

## **Mitogen-Activated Protein Kinase Menghambat Perkembangan Toleransi Analgesik Morfina pada Mencit**

Toetik Ariyani\*, Tri Kaloko, Junaidi Khotib

Departemen Farmasi Klinis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya  
(E-mail: toetik\_61@yahoo.com)

*The analgesic properties and side effects of morphine such as tolerance are mediated by the  $\mu$ -opioid receptor. Long-term morphine treatment initiates adaptation mechanism like receptor desensitization or internalization that underlie tolerance. Another adaptation mechanism is the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Repeated exposure to morphine activates MAP kinase cascade which elevates the level of MAP kinase extracellular signaling regulatory protein kinase (ERK 1/2) and MAP kinase p38 causing phosphorylation of many transcriptional factors. In this study, the role of MAP kinase on the development of morphine analgesic tolerance was evaluated by giving inhibitor MAP kinase p38 (SB203580) and inhibitor MAP kinase ERK 1/2 (PD98059). MAP kinase inhibitor injected intrathecally in different doses (0.01 nmol; 0.1 nmol and 1.0 nmol) to mice before got 10,0 mg/Kg body weight morphine subcutan once daily. Analgesic responses was determined by using hot plate method. The result showed that SB203580 prevented the development of morphine analgesic tolerance at the dose 1.0 nmol ( $P < 0.05$ ) significantly different with the control group DMSO 30%. PD98059 also prevented the development of morphine analgesic tolerance at the dose 1.0 nmol ( $P < 0,05$ ) significantly different with the control group DMSO 30%. Result of this studies indicated that MAP kinase had a substansial role on inhibiting the development of morphine analgesic tolerance.*

**Key words:** *morphine, analgesic tolerance, mitogen-activated protein kinase*

### **PENDAHULUAN**

Nyeri didefinisikan sebagai suatu pengalaman sensorik dan emosional yang tidak menyenangkan yang berhubungan dengan adanya kerusakan jaringan baik yang bersifat aktual ataupun potensial. Berdasarkan lama rangsangan, nyeri dibedakan menjadi dua yaitu nyeri akut dan kronik. Pengalaman sensorik dari nyeri akut terjadi karena adanya rangsangan spesifik seperti rangsangan mekanik, kimiawi atau termal. Proses ini terjadi melalui suatu sistem sensorik yang sangat khusus yaitu nosisepsi. Nosisepsi melibatkan keseluruhan proses yang terdiri dari proses transduksi atau stimulasi, konduksi atau transmisi, persepsi, dan modulasi.

Morfina telah dikenal untuk meredakan nyeri yang sangat hebat dengan efektivitas yang tinggi. Mekanisme kerja morfina sebagai analgesik terjadi melalui ikatan pada reseptor opioid terutama pada reseptor opioid  $\mu$  yang menyebabkan hambatan transmisi impuls nyeri lebih lanjut (Liu & Prather, 2001; Katzung, 2005; Hill, 2006).

Penggunaan morfina secara berulang akan menyebabkan terjadinya toleransi yaitu suatu fenomena dimana obat akan mengalami penurunan efektivitas atau memerlukan dosis yang lebih tinggi untuk mempertahankan suatu efek tertentu. Mekanisme perkembangan toleransi analgesik morfina melibatkan reseptor opioid  $\mu$  dimana terjadi desensitisasi reseptor opioid  $\mu$  yang akan memicu sekuestrasi atau internalisasi reseptor sehingga mengurangi jumlah reseptor pada membran sel. Selain itu, ada hipotesis lain yang menyatakan bahwa aktivasi reseptor opioid  $\mu$  oleh agonis opioid akan menyebabkan terjadinya mekanisme adaptasi yang mempengaruhi berbagai *signaling cascade* diantaranya upregulasi *adenyil cyclase cascade* serta *second messenger* lainnya seperti MAP kinase (Liu & Prather, 2001; Katzung, 2005; Hill, 2006).

Aktivasi *MAP kinase cascade* menyebabkan fosforilasi berbagai faktor transkripsi dan bertindak sebagai perantara sentral dalam transduksi sinyal dari membran plasma ke dalam nukleus. Sinyal mitogenik ini lebih lanjut akan menyebabkan desensitisasi reseptor opioid  $\mu$  melalui serangkaian proses yang melibatkan transkripsi mRNA oleh DNA dan translasi mRNA menjadi protein tertentu (Kieffer & Evans, 2002). Oleh karena itu dilakukan penelitian tentang pengaruh *MAP kinase* pada perkembangan toleransi analgesik morfina dengan pemberian *MAP kinase inhibitor* p38 yaitu SB203580 dan *MAP kinase inhibitor* ERK 1/2 yaitu PD98059.

### **BAHAN DAN METODE**

**Bahan dan Alat.** Bahan dan pereaksi yang digunakan adalah Morfina HCl *pharmaceutical grade* (PT. Kimia Farma), SB203580 p.a *MAP kinase p38 inhibitor* (Calbiochem), PD98059 p.a *MAP kinase ERK inhibitor* (Calbiochem), *Normal Saline* (NS) steril *pro injection* (Apotek Kimia Farma), DMSO pro sintesis (Merck), *Water for Injection* (Apotek Kimia Farma), ethanol p.a. (Merck). Alat-alat yang digunakan adalah *Hot-Cold Plate* (Ugo Basile 35100), neraca analitik, spuit injeksi 1,0 ml (Terumo), jarum suntik 26 G dan 30 G (Terumo), dan alat-alat gelas.

**Rancangan Penelitian.** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang terdiri dari dua tahap dengan menggunakan subyek penelitian mencit Balb-C sebanyak 112 ekor. Pada tahap pertama mencit dibagi secara random ke dalam 6 kelompok masing-masing 8 ekor. Tiap kelompok mendapatkan *Normal Saline* (NS) atau morfina secara subkutan dengan dosis 1,0 mg/Kg BB; 3,0 mg/Kg BB; 5,6 mg/Kg BB; 10,0 mg/Kg BB dan 20,0 mg/Kg B sehari sekali selama tujuh hari. Sedangkan pada tahap kedua mencit dibagi ke dalam 8

kelompok masing-masing 8 ekor. DMSO 30%, MAP kinase inhibitor (SB203580 atau PD98059) diberikan secara intratekal 30 menit sebelum pemberian morfina. Injeksi intratekal dilakukan dengan menyisipkan jarum pada ruang antar tulang belakang diantara L5 dan L6 dari korda spinalis. SB203580 dan PD98059 diberikan dalam dosis 0,01 nmol; 0,1 nmol dan 1,0 nmol (Cavun *et al.*, 2003). Pengaruh pada perkembangan toleransi analgesik morfina diukur pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, dan 9. Perkembangan toleransi dapat diukur melalui penurunan waktu ketahanan mencit terhadap stimulus panas dengan metode *Hot Plate* pada suhu  $55^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Pengukuran dilakukan 30 menit setelah pemberian morfina dan waktu ketahanan mencit pada suhu tersebut diukur dengan *end point* berupa gerakan melompat, menjilat, mengangkat kaki depan, berjingkat, memutar atau menghentakkan kaki (Allen & Yaksh, 2004). *Baseline* ditentukan terlebih dahulu pada hari ke-0. Untuk menghindari terjadinya kerusakan jaringan maka pengukuran waktu ketahanan terhadap mencit dihentikan (*cut off time*) setelah 30 detik.

**Analisis Data.** Sebelum dilakukan uji statistik maka data waktu ketahanan mencit terhadap panas pada berbagai perlakuan diolah terlebih dahulu dengan menggunakan rumus (Cavun *et al.*, 2003):

$$\% \text{Maximum Possible Effect (\% MPE)} = \frac{T_n - T_0}{T_{\text{cut off}} - T_0} \times 100 \%$$

**Keterangan.**  $T_n$  = waktu ketahanan mencit terhadap panas setelah perlakuan (detik),  $T_0$  = waktu ketahanan mencit terhadap panas sebelum perlakuan (detik),  $T_{\text{cut off}}$  = *cut off time* = 30 detik, = waktu maksimal pengukuran waktu ketahanan mencit terhadap panas

Rata-rata *%Maximum Possible Effect* (%MPE) tiap hari pada setiap kelompok dosis pada tahap pertama dilakukan uji statistik *one way anova*, jika ada

perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan *post hoc multiple comparison* Bonferroni apabila diasumsikan variansinya sama atau Games Howell apabila variansinya tidak sama. Sementara rata-rata *%Maximum Possible Effect* (%MPE) tiap kelompok dosis pada tahap kedua dibandingkan dengan kontrol negatif DMSO 30 % kemudian diuji dengan uji statistik *two way anova*. Jika ada perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) pada *two way anova*, analisis statistik dilanjutkan dengan *post hoc multiple comparison* Bonferroni apabila diasumsikan variansinya sama atau Games Howell apabila variansinya tidak sama.

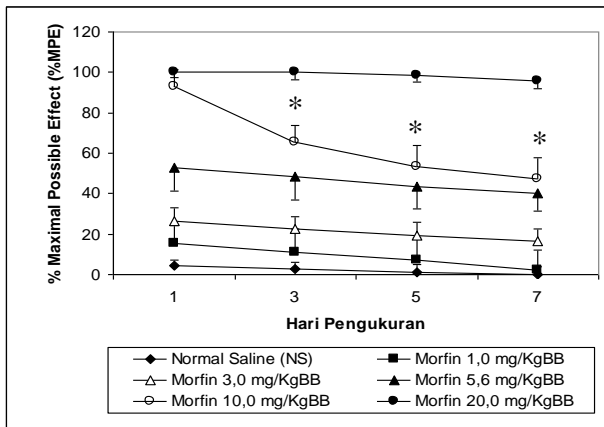
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Perkembangan Toleransi Analgesik Morfina.** Pada tahap pertama, dilakukan penentuan dosis perkembangan toleransi analgesik morfina yang akan digunakan untuk mengetahui pengaruh MAP kinase. Perkembangan toleransi analgesik morfina terjadi pada dosis 10,0 mg/Kg BB (tabel 1). Pada dosis tersebut efek analgesik morfina menurun secara bermakna  $\{F(3,24) = 31,427; P < 0,05\}$  dimulai pada hari ketiga dan pada hari ketujuh menurun sebesar 28,2% atau lebih dari 20% dari hari pertama (tabel 1).

Data pada tabel 1 menunjukkan peningkatan waktu ketahanan mencit terhadap panas setelah pemberian analgesik morfina dibandingkan dengan *baseline*. Perkembangan toleransi sudah dimulai dari pemberian dosis pertama morfina (gambar 1). Gambar 1 menunjukkan korelasi linier antara peningkatan dosis dengan penurunan efek analgesik. Pemberian morfina dosis 10,0 mg/ Kg BB menunjukkan adanya toleransi analgesik dengan penurunan lebih dari 20% pada hari ketujuh pemberian dosis. Toleransi secara umum tidak langsung bermanifestasi klinis hingga setelah dua sampai tiga minggu pemberian yang berkali-kali pada dosis terapi biasa. Toleransi berkembang paling baik pada dosis besar yang diberikan dengan interval waktu yang pendek dan efek minimal bila diberikan dengan dosis kecil dengan interval panjang (Katzung, 2005).

**Tabel 1.** Hasil pengukuran waktu ketahanan mencit terhadap panas pada berbagai dosis morfina

Kelompok Perlakuan	Waktu ketahanan mencit terhadap panas (detik)				
	Hari 0	Hari 1	Hari 3	Hari 5	Hari 7
Normal Saline	11,4 ± 0,8	12,3 ± 0,4	12,0 ± 0,6	11,7 ± 0,6	11,5 ± 0,6
Morfina HCl 1,0 mg/KgBB	12,1 ± 1,2	14,9 ± 1,5	14,1 ± 1,9	13,4 ± 1,6	12,5 ± 1,0
Morfina HCl 3,0 mg/KgBB	11,3 ± 0,6	16,3 ± 1,1	15,5 ± 1,0	14,8 ± 1,1	14,4 ± 1,0
Morfina HCl 5,6 mg/KgBB	11,7 ± 0,7	21,4 ± 2,2	20,6 ± 2,1	19,7 ± 2,0	19,1 ± 1,6
Morfina HCl 10,0 mg/KgBB	11,9 ± 0,7	28,7 ± 1,5	23,7 ± 1,5	21,6 ± 2,0	20,6 ± 1,9
Morfina HCl 20,0 mg/KgBB	11,6 ± 0,6	30 ± 0	30 ± 0	29,8 ± 0,6	29,2 ± 1,6



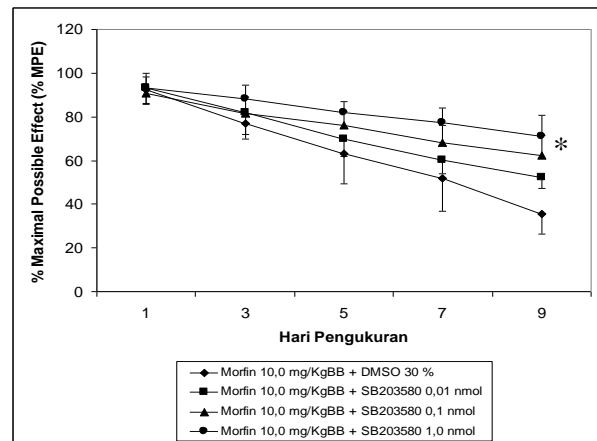
**Gambar 1.** Grafik perkembangan toleransi analgesik morfina pada berbagai dosis Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna

Mekanisme kerja morfina sebagai analgesik terjadi melalui ikatan pada reseptor opioid terutama pada reseptor opioid  $\mu$ . Ikatan pada reseptor opioid  $\mu$  menyebabkan pecahnya protein G menjadi protein  $G_{\alpha}$  dan  $G_{\beta\gamma}$ . Protein  $G_{\alpha}$  akan menghambat *adenylyl cyclase cascade* sehingga terjadi penurunan jumlah *cyclic adenosine monophosphate (cAMP)* di dalam sel. Hal ini menyebabkan penutupan gerbang ion kalsium sehingga menghambat pelepasan neurotransmitter eksitatori nyeri pada presinaps. Selain itu, aktivasi reseptor opioid  $\mu$  pada pasca sinaps menyebabkan pembukaan gerbang ion kalium keluar dari dalam sel syaraf yang mengakibatkan terjadinya hiperpolarisasi sehingga menghambat transmisi impuls nyeri lebih lanjut (Liu & Prather, 2001; Katzung, 2005; Hill, 2006).

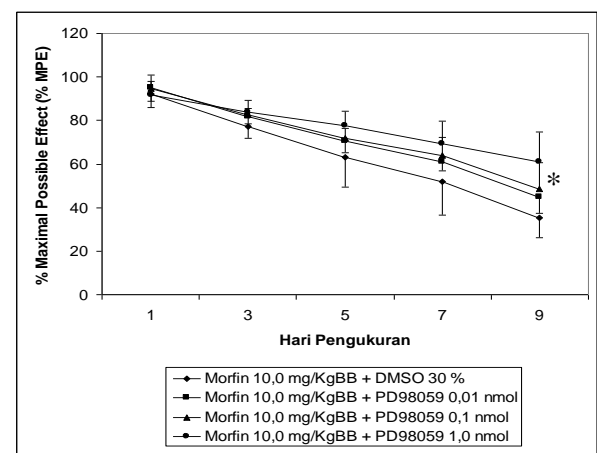
Aktivasi reseptor opioid  $\mu$  oleh agonis opioid akan menyebabkan terjadinya mekanisme adaptasi yang mempengaruhi berbagai *signaling cascade* diantaranya upregulasi *adenylyl cyclase cascade* serta *second messenger* lainnya (Kieffer & Evans, 2002). Perubahan pada *adenylyl cyclase cascade* dimana pemberian agonis opioid secara berulang justru akan menyebabkan peningkatan aktivitas *adenylyl cyclase* yang disebut dengan istilah supersensitivitas atau superaktivasi atau upregulasi *adenylyl cyclase* sehingga meningkatkan jumlah cAMP. Peningkatan jumlah cAMP ini akan mengaktifkan protein kinase A (PKA) yang kemudian akan mengaktifkan jalur *MAP kinase* melalui jalur Rap-1 dan Ras. *MAP kinase cascade* terdiri dari 3 kinase yaitu MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), MAP kinase kinase (MEK) dan MAP kinase. Aktivasi *MAP kinase cascade* menyebabkan fosforilasi berbagai faktor transkripsi dan bertindak sebagai perantara sentral dalam transduksi sinyal dari membran plasma ke dalam nukleus (Taylor & Fleming, 2001). Sinyal mitogenik ini lebih lanjut akan menyebabkan desensitisasi reseptor opioid  $\mu$  melalui serangkaian proses yang melibatkan transkripsi mRNA oleh DNA dan translasi mRNA menjadi protein tertentu. Protein  $G_{\beta\gamma}$  juga akan mengaktifkan *MAP kinase* melalui jalur Ras GTP, phosphatidilinositol-3-kinase (Pi-3 kinase) serta inositol trifosfat (IP3) yang mengaktifkan protein kinase C (PKC) dan *calcium-calmodulin* (Williams et al., 2001; Wettschurek et al., 2005).

**Pengaruh MAP Kinase Inhibitor.** Pengaruh pemberian SB203580 pada berbagai dosis terhadap perkembangan toleransi analgesik morfina dapat dilihat pada gambar 2. Kelompok perlakuan SB203580 dengan dosis 1,0 nmol berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol DMSO 30% ( $P < 0,05$ ). Kelompok dosis 0,01 nmol dan 0,1 nmol tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hal ini berhubungan dengan konsentrasi penghambatan SB203580 terhadap MAPK p38.

Pengaruh pemberian PD98059 pada berbagai dosis terhadap perkembangan toleransi analgesik morfina dapat dilihat pada gambar 3. Kelompok perlakuan PD98059 dengan dosis 1,0 nmol berbeda secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol pemberian DMSO 30% ( $P < 0,05$ ). Kelompok dosis 0,01 nmol dan 0,1 nmol tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol. Hal ini berhubungan dengan konsentrasi penghambatan PD98059 terhadap MAP kinase ERK 1/2.



**Gambar 2.** Pengaruh pemberian SB203580 intratekal pada berbagai dosis terhadap perkembangan toleransi analgesik morfina Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna



**Gambar 3.** Pengaruh pemberian PD98059 intratekal pada berbagai dosis terhadap perkembangan toleransi analgesik morfina Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan bermakna

Penelitian Schmidt *et al.* (2000) menemukan adanya keterlibatan MAP Kinase ERK 1 dan 2 pada proses fosforilasi reseptor opioid  $\mu$  baik secara langsung maupun tidak langsung yang berhubungan dengan desensitisasi reseptor opioid  $\mu$ . Penelitian ini dilakukan pada sel HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293 secara *in vitro* dan PD98059 menghambat secara signifikan proses fosforilasi ini dengan konsentrasi 20  $\mu$ M. Penelitian serupa oleh Mace *et al.* (2005) yang dilakukan pada sel HEK (*Human Embryonic Kidney*) 293 secara *in-vitro* juga menemukan peranan MAP Kinase p38 pada fosforilasi EEA 1 dan Rabenosyn 5 yang mengatur endositosis atau internalisasi reseptor opioid  $\mu$ . Pemberian inhibitor MAP kinase p38 SB203580 menghambat secara signifikan proses ini pada konsentrasi 10  $\mu$ M.

**Kesimpulan.** *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP kinase)* menghambat perkembangan toleransi analgesik morfina pada pemberian SB203580 dengan dosis 1,0 nmol secara intratekal 30 menit sebelum pemberian morfina. PD98059 menghambat secara signifikan proses fosforilasi reseptor opioid  $\mu$  sedangkan SB203580 menghambat fosforilasi EEA 1 dan Rabenosyn 5 yang mengatur endositosis atau internalisasi reseptor opioid  $\mu$ .

#### DAFTAR PUSTAKA

- Allen, J.W. and Yaksh, T.L.(2004) Assesment of acute thermal nociception in laboratory animals, *In* : Luo, Z.D. (Eds.), *Pain Research: Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, p.11-23.
- Cavun, S., Goktalay, G. and Millington, W. R.(2003) Glycyl-glutamine, an endogenous beta endorphin-derived peptide, inhibits morphine-induced conditioned place preference, tolerance, dependence and withdrawal, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315, 2, p.949–958.
- Hill, S. J.(2006) G-protein coupled receptor : past, present and future, *British Journal of Pharmacology*,147, p.S27-37.
- Katzung, B.G., (2005) *Basic and Clinical Pharmacology*. 9th edition, New York : The MacGraw-Hill Companies, Inc., p.691-720.
- Kieffer, B.L. and Evans, C.J.(2002) Opioid tolerance-in search of the holy grail, *Cell*, 108, 8, p.587-590.
- Liu, J. and Prather, P.L. (2001) Chronic exposure to  $\mu$ -opioid agonist produces constitutive activation of  $\mu$ -opioid receptor in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment, *Molecular Pharmacology*, 60, 1, p.53-62.
- Mace, G., Miaczynska, M., Zerial, M. and Nebreda, A. R. (2005). Phosphorylation of EEA 1 by p38 MAP kinase regulates  $\mu$  opioid receptor Endocytosis, *The EMBO Journal*, 24, p.3235-3246.
- Schmidt, H., Schulz, S., Klutzny, M., Koch, T., Handel, M. and Hollt, V. (2000) involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the  $\mu$ -opioid receptor in HEK 293 cells, *Journal of Neurochemistry*, 74, p.414-422.
- .Taylor, D. A. and Fleming, W. W. (2001) Unifying perspectives of the mechanism underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297, 1, p.11-18.
- Wettschurek, N. and Offermans, S. (2005) Mammalian G protein and their cell type spesific functions, *Physiological Reviews*, 85, p.1159-1204.
- Williams, J. T., Christie, M. J. and Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptis adaptations mediating opioid dependence, *Physiological Review*, 81, 1, p.299-343.