

**EFEK ANTINOSISEPTIF *MORINDA CITRIFOLIA* L. DENGAN
MODEL NYERI INFLAMASI PADA TIKUS YANG
DIINDUKSI *CARRAGEENAN***

TESIS

**FIKRI FAHRUROJI
NPM: 0606000094**




**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FISILOGI
JAKARTA
JUNI 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Fikri Fahruroji

NPM : 0606000094

Tandatangan : 

Tanggal : 25 Juni 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh,

Nama : Fikri Fahrurroji
NPM : 0606000094
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Efek Antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. dengan Model Nyeri Inflamasi pada Tikus yang Diinduksi *Carrageenan*

Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. dr. Sri Bekti Subakir, MS

Pembimbing II : dr. Nurhadi Ibrahim, Ph.D.

Penguji I : dr. Tomi Hardjatmo, MS

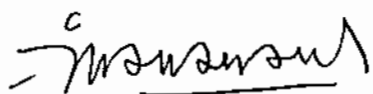
Penguji II : Prof. Hedi R. Dewoto, SpFK

Penguji III : dr. Ninik Mujihartini, MS

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 25 Juni 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FK UI,



Dr. rer physiol dr. Septelia Inawati Wanadi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagian sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fikri Fahruroji
NPM : 0606000094
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

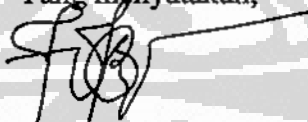
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia *Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)* atas karya ilmu ilmiah saya yang berjudul :

Efek Antinosisseptif *Morinda citrifolia* L. dengan Model Nyeri Inflamasi pada Tikus yang Diinduksi *Carrageenan*. Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 25 Juni 2009

Yang menyatakan,



(Fikri Fahruroji)

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, saya panjatkan ke hadirat Allah SWT. Atas karunia-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister ilmu biomedik (M.Biomed.) pada Kekhususan Fisiologi Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (PMIB FK UI)

Penelitian ini telah membuktikan efek antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. (Morinda) pada tikus dengan model nyeri inflamasi. Hasilnya diperoleh data beda masa laten yang merepresentasikan penurunan respon hiperalgesia termal pada tikus yang diberi minum Morinda sebelum diinjeksi *carrageenan*. Hasil uji nyeri *hot plate test* ini sinergis dengan laporan penelitian *in vitro* mengenai potensi antinosiseptif Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif.

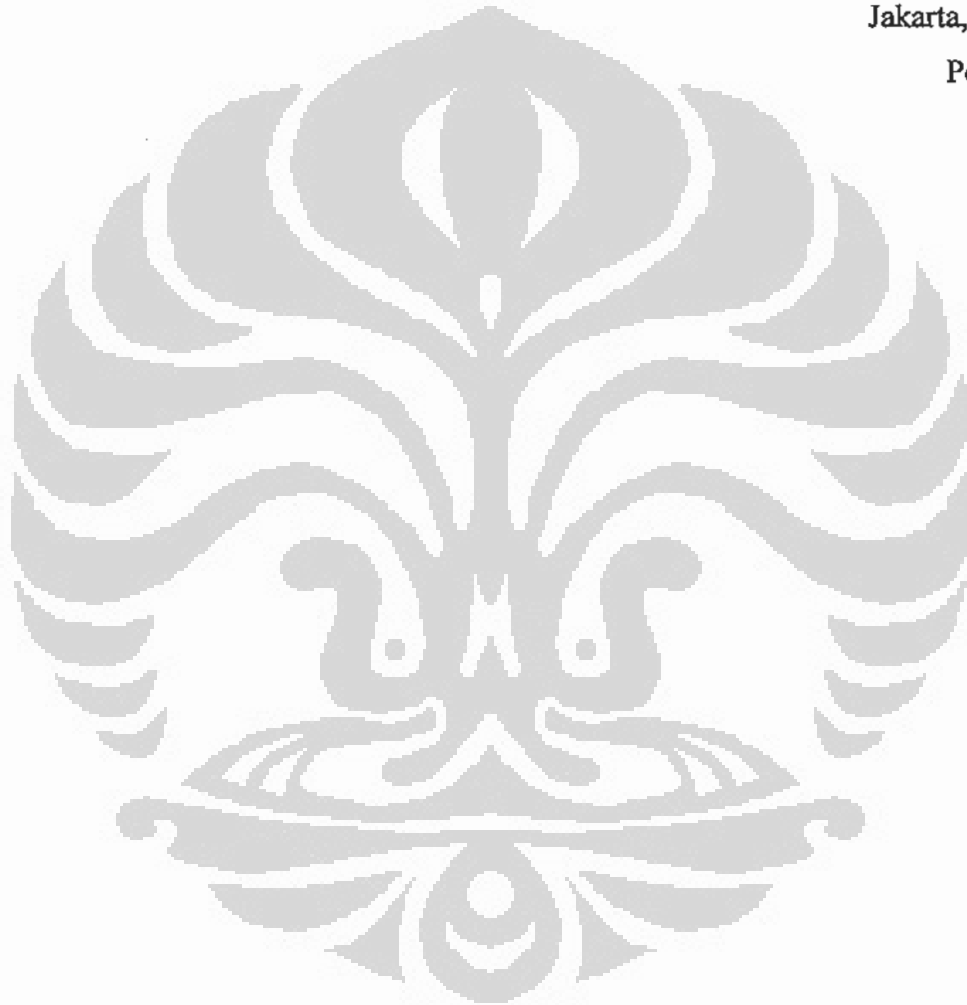
Selanjutnya, saya menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang telah berjasa selama proses belajar dan penelitian di PMIB FK UI, diantaranya:

- (1) Prof. Dr. dr. Sri Bakti Subakir, MS selaku pembimbing I; atas bimbingan, bantuan, dan nasehatnya selama saya kuliah ilmu faal di PMIB FK UI.
- (2) dr. Nurhadi Ibrahim, Ph.D. serta Dr. dr. Erni H. Purwaningsih, MS, selaku pembimbing II; atas bimbingan dan motivasi selama pembuatan proposal, pelaksanaan, penulisan hasil penelitian ini, dan revisi tesis.
- (3) dr. Ermita Ilyas, MS selaku Ketua Departemen Faal FK UI; saya ucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk belajar di Departemen Faal FK UI.
- (4) Seluruh staf pengajar Kekhususan Fisiologi dan staf pengajar PMIB FKUI yang telah berbagi ilmu, menuntun dan mengarahkan untuk belajar aktif.
- (5) Seluruh staf administrasi dan umum yang turut membantu dan memperlancar proses belajar saya di kekhususan Fisiologi.
- (6) Ema dan Bapa, serta keluarga di Garut.
- (7) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, tidak ada yang dapat saya berikan selain ucapan terimakasih atas bantuan, kerjasama dan doa' dari semuanya selama saya menyelesaikan pendidikan.

Saya berharap tesis ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu faal dan para pembaca. Oleh karena itu, saya menanti saran maupun kritik demi perbaikan tulisan ini. Akhirnya saya berdoa' semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan ridho-Nya, serta membalas kebaikan semua pihak yang telah diberikan kepada saya. Amin.

Jakarta, Juni 2009

Penulis,



EFEK ANTINOSISEPTIF *MORINDA CITRIFOLIA* L. DENGAN MODEL NYERI INFLAMASI PADA TIKUS YANG DIINDUKSI *CARRAGEENAN*

Fikri Fahrurroji
Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Jakarta, Juni 2009

ABSTRAK

Latar belakang: Salah satu mekanisme nyeri inflamasi adalah sensitisasi perifer yang dimediasi oleh prostaglandin E₂ (PGE₂) di terminal nosiseptor perifer. Konsekuensi sensitisasi adalah hiperalgesia yang menandai penurunan ambang nosiseptor atau modulasi aneka reseptor dan kanal ion nyeri. Hiperlgesia dapat diatasi oleh agen antinosiseptif inhibitor siklooksigenase-2 (COX-2) selektif, namun pada praktiknya analgesik tersebut dilaporkan masih memiliki kelemahan. Dalam hal ini, *Morinda citrifolia* L. dikategorikan etnomedika tropis yang diyakini memiliki efek antinosiseptif dalam berbagai kasus nyeri kronis. Secara *in vitro* jus *Morinda citrifolia* L. dilaporkan mampu menginhibisi aktivitas enzimatik COX-2 secara selektif, sehingga sangat potensial untuk mengatasi hiperalgesia.

Tujuan: Membuktikan efek antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal, dan pola beda latennya dibandingkan *celecoxib*, serta pengaruh diet teratur *Morinda citrifolia* L. terhadap hewan coba yang diinduksi *carrageenan* sesuai metode *modified hot plate* (MHP).

Metode: Penelitian ini merupakan studi eksperimental pada tikus *Sprague-Dawley* (SD) dengan model nyeri inflamasi menggunakan algogenik *carrageenan*. Parameter yang diteliti adalah beda laten reaksi menghindar antara telapak tungkai yang diinjeksi *carrageenan* secara intraplantar dengan telapak tungkai kontralateral melalui uji nyeri *hot plate test*. Nilai beda laten ditentukan pada tahapan respon hiperalgesia menit ke-15, ke-60, ke-180, dan ke-300 setelah diinduksi nyeri inflamasi.

Hasil: Diperoleh penurunan rerata beda laten pada tikus yang diberi minum *Morinda citrifolia* L. sebelum diinjeksi *carrageenan* secara bermakna dibandingkan rerata beda masa laten tikus yang diberi minum salin. Nilai tersebut juga tidak signifikan perbedaannya dengan rerata beda laten pada tikus yang diobati *celecoxib* maupun tikus yang diberi minum *Morinda citrifolia* L. selama 10 hari.

Kesimpulan: Efek antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal dengan model nyeri inflamasi pada tikus yang diinduksi algogenik *carrageenan*. Pola beda laten tersebut mirip dengan efek *celecoxib*, sehingga keduanya sama-sama terbukti dapat menginhibisi respon hiperalgesia termal. Sedangkan efek diet *Morinda citrifolia* L. secara teratur tidak signifikan mempengaruhi penurunan beda laten hiperalgesia termal.

Kata kunci: *Morinda citrifolia* L.; nosiseptif; COX-2; sensitisasi; hiperalgesia

ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF *MORINDA CITRIFOLIA* L. WITH PAIN INFLAMMATORY MODEL IN RAT-CARRAGEENAN INDUCED

Fikri Fahrurroji
Magister of Biomedical Science of Physiology Departement
Faculty of Medicine of University Indonesia
Jakarta, June 2009

ABSTRACT

Background: One mechanism of inflammatory pain was peripheral sensitization that mediated by prostaglandin E₂ (PGE₂) at peripheral terminal nociceptor. Therefore hyperalgesia was occurred and indicated reduction of threshold nociceptor or modulation of many receptors and ion channels of pain. Antinociceptive agent that is used for the treatment of hyperalgesia is selective cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitor, but practically it has several problems. *Morinda citrifolia* L. was categorized as tropical ethnomedicine that was believed has antinociceptive effect, especially in many types of chronic pain. Based on *in vitro* research, *Morinda citrifolia* L. was reported inhibited enzymatic activity of COX-2 selectively, thus it was potential to relieve hyperalgesia.

Objective: To proved that antinociceptive effect of *Morinda citrifolia* L. could decrease Δ latency of thermal hyperalgesia, and its value compare with *celecoxib*, and the effect of regular diet of *Morinda citrifolia* L. in rat-carrageenan induced based on modified hot plate test (MHP) method.

Method: This was an experimental study in rat *Sprague-Dawley* (SD) with pain inflammatory model using algogenic *carrageenan*. The parameter was the Δ latency of withdrawal reaction between paw that was injected by *carrageenan ipi* and contralateral paw through *hot plate test*. The Δ latency was measured at 15, 60, 180, and 300 minutes after inflammatory challenge.

Result: The rat that treated with *Morinda citrifolia* L. an hour before *carrageenan* injection has Δ latency of thermal hyperalgesia that was significantly different from rat that was treated with saline. That value was not different significantly than the Δ latency of the rat that was treated with *celecoxib* or the rat that was regular treated with *Morinda citrifolia* L. for 10 days.

Conclusion: Antinociceptive effect of *Morinda citrifolia* L. decreased Δ latency of thermal hyperalgesia with pain inflammatory model in rat *carrageenan* induced. This Δ latency was similar with the effect of *celecoxib*, thus both were inhibited thermal hyperalgesia response. While the effect of regular diet of *Morinda citrifolia* L. was not significantly influence the decreasing of Δ latency of thermal hyperalgesia

Key words: *Morinda citrifolia* L.; nociceptive; COX-2; sensitization; hyperalgesia

DAFTAR PUSTAKA

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Hipotesis	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Fisiologi Nyeri	7
2.2 Mekanisme Hiperalgnesia	15
2.3 Algogenik <i>Carrageenan</i>	23
2.4 Uji Nosiseptif <i>Hot Plate</i>	28
2.5 Mekanisme Antinosiseptif <i>Morinda</i>	33
2.6 Kerangka Teori	39
2.7 Kerangka Konsep	40
3. METODOLOGI PENELITIAN	41
3.1 Desain Penelitian	41
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	41
3.3 Sampel Penelitian	42
3.4 Material Penelitian	43
3.5 Cara Kerja	44
3.6 Parameter yang Diteliti	48
3.7 Analisis Data	48
3.8 Alur Penelitian	49
4. HASIL PENELITIAN	50
4.1 Efek Antinosiseptif <i>Morinda</i> terhadap Tikus yang Diinduksi Nyeri Inflamasi Menggunakan <i>Carrageenan</i> dengan Uji Nyeri <i>Hot Plate Test</i>	52
4.2 Perbandingan Efek Antinosiseptif <i>Morinda</i> dan <i>Celecoxib</i> Diperlihatkan oleh Penurunan Respon Hiperalgnesia pada Tikus yang Diinjeksi <i>Carrageenan</i> dengan Uji Nyeri <i>Hot Plate Test</i>	53

4.3 Perbandingan Aktivitas Antinosiseptif Morinda yang Diminumkan Sehari dengan Diet Morinda Selama Sepuluh Hari pada Tikus sebelum Diinjeksi <i>Carrageenan</i> dengan Uji Nyeri <i>Hot Plate Test</i>	54
5. PEMBAHASAN	55
6. KESIMPULAN DAN SARAN	61
6.1 Kesimpulan	61
6.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	
FORMAT JURNAL	
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

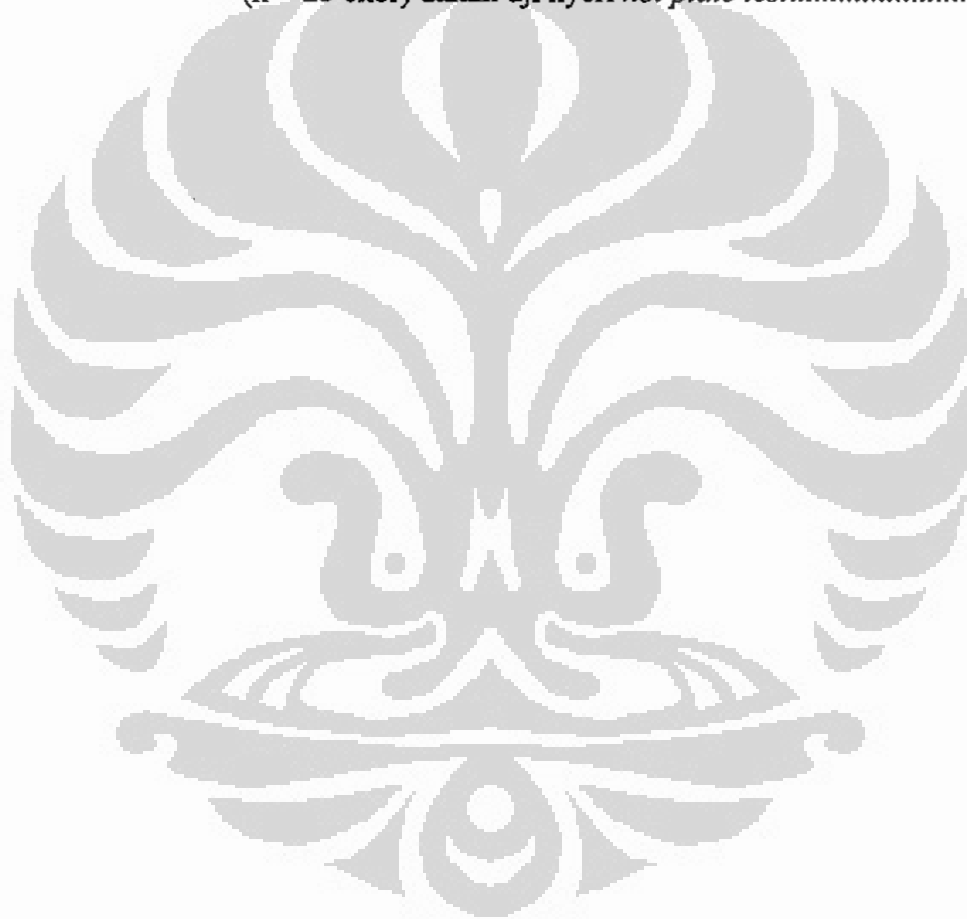


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Anatomi fungsional nosiseptor	9
Gambar 2.2	Nyeri pertama dan nyeri kedua	9
Gambar 2.3	Jaras asenden sensorik	11
Gambar 2.4	Refleks fleksor dan ekstensor menyilang dalam mempertahankan keseimbangan	15
Gambar 2.5	Proses nyeri inflamasi	16
Gambar 2.6	Mekanisme sensitisasi perifer	18
Gambar 2.7	Mekanisme sensitisasi sentral	19
Gambar 2.8	Model mekanisme transmisi nyeri normal dan hiperalgesia di taju dorsalis	20
Gambar 2.9	Kunci elemen molekuler pada proses transduksi, konduksi, transmisi, dan pemrosesan sinyal dari input nosiseptif di sistem saraf pusat dan perifer	22
Gambar 2.10	Struktur molekul κ -carrageenan terdiri dari polimer derivat polisakarida	24
Gambar 2.11	Penundaan sensitisasi sentral	25
Gambar 2.12	Model transduksi sinyal untuk memodulasi reseptor VR1 yang dipicu oleh aktivasi reseptor mGluR di terminal neuron aferen	26
Gambar 2.13	Biosintesis asam arakidonat menghasilkan prostanoide terminal yang dikatalisasi oleh sikloosigenase	28
Gambar 2.14	Model produk <i>hot plate</i> untuk menguji efikasi analgesik narkotik pada hewan tikus atau mencit sesuai dengan metode dari N.B. Eddy dan D. Leinbah.....	29
Gambar 2.15	Reseptor kapsaisin sebagai molekul reseptor sensorik polimodal	31
Gambar 2.16	Fenomena belajar merupakan masalah uji <i>hot plate</i>	32
Gambar 2.17	<i>Morinda citrifolia</i> L. Memiliki keunggulan khas dibandingkan spesies noni/mengkudu lainnya	34
Gambar 2.18	Skema kerangka teori penelitian efek antinosiseptif <i>Morinda</i> dengan model nyeri inflamasi dan uji respon hiperalgesia termal menggunakan <i>hot plate test</i>	39
Gambar 2.19	Skema kerangka konsep penelitian efek antinosiseptif <i>Morinda</i> dengan model nyeri inflamasi	40
Gambar 3.1	Skema alur penelitian efek antinosiseptif <i>Morinda</i> dengan model nyeri inflamasi dan respon hiperalgesia <i>hot plate test</i> ...	49
Gambar 4.1	Pengamatan respon hiperalgesia tikus dalam uji nyeri <i>hot plate test</i>	50
Gambar 4.2	Respon hiperalgesia termal antara kelima kelompok tikus direpresentasikan oleh beda laten reaksi menghindar tungkai dalam uji nyeri <i>hot plate test</i>	52

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Reseptor ionotropik dan kanal ion bergerbang ligan yang diekspresikan oleh neuron aferen primer nosiseptif	13
Tabel 2.2	Reseptor metabotropik pada neuron aferen primer nosiseptif	14
Tabel 4.1	Data rerata beda laten hasil pengukuran respon hiperalgesia terhadap 5 kelompok tikus yang berbeda (n = 25) dalam uji nyeri <i>hot plate test</i>	51
Tabel 4.2	Perbandingan <i>pairwise</i> beda laten hasil pengukuran respon hiperalgesia antar 5 kelompok tikus yang berbeda (n = 25 ekor) dalam uji nyeri <i>hot plate test</i>	51

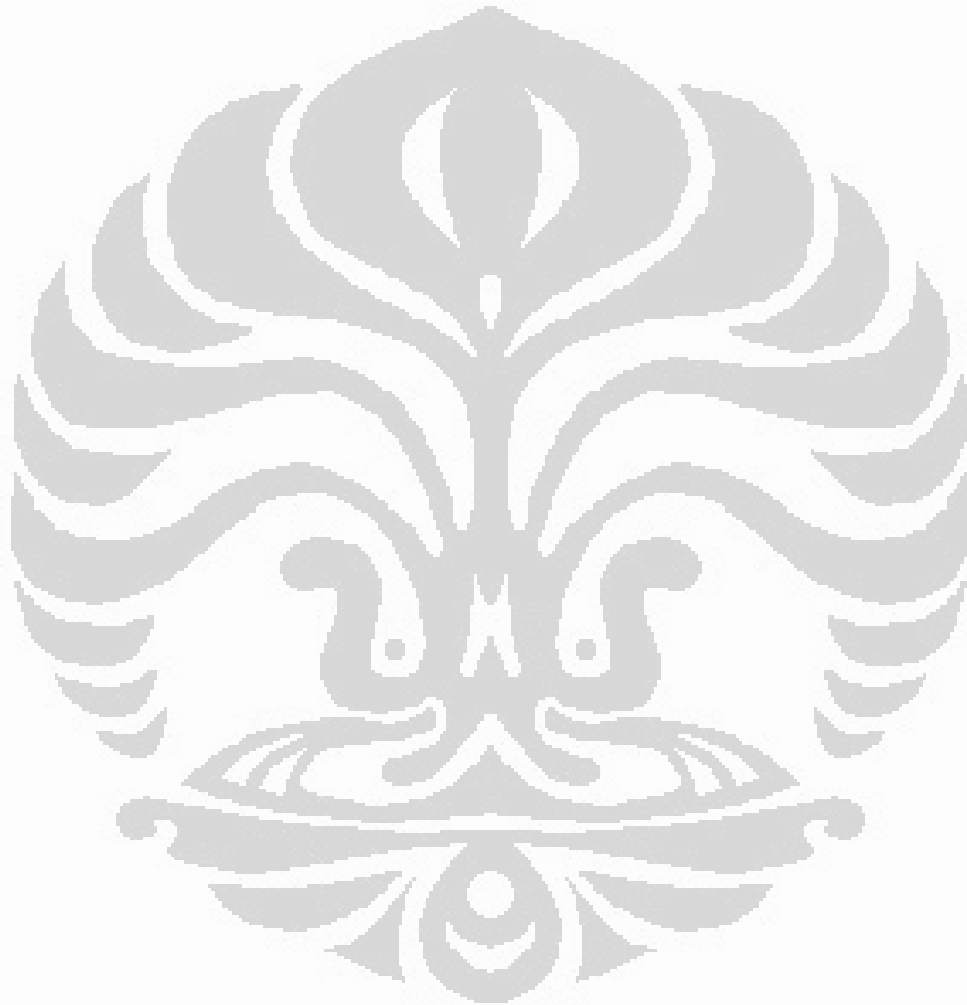


DAFTAR SINGKATAN

(IEG) <i>c-fos</i>	: <i>immediate early gene c-fos</i>
5HT _{A2}	: reseptor 5-hidroksitriptamin A2
AMPA	: reseptor <i>α-amino-hidroxy-5-methyl-4-isoxazo-lepropionic acid</i>
AP1	: <i>activated protein 1</i>
BDNF	: <i>brain-driven neurotrophic factor</i>
CAM	: <i>complementary and alternative medicine</i>
cAMP-PKA/PKC-dependent:	jalur adenosin monofosfat-protein kinase A/protein kinase C
CB2	: <i>cannabinoid 2</i>
CGRP	: <i>calsitonin gen-related peptida</i>
CREB	: <i>cAMP responsive element-binding protein</i>
DH	: <i>dorsal horn</i>
DREAM	: faktor represor inti
DRG	: <i>dorsal root ganglia</i>
EIA	: <i>enzyme immuno assay</i>
EP ₁	: reseptor PGE ke-1 yang terikat protein G
H ₂ S	: hidrogen disulfida
IASP	: <i>International Association for the Study of Pain</i>
IL-1 β	: interleukin-1 beta
LTP	: <i>long-term potentiation</i>
mGluR	: <i>metabotropic glutamate receptor</i>
MHP	: <i>modified hot plate</i>
mPGES-2	: <i>microsomal prostaglandin sinthas-2</i>
NF κ B	: faktor transkripsi inti untuk gen-gen proinflamasi
NK1	: reseptor nerurokinin 1
NMDA	: <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NSAIDs	: <i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
OIH	: <i>opioid-induced-hyperalgesia</i>
COX-2	: <i>cyclooxygenase-2</i>
PAG	: <i>periaqueductal gray matter</i>
PGE ₂	: Prostaglandin E2
SD	: <i>Sprague-Dawley</i>
TBX ₂	: tromboksan B ₂
TNF- α ,	: <i>tumor necrosis factor-α</i>
TRPV1	: <i>transient receptor potencial vaniloid 1</i>
TTXr	: <i>tetrodotoxin-sensitive</i>
VR1	: <i>vaniloid receptor 1</i>
W-MHP	: <i>water-modified hot plate</i>

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Standar prosedur penggunaan *Hot Plate*
Lampiran 2 Data hasil pengamatan respon hiperalgesia termal dalam uji nyeri
hot plate test



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fenomena nyeri kerap menyertai berbagai gangguan homeostasis sistem organ. Berdasarkan tinjauan fisiologi, nyeri merupakan interpretasi otak terhadap informasi sensorik yang dikirim dari nosiseptor melalui sirkuit nyeri.¹ Respon nyeri merefleksikan dinamika biomolekuler di dalam jaringan, dan pengolahan pesan secara spesifik di sepanjang sirkuit nyeri. Seandainya terjadi reaksi inflamasi, proliferasi kanker, atau lesi pada serat saraf; kondisi patologis tersebut kerap memicu respon nyeri yang maladaptif atau berlangsung secara kronis. Oleh karena itu, diperlukan manajemen nyeri yang lebih khusus terhadap pasien-pasien nyeri kronis agar mereka tidak terlalu terbebani oleh biaya yang lebih besar atau waktu penyembuhan yang lebih lama.

Salah satu mekanisme neurofisiologi yang berhubungan dengan nyeri kronis adalah hiperalgesia atau secara molekuler dikategorikan sensitisasi dan plastisitas sinaps. Umumnya hiperalgesia ditandai penurunan ambang nyeri, sehingga intensitas nyeri meningkat atau terkadang disertai nyeri spontan.² Penurunan ambang nyeri merupakan proses kompleks yang melibatkan aneka protein seperti mediator, reseptor, kanal ion, atau transduser sinyal di nosiseptor. Kondisi patologis tertentu mungkin dapat menginduksi peningkatan ekspresi gen yang mempengaruhi fungsi kerja aneka protein tersebut. Respon hiperalgesia terjadi manakala modifikasi pascatranslasi dan perubahan transkripsi berhasil menurunkan ambang nyeri atau meningkatkan eksitabilitas membran nosiseptor.³

Dewasa ini target molekuler penyembuhan hiperalgesia terus dikembangkan untuk meningkatkan kualitas manajemen nyeri inflamasi atau nyeri neuropatik. Hiperalgesia yang dominan merupakan manifestasi penyakit-penyakit kronis seperti kanker, artritis, dismenorhea, dan trauma jaringan saraf.⁴ Bahkan disinyalir inefisiensi aplikasi opioid dalam kasus-kasus nyeri kronis, justru memicu hiperalgesia yang disebut fenomena hiperalgesia akibat efek opioid (*opioid-induced-hyperalgesia*, OIH).⁵ Berdasarkan patofisiologinya, nyeri dalam kasus-kasus tersebut melibatkan aneka biomolekul yang berhubungan dengan mekanisme hiperalgesia. Oleh karena itu, terdapat banyak target molekuler yang

harus diidentifikasi bila akan mengaplikasikan suatu agen antinosiseptif dalam kasus-kasus tersebut. Manajemen nyeri saat ini tidak cukup hanya menargetkan penghilangan gejala umum nyeri, tanpa merevitalisasi mekanisme neurobiologi nyeri.^{3,4} Artinya, perlu diteliti signifikansi interaksi antara agen antinosiseptif yang akan diaplikasikan dengan target molekul yang terlibat dalam mekanisme hiperalgesia.

Salah satu target molekuler berbagai agen antinosiseptif atau analgesik adalah enzim siklooksigenase-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2). Enzim mikrosomal ini telah diidentifikasi sebagai katalisator biosintesis prostanooid yang menyebabkan nyeri dan reaksi inflamasi secara umum.^{1,6,7} Dalam konteks hiperalgesia, prostanooid merupakan salah satu mediator yang dapat menginduksi sensitisasi atau plastisitas, terutama pada kasus-kasus nyeri inflamasi.^{4,8,9} Misalnya, peningkatan sintesis prostaglandin akan memodulasi kanal ion atau reseptor di nosiseptor melalui jalur adenosin monofosfat-protein kinase A/protein kinase C (*cAMP-PKA/PKC-dependent*), sehingga ambang nyeri tereduksi.⁹⁻¹¹ Umumnya manajemen nyeri untuk menginhibisi respon hiperalgesia atau menghilangkan gejala nyeri adalah aplikasi obat antiinflamasi nonsteroid (*nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs*), inhibitor COX-2 selektif, opioid, atau kombinasi farmaseutikal.^{3,7,8,12}

Akan tetapi, faktanya aplikasi analgesik tersebut dilaporkan masih memiliki kelemahan, risiko efek samping, atau hambatan teknologi dan biaya untuk diaplikasikan secara luas. Realitas farmaseutikal ini melatarbelakangi peneliti untuk mengeksplorasi agen antinosiseptif yang memiliki efek terapeutik setara dengan inhibitor COX-2 selektif, tanpa memicu gangguan homeostasis sistem tubuh serta mudah diaplikasikan oleh pasien dengan biaya yang relatif terjangkau. Selain itu, mekanisme inhibisi COX-2 dalam konsep hiperalgesia merupakan topik penelitian neurofisiologi yang relatif langka di Indonesia. Salah satu agen antinosiseptif yang akan diteliti adalah *Morinda citrifolia* L. (selanjutnya ditulis Morinda) atau di Indonesia dinamai buah mengkudu, sedangkan di Kepulauan Pasifik disebut buah noni.

Morinda merupakan etnomedika kategori *complementary and alternative medicine* (CAM) yang paling populer pemanfaatannya di dunia dalam dekade

terakhir ini.¹³ Salah satu manfaat terapeutik buah ini adalah sebagai antinosiseptif dalam berbagai kasus inflamasi, malignan, dan neurodegeneratif.¹³⁻¹⁶ Berdasarkan hasil-hasil penelitian *in vitro* sebelumnya telah diidentifikasi bahwa Morinda memiliki efek terapeutik sebagai inhibitor COX-2 selektif yang setara dengan kapasitas inhibisi *celecoxib* (obat inhibitor selektif COX-2).^{15,17} Penelitian tersebut sinergis dengan laporan penelitian yang menyatakan bahwa sejak dulu buah Morinda dianggap memiliki aktivitas analgesik dan sedatif.^{15,18} Morinda juga dilaporkan signifikan sebagai analgesik sentral dalam uji nyeri *writhing test* dan *hot plate test* dengan obat perbandingan nalokson, tanpa beresiko adiksi serta tidak memicu efek samping.^{15,19,20}

Begitupun halnya di Indonesia, Morinda sudah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional, dan dalam kurun waktu delapan tahun terakhir ini mulai populer sebagai minuman kesehatan di lapisan masyarakat tertentu.²¹ Akan tetapi, penelitian mengenai efek terapeutik Morinda –terutama sebagai obat tradisional untuk mengatasi nyeri kronis– masih sangat terbatas. Jadi, penelitian ini penting untuk membuktikan efek antinosiseptif Morinda melalui mekanisme inhibisi COX-2 dengan model uji hiperalgesia pada hewan coba. Lebih jauh lagi penelitian ini sinergis dengan misi riset Universitas Indonesia dan tren riset Program Magister Ilmu Biomedik FK UI guna mengungkap potensi etnomedika khas bumi Indonesia melalui pendekatan biomedik molekuler.²²

Dalam konteks penelitian antinosiseptif, aplikasi formula naturaseutikal Morinda harus memperlihatkan penurunan respon hiperalgesia pada hewan coba sebagai indikator terjadinya inhibisi COX-2. Tinjauan neurofisiologi *behavior* ini dipakai untuk membuktikan efek terapeutik Morinda sebagai analgesik. Model penelitian yang dipakai adalah uji nyeri *hot plate test* yang sensitif terhadap inhibitor COX-2 (analgesik nonopioid).²³ Nyeri inflamasi pada hewan coba akan diinduksi memakai algogenik *carrageenan*, yakni sebagai stimulus primer hiperalgesia. Sedangkan stimulus sekunder bersumber dari panas *hot plate*. Jadi, prospek penelitian ini adalah mengungkap lebih lanjut efek antinosiseptif Morinda melalui jalur inhibisi COX-2 dengan mengadopsi model uji nyeri inflamasi menggunakan metode *modified hot plate* (MHP) pada hewan coba.

1.2 Rumusan Masalah

Masyarakat tradisional zona tropis mempercayai Morinda dapat dijadikan obat untuk mengatasi nyeri kronis. Sementara itu, kecenderungan masyarakat global mulai mengenal dan memanfaatkan efek antinosiseptif produk olahan Morinda yang berhubungan dengan aneka masalah kesehatan. Sejauh ini motif masyarakat Indonesia mengkonsumsi Morinda umumnya kurang dilandasi rasionalisasi ilmiah, dan masyarakat ilmiahnya praktis belum ada yang meneliti antinosiseptif Morinda. Oleh karena itu, masalah utama penelitian ini adalah membuktikan efek antinosiseptif Morinda secara ilmiah dengan model nyeri inflamasi.

Hasil penelitian *in vitro* sebelumnya memperlihatkan signifikansi inhibisi Morinda terhadap aktivitas enzimatik COX-2. Seandainya jalur inhibisi yang diperankan oleh komponen aktif Morinda ini berperan juga dalam mekanisme nyeri inflamasi, maka aplikasi Morinda secara *in vivo* pada hewan coba harus memperlihatkan penurunan beda laten hiperalgesia termal ketika diinduksi *carrageenan*. Dengan demikian, turunan masalah yang harus dibuktikan adalah kekuatan antinosiseptif Morinda dibandingkan *celecoxib*. Selain itu, terdapat kepercayaan bahwa diet harian Morinda akan menghasilkan efek antinosiseptif yang lebih kuat. Hal ini menjadi masalah tambahan untuk membuktikan apakah benar diet Morinda teratur menimbulkan efek antinosiseptif yang lebih baik dibandingkan dengan efek konsumsi Morinda sewaktu.

1.3 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah di atas, penelitian ini akan difokuskan pada tiga hipotesis utama:

1. Efek antinosiseptif Morinda dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal ketika terjadi nyeri inflamasi.
2. Efek antinosiseptif Morinda dalam hal menurunkan beda laten hiperalgesia termal setara dengan *celecoxib*.
3. Diet Morinda teratur selama 10 hari lebih kuat menurunkan beda laten hiperalgesia termal dibandingkan dengan diet Morinda hanya 1 jam sebelum diinduksi *carrageenan*.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Meneliti efek antinosiseptif Morinda melalui model uji nyeri inflamasi pada hewan coba memakai *hot plate* sebagai alat uji hiperalgesia. Hasil akhir penelitian ini bertujuan untuk membuktikan kepercayaan tradisional mengenai etnomedika Morinda sebagai obat nyeri kronis melalui pendekatan fisiologi perilaku.

1.4.2 Tujuan Khusus

Secara khusus penelitian ini menekankan pada tiga tujuan utama, yaitu sebagai berikut:

1. Membuktikan bahwa efek antinosiseptif Morinda dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal dengan model nyeri inflamasi sesuai metode MHP.
2. Membandingkan pola beda laten hiperalgesia termal antara efek antinosiseptif Morinda dan *celecoxib*.
3. Membandingkan efek antinosiseptif antara diet teratur Morinda dengan konsumsi Morinda sewaktu terhadap penurunan beda laten hiperalgesia termal.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Metodologis

Penelitian antinosiseptif Morinda jalur inhibisi COX-2 merupakan landasan penting dalam mengatasi hiperalgesia pada kasus-kasus nyeri kronis. Beragam target molekul yang terlibat dalam mekanisme sensitisasi dapat diteliti lebih lanjut seperti reseptor, kanal ion, cAMP, adenilat siklase, sitokin, dll. Bila secara *in vivo* efek inhibisi Morinda terhadap aktivitas enzimatik COX-2 terbukti menurunkan reaksi hiperalgesia, maka besar kemungkinan Morinda juga mempengaruhi ekspresi aneka protein yang terlibat dalam mekanisme sensitisasi. Sejauh ini sudah ada penelitian efek Morinda terhadap produksi cAMP dan interleukin 1-beta (IL-1 β) yang berhubungan dengan reaksi inflamasi atau hipersensitivitas. Selain itu, secara tidak langsung penelitian ini dapat menjadi argumentasi ilmiah

perihal aplikasi Morinda untuk sejumlah penyakit yang ditandai ekspresi berlebihan COX-2.

Sedangkan model uji nyeri *hot plate test* merupakan metodologi sederhana untuk penelitian nosiseptif pada hewan coba. Banyak mekanisme hiperalgesia termal yang dapat dieksplorasi dengan menggunakan *hot plate* sesuai standar MHP. Respon perilaku hewan coba akibat perlakuan atau stimulus hiperalgesia tertentu dapat diobservasi secara sederhana, cepat, dan akurat. Manfaat akhirnya adalah memfasilitasi penelitian-penelitian nosiseptif, baik yang berhubungan dengan efikasi antinosiseptif maupun mekanisme molekuler hiperalgesia. Dengan demikian, hasil-hasil penelitian hiperalgesia tersebut akan semakin memperkaya khasanah fisiologi nyeri.

1.5.2 Manfaat Aplikatif

Adapun manfaat praktis penelitian ini diantaranya:

1. Morinda yang terbukti signifikan menurunkan beda laten hiperalgesia termal dapat dipertimbangkan untuk mengatasi nyeri inflamasi dengan tetap memperhatikan aspek toksikologi.
2. Morinda yang terbukti signifikan menurunkan beda laten hiperalgesia termal dapat dipertimbangkan sebagai alternatif inhibitor COX-2 selektif dengan tetap memperhatikan aspek toksikologi.
3. Model dan instrumen penelitian hiperalgesia yang sesuai dengan metode MHP dapat diaplikasikan untuk menguji agen antinosiseptif lainnya pada hewan coba.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fisiologi Nyeri

Nyeri berdasarkan definisi *International Association for the Study of Pain* (IASP) adalah sensorik yang tidak menyenangkan atau pengalaman emosional yang berhubungan dengan kerusakan jaringan, baik secara aktual maupun potensial. Presepsi nyeri selalu subyektif, banyak orang melaporkan nyeri karena kerusakan jaringan atau penyebab patofisiologi, tetapi ada juga orang yang melaporkan nyeri karena alasan psikologis semata.²⁴ Pengalaman nyeri merupakan proses kompleks yang melibatkan transduksi stimulus berbahaya dari lingkungan, hingga proses kognitif dan emosional di dalam otak.²⁵ Deskripsi nyeri merupakan presepsi atau perasaan teriritasi, terluka, tersengat, tersakiti, tertekan, sedih, atau setiap sensasi yang tidak dapat ditolerir oleh anggota tubuh. Sedangkan nosiseptif adalah setiap proses sensorik yang dapat menimbulkan sinyal untuk mentrigger nyeri.² Dalam hal ini, para neurofisiolog mengkaji nosiseptif sebagai respon spesifik terhadap stimulus yang berpotensi merusak jaringan, sedangkan kajian nyeri terbatas pada sensasinya.²⁶

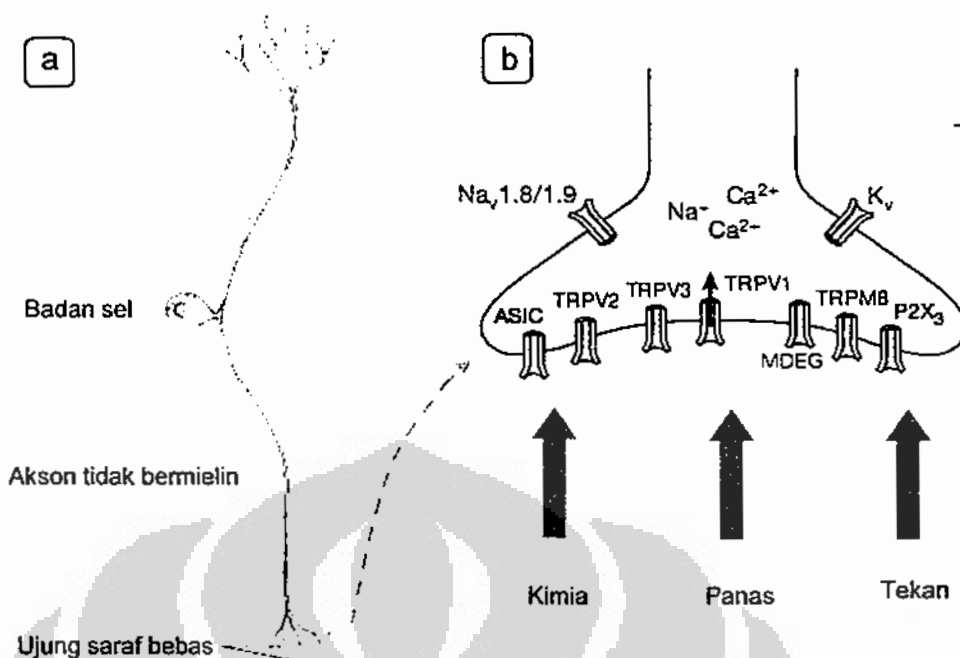
Idealnya nyeri berfungsi sebagai sistem alarm –yang dimiliki organisme– atau peringatan dini akan ancaman kerusakan.^{3,25} Manusia yang terlahir tanpa sensasi nyeri akan hidup dalam bahaya yang konstan, dan umumnya meninggal pada usia muda. Aktivitas nosiseptif pada tingkat rendah tetap penting dalam kerja sehari-hari, yakni untuk mengontrol pergerakan dan postur. Bahkan dalam keadaan tidur, nyeri diperlukan untuk mencegah regangan skeletal.² Oleh karena itu, nyeri laksana mekanisme penyelamatan yang esensial bagi kontinuitas perilaku dan kesehatan manusia.²⁶ Konsep ini sudah diperkenalkan oleh Sherrington sejak 1910, bahwa respon nyeri berupa refleks protektif atau perilaku menghindar yang diperlukan untuk melindungi organisme dari ancaman kerusakan.^{6,27} Dengan demikian, mekanisme nyeri atau sistem nosiseptif layak dikategorikan sebagai salah satu komponen yang bertanggung jawab mengontrol homeostasis.²⁷

Teori nyeri termasuk topik sensasi somatovisera dalam fisiologi manusia. Saat ini mekanismenya telah berkembang hingga pada tingkat molekuler. Dalam konteks fisiologi nyeri, penelitian nosiseptif umumnya difokuskan pada respon

perilaku organisme yang berhubungan dengan molekuler nyeri dalam kondisi tertentu. Minimal ada empat hal yang dapat dikritisi, yaitu: (1) nosiseptor dan jaras nyeri; (2) mekanisme transduksi, konduksi, dan transmisi sinyal nyeri; (3) molekuler nyeri yang mencakup kanal ion, reseptor, neurotransmitter, serta mediator nyeri; dan (4) respon perilaku nyeri. Keempat hal tersebut menjadi dasar analisis untuk semua jenis nyeri, termasuk dalam kasus hiperalgesia.

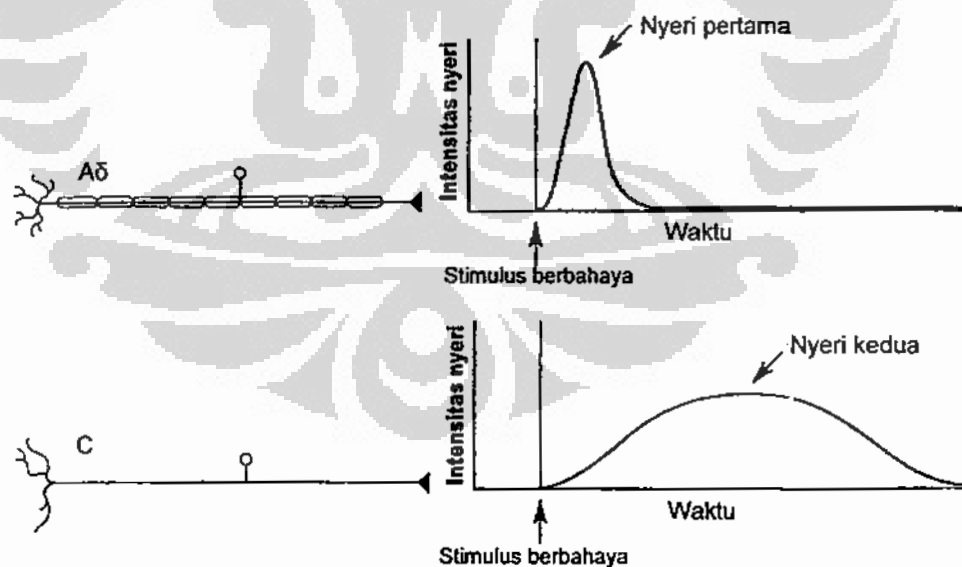
Nosiseptor merupakan neuron sensorik primer yang vital dalam hal sensasi somatik khusus stimulus nyeri. Kata nosiseptor itu sendiri berasal dari bahasa latin *nocere* yang artinya “menyakiti”.² Nosiseptor memiliki karakteristik ambang dan sensitivitas yang berbeda dibandingkan dengan serat saraf lainnya. Penelitian elektrofisiologi memperlihatkan nosiseptor hanya dapat diaktivasi oleh stimulus panas yang tinggi, tekanan yang intens, atau iritan kimia.^{2,25} Nosiseptor terdiri atas dua tipe dengan kekhasan neurokimia masing-masing. Anatomi fungsional nosiseptor berbentuk ujung saraf bebas, aksonnya bermielin atau tanpa mielin, dan termasuk kelompok reseptor somatosensori (Gambar 2.1a). Ujung saraf bebas tersebut adalah serat C tidak bermielin dan serat A δ kecil bermielin. Keduanya dikategorikan nosiseptor polimodal karena membrannya memiliki aneka kanal ion yang sensitif terhadap stimulus panas, tekan, atau kimia (Gambar 2.1b).^{2,3,28} Masing-masing serat berbeda dalam hal ukuran, kecepatan konduksi, dan derajat mielinasinya. Serat A δ memediasi nyeri pertama (cepat, akut, tajam), sedangkan serat C memediasi nyeri kedua (lambat, menyebar, tumpul) (Gambar 2.2).^{1,2,28}

Nosiseptor ditemukan hampir di semua jaringan tubuh mencakup kulit, tulang, otot, organ internal, dan meningen otak. Sedangkan badan selnya berada di segmental ganglia akar dorsalis (*dorsal root ganglia, DRG*), dan terminalnya bersinaps dengan neuron ordo kedua di taju dorsalis (*dorsal horn, DH*) medula spinalis. Jalur ascenden nyeri sebenarnya terdiri dari dua jaras, yaitu jalur spinothalamikus dan jalur trigeminal. Informasi nyeri dari tubuh yang sampai ke medula spinalis selanjutnya akan dikirim ke otak melalui jalur spinothalamikus secara kontralateral. Akson neuron ordo kedua pada jalur ini langsung melintas dan naik melalui traktus spinothalamikus di sepanjang permukaan ventral medula spinalis sampai ke talamus untuk bersinaps dengan neuron ordo ketiga. Sedangkan informasi nyeri dari wajah dan kepala dikirim melalui serat-serat tipis saraf



Gambar 2.1 Anatomi fungsional nosiseptor. (a) Ujung saraf bebas dikategorikan reseptor sederhana (pseudounipolar); (b) Aneka kanal ion pada ujung saraf bebas sensitif terhadap stimulus kimia, panas, atau tekan.

Sumber: Silverthorn DU. Human physiology: an integrative approach 3rd ed. Benjamin Cumming, 2004 "telah diolah kembali".



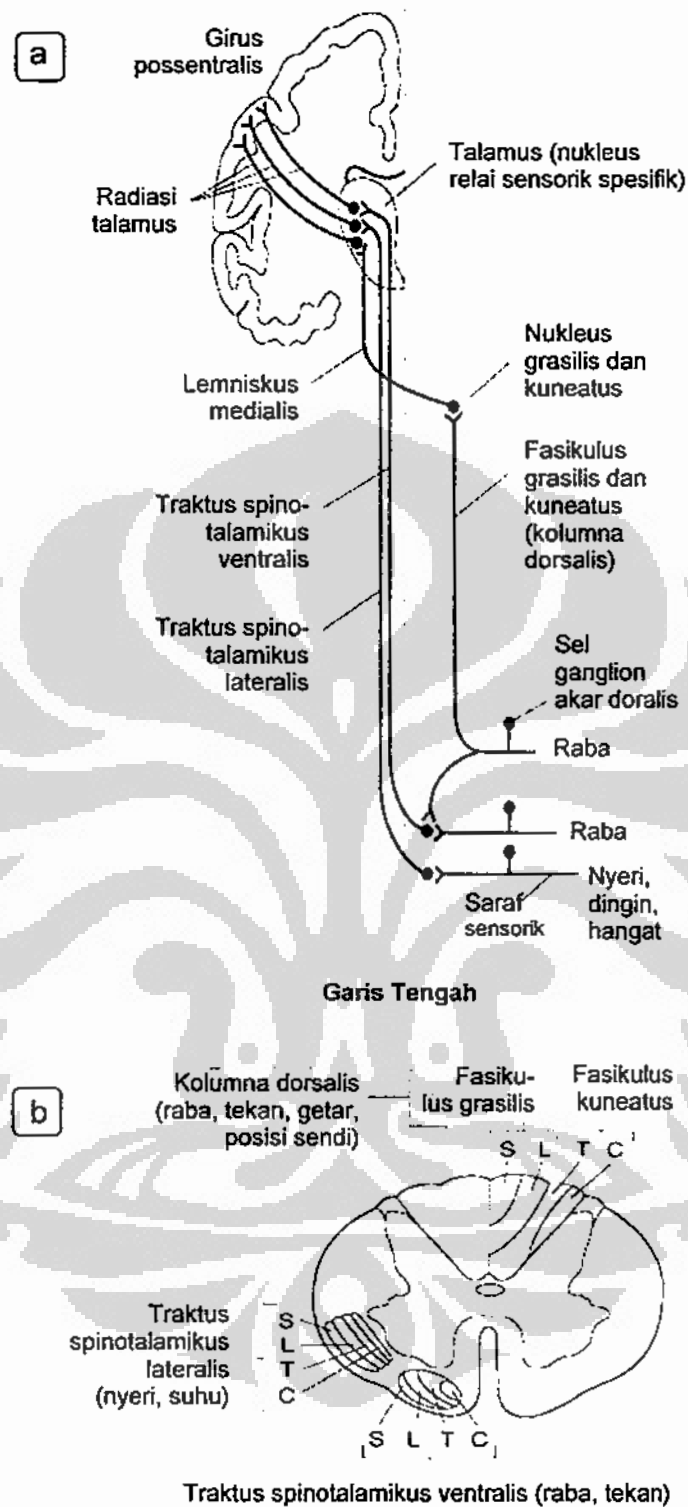
Gambar 2.2 Nyeri pertama dan nyeri kedua. Sensasi nyeri pertama akibat stimulus berbahaya dimediasi akson cepat A δ . Sedangkan yang kedua, sensasi nyeri yang lebih lama dimediasi serat C yang lambat.

Sumber: Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience exploring the brain 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001 "telah diolah kembali".

trigeminal yang bersinaps dengan neuron sensorik ordo kedua di nukleus trigeminal spinal batang otak. Akson sel ini melintas dan naik ke talamus melalui leminiskus trigeminalis. Sinaps dari kedua jaras tersebut di talamus cukup luas, sebagian akson berterminasi di nukleus paraventrikuler dan sebagian lagi di nukleus intralaminar. Akhirnya, informasi nyeri dari talamus diproyeksikan ke korteks somatosensori primer dan korteks singulat.^{2,6,26,28} Dalam hal ini, jalur ascenden nyeri memiliki persamaan dengan sensasi suhu, tetapi berbeda dengan sensasi raba dan tekan (Gambar 2.3).⁶

Nosiseptor sebagai neuron aferen primer memiliki tiga fungsi utama dalam proses nyeri, yaitu: mendeteksi stimulus membahayakan atau merusak (transduksi), mengirim input sensorik dari terminal perifer ke medula spinalis (konduksi), dan mentransfer input melalui sinaps ke neuron spesifik di lamina DH medula spinalis (transmisi). Secara umum fungsi tersebut dikategorikan transmisi normal atau mekanisme nyeri nosiseptif. Aktivasi neuron aferen primer berambang tinggi (serat C dan serat A δ) oleh stimulus intens (tidak merusak) akan menghasilkan nyeri yang terlokalisasi, tanpa disertai perubahan transkripsional maupun pasca-translasi. Transmisi normal ini mengisyaratkan peristiwa sensitivitas basal pada nosiseptor. Seandainya input –dari serat C berhasil– menginduksi perubahan pascatranslasi, maka akan terjadi sensitisasi perifer atau sentral.^{4,8,29}

Proses transduksi dimediasi oleh beragam reseptor spesifik seperti kanal ion sensitif-panas yang dinamai *vanilloid receptor* (VR1), kanal ion sensitif-proton yang dinamai *acid-sensing ionic channel* (ASIC) dan *dorsal root acid-sensing ionic channel* (DRASIC), serta aneka reseptor yang sensitif terhadap stimulus kimiawi spesifik (terutama histamin, bradikinin, purin, dan serotonin). Ekspresi elemen transduksi tersebut terjadi pada subset nosiseptor spesifik sesuai dengan sensitivitas modalitas tertentu. Selanjutnya proses konduksi akan dimediasi oleh kanal sodium bergerbang-voltase yang bertanggung jawab dalam fase pembangkitan potensial aksi dan –bersama kanal potasium– menentukan eksitabilitas neuron sensorik. Sejauh ini telah diketahui dua tipe kanal sodium bergerbang-voltase pada neuron, yaitu kanal yang sensitif terhadap racun ikan *puffer* dinamai *tetrodotoxin-sensitive* (TTXs) dan yang resisten terhadap racun tersebut dinamai *tetrodotoxin-resistant* (TTXr). Terakhir adalah proses transmisi sinaptik yang



Gambar 2.3 Jaras ascenden sensorik. (a) Perbandingan jaras ascenden antara sensasi nyeri, suhu, dan raba. Informasi nyeri dari kulit, badan, anggota tubuh dikirim melalui traktus spinotalamikus menuju formasio retikularis; (b) Potongan melintang medula spinalis yang menunjukkan lokasi jaras ascenden sensorik.

Sumber: Ganong WF. Review of medical physiology 21st ed. McGraw-Hill Companies, 2003 "telah diolah kembali".

dimediasi oleh kerja glutamat pada reseptor *α -amino-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) di neuron DH. Hasilnya adalah potensial pascasinaps eksitasi yang cepat diikuti oleh *edge trailing* yang lambat karena pengaruh reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA). Reseptor NMDA bersama reseptor nerurokinin 1 (NK1) dan *metabotropic glutamate receptor* (mGluR) merupakan kunci inisiasi atau kontinuitas transmisi sinaptik pada kasus sensitisasi sentral.^{8,29}

Berdasarkan uraian di atas dapat disimpulkan bahwa mekanisme nosiseptif sama dengan mekanisme potensial aksi, konduksi impuls, atau transmisi sinaptik pada umumnya. Hanya berbeda spesialisasi kanal ion, reseptor, atau neurotransmitter sesuai somatosensori masing-masing. Elemen terpenting dari semua itu adalah peranan kanal ion atau reseptor nosiseptif, baik yang bersifat ionotropik maupun metabotropik (Tabel 2.1 dan Tabel 2.2). Masing-masing reseptor atau kanal ion memiliki ligan spesifik, diekspresikan oleh neuron tertentu, serta memiliki fungsi yang khusus.^{3,8,28,29} Perubahan struktural, kimiawi dan fungsional neuron dapat terjadi sebagai respon terhadap perubahan stimulus lingkungan ditandai oleh modifikasi transduksi, konduksi, dan transmisi. Mekanisme tersebut merupakan peristiwa plastisitas yang berhubungan dengan perubahan ekspresi aneka molekul efektor akibat modifikasi pascatranslasi pada neuron.³⁴ Kasus plastisitas yang sering menandai beragam kondisi patologis adalah hiperalgesia atau mekanisme umumnya dinamai hipersensitivitas (sensitisasi).

Terakhir, tinjauan nosiseptif yang cukup penting dalam penelitian fisiologi perilaku ialah respon nyeri pada manusia atau hewan coba. Subset neuron ordo kedua yang telah diaktivasi akan berproyeksi ke pusat otak spesifik yang terlibat dalam sensasi nyeri akut mencakup emosi, kognitif, dan respon otonom. Respon umum perilaku nosiseptif adalah refleks menghindar, respon otonom, dan sensasi nyeri itu sendiri. Sedangkan nyeri inflamasi atau nyeri neuropatik biasanya ditandai respon nyeri spontan atau hipersensitivitas (alodinia dan hiperalgesia).⁴ Namun, secara umum respon nyeri yang berhubungan dengan fungsi peringatan dini di atas dikategorikan refleks menghindar.

Mekanisme refleks menghindar terhadap stimulus nyeri diintegrasikan pada tingkat supraspinal. Contoh refleks ini terjadi ketika menginjak paku payung atau duri, pasti tungkai sesegera mungkin akan dihindarkan dari stimulus nyeri

Tabel 2.1 Reseptor ionotropik dan kanal ion bergerbang ligan yang diekspresikan oleh neuron aferen primer nosiseptif

Reseptor/ Kanal Ion	Subtipe Utama	Ligan	Ekspresi (Ukuran Sel/Tipe)	Keterangan	Fungsi
Purin	P2X ₂ P2X ₃	ATP, ADP, adenosin	P2X ₃ sel positif IB4	P2X ₂ dimodulasi oleh proton, P2X ₃ diregulasi GDNF	IMR, SyMR, AR
Gerbang- proton sensitif- asam	DRASIC, ASIC (α , β)	Proton	DRASIC, kecil. ASICs α , kecil β , kecil/besar	Sensitif amilorida, mekanosensitivitas	ST, IMR, SyMR
Vaniloid	VR1	Panas, kapsaisin	Kecil	Desensitisasi oleh panas, bergerbang- proton, diregulasi- NGF	ST, IMR
Sodium TTXr	SNS/PN3 SNS2/ NaN	N/A	Kecil	Substrat PKA dan PKC, diregulasi NGF	EMC
Sodium TTXs	PN1, PN4, rB (I-III)	N/A	Semua sel	Diregulasi NGF	EMC
Kanal kalsium bergerbang- voltase	T- (ambang- rendah), L-, N- (ambang- tinggi)	N/A	T, kecil/medium L, N, umumnya kecil	Arus kalsium sekunder dimediasi oleh reseptor terikat-protein G (c/ bradikinin), Pembangkitan arus berambang tinggi melalui PKC	SyMC
Serotonin	5HT-3	Serotonin	Kecil		IMR, ST
NMDA	NR1 NRgbs	Glutamat/ aspartat	Kecil/besar	Mengontrol penglepasan SP	SyMR, AR
AMPA	iGluR1-3	Glutamat	R1, kecil R2-3, kecil/besar		SyMR, AR
Kainat	iGluR5	Glutamat	Kecil	Mengontrol penglepasan neurotransmitter	SyMR, AR

IMR, *inflammatory mediator receptor*; SyMR, *synaptic modulator receptor*; SyMC, *synaptic modulator channel*; ST, *signal transducer*; EMC, *excitatory modulator channel*; AR, *autoreceptor*; N/A, tidak daplikasikan

Sumber: Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 7725 "telah diolah kembali".

tersebut (Gambar 2.4).¹ Respon nosiseptif dikategorikan refleks fleksor yaitu refleks polisinaps khas sebagai jawaban terhadap stimulus nyeri pada kulit, jaringan subkutan atau otot. Respon yang timbul berupa kontraksi otot fleksor dan inhibisi otot ekstensor, sehingga bagian yang terkena nyeri akan mengalami fleksi dan tertarik/terhindar dari sumber nyeri.^{1,6}

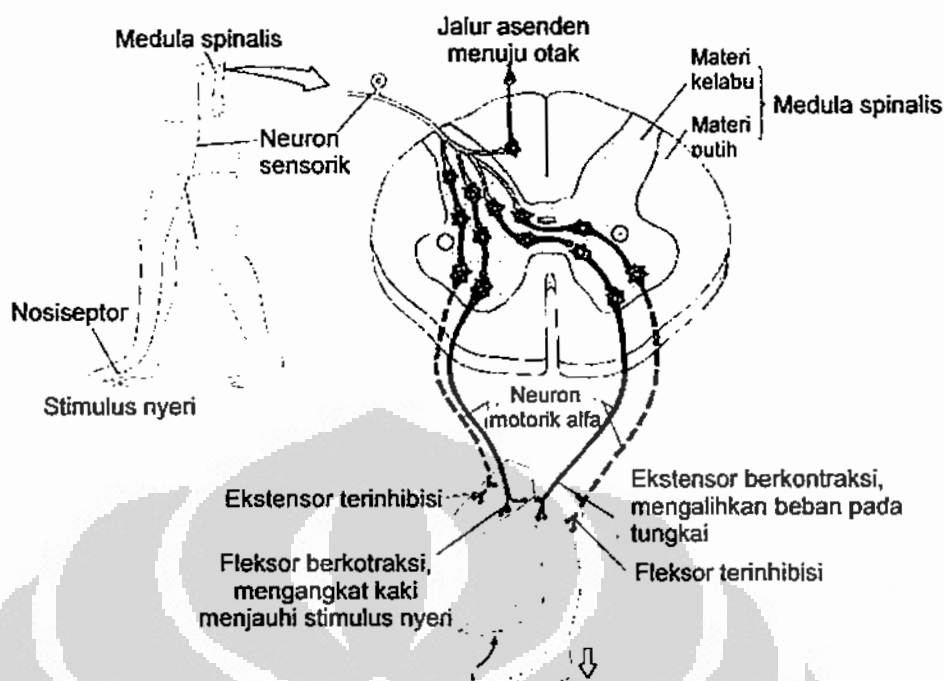
Tabel 2.2 Reseptor metabotropik pada neuron aferen primer nosiseptif

Reseptor terikat-protein G	Subtipe Utama	Ligan	Ekspresi (Ukuran Sel/Tipe)	Keterangan	Fungsi
Prostanoid PGE	EP1-4	PGE ₁₋₄	EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ tidak terspesifikasi, EP ₃ umumnya kecil	PGE ₂ mensensitisasi sel intermediet yang tidak merespon bradikinin, PGE ₂ -PKA/C memediasi modulasi TTXr, mensensitisasi stimulus panas	IMR, AR, SyMR?
IP	IP	PGI ₂	Umumnya kecil		
Histamin	H1	Histamin	Beberapa ada yang kecil	Mediator gatal	IMR
Serotonin	5HT-1A 5-HT4 5-HT2A	Serotonin	5-HT1A/5HT4 kecil,	5HT4 meningkatkan arus sel kecil TTXr melalui PKA/C	IMR
Bradikinin	B1 (terinduksi) B2	Bradikinin	B1, kecil/besar B2, besar	Mensensitisasi sel kecil terhadap panas melalui PKA Meningkatkan jumlah sel yang merespon kapsaisin dan proton	IMR
Kanabinoid	CB1-2	Anadamida	Tidak terspesifikasi	Inhibisi aktivasi perifer	IMR (in)
Takikinin	NK1	Sub P, NKA	Sel-sel kecil		SyMR, AR
Opioid	μ, δ, κ	Enkefalin Dinorfin β-Endorfin	Sel-sel kecil	Sel-sel inflamasi melepaskan opioid endogen. Menginhibisi aktivasi perifer	SyMR, IMR

Singkatan seperti Tabel 1, kecuali IMR (in) maksudnya *IMR-inhibitory*

Sumber: Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 7725 "telah diolah kembali".

Regulasi jalur desenden nyeri mampu mensupresi sensasi nyeri atau respon perilaku nyeri. Salah satu pusat regulasi ini diperankan oleh neuron-neuron di otak tengah yang dinamai periventrikuler dan *periaqueductal gray matter* (PAG). Stimulasi elektrik pada PAG akan menimbulkan analgesia yang berhubungan dengan status emosi. Aksonnya bermuara pada nukleus rafe di medula oblongata. Kemudian neuron tersebut akan berproyeksi ke DH medula spinalis dengan dimediasi serotonin untuk menekan aktivitas neuron nosiseptif.² Regulasi



Gambar 2.4 Refleks fleksor dan refleks ekstensor menyilang dalam mempertahankan keseimbangan. Refleks fleksor merupakan bentuk reaksi menghindar terhadap stimulus nyeri untuk meminimalisasi kerusakan jaringan.

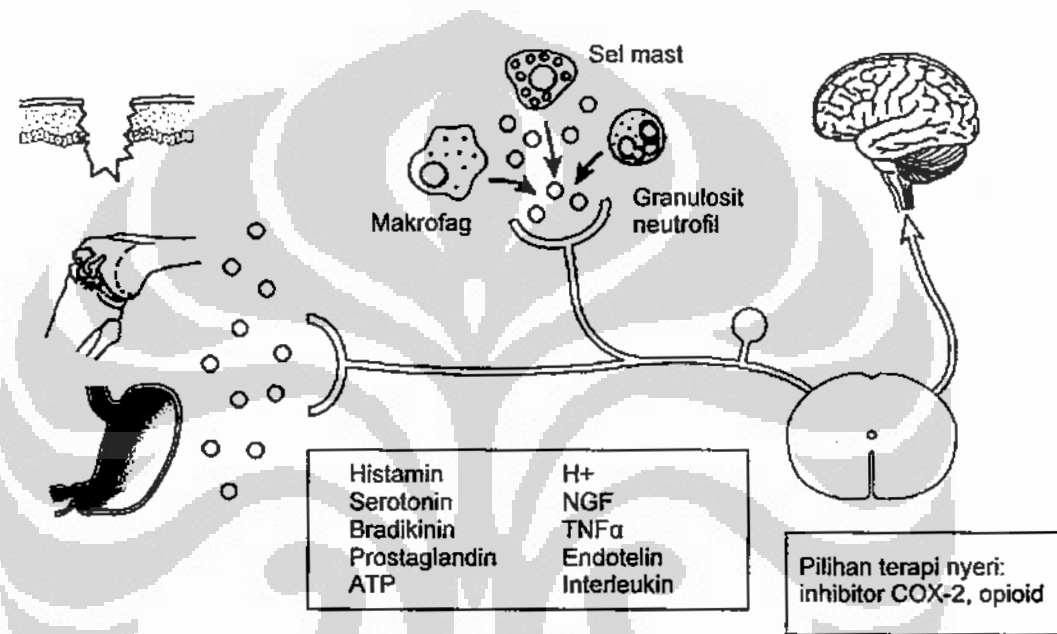
Sumber: Silverthorn DU. Human physiology: an integrative approach 3rd ed. Benjamin Cumming, 2004 "telah diolah kembali".

lain dapat dilakukan pada jalur ascenden dengan menstimulasi aktivitas serat A β yang memiliki ambang rendah (mekanoreseptor). Serat ini akan mengaktifasi neuron inhibisi di medula spinalis untuk memblokir transmisi nyeri atau inhibisi parsial jalur ascenden nyeri.^{1,2}

2.2 Mekanisme Hiperalgnesia

Seperti dijelaskan sebelumnya bahwa hiperalgnesia merupakan konsekuensi perubahan transmisi normal pada tingkat molekul efektor, serta merupakan manifestasi respon nyeri inflamasi atau nyeri neuropatik. Batasan nyeri inflamasi adalah hipersensitivitas yang menyertai proses inflamasi, dan nyeri itu sendiri merupakan salah satu tanda kardinal status inflamasi. Beragam reseptor, kanal ion dan transmitter terlibat dalam nyeri inflamasi (lihat Tabel 2.1 & Tabel 2.2); serta berkontribusi dalam peristiwa hipersensitivitas.⁸ Selain itu aneka mediator nyeri akan dilepaskan oleh sel inflamasi dan sel-sel yang rusak akibat pengaruh mekanik, infeksi, iskemia, pertumbuhan tumor, atau otoimun. Hasil akhirnya

adalah “sup inflamasi” yang kaya akan sitokin, faktor pertumbuhan, kinin, purin, amin, prostanoid, ion dan proton (Gambar 2.5). Sejumlah mediator langsung mengaktifasi nosiseptor, dan sebagian lagi terlibat dalam sensitisasi sistem saraf somatosensori sampai terjadi penyembuhan jaringan.³ Nyeri inflamasi umumnya bersifat adaptif; tetapi pada kasus trauma, pembedahan, dan penyakit inflamasi (seperti artritis reumotoid) diperlukan manajemen nyeri khusus untuk menormalkan potensi sensitivitas.⁴



Gambar 2.5 Proses nyeri inflamasi. Jaringan yang rusak, sel inflamasi atau sel tumor melepaskan mediator kimiawi (kotak besar) atau sup inflamasi yang akan memodulasi dan mengaktifasi (reseptor) di terminal nosiseptor. Salah satu pilihan manajemen nyeri inflamasi adalah obat inhibitor COX-2 selektif.

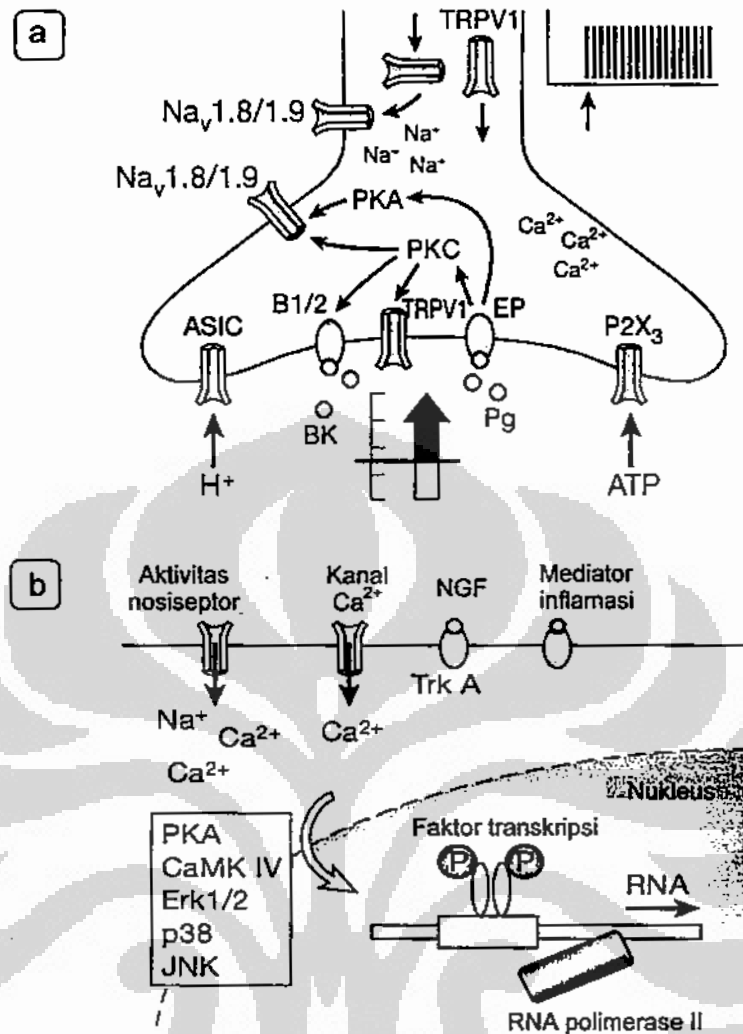
Sumber: Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1063 “telah diolah kembali”.

Lain halnya nyeri neuropatik yang umumnya bersifat maladaptif, ekspresi elemen sensoriknya abnormal persisten, atau diibaratkan sistem peringatan dininya nyaris “on terus”. Nyeri ini dapat terjadi akibat lesi pada sistem saraf seperti pada kasus diabetes polineuropati, neuralgia, lumbar radikulopati, injuri medula spinalis, multipel sklerosis, dan stroke.⁴ Plastisitas maladaptif yang mungkin terjadi merepresentasikan terjadinya nyeri spontan, semakin berat, tanpa regulasi yang adekuat. Nyeri ini dikategorikan patologi karena terjadi disfungsi

atau kerusakan sistem saraf.³ Baik mekanisme nyeri inflamasi maupun nyeri neuropatik, sama-sama ditandai oleh hipersensitivitas atau lebih tepatnya respon hiperalgesia. Namun, tinjauan penelitian ini akan difokuskan pada hiperalgesia yang menyertai nyeri inflamasi.

Tinjauan pertama untuk menjelaskan respon hiperalgesia adalah mekanisme sensitisasi perifer. Sewaktu inflamasi praktis akan terbentuk “sup inflamasi”, diantaranya bradikinin dan prostaglandin yang bekerja pada reseptor terikat-protein G lalu mengaktivasi PKA atau PKC di dalam terminal nosiseptor. Protein kinase tersebut akan memfosforilasi kanal ion dan reseptor sehingga terjadi penurunan ambang untuk mengaktivasi reseptor transduser seperti *transient receptor potencial vaniloid 1* (TRPV1) atau di atas disebut VR1. Sedangkan eksitabilitas membran terminal perifer meningkat sebagai penanda status sensitivitas tinggi atau dinamai sensitisasi perifer (Gambar 2.6a).³ Hal ini berhubungan dengan peningkatan arus sodium di terminal perifer akibat fosforilasi kanal sodium TTXr, terutama kanal sodium Na_v1,8 dan Na_v1,9. Fosforilasi merupakan mekanisme perubahan pascatranslasi terhadap asam amino serin dan treonin, terutama aneka protein kanal ion atau reseptor yang terlibat dalam transduksi dan konduksi.^{4,28} Jadi, modifikasi pascatranslasi adalah penentu hipersensitivitas nosiseptor terhadap stimulus nyeri dalam waktu yang singkat pada kasus-kasus inflamasi.

Fenomena sensitisasi perifer ternyata juga teramplifikasi oleh perubahan transkripsi di neuron DRG dan DH medula spinalis. Mekanisme ini dipicu oleh kaskade transduksi sinyal dan sinyal hilir akibat pengikatan reseptor oleh mediator, faktor pertumbuhan, dan efek domino peningkatan eksitabilitas neuron. Konsekuensinya adalah perubahan produksi aneka protein dan fenotip neuron dalam konteks transduksi, konduksi dan translasi (Gambar 2.6b).³ Modifikasi transkripsi memang tidak terlalu berperan dalam sensitisasi perifer karena mekanisme ini berlangsung beberapa jam setelah terjadi inflamasi. Akan tetapi, peningkatan ekspresi dan transpor molekul efektor dari badan sel di DRG jelas akan mempengaruhi sensitivitas basal nosiseptor. Ada dua cara perubahan transkripsi tersebut, yaitu: (1) mengaktivasi faktor transkripsi *cAMP responsive element-binding protein* (CREB) sehingga terjadi peningkatan ekspresi neuromodulator



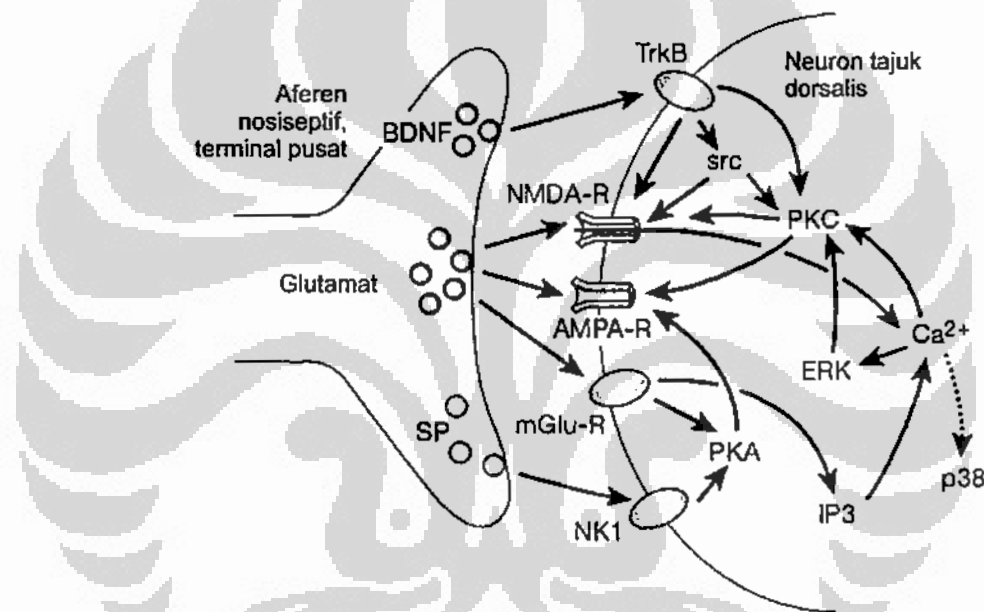
Gambar 2.6 Mekanisme sensitisasi perifer. (a) Modifikasi pascatranslasi memicu sensitisasi perifer hasil fosforilasi aneka kanal ion dan reseptor (terutama diinduksi prostanoid) di nosiseptor terminal perifer melalui jalur cAMP-PKA/PKC; (b) Perubahan transkripsi di neuron DRG medula spinalis dengan mengaktifkan faktor transkripsi untuk memproduksi beragam molekul efektor.

Sumber: Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement*, 2002; 5: 1064 "telah diolah kembali".

serta reseptornya ataupun molekul efektor lainnya, dan (2) meningkatkan produksi sinyal spesifik di jaringan inflamasi sehingga terjadi peningkatan kompleks ligan-reseptor untuk mengaktifkan kaskade transduksi sinyal.²⁹

Tinjau kedua yang berkontribusi terhadap respon hiperalgesia adalah sensitisasi sentral. Aktivasi serat aferen primer oleh stimulus nyeri inflamasi juga akan memicu perubahan mendasar dalam hal fungsi dan aktivitas jalur neurogenik pusat. Indikator utamanya adalah peningkatan pelepasan transmittor glutamat,

neuropeptida substansi P, dan *brain-driven neurotrophic factor* (BDNF) dari terminal pusat ke neuron ordo kedua di DH. Sel-sel tersebut menjadi sangat responsif terhadap stimulus normal, area reseptifnya meningkat, dan mengalami penurunan ambang aktivasi.⁸ Peningkatan eksitabilitas dan responsivitas neuron DH merupakan manifestasi sensitisasi sentral yang ternyata sama-sama diinduksi oleh modifikasi pascatranslasi (Gambar 2.7), serta perubahan transkripsi molekul yang terlibat transmisi sinaptik. Ekspresi molekul efektor meningkat karena faktor transkripsi seperti CREB meningkat, sedangkan represor seperti DREAM akan direduksi sehingga terjadi perubahan jangka panjang pada neuron DH.³

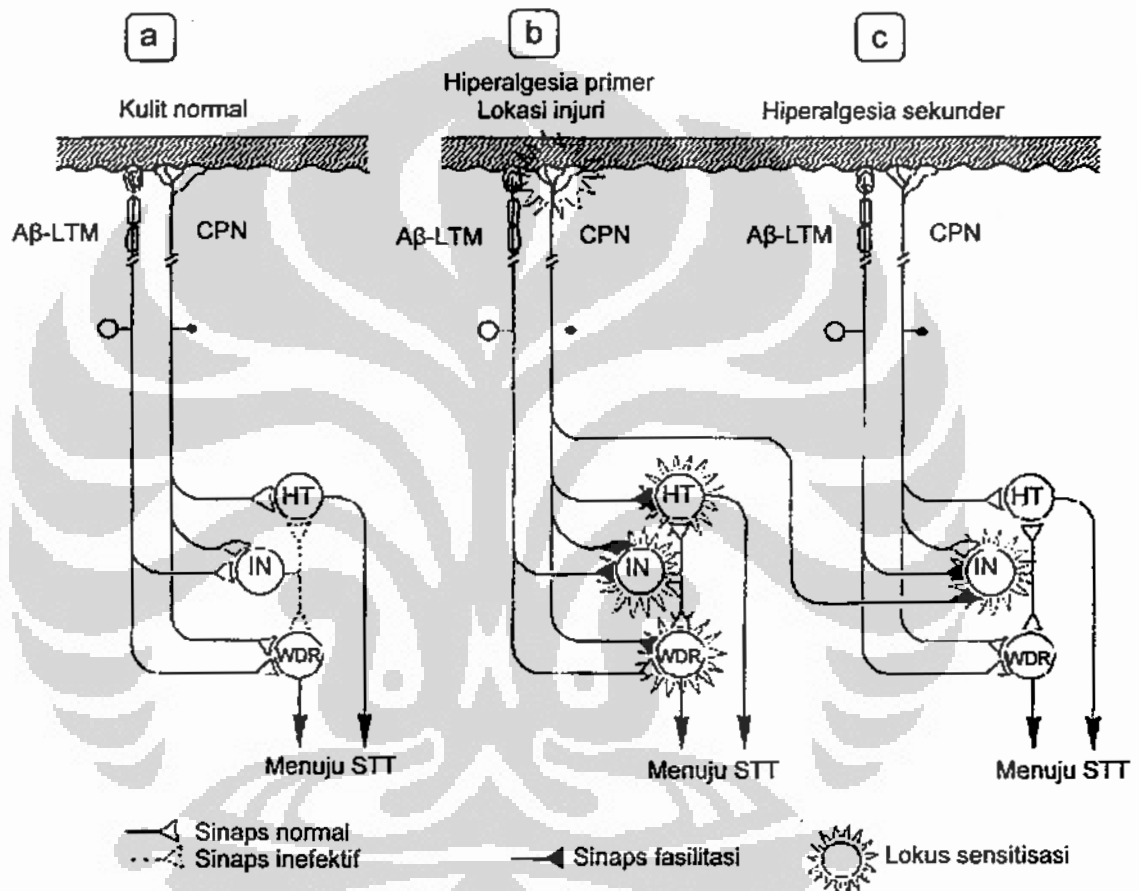


Gambar 2.7 Mekanisme sensitisasi sentral di neuron DH medula spinalis. Pelepasan transmitter (glutamat), neuropeptida (substansi P), dan faktor neurotropik (BDNF) akan menginduksi modifikasi pascatranslasi terhadap aneka kanal ion dan reseptor melalui jalur cAMP PKA/PKC-dependen, sehingga terjadi peningkatan eksitabilitas neuron DH.

Sumber: Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1065 "telah diolah kembali".

Peningkatan eksitabilitas neuron artinya sel tersebut dapat diaktivasi oleh input yang dalam keadaan normal dikategorikan subambang serta mengalami peningkatan respon terhadap supraambang. Rekrutmen input subambang ini dimanifestasikan oleh penurunan ambang untuk memicu sensasi nyeri (alodinia), amplifikasi respon terhadap stimulus berbahaya (hiperalgesia), dan penyebaran

sensitivitas terhadap area noninflamasi (hiperalgesia sekunder) (Gambar 2.8).⁴ Konsep ini dikenal dengan istilah sensitisasi atau hipersensitivitas yang ditandai enam perubahan mendasar, yaitu: penurunan muatan ambang nosiseptor, terjadi muatan spontan pada nosiseptor, peningkatan frekuensi muatan nosiseptor, perluasan area reseptif nosiseptor, terjadi *posthumous* di nosiseptor, dan tereduksinya efek mekanisme inhibisi sentral.²⁶



Gambar 2.8 Model mekanisme transmisi nyeri normal dan hiperalgnesia di taju dorsalis. (a) Kelompok neuron DH medula spinalis: neuron berambang tinggi (HT) menerima input hanya dari aferen nosiseptif seperti nosiseptor plimodal serat C (CPN), neuron jangkauan luas (WDR) menerima *input* konvergen dari mekanoreseptor berambang rendah serat Aβ (Aβ-LTM); (b) Bila terjadi injuri, terminal CPN perifer menginervasi zona hiperalgnesia sensitif panas, peningkatan input dari CPN akan meningkatkan *output* dari neuron HT dan WDR serta akan terjadi fasilitasi sinaptik sebagai konsekuensi sensitisasi sentral; (c) Sementara itu di zona hiperalgnesia sekunder terjadi penyebaran sensitisasi sentral melalui percabangan terminal CPN.

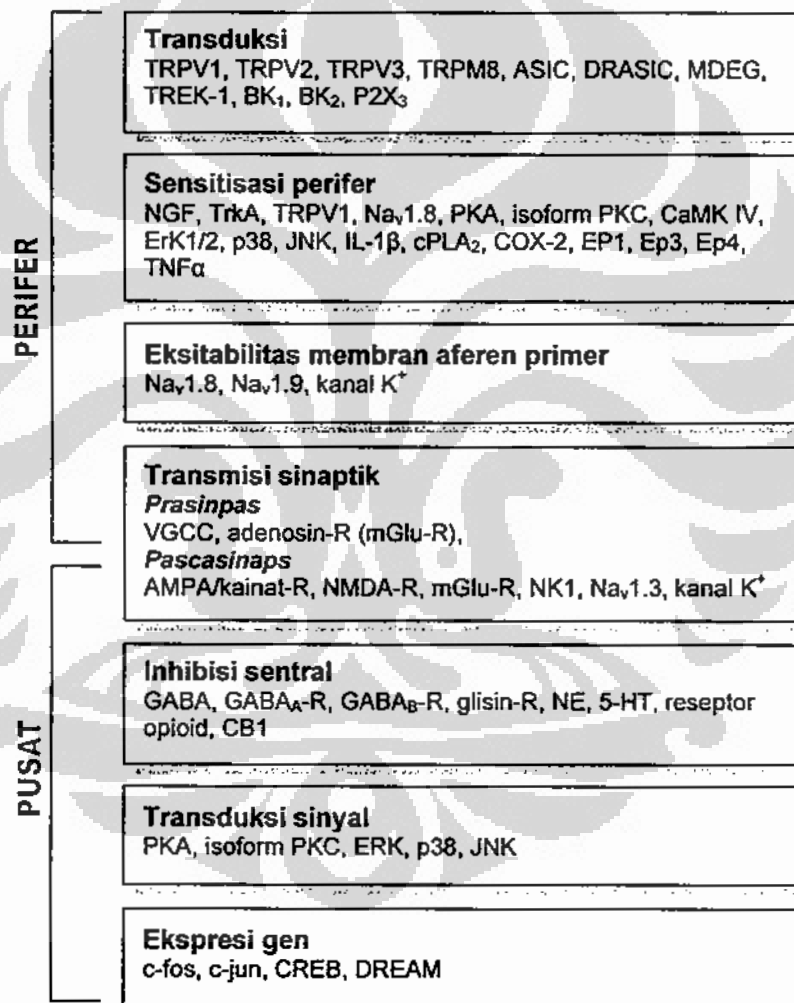
Sumber: Treede RD, Magerl W. Modern concepts of pain and hyperalgesia: beyond the polymodal the C nociceptor. *A Physiol Soc* 1993; 10: 219 "telah diolah kembali".

Istilah sensitisasi termasuk salah satu mekanisme plastisitas sinaps yang merupakan perubahan jangka panjang pada fungsi sinaps untuk memperkuat hantaran sinaptik sesuai pengalaman masa lalu. Sensitisasi ialah respon pascasinaps yang kuat dan berlangsung lama sebagai jawaban terhadap stimulus yang telah terhabituisasi. Sedangkan potensiasi jangka panjang (*long-term potentiation*, LTP) adalah peningkatan respon potensial pascasinaps yang bersifat menetap dan terbentuk cepat akibat stimulus prasinaps yang cepat, berulang, dan singkat.⁶ Dalam konteks hiperalgesia, LTP di sinaps serat nosiseptif dianggap turut berkontribusi terhadap respon hiperalgesia pada kasus inflamasi, trauma, atau neuropati. LTP terbentuk minimal sesudah tiga jam sintesis protein – perubahan pasca translasi dan transkripsi kanal ion atau reseptor nyeri– sehingga terjadi perubahan struktur sinaps dengan atau tanpa penguatan sinaptik.

LTP pada sinaps antara serat C aferen primer dan kelompok neuron nosiseptif di lamina I medula spinalis pada awalnya dimediasi oleh peningkatan ekspresi reseptor NK1 untuk substansi P sehingga terjadi proses amplifikasi nyeri. Sementara itu peningkatan penglepasan substansi P dari neuron prasinaps akan mengaktifasi reseptor NK1 dan kanal kalsium bergerbang –voltase secara sinergis untuk memfasilitasi LTP. Mekanisme molekuler di neuron lamina I tersebut diyakini dapat memediasi hiperalgesia dan sensitisasi sentral secara umum. Dalam hal ini, baik LTP maupun sensitisasi sama-sama berawal dari perubahan ekspresi molekul efektor. Mekanisme keduanya serupa sehingga istilah ini juga sama-sama mewakili plastisitas saraf pada kasus hipersensitivitas nyeri yang ditandai oleh peristiwa aktivasi, modulasi, atau modifikasi molekuler nyeri.^{9,31,32} Namun, secara umum tinjauan plastisitas sinaps juga sering dihubungkan dengan model kerja glutamat pada reseptor AMPA dan NMDA.

Kembali lagi pada masalah nyeri inflamasi, plastisitas sinaps yang terjadi di neuron DH juga berhubungan dengan peranan *calsitonin gen-related peptida* (CGRP). Molekul ini diidentifikasi penting untuk proses nosiseptif, respon perilaku nyeri, dan tentunya berkontribusi dalam plastisitas sinaps. Mekanisme plastisitas sinaps dalam kasus nyeri artritis ternyata melibatkan aktivasi reseptor CGRP1 untuk meningkatkan fungsi input dan output neuron DH medula spinalis.³³ Jika diselidiki lebih lanjut, peningkatan ekspresi CGRP dan berbagai

gen molekul efektor disebabkan oleh ekspresi *immediate early gene* (IEG) *c-fos* yang dipicu stimulus nyeri di medula spinalis. Protein Fos itu sendiri merupakan bagian penting dari faktor transkripsi pengaktivasi protein (*activated protein 1, API*).^{33,34} Muara analisis ini adalah stimulus nyeri inflamasi akan meningkatkan ekspresi gen *c-fos* di neuron pascasinaps DH medula spinalis, lalu membuka pintu plastisitas dengan meningkatkan ekspresi gen molekul efektor nyeri. Dengan demikian, kasus hiperalgesia melibatkan ekspresi aneka molekul efektor sampai pada tingkat faktor transkripsinya (Gambar 2.9).



Gambar 2.9 Kunci elemen molekuler pada proses transduksi, transmisi, dan pemrosesan sinyal dari input nosiseptif di sistem saraf perifer dan pusat.

Sumber: Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1066 "telah diolah kembali".

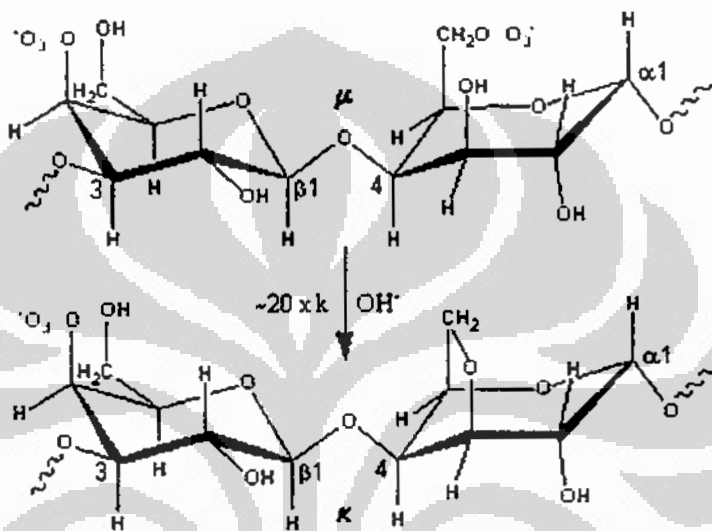
2.3 Algogenik Carrageenan

Istilah algogenik sama artinya dengan flogogen,²³ iritan,³⁵ substansi aktif,² yaitu stimulus kimia pemicu nyeri.²⁷ Agen algogenik bekerja lambat atau sangat lambat, progresif, durasinya lama, dan efeknya tidak dapat dihindari bila sudah diaplikasikan. Respon perilaku akibat injeksi algogenik pada hewan coba sangat beragam, tetapi relatif seragam pada rodensia. Algogenik sering dipakai dalam uji nyeri viseral, atau untuk model uji perilaku nyeri melalui injeksi intradermal dan intraperitoneal. Nyeri yang dipicu oleh algogenik dikategorikan model nyeri tonik ditandai oleh kerja stimulus berdurasi panjang. Secara umum mekanisme kerja stimulus nosiseptif kimiawi berbeda dengan stimulus nosiseptif listrik, suhu, dan mekanik. Perbedaan itu tampak dari bentuk fisik dan durasinya, pengukuran ambangnya, serta skor perilaku (dalam satuan waktu) terhadap supraambang.²⁷

Ada bermacam-macam agen algogenik atau iritan yang sering dipakai dalam uji perilaku nyeri, diantaranya: kapsaisin, formalin, histamin, bradikinin, carrageenan, prostaglandin, *Freud's adjuvat*, kristal urat, asam asetat, dll.^{23,27,35-39} Salah satu jenis algogenik yang umum dipakai untuk model nyeri inflamasi adalah carrageenan.²⁷ Algogenik ini mampu menginduksi edema inflamasi dan menyebabkan hiperalgesia, sehingga sering dipakai untuk menguji efek antiinflamasi NSAIDs dan inhibitor COX-2 selektif.³⁶ Carrageenan merupakan polisakarida sulfat yang dapat memicu inflamasi dengan cara mengaktivasi sel-sel inflamasi. Mekanisme hiperalgesia oleh carrageenan terjadi melalui aktivasi IEG seperti gen *c-fos* yang dapat menginduksi transkripsi aneka gen neuropeptida di neuron DH medula spinalis. Oleh karena itu, injeksi carrageenan pada tungkai hewan coba akan menginduksi peningkatan mRNA COX-2 di lumbar medula spinalis serta pelepasan glutamat, aspartat, substansi P, nitrit oksida, prostaglandin E₂ (PGE₂) di neuron tersebut. Selain itu, carrageenan juga dapat meningkatkan imunreaktif CGRP dan substansi P di medula spinalis selama sepekan pasca diinjeksikan.³⁵

Sumber carrageenan diperoleh melalui ekstraksi alkalin dari ganggang merah bergenus *Chondrus*, *Euchema*, *Gigartina*, dan *Iridaea*. Struktur molekulnya tersusun dari polimer sekitar 25.000 derivat polisakarida dengan regulasi struktur sesuai kondisi ekstraksinya. Struktur ideal diperlihatkan oleh κ -carrageenan dengan dimer kecil yang proporsional, dan memiliki rumus molekul

$[-(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galaktopiranos-4-sulfat-(1 \rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-anhidro-}\alpha\text{-D-galatopiranos-4-sulfat-(1 \rightarrow 3)}]$ (Gambar 2.10). Tipe ini diperoleh melalui eliminasi alkalin $\mu\text{-carrageenan}$ dari ganggang *Euchema cottonii*.³⁸ Manfaat produk olahan *carrageenan* tertentu dalam industri makanan dipakai untuk campuran susu, gel, pasta gigi, pengolahan daging, dll. Namun, *carrageenan* juga diduga dapat memicu proliferasi tumor, pendarahan dan ulkus gastrointestinal.³⁹

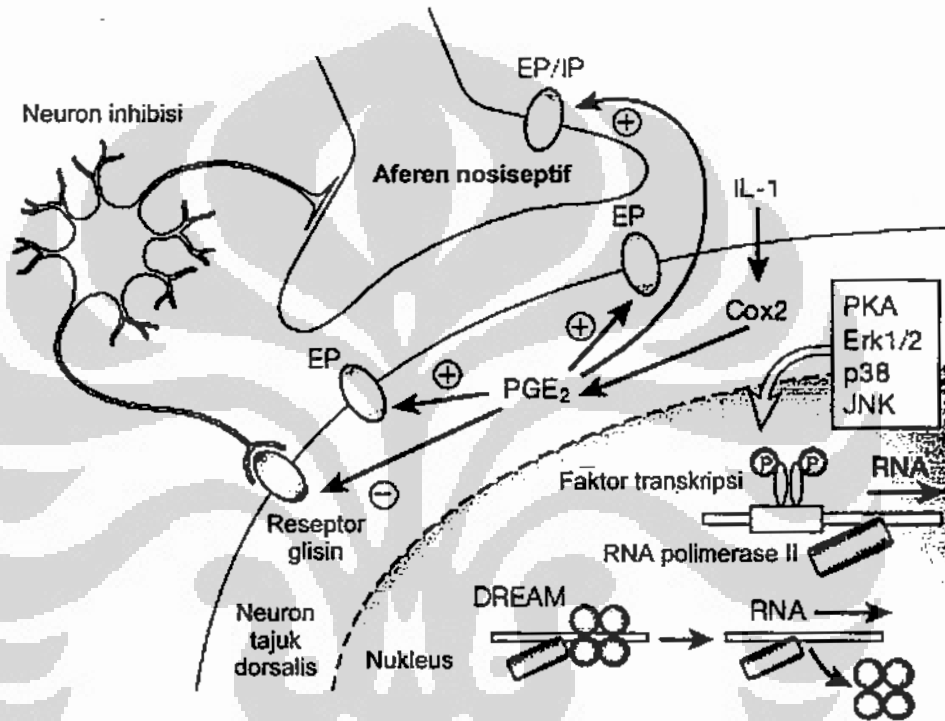


Gambar 2.10 Struktur molekul $\kappa\text{-carrageenan}$ $[-(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galaktopiranos-4-sulfat-(1 \rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-anhidro-}\alpha\text{-D-galatopiranos-4-sulfat-(1 \rightarrow 3)}]$ terdiri dari polimer derivat polisakarida.

Sumber: Chaplin M. Carrageenan. [cited 1 July 2008]. Available at: [http://www. Isbu.ac.uk/water/hycar.html](http://www.Isbu.ac.uk/water/hycar.html).

Seperti telah dinyatakan di atas bahwa *carrageenan* dapat menyebabkan nyeri inflamasi atau lebih spesifik lagi menginduksi hiperalgesia. Mekanisme tersebut berhubungan dengan sensitisasi melalui aktivitas enzimatik COX-2 yang menjadi regulasi hulu produksi prostanoid. Injeksi *carrageenan* pada telapak tungkai hewan coba terbukti dapat meningkatkan sintesis prostanoid di jaringan inflamasi perifer dan di sistem saraf pusat. Peningkatan ekspresi COX-2 dan enzim *microsomal prostaglandin synthase* (mPGES) pada fase awal inflamasi yang diinduksi *carrageenan* sama-sama menjadi regulator hulu peningkatan sintesis PGD₂, 6-keto-PGF_{1 α} , tromboksan B₂ (TXB₂), dan terutama PGE₂.³⁶ Prostanoid itu sendiri merupakan mediator inflamasi yang dapat memicu

fosforilasi aneka kanal ion atau reseptor melalui jalur c-AMP PKA/PKC dependen. Secara umum, peningkatan ekspresi COX-2 dan produksi prostanoid dapat memfasilitasi transmisi eksitasi pra/pascasinaps, serta mereduksi transmisi inhibisi (Gambar 2.11).³ Dengan demikian, model uji respon hiperalgesia pada hewan coba yang diinduksi *carrageenan* akan berhubungan dengan ekspresi COX-2 dan produksi prostanoid terminal.

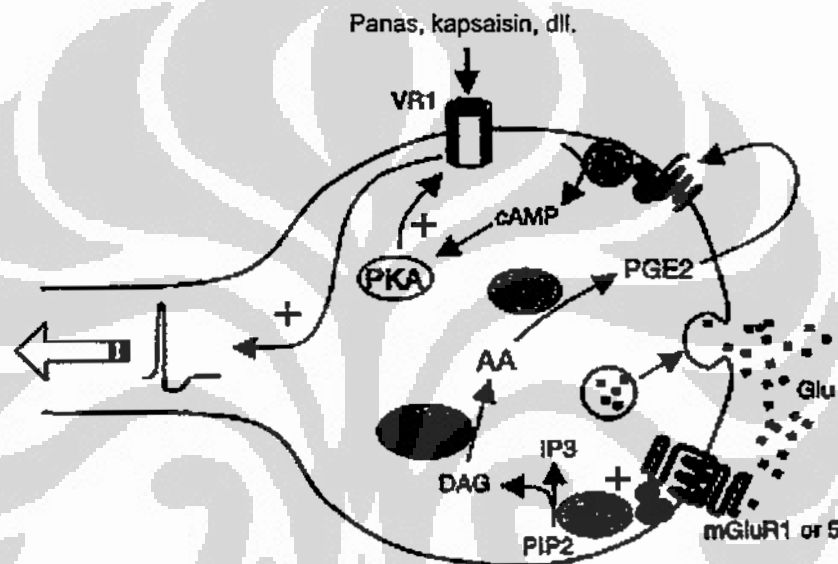


Gambar 2.11 Penundaan sensitisasi sentral. Stimulus nyeri (misalnya kimiawi) dan sitokin proinflamasi ($IL-1\beta$) dapat menginduksi ekspresi COX-2 yang bertanggungjawab dalam peningkatan produksi prostanoid. PGE_2 dapat memodulasi kanal ion atau reseptor untuk meningkatkan transmisi sinaptik dan menurunkan transmisi inhibisi.

Sumber: Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1065 "telah diolah kembali".

Prostaglandin sebagai prostanoid terminal terlibat dalam mekanisme modifikasi pascatranslasi di terminal nosiseptor perifer dan neuron pascasinaps di DH medula spinalis. Beberapa penelitian melaporkan bahwa PGE_2 dan PGI masing-masing bekerja pada reseptor EP_1 dan IP untuk memicu sensitisasi terhadap reseptor TRPV1 melalui jalur PKA atau PKC-dependen. Mekanisme ini semakin menguatkan peranan prostaglandin sebagai penyebab langsung nyeri

inflamasi dan hiperalgesia pada model induksi *carrageenan*.³⁷ Kemungkinan lain yang dilakukan oleh prostaglandin adalah memodulasi reseptor VR1 atau TRPV1 melalui jalur cAMP-PKA dependen akibat efek hilir aktivasi reseptor mGluRs kelompok I dan II (Gambar 2.12).^{41,42} Ketika terjadi inflamasi, glutamat dilepaskan oleh terminal nosiseptor perifer atau sentral serta oleh sel mast, sehingga mungkin terjadi peristiwa sensitisasi di perifer maupun di pusat. Konsekuensi sensitisasi yang diinduksi oleh PGE₂ adalah terjadinya hiperalgesia termal, baik perifer maupun sentral.



Gambar 2.12 Model transduksi sinyal untuk memodulasi reseptor VR1 yang dipicu oleh aktivasi reseptor mGluR di terminal neuron aferen primer. Glutamat (Glu) mungkin dilepaskan dari neuron tersebut atau dari sel mast, selanjutnya menginisiasi kaskade asam arakidonat yang dikatalisasi oleh COX. Prostaglandin (PGE₂) yang dihasilkan dari jalur ini atau dari eksternal neuron tersebut akan mengaktifkan adenilat siklase untuk menginduksi fosforilasi VR1 melalui cAMP PKA-dependen.

Sumber: Hu H-J, Bhawe G, Gereau IV RW. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potensial mechanism for thermal hiperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22: 7449 "telah diolah kembali".

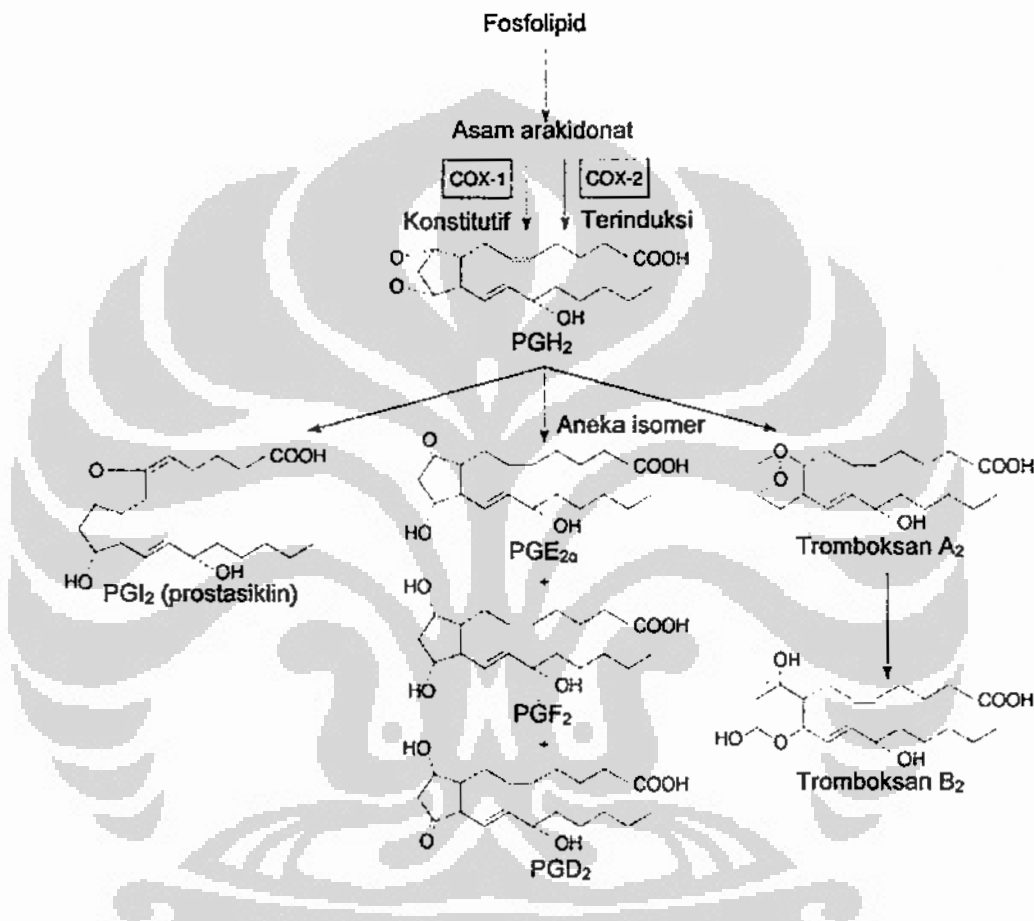
Sekarang perlu dianalisis, bagaimana *carrageenan* menginduksi peningkatan ekspresi COX-2 sehingga dapat disimpulkan menjadi jalur hulu penyebab hiperalgesia? Pada kasus nyeri inflamasi, peningkatan ekspresi enzim COX-2 dan mPGES-1 diinduksi oleh IL-1 β .³⁵ Sedangkan IL-1 β itu sendiri telah dijadikan

salah satu target molekul penyembuhan nyeri inflamasi atau nyeri kronis, mencakup hiperalgesia primer dan sekunder.⁴³ Disamping itu indikator efikasi obat inhibitor COX-2 selektif adalah terjadinya penekanan ekspresi IL-1 β serta faktor transkripsi NF κ B.⁴⁴ Sitokin proinflamasi meningkat di dalam “sup inflamasi” karena diinduksi oleh faktor transkripsi seperti NF κ B atau AP1.⁴⁵ Dalam konteks nyeri kronis, sitokin proinflamasi memicu peningkatan frekuensi serta amplitudo transmisi sinaptik eksitasi ketika terjadi sensitisasi sentral.^{3,8,46} Lebih tepatnya lagi sitokin proinflamasi menginduksi arus AMPA atau NMDA, mensupresi arus GABA dan glisin, dan akhirnya meningkatkan fosforilasi CREB di neuron DH medula spinalis sampai terjadi hiperalgesia termal.⁴⁶ Jadi, besar kemungkinan *carrageenan* juga menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi dengan terlebih dulu mengaktivasi faktor transkripsinya.

Tinjauan akhir bagian ini adalah mengungkap peningkatan kaskade asam arakidonat yang dikatalisasi oleh aktivitas enzimatis COX-2 sampai dihasilkan prostanooid terminal. Prekursor asam arakidonat adalah asam lemak esensial yang memiliki 20 karbon dengan beberapa ikatan ganda (terutama asam lemak esensial (5,8,11,14-asam eikosatetraenoat), dihasilkan dari degradasi gliserofosfolipid membran sel oleh fosfolipase C atau fosfolipase A₂. Stimulus nyeri kimiawi dapat meningkatkan pelepasan asam arakidonat atau esterifikasi domain sn-2 membran fosfolipid oleh fosfolipase A₂.^{6,7} Dalam hal ini, *carrageenan* terbukti mampu meningkatkan ekspresi COX-2 dan mPGES-1 pada jaringan inflamasi. Sel-sel yang mengalami trauma atau jaringan inflamasi akan mengalami peningkatan metabolisme asam arakidonat akibat aktivitas enzimatis COX-2. Hasilnya ialah terbentuk PGH₂ yang akan dikatalisis lebih lanjut oleh mPGES-1 menjadi prostanooid terminal seperti PGE₂, PGI, dan TBX₂ (Gambar 2.13).^{6,7} Kaskade ini dapat dicegah dengan cara menghambat ekspresi COX-2 sebagai katalisator hulu biosintesis asam arakidonat sehingga tidak terjadi sensitisasi.

Dalam konteks uji respon hiperalgesia termal, maka pengaruh induksi *carrageenan* adalah sebagai stimulus primer nyeri inflamasi yang akan meningkatkan ekspresi COX-2 (pintu awal sensitisasi). Hewan coba yang diinduksi *carrageenan* dipastikan akan mengalami hipersensitisasi nyeri, dan untuk menguji respon hiperlagesianya perlu diberikan stimulus sekunder baik

termal maupun mekanik. Model uji respon hiperalgesia ini lalu dikombinasikan dengan uji nyeri *hot-plate test* untuk mengukur perilaku nyeri hewan coba dalam satuan waktu tertentu setelah diinjeksi *carrageenan*. Panas *hot-plate* diasumsikan sebagai stimulus sekunder untuk memperlihatkan respon hiperalgesia yang terjadi pada hewan coba.



Gambar 2.13 Biosintesis asam arakidonat menghasilkan prostanooid terminal yang dikatalisasi oleh aktivitas enzimatis siklooksigenase. Ketika terjadi inflamasi, COX-2 diekspresikan secara terinduksi sehingga terjadi peningkatan produksi prostanooid.

Sumber: Ganong WF. Review of medical physiology 21st ed. McGraw-Hill Companies, 2003 "telah diolah kembali".

2.4 Uji Nosiseptif *Hot Plate*

Teknik dasar uji nosiseptif *hot plate* adalah memperkenalkan tikus atau mencit pada ruangan silinder terbuka dengan alas terbuat dari lempeng metalik yang dialiri kalor melalui termode atau medium air panas. Lempengan dipanaskan

hingga mencapai suhu uji yang konstan dan diperkirakan mampu memicu respon perilaku nyeri pada hewan coba. Suhu uji standar lempeng pemanas sekitar 50°C atau suhu dinaikan secara progresif linear dari 43°C hingga 53°C dengan ketentuan 2,5°C/menit.²⁷ Penentuan suhu uji dapat disesuaikan dengan pedoman uji nosiseptif *hot plate* masing-masing alat, mengingat metodenya beragam dan terus berkembang. Sejauh ini, metode terbaru yang mudah untuk direproduksi adalah MHP dengan standar suhu uji 51°C.²³ Suhu tersebut setara dengan protokol umum metode suhu uji *hot plate*, yakni sekitar 52°C.⁴⁷ Produk komersil *hot plate* umumnya memiliki termostat dalam rentang suhu 45 – 62°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) seperti produk Panlab (Gambar 2.14a).⁴⁸ *Hot plate* lain memiliki protokol standar suhu uji 55°C seperti produk dari Columbus Instrumen,⁴⁹ dan ada juga *hot plate* yang dikombinasikan dengan *cold plate* sehingga suhu ujinya dapat diatur dalam rentang 2–66°C seperti produk dari UgoBasile (Gambar 2.14b).⁵⁰



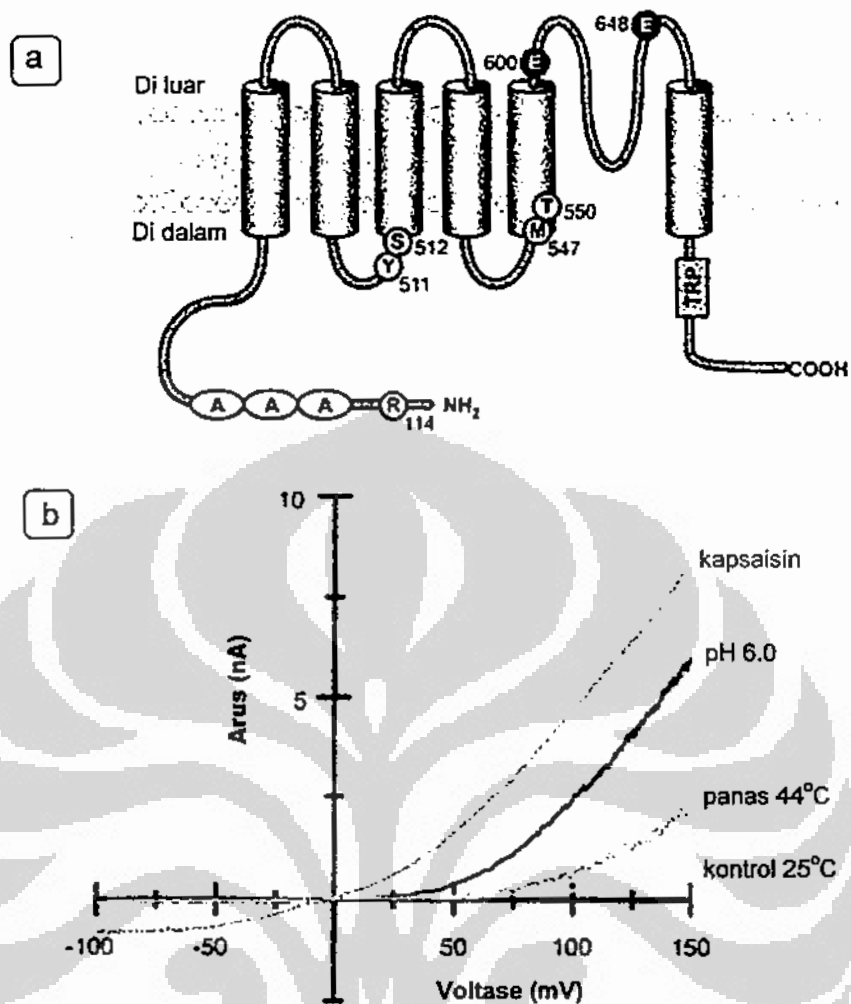
Gambar 2.14 Model produk *hot plate* untuk menguji efikasi analgesik narkotik pada hewan tikus atau mencit sesuai metode dari N.B. Eddy dan D. Leinbah. (1) *Hot plate* produk Panlab khusus untuk uji nosiseptif terhadap stimulus panas; (2) *Hot/Cold plate* memiliki fungsi ganda untuk menguji respon sensorik terhadap suhu panas dan dingin.

Sumber: UgoBasile. Catalogue 2006. *Biological Research Apparatus* 2006 “telah diolah kembali”.

Suhu uji *hot plate* sekitar 51°C relevan dengan teori molekuler nyeri inflamasi dan hiperalgesia. Stimulus panas dari lempeng pemanas akan mengenai kulit hewan coba terutama keempat tungkai dan ekornya, sehingga nosiseptor serat C dan A δ di area tersebut teraktivasi.²⁷ Berdasarkan pengamatan kultur sel, sekitar 45% neuron dari DRG yang berdiameter kecil hingga menengah (serat C dan serat A δ tipe II) memperlihatkan arus yang dapat dibangkitkan oleh panas dengan ambang sedang, yakni sekitar 45°C. Sekitar 10% neuron lainnya (A δ tipe I) hanya merespon suhu dengan ambang tinggi sekitar 52°C serta tidak sensitif terhadap kapsaisin. Respon terhadap panas ambang sedang dimediasi oleh transduser reseptor VRI atau TRPV1, sedangkan respon terhadap panas ambang tinggi dimediasi oleh VRL-1 atau TRPV2.²⁵ Penelitian lain melaporkan bahwa PGE₂ dapat menurunkan ambang aktivasi TRPV1 yang diekspresikan oleh sel HEK293 sampai suhu di bawah 35°C, sehingga suhu sekitar suhu tubuh sudah dapat mengaktivasi reseptor tersebut.⁴³

Dengan kata lain, suhu uji *hot plate* di atas sesuai dengan mekanisme konduksi pada reseptor vaniloid serat aferen primer ketika terjadi hiperalgesia. TRPV1 merupakan kanal kation nonselektif yang berupa tetramer dengan subunit masing-masing memiliki 6 domain transmembran, dengan *loop* hidrofobik pada domain 5 dan 6. Reseptor ini diekspresikan oleh nosiseptor dan keratinosit, bersifat polimodal, khusus untuk stimulus panas akan teraktivasi pada suhu di atas 43°C (Gambar 2.15). Reseptor ini akan tersensitisasi bila terjadi modifikasi pascatranslasi dan translokasi hasil perubahan transkripsi gen.⁵¹ Jadi, bila diasumsikan stimulus primer *carrageenan* telah berhasil menginduksi nyeri inflamasi (sensitisasi pada reseptor/kanal ion) di jaringan tungkai hewan coba, maka stimulus sekunder panas *hot plate* berkisar 51°C (ambang normal) dipastikan akan memicu respon hiperalgesia. Suhu ini sangat mungkin dikonduksikan pada lapisan kulit telapak tungkai hewan coba, dan bila mengalami hiperalgesia akan memperlihatkan waktu reaksi menghindar yang lebih cepat dibandingkan kontrol.

Ada dua respon perilaku nyeri utama yang dapat diukur waktu reaksinya, yaitu menjilati tungkai (*paw licking*) dan meloncat (*jumping*). Kedua respon tersebut diintegrasikan pada tingkat supraspinal. Perilaku menjilati tungkai biasanya hanya sensitif dalam pengujian antinosisseptif seperti opioid, sedangkan

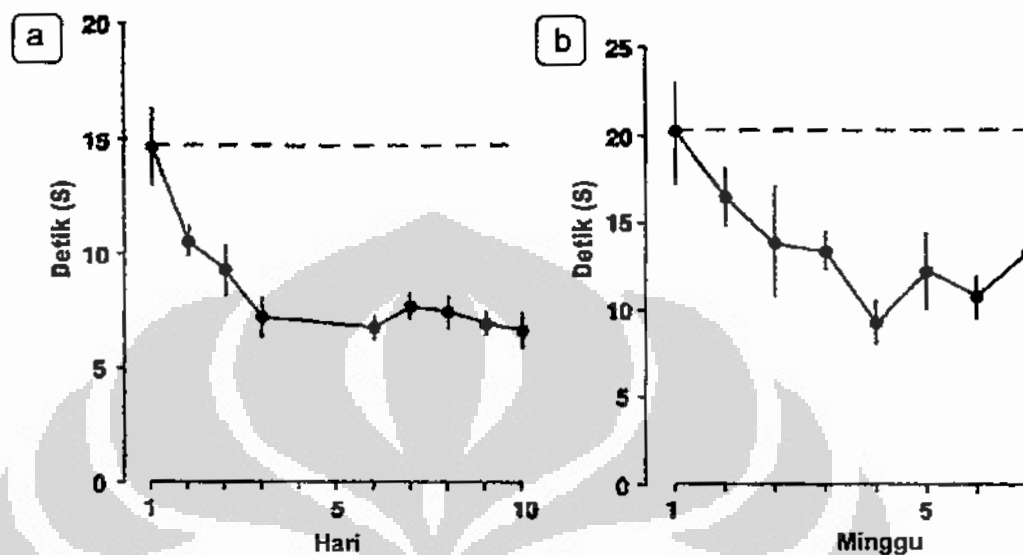


Gambar 2.15 Reseptor kapsaisin merupakan sensorik polimodal. (a) Ilustrasi topologi subunit protein TRPV1. Kanal fungsionalnya adalah tetramer yang dibentuk dari empat sub unit. Memiliki residu yang sensitif terhadap kapsaisin, proton, dan panas; (b) Arus TRPV1 yang ditransfeksikan pada sel HEK293 dapat diaktivasi oleh pH rendah (6.0), panas (42°C), dan kapsaisin (100 nM).

Sumber: Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular to somatosensory specificity. *Molecular Pain* 2008; 4: 4 "telah diolah kembali".

pengaruh analgesik lemah seperti asam asetilsalisilat biasanya direspon dengan perilaku meloncat. Respon pada mencit umumnya seragam, sedangkan pada tikus lebih kompleks; sedikitnya terdapat 12 macam perilaku nyeri yang berbeda. Semua respon tersebut dikategorikan "*chaotic defensive movements*" atau dalam konteks nosiseptif merepresentasikan refleks menghindar terhadap stimulus berbahaya. Kemungkinan yang harus dihindari adalah terjadinya reduksi waktu

reaksi sebagai konsekuensi pengulangan uji nyeri (fenomena belajar) pada hewan coba yang sama secara harian maupun mingguan (Gambar 16).²⁷



Gambar 2.16 Fenomena belajar merupakan masalah uji nyeri *hot plate test*. (a) Waktu reaksi (s) tikus SD berkurang dalam pengulangan uji nyeri pada hari-hari berikutnya; (b) Waktu reaksi tikus Wistar juga berkurang pada pengulangan uji nyeri berikutnya dalam hitungan minggu.

Sumber: Le BD, Gozariu M, Cadden SW. Animal model of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 611 "telah diolah kembali".

Pada awalnya uji respon hiperalgesia termal hanya sensitif untuk mengukur efek analgesik opioid. Metode tersebut mencakup *hot plate* dan *tail flick*. Prinsip keduanya adalah mengukur masa laten reaksi nosifensif terhadap stimulus panas dengan intensitas supraambang yang konstan. Kemudian Hargreaves mengembangkan metode baru dengan memilih stimulus radiasi panas (fotoelektrik) yang diarahkan pada salah satu plantar tungkai belakang tikus yang mengalami inflamasi akibat induksi *carrageenan*. Metode ini diaplikasikan pada tikus yang tidak diikat dengan cara mengukur masa laten reaksi menghindar tikus. Hasilnya dinyatakan sensitif untuk menguji efek analgesik inhibitor siklooksigenase.²³ Selanjutnya Menendez⁵² memperkenalkan modifikasi sistem *hot plate* dengan nama *unilateral hot plate test*. Bedanya dengan metode *hot plate* klasik, metode ini hanya menguji satu tungkai belakang terhadap stimulus panas dengan kondisi hewan coba yang terikat. Hasilnya dilaporkan cukup sensitif untuk

mendeteksi efek analgesik opioid serta hiperalgesia perifer ataupun sentral. Namun, karena masih diikat, maka hewan coba beresiko mengalami stres.

Terakhir, Lavich²³ melaporkan bahwa metode MHP sensitif terhadap efek analgesik nonopioid. Prinsip kerja metode ini adalah menyempurnakan metode-metode sebelumnya, yaitu menguji nyeri inflamasi pada tikus atau mencit yang tidak diikat. Analisis difokuskan pada masa laten reaksi menghindar antara tungkai belakang yang mengalami inflamasi dan tungkai kontralateral ketika terpapar stimulus panas *hot plate* yang konstan secara simultan. Metode ini dianggap sederhana, cepat, dan sensitif untuk uji farmakologi analgesik dan penelitian nyeri inflamasi. Atas pertimbangan tersebut, penelitian ini juga mengadopsi metode MHP dengan instrumen W-MHP yang fungsi kejanya telah sesuai standar.

2.5 Mekanisme Antinosiseptif Morinda

Noni atau mengkudu terdiri atas puluhan spesies dengan variasi morfologi, kandungan fitokimia, serta lokasi endemiknya di berbagai belah bumi beriklim tropis. Spesies Morinda yang dianggap sebagai varitas paling unggul adalah *Morinda citrifolia* L., termasuk famili *Rubiaceae*, dan bergenus *Morinda* bersama dengan 80 spesies lainnya. Spesies tersebut kaya akan nutrisi dan komponen aktif, sehingga sejak ribuan tahun silam telah dimanfaatkan oleh bangsa Polinesia sebagai etnomedika yang memiliki efek terapeutik dengan spektrum luas atau dijadikan sumber makanan bergizi tinggi. Para ahli botani berpendapat bahwa spesies endemik Kepulauan Pasifik ini mungkin berasal dari Asia Tenggara, sebagaimana laporan tradisi *Materia Medica* bangsa Melanesia.^{14,15,53}

Morinda merupakan tanaman atau semak yang selalu hijau, idealnya tumbuh di pesisir pantai ataupun di hutan dengan ketinggian mencapai 1300 kaki dari permukaan laut. Tanaman ini juga sering tumbuh di bekas aliran lava gunung berapi. Secara umum spesies *Morinda citrifolia* L. dapat diidentifikasi sebagai berikut (Gambar 2.17): batangnya lurus bercabang-cabang setinggi 3 hingga 10 m; daunnya lebar bergelombang, hijau terang, berbentuk elips atau oval dengan ujung runcing, menjari sepanjang 10 hingga 30 cm dan lebar 5 hingga 15 cm; bunganya bundar, mahkotanya bertandan sebanyak 3 hingga 5 lobus, berbentuk tubulus

sepanjang 1,25 cm, putih dan harum; dan berbuah sangat unik, ovoid `seperti granat` kuning. Bunga yang sudah matang akan berkembang menjadi buah dengan panjang 5 hingga 10 cm, tebal 5 hingga 7 cm, dilindungi kulit berlilin berwarna putih atau hijau/kuning keputihan agak transparan. Buahnya itu dapat tumbuh hingga sebesar 12 cm atau lebih, berbentuk poligonal, dan memiliki kulit kasar dengan corak `mata-mata` seperti kentang. Daging buahnya berair, pahit, kuning pudar atau kuning keputihan, serta memiliki 2 `inti batu` yang masing-masing berisi empat biji. Buah yang sudah matang dapat dimakan, namun memiliki bau butirat yang tidak menyenangkan dan rasanya bersabun. Sedangkan bijinya berbentuk segitiga oblong, keras berwarna merah kecoklatan, memiliki kantong udara di salah satu ujungnya, bersayap sehingga memungkinkan untuk melayang atau terapung. Karakter fenotip demikian memperlihatkan tingginya keragaman genetik *Morinda* antar varietas, terutama dalam hal morfologi daun dan buah.^{16,54}



Gambar 2.17 *Morinda citrifolia* L. memiliki keunggulan khas dibandingkan spesies noni/mengkudu lainnya. (a) Buahnya berbentuk poligonal, bercorak, besar sepanjang ± 12 cm; (b) Pohonnya hijau seperti semak tumbuh ideal liar di area pedalaman dan vulkanik.

Sumber: Fahrurroji F., Kunto R. Intisari hak paten efek terapeutik jus noni. Pena Salemba, 2009.

Dalam konteks etnomedika, proses pengolahan buah *Morinda* sangat menentukan kualitas produk hilirnya. Beberapa hal yang perlu diadopsi adalah standar agrikultur, higienitas pemrosesan, dan manufaktur yang baik.⁵⁶ Selain tetap harus mengadopsi kearifan penduduk lokal dalam memanfaatkan *Morinda* sebagai sumber kesehatan tradisional. Penduduk lokal memiliki cara tersendiri

dalam hal pemilihan bibit, pemetikan buah, penentuan formula atau komposisi dasar produk olahan Morinda. Tujuannya agar efek terapeutik Morinda dapat dipertahankan, meskipun telah diproses memakai teknologi modern. Ada dua teknologi pangan modern yang dinilai sangat menentukan kualitas produk Morinda, yaitu: (1) pasteurisasi untuk mencegah kontaminan mikroba dan agar komponen aktifnya tetap intak; (2) analiser *high performance liquid chromatography* untuk memastikan komposisi fitokimia atau komponen aktifnya telah sesuai standar ideal.⁵⁵

Pertimbangan utama sebelum mengaplikasikan produk olahan Morinda adalah mengukur tingkat keamanan atau resiko toksisitasnya. Produk olahan Morinda dinyatakan layak diaplikasikan bila memenuhi standar uji toksikologi mencakup toksisitas akut, toksisitas subakut, toksisitas subkronis, alergenitas, dan genotoksitas. Aspek toksikologi penting untuk dipertimbangkan karena Morinda sebagaimana komoditas etnomedika lainnya tidak lepas dari resiko *overdose* dan toksisitas.^{56,57} Pada praktiknya, efek terapeutik produk olahan Morinda apapun akan bergantung pada kualitas serta aspek keamanannya. Oleh karena itu, sampel penelitian efek antinosiseptif Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif inipun telah disesuaikan dengan pertimbangan-pertimbangan tersebut.

Keunggulan Morinda yang telah diakui sebagai CAM mengandung lebih dari 150 fitokimia atau nutraseutikal.^{16,17} Beberapa diantaranya telah diidentifikasi memiliki efek antinosiseptif seperti terpen, rutin, quersetin, ligan, fenialanin, skopoletin, dan proxeronin. Adapun komponen aktif yang telah diteliti mampu bekerja sebagai inhibitor COX-2 selektif adalah (+)-3,4,3',4'-tetrahidroksi-9,7' α -epoksiligano-7 α ,9'-laktone dan (+)-3,3'-bisdimetiltanagol (neolignan); pinoresinol dan 3,3'-bisdimetilpinoresinol (lignan); quersetin dan kaempferol (flavonol); skopoletin dan isoskopoletin; serta aromatik vanilin.⁵⁸ Semua komponen aktif tersebut diaplikasikan sebagai agen antinosiseptif dalam satu kesatuan formula Morinda, dan bukan dalam bentuk isolasi komponen tunggal.

Mekanisme antinosiseptif Morinda yang paling relevan untuk kasus nyeri inflamasi adalah jalur inhibisi aktivitas enzimatis COX-2. Sejumlah literatur menyatakan bahwa Morinda merupakan agen inhibitor COX-2 selektif dengan kekuatan hampir setara *celecoxib*.^{15-17,20} Hasil penelitian *enzyme immuno assay*

(*ELA*) dengan sumber COX-2 dari sel insekta Sf9 rekombinan manusia; memperlihatkan kapasitas inhibisi formula naturaseutikal Morinda 2,31% terhadap enzim COX-2 mencapai 60%.⁵⁴ Sedangkan melalui penelitian *Amersham ELA assay* dengan sumber COX-2 dari platelet manusia, formula naturaseutikal Morinda terbukti mampu menghambat aktivitas COX-2 –dalam hal memblokir sintesis PGE₂- dengan rasio IC₅₀ COX-2/COX-1 sebesar 0,76, yakni hampir setara dengan kapasitas inhibisi *celecoxib*.¹⁵ Bahkan dua laboratorium yang berbeda melaporkan perbandingan inhibisi COX-2/COX-1 (rasio IC₅₀ %) antara efek antinosiseptif Morinda, *celebrex*, indometasin, aspirin berurut-turut 0.35, 0.34, 40, dan 119.^{16,17}

Seperti telah diuraikan di atas bahwa hiperalgesia termal terjadi karena pengaruh sensitisasi PGE₂ terhadap aneka kanal ion atau reseptor nyeri melalui jalur cAMP PKA/PKC dependen. Ekspresi COX-2 itu sendiri merupakan regulasi hulu sintesis PGE₂, sehingga COX-2 layak dijadikan target molekul untuk mengatasi inflamasi atau hiperalgesia. Seandainya Morinda mampu menghambat COX-2 secara selektif, maka secara *in vivo* hewan coba yang diberi Morinda harus memperlihatkan penurunan respon hiperalgesia dibandingkan kontrol. Model penelitian yang tepat untuk membuktikan analisis ini adalah uji nyeri inflamasi dengan induksi *carrageenan*, lalu dikombinasikan dengan uji respon hiperalgesia memakai *hot plate test*. Hasil penelitian fisiologi perilaku ini seharusnya sinergis dengan hasil penelitian *in vitro* di atas, bahkan harus dapat mengkonfirmasi klaim anekdotal mengenai efek terapeutik Morinda sebagai anti nyeri kronis atau lebih spesifik lagi mengatasi hiperalgesia.

Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif cukup potensial untuk diaplikasikan dalam manajemen nyeri, mengingat obat analgesik saat ini masih menyisakan kelemahan. Analgesik generasi NSAIDs ternyata tidak selektif dalam menghambat COX-2, akibatnya siklooksigenase-1 (*cyclooxygenase-1, COX-1*) yang merupakan isoformnya juga terhambat. Kelemahan ini memicu berbagai efek samping pada pasien yang mengkonsumsi NSAIDs dalam jangka panjang seperti diare, peningkatan nyeri abdomen, *heartburn*, dan ulkus saluran cerna bagian atas disertai pendarahan internal. Solusi terhadap efek samping tersebut adalah dengan diaplikasikannya analgesik generasi inhibitor COX-2 selektif.

Namun, obat ini bersifat teratogenik sehingga tidak aman dikonsumsi oleh ibu hamil, serta berisiko memicu serangan jantung yang lebih besar.^{7,12,54}

Dalam hal ini, peningkatan gangguan fungsi kardiovaskuler terjadi karena inhibitor COX-2 selektif meningkatkan risiko trombotik yang berhubungan dengan penekanan produksi PGI₂ di sel-sel endotel tanpa menghambat produksi TXA₂. Misalnya, aplikasi *celecoxib* dengan dosis yang tidak tepat terhadap pasien nyeri arthritis dapat memicu efek samping seperti trombotik, hipertensi, dan aterosklerosis.⁷ Sedangkan penelitian tentang Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif sejauh ini tidak ada yang melaporkan efek samping tersebut. Bahkan dalam beberapa penelitian Morinda dilaporkan dapat meningkatkan kesehatan kardiovaskuler dengan cara menghambat ekspresi gen-gen protrombotik, menghambat enzim pengkonversi angiotensin (*angiotensin converting enzyme*, ACE), mereduksi oksisterol, mereduksi HMG-KoA reduktase, dan meningkatkan profil lipid.⁵⁵ Meskipun demikian, berbagai penelitian yang telah dipatenkan tersebut masih perlu diteliti lebih lanjut agar klaim efek terapeutik Morinda sinergis dengan penelitian Morinda sebagai COX-2 selektif.

Efek samping yang tidak diinginkan juga terjadi pada aplikasi analgesik golongan asetaminofen dan opioid. Toksikitas terhadap ginjal dan hati menjadi risiko bagi pasien yang mengonsumsi asetaminofen dalam jangka panjang. Sedangkan pasien yang diintervensi dengan opioid berisiko mengalami adiksi dan konsekuensi terfatal mengalami depresi respirasi.^{7,12} Berbagai kelemahan tersebut menginspirasi para peneliti untuk mengkombinasikan suatu analgesik dengan satu agen farmasetikal lain. Pendekatan ini dapat memperkuat potensi analgesik dan mengurangi efek sampingnya, misalnya kombinasi NSAIDs dengan beta adrenergik agonis atau antara opiat dengan adenosinergik agonis.^{12,59} Disamping itu telah diperkenalkan metode inhibisi interleukin 1- β (IL-1 β) pada sistem saraf pusat yang secara otomatis akan memblokir COX-2,⁴³ serta terapi gen dengan memperkenalkan molekul antiinflamasi yang bekerja pada sitokin, kode asam nukleat, atau jaringan saraf.⁶⁰

Hadirnya Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif tentunya dapat dijadikan alternatif manajemen nyeri, dengan catatan produk Morinda tersebut juga tidak berisiko memicu efek samping yang negatif. Morinda yang dipilih

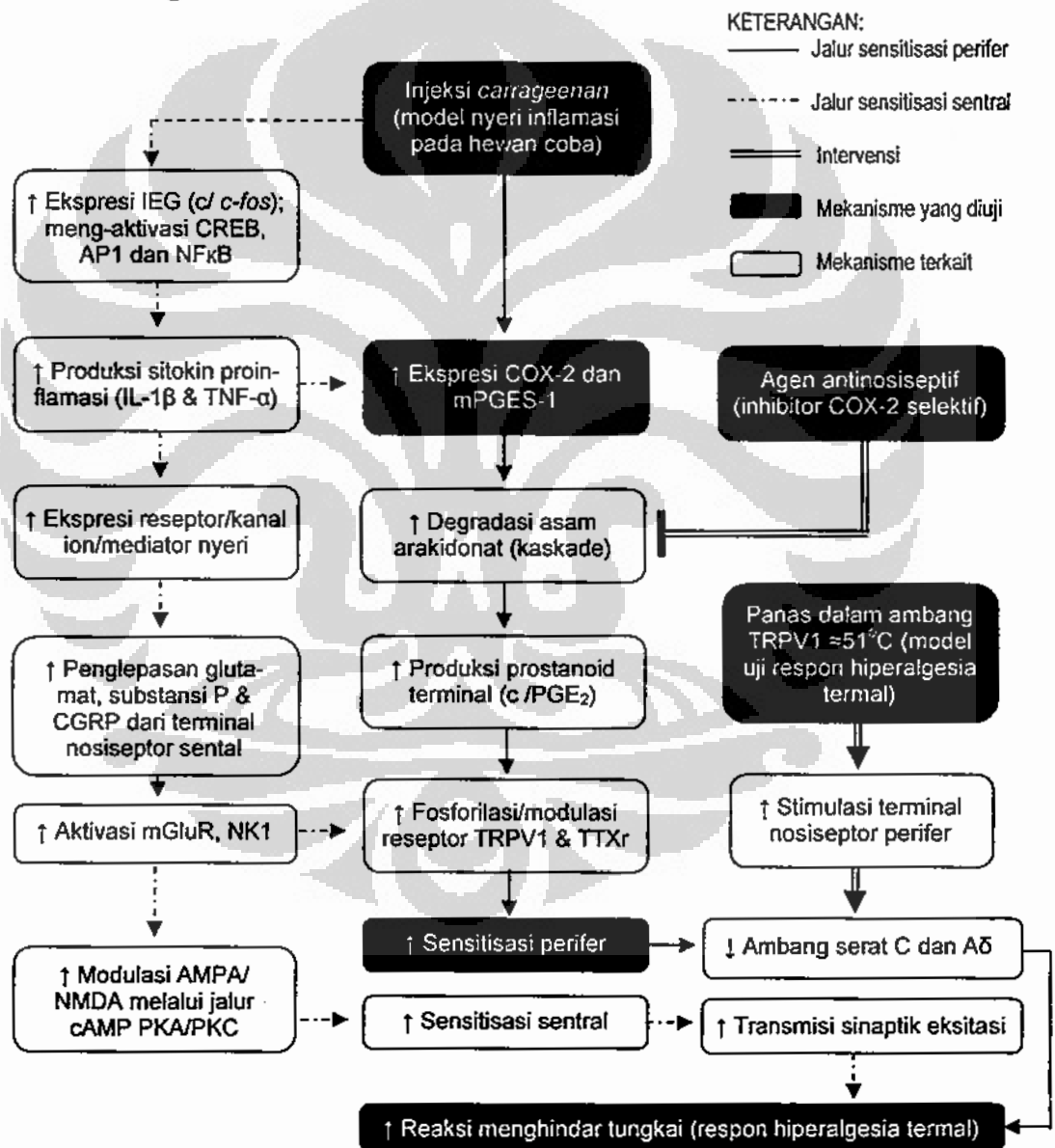
sebagai sampel penelitian ini adalah spesies dan formula Morinda sama seperti yang dilaporkan memiliki efek inhibitor COX-2 selektif. Ranah penelitian neurofisiologi ini lebih menekankan pada respon perilaku hewan coba ketika diinduksi *carrageenan*, sehingga data inhibisi COX-2-nya tidak diteliti lagi. Namun mengingat sumber Morindanya sama, maka aktivitas enzimatis COX-2 yang diinduksi *carrageenan* diperkirakan akan diblokade oleh Morinda yang diminumkan pada hewan coba seperti halnya laporan penelitian *in vitro* di atas.

Selanjutnya analisis efek antinosiseptif Morinda di atas sebaiknya dibandingkan dengan jalur molekuler nyeri lainnya. Berikut ini adalah mekanisme antinosiseptif Morinda lainnya yang terungkap dalam sejumlah literatur:

- Morinda 5% secara *in vitro* mampu mengikat reseptor serotonin 5HT_{A2} sekuat 103% dengan IC₅₀ <2,5%. Mekanisme ini penting untuk mengatasi nyeri migrain dengan cara memodulasi reseptor serotonin di sistem saraf pusat.⁶¹ Tujuannya agar regulasi antinosiseptif jalur asenden dari nukleus rafe ke neuron DH medula spinalis dapat dipertahankan ketika terjadi penurunan kadar serotonin seperti pada kasus migrain.^{1,2}
- Morinda melalui uji radio ligan mampu mengikat reseptor GABA_A sekuat 75%.¹⁸ Mekanisme ini berfungsi sebagai sedatif dan ansiolitik melalui fasilitasi transmisi sinaptik inhibisi di neuron DH medula spinalis.³
- Morinda 1% dalam uji radio ligan mampu mengikat reseptor opioid mu sekuat 93% dan terhadap reseptor kappa sekuat 77%.⁶² Mekanisme ini berfungsi sebagai analgesik melalui jalur antagonis opioid dalam kasus nyeri inflamasi atau nyeri neuropatik.^{8,63}
- Morinda 1,5 mg/mL mampu mengaktivasi reseptor kanabinoid 2 (*cannabinoid*, CB2).⁶⁴ Mekanisme penting untuk mengatasi sensitisasi perifer dalam kasus nyeri inflamasi.⁶
- Morinda melalui uji ELA mampu menginhibisi IL-1 β dan TNF- α dengan IC₅₀ masing-masing 100 μ g/ μ L dan 90 μ g/ μ L.⁶⁵ Mekanisme ini berperan dalam mengatasi nyeri inflamasi melalui jalur inhibisi sitokin proinflamasi yang diduga menginduksi ekspresi COX-2.^{3,8,9}
- Proxeronin buah Morinda berfungsi sebagai penghilang nyeri dan penenang. Penelitian *in vivo* terhadap tikus yang diberi minum kristal

xeronin memperlihatkan kondisi yang tenang dibandingkan kontrol. Percobaan lain pada tikus yang diinjeksi kristal xeronin serta tetrodotoksin hanya tampak gelisah, sedangkan tikus yang diinjeksi tetrodotoksin saja mati seketika. Mekanisme ini diduga terjadi karena xeronin dapat mengikat reseptor endorfin untuk memicu perasaan bahagia, serta memblok reseptor prostaglandin untuk mendatangkan efek antinosiseptif.⁶⁶

2.6 Kerangka Teori

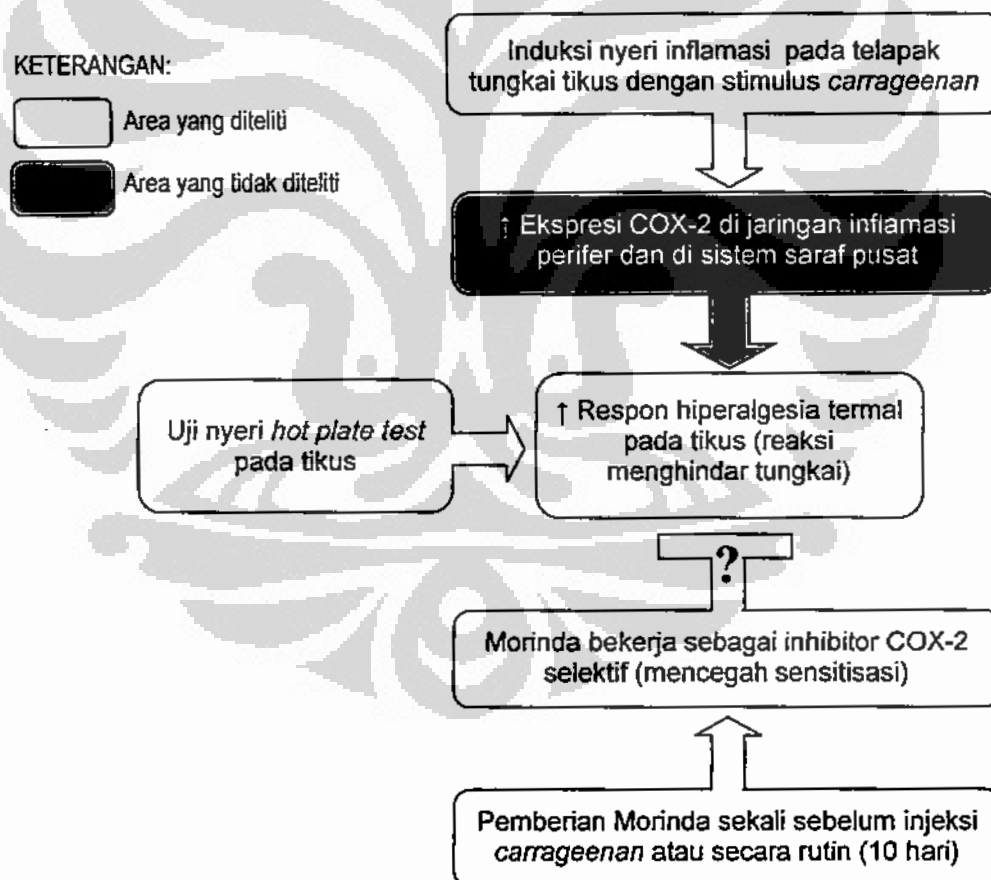


Gambar 2.18 Skema kerangka teori penelitian efek antinosiseptif Morinda dengan model nyeri inflamasi, diinduksi *carrageenan*, dan uji respon hiperalgesia termal menggunakan *hot plate*.

Tinjauan pustaka di atas bermuara pada kerangka teori (Gambar 2.18) yang dapat dijadikan landasan penelitian efek antinosiseptif Morinda. Dimulai dengan mengidentifikasi efek injeksi *carrageenan* sehingga terjadi nyeri inflamasi dan sensitisasi. Kemudian diintroduksi model uji nyeri *hot plate test* untuk menguji repon perilaku hiperalgesia termal pada hewan coba. Tinjauan akhirnya adalah efek antinosiseptif Morinda melalui jalur inhibisi COX-2 selektif dapat dibuktikan oleh pengukuran masa laten respon hiperalgesi termal.

2.7 Kerangka Konsep

Berikut ini adalah kerangka konsep penelitian efek antinosiseptif Morinda dengan model nyeri inflamasi pada hewan coba yang diinduksi *carrageenan*:



Gambar 2.19 Skema kerangka konsep penelitian efek antinosiseptif Morinda dengan model nyeri inflamasi. Tanda tanya (?) dalam skema menunjukkan bahwa Morinda –yang dilaporkan memiliki efek inhibitor COX-2 selektif– diprediksi akan menginhibisi sensitisasi untuk mencegah atau mengatasi respon hiperalgesia termal pada tikus sewaktu uji nyeri *hot plate test*.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vivo* dengan cara membandingkan efek antinosiseptif Morinda, *celecoxib* (obat inhibitor COX-2 selektif), placebo, dan kontrol terhadap hewan coba. Stimulus nyeri inflamasi yang dipakai adalah agen algogenik *carrageenan*. Parameter yang diteliti adalah respon hiperalgesia hewan coba pada setiap perlakuan melalui pengamatan uji nyeri *hot plate test*.^{23,27,35} Uji nyeri ini dilakukan pada menit ke-15, ke-60, ke-180, dan ke-300 setelah diinjeksi *carrageenan*.²³ Interval waktu tersebut beriringan dengan produksi prostanooid terminal (sekitar 6 jam pertama setelah diinjeksi *carrageenan*),³⁶ dan sesuai farmakokinetik Morinda dengan marker skopoletin (salah satu komponen aktif antinosiseptif) yang dilaporkan kadarnya meningkat di berbagai jaringan selama 4 jam dari sejak diminumkan.¹⁵

Efek antinosiseptif Morinda ditentukan oleh hasil pengukuran waktu reaksi (masa laten) berupa refleks menghindar tungkai hewan coba yang spesifik ketika terpapar *hot plate*, yaitu respon nosifensif seperti menjilati tungkai atau loncat.^{23,27} Parameter hiperalgesia ini seharusnya memperlihatkan nilai beda laten dalam kisaran nosiseptif normal (sekitar 1–4 detik), jika Morinda sebagai inhibitor COX-2 selektif mampu menginhibisi sensitisasi kanal ion atau reseptor nyeri.^{3,4,8} Morinda yang bersifat adaptogen^{16,20} membutuhkan pola konsumsi dan waktu kerja tertentu untuk memberikan efek yang optimal, misalnya selama 10 hari pemberian.¹⁵ Idealnya, hewan coba yang diberi minum Morinda akan memiliki presentase waktu toleransi yang lebih besar dalam fase akut nyeri dibandingkan yang diberi NSAIDs,^{15,16} dan mampu mengatasi hiperalgesia termal setara *celecoxib* sesuai dengan hasil penelitian *in vitro* sebelumnya (dalam hal menginhibisi aktivitas enzimatik COX-2).^{15,20,54}

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung mulai Agustus 2008 sampai Januari 2009. Tahap pemeliharaan dan perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di *Animal*

House FK UI. Sedangkan persiapan alat/bahan (terutama W-MHP) dan tahap uji nyeri *hot plate test* dilakukan di Laboratorium Faal FK UI.

3.3 Sampel Penelitian

Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan 5 ulangan (jumlah sampel per kelompok). Jumlah ulangan ini ditentukan dengan menggunakan rumus Federer: $(t - 1)(n - 1) \geq 15$, dengan t : jumlah perlakuan, dan n : besar sampel. Jumlah ini masih sesuai dengan ketentuan minimal sampel per kelompok, yaitu 5 ekor tikus per kelompok.⁶⁷

Kelima kelompok hewan coba tersebut adalah sebagai berikut: (1) kelompok kontrol tanpa perlakuan (tidak diberi obat apapun) sebagai standar respon tikus terhadap stimulus panas W-MHP, (2) kelompok plasebo hanya diberi larutan NaCl 0,9% (5 mL/kg BB, p.o), (3) kelompok standar yang diobati dengan *celecoxib* (*celebrex*, 50 mg/kg BB, p.o),⁶⁸ (4) kelompok yang diberi minum formula cair Morinda (POM TI 054617361) (5 mL/kg BB, p.o) hanya sekali sebelum diinjeksi *carrageenan*, dan (5) kelompok yang diberi minum formula cair Morinda (POM TI 054617361) (5 mL/kg BB, p.o) secara rutin sekali dalam sehari selama 10 hari.¹⁵

Pemilihan hewan coba dilakukan secara acak terhadap 30 ekor tikus dari satu galur yang telah disiapkan di *Animal House* FK UI dalam rentang waktu dan cara pemeliharaan yang sama, serta telah memenuhi standar berat badan (lihat di bawah). Kriteria hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini ialah tikus baru atau belum pernah digunakan dalam percobaan uji nyeri metode apapun, memperlihatkan respon menjilati tungkai yang seragam ketika terpapar panas *hot plate*, respon nosifensif tikus terjadi dalam rentang waktu *cut off time* (20 detik), dan uji nyeri *hot plate test* dilakukan pada tikus dalam satu rangkaian bertahap (5 jam). Sebaliknya bila tikus memperlihatkan respon berbeda (seperti loncat keluar kotak akrilik) pada salah satu tahap pengujian, atau tikus terlalu tahan panas sehingga berkali-kali melewati *cut off time*; maka tikus tersebut dinyatakan tidak memenuhi kriteria sampel hewan coba dan datanya tidak diikutsertakan dalam perhitungan statistik. Khusus untuk tikus kelompok 5 ditempatkan di kandang yang berbeda untuk mempermudah pemberian diet Morinda selama 10 hari.

Sedangkan dosis Morinda di atas disesuaikan dengan ketentuan dosis dalam penelitian mengenai efek antiinflamasi jus Morinda dengan parameter edema pada telapak tungkai tikus yang diinduksi *carrageenan*.⁶⁹ Dosis tersebut juga disesuaikan dengan ketentuan dosis *puree* Morinda yang diminumkan pada tikus dalam uji farmakokinetik Morinda dengan marker skopoletin.¹⁵ Sedangkan pemilihan dosis *celebrex* di atas disesuaikan dengan ketentuan dosis efektif antiinflamasi *celecoxib* guna mencegah peningkatan regulasi hulu TNF- α dan NF κ B.⁶⁸ Adapun pemilihan salin sebagai plasebo disamakan dengan model penelitian metode MHP²³ dan uji antiinflamasi jus Morinda⁶⁹ sebelumnya.

3.4 Material Penelitian

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague-Dawley* (SD) jantan dengan berat badan 180-230 gram, usia 3-4 bulan. Tikus tersebut diperoleh dari Pusat Litbang Pemberantasan Penyakit Depkes RI. Sekitar 1 bulan semua tikus dipelihara di *Animal House* FK UI sampai berat badannya sesuai standar penelitian uji nyeri. Hewan coba ditempatkan di dalam kandang tersendiri, dengan standar temperatur laboratorium, siklus gelap terang yang terkontrol, dan selalu diaklimatisasi sebelum dilibatkan dalam percobaan. Selama pemeliharaan, hewan coba tersebut diberi makanan pelet dan air minum standar *Animal House* FK UI.

Selanjutnya peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Perangkat alat *hot plate* hasil modifikasi dengan nama W-MHP
- *Stop watch* digital
- *Test tube* ukuran 0,5 mL dan 2 mL
- Gelas arloji kecil
- Lemari pendingin
- Lemari sterilisasi
- Timbangan digital
- Spuit tuberkulin ukuran 26 *Gauge* (volume 1 mL)
- Sonde (volume 1 mL)
- Sarung tangan

- *Tissue* gulung

Selain tikus SD sebanyak 30 ekor, bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- *Carrageenan* ukuran 25 mg (dipesan dari SIGMA)
- Morinda cair ukuran 1 L (konsentrasi dalam berat, 90% jus buah Morinda)
- NaCl 0,9% ukuran 10 mL
- Alkohol 70% ukuran 1 L

3.5 Cara Kerja

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yaitu: persiapan alat dan bahan percobaan (termasuk W-MHP), perlakuan terhadap hewan coba, dan uji nyeri *hot plate test*. Khusus untuk prinsip dasar modifikasi dan penggunaan W-MHP telah disesuaikan dengan fungsi kerja *hot plate* produk Panlab⁴⁸ dan Ugo Basile,⁵⁰ serta metode MHP yang didesiminasikan oleh Lavich.²³ Informasi tersebut telah dijelaskan di lampiran tesis ini.

Berikut ini adalah cara kerja untuk tahap persiapan alat dan bahan percobaan respon hiperalgesia:

1. Semua peralatan harus sudah siap pakai sehari sebelum percobaan. Khusus untuk *test tube* dan toples obat disterilkan memakai lemari pensteril otomatis. Sedangkan alat lainnya seperti gelas arloji dan nampan timbangan dibersihkan memakai alkohol.
2. Memakai jas laboratorium dan sarung tangan steril selama menyiapkan obat atau zat yang dipakai dalam percobaan.
3. Menyiapkan NaCl 0,9% yang akan diinjeksikan pada tungkai kontralateral. Sebanyak 0,5 mL NaCl 0,9% steril diambil memakai spuit (ukuran 1 mL) dari kemasan 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam *test tube* baru berukuran 0,5 mL.
4. Menyiapkan salin yang akan diminumkan pada kelompok kedua hewan coba. Sebanyak 1,5 mL NaCl 0,9% diambil memakai spuit dari kemasan 10 mL, lalu dimasukkan ke dalam *test tube* baru berukuran 2 mL.
5. Menimbang *carrageenan* 2% untuk diinjeksikan ke tungkai ipsilateral. *Carrageenan* diambil memakai sendok kecil dari kemasan 25 gram, lalu

ditimbang sesuai kebutuhan (dosis) memakai neraca digital. Setelah itu *carrageenan* dilarutkan dalam NaCl 0,9% secara merata di dalam toples steril. Larutan *carargeenan* 2% diambil memakai spuit untuk dituangkan ke dalam *test tube* baru berukuran 0,5 mL.

6. Menyiapkan Morinda cair yang akan diminumkan pada hewan coba kelompok ke-4, dan ke-5. Sebanyak 1,5 mL Morinda diambil dari kemasan 1 L memakai spuit steril lalu dimasukkan ke dalam *test tube* baru berukuran 2 mL.
7. Menyiapkan *celecoxib* yang akan diminumkan pada hewan coba kelompok ke-3 dengan dosis 50 mg/kg BB. *Celebrex* yang telah ditimbang sesuai kebutuhan (dosis) memakai neraca digital lalu dilarutkan memakai aquades secara merata di dalam toples steril. Larutan *celebrex* dibagi rata memakai spuit steril ke dalam *test tube* baru berukuran 2 mL.
8. Semua obat yang telah disesuaikan dosisnya disimpan dilemari pendingin untuk meminimalisasi risiko rusak sebelum dipakai pada waktunya.

Menjelang percobaan dilakukan persiapan dan perlakuan terhadap hewan coba dengan tahapan cara kerja sebagai berikut:

1. Setiap hari disiapkan 2 atau 3 ekor tikus yang memenuhi kriteria untuk percobaan respon hiperalgesia.
2. Memakai jas laboratorium dan sarung tangan bersih selama menimbang dan memberi dosis obat pada hewan coba.
3. Berat badan setiap tikus ditimbang memakai neraca manual; lalu diberi tanda warna di bagian kepala, punggung, atau polos.
4. Hasil penimbangan berat badan langsung dicatat pada kertas kerja harian.
5. Setiap tikus diberi perlakuan (pemberian agen antinosieptif) sesuai ketentuan kelompok masing-masing (lihat bagian 3.3) memakai sonde yang berbeda untuk setiap perlakuan.
6. Tikus yang telah diberi perlakuan di *check list* pada kertas kerja dan dimasukkan kembali ke dalam 1 kandang khusus.
7. Satu jam kemudian setiap tikus (kecuali kelompok ke-1) diinjeksi *carrageenan* 2 % (150 μ L) secara intraplantar (*ipl*) pada telapak tungkai belakang kiri, memakai spuit 0,5 mL baru dan *carrageenan* diambil dari

test tube baru. Sedangkan telapak tungkai kanan belakang diinjeksi NaCl 0,9% steril (150 μ L) dengan cara yang sama memakai spuit yang berbeda. Khusus untuk tikus kelompok pertama tidak diinjeksi apapun.

8. Semua tikus yang telah diberi perlakuan dimasukkan kembali ke dalam 1 kandang (lengkap dengan pakan dan air) tertutup, dan sesegera mungkin di bawa ke ruangan uji nyeri (>3 menit).
9. Tikus ditempatkan lagi dalam kandang terpisah (1 kandang untuk 1 ekor) dan diaklimatisasi sekitar 10 menit di ruangan uji nyeri yang bersuhu 24°C, penerangan lampu neon, dan suara bising eksternal seminimal mungkin.
10. Selama aklimatisasi semua peralatan uji nyeri dan kertas kerja disiapkan. Lempeng dan kotak akrilik *hot plate* dibersihkan dengan alkohol 70% memakai sarung tangan dan *tissue* gulung.

Selanjutnya dilakukan percobaan uji nyeri *hot plate test* dengan tahapan sebagai berikut:

1. Stop kontak W-MHP dihubungkan dengan arus listrik (*on*) selama \pm 10 menit hingga suhu lempeng aluminium yang tertera pada termometer digital mencapai 50,5°C. Program PC camera ZS211 dan *stop watch* digital juga harus sudah siap dioperasikan untuk perekaman respon hiperalgesia tikus.
2. Setelah tercapai suhu uji segera stop kontak W-MHP dibebaskan dari arus listrik (*off*), dan tunggu sampai suhu lempeng aluminium stabil $51 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (waktu pemanasan diatur agar tercapai suhu uji pada menit ke-15 pasca injeksi *carrageenan*).
3. Program PC camera ZS211 dioperasikan tepat menit ke-15 pasca injeksi *carrageenan*, dengan memakai sarung tangan bersih, tikus diambil dari kandangnya lalu ditempatkan ke atas lempeng aluminium yang telah mencapai suhu uji stabil.
4. Mencatat waktu reaksi menghindar tungkai (masa laten) dengan mengoperasikan *stop watch* digital tepat ketika tikus menginjakkan kaki ke atas lempengan aluminium.

5. Respon hiperalgesia hewan coba berupa perilaku menjilati tungkai atau loncat harus dipastikan terekam atau waktunya tercatat pada *stop watch* digital. Bila tikus telah menjilati tungkai kiri dan kananya (atau sebaliknya) secara berurutan, atau bila tikus telah terpapar terhadap panas lempeng aluminium melebihi *cut off time* (20 detik); maka tikus harus segera diangkat dari *hot plate* dan dikembalikan ke dalam kandang semula.
6. Ketika tikus diangkat segera *stop watch* digital diberhentikan, dan catatan waktu (masa laten setiap tungkai) yang tertera di layar segera dipindahkan pada kertas kerja.
7. Lempeng aluminium dan kotak akrilik dibersihkan lagi dari kotoran tikus dengan alkohol 70% memakai *tissue* secepat mungkin.
8. Berikutnya dilakukan pengujian respon hiperlagesia untuk tikus ke-2 dan ke-3 dengan cara yang sama seperti prosedur sebelumnya, dengan catatan suhu lempeng *hot plate* yang tertera pada termometer digital masih berkisar pada suhu uji stabil.
9. Setelah selesai perekaman dan pencatatan waktu reaksi (masa laten) tikus ke-3, program PC *camera ZS211* diberhentikan dan datanya disimpan.
10. Semua tikus diistirahatkan kembali di dalam kandang masing-masing sebelum pengujian respon hiperalgesia untuk menit ke-60, ke-180, dan ke-300.
11. Lima belas menit sebelum memasuki waktu pengujian berikutnya, W-MHP dipanaskan kembali sampai tercapai suhu uji yang stabil tepat pada setiap waktu pengujian. Tikus dan peralatan lainnya juga disiapkan.
12. Uji nyeri pada menit berikutnya dilakukan seperti prosedur uji nyeri menit ke-15, sampai catatan dan rekaman waktu reaksi menghindar tungkai (masa laten) dipindahkan pada kertas kerja.
13. Setelah selesai perekaman menit ke-300, semua tikus dimasukkan ke dalam satu kandang untuk dikembalikan lagi ke *Animal House* FK UI.
14. Semua peralatan dimatikan dan dirapihkan kembali seperti kondisi semula sebelum percobaan.
15. Melakukan evaluasi hasil pencatatan masa laten pada kertas kerja dan reakaman *webcam*.

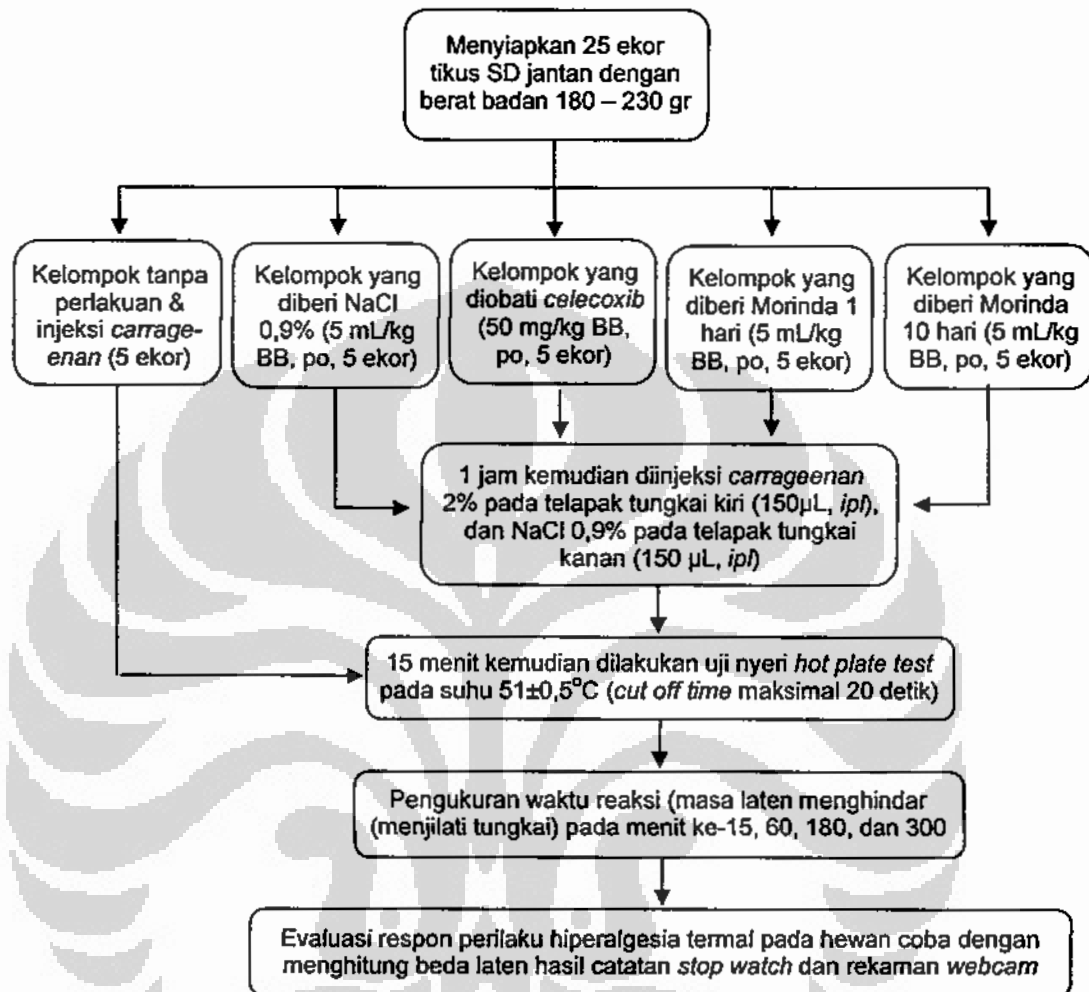
3.6 Parameter yang Diteliti

Respon hiperalgesia termal merupakan parameter penelitian ini yang ditentukan dengan mengukur beda laten masing-masing tikus memakai rumus: Δ masa laten menghindar tungkai (detik) = masa laten menghindar tungkai kanan – masa laten menghindar tungkai kiri.²³ Reaksi menghindar tersebut adalah perilaku khas tikus berupa menjilati tungkainya secara bergantian.^{23,27} Nilai masa laten diukur sejak detik pertama tikus kontak dengan lempeng *hot plate* sampai terjadi respon menjilati tungkai. Berdasarkan rangkaian uji nyeri pada tikus tersebut akan diperoleh data waktu terjadinya puncak respon hiperalgesia yang mengisyaratkan puncak produksi prostanoïd. Semakin kuat efek agen antinosiseptif, maka hasil penghitungan beda laten hewan coba akan semakin kecil, terutama pada menit ke-60 pasca injeksi *carrageenan*.

3.7 Analisis Data

Hasil pengukuran akan direpresentasikan sebagai nilai rerata \pm S.E.M. Signifikansi statistik ditentukan dengan memakai uji *Repeated Anova*.^{70,71} Pada $P < 0,05$ dinilai signifikan secara statistik. Pengolahan data menggunakan program komputer SPSS 17.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema alur penelitian efek antinosiseptif Morinda dengan model uji nyeri inflamasi dan respon hiperalgesia *hot plate test*.

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Penelitian efek antinosiseptif Morinda telah dilakukan di Laboratorium Faal FK UI selama kurun waktu Agustus 2008 s.d Januari 2009. Aktivitas penelitian mencakup pengukuran masa laten reaksi menghindar tungkai dengan metode MHP, terhadap 25 ekor tikus yang diinduksi nyeri inflamasi memakai *carrageenan*. Proses pengamatan respon hiperalgesia pada setiap tikus difokuskan pada reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang seperti tampak dalam Gambar 4.1b-c. Adapun hasil pengukuran rerata beda laten pada setiap kelompok tikus diperlihatkan dalam Tabel 3 (nilai masa laten setiap tikus, terlampir). Nilai rerata beda laten pada setiap tahap pengamatan respon hiperalgesia dijadikan bahan analisis statistik dengan memakai pendekatan uji hipotesis *Repeated-Anova* atau desain pengukuran berulang.



Gambar 4.1 Pengamatan respon hiperalgesia tikus dengan uji nyeri *hot plate test*. (a) Sketsa penempatan tikus di atas lempeng pemanas W-MHP, tampak dari depan kotak akrilik; (b) Rekaman posisi tungkai tikus ketika pertama kali ditempatkan di atas lempeng pemanas; (c) Rekaman reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang tikus sesaat setelah ditempatkan di atas lempeng pemanas.

Tabel 4.1 Data rerata beda laten hasil pengukuran respon hiperalgesia terhadap 5 kelompok tikus yang berbeda (n=25 ekor) dalam uji nyeri *hot plate test*

Kelompok	laten_15		laten_60		laten_180		laten_300	
	Rerata	sb	Rerata	sb	Rerata	sb	Rerata	sb
1 Kontrol	1.99	0.29	2.41	1.05	1.83	0.39	1.66	0.46
2 Salin	4.85	0.43	7.44	1.26	3.78	0.88	2.97	0.87
3 <i>Celecoxib</i>	3.19	0.13	4.20	0.63	2.37	0.24	2.02	0.21
4 Morinda 1 hr	2.93	0.53	4.09	0.60	2.44	0.57	1.92	0.41
5 Morinda 10 hr	2.84	0.56	3.99	0.32	2.02	0.19	1.94	0.10

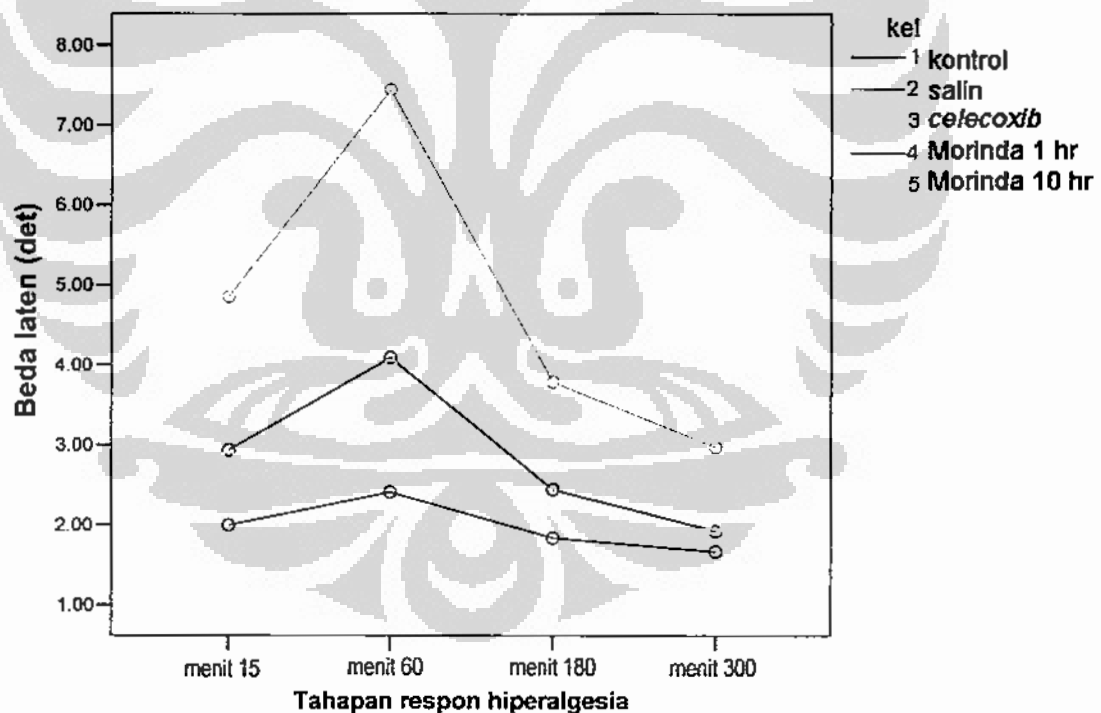
Selanjutnya hasil uji Anova dengan analisis *general linear model* diinterpretasikan melalui perbandingan *pairwise* (Tabel 4.2). Berdasarkan tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai beda laten kelompok 2 (salin) berbeda bermakna dibandingkan beda laten kelompok 4 (Morinda 1 hari) dan yang lainnya ($P < 0,05$). Sedangkan beda laten antara kelompok 3 (*celecoxib*) dengan beda laten kelompok 4 (Morinda 1 hari) dan 5 (Morinda 10 hari) tidak berbeda bermakna ($P > 0,05$). Interpretasi ini telah menjelaskan bahwa: (1) Morinda memiliki efek antinosiseptif karena dapat menurunkan nilai beda laten respon hiperalgesia bila dibandingkan kontrol, (2) efek antinosiseptif Morinda yang direpresentasikan oleh nilai beda laten respon hiperalgesia tidak berbeda dibandingkan *celecoxib* sebagai standar inhibitor COX-2 selektif, dan (3) efektivitas (kekuatan antinosiseptif) diet Morinda 10 hari tidak berbeda dibandingkan Morinda 1 hari dalam hal mengatasi respon hiperalgesia.

Tabel 4.2 Perbandingan *pairwise* beda laten hasil pengukuran respon hiperalgesia antar 5 kelompok tikus yang berbeda (n=25 ekor) dalam uji nyeri *hot plate test*

I (Kel)	J (Kel)	Mean	Sig	IK 95%	
		Difference (I-J)		Min	Maks
1 Kontrol	2 Salin	-2.79	0.000	-3.41	-2.16
	3 <i>Celecoxib</i>	-0.98	0.001	-1.60	-0.35
	4 Morinda 1 hr	-0.87	0.003	-1.49	-0.25
	5 Morinda 10 hr	-0.72	0.015	-1.35	-0.10
2 Salin	3 <i>Celecoxib</i>	1.81	0.000	1.19	2.43
	4 Morinda 1 hr	1.91	0.000	1.29	2.54
	5 Morinda 10 hr	2.06	0.000	1.44	2.68
3 <i>Celecoxib</i>	4 Morinda 1 hr	0.10	1.000	-0.52	0.73
	5 Morinda 10 hr	0.25	1.000	-0.37	0.87
4 Morinda 1 hr	5 Morinda 10 hr	0.15	1.000	-0.48	0.77

4.1 Efek Antinosiseptif Morinda terhadap Tikus yang Diinduksi Nyeri Inflamasi Menggunakan *Carrageenan* dengan Uji Nyeri *Hot Plate Test*

Grafik perbandingan beda laten untuk setiap tahapan respon hiperalgesia diantara kelima kelompok tikus diperlihatkan dalam Gambar 4.2. Pengamatan terhadap kelompok 2 (salin) memperlihatkan pengaruh injeksi *carrageenan* pada telapak tungkai kiri belakang tikus secara *ipl* menyebabkan berkurangnya masa laten (lebih cepat) respon menghindari tungkai terhadap stimulus panas, dibandingkan yang terjadi pada tungkai kanan yang diinjeksi dengan salin. Nilai beda laten yang merepresentasikan peningkatan respon hiperalgesia termal terjadi mulai menit ke-15 hingga menit ke-60 setelah injeksi *carrageenan*. Secara umum beda laten tampak signifikan mulai menit ke-15 hingga menit ke-300 setelah diinjeksi *carrageenan* dibandingkan dengan nilai beda laten pada tikus yang tidak



Gambar 4.2 Respon hiperalgesia termal antara kelima kelompok tikus direpresentasikan oleh beda laten reaksi menghindari tungkai dalam uji nyeri *hot plate test*. Hiperalgesia akibat injeksi *carrageenan* (menit nol) pada setiap kelompok dibandingkan dengan kelompok 1 (kontrol). Sedangkan efek antinosiseptif kelompok 3 (*celecoxib*), kelompok 4 (Morinda 1 hari), dan kelompok 5 (Morinda 10 hari) dibandingkan dengan kelompok 2 (salin). Nilai beda laten merupakan rerata yang dipakai dalam uji *Repeated Anova*.

diinjeksi *carrageenan* (kelompok 1, kontrol). Sementara itu, pemaparan tungkai tikus terhadap stimulus panas dalam uji nyeri *hot plate test* secara berulang selama 5 jam pertama tahapan respon hiperalgesia tidak memperlihatkan peningkatan beda laten yang signifikan pada tikus kelompok kontrol.

Hasil analisis aktivitas antinosiseptif memperlihatkan penurunan respon hiperalgesia pada tikus yang diberi minum Morinda 1 hari sebelum diinjeksi *carrageenan* dibandingkan tikus yang diberi salin. Beda laten kelompok Morinda signifikan lebih kecil ($P < 0,05$) dibandingkan beda laten kelompok salin yang mencapai 3 hingga 7 detik. Dalam hal ini, efek antinosiseptif Morinda sudah bekerja sejak 15 menit pertama setelah diinjeksi *carrageenan* hingga berakhir fase awal inflamasi, sebab tidak ditemukan penurunan ambang atau peningkatan beda laten yang signifikan. Oleh karena itu, pengamatan respon hiperalgesia termal pada kelompok Morinda tidak seakut kelompok salin yang tampak tersensitisasi dalam uji nyeri *hot plate test*.

4.2 Perbandingan Efek Antinosiseptif *Celecoxib* dan Morinda diperlihatkan oleh Penurunan Respon Hiperlagesia pada Tikus yang Diinjeksi *Carrageenan* dengan Uji Nyeri *Hot Plate Test*

Gambar 4.2 juga memperlihatkan perbandingan respon hiperalgesia antara tikus kelompok 3 yang diobati *celecoxib* dengan tikus kelompok 4 yang diberi minum Morinda sebelum diinjeksi *carrageenan* pada tungkai kiri belakang tikus secara *ipl*. Beda laten tikus kelompok 3 (*celecoxib*) tidak berbeda secara bermakna ($P > 0,05$) dibandingkan kelompok 4 (Morinda 1 hari), yaitu selisihnya kurang dari 1 detik. Baik efek antinosiseptif *celecoxib* maupun Morinda, sama-sama sudah bekerja pada menit ke-15 untuk menginhibisi sensitisasi nyeri akibat aktivitas enzimatik COX mengkatalisasi produksi prostanoid.

Beda laten reaksi menghindar tungkai tikus pada setiap tahapan uji nyeri *hot plate test* masih dalam rentang normal nosiseptif, kecuali pada menit ke-15 dan ke-60 yang mengalami penurunan beda laten mencapai 4 detik. Namun secara umum, kedua kelompok tidak mengalami respon hiperalgesia selama 5 jam uji nyeri *hot plate test* secara berulang. Dengan demikian, aplikasi Morinda dalam

dosis 5 mL/kg BB tikus sudah cukup efektif mencegah hiperalgesia termal, bahkan nilai beda latennya hampir setara dibandingkan kelompok *celecoxib*.

4.3 Perbandingan Aktivitas Antinosiseptif Morinda yang Diminumkan Sehari dengan Diet Morinda Selama Sepuluh Hari sebelum Injeksi Carrageenan dengan Uji Nyeri Hot Plate Test

Gambar 4.2 juga memperlihatkan perbandingan aktivitas antinosiseptif antara tikus kelompok 4 yang diberi minum Morinda sekali dengan tikus kelompok 5 yang diet Morinda selama 10 hari sebelum diinjeksi *carrageenan* pada tungkai kiri belakang secara *ipl*. Beda laten antara kedua kelompok hanya berbeda pada menit ke-180, tetapi selisihnya kurang dari 0,5 detik. Selisih beda laten tersebut tidak signifikan secara statistik ($P > 0,05$). Artinya, efektivitas diet Morinda 10 hari tidak memperlihatkan antinosiseptif yang lebih kuat untuk mengatasi hiperalgesia termal dibandingkan dengan konsumsi Morinda sewaktu.

Aktivitas antinosiseptif Morinda pada kedua kelompok tikus juga sudah terjadi sejak menit ke-15 uji nyeri *hot plate test*, dan bertahan selama fase awal inflamasi (5 jam pertama setelah injeksi *carrageenan*). Durasi aktivitas antinosiseptif tersebut mungkin berhubungan dengan farmakokinetik Morinda yang bekerja optimal selama 4 jam pertama setelah diminumkan. Namun, komponen antinosiseptif Morinda yang diminumkan pada kedua kelompok tikus sebelum injeksi *carrageenan* sudah cukup maksimal menghambat aktivitas enzimatik COX-2 pada jaringan yang mengalami nyeri inflamasi, sehingga dipastikan tidak terjadi sensitisasi nyeri yang ditandai respon hiperalgesia termal.

BAB 5 PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mengkonfirmasi potensi antinosiseptif Morinda dengan model nyeri inflamasi pada tikus yang diinjeksi *carrageenan*. Caranya ialah dengan mengukur masa laten reaksi menghindar tungkai tikus tersebut melalui uji nyeri *hot plate test* yang merepresentasikan efek antinosiseptif Morinda guna mengatasi hiperalgesia termal, dan hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa Morinda dan *celecoxib* sama-sama signifikan menurunkan respon hiperalgesia termal pada tikus tersebut. Secara *in vitro*, Morinda dilaporkan signifikan menghambat aktivitas enzimatis COX-2. Hal ini dapat memperkuat dugaan mekanisme antinosiseptif Morinda melalui jalur inhibisi COX-2 selektif. Selain itu, Morinda dalam dosis 5 mL/kg BB tikus sudah cukup efektif menghambat sensitisasi perifer dengan parameter reaksi menghindar tungkai, seperti halnya efek analgesik *celecoxib* dalam dosis 50 mg/kg BB tikus. Sedangkan diet Morinda selama 10 hari pada tikus tersebut tidak memperkecil beda laten atau reaksi nosifensif yang signifikan bila dibandingkan dengan tikus yang hanya sekali diberi Morinda sebelum diinjeksi *carrageenan*.

Pemilihan hewan coba telah dilakukan secara acak terhadap tikus yang memenuhi kriteria sampel. Reaksi menghindar tungkai (masa laten) semua tikus tercatat tidak melewati *cut off time* (20 detik), atau relatif normal bila dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Akan tetapi, hasil pencatatan masa laten dalam percobaan uji nyeri *hot plate test* ini masih memperlihatkan perbedaan variabilitas (lampiran 2). Hal ini terjadi karena setiap tikus pasti memiliki karakteristik yang berbeda dalam merespon stimulus nyeri. Oleh karena itu, patokan yang dirumuskan sebagai parameter hiperalgesia termal adalah beda laten antara reaksi menghindar pada tungkai kiri yang diinduksi *carrageenan* dengan tungkai kontralateral (kontrol) masing-masing tikus.²³

Algogenik *carrageenan* 2% (150 μ L/tungkai) yang diinjeksikan pada tungkai ipsilateral tikus cukup signifikan menginduksi nyeri inflamasi dan respon hiperalgesia. Hal ini terjadi pada kelompok tikus yang hanya diberi minum salin (5 mL/kg BB), ternyata tikus-tikus tersebut mengalami peningkatan reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang kiri yang diinjeksi *carrageenan* secara *ipl*.

Reaksi nosifensif ini menandai respon hiperalgesia termal pada tikus, dan secara tidak langsung mengisyaratkan terjadinya sensitisasi perifer pada terminal nosiseptor yang dimediasi oleh peningkatan produksi prostanoïd. Respon tersebut meningkat signifikan pada menit ke-60 setelah injeksi *carrageenan*, atau sinergis dengan waktu puncak peningkatan ekspresi mRNA COX-2 (5 kali lipat) di jaringan inflamasi.³⁶ Artinya, waktu tersebut beriringan dengan puncak produksi PGE₂ (6 kali lipat)³⁶ yang notabene bertanggung jawab terhadap sensitisasi (peningkatan transduksi termal) reseptor TRPV1, ditandai oleh penurunan ambang nosiseptor terhadap stimulus panas seperti yang bersumber dari *hot plate*.⁴⁰ Konsekuensinya adalah tikus kelompok salin semakin cepat mengalami hiperalgesia termal yang direpresentasikan dengan peningkatan grafik nilai beda laten (3 – 7 detik) dalam uji nyeri *hot plate test*.

Disamping itu, ekspresi gen *c-fos* di DRG dan neuron DH medula spinalis terjadi pada jam pertama hingga jam kedua setelah terpapar stimulus panas yang berbahaya seperti suhu uji *hot plate* (52°C).³⁴ Peningkatan “sup inflamasi” juga terjadi pada jam pertama setelah injeksi *carrageenan*; mengindikasikan peningkatan mediator lokal seperti substansi P, glutamat, histamin, bradikinin, dan prostaglandin.³⁵ Bersamaan dengan itu sintesis IL-1 β juga meningkat yang mengisyaratkan terjadi induksi ekspresi COX-2 di jaringan inflamasi. Jadi, peningkatan respon hiperalgesia pada jam pertama setelah injeksi *carrageenan*, semata-mata terjadi karena mediator sensitisasi nyeri meningkat mulai dari faktor transkripsi gen hingga prostanoïd terminal. Sensitisasi ini secara molekuler diduga berlangsung selama enam jam pertama setelah injeksi *carrageenan*.³⁶

Selanjutnya uji nyeri model MHP yang dipakai dalam penelitian ini dipastikan sensitif terhadap efek analgesik non opioid, atau secara spesifik mampu mendeteksi reaksi hiperalgesia yang dipicu oleh *carrageenan* pada tikus yang diobati inhibitor COX-2 selektif. Model ini telah dinyatakan sebagai metode sederhana, cepat, dan sensitif untuk mendeteksi hiperalgesia perifer pada tikus yang tidak diikat.²³ Suhu uji W-MHP –yang stabil pada kisaran 51,5°C– cukup kuat mengaktivasi TRPV1 yang sudah tersensitisasi oleh PGE₂,^{25,40,51} atau mungkin menginduksi ekspresi *c-fos* untuk menginisiasi sensitisasi sentral.^{3,34} Hal ini terlihat pada tikus kelompok salin yang dipastikan telah mengalami respon

hiperalgesia termal akibat induksi *carrageenan*, berbeda dengan kelompok kontrol hanya mengalami respon nosiseptif normal dengan nilai beda laten yang kecil (ambang nyeri normal). Bila tikus tersebut diberi minum Morinda atau obat inhibitor COX-2 selektif sebelum diinjeksi *carrageenan*, maka kemungkinan penurunan respon hiperalgesianya akan terdeteksi oleh W-MHP. Aspek sensitivitas W-MHP ini tampak dalam pengamatan reaksi menghindar tungkai tikus kelompok Morinda dan *celecoxib* yang mengalami penurunan beda laten pada menit ke-60, yaitu sekitar 4 detik dibandingkan kelompok salin.

Ada beberapa alasan yang menyebabkan kelompok tikus yang diberi Morinda tidak mengalami hiperalgesia termal, ditandai oleh nilai beda laten yang kecil atau ambang yang relatif tinggi. Secara *in vitro*, hasil kuantifikasi PGE₂ pada platelet yang diberi Morinda dilaporkan sangat rendah.⁵⁴ Sedangkan respon hiperalgesia dilaporkan tidak terjadi pada mencit yang mengalami defisiensi kanal ion TRPV1 dan reseptor EP₁.^{40,72} Dalam konteks sensitisasi perifer, hiperalgesia termal dapat terjadi bila PGE₂ di jaringan inflamasi berhasil mengkativasi subunit G_s reseptor EP₁ di terminal nosiseptor perifer untuk menginisiasi transduksi sinyal melalui jalur cAMP-PKA. Subunit katalitik PKA akan bertranslokasi untuk memfosforilasi residu serin TRPV1, sehingga nosiseptor tersensitisasi atau ambangnya menurun.¹¹ Seandainya reseptor TRPV1 teraktivasi oleh stimulus panas lempeng *hot plate*, maka akan terjadi respon hiperalgesia termal pada tikus.

Jadi, syarat utama terjadinya hiperalgesia termal dalam kasus nyeri inflamasi adalah adanya kontinuitas produksi PGE₂ yang dikatalisasi oleh COX-2.^{73,74} Sebaliknya aplikasi antibodi monoklonal anti-PGE₂ atau inhibitor COX-2 selektif terhadap tikus yang diinjeksi *carrageenan* dinyatakan dapat memulihkan hiperalgesia termal dalam tempo 1 hingga 3 jam.⁷⁵ Pada tikus kelompok Morinda terbukti tidak terjadi penurunan ambang nosiseptor (peningkatan beda laten) yang signifikan, sehingga diduga reseptor TRPV1 tidak tersensitisasi. Artinya, produksi PGE₂ di jaringan inflamasi tikus tersebut tidak cukup kuat untuk memodulasi reseptor TRPV1. Sedangkan beda laten yang relatif kecil menunjukkan bahwa Morinda telah bekerja memulihkan hiperalgesia termal sejak menit 15 setelah diminumkan pada tikus tersebut seperti halnya inhibitor COX-2 selektif.

Dengan diperoleh data beda laten yang hampir setara pada tikus kelompok Morinda dan tikus kelompok *celecoxib*, maka semakin memperkuat potensi antinosiseptif Morinda melalui mekanisme inhibisi COX-2 selektif. Aktivitas antinosiseptif Morinda sudah bekerja signifikan sejak menit ke-15 pasca injeksi *carrageenan*. Bahkan ketika terjadi puncak ekspresi COX-2 pada menit ke-60 pasca injeksi *carrageenan*, komponen aktif Morinda juga masih cukup efektif memblokir aktivitas siklooksigenase dalam mendegradasi asam arakidonat. Hal ini tampak pada kelompok Morinda dan *celecoxib* yang mengalami penurunan respon hiperalgesia termal dengan beda laten sekitar 3 detik, sehingga diduga tidak terjadi sensitisasi yang masif pada kedua kelompok tikus dalam uji nyeri *hot plate test*. Artinya, tikus-tikus tersebut memiliki toleransi yang tinggi terhadap stimulus panas W-MHP, meskipun telah diinduksi oleh *carrageenan* sebagai stimulus primer hiperalgesia.

Kapasitas inhibisi Morinda terhadap respon hiperalgesia masih dalam rentang waktu farmakokinetiknya. Sekitar 30 menit setelah tikus diminumkan Morinda, komponen antinosiseptif Morinda dengan marker skopoletin (salah satu komponen antinosiseptif) sudah mulai diabsorpsi oleh jaringan tubuh tikus. Satu jam kemudian komponen aktif Morinda sudah menyebar ke seluruh tubuh, termasuk ke jaringan inflamasi. Artinya, komponen aktif Morinda diduga sudah bekerja efektif guna menginhibisi aktivitas enzimatik COX-2 setelah 1 jam pertama diminumkan pada tikus. Kadar puncak komponen aktif Morinda di dalam plasma terjadi pada jam ke-2, dan berkurang 50% selama 4 jam.¹⁵ Data ini sejalan dengan kemampuan Morinda menghambat respon hiperalgesia termal pada tikus selama 5 jam uji nyeri *hot plate test*. Nilai beda laten tikus kelompok Morinda pada setiap tahap pengamatan hiperalgesia tidak mengindikasikan peningkatan beda laten (penurunan ambang nosiseptor) yang signifikan, seperti halnya nilai beda laten pada tikus kelompok *celecoxib*. Jadi, penelitian ini memperlihatkan bahwa Morinda memiliki potensi antinosiseptif yang sama seperti *celecoxib* dalam hal mengatasi hiperalgesia termal terutama selama 5 jam pertama nyeri inflamasi.

Pengamatan efek antinosiseptif Morinda di atas sinergis dengan efek antiinflamasi Morinda pada tikus yang diinjeksi *carrageenan*. Morinda dilaporkan cukup signifikan mereduksi edema tungkai yang diinjeksi *carrageenan* secara *ipl*

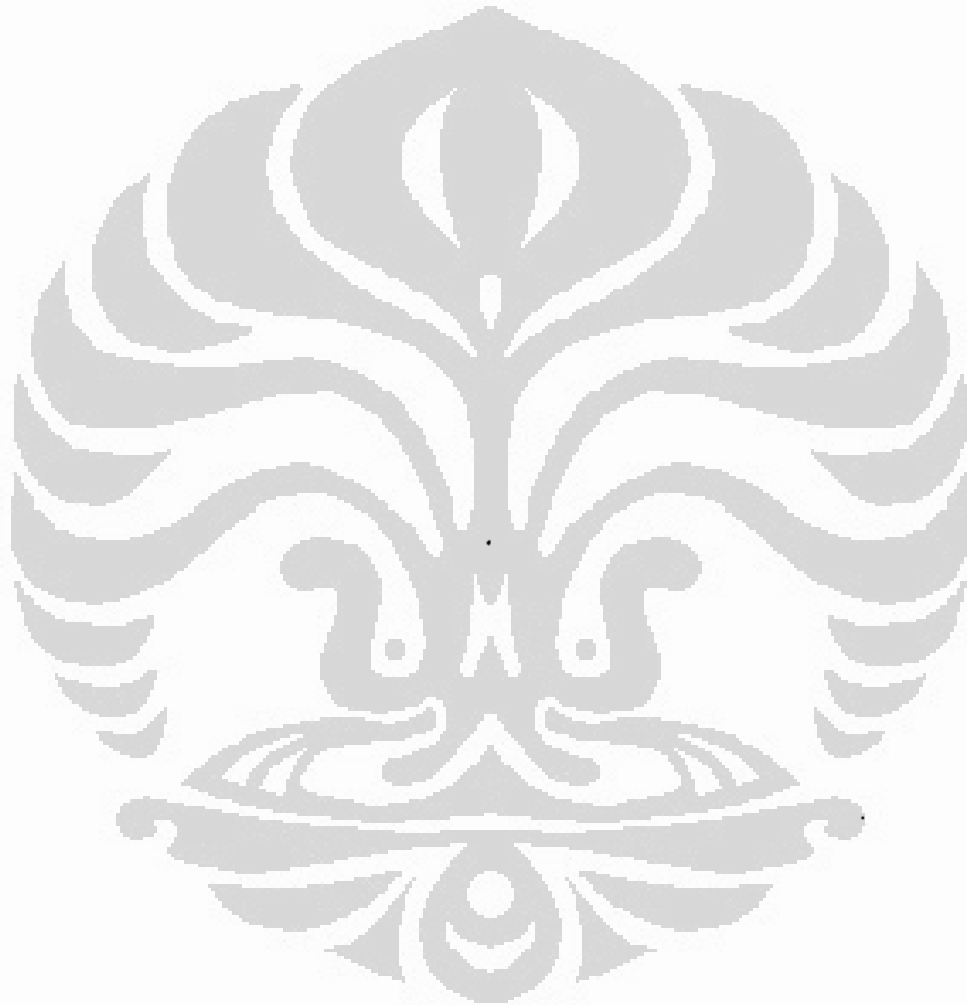
yang mengisyaratkan tikus tersebut tidak mengalami inflamasi dan hiperalgesia pada menit ke-50 hingga menit ke-250. Edema itu sendiri terjadi karena *carrageenan* menginduksi pelepasan gas hidrogen disulfida (H_2S) yang berhubungan dengan infiltrasi neutrofil. Sedangkan infiltrasi ini ditandai peningkatan aktivitas myeloperoksida.³⁷ Mekanisme ini mengindikasikan bahwa H_2S bersama NO bekerja mengaktifasi faktor transkripsi NF κ B yang mungkin didahului oleh stimulasi IL-1 β . Lebih tepatnya menginduksi fosforilasi I κ B α , sehingga NF κ B terdisosiasi dan bertranslokasi ke nukleus untuk meningkatkan transkripsi gen-gen proinflamasi,^{76,77} salah satu diantaranya peningkatan ekspresi gen COX-2. Jadi, baik pengamatan efek Morinda sebagai antiinflamasi (dengan parameter edema) maupun sebagai antinosiseptif (dengan parameter hiperalgesia termal) sama-sama melalui jalur inhibisi COX-2, dan hasilnya secara *in vivo* sinergis.

Analisis di atas juga sesuai dengan tinjauan pustaka sebelumnya, bahwa Morinda dilaporkan dapat menginhibisi aktivitas faktor transkripsi NF κ B serta menginhibisi produksi sitokin proinflamasi (terutama IL-1 β dan TNF- α). Artinya, sangat mungkin tikus yang diberi Morinda tidak mengalami peningkatan produksi mediator inflamasi meskipun diinduksi *carrageenan*. Bila mediator inflamasi (terutama IL-1 β) diinhibisi, maka dilaporkan tidak akan terjadi peningkatan aktivitas CREB. Oleh karena itu, wajar tidak terjadi sensitisasi atau peningkatan respon hiperalgesia termal pada tikus yang diberi Morinda karena diduga jalur CREB tidak menginduksi peningkatan transmisi sinaptik.

Analisis terakhir perihal diet Morinda selama 10 hari tidak memperlihatkan perbedaan beda laten yang signifikan dibandingkan konsumsi Morinda 1 jam sebelum diinduksi nyeri inflamasi, kecuali sedikit penurunan beda laten pada menit ke-60. Pengaruh diet Morinda selama 10 hari juga berhubungan dengan farmakokinetik Morinda di atas. Setelah 24 jam dikonsumsi kadar komponen aktif Morinda di dalam plasma dilaporkan hanya tersisa 2%.¹⁵ Artinya, komponen aktif Morinda telah dimetabolisme dalam rentang waktu 24 jam. Diduga diet Morinda 10 hari tidak mengalami akumulasi di dalam tubuh dan hanya berperan sebagai sumber nutrisi.

Dalam konteks mengatasi fase awal inflamasi, pemberian Morinda 1 hari sudah cukup kuat mengatasi kemungkinan hiperalgesia termal yang menyertai

reaksi inflamasi. Akan tetapi, pada kasus nyeri kronis prostanoid perifer diproduksi berkelanjutan sampai mekanisme transkripsi gen-gen proinflamasi kembali normal. Oleh karena itu, perlu strategi pemberian Morinda dengan frekuensi yang tepat untuk mengimbangnya. Efek frekuensi pemberian antinoseptif Morinda ini dapat dibuktikan lebih lanjut pada manusia dengan metode hiperalgesia yang sudah baku.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berikut ini kesimpulan penelitian yang memperkuat dua hipotesis yang dirumuskan sebelumnya, yaitu:

1. Efek antinosiseptif Morinda dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal secara bermakna, berupa penurunan respon menghindar tungkai tikus yang diinduksi nyeri inflamasi menggunakan algogenik *carrageenan*.
2. Efek antinosiseptif Morinda untuk menurunkan beda laten hiperalgesia termal tidak berbeda bermakna dibandingkan *celecoxib*, dan tampak mirip pola beda laten diantara keduanya.
3. Diet Morinda secara teratur selama 10 hari tidak menurunkan beda laten hiperalgesia termal yang berbeda secara bermakna dibandingkan diet Morinda 1 jam sebelum diinduksi *carrageenan*.

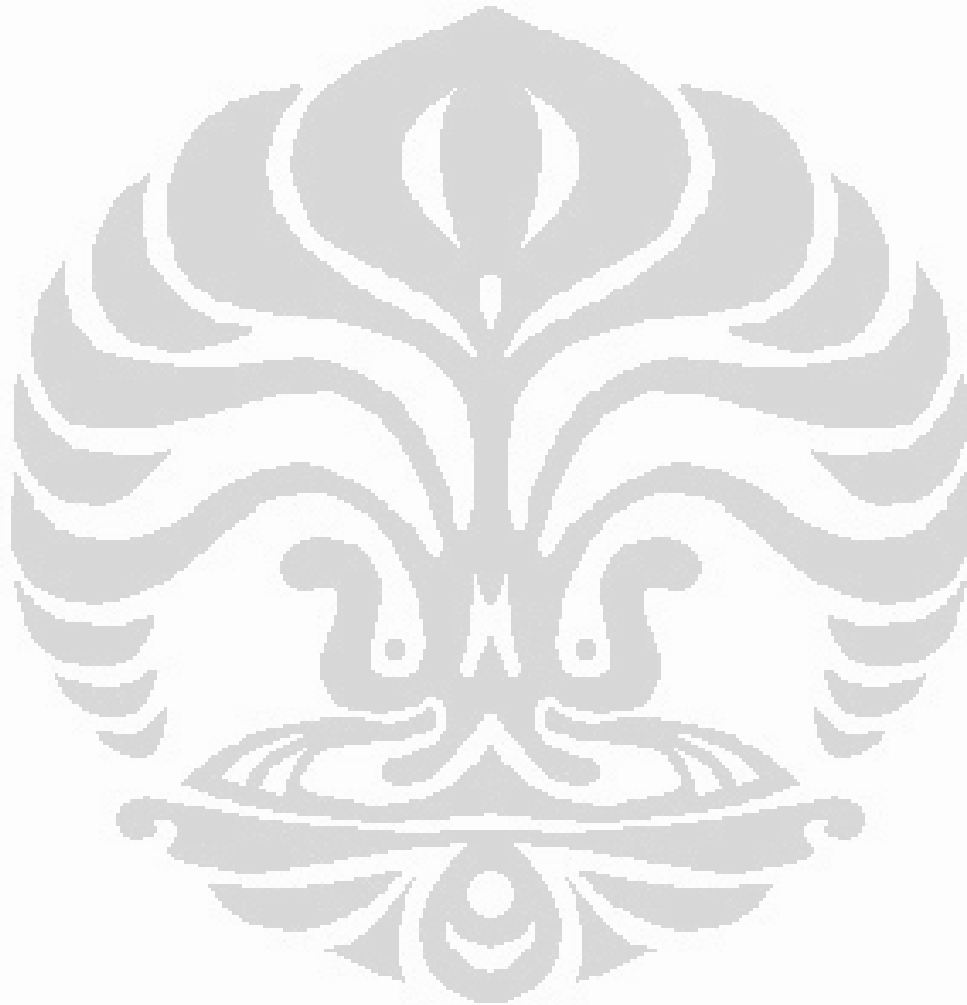
6.2 Saran

Morinda memiliki potensi antinosiseptif dengan kemungkinan mekanisme atau jalur inhibisi nosiseptif yang beragam. Penelitian ini dapat dikembangkan pada ranah fisiologi perilaku, biomolekuler nyeri, atau efikasi antinosiseptif dengan pendekatan farmakologi. Saran yang diajukan berdasarkan penelitian ini, diantaranya:

1. Meneliti efek antinosiseptif Morinda dengan pendekatan riset fisiologi nyeri lainnya pada hewan coba, seperti: model nyeri neuropatik, respon hiperalgesia mekanik, induksi algogenik kapsaisin, dan memakai alat atau metode uji respon nyeri lainnya.
2. Meneliti efek antinosiseptif Morinda terhadap inhibisi respon hiperalgesia, langsung pada manusia dengan metode riset neurofisiologi yang sudah baku.
3. Meneliti mekanisme antinosiseptif Morinda pada tingkat molekuler seperti jalur peningkatan sintesis prostanooid terminal (PGE_2 dan TBX_2), sensitisasi reseptor vaniloid (TRVP1), modulasi reseptor serotonin (5HT_{2A}), inhibisi reseptor opioid (μ -opioid), produksi interleukin proninflamasi (IL-

1β dan $\text{TNF-}\alpha$), ekspresi gen *c-fos*, aktivitas faktor transkripsi gen-gen proinflamasi ($\text{NF}\kappa\text{B}$ dan AP1), dan molekuler plastisitas lainnya.

4. Meneliti efikasi antinosiseptif *Morinda* dengan pendekatan farmakologi dibandingkan NSAIDs, inhibitor COX-2 selektif, opiat, antagonis reseptor opioid, antagonis reseptor NMDA, dll.



DAFTAR PUSTAKA

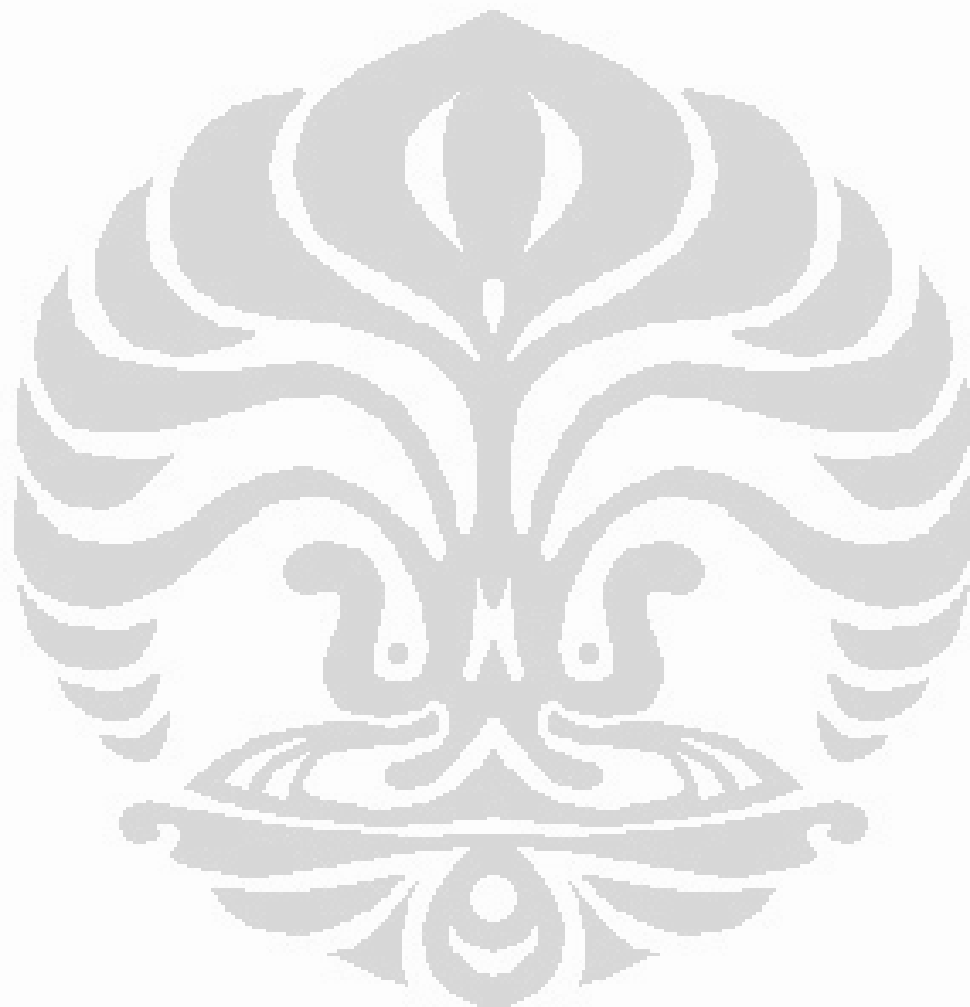
1. **Silverthorn DU.** Human physiology: an integrative approach 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cumming; 2004. p 183-4, p 333-5.
2. **Bear MF, Connors BW, Paradiso MA.** Neuroscience exploring the brain 2nd ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p 421-32.
3. **Scholz J, Woolf CJ.** Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1062-7.
4. **Woolf CJ.** Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 2004; 140: 441-51.
5. **Davis MP, Shaiova LA, Angst MS.** When opioids cause pain. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(28): 4497-8.
6. **Ganong WF.** Review of medical physiology 21st ed. San Francisco: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2003. p 609-10, p 297-9.
7. **Brunton LL, Lazo JS, Parker KL.** Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics 11th ed. San Francisco: McGraw-Hill; 2006.
8. **Kidd BL, Urban LA.** Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia* 2001; 87(1): 3-11.
9. **Woolf CJ, Salter MW.** Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-8.
10. **Zhang X, McNaughton PA.** Why pain gets worse: the mechanism of heat hyperalgesia. *J. Gen Physiol* 2006; 128(5): 491-3.
11. **Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang S-Y, et al.** PKA/AKP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22(11): 4740-5.
12. **Babul N.** Methods for treating pain and compositions for use therefor. USPTO No. 60/462,691. 2004.
13. **Etkin NL, McMillen HL.** The ethnobotany of noni (*Morinda citrifolia* L., Rubiaceae): dwelling in the land between Lā'au Lapa'au and testimonials. *Proceedings of the 2002 Hawai'i Noni Conference* 2003; p 11-16.
14. **McClatchey W.** From polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (rubiaceae). *Integrative cancer therapies* 2002; 1 (2): 110-20.
15. **Wang M-Y, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen S, Palu AK, et al.** *Morinda citrifolia* (noni): a literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 23 (12): 1127-41.
16. **Solomon N.** The noni phenomenon: discover the powerful tropical healer that fights cancer, lower blood pressure and relieves chronic pain. Utah: Direct Souch Publishing; 1998. p 609-10.
17. **Solomon N.** Doctor to doctor: clear answer to your patients' question about noni. Utah: Direct Souch Publishing; 2004. p 15-9.
18. **Deng S, Palu AK, Zhou B-N, Jensen CJ.** Noni as anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acidergic effect. *Phytomedicin*, 2007; 14 (7):517-22.
19. **Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Missilin R, dan Mortier F.** Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med* 1990; 56: 430-4.

20. **Solomon N.** Noni juice: how much, how often, for what 4th ed. Utah; 2006. p 73-7, p 13-8.
21. **Winarti C.** Peluang pengembangan minuman fungsional dari buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L). *Jurnal Litbang Pertanian* 2005; 24 (4): 149-55.
22. **Pelawati R.** Efek neuropotektif piperin terhadap tikus yang diinduksi kejang oleh bikukulin. Tesis, 2008; p.1-3.
23. **Lavich TR, Cordeiro RSB, Silva PMR, Martins MA.** A novel hot plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Med Biol Res* 2005; 38(3): 445-51.
24. **International Association for the Study of Pain.** *Pain* 1993; 1979(6): 249-52.
25. **Julius D, Basbaum AI.** Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 13: 203-9.
26. **Aguggia M.** Neurophysiology of pain. *Neurol Sci*, 2003; 24: 57-60.
27. **Le BD, Gozariu M, Cadden SW.** Animal model of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4): 597-652.
28. **Wilkinson PR.** Neurophysiology of pain: mechanism of pain in the peripheral nervous system. *CPD Anaesthesia* 2003; 3(3): 103-8.
29. **Woolf C, Costigan M.** Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1999; 96: 7723-30.
30. **Treede RD, Magerl W.** Modern concepts of pain and hyperalgesia: beyond the polymodal the C nociceptor. *A Physiol Soc* 1993; 10: 216-28.
31. **Sandkuhler J.** Understanding LTP in pain pathways. *Molecular Pain* 2007; 3(9): 1-9.
32. **Ikeda H, Heinke B, Ruscheweyh R, Sandkuhler J.** Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neuron that mediate hyperalgesia. *Science* 2003; 299: 1237-40.
33. **Bird GC.** Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neuron. *Molecular Pain* 2006; 2(31): 1-12.
34. **Munglani R, Hunst SP.** Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 186-192.
35. **Bach-Rojecky L, Lackovic Z.** Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat Med J* 2005; 46(2): 201-7.
36. **Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D.** Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant PGE2 response in the central nervous system associated with the induction of microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 1-35.
37. **Bhatia M, Sidhapuriwala J, Mochala SM, Moore PK.** Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in rat. *British Journal of Pharmacology* 2005; 145(2): 141-4.
38. **Chaplin M.** Carrageenan. [cited 1 July 2008]. Available at: <http://www.Isbu.ac.uk/water/hycar.html>
39. **European Commission.** Opinion of Scientific Committee on Food on carrageenan. [cited 5 March 2003]. Available at: <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/>

40. **Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi Eri, Sugimoto Y, et al.** Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 2005; 1(3): 1-9.
41. **Hu H-J, Bhawe G, Gereau IV RW.** Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22(17): 7444-52.
42. **Yang D, Gereau IV RW.** Peripheral group II metabotropic glutamate receptors (mGluR2/3) regulate prostaglandin E2-mediated sensitization of capsaicin responses and thermal nociception. *The Journal of Neuroscience*, 2002; 22(15): 6388-93.
43. **Woolf CJ, Samad TA.** Methods for inhibiting pain. USPTO No. 09/708,375. 2002.
44. **Niederberger E, Tegeder I, Vetter G, Schimidtko A, Schmidt H, Euchenhofer C, et al.** Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF κ B. *The FASEB Journal* 2001; 10: 1-23.
45. **Abas AK, Lichtman AH.** Basic immunology: function and disorders of the immune system 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2006. p 282.
46. **Kawasaki Y, Zhang L, Cheung J-K, Ji R-R.** Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct overlapping role of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neuroscience* 2008; 28(20): 5189-94.
47. **Empress Standard Operating Procedure.** Hot plate test. *Empress*, 2007; 1-4.
48. **Panlab.** Hot plate for mouse and rat. *Technology for Bioresearch*, 2005. 1-2
49. **Columbus Instrumen.** Standard protocol for hot plate test, 2002; 1-2
50. **UgoBasile.** Catalogue 2006. *Biological Research Apparatus*, 2006; 1-13.
51. **Belmonte C, Viana F.** Molecular and cellular to somatosensory specificity. *Molecular Pain* 2008; 4(14): 1-17.
52. **Menendez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A.** Unilateral hot-plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience* 2002; 113: 91-7.
53. **Potterat O, Hamburger M.** *Morinda citrifolia* (noni) fruit - phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Med* 2007; 73: 191-9.
54. **Su CX, Jensen CJ, Story SP.** Noni juice on COX-1 and COX-2 and noni juice as a selective COX-2 inhibitor. WO/2002/045734.
55. **Fahuroji F, Kunto R.** Intisari hak paten efek terapeutik jus noni. Jakarta: Pena Salemba; 2009. p 2-12.
56. **European Commission.** Opinion of the scientific committee on food on noni juice. [cited 11 December 2003]. Available at: <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/>
57. **West B, Jensen CJ, Westendorf J, White LD.** A safety review of noni fruit juice. *Journal of Food Science* 2006; 71(8): R100-6.
58. **Deng S, West B, Palu AK, Zhou B-N, Jensen CJ.** Lipooxygenase and cyclooxygenase inhibition. WO 2008/ 067420.
59. **Canborde F, Cloarex A, Gungor T, Teulon J-M.** Pharmaceutical combination with analgesic activity containing an adenosinergic agonist and a compound selected from opiates, benzodiazepines, and NMDA antagonist. WO/99/29347.

60. **Linda W.** Methods for treating pain. USPTO No. 60/480,4886. 2003.
61. **Story SP, Jensen CJ, Palu AK.** Morinda citrifolia enhanced naturaseutical formulation and method for treating and preventing migaine headaches. United Satate Patent Application Ser. No 200301086330. USPTO 2003; p 1-12.
62. **Palu AK, Zhou B-N, West B, Jensen CJ, Strory SP.** Formulation and method for preventing and treating substance abuse and addiction. United Satate Patent Application Ser. No 20070166416. USPTO 2007; p 1-19.
63. **Levine JD.** Method of treating pain using nalbuphine and opioid antagonist. 2001. WO 01/93852
64. **Palu AK, KIM AH, West BJ, Deng S, Jensen CJ, White L.** The effect of Morinda citrifolia L. (noni) on the immune system: its molecular mechanism action. *J Ethnopharmacol*, 2008; 115(3): 502-6
65. **Zhou B-N, Jensen CJ, Asay K, West B, Kreuter M, dan Palu AK.** Morinda citrifolia based composition for treatment of anti-inflammatory diseases through inhibition of COX-1, COX-2, interleukin-1 β , interleukin-6, TNF- α , HLE, and iNOS. International Publication Number WO 2000/076024. PCT 2007; p 1-52.
66. **Heinicke RM.** The xeronine system: a new cellular mechanisms that explains the health promoting action of noni and bromelain. Utah: Direct Souch Publishing; 2001. p 110-12.
67. **Hanafiah KA.** Rancangan penelitian percobaan: teori dan aplikasi, edisi 2. Rajawali Pers, 1976.
68. **Jerome J, Brunson T, Takeoka G, Foster C, Moon HB, Grageda E, et al.** Celebrex offers a small protection from root resorption associated with orthodontic movement. *CDA Journal*, 2005; 35(12):951-9.
69. **McKoy MG, Thomas EA, Simon OR.** Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from Morinda citrifolia L. (noni). *Proc. West Pharmacol Soc*, 2002; 45: 76-8.
70. **Dahlan, SM.** Statistik untuk kedokteran dan kesehatan: deskriptif, bivariat, dan multivariate dilengkapi aplikasi dengan menggunakan SPSS. Jakarta: Salemba Medika, 2008; p 106-20.
71. **Trapp D.** Basic & clinical biostatistics 4th ed. San Fracisco: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2003. p 181-3.
72. **Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martia WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al.** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 2000; 288: 306-13.
73. **Dirig DM, Isakon PC, Yaksh TL.** Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rat. *JPET* 1998; 285(3): 1031-8.
74. **Vasque E, Barl K-J, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible H-G.** Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammatory spinal induced-hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(22):9001-8.
75. **Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakon PC.** Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverse inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *JPET* 1997; 283(3): 1069-75.

76. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T, *et al.* Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *The FASEB Journal* 2001; 15: 1187-200.
77. Borthakur A, Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobachman JK. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cell. *Am J Physiol Gastrointest* 2006; 292: G829-38.



STANDAR PROSEDUR PENGGUNAAN HOT PLATE

1. Tujuan

- 1.1 Uji *hot plate* digunakan untuk meneliti sensitivitas nyeri akut terhadap stimulus suhu.

2. Lingkup Penggunaan

- 2.1 Individu yang telah dilatih, dan kompeten untuk mempraktikkan uji nyeri tersebut harus mengikuti prosedur di bawah ini.
- 2.2 Setiap pertanyaan, komentar atau saran, yang berhubungan dengan SPP ini secara umum atau masalah spesifik mengenai tahapan prosedur tertentu, dapat diajukan kepada Ketua Program Neurosains Behavior.
- 2.3 Setiap deviasi dari protokol ini harus dilaporkan kepada Ketua Program Neurosains Behavior.

3. Syarat-Syarat Keamanan

- 3.1 Prosedur umum laboratorium harus diikuti, diantaranya: tidak makan, tidak mengunyah premen, tidak minum, dan tidak memakai kosmetik di area kerja. Jas laboratorium dan sarung tangan harus dipakai selama ada di area kerja, kecuali protokol spesifik yang harus mengenakan pakaian tertentu.

4. Catatan

- 4.1 Validitas hasil yang didapatkan dari penelitian *behavior* sangat bergantung pada metode perlakuan terhadap hewan. Hal penting yang harus diikuti dalam prosedur ini adalah menyadari dan mengutamakan kesejahteraan hewan.
- 4.2 Mayoritas penelitian *behavior* pada tikus bergantung pada usia, jenis kelamin, dan galur. Hal penting yang harus dipenuhi adalah menyeragamkan parameter tersebut untuk satu tujuan percobaan.
- 4.3 Faktor lingkungan dapat berkontribusi terhadap tingkat kecemasan yang dialami tikus. Temperatur, kelembaban, intensitas kebisingan, dan intensitas pencahayaan harus diatur pada tingkat yang dapat ditolerir oleh tikus. Hal penting yang harus dilakukan adalah mempersiapkan lingkungan yang seragam sebelum dan sesudah pengujian untuk menghindari anomali hasil penelitian.

5. Alat

- 5.1 *Hot plate* menggunakan elemen pemanas air untuk menaikkan suhu lempeng aluminium (panjang 20cm dan lebar 20cm).
- 5.2 Sangkar tembus pandang untuk mengamati *behavior* tikus terbuat dari akrilik berbentuk kotak (tinggi 15 cm dan lebar 20 cm).

6. Perlengkapan

6.1 Kap air, etanol 70%

6.2 *Tissue*

6.3 *Stopwatch*

7. Prosedur

7.1 Kerangka Umum

7.1.1 Tikus hanya diperlakukan untuk sekali pengujian selama ditempatkan ke dalam kotak akrilik pada suhu sekitar 52°C dan masa laten reaksi pertama (menjilat, menggeliat, loncat) dicatat (waktu penghentian setiap uji selitar 30 detik).

7.2 Pemindahan dan Aklimatisasi

7.2.1 Hewan coba dipindahkan ke ruang pengujian masih dalam sangkarnya (bagaimanapun caranya) dan dikondisikan minimal 15 menit sebelum pengujian (dengan asumsi kondisi ruang pengujian sudah sama dengan fasilitas istirahat –jika belum, biarkan teraklimatisasi selama 1 jam).

7.2.2 Iluminasi ruangan pengujian sekitar 100-130 Lux setinggi bangku. Hal yang harus diperhatikan adalah memberi label pada tikus. Jika hewan coba akan diperlakukan untuk pengamatan beavior lainnya, label harus selalu dicek pada sesi pengujian.

7.3 Pengujian

7.3.1 Kertas kerja harus disiapkan terlebih dahulu dengan mencantumkan hari pengujian, judul penelitian, daftar hewan coba dan parameter stimulus suhu.

7.3.2 Sambungkan arus ke elemen *hot plate* dan tunggu hingga lempeng aluminium mencapai suhu tertentu (52°C, jika perlu disesuaikan).

7.3.3 Bersihkan permukaan lempeng aluminium dan akrilik memakai disinfektan (misal etanol 70%).Tunggu 1 menit untuk menstabilkan suhu permukaan sebelum memulai pengujian.

7.3.4 Simpan tikus pertama ke atas lempeng aluminium dan secara simultan aktifkan *stopwatch* untuk mengukur masa laten menghindar.

7.3.5 Matikan stopwatch setelah tikus memperlihatkan reaksi tertentu terhadap suhu (tunggai penggeliat, menjilat atau loncat). Jika tikus tidak bereaksi setelah dipanaskan selama 30 detik, angkat tikus dari *hot plate* dan anggap 30 detik sebagai masa latennya.

7.3.6 Catatan hasil pengamatan pada kertas kerja untuk bahan analisis data

7.3.7 Lempeng pemanas dan dan kotak sangkar harus dibersihkan dengan air atau disinfktan (misal etanol 70%) sebelum pengujian hewan coban selanjutnya, tunggu 1 menit untuk menyesuaikan kembali suhu permukaan lempeng.

8. Parameter dan Prosedur

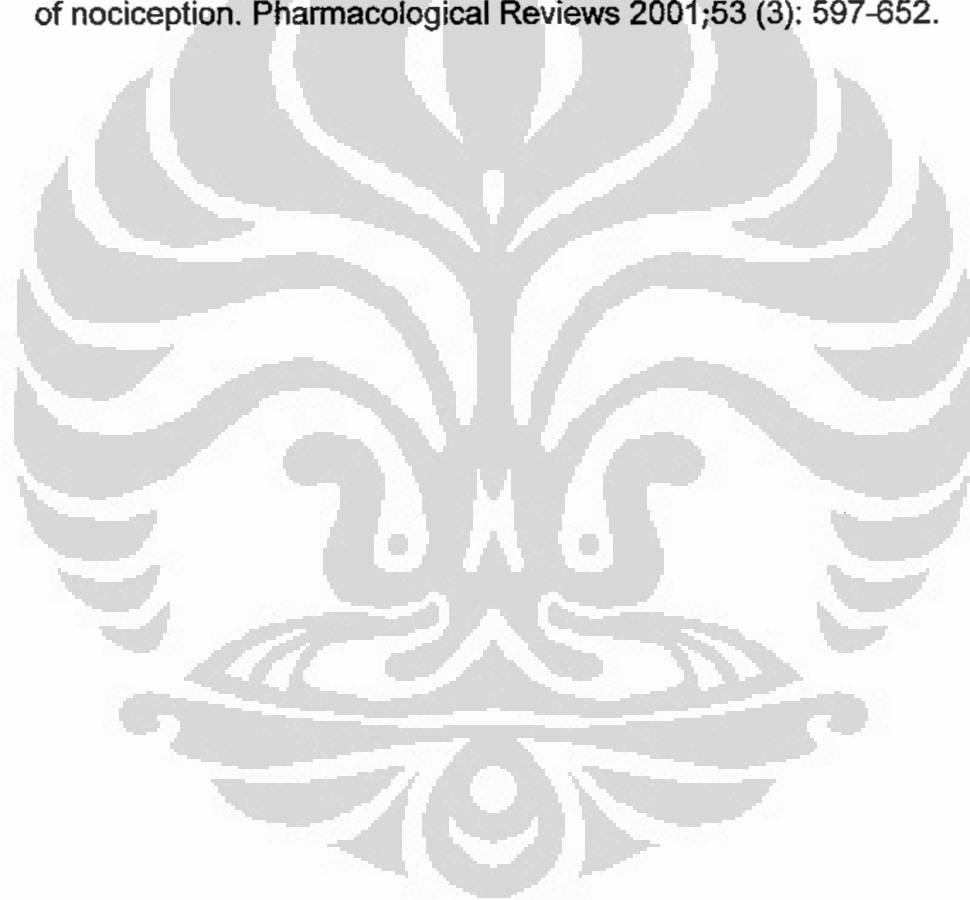
8.1 Waktu respon pertama (detik)

8.2 Tipe respon (menggeliat, menjilat, loncat)

8.3 Komentar untuk *behavior* lainnya

9. Informasi Penunjang

- 9.1 Wilson S.G. dan Mogil J.S. Measuring pain in the knockout mouse: big challenges in small mammals. *Behav Brain Res* 2001; 125: 67-7.
- 9.2 Hunskar Steinar dan Berge Odd-Geir. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. Elsevier Science 1986.
- 9.3 Menendez Luis et al. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive methode for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. Elsevier Science 2002.
- 9.4 Lavich T.R. et al. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic and non-opioid analgesics. *Braz J Med Biol Res* 2005;38 (3): 445-51.
- 9.5 Le Bars Daniel, Gazariu Manuela, dan Cadden Samuel W. Animal model of nociception. *Pharmacological Reviews* 2001;53 (3): 597-652.



HASIL PENGAMATAN (1)

Respon Hiperalgnesia Termal Tikus dalam Uji Nyeri *Hot Plate Test*

KELOMPOK 1 (Kontrol Uji <i>Hot Plate</i>)					
Hewan Coba	Pengamatan Uji <i>Hot Plate</i>	Tahapan Respon Hiperalgnesia (detik)			
		Menit ke-15	Menit ke-60	Menit ke-180	Menit ke-300
Tikus ke-1 219 gr	Tungkai kiri	10,65	11,87	11,82	07,70
	Tungkai kanan	12,62	15,12	09,81	09,23
Δ Laten (waktu reaksi)		01,97	03,25	02,01	01,53
Tikus ke-2 220 gr	Tungkai kiri	09,83	17,22	14,37	08,24
	Tungkai kanan	12,05	19,77	13,01	10,43
Δ Laten (waktu reaksi)		02,22	02,55	01,36	02,19
Tikus ke-3 228 gr	Tungkai kiri	06,64	10,10	08,37	06,13
	Tungkai kanan	08,67	06,55	09,84	07,41
Δ Laten (waktu reaksi)		02,03	03,55	01,47	01,28
Tikus ke-4 224 gr	Tungkai kiri	10,59	06,43	09,17	07,06
	Tungkai kanan	08,37	07,58	07,07	09,07
Δ Laten (waktu reaksi)		02,22	01,15	02,10	02,10
Tikus ke-5 216 gr	Tungkai kiri	15,82	11,95	11,95	12,08
	Tungkai kanan	14,30	13,48	09,73	10,87
Δ Laten (waktu reaksi)		01,52	01,53	02,22	01,21
Rerata Δ laten (waktu reaksi)		$X_1 = 01,99$	$X_2 = 02,40$	$X_3 = 01,83$	$X_4 = 01,66$

KELOMPOK 2 (NaCl 0,9% 1 mL/200 gr BB po, Injeksi Carrageenan 2% ipl 150 μ L)					
Hewan Coba	Pengamatan Uji <i>Hot Plate</i>	Tahapan Respon Hiperalgnesia (detik)			
		Menit ke-15	Menit ke-60	Menit ke-180	Menit ke-300
Tikus ke-6 200 gr	Tungkai kiri	08,31	06,42	07,58	04,92
	Tungkai kanan	12,43	13,86	11,86	08,80
Δ Laten (waktu reaksi)		05,12	07,44	04,28	03,88
Tikus ke-7 202 gr	Tungkai kiri	07,53	09,45	09,50	08,30
	Tungkai kanan	12,46	16,04	12,52	10,47
Δ Laten (waktu reaksi)		04,93	06,59	03,02	02,17
Tikus ke-8 220 gr	Tungkai kiri	05,33	04,92	05,53	04,78
	Tungkai kanan	09,87	10,77	09,48	08,60
Δ Laten (waktu reaksi)		04,54	05,85	03,95	03,82
Tikus ke-9 230 gr	Tungkai kiri	07,27	07,63	09,46	08,02
	Tungkai kanan	11,56	16,35	14,34	10,95
Δ Laten (waktu reaksi)		04,29	08,92	04,88	02,93
Tikus ke-10 224 gr	Tungkai kiri	06,04	04,84	06,97	10,89
	Tungkai kanan	11,40	13,23	09,75	12,93
Δ Laten (waktu reaksi)		05,36	08,39	02,78	02,04
Rerata Δ laten (waktu reaksi)		$X_1 = 04,85$	$X_2 = 07,43$	$X_3 = 03,78$	$X_4 = 02,97$

HASIL PENGAMATAN (2)

Respon Hiperalgnesia Termal Tikus dalam Uji Nyeri *Hot Plate Test*

KELOMPOK 3					
(Standar Celecoxib 50 mg/kg BB po, Injeksi Carrageenan 2% ipl 150 µL)					
Hewan Coba	Pengamatan Uji <i>Hot Plate</i>	Tahapan Respon Hiperalgnesia (detik)			
		Menit ke-15	Menit ke-60	Menit ke-180	Menit ke-300
Tikus ke-11 213 gr	Tungkai kiri	04,85	05,29	06,45	06,72
	Tungkai kanan	07,90	08,54	08,82	08,67
Δ Laten (waktu reaksi)		03,05	03,25	02,37	01,95
Tikus ke-12 227 gr	Tungkai kiri	05,93	05,80	04,14	06,02
	Tungkai kanan	09,02	10,17	06,67	07,89
Δ Laten (waktu reaksi)		03,09	04,37	02,53	01,87
Tikus ke-13 230 gr	Tungkai kiri	07,02	06,12	06,09	07,06
	Tungkai kanan	10,38	10,28	08,26	09,46
Δ Laten (waktu reaksi)		03,36	04,16	02,17	02,40
Tikus ke-14 208 gr	Tungkai kiri	04,16	05,85	05,95	07,12
	Tungkai kanan	07,33	10,86	08,06	08,31
Δ Laten (waktu reaksi)		03,17	05,01	02,11	01,93
Tikus ke-15 204 gr	Tungkai kiri	08,00	09,53	07,58	07,13
	Tungkai kanan	11,30	13,74	10,27	09,10
Δ Laten (waktu reaksi)		03,30	04,21	02,69	01,97
Rerata Δ laten (waktu reaksi)		X₁ = 03,19	X₂ = 04,20	X₃ = 02,37	X₄ = 02,02

KELOMPOK 4 (1 hari)					
(Formula <i>Morinda citrifolia</i> L. 1 mL/200 gr BB po, Injeksi Carrageenan 2% ipl)					
Hewan Coba	Pengamatan Uji <i>Hot Plate</i>	Tahapan Respon Hiperalgnesia (detik)			
		Menit ke-15	Menit ke-60	Menit ke-180	Menit ke-300
Tikus ke-16 224 gr	Tungkai kiri	08,98	07,29	06,79	07,85
	Tungkai kanan	12,49	11,79	10,07	10,44
Δ Laten (waktu reaksi)		03,51	04,50	03,28	02,59
Tikus ke-17 214 gr	Tungkai kiri	06,56	07,22	11,37	09,61
	Tungkai kanan	09,40	11,13	13,04	11,40
Δ Laten (waktu reaksi)		02,84	03,91	02,67	01,79
Tikus ke-18 205 gr	Tungkai kiri	06,48	04,57	12,50	17,60
	Tungkai kanan	09,78	09,48	14,54	19,22
Δ Laten (waktu reaksi)		03,30	04,91	02,04	01,62
Tikus ke-19 229 gr	Tungkai kiri	04,50	04,98	05,10	06,15
	Tungkai kanan	06,62	08,64	06,93	08,18
Δ Laten (waktu reaksi)		02,12	03,66	01,83	02,03
Tikus ke-20 220 gr	Tungkai kiri	07,59	07,24	07,92	08,47
	Tungkai kanan	10,48	10,70	10,29	10,05
Δ Laten (waktu reaksi)		02,89	03,46	02,37	01,58
Rerata Δ laten (waktu reaksi)		X₁ = 02,93	X₂ = 04,09	X₃ = 02,43	X₄ = 01,92

HASIL PENGAMATAN (3)

Respon Hiperalgnesia Termal Tikus dalam Uji Nyeri *Hot Plate Test*

KELOMPOK 5 (10 hari)					
(Formula <i>Morinda citrifolia</i> L. 1 mL/200 gr BB po, Injeksi Carrageenan 2% ipl)					
Hewan Coba	Pengamatan Uji <i>Hot Plate</i>	Tahapan Respon Hiperalgnesia (detik)			
		Menit ke-15	Menit ke-60	Menit ke-180	Menit ke-300
Tikus ke-11 210 gr	Tungkai kiri	04,94	04,92	08,75	07,63
	Tungkai kanan	07,39	09,24	10,48	09,50
Δ Laten (waktu reaksi)		02,45	04,32	02,13	01,87
Tikus ke-12 216 gr	Tungkai kiri	08,13	08,05	08,09	09,02
	Tungkai kanan	10,84	11,72	09,84	10,94
Δ Laten (waktu reaksi)		02,71	03,67	01,75	01,92
Tikus ke-13 200 gr	Tungkai kiri	05,21	08,38	10,13	10,87
	Tungkai kanan	08,43	12,69	12,31	12,96
Δ Laten (waktu reaksi)		03,22	04,31	02,18	02,09
Tikus ke-14 220 gr	Tungkai kiri	05,15	04,97	07,14	08,28
	Tungkai kanan	08,74	08,67	09,28	10,11
Δ Laten (waktu reaksi)		03,59	03,70	02,14	01,83
Tikus ke-15 225 gr	Tungkai kiri	06,61	05,91	07,15	08,36
	Tungkai kanan	08,83	09,87	09,06	10,35
Δ Laten (waktu reaksi)		02,22	03,96	01,91	01,99
Rerata Δ laten (waktu reaksi)		X₁ = 02,84	X₂ = 03,96	X₃ = 02,02	X₄ = 01,94

Efek Antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. dengan Model Nyeri Inflamasi pada Tikus yang Diinduksi *Carrageenan*

Fikri Fahrurroji

Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

ABSTRAK

Salah satu mekanisme nyeri inflamasi adalah sensitisasi perifer yang dimediasi oleh prostaglandin E₂ (PGE₂) di terminal nosiseptor perifer. Konsekuensi sensitisasi adalah hiperalgesia yang menandai modulasi berbagai reseptor dan kanal ion nyeri. Hiperalgesia dapat diatasi oleh agen antinosiseptif inhibitor siklooksigenase 2 (COX-2) selektif. Dalam hal ini, *Morinda citrifolia* L. sebagai etnomedika tropis dilaporkan mampu menghambat aktivitas enzimatis COX-2 secara selektif sehingga sangat potensial untuk mengatasi hiperalgesia. Penelitian ini telah membuktikan bahwa efek antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal dengan model nyeri inflamasi pada hewan coba yang diinduksi *carrageenan* sesuai metode *modified hot plate* (MHP). Parameter yang diteliti adalah beda laten reaksi menghindar antara telapak tungkai yang diinjeksi *carrageenan* secara intraplantar dengan telapak tungkai kontralateral. Nilai beda laten ditentukan pada tahapan respon hiperalgesia menit ke-15, ke-60, ke-180, dan ke-300 setelah diinduksi nyeri inflamasi. Hasilnya diperoleh penurunan rerata beda laten pada tikus yang diberi minum *Morinda citrifolia* L. sebelum diinjeksi *carrageenan* secara bermakna dibandingkan rerata beda masa laten tikus yang diberi minum salin. Nilai tersebut juga tidak signifikan perbedaannya dengan rerata beda laten pada tikus yang diobati *celecoxib* maupun tikus yang diberi minum *Morinda citrifolia* L. selama 10 hari. Dengan demikian, efek antinosiseptif *Morinda citrifolia* L. terbukti dapat menghambat respon hiperalgesia termal dengan pola beda laten mirip efek *celecoxib*, dan efek diet *Morinda citrifolia* L. secara teratur tidak mempengaruhi penurunan beda laten tersebut.

Kata kunci: *Morinda citrifolia* L.; nosiseptif; COX-2; sensitisasi; hiperalgesia

PENDAHULUAN

Salah satu mekanisme neurofisiologi yang berhubungan dengan nyeri kronis adalah hiperalgesia atau secara molekuler dikategorikan sensitisasi dan plastisitas sinaps. Umumnya hiperalgesia ditandai penurunan ambang nyeri, sehingga intensitas nyeri meningkat atau terkadang disertai nyeri spontan.¹ Penurunan ambang nyeri merupakan proses kompleks yang melibatkan aneka protein seperti mediator, reseptor, kanal ion, atau transduser sinyal di nosiseptor. Kondisi patologis tertentu mungkin dapat menginduksi peningkatan ekspresi gen

yang mempengaruhi fungsi kerja aneka protein tersebut. Respon hiperalgesia terjadi bila modifikasi pascatranslasi dan perubahan transkripsi berhasil menurunkan ambang nyeri atau meningkatkan eksitabilitas membran nosiseptor.²

Dewasa ini target molekuler penyembuhan hiperalgesia terus dikembangkan untuk meningkatkan kualitas manajemen nyeri inflamasi atau nyeri neuropatik. Hiperalgesia yang dominan merupakan manifestasi penyakit-penyakit kronis seperti kanker, artritis, disme-

norhea, dan trauma jaringan saraf.³ Bahkan disinyalir inefisiensi aplikasi opioid dalam kasus-kasus nyeri kronis, justru memicu hiperalgesia yang disebut fenomena hiperalgesia yang diinduksi opioid (*opioid-induced-hyperalgesia*, OIH).⁴ Berdasarkan patofisiologinya, nyeri dalam kasus-kasus tersebut melibatkan aneka biomolekul yang berhubungan dengan mekanisme hiperalgesia. Oleh karena itu, terdapat banyak target molekul yang harus diidentifikasi bila akan mengaplikasikan suatu agen antinosiseptif. Manajemen nyeri saat ini tidak cukup hanya menargetkan penghilangan gejala umum nyeri, tanpa merevitalisasi mekanisme neurobiologi nyeri.^{2,3} Artinya, perlu diteliti signifikansi interaksi antara agen antinosiseptif yang akan diaplikasikan dengan target molekul yang terlibat dalam mekanisme hiperalgesia.

Salah satu target molekuler agen antinosiseptif atau analgesik adalah enzim siklo-oksigenase-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2) yang menyebabkan peningkatan produksi prostanoïd. Dalam konteks hiperalgesia, prostanoïd merupakan salah satu mediator yang dapat menginduksi sensitisasi atau plastisitas, terutama pada kasus-kasus nyeri inflamasi.^{3,5,6}

Peningkatan sintesis prostaglandin akan memodulasi kanal ion atau reseptor di nosiseptor melalui jalur adenosin monofosfat-protein kinase A/protein kinase C (*cAMP-PKA/PKC-dependent*), sehingga ambang nyeri tereduksi.⁶

⁸ Salah satu agen antinosiseptif yang akan diteliti adalah *Morinda citrifolia* L. (selanjutnya ditulis *Morinda*) atau di Indonesia dinamai buah mengkudu, sedangkan di Kepulauan Pa-

sifik disebut buah noni.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian *in vitro* sebelumnya telah diidentifikasi bahwa *Morinda* memiliki efek terapeutik sebagai inhibitor COX-2 selektif yang setara dengan kapasitas inhibisi *celecoxib* (obat inhibitor selektif COX-2).^{9,10} Penelitian tersebut sinergis dengan laporan penelitian yang menyatakan bahwa sejak dulu buah *Morinda* dianggap memiliki aktivitas analgesik dan sedatif.^{9,11} *Morinda* juga dilaporkan signifikan sebagai analgesik sentral dalam uji nyeri *writhing test* dan *hot plate test* dengan obat pembanding nalokson, tanpa beresiko adiksi serta tidak memicu efek samping.^{9,12,13}

MATERIAL DAN METODE

Hewan Coba

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague-Dawley* (SD) jantan dengan berat badan 180-230 gram, usia 3-4 bulan. Tikus tersebut diperoleh dari Pusat Litbang Pemberantasan Penyakit Depkes RI. Sekitar 1 bulan semua tikus dipelihara di *Animal House* FK UI sampai berat badannya sesuai standar penelitian uji nyeri. Hewan coba ditempatkan di dalam kandang tersendiri, dengan standar temperatur laboratorium, siklus gelap terang yang terkontrol, dan selalu diaklimatisasi sebelum dilibatkan dalam percobaan. Selama pemeliharaan, hewan coba tersebut diberi makanan pelet dan air minum standar *Animal House* FK UI.

Pengobatan

Sebanyak 25 ekor tikus dibagi menjadi

lima kelompok dengan perlakuan yang berbeda, yaitu: (1) kelompok kontrol tanpa perlakuan (tidak diberi obat apapun) sebagai standar respon tikus terhadap stimulus panas W-MHP, (2) kelompok plasebo hanya diberi larutan NaCl 0,9% (5 mL/kg BB, p.o),¹⁴ (3) kelompok standar yang diobati dengan *celecoxib* (*celebrex*, 50 mg/kg BB, p.o),¹⁵ (4) kelompok yang diberi minum formula cair *Morinda* (POM TI 054617361) (5 mL/kg BB, p.o) hanya sekali sebelum diinjeksi *carrageenan*, dan (5) kelompok yang diberi minum formula cair *Morinda* (POM TI 054617361) (5 mL/kg BB, p.o) secara rutin sekali dalam sehari selama 10 hari.^{9,16}

Stimulus dan Perlakuan

Carrageenan 2 % (150 μ L) diinjeksikan secara intraplantar pada telapak tungkai belakang kiri tikus memakai spuit 26-Gauge. Sedangkan telapak tungkai belakang kanan tikus diinjeksi NaCl 0,9% steril (150 μ L) dengan cara yang sama memakai spuit yang berbeda. Khusus untuk tikus kelompok kontrol sama sekali tidak diinjeksi *carrageenan* maupun salin. Satu jam sebelumnya semua tikus diberi pengobatan sesuai ketentuan kelompok masing-masing dengan cara diminumkan memakai sonde yang berbeda. *Carrageenan* dipesan dari SIGMA, *celecoxib* dari apotek, dan *Morinda* dari agen khusus dan legal. *Carrageenan* dilarutkan terlebih dulu di dalam salin steril, *celecoxib* dilarutkan di dalam akuades, sedangkan *Morinda* langsung diminumkan pada tikus. Semua larutan atau obat dipersiapkan sebelumnya sesegera mungkin memakai

memakai *test tube* dan toples yang telah disterilkan.

Uji Nyeri MHP

Percobaan dilakukan dalam kondisi ruangan yang relatif sunyi dan ber-AC ($\pm 24^{\circ}\text{C}$). Satu persatu hewan coba diletakkan di atas lempeng pemanas *water-modified hot plate* (W-MHP) dengan temperatur stabil $51 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pemaparan terhadap panas dilakukan sampai terjadi reaksi menghindar tungkai belakang tikus. Masa laten respon menghindar untuk setiap tungkai belakang tikus diukur pada menit ke-15, ke-60, ke-180, dan ke-300 setelah diinjeksi *carrageenan*. Sumber stimulus panas dipertahankan dalam intensitas yang konstan, sehingga diperkirakan dapat menghasilkan masa laten menghindar sekitar 7 – 14 detik pada tungkai yang diinjeksi salin. Hewan coba hanya diuji dalam satu rangkaian percobaan dengan ketentuan respon tipikal berupa menjilati tungkai. Masa laten setiap respon dicatat memakai *stop watch* digital dan *timer* rekaman *webcam*. Waktu pemaparan terhadap lempeng pemanas W-MHP (*cut off time*) maksimal selama 20 detik. Hiperalgnesia termal didefinisikan sebagai masa laten menghindar yang ditentukan dengan rumus: Δ laten menghindar tungkai (s) = masa laten menghindar tungkai kiri - masa laten menghindar tungkai kiri.¹⁴

Analisis Statistik

Hasil pengukuran akan direpresentasikan sebagai nilai rerata \pm S.E.M. Signifikansi statistik ditentukan dengan memakai uji *Repeated Anova*.^{17,18} Nilai $P < 0,05$ dinilai signifikan secara statistik. Pengolahan data

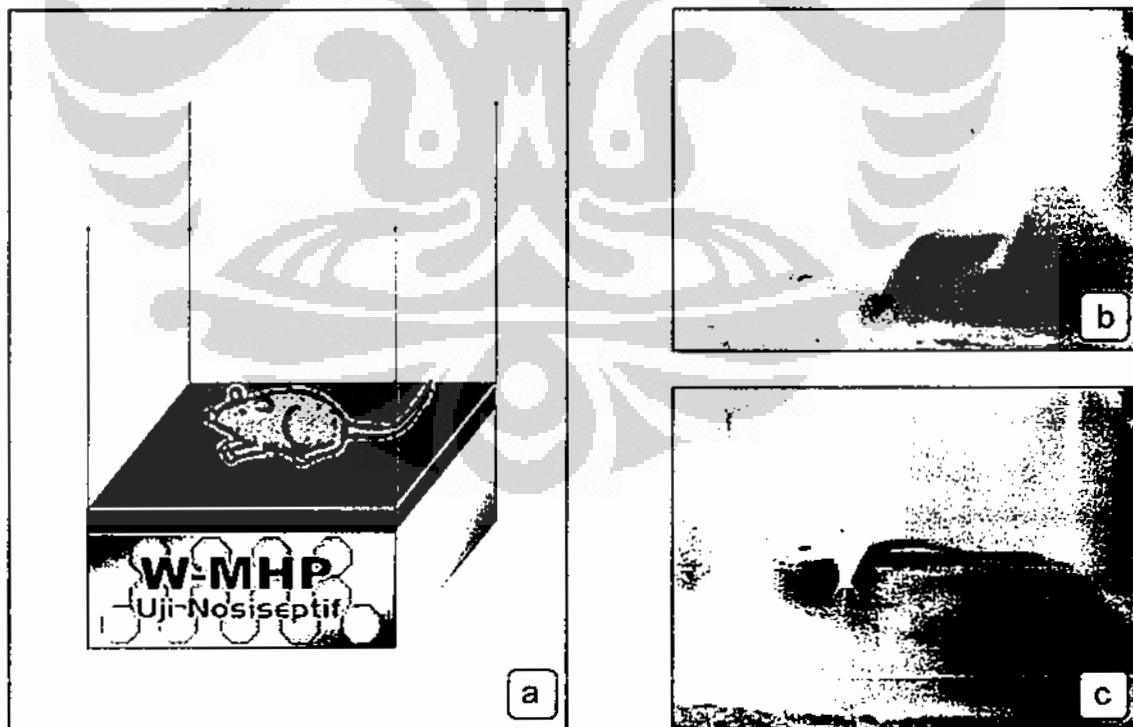
menggunakan program komputer SPSS 17.

HASIL

Penelitian efek antinosiseptif *Morinda* telah dilakukan di Laboratorium Faal FK UI selama kurun waktu Agustus 2008 s.d Januari 2009. Aktivitas penelitian mencakup pengukuran masa laten reaksi menghindar tungkai dengan metode MHP, terhadap 25 ekor tikus yang diinduksi nyeri inflamasi memakai *carrageenan*. Proses pengamatan respon hiperalgesia pada setiap tikus difokuskan pada reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang seperti tampak dalam Gambar 1b-c. Nilai rerata beda laten pada setiap tahap pengamatan respon hiperalgesia dijadikan bahan analisis statistik.

Efek Antinosiseptif *Morinda* terhadap Tikus yang Diinduksi Nyeri Inflamasi Menggunakan *Carrageenan* dengan Uji Nyeri *Hot Plate Test*

Grafik perbandingan beda laten untuk setiap tahapan respon hiperalgesia diantara kelima kelompok tikus diperlihatkan dalam Gambar 2. Pengamatan terhadap kelompok 2 (salin) memperlihatkan pengaruh injeksi *carrageenan* pada telapak tungkai kiri belakang tikus secara *ipl* menyebabkan berkurangnya masa laten (lebih cepat) respon menghindar tungkai terhadap stimulus panas, dibandingkan yang terjadi pada tungkai kanan yang diinjeksi dengan salin. Nilai beda laten yang merepresentasikan peningkatan respon hiperal-

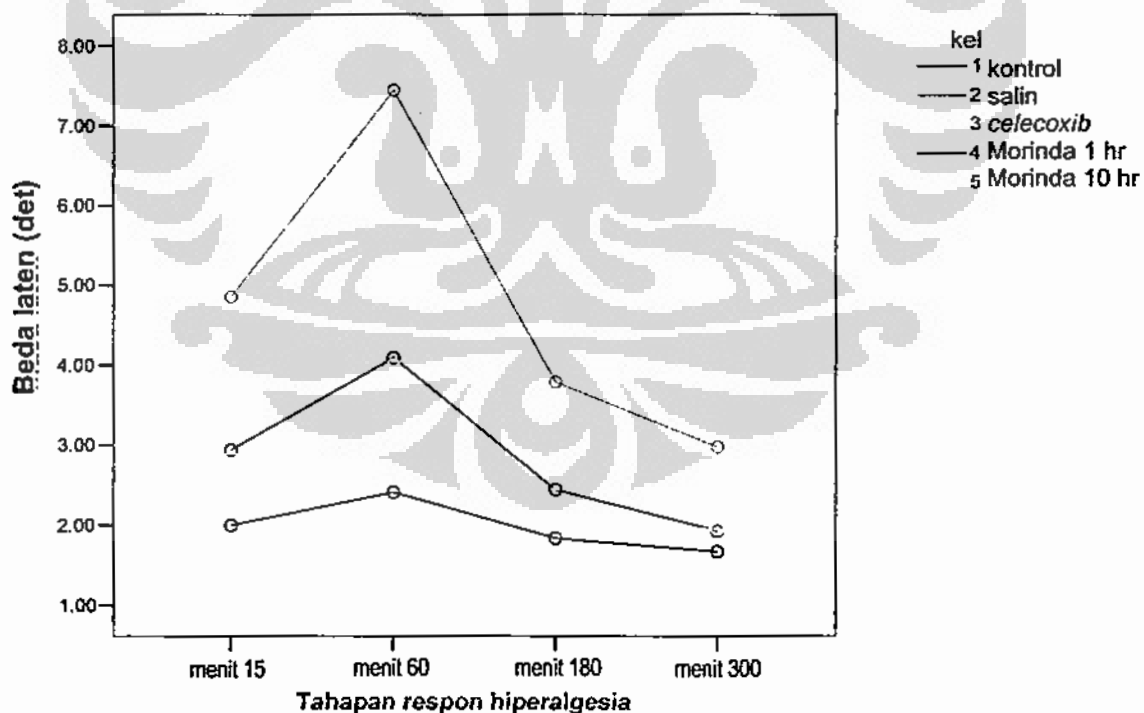


Gambar 1. Pengamatan respon hiperalgesia tikus dengan uji nyeri *hot plate test*. (a) Sketsa penempatan tikus di atas lempeng pemanas W-MHP, tampak dari depan kotak akrilik; (b) Rekaman posisi tungkai tikus ketika pertama kali ditempatkan di atas lempeng pemanas; (c) Rekaman reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang tikus sesaat setelah ditempatkan di atas lempeng pemanas.

hiperalgesia termal terjadi mulai menit ke-15 hingga menit ke-60 setelah injeksi *carrageenan*. Secara umum beda laten tampak signifikan mulai menit ke-15 hingga menit ke-300 setelah diinjeksi *carrageenan* dibandingkan dengan nilai beda laten pada tikus yang tidak diinjeksi *carrageenan* (kelompok 1, kontrol). Sementara itu, pemaparan tungkai tikus terhadap stimulus panas dalam uji nyeri *hot plate test* secara berulang selama 5 jam pertama tahapan respon hiperalgesia tidak memperlihatkan peningkatan beda laten yang signifikan pada tikus kelompok kontrol.

Hasil analisis aktivitas antinosiseptif memperlihatkan penurunan respon hiperalgesia pada tikus yang diberi minum *Morinda* 1 hari

sebelum diinjeksi *carrageenan* dibandingkan tikus yang diberi salin. Beda laten kelompok *Morinda* signifikan lebih kecil ($P < 0,05$) dibandingkan beda laten kelompok salin yang mencapai 3 hingga 7 detik. Dalam hal ini, efek antinosiseptif *Morinda* sudah bekerja sejak 15 menit pertama setelah diinjeksi *carrageenan* hingga berakhir fase awal inflamasi, sebab tidak ditemukan penurunan ambang atau peningkatan beda laten yang signifikan. Oleh karena itu, pengamatan respon hiperalgesia termal pada kelompok *Morinda* tidak seakut kelompok salin yang tampak tersensitisasi dalam uji nyeri *hot plate test*.



Gambar 2. Respon hiperalgesia termal antara kelima kelompok tikus direpresentasikan oleh beda laten reaksi menghindari tungkai dalam uji nyeri *hot plate test*. Hiperalgesia akibat injeksi *carrageenan* (menit nol) pada setiap kelompok dibandingkan dengan kelompok 1 (kontrol). Sedangkan efek antinosiseptif kelompok 3 (*celecoxib*), kelompok 4 (*Morinda* 1 hari), dan kelompok 5 (*Morinda* 10 hari) dibandingkan dengan kelompok 2 (salin). Nilai beda laten merupakan rerata yang dipakai dalam uji *Repeated Anova*.

Perbandingan Efek Antinosiseptif *Celecoxib* dan *Morinda* diperlihatkan oleh Penurunan Respon Hiperlagesia pada Tikus yang Diinjeksi *Carrageenan* dengan Uji Nyeri *Hot Plate Test*

Gambar 2 juga memperlihatkan perbandingan respon hiperalgesia antara tikus kelompok 3 yang diobati *celecoxib* dengan tikus kelompok 4 yang diberi minum *Morinda* sebelum diinjeksi *carrageenan* pada tungkai kiri belakang tikus secara *ipl*. Beda laten tikus kelompok 3 (*celecoxib*) tidak berbeda secara bermakna ($P>0,05$) dibandingkan kelompok 4 (*Morinda* 1 hari), yaitu selisihnya kurang dari 1 detik. Baik efek antinosiseptif *celecoxib* maupun *Morinda*, sama-sama sudah bekerja pada menit ke-15 untuk menginhibisi sensitivasi nyeri akibat aktivitas enzimatik COX mengkatalisasi produksi prostanoïd.

Beda laten reaksi menghindar tungkai tikus pada setiap tahapan uji nyeri *hot plate test* masih dalam rentang normal nosiseptif, kecuali pada menit ke-15 dan ke-60 yang mengalami penurunan beda laten mencapai 4 detik. Namun secara umum, kedua kelompok tidak mengalami respon hiperalgesia selama 5 jam uji nyeri *hot plate test* secara berulang. Dengan demikian, aplikasi *Morinda* dalam dosis 5 mL/kg BB tikus sudah cukup efektif mencegah hiperalgesia termal, bahkan nilai beda latennya hampir setara dibandingkan kelompok *celecoxib*.

Perbandingan Aktivitas Antinosiseptif *Morinda* yang Diminumkan Sehari dengan Diet *Morinda* Selama Sepuluh Hari sebelum

Injeksi *Carrageenan* dengan Uji Nyeri *Hot Plate Test*

Gambar 2 juga memperlihatkan perbandingan aktivitas antinosiseptif antara tikus kelompok 4 yang diberi minum *Morinda* sekali dengan tikus kelompok 5 yang diet *Morinda* selama 10 hari sebelum diinjeksi *carrageenan* pada tungkai kiri belakang secara *ipl*. Beda laten antara kedua kelompok hanya berbeda pada menit ke-180, tetapi selisihnya kurang dari 0,5 detik. Selisih beda laten tersebut tidak signifikan secara statistik ($P>0,05$). Artinya, efektivitas diet *Morinda* 10 hari tidak memperlihatkan antinosiseptif yang lebih kuat untuk mengatasi hiperalgesia termal dibandingkan dengan konsumsi *Morinda* sewaktu.

Aktivitas antinosiseptif *Morinda* pada kedua kelompok tikus juga sudah terjadi sejak menit ke-15 uji nyeri *hot plate test*, dan bertahan selama fase awal inflamasi (5 jam pertama setelah injeksi *carrageenan*). Durasi aktivitas antinosiseptif tersebut mungkin berhubungan dengan farmakokinetik *Morinda* yang bekerja optimal selama 4 jam pertama setelah diminumkan. Namun, komponen antinosiseptif *Morinda* yang diminumkan pada kedua kelompok tikus sebelum injeksi *carrageenan* sudah cukup maksimal menginhibisi aktivitas enzimatik COX-2 pada jaringan yang mengalami nyeri inflamasi, sehingga dipastikan tidak terjadi sensitivasi nyeri yang ditandai respon hiperalgesia termal.

PEMBAHASAN

Penelitian ini telah mengkonfirmasi po-
Efek antinosiseptif ..., Fikri Fahuroji, FKUI, 2009

tensi antinosiseptif *Morinda* dengan model nyeri inflamasi pada tikus yang diinjeksi *carrageenan*. Caranya ialah dengan mengukur masa laten reaksi menghindar tungkai tikus tersebut melalui uji nyeri *hot plate test* yang merepresentasikan efek antinosiseptif *Morinda* guna mengatasi hiperalgnesia termal, dan hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa *Morinda* dan *celecoxib* sama-sama signifikan menurunkan respon hiperalgnesia termal pada tikus tersebut. Secara *in vitro*, *Morinda* dilaporkan signifikan menghambat aktivitas enzimatis COX-2. Hal ini dapat memperkuat dugaan mekanisme antinosiseptif *Morinda* melalui jalur inhibisi COX-2 selektif. Selain itu, *Morinda* dalam dosis 5 mL/kg BB tikus sudah cukup efektif menghambat sensitisasi perifer dengan parameter reaksi menghindar tungkai, seperti halnya efek analgesik *celecoxib* dalam dosis 50 mg/kg BB tikus. Sedangkan diet *Morinda* selama 10 hari pada tikus tersebut tidak memperkecil beda laten atau reaksi nosifensif yang signifikan bila dibandingkan dengan tikus yang hanya sekali diberi *Morinda* sebelum diinjeksi *carrageenan*.

Pemilihan hewan coba telah dilakukan secara acak terhadap tikus yang memenuhi kriteria sampel. Reaksi menghindar tungkai (masa laten) semua tikus tercatat tidak melewati *cut off time* (20 detik), atau relatif normal bila dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Akan tetapi, hasil pencatatan masa laten dalam percobaan uji nyeri *hot plate test* ini masih memperlihatkan perbedaan variabilitas. Hal ini terjadi karena setiap tikus

pasti memiliki karakteristik yang berbeda dalam merespon stimulus nyeri. Oleh karena itu, patokan yang dirumuskan sebagai parameter hiperalgnesia termal adalah beda laten antara reaksi menghindar pada tungkai kiri yang diinduksi *carrageenan* dengan tungkai kontralateral (kontrol) masing-masing tikus.¹⁴

Algogenik *carrageenan* 2% (150 µL/tungkai) yang diinjeksikan pada tungkai ipsilateral tikus cukup signifikan menginduksi nyeri inflamasi dan respon hiperalgnesia. Hal ini terjadi pada kelompok tikus yang hanya diberi minum salin (5 mL/kg BB), ternyata tikus-tikus tersebut mengalami peningkatan reaksi nosifensif menjilati tungkai belakang kiri yang diinjeksi *carrageenan* secara *ipl*. Reaksi nosifensif ini menandai respon hiperalgnesia termal pada tikus, dan secara tidak langsung mengisyaratkan terjadinya sensitisasi perifer pada terminal nosiseptor yang dimediasi oleh peningkatan produksi prostanoide. Respon tersebut meningkat signifikan pada menit ke-60 setelah injeksi *carrageenan*, atau sinergis dengan waktu puncak peningkatan ekspresi mRNA COX-2 (5 kali lipat) di jaringan inflamasi.¹⁹ Artinya, waktu tersebut beriringan dengan puncak produksi PGE₂ (6 kali lipat)¹⁹ yang notabene bertanggung jawab terhadap sensitisasi (peningkatan transduksi termal) reseptor TRPV1, ditandai oleh penurunan ambang nosiseptor terhadap stimulus panas seperti yang bersumber dari *hot plate*.²⁰

Konsekuensinya adalah tikus kelompok salin semakin cepat mengalami hiperalgnesia termal yang direpresentasikan dengan pening-

katan grafik nilai beda laten (3 – 7 detik) dalam uji nyeri *hot plate test*.

Disamping itu, ekspresi gen *c-fos* di DRG dan neuron DH medula spinalis terjadi pada jam pertama hingga jam kedua setelah terpapar stimulus panas yang berbahaya seperti suhu uji *hot plate* (52°C).²¹ Peningkatan “sup inflamasi” juga terjadi pada jam pertama setelah injeksi *carrageenan*; mengindikasikan peningkatan mediator lokal seperti substansi P, glutamat, histamin, bradikinin, dan prostaglandin.²² Bersamaan dengan itu sintesis IL-1 β juga meningkat yang mengisyaratkan terjadi induksi ekspresi COX-2 di jaringan inflamasi. Jadi, peningkatan respon hiperalgesia pada jam pertama setelah injeksi *carrageenan*, semata-mata terjadi karena mediator sensitisasi nyeri meningkat mulai dari faktor transkripsi gen hingga prostanoid terminal. Sensitisasi ini secara molekuler diduga berlangsung selama enam jam pertama setelah injeksi *carrageenan*.¹⁹

Selanjutnya uji nyeri model MHP yang dipakai dalam penelitian ini dipastikan sensitif terhadap efek analgesik non opioid, atau secara spesifik mampu mendeteksi reaksi hiperalgesia yang dipicu oleh *carrageenan* pada tikus yang diobati inhibitor COX-2 selektif. Model ini telah dinyatakan sebagai metode sederhana, cepat, dan sensitif untuk mendeteksi hiperalgesia perifer pada tikus yang tidak diikat.¹⁴ Suhu uji W-MHP –yang stabil pada kisaran 51,5°C– cukup kuat mengaktivasi TRPV1 yang sudah tersensitisasi oleh PGE₂,^{20,23,24} atau mungkin menginduksi ekspresi gen *c-fos*.

untuk menginisiasi sensitisasi sentral.^{2,21} Hal ini terlihat pada tikus kelompok salin yang dipastikan telah mengalami respon hiperalgesia termal akibat induksi *carrageenan*, berbeda dengan kelompok kontrol hanya mengalami respon nosiseptif normal dengan nilai beda laten yang kecil (ambang nyeri normal). Bila tikus tersebut diberi minum *Morinda* atau obat inhibitor COX-2 selektif sebelum diinjeksi *carrageenan*, maka kemungkinan penurunan respon hiperalgesianya akan terdeteksi oleh W-MHP. Aspek sensitivitas W-MHP ini tampak dalam pengamatan reaksi menghindar tungkai tikus kelompok *Morinda* dan *celecoxib* yang mengalami penurunan beda laten pada menit ke-60, yaitu sekitar 4 detik dibandingkan kelompok salin.

Ada beberapa alasan yang menyebabkan kelompok tikus yang diberi *Morinda* tidak mengalami hiperalgesia termal, ditandai oleh nilai beda laten yang kecil atau ambang yang relatif tinggi. Secara *in vitro*, hasil kuantifikasi PGE₂ pada platelet yang diberi *Morinda* dilaporkan sangat rendah.²⁵ Sedangkan respon hiperalgesia dilaporkan tidak terjadi pada mencit yang mengalami defisiensi kanal ion TRPV1 dan reseptor EP₁.^{20,26} Dalam konteks sensitisasi perifer, hiperalgesia termal dapat terjadi bila PGE₂ di jaringan inflamasi berhasil mengaktivasi subunit G_s reseptor EP₁ di terminal nosiseptor perifer untuk menginisiasi transduksi sinyal melalui jalur cAMP-PKA. Subunit katalitik PKA akan bertranslokasi untuk memfosforilasi residu serin TRPV1, sehingga nosiseptor tersensitisasi atau ambangnya turun.⁸

Seandainya reseptor TRPV1 teraktivasi oleh stimulus panas lempeng *hot plate*, maka akan terjadi respon hiperalgesia termal pada tikus.

Jadi, syarat utama terjadinya hiperalgesia termal dalam kasus nyeri inflamasi adalah adanya kontinuitas produksi PGE₂ yang dikatalisasi oleh COX-2.^{27,28} Sebaliknya aplikasi antibodi monoklonal anti-PGE₂ atau inhibitor COX-2 selektif terhadap tikus yang diinjeksi *carrageenan* dinyatakan dapat memulihkan hiperalgesia termal dalam tempo 1 hingga 3 jam.²⁹ Pada tikus kelompok *Morinda* terbukti tidak terjadi penurunan ambang nosiseptor (peningkatan beda laten) yang signifikan, sehingga diduga reseptor TRPV1 tidak tersensitisasi. Artinya, produksi PGE₂ di jaringan inflamasi tikus tersebut tidak cukup kuat untuk memodulasi reseptor TRPV1. Sedangkan beda laten yang relatif kecil menunjukkan bahwa *Morinda* telah bekerja memulihkan hiperalgesia termal sejak menit 15 setelah diminumkan pada tikus tersebut seperti halnya inhibitor COX-2 selektif.

Dengan diperoleh data beda laten yang hampir setara pada tikus kelompok *Morinda* dan tikus kelompok *celecoxib*, maka semakin memperkuat potensi antinosiseptif *Morinda* melalui mekanisme inhibisi COX-2 selektif. Aktivitas antinosiseptif *Morinda* sudah bekerja signifikan sejak menit ke-15 pasca injeksi *carrageenan*. Bahkan ketika terjadi puncak ekspresi COX-2 pada menit ke-60 pasca injeksi *carrageenan*, komponen aktif *Morinda* juga masih cukup efektif memblokir aktivitas siklo-oksigenase dalam mendegradasi asam arakido-

nat. Hal ini tampak pada kelompok *Morinda* dan *celecoxib* yang mengalami penurunan respon hiperalgesia termal dengan beda laten sekitar 3 detik, sehingga diduga tidak terjadi sensitisasi yang masif pada kedua kelompok tikus dalam uji nyeri *hot plate test*. Artinya, tikus-tikus tersebut memiliki toleransi yang tinggi terhadap stimulus panas W-MHP, meskipun telah diinduksi oleh *carrageenan* sebagai stimulus primer hiperalgesia.

Kapasitas inhibisi *Morinda* terhadap respon hiperalgesia masih dalam rentang waktu farmakokinetiknya. Sekitar 30 menit setelah tikus diminumkan *Morinda*, komponen antinosiseptif *Morinda* dengan marker skopoletin (salah satu komponen antinosiseptif) sudah mulai diabsorpsi oleh jaringan tubuh tikus. Satu jam kemudian komponen aktif *Morinda* sudah menyebar ke seluruh tubuh, termasuk ke jaringan inflamasi. Artinya, komponen aktif *Morinda* diduga sudah bekerja efektif guna menghambat aktivitas enzimatis COX-2 setelah 1 jam pertama diminumkan pada tikus.

Kadar puncak komponen aktif *Morinda* di dalam plasma terjadi pada jam ke-2, dan berkurang 50% selama 4 jam.⁹ Data ini sejalan dengan kemampuan *Morinda* menghambat respon hiperalgesia termal pada tikus selama 5 jam uji nyeri *hot plate test*. Nilai beda laten tikus kelompok *Morinda* pada setiap tahap pengamatan hiperalgesia tidak mengindikasikan peningkatan beda laten (penurunan ambang nosiseptor) yang signifikan, seperti halnya nilai beda laten pada tikus kelompok *celecoxib*. Jadi, penelitian ini memperlihatkan

bahwa *Morinda* memiliki potensi antinosiseptif yang sama seperti *celecoxib* dalam hal mengatasi hiperalgesia termal terutama selama 5 jam pertama nyeri inflamasi.

Pengamatan efek antinosiseptif *Morinda* di atas sinergis dengan efek antiinflamasi *Morinda* pada tikus yang diinjeksi *carrageenan*. *Morinda* dilaporkan cukup signifikan mereduksi edema tungkai yang diinjeksi *carrageenan* secara *ipl* yang mengisyaratkan tikus tersebut tidak mengalami inflamasi dan hiperalgesia pada menit ke-50 hingga menit ke-250. Edema itu sendiri terjadi karena *carrageenan* menginduksi pelepasan gas hidrogen disulfida (H_2S) yang berhubungan dengan infiltrasi neutrofil. Sedangkan infiltrasi ini ditandai peningkatan aktivitas myeloperoksida.³⁰ Mekanisme ini mengindikasikan bahwa H_2S bersama NO bekerja mengaktifasi faktor transkripsi NF κ B yang mungkin didahului oleh stimulasi IL-1 β . Lebih tepatnya menginduksi fosforilasi I κ B α , sehingga NF κ B terdisosiasi dan bertranslokasi ke nukleus untuk meningkatkan transkripsi gen-gen proinflamasi,^{31,32} salah satu diantaranya peningkatan ekspresi gen COX-2. Jadi, baik pengamatan efek *Morinda* sebagai antiinflamasi (dengan parameter edema) maupun sebagai antinosiseptif (dengan parameter hiperalgesia termal) sama-sama melalui jalur inhibisi COX-2, dan hasilnya secara *in vivo* sinergis.

Analisis di atas juga sesuai dengan tinjauan pustaka sebelumnya, bahwa *Morinda* dilaporkan dapat menginhibisi aktivitas faktor transkripsi NF κ B serta menginhibisi produksi

sitokin proinflamasi (terutama IL-1 β dan TNF- α). Artinya, sangat mungkin tikus yang diberi *Morinda* tidak mengalami peningkatan produksi mediator inflamasi meskipun diinduksi *carrageenan*. Bila mediator inflamasi (terutama IL-1 β) diinhibisi, maka dilaporkan tidak akan terjadi peningkatan aktivitas CREB. Oleh karena itu, wajar tidak terjadi sensitisasi atau peningkatan respon hiperalgesia termal pada tikus yang diberi *Morinda* karena diduga jalur CREB tidak menginduksi peningkatan transmisi sinaptik.

Analisis terakhir perihal diet *Morinda* selama 10 hari tidak memperlihatkan perbedaan beda laten yang signifikan dibandingkan konsumsi *Morinda* 1 jam sebelum diinduksi nyeri inflamasi, kecuali sedikit penurunan beda laten pada menit ke-60. Pengaruh diet *Morinda* selama 10 hari juga berhubungan dengan farmakokinetik *Morinda* di atas. Setelah 24 jam dikonsumsi kadar komponen aktif *Morinda* di dalam plasma dilaporkan hanya tersisa 2%.⁹ Artinya, komponen aktif *Morinda* telah dimetabolisme dalam rentang waktu 24 jam. Diduga diet *Morinda* 10 hari tidak mengalami akumulasi di dalam tubuh dan hanya berperan sebagai sumber nutrisi.

Dalam konteks mengatasi fase awal inflamasi, pemberian *Morinda* 1 hari sudah cukup kuat mengatasi kemungkinan hiperalgesia termal yang menyertai *nat*. Hal ini tampak pada kelompok *Morinda* dan *celecoxib* yang mengalami penurunan reaksi inflamasi. Akan tetapi, pada kasus nyeri kronis prostanoid perifer diproduksi berkelanjutan sampai meka-

mekanisme transkripsi gen-gen proinflamasi kembali normal. Oleh karena itu, perlu strategi pemberian *Morinda* dengan frekuensi yang tepat untuk mengimbangnya. Efek frekuensi pemberian antinosiseptif *Morinda* ini dapat dibuktikan lebih lanjut pada manusia dengan metode hiperalgesia yang sudah baku.

KESIMPULAN

Penelitian memperkuat hipotesis bahwa Efek antinosiseptif *Morinda* dapat menurunkan beda laten hiperalgesia termal secara bermakna, berupa penurunan respon menghindar tungkai tikus yang diinduksi nyeri inflamasi menggunakan algogenik *carrageenan*. Efek antinosiseptif *Morinda* untuk menurunkan beda laten hiperalgesia termal tidak berbeda bermakna dibandingkan *celecoxib*, dan tampak mirip pola beda laten diantara keduanya. Sedangkan diet *Morinda* secara teratur selama 10 hari tidak menurunkan beda laten hiperalgesia termal yang berbeda secara bermakna dibandingkan diet *Morinda* 1 jam sebelum diinduksi *carrageenan*. *Morinda* memiliki potensi antinosiseptif dengan kemungkinan mekanisme atau jalur inhibisi nosiseptif yang beragam. Oleh karena itu penelitian ini dapat dikembangkan pada ranah fisiologi perilaku, biomolekuler nyeri, atau efikasi antinosiseptif dengan pendekatan farmakologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience exploring the brain 2nd ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p 421-32.
- Scholz J, Woolf CJ. Effect of antinociceptive pain. *Nature Neuroscience Supplement* 2002; 5: 1062-7.
- Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 2004; 140: 441-51.
- Davis MP, Shaiova LA, Angst MS. When opioids cause pain. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25(28): 4497-8.
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia* 2001; 87(1): 3-11.
- Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-8.
- Zhang X, McNaughton PA. Why pain gets worse: the mechanism of heat hyperalgesia. *J. Gen Physiol* 2006; 128(5): 491-3.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang S-Y, et al. PKA/AKP/VR-1 module: a common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22(11): 4740-5.
- Wang M-Y, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen S, Palu AK, et al. *Morinda citrifolia* (noni): a literature review and recent advances in noni research. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 23 (12): 1127-41.
- Solomon N. Doctor to doctor: clear answer to your patients' question about noni. Utah: Direct Souch Publishing; 2004. p 15-9.
- Deng S, Palu AK, Zhou B-N, Jensen CJ. Noni as anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acidergic effect. *Phytomedicin*, 2007; 14 (7):517-22
- Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Missilin R, dan Mortier F. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med* 1990; 56: 430-4.
- Solomon N. Noni juice: how much, how often, for what 4th ed. Utah; 2006. p 73-7, p 13-8.
- Lavich TR, Cordeiro RSB, Silva PMR, Martins MA. A novel hot plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Med Biol Res* 2005; 38(3): 445-51.
- Jerome J, Brunson T, Takeoka G, Foster C, Moon HB, Grageda E, et al. Celebrex offers a small protection from root resorption associated with orthodontic movement. *CDA Journal*, 2005; 35(12):951-9.
- McKoy MG, Thomas EA, Simon OR. Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* L. (noni). *Proc. West Pharmacol Soc*, 2002; 45: 76-8.
- Dahlan, SM. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan deskriptif, bivariat, dan multivariat

- dilengkapi aplikasi dengan menggunakan SP SS. Jakarta: Salemba Medika, 2008; p 106-20.
18. **Trapp D.** Basic & clinical biostatistics 4th ed. San Francisco: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2003. p 181-3.
 19. **Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D.** Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant PGE2 response in the central nervous system associated with the induction of microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 1-35.
 20. **Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi Eri, Sugimoto Y, et al.** Sensitization of TRPV1 by EP1 dan IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 2005; 1(3): 1-9.
 21. **Munglani R, Hunst SP.** Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 186-192.
 22. **Bach-Rojecky L, Lackovic Z.** Antinociceptive effect of botulinum toxin type A in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat Med J* 2005; 46(2): 201-7.
 23. **Julius D, Basbaum AI.** Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 13: 203-9.
 24. **Belmonte C, Viana F.** Molecular and cellular to somatosensory specificity. *Molecular Pain* 2008; 4(14): 1-17.
 25. **Su CX, Jensen CJ, Story SP.** Noni juice on COX-1 and COX-2 and noni juice as a selective COX-2 inhibitor. WO/2002/045734.
 26. **Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al.** Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 2000; 288: 306-13.
 27. **Dirig DM, Isakon PC, Yaksh TL.** Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rat. *JPET* 1998; 285(3): 1031-8.
 28. **Vasque E, Barl K-J, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible H-G.** Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammatory spinal induced-hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(22):9001-8.
 29. **Zhang Y, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakon PC.** Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverse inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *JPET* 1997; 283(3): 1069-75.
 30. **Bhatia M, Sidhapuriwala J, Moochala SM, Moore PK.** Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in rat. *British Journal of Pharmacology* 2005; 145(2): 141-4.
 31. **Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T, et al.** Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *The FASEB Journal* 2001; 15: 1187- 200.
 32. **Borthakur A, Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobachman JK.** Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cell. *Am J Physiol Gastrointest* 2006; 292: G829-38.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

- o Nama : Fikri Fahruroji
- o Tempat/Tgl. Lahir : Garut, 14 Mei 1982
- o Agama : Islam
- o Riwayat pendidikan :
 - PMIB FK UI (2006 – sekarang)
 - Program Sarjana FIK UI (2001 – 2005)
 - SMU Negeri 1 Tarogong Garut (1999 – 2001)
- o Pekerjaan :
 - Menulis *part time* (2008 – sekarang)
 - Dosen *part time* (2006 – 2007)



Catatan:

Sumber dana penelitian tesis berasal dari anggaran pribadi.