 mg/kg i.p nicotine, the second group (Nd) was given 3.2 mg/kg i.p diclofenac and the third group (NVCO) was given 5ml/kg p.o VCO 30 min before nicotine administration. The hippocampus and olfactory bulb from all rats that has been tested by preference test using the Conditioned Place Preference (CPP) methods were isolated. The protein from the isolated brain then were isolated, electroforised and transfer to PVDF membrane using Western blotting method. The Enhanced Chemiluminescence (ECL) was done using rabbit polyclonal to prostaglandin E reseptor EP3 primer antibody (Abcam) and rabbit polyclonal Actin antibody (Abcam) as an internal control. The bands then were exposed to the film and were analyzed using semi quantitative scion image. The results showed that the expression of EP3 receptors was high in group of rats given nicotine alone, and decreased in groups given diclofenac and VCO. The decreased pattern of the expression of EP3 receptors from VCO group was similar to diclofenac group. The results of present study indicated the increased EP3 receptor expression in nicotine dependence can be attenuated by diclofenac. The decreased of the EP3 receptor expression pattern by VCO administration was similar to diclofenac.

**Key words** : nicotine, addiction, arachidonic acid, EP3 receptor, virgin coconut oil

## PENDAHULUAN

Ketergantungan merokok menjadi satu permasalahan serius yang dihadapi di banyak negara maju maupun negara berkembang. *National Institute on Drug Abuse* (2011) melaporkan bahwa lebih kurang 440.000 jiwa meninggal setiap tahunnya di Amerika Serikat, karena berbagai penyakit yang ditimbulkan dari kebiasaan merokok.<sup>1</sup> Merokok tidak hanya meningkatkan resiko penyakit respirasi, kardiovaskuler dan kanker pada perokok aktif, tetapi juga pada perokok pasif. Permasalahan lain yang muncul adalah sulitnya seorang perokok untuk lepas dari ketergantungan merokok; lebih kurang 70% perokok berniat untuk berhenti

merokok, tapi hanya sekitar 3% perokok berhasil keluar dari ketergantungan rokok setiap tahunnya.<sup>2</sup> Bila individu secara kompulsif telah merasakan ketergantungan untuk selalu merokok, walaupun tahu kesehatannya akan terancam akibat kebiasaannya tersebut, maka individu tersebut dikategorikan telah mengalami adiksi.<sup>1</sup>

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk meneliti bermacam-macam komponen toksik yang ditemukan dalam rokok. Nikotin merupakan komponen yang paling berperan dalam ketergantungan rokok.<sup>3</sup> Nikotin akan mempengaruhi aktivitas neuron yang terlibat dalam *brain reward system* (suatu sistem yang berkaitan dengan ketergantungan) pada saat berikatan dengan reseptor *nicotinic acetylcholine (nACh)* dalam sistem saraf pusat, yang selanjutnya mempengaruhi motivasi dan perilaku.<sup>4,5</sup> Keterlibatan metabolisme asam arakhidonat dan reseptor EP3 dalam *brain reward system* kini menjadi perspektif baru dalam memahami proses adiksi nikotin. Peranan metabolisme asam arakhidonat dalam adiksi ditandai dengan adanya kenaikan kadar prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dalam otak.<sup>6</sup> PGE<sub>2</sub> merupakan salah satu produk akhir dari metabolisme asam arakhidonat pada jalur *cyclooxygenase (COX)*, yang akan mempengaruhi neurofisiologi otak melalui reseptor EP3.<sup>6,7</sup> Penelitian di tingkat perilaku telah menyimpulkan bahwa diklofenak sebagai obat golongan *Non Steroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAID)* yang menghambat enzim *cyclooxygenase* dalam metabolisme asam arakhidonat, dapat mengurangi gejala ketergantungan dan kekambuhan pada hewan percobaan yang diberi nikotin.<sup>8,9</sup> Penelitian lain mengenai reseptor EP3 di tingkat mRNA menyimpulkan bahwa ekspresi reseptor EP3 di tingkat mRNA meningkat pada tikus yang mengalami ketergantungan nikotin, dan menurun pada tikus yang diberi *pre-treatment* diklofenak sebagai obat *COX inhibitor*. Penelitian ini juga menyimpulkan bahwa pemberian diklofenak dapat menurunkan ekspresi gen reseptor EP3 secara *dose-specific* dengan dosis optimum 3,2 mg/kgbb.<sup>10</sup>

Penelitian-penelitian lain juga dilakukan untuk mencari produk alami yang dapat digunakan sebagai alternatif dalam mengatasi ketergantungan obat. *Virgin Coconut Oil (VCO)* adalah minyak murni dari buah kelapa yang tidak mengalami proses hidrogenisasi dan pemanasan seperti minyak sayur/minyak goreng, dan sering digunakan sebagai obat. Berbagai macam khasiat telah diteliti dari VCO, seperti anti mikroba, anti virus dan anti *Candida*.<sup>11,12</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Intahphuak dkk (2010) juga mempelajari khasiat VCO sebagai anti inflamasi pada tikus yang diinduksi demam dan edema.<sup>13</sup> Pengaruh VCO dalam ketergantungan nikotin dilakukan oleh Anggadiredja dkk (2011) yang membuktikan bahwa VCO dapat terlibat di jalur asam arakhidonat, karena metabolisme asam arakhidonat

merupakan bagian dari proses inflamasi.<sup>14</sup> Hasil penelitian tersebut menyimpulkan bahwa pemberian VCO dapat mengubah perilaku ketergantungan tikus, namun bagaimana mekanisme senyawa aktif VCO dapat mengubah perilaku adiksi, khususnya di jalur metabolisme asam arakhidonat masih belum jelas sehingga perlu untuk diteliti lebih lanjut.

Berdasarkan hasil tersebut di atas, penelitian ini dilakukan untuk mempelajari ekspresi reseptor EP3 pada bagian otak hipokampus dan bulbus olfaktorius, sebagai bagian yang berperan dalam *brain reward system* pada hewan adiksi nikotin kondisi *dependence*. Pengaruh pemberian VCO sebagai senyawa anti inflamasi di jalur metabolisme asam arakhidonat akan dipelajari, dengan diklofenak sebagai pembanding. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk lebih memahami keterlibatan metabolisme asam arakhidonat dalam adiksi nikotin, juga sebagai dasar pengembangan senyawa VCO dalam penanganan adiksi nikotin.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Subjek Penelitian**

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur Wistar berumur delapan minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Jumlah tikus percobaan yang digunakan adalah sebanyak 27 ekor, yang dibagi menjadi tiga kelompok pengulangan dengan jumlah sembilan ekor yang ditempatkan dalam satu kandang. Suhu ruangan tetap ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap. Persediaan makan dan minum diberikan *ad libitum*.

### **Tempat dan Waktu Penelitian**

Pemeliharaan dan pengamatan perilaku hewan dilakukan di Laboratorium Perhewan dan Laboratorium Farmakologi Sekolah Farmasi ITB mulai bulan Agustus 2010 sampai bulan April 2011. Isolasi otak dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan SITH ITB, sedangkan fraksinasi protein sampai proses deteksi protein (*Western blot* dan *enhanced chemiluminescence*) dilakukan di Ruang Preparasi dan Laboratorium Analisis Struktur dan Perkembangan Hewan SITH ITB mulai bulan April sampai bulan Agustus 2011.

### **Bahan Pemeriksaan**

Bahan yang diperiksa adalah bagian bulbus olfaktorius dan hipokampus dari model tikus yang telah mendapatkan perlakuan, dan perilakunya telah diukur menggunakan metode CPP. Tikus dibunuh dengan cara dekapitasi dan diambil otaknya dalam waktu 30-40 detik. Bagian

bulbus olfaktorius dan hipokampus dipisahkan dari otak di atas cawan petri berisi larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dingin, kemudian ditimbang dan masing-masing dimasukkan ke dalam *cryotube*. Otak yang diisolasi selanjutnya disimpan dalam tangki nitrogen cair sampai seluruh otak tikus perlakuan selesai diisolasi.

### **Prosedur Penelitian**

Tikus-tikus percobaan pada setiap kelompok pengulangan dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok perlakuan, yaitu kelompok N yang terdiri atas tikus-tikus yang diinduksi nikotin (Sigma), kelompok Nd yang terdiri atas tikus-tikus yang diberi perlakuan sodium diklofenak (Dexa Medica) dan nikotin, dan kelompok NVCO yang terdiri atas tikus-tikus yang diberi perlakuan VCO (C-Oil Minyak Kelapa Murni, Aphrodita) dan nikotin. Nikotin dan sodium diklofenak diberikan secara intra peritoneal dengan dosis 0,5 mg/kg untuk nikotin dan 3,2 mg/kg untuk sodium diklofenak, sedangkan VCO diberikan secara per oral dengan dosis 5 ml/kg.<sup>15</sup> Alur proses perlakuan dan uji CPP dapat dilihat pada gambar 2. Setelah itu tikus dibunuh untuk diambil bagian bulbus olfaktorius dan hipokampusnya sebagai bahan pemeriksaan.

Uji CPP adalah uji perilaku tikus diamati dan diukur menggunakan metode *Conditioned Place Preference* (CPP), yaitu suatu metode untuk mengukur ketergantungan obat secara kuantitatif pada hewan percobaan, menggunakan alat CPP. Uji perilaku dilakukan dengan cara mengamati dan merekam perilaku hewan percobaan dalam alat CPP, yang selanjutnya dianalisis menggunakan *Software Smart Junior*<sup>TM</sup>. Parameter yang digunakan adalah *preference score*, yaitu lama waktu tinggal hewan di ruangan yang dikondisikan dengan nikotin dibagi dengan total waktu uji perilaku (detik).<sup>15</sup>

### **Metode Pemeriksaan**

Bahan pemeriksaan selanjutnya akan melalui beberapa tahapan pemeriksaan, dimulai dari isolasi protein, penentuan konsentrasi protein, elektroforesis, *Western blotting*, dan *Enhanced Chemiluminescence* (ECL).

### **Isolasi Protein**

Isolasi protein dilakukan dua tahap. Pada tahap pertama, sebanyak 0,3 gr bagian otak (hipokampus atau bulbus olfaktorius) yang berasal dari tiga kelompok perlakuan dalam satu kondisi dipindahkan ke dalam tiga tabung *Falcon* 15 ml yang masing-masing telah diisi dengan

4,5 ml *Ice Cold Sucrose Buffer /ICSB*. Selanjutnya bagian otak dihomogenisasi dengan menggunakan *pestle* dalam keadaan dingin. Suspensi otak yang didapat disentrifugasi menggunakan alat *Superspeed Centrifuge (Sorval RC-5B plus)* dengan kecepatan 3000g selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang didapat dipisahkan untuk menentukan jumlah protein total (metode Bradford) dan deteksi protein *actin* (metode *Western blot*), sementara pelet yang terbentuk disentrifugasi sebanyak dua kali dengan 4,5 ml Tris-HCl pH 8,0 pada kecepatan 3000g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan 2,25 ml Tris-HCl pH 8,0 dan dipindahkan ke dalam *beaker glass* 40 ml berisi *magnetic stirrer*. *Beaker glass* selanjutnya ditutup dengan *aluminium foil* dan diaduk dengan *stirrer* selama  $\pm$  16 jam (semalam) pada suhu 4°C.

Pada tahap kedua, suspensi dalam *beaker glass* yang telah diaduk selama semalam diberi LiBr 50 mM / 10 ml sebanyak 30  $\mu$ l, kemudian diaduk kembali di atas *plate stirrer* selama 2,5 jam pada suhu 4°C. Suspensi selanjutnya dipindahkan ke tabung *Eppendorf* dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet hasil sentrifugasi dihomogenisasi dan diresuspensi dengan 2,25 ml Tris-HCl pH 8,0. Suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 6000g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang terbentuk dihomogenisasi dan diresuspensi dengan 2,25 ml KBr 25% B/V, lalu kembali disentrifugasi dengan kecepatan 10.000g selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet yang didapat diberi ICSB sebanyak 1,5 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 17.000g selama 20 menit pada suhu 4°C. Pelet yang didapat kemudian disuspensi dengan 15  $\mu$ l ICSB dan disonikasi selama siklus 2x50 detik, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000g selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet selanjutnya dipisahkan untuk pemeriksaan metode Bradford dan deteksi protein EP3 dengan metode *Western blot*.

### **Penentuan Konsentrasi Protein Total Dengan Metode Bradford**

Konsentrasi protein total dari supernatan dan pelet hasil isolasi protein dihitung untuk menentukan volume sampel yang berasal dari supernatan dan pelet yang akan dimasukkan dalam sumur pada proses elektroforesis. Kuantifikasi dilakukan dengan menggunakan metode Bradford. Metode ini dilakukan dengan mencampurkan sampel protein, larutan NaCl 0,15 M dan CBBG-250 10%. Sebagai protein standar digunakan BSA (*bovine serum albumin*, Sigma A 9418) untuk membuat kurva standar konsentrasi protein, sehingga konsentrasi sampel protein dapat dihitung. Absorbansi protein diukur menggunakan spektrofotometer (*Pharmasia*

*Biotech*) pada panjang gelombang 595 nm, lalu konsentrasi protein total pada sampel protein dapat dihitung menggunakan persamaan kurva standar konsentrasi protein BSA.

### **Elektroforesis dan *Western Blotting***

Elektroforesis dilakukan untuk memisahkan protein-protein berdasarkan perbedaan berat molekul. Sampel protein sebanyak 20 µg dimasukkan ke dalam *Eppendorf* dan dicampur dengan *sample buffer* dengan perbandingan volume 1:1. Sampel selanjutnya didenaturasi dalam *waterbath* pada suhu 95°C selama 5 menit, kemudian dimasukkan dalam sumur gel elektroforesis poliakrilamid 10% yang telah terpasang pada aparatus elektroforesis (*Advantec*) dan diisi *running buffer*. Elektroforesis dimulai pada tegangan 100 volt sampai sampel protein mencapai batas antara *stacking gel* dan *separating gel*. Tegangan selanjutnya ditingkatkan menjadi 120 volt sampai sampel protein mencapai batas bawah gel. Hasil elektroforesis selanjutnya ditransfer ke membran *polyvinilidene difluoride (PVDF Western Blotting Membrane, Roche)* menggunakan alat *tank transfer system (BioRAD Mini PROTEAN® Tetra System)* dalam larutan *transfer buffer* pH 8,3 dengan arus sebesar 10A selama 2 jam pada suhu 4°C.

Protein *actin* dan EP3 selanjutnya dideteksi menggunakan metoda pemeriksaan *Western blot*. Membran PVDF dengan protein hasil transfer elektroforesis dibilas dengan methanol absolut dan deion. Membran PVDF yang berisi protein EP3 direndam dalam larutan *skim milk* 15%, sedangkan membran PVDF yang berisi protein *actin* direndam dalam larutan *skim milk* 5%. Proses perendaman dilakukan selama 15 jam. Membran selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *rabbit polyclonal* anti reseptor EP3 ab21227 (Abcam) dan antibodi *rabbit polyclonal* anti-*actin* ab1801 (Abcam) yang dilarutkan dalam larutan *skim milk* 5% dengan pengenceran 1:500 untuk EP3 dan 1:1000 untuk *actin* pada suhu 4°C selama 3 jam. Membran kemudian dibilas dengan larutan TBST (*Tris-Buffered Saline-Tween*) selama 5 menit sebanyak delapan kali. Membran selanjutnya diinkubasi dalam antibodi sekunder *Anti-mouse IgG-POD/anti-rabbit-IgG-POD (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Roche)* yang dilarutkan dalam larutan *skim milk* 5% dengan pengenceran 1:5000 selama 45 menit pada suhu 4°C. Pada tahap akhir membran kembali dibilas menggunakan larutan TBST selama 5 menit sebanyak 10 kali.

## **ECL (Enhanced Chemiluminescence)**

Proses pendeteksian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan sistem ECL (Enhanced Chemiluminescence). Membran ditetesi larutan *luminescence substrate solution A* dan larutan *starting solution B* (*BM Chemiluminescence Western Blotting Kit*, Roche), lalu didedahkan pada film (*Fuji Medical X-ray Film*) dalam kaset Kodak *X-OMAT* selama 45 menit. Selanjutnya film dicuci dengan larutan *developer* selama 10 menit, larutan *fotofix* selama 2 menit dan akuades selama 1 menit. Pita/larik yang terbentuk kemudian dikuantifikasi menggunakan program *Scion Image*.

## **Metode Analisis**

Data diperoleh berdasarkan rasio reseptor EP3 terhadap kontrol internal *actin*, dan merupakan data yang *reproducible*. Hasil rasio disajikan dalam bentuk grafik histogram.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Ekspresi reseptor EP3 tampak paling tinggi pada kelompok tikus yang diberi nikotin saja, baik pada wilayah hipokampus maupun bulbus olfaktorius, sehingga total ekspresi reseptor EP3 di kedua wilayah otak tersebut menunjukkan ekspresi reseptor EP3 yang tinggi pada kelompok N dibandingkan dengan kelompok lainnya (Gambar 4b, kelompok N). Ekspresi reseptor EP3 yang tinggi pada kelompok N diduga terjadi karena pemberian nikotin mempengaruhi ekspresi reseptor EP3 secara tidak langsung. Diduga nikotin yang diinjeksi secara intraperitoneal akan diabsorpsi masuk ke dalam sirkulasi darah melalui vena porta.<sup>16</sup> Darah akan membawa nikotin sampai ke dalam otak, melewati *blood brain barrier* lalu berikatan dengan *nicotinic acetylcholine receptors* (*nAChRs*).<sup>17</sup>

Albuquerque dkk (2009) memaparkan, reseptor *nACh* adalah suatu reseptor transmembran yang merupakan subtype dari *acetylcholine receptors* (*AChRs*) dan sangat sensitif untuk teraktivasi oleh nikotin.<sup>18</sup> Reseptor *nACh* memiliki struktur pentamerik, yang tersusun atas lima sub unit dan *central pore* yang menjadi jalan masuknya ion ke dalam sel pada saat reseptor teraktivasi. Sub unit penyusun reseptor merupakan kombinasi sub unit  $\alpha$  dan  $\beta$  yang tersusun secara homomerik atau heteromerik dan berperan di dalam memperantarai berbagai fungsi yang khas. Reseptor *nAChRs* terutama ditemukan pada sistem saraf, selain dapat pula ditemukan di luar sistem saraf (*non neuronal nAChRs*). Ikatan antara nikotin dan reseptor *nACh* kemudian akan menyebabkan pelepasan berbagai macam neurotransmitter.<sup>3</sup> Neurotransmitter glutamat diduga memperantarai proses memori yang melibatkan jalur asam arakhidonat.<sup>3,19</sup>

Reseptor *nACh* yang diduga terlibat dalam pengeluaran neurotransmitter glutamat adalah reseptor subtype  $\alpha 7$ .<sup>4,20</sup> Lubin dkk melaporkan keberadaan reseptor ini pada presinaps terminal saraf hipokampus.<sup>4</sup>

Reseptor *nACh* merupakan *ligand gated ion channel*, sehingga pada saat nikotin berikatan dengan reseptor *nACh*, terjadi perubahan konformasi pada struktur reseptor yang menyebabkan kation-kation seperti  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , dan  $\text{Ca}^{2+}$  ekstraseluler masuk melewati *channel*, menginduksi depolarisasi, meningkatkan eksitabilitas dan perubahan pada  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler.<sup>4</sup> Peningkatan jumlah  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler menyebabkan terjadinya pelepasan neurotransmitter glutamat. Ikatan antara glutamat dan reseptornya pada post sinaps akan meningkatkan jumlah  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler dan mengaktivasi cPLA<sub>2</sub> yang ada di sitoplasma.<sup>19</sup> *Cytosolic* PLA<sub>2</sub> merupakan stimulus langsung aktivasi proses metabolisme asam arakhidonat melalui hidrolisis pada posisi *sn-2* dari membran fosfolipid.<sup>21</sup> Proses metabolisme asam arakhidonat yang terjadi dengan bantuan enzim *cyclooxygenase* akan menghasilkan berbagai macam produk akhir, salah satunya PGE<sub>2</sub> yang akan berfungsi melalui reseptor EP3.

Eksresi yang ditampilkan pada kelompok N di wilayah bulbus olfaktorius tampak lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok N di wilayah hipokampus (Gambar 4b, kelompok N wilayah hipokampus dan bulbus olfaktorius). Hal ini diduga berkaitan dengan peranan bulbus olfaktorius dan hipokampus dalam pembentukan memori.<sup>22</sup> Pada sebagian mamalia, terutama hewan pengerat, bulbus olfaktorius merupakan wilayah otak yang sangat penting dalam mengembangkan kemampuan untuk cepat mempelajari, mengingat dan membedakan bau.<sup>23</sup> Distribusi reseptor EP3 sendiri telah diketahui banyak ditemukan di bagian otak yang mempunyai peran dalam fungsi kognitif.<sup>7</sup> Berdasarkan hal tersebut di atas, diduga reseptor EP3 lebih banyak terdistribusi di wilayah bulbus olfaktorius pada hewan pengerat, sehingga ekspresi reseptor EP3 di bulbus olfaktorius lebih tinggi dibandingkan dengan wilayah hipokampus. Hasil yang didapat di kelompok nikotin sesuai dengan penelitian Faridah (2010) yang meneliti ekspresi reseptor EP3 di tingkat mRNA.<sup>10</sup> Dengan demikian, ekspresi reseptor EP3 yang ditampilkan di tingkat protein sejalan dengan ekspresi reseptor EP3 di tingkat mRNA.

Eksresi reseptor EP3 pada kelompok tikus yang diberi diklofenak cenderung lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi nikotin saja (Gambar 4b, kelompok N dan kelompok Nd pada wilayah otak hipokampus, bulbus olfaktorius dan total wilayah hipokampus dan bulbus olfaktorius). Hasil ini sesuai dengan ekspresi reseptor EP3 di tingkat mRNA dan sesuai pula dengan perubahan perilaku adiksi tikus yang ditandai dengan penurunan

nilai *preference score* yang berarti menurunnya keinginan tikus untuk berada di tempat yang dikondisikan dengan nikotin.<sup>10,15</sup> Diklofenak adalah obat yang termasuk dalam golongan *non steroid anti inflammation drugs* (NSAID) yang berkerja sebagai *COX (cyclooxygenase) inhibitor non spesifik*. Ekspresi EP3 yang rendah terjadi disebabkan karena diklofenak menghambat enzim *cyclooxygenase* secara *competitive inhibitor*.<sup>24</sup> Pada penelitian ini, diduga pemberian diklofenak 30 menit sebelum induksi nikotin menyebabkan *site* enzim *cyclooxygenase* telah diikat oleh diklofenak sebelum proses metabolisme asam arakhidonat terjadi. Hal ini menyebabkan enzim menjadi tidak aktif, sehingga proses metabolisme asam arakhidonat yang terjadi setelah induksi nikotin terhambat, yang mengakibatkan produk akhir dari proses metabolisme asam arakhidonat yaitu PGE<sub>2</sub> di jalur *cyclooxygenase* menurun.

Penurunan rasio EP3 juga terjadi pada kelompok tikus adiksi nikotin yang diberi VCO, dan tampak sebanding dengan penurunan rasio EP3 pada kelompok yang diberi diklofenak (Gambar 4b, kelompok Nd dan NVCO, wilayah otak hipokampus), bahkan lebih rendah (Gambar 4b, kelompok Nd dan NVCO, wilayah otak bulbus olfaktorius dan total wilayah hipokampus dan bulbus olfaktorius). VCO telah diketahui mempunyai efek anti inflamasi.<sup>13,25</sup> Penelitian lain mengenai VCO dalam adiksi nikotin dilakukan oleh Anggadiredja dkk (2011) yang menyimpulkan bahwa VCO dapat mencegah kondisi *dependence* dan *relapse* tikus model adiksi nikotin di tingkat perilaku, yang ditandai dengan rendahnya nilai *preference score*. VCO mengandung berbagai macam senyawa aktif.<sup>14</sup> Salah satu senyawa aktif yang paling banyak terkandung dalam VCO adalah asam laurat, yang tergolong ke dalam golongan asam lemak jenuh rantai sedang atau *Mid Chain Fatty Acids* (MCFA).

Asam laurat di dalam pencernaan akan diurai menjadi monolaurin dan gliserol, kemudian diabsorpsi usus halus langsung masuk ke dalam sirkulasi darah yang dapat digunakan langsung sebagai energi.<sup>26</sup> Hal ini berbeda dengan asam lemak jenuh rantai panjang seperti asam palmitat, asam oleat pada VCO yang tidak dapat masuk ke dalam sirkulasi darah secara langsung namun harus diikat terlebih dahulu dalam bentuk kilomikron dan dideposit sebagai lemak. Monolaurin telah diketahui memiliki berbagai macam khasiat, seperti anti mikroba, anti jamur dan anti virus.<sup>11,12</sup> Diduga monolaurin mempengaruhi jalur lain selain jalur asam arakhidonat, yang terkait dengan *down regulation* ekspresi gen reseptor EP3.<sup>27</sup> Masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme seluler dari senyawa-senyawa aktif di dalam VCO yang terlibat dalam jalur metabolisme asam arakhidonat. Penemuan yang didapat akan mengarahkan pemahaman yang lebih mendalam mengenai peran VCO pada metabolisme asam arakhidonat, khususnya di dalam menanggulangi masalah adiksi nikotin.

## **Mekanisme Nikotin, Peran Diklofenak dan VCO di Jalur Asam Arakhidonat dalam Ketergantungan**

Dari hasil penelitian di atas, dapat dibuat suatu mekanisme seluler proses ketergantungan nikotin yang melibatkan metabolisme asam arakhidonat. Gambar 6 memperlihatkan model mekanisme adiksi nikotin, peran diklofenak dan dugaan peran VCO dalam menghambat proses adiksi nikotin pada penelitian ini.

Kerja nikotin mempengaruhi aktivitas saraf dan perilaku tidak lepas dari peran reseptor nAChRs. Nikotin yang diberikan secara intra peritoneal diduga sampai ke sistem saraf pusat dengan cara masuk ke sistem sirkulasi darah melalui vena porta melewati *blood brain barrier* dan selanjutnya berikatan dengan reseptor nACh yang berada pada neuron pre sinaps.<sup>16</sup> Ikatan nikotin dengan reseptor nACh menyebabkan perubahan konformasi reseptor, sekaligus membuka gerbang *ion channel*.<sup>19</sup> Akibatnya  $Ca^{2+}$  ekstraseluler masuk ke dalam sel neuron pre sinaps dan mengakibatkan jumlah  $Ca^{2+}$  intraseluler meningkat. Peningkatan  $Ca^{2+}$  intraseluler ini akan menyebabkan pengeluaran neurotransmiter. Dari berbagai macam neurotransmiter, glutamat diduga memperantarai proses-proses yang melibatkan jalur asam arakhidonat (Gambar 6a).<sup>19</sup>

Glutamat yang berada pada celah sinaps selanjutnya akan berikatan dengan reseptor glutamat yang terdapat pada neuron post sinaps. Ikatan antara glutamat dan reseptornya akan menyebabkan  $Ca^{2+}$  ekstraseluler di daerah celah sinaps masuk ke dalam sel sehingga  $Ca^{2+}$  intraseluler di post sinaps meningkat, yang selanjutnya akan mengaktivasi cPLA<sub>2</sub> yang terdapat pada sitosol. Aktivasi cPLA<sub>2</sub> akan menghidrolisis asam arakhidonat dari fosfolipid pada membran plasma, dan proses metabolisme asam arakhidonat dimulai.<sup>19</sup> Proses metabolisme asam arakhidonat di jalur *cyclooxygenase* dengan bantuan enzim COX 1 dan COX2 akan menghasilkan produk-produk akhir, salah satunya adalah PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> selanjutnya akan berdifusi keluar dari sel untuk berikatan dengan reseptor eiprostanoid (EP3). Ligand PGE<sub>2</sub> dengan reseptor EP3 akan menimbulkan sinyal transduksi yang selanjutnya diteruskan ke nucleus, dan menginduksi transkripsi gen EP3.<sup>10</sup> Pada penelitian ini ekspresi reseptor EP3 yang diisolasi dari membran sel saraf di daerah hipokampus dan bulbus dipelajari.

Diklofenak yang telah diketahui berperan sebagai COX inhibitor non spesifik, bekerja menghambat enzim *cyclooxygenase* pada proses metabolisme asam arakhidonat. Karena enzim *cyclooxygenase* dihambat oleh diklofenak maka proses metabolisme asam arakhidonat di jalur *cyclooxygenase* akan terhambat dan PGE<sub>2</sub> akan menurun. Penurunan PGE<sub>2</sub> sebagai ligan

reseptor EP3 diduga akan menurunkan sinyal transduksi yang berdampak pada penurunan jumlah reseptor EP3.

VCO diduga mempengaruhi ekspresi reseptor EP3 melalui senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam VCO. Monolaurin, monokaprat dan monokaprilat merupakan senyawa bioaktif yang termasuk dalam golongan asam lemak rantai sedang yang akan diabsorpsi dalam usus halus langsung masuk ke dalam sirkulasi darah.<sup>26</sup> Senyawa-senyawa ini diduga mempengaruhi transduksi sinyal reseptor EP3 dan menghambat induksi transkripsi gen EP3 sehingga jumlah reseptor EP3 menurun.<sup>27</sup> Namun hingga saat ini belum diketahui senyawa aktif apa yang ada pada VCO dan bagaimana dapat berperan dalam mengatur ekspresi gen reseptor EP3, apakah melalui jalur asam arakhidonat atau jalur lain.

## **KESIMPULAN**

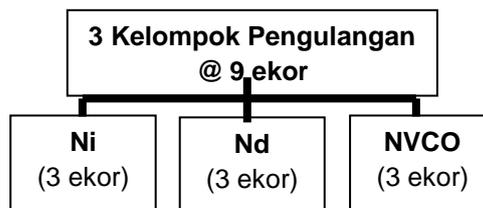
Ekspresi reseptor EP3 meningkat pada kelompok tikus yang diberi nikotin saja dan menurun pada kelompok tikus yang diberi *pre-treatment* diklofenak dan VCO. Pola penurunan ekspresi reseptor EP3 pada kelompok tikus yang diberi *pre-treatment* VCO sebanding dengan kelompok tikus yang diberi *pre-treatment* diklofenak.

## **DAFTAR PUSTAKA**

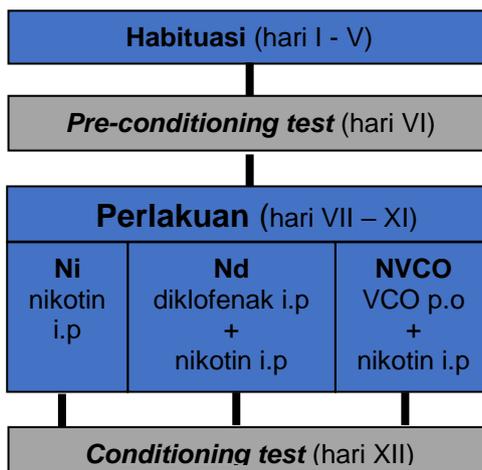
1. National Institute on Drug Abuse (2011) : Tobacco Addiction – December 2011. *Topics in Brief: National Institute on Drug Abuse*.
2. Benowitz, N. L. (c) (2010) : Nicotine Addiction, *The New England Journal of Medicine*, **362**, 2295-2303.
3. Benowitz, N.L. (b) (2008) : Neurobiology of Nicotine Addiction: Implication for Smoking Cessation Treatment. *The American Journal of Medicine*, **121**, **4A**, S3-S10.
4. Mao, D dan Daniel S. McGehee. (2009) : Nicotine and Behavioral Sensitization. *J Mol Neurosci*, **40**, 154-163.
5. Laviolette, S.R. dan Derek, K. (2004) : The Neurobiology of Nicotine Addiction: Bridging the Gap from Molecules to Behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**, 55-65.
6. Yamamoto, T., Anggadiredja, K., dan Hiranita, T. (2004) : New Perspective in The Studies on Endocannabinoid and Cannabis: a Role for The Endocannabinoid-Arachidonic Acid Pathway in Drug Reward and Long Lasting Relapse to Drug Taking. *J Pharmacol Sci*, **96**, 382-388.

7. Narumiya, S., Sugimoto, Y., dan Ushikubi, F. (1999) : Prostanoid Receptors: Structures, Properties, and Functions. *Physiological Reviews*, **79**, **4**, 1193-1226.
8. Sjah, S. dan Anggadiredja, K. (2007) : Study on The role of Arachidonic Acid Cascade in The Rewarding Effects of Nicotine Using Conditioned Place Preference Method. Skripsi Sarjana Program Studi Sains dan Teknologi Farmasi Sekolah Farmasi ITB.
9. Lucius, A. (2010) : Peran Jalur Asam Arakhidonat dalam Kekambuhan dan Ketergantungan Nikotin. Skripsi Sarjana Program Studi Sains dan Teknologi Farmasi Sekolah Farmasi ITB.
10. Sekidah, E. (2010) ~~ITB~~. Pengaruh Diklofenak pada Perubahan Tingkat Ekspresi Gen Reseptor EP3 pada Model Tikus Ketergantungan Nikotin, Tesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung.
11. Nevin, K. G. dan Rajamohan, T. (2010) : Effect of Topical of Virgin Coconut Oil and Skin Components and Antioxidant Status during Dermal Wound Healing in Young Rats, *Skin Pharmacol Physiol*, **23**, 290-297
12. Oghbolu, D. O., A. A. Oni, O. A. Daini dan A. P. Oloko. (2007) : In Vitro antimicrobial Properties of Coconut Oil on Candida species in Ibadan, Nigeria. *J. Med. Food.*, **10**, 384-387.
13. Intahphuak, S., P. Khonsung dan A. Panthong,(2010) : Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of Virgin Coconut Oil. *Pharm. Biol.*, **48** : 151-157
14. Anggadiredja, K., Barlian, A., Pinang, Y. D. M., dan Anggraeny, D. (2011) : Virgin Coconut Oil Prevents Nicotine Dependence and Relapse, *International Journal of Pharmacology*, **7**, **5**, 664-669.
15. Pinanga, Y. (2011) : Efek Virgin Coconut Oil (VCO) dalam Ketergantungan dan Kekambuhan Ketergantungan Nikotin. Skripsi Sarjana Program Studi Sains dan Teknologi Farmasi Sekolah Farmasi ITB.
16. Riviere, Jim. E. (2011) : Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications. John Wiley & Sons, 39-72.
17. Houezec, J. L. (2003) : Role of Nicotine Pharmacokinetics in Nicotine Addiction and Nicotine Replacement Therapy: A Review, *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **7**, **9**, 811-819.
18. Albuquerque, E. X, Pereira, E. F. R., Alkondon, M., dan Rogers, S. W. (2009) : Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: from Structure to Function. *Physiol*, **89**, 73-120.

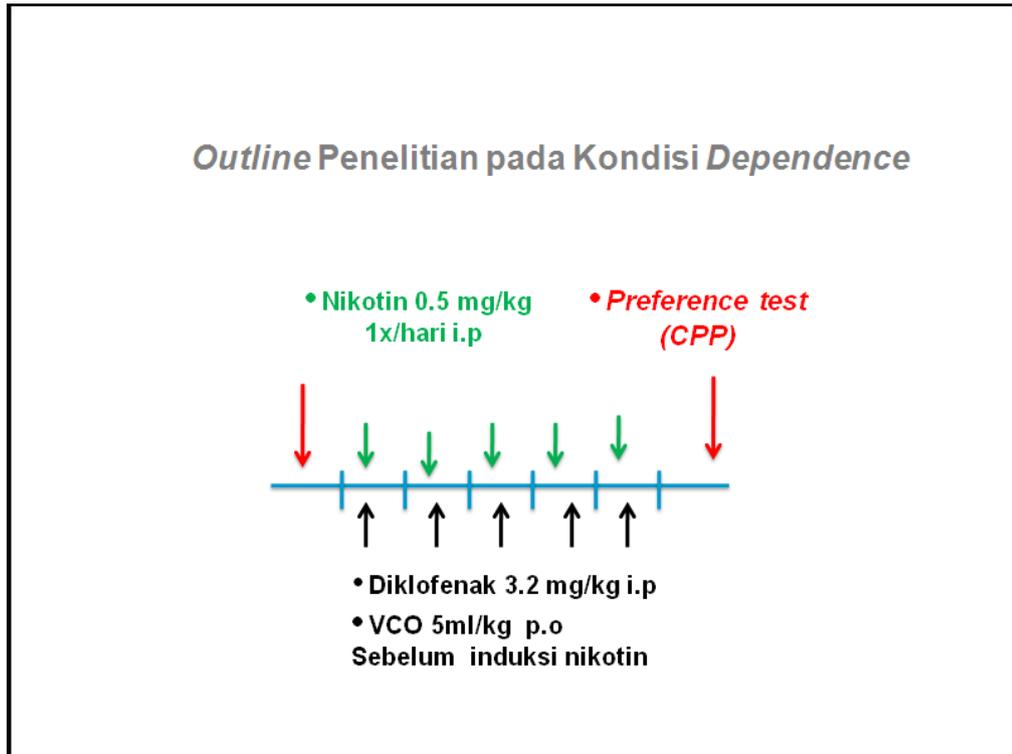
19. Turco, E., Jackson, F.R., DeCoster, M.A., Kolko, M., dan Bazan, N.G. (2002) : Glutamate Singnalling and Secretory Phospholipase A2 Modulate The Release of Arachidonic Acid from Neuronal. *Journal of Neuroscience Research*, **68**, 558-567.
20. Ge, S. dan Dani, J. A. (2005) : Nicotinic Acetylcholine Receptors at Glutamate Synapses Facilitate Long-Term Depression or Potentiation, *The Journal of Neuroscience*, **25**, **26**, 6084-6091.
21. Gijon, M.A. dan Leslie, C.C. (1999) : Regulation of Arachidonic Acid Release and Cytosolic Phospholipase A2 Activation. *Journal of Leukocyte Biology*, **65**, **3**, 330.
22. Gourevitch, B.; Kay, L. M., dan Martin C. (2010) : Directional Coupling from the Olfactory Bulb to the Hippocampus during a Go/No-Go Odor Discrimination Task. *J Neurophysiol*, **103**, 2633-2641.
23. Fletcher, M. L. dan Chen W. R. (2010) : Neural Correlates of Olfactory Learning: Critical Role of Centrifugal Neuromodulation, *Learning Memory*, **17**, 561-570.
24. Lucas, R., Warner, T.D., Vojnovic, I., dan Mitchell, J.A. (2005) : Cellular Mechanism of Acetaminophen: Role of Cyclooxygenase. *The FASEB Journal Express Article* 10.1096/fj.04-2437
25. Zakaria, Z. A., Somchit, M. N., Mat Jais, A. M., The, L. K., dan Salleh, M. Z. (2011) : In vivo Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Dried and Fermented Processed Virgin Coconut Oil, *Medical Principles and Practice*, **20**, 231-236.
26. German, J. B. dan Dillard, C. J. (2004) : Saturated Fats: What Dietary Intake? *Am J Clin Nutr*, **80**, 550-559.
27. Ruzin, A. dan Novick, R. P. (2000) : Equivalence of Lauric Acid and Glycerol Monolaurate as Inhibitors of Signal Transduction in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology*, **182**, **9**, 2668-2671.



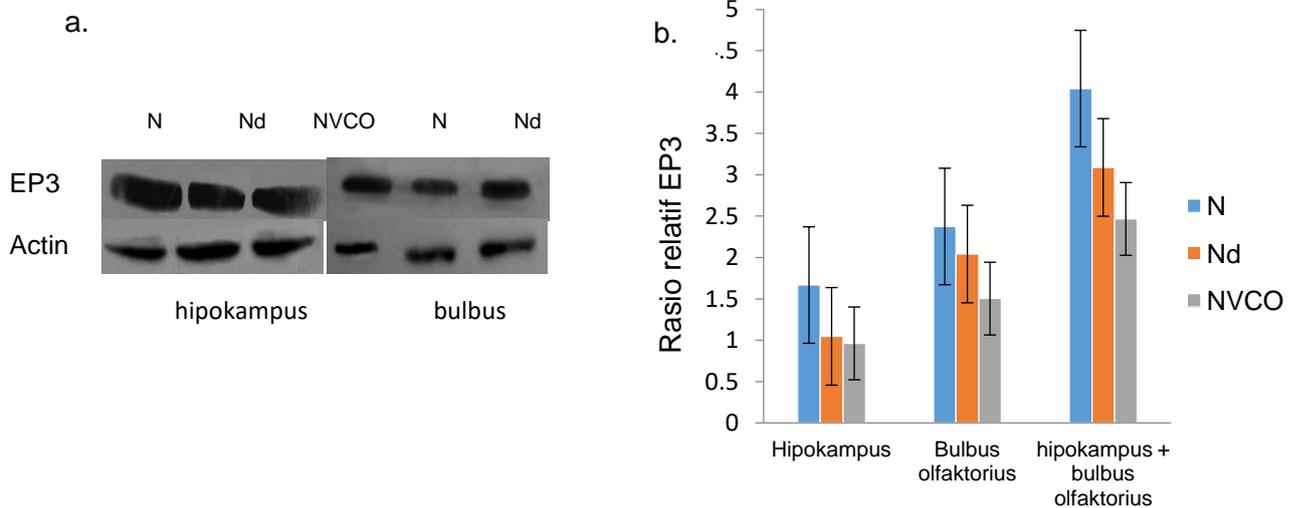
Gambar 1. Pengelompokan tikus percobaan berdasarkan kondisi dan perlakuan.



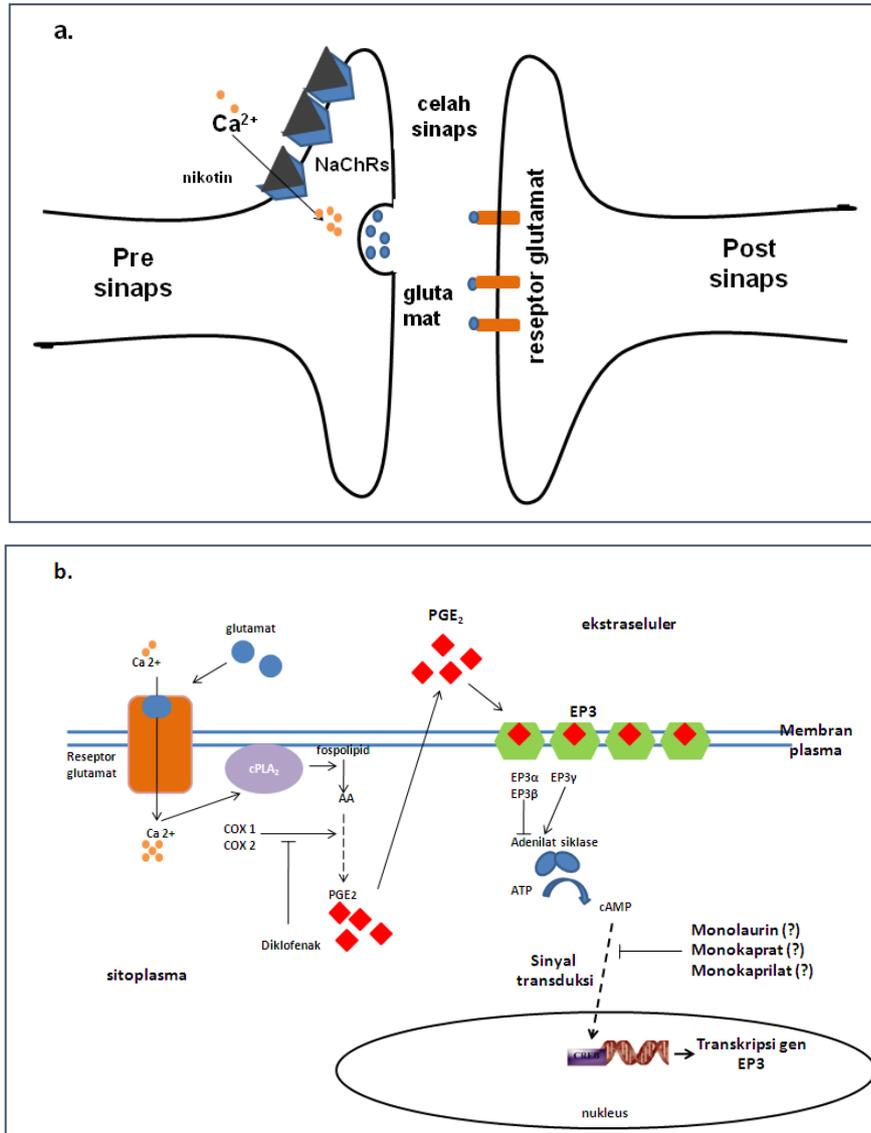
Gambar 2. Diagram alur perlakuan hewan percobaan. Uji CPP dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan (*pre-conditioning test* dan *conditioning test*)



Gambar 3. Outline penelitian



Gambar 4. a) Hasil Western Blot untuk reseptor EP3 dan *actin* (sebagai kontrol internal)  
 b) Rasio relatif EP3 terhadap *actin* pada wilayah otak hipokampus, bulbus olfaktorius dan total hipokampus-bulbus olfaktorius kondisi *dependence*. N: hanya diberi nikotin 0,5 mg/kg. Nd: diklofenak diberikan 3,2mg/kg 30 menit sebelum nikotin. NVCO: VCO diberikan 5ml/kg 30 menit sebelum nikotin.



Gambar 5. a) Pada celah sinaps di wilayah hipokampus dan bulbus olfaktorius, nikotin berikatan dengan reseptor nACh, yang menyebabkan ion channel terbuka dan Ca<sup>2+</sup> ekstraseluler masuk ke dalam sel neuron pre sinaps. Peningkatan Ca<sup>2+</sup> intraseluler akan menyebabkan pengeluaran berbagai macam neurotransmiter, salah satunya glutamat. b) Pada post sinaps, glutamat yang berada pada celah sinaps berikatan dengan reseptor glutamat, yang menyebabkan Ca<sup>2+</sup> ekstraseluler di daerah celah sinaps masuk ke dalam sel sehingga Ca<sup>2+</sup> intraseluler di post sinaps meningkat. Akumulasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler akan mengaktifasi cPLA<sub>2</sub> yang terdapat pada sitosol yang selanjutnya akan menghidrolisis asam arakhidonat dari fosfolipid pada membran plasma (Turco dkk, 2002). Proses metabolisme asam arakhidonat terjadi, salah satunya di jalur

*cyclooxygenase* dengan bantuan enzim COX 1 dan COX2 akan menghasilkan produk-produk akhir, salah satunya adalah PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> selanjutnya akan berdifusi keluar dari sel untuk berikatan dengan reseptor EP3. Ligand PGE<sub>2</sub> dengan reseptor EP3 akan menimbulkan sinyal transduksi yang selanjutnya diteruskan ke nucleus, dan menginduksi transkripsi gen EP3. Diklofenak menghambat kerja enzim COX, sedangkan monolaurin, monokaprat dan monokaprilat merupakan senyawa bioaktif VCO yang diduga mempengaruhi transduksi sinyal reseptor EP3 sehingga menghambat induksi transkripsi gen EP3.