



LAPORAN PENELITIAN
DIPA PENERIMAAN NEGARA BUKAN PAJAK
TAHUN ANGGARAN 2005

EFEKTIVITAS TYROSIN KINASE INHIBITOR PADA PENGHAMBATAN TOLERANSI ANTI NYERI OPIOID

Oleh:

Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D.

Mahardian Rahmadi, S.Si., Apt.

Dra. Budi Suprpti, M.Si.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana Penerimaan Negara Bukan Pajak Tahun 2005,
Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga
Nomor 4683/J03/PP/2005
Tanggal 4 Juli 2005
Nomor Urut : 28

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

November, 2005

- PROTEIN - TYROSINIE KINASE
- OPIOIDS



LAPORAN PENELITIAN
DIPA PENERIMAAN NEGARA BUKAN PAJAK
TAHUN ANGGARAN 2005

EFEKTIVITAS TYROSIN KINASE INHIBITOR PADA PENGHAMBATAN TOLERANSI ANTI NYERI OPIOID

Oleh:

Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D.

Mahardian Rahmadi, S.Si., Apt.

Dra. Budi Suprapti, M.Si.

kKB
KK-2
LP 132/08

kho
e

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana Penerimaan Negara Bukan Pajak Tahun 2005,
Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga
Nomor 4683/J03/PP/2005
Tanggal 4 Juli 2005
Nomor Urut : 28

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

November, 2005

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

| | |
|--|---|
| 1. Judul Penelitian | : Efektivitas <i>tyrosine kinase inhibitor</i> pada penghambatan toleransi anti nyeri opioid |
| a. Macam Penelitian | : <input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Terapan <input type="checkbox"/> Pengembangan |
| b. Kategori Penelitian | : <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III |
| 2. Kepala Proyek Penelitian | |
| a. Nama Lengkap dan Gelar | : Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes, Ph.D |
| b. Jenis Kelamin | : Pria |
| c. Pangkat/Golongan/NIP | : Asisten Ahli / IIIB / 132133960 |
| d. Jabatan Sekarang | : Staf Pengajar |
| e. Fakultas/Puslit/Jurusan | : Farmasi |
| f. Universitas/Inst./Akademi | : Universitas Airlangga |
| g. Bidang Ilmu yang Diteliti | : Ilmu Biomedik Farmasi |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 3 Peneliti |
| 4. Lokasi Penelitian | : Ilmu Biomedik Farmasi |
| 5. Kerjasama dengan Instansi lain | : - |
| a. Nama Instansi | : - |
| b. Alamat | : - |
| c. | |
| 6. Jangka Waktu Penelitian | : 6 Bulan |
| 7. Biaya yang Diperlukan | : Rp. 6.250.000,- |
| 8. Seminar Hasil Penelitian | : |
| a. Dilaksanakan tanggal | : () Baik Sekali (<input checked="" type="checkbox"/>) Baik |
| b. Hasil Penelitian | : () S e d a n g () Kurang |

Surabaya, 28 Oktober 2005

Mengetahui/ Mengesahkan

a.n. Rektor

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga,



(Handwritten signature)

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS
NIP 130 701 125

RINGKASAN

Lebih dari 90% penyakit selalu diikuti oleh timbulnya rasa nyeri. Dari kasus tersebut hampir 40% berkembang menjadi nyeri yang bersifat kronik. Di negara-negara maju seperti Amerika dan Inggris, ini menjadi salah satu masalah utama di bidang kesehatan karena menimbulkan penurunan kualitas hidup, biaya pengobatan yang sangat besar dan menyebabkan penurunan produktivitas bagi penderita.

Masalah menjadi lebih serius dengan timbulnya toleransi pada penggunaan obat-obat anti nyeri. Penurunan potensi obat-obat anti nyeri poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan sensitifitas reseptor (*desensitization*) dan penurunan jumlah reseptor yang bertanggung jawab untuk mengatasi nyeri seperti reseptor opioid mu, delta dan kappa pada permukaan sel (*down regulation*) dari reseptor. Selain itu, dilaporkan bahwa pemberian opioid jangka lama akan menghasilkan peningkatan ekspresi dan pelepasan *neuronal migrating factor (reelin)*. Ikatan *reelin* dengan reseptor *Apolipoprotein A* akan menghasilkan aktivasi *protein tyrosin kinase* yang terikat pada protein adapter (DAB). Selanjutnya akan mengaktifkan beberapa protein kecil yang termasuk dalam jalur *reelin signaling pathway*. Ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan sintesis protein tertentu, perubahan morfologi sel-sel syaraf, sinaptogenesis dan neuroplastisitas. Dengan demikian *protein tyrosine kinase* memegang peran yang sangat penting pada proses pengembangan toleransi obat anti nyeri. Untuk itu pada penelitian ini akan diuji efektivitas *protein tyrosine kinase inhibitor* seperti K252a dan genistein dalam mencegah terjadinya proses desensitisasi reseptor opioid, yang pada akhirnya akan menghambat terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid.

Pemberian subkutan agonis reseptor opioid mu morfin 10 mg/kg pada hewan coba mencit galur Balb-C menghasilkan potensi anti nyeri yang kuat yang diukur baik dengan metode *tail flick test* maupun *hot plate test*. Pemberian berulang sehari sekali selama 7 hari akan menimbulkan penurunan secara bermakna potensi morfin sebagai anti nyeri.

Pada penelitian ini dilakukan upaya untuk mendapatkan senyawa aktif yang dapat menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin secara kronik dengan menggunakan *tyrosine kinase inhibitor* seperti K252a dan genistein. Dengan metode *hot plate test*, praperlakuan injeksi K252a secara *intracerebroventricular (icv)* pada dosis 0.1 nmol per mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=1.57$; $p=0.24$). Pada peningkatan dosis K252a menjadi 1 nmol dapat menghambat secara bermakna terjadinya pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh pemberian morfin secara kronik ($F_{(1,14)}=6.53$; $p=0.02$). Penghambatan mulai terjadi pada hari ke 5 setelah pemberian K252a. Hal yang sama terjadi pada pengamatan dengan metode *tail flick test*, dimana kelompok yang mendapatkan K252a secara *icv* pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat secara bermakna terjadinya toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh pemberian morfin kronik ($F_{(1,12)}=3.35$; $p=0.09$). Sementara kelompok yang mendapatkan K252a pada dosis 1 nmol/mencit menunjukkan efektifitas penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=15.24$; $p=0.002$). Ini menunjukkan bahwa K252a mampu menghambat terjadinya pengembangan toleransi yang ditimbulkan oleh morfin.

Penggunaan *tyrosine kinase inhibitor* yang lain yaitu genistein, juga menghasilkan data yang konsisten. Pengamatan dengan menggunakan *hot plate* menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 10 nmol/mencit secara icv sehari sekali selama 7 hari dapat menghambat secara signifikan terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh penggunaan morfin kronik ($F_{(1,14)}=3.49$; $p=0.02$), sementara pada dosis 1 nmol/mencit tidak memberikan aktivitas penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri ($F_{(1,15)}=1.58$; $p=0.23$). Pengamatan dengan menggunakan metode tail flick test menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 1 dan 10 nmol/mencit dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,15)}=4.73$; $p=0.05$ untuk dosis 1 nmol dan $F_{(1,14)}=20.35$; $p=0.0005$ untuk dosis 10 nmol).

Berdasarkan data farmakologi diatas dapat disimpulkan bahwa pemberian *tyrosine kinase inhibitor* K252a atau genistein dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri morfin.

Kata kunci = Tyrosine kinase inhibitor ; anti nyeri opioid

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayahnya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan. Pada kesempatan ini kami sampaikan terima kasih kepada :

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga yang telah menyediakan dana DIPA PNBP UNAIR 2005 untuk melaksanakan penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Kepala Bagian Ilmu Biomedik Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan dan fasilitas selama penelitian ini berlangsung.
3. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat atas segala kebaikan dan bantuan yang diberikan. Kami berharap semoga data penelitian ini dapat memberikan kemaknaan dalam kemajuan ilmu pengetahuan khususnya di bidang penanganan penderita nyeri kronik yang mengalami toleransi pada penggunaan obat anti nyeri.

Surabaya, Oktober 2005
Penyusun

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN | ii |
| RINGKASAN | iii |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR GAMBAR/ILUSTRASI | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | viii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 3 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Nyeri | 4 |
| 2.2 Toleransi analgesik opioid..... | 5 |
| 2.3. Peran <i>tyrosine kinase inhibitor</i> | 5 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 7 |
| 4.1 Bahan..... | 7 |
| 4.2 Alat..... | 7 |
| 4.3 Metode Penelitian..... | 7 |
| BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN | 10 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | 16 |
| DAFTAR PUSTAKA | 17 |
| LAMPIRAN..... | 20 |

DAFTAR GAMBAR/ILUSTRASI

| | | |
|-----------|--|---------|
| Gambar 1. | Diagram pengelompokan hewan coba dan perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok |8 |
| Gambar 2. | Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode <i>hot plate test</i> . |11 |
| Gambar 3. | Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode <i>tail flick test</i> . |12 |
| Gambar 4. | Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode <i>hot plate test</i> . |14 |
| Gambar 5. | Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode <i>tail flick test</i> . |15 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Hasil pengamatan dengan metode <i>hot plate test</i> pada mencit yang mendapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan K252a 0.1 atau 1 nmol/mencit (i.c.v.) |20 |
| Lampiran 2. Hasil pengamatan dengan metode <i>tail flick test</i> pada mencit yang mendapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan K252a 0.1 atau 1 nmol/mencit (i.c.v.) |23 |
| Lampiran 3. Hasil pengamatan dengan metode <i>hot plate test</i> pada mencit yang mendapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan genistein 1 atau 10 nmol/mencit (i.c.v.) |26 |
| Lampiran 4. Hasil pengamatan dengan metode <i>tail flick test</i> pada mencit yang mendapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan genistein 1 atau 10 nmol/mencit (i.c.v.) |29 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lebih dari 90% penyakit selalu diikuti oleh timbulnya rasa nyeri. Dari kasus tersebut hampir 40% berkembang menjadi nyeri yang bersifat kronik. Di negara-negara maju seperti Amerika dan Inggris, ini menjadi salah satu masalah utama di bidang kesehatan karena menimbulkan penurunan kualitas hidup, biaya pengobatan yang sangat besar dan menyebabkan penurunan produktivitas bagi penderita (Bowsher, 1991; Von Kroff *et al*, 1990).

Masalah menjadi lebih serius dengan timbulnya toleransi pada penggunaan obat-obat anti nyeri. Penurunan potensi obat-obat anti nyeri poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan jumlah reseptor, desensitisasi reseptor dan terjadinya down regulation reseptor yang bertanggung jawab untuk mengatasi nyeri seperti reseptor opioid mu, delta dan kappa (Lefkowitz, 1998; Zastrow, 2001; Tanowitz and Zastrow, 2002; Khotib *et al*, 2004). Untuk menghindari penurunan potensi opioid, WHO pada tahun 1986 mengatur pemakaian obat anti nyeri opioid seperti dimana opioid hanya digunakan bila penggunaan obat anti nyeri non steroid tidak mampu menghilangkan rasa nyeri seperti pada nyeri kanker, nyeri luka bakar, nyeri diabetik neuropati dan nyeri akibat herpes (WHO, 1986).

Penelitian tingkat molekuler menyatakan bahwa aktivasi reseptor opioid akan dilanjutkan fosforilasi pada protein G oleh GRK2. Protein G akan pecah menjadi 2 bagian, dimana bagian pertama akan mengatur pembukaan dan penutupan saluran ion, sedangkan bagian yang lain akan memfasilitasi terjadinya internalisasi. Sejumlah protein kecil terlibat dalam penghantaran signal dan proses internalisasi. Beberapa gugus dalam protein kecil seperti tirosin, treonin dan serin merupakan bagian yang sangat menentukan dalam proses aktivasi. Pada penggunaan obat anti nyeri opioid jangka lama menunjukkan bahwa jumlah sejumlah gugus yang terfosforilasi meningkat secara bermakna (Lefkowitz, 1998; Zastrow, 2001; Tanowitz and Zastrow, 2002).

Penurunan potensi obat-obat anti nyeri poten seperti morfin, fentanil dan oksikodon selalu dihubungkan dengan penurunan sensitifitas reseptor (*desensitization*) dan penurunan jumlah reseptor yang bertanggung jawab dalam mengatasi nyeri pada

permukaan sel (*down regulation*). Selain itu, dilaporkan bahwa pemberian opioid jangka lama akan menghasilkan ekspresi *neuronal migrating factor (reelin)* yang berlebihan. Ikatan *reelin* dengan reseptor *Apolipoprotein A* akan menghasilkan aktivasi *protein tyrosin kinase* yang terikat pada protein adapter (DAB). Selanjutnya akan mengaktifkan beberapa protein kecil yang termasuk dalam jalur *reelin signaling pathway*. Ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan sintesis protein tertentu, perubahan morfologi sel-sel syaraf, sinaptogenesis dan neuroplastisitas (Quattrocchi *et al*, 2002; Sanada *et al*, 2004; Morimura *et al*, 2005; Khotib *et al*, 2005). Oleh karena itu *protein tyrosine kinase* memegang peran yang sangat penting pada proses pengembangan toleransi obat anti nyeri. Untuk itu pada penelitian ini akan diuji efektivitas protein *tyrosine kinase inhibitor* seperti K252a dan genistein dalam mencegah terjadinya proses desensitisasi reseptor opioid, yang pada akhirnya akan menghambat terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid.

Data terbaru menyatakan bahwa penghambatan fosforilasi pada beberapa gugus tersebut atau perlindungan pada gugus tersebut dari proses fosforilasi akan memberikan efek perlindungan pada reseptor opioid dari proses desensitisasi. Untuk itu pada penelitian ini akan diuji efektivitas protein *tyrosine kinase inhibitor* seperti K252a dan genistein dalam mencegah terjadinya proses desensitisasi reseptor opioid, yang pada akhirnya akan menghambat terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah *protein tyrosine kinase inhibitor* seperti K252a dan genistein dapat menghambat pengembangan toleransi obat anti nyeri morfin ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1.3.1 Mempelajari peran *protein tyrosine kinase* pada pengembangan toleransi obat anti nyeri morfin.
- 1.3.2 Mempelajari efektivitas *protein tyrosine kinase inhibitor* K252a dan genistein dalam menghambat pengembangan toleransi obat anti nyeri morfin.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan memberikan manfaat :

- 1.4.1 Dengan mengetahui mekanisme yang mendasari terjadinya pengembangan toleransi obat-obat anti nyeri opioid maka akan didapatkan suatu metode yang efektif, efisiensi dan aman dalam menangani penurunan potensi obat-obat anti nyeri opioid.
- 1.4.2 Bukti dasar ini diharapkan akan menyumbangkan kemajuan dibidang farmasi dan kedokteran tentang dalam mencegah terjadinya penurunan potensi obat nyeri sehingga menjamin penggunaan obat-obat tepat sasaran, meningkatkan kecepatan proses penyembuhan dan penurunan tingkat kesakitan serta peningkatan kualitas hidup penderita.
- 1.4.3 Pencegahan terjadinya toleransi obat-obat anti nyeri akan dapat menurunkan biaya penggunaan obat, yang pada akhirnya akan berdampak pada peningkatan kesejahteraan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Nyeri

Secara alamiah rasa nyeri baik yang bersifat akut maupun kronik merupakan konsekuensi dari kerusakan jaringan (Garry *et al*, 2004). Intensitas rasa nyeri sangat tergantung pada tingkat kerusakan jaringan, jenis jaringan yang rusak dan pengalaman emosional (Sneddon, 2004). Rangsangan panas, kimiawi ataupun fisik yang mengenai permukaan tubuh akan mengaktifkan reseptor nyeri. Informasi ini akan diteruskan ke permukaan dorsal horn spinal cord melalui serabut syaraf primer aferen A β dan C. Syaraf pada dorsal horn spinal cord akan menyampaikan informasi ini ke otak terutama brainstem, midbrain dan thalamus melalui jalur *ascending* untuk memberikan arti dan respon dari rangsangan tersebut (Garry *et al*, 2004; Djouhri dan Lawson, 2004; Clark dan Harris, 2004; Morris *et al*, 2004).

Penelitian di negara-negara maju menunjukkan bahwa hampir 90 % orang yang mempunyai masalah kesehatan selalu diikuti dengan gejala nyeri dan 40 % akan berkembang menjadi nyeri kronik. Ini merupakan masalah yang kompleks karena pemerintah akan terbebani biaya perawatan yang tidak sedikit dan akan terjadi penurunan produktifitas masyarakat (Bowsher, 1991; Von Kroff *et al*, 1990). Untuk mengatasi itu, sejak tahun 2001 di Amerika telah dicanangkan program "*Decade of Pain Control and Research*" yang bertujuan untuk mendapatkan strategi pengobatan pain secara aman, efektif dan efisien (Harden, 2005).

Kesamaan pada tingkat prevalensi, mekanisme yang mendasari dan konsekuensi potensial nyeri antara data klinik pada manusia dan data laboratorium pada hewan maka memungkinkan penelitian menggunakan model hewan untuk mempelajari nyeri pada manusia (Handwerker, 1987).

2.2. Toleransi analgesik opioid

Terjadinya toleransi dan ketergantungan fisik setelah penggunaan berulang merupakan gambaran spesifik obat-obat opioid. Kemungkinan untuk terjadinya toleransi tersebut merupakan salah satu alasan utama untuk membatasi penggunaannya. Secara molekular penggunaan jangka pendek obat-obat opioid, reseptor opioid akan mengalami fosforilasi dan internalisasi. Setelah obat terlepas dari ikatan kompleks obat-reseptor maka reseptor tersebut akan disisipkan kembali ke membran sel. Reseptor ini akan tetap mempunyai fungsi seperti semula. Sementara, pada pemakaian jangka panjang atau berulang, reseptor opioid akan mengalami proses internalisasi dan dilanjutkan desensitisasi (Khotib *et al*, 2004). Sebagian reseptor mengalami penghancuran di dalam sitosol oleh enzim tertentu. Ini sebenarnya merupakan mekanisme sel untuk menjaga hemostasis akibat adanya pemaparan bahan asing.

2.3. Peran *tyrosine kinase inhibitor*

Protein tyrosine kinase merupakan domain protein yang dapat mengalami fosforilasi atau fosfatasi oleh enzim-enzim tertentu. Fosforilasi atau fosfatasi ini akan mempunyai arti yang penting dalam mengaktifkan protein-protein yang terlibat dalam jalur penghantaran signal. Bahan-bahan yang menghambat fosforilasi *tyrosine kinase* antara lain K252a dan genistein.

a. K252a

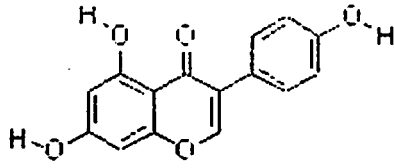
K252a merupakan alkaloid yang diisolasi dari jamur tanah *Nocardioopsis sp.* mempunyai struktur kimia:



Mampu melindungi fosforilasi gugus tirosin dari suatu reseptor. Konsentrasi penghambatan efektif adalah 1.7 nM.

b. Genistein

Genistein merupakan isoflavon yang berasal dari kedelai mempunyai struktur sebagai berikut :



Daya hambat fosforilasi pada gugus tirosin oleh enzim *phosphorylase kinase* adalah 2.6 μM .

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Bahan

- Morfin (Kimia Farma, Pharmaceutical Grade)
- K252a (Tocris Cookson LTD, Analysis grade)
- Genistein (Tocris Cookson LTD, Analysis grade)
- Aquades

3.2 Alat

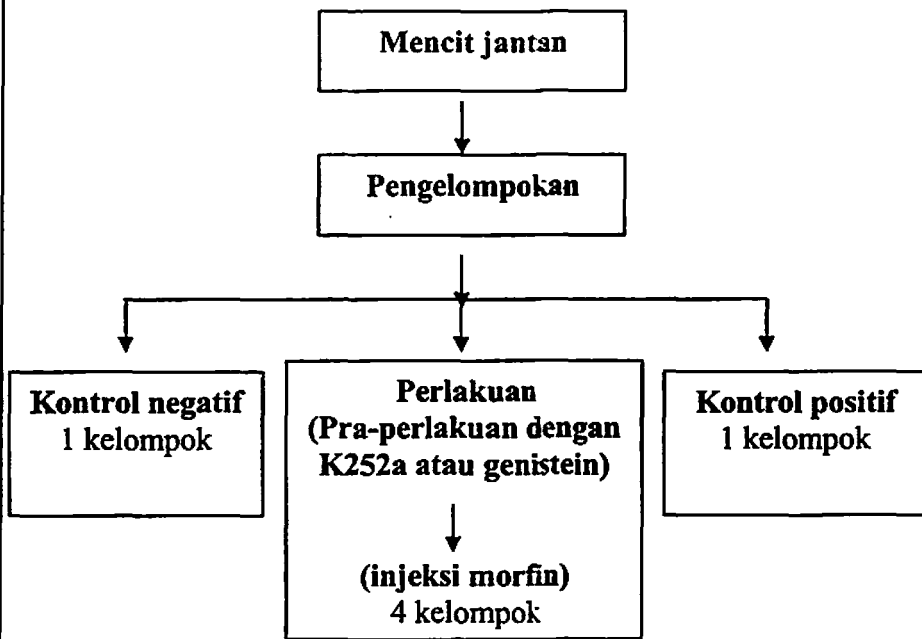
- Jarum suntik 26 G
- Socorec micropipet
- Pipet tip
- Kandang mencit
- *Hot plate analgesia meter*
- *Tail flick analgesia meter*

3.3 Metode Penelitian

3.3.1. Membuat model toleransi pada obat anti nyeri pada mencit

Mencit jantan galur Balb-C (Pusvetmal, Surabaya) berumur 10 minggu ditempatkan secara berkelompok (6 ekor tiap kelompok) dalam kandang dengan temperatur ruangan $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai 6:00 am sampai 18:00 pm). Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang cukup. Setelah 1 minggu adaptasi, mencit diinjeksi secara sub kutan dengan morfin 10 mg/kg setiap hari selama 7 hari untuk menginduksi terjadinya toleransi obat-obat anti nyeri. Untuk kontrol negatif 1 kelompok mencit hanya diinjeksi dengan larutan salin.

Skema penelitian secara sederhana digambarkan dalam diagram berikut:



Gambar 1. Diagram pengelompokan hewan coba dan perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok.

3.3.2. Pengujian toleransi pada mencit

Tiga puluh menit setelah injeksi morfin 10 mg/kg, potensi anti nyeri morfin ditentukan dengan metode *hot plate test* dan *tail flick test*. Pengujian dilakukan pada hari ke 0, 1, 3, 5 dan 7. Potensi anti nyeri dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ anti nyeri} = \frac{\text{Waktu penarikan pada } test - \text{Waktu penarikan pada } pre-test}{\text{Waktu } cut-off - \text{Waktu penarikan pada } pre-test} \times 100$$

Untuk mencegah kerusakan jaringan, ditetapkan cut-off untuk *hot plate test* dan *tail flick test* masing-masing adalah 30 detik dan 15 detik.

3.3.3. Pengujian efektivitas *tyrosine kinase inhibitor* dalam menghambat terjadinya toleransi obat anti nyeri opioid

Tyrosine kinase inhibitor K252a atau genistein diberikan dengan berbagai dosis 0.1 dan 1 nmol untuk K252a serta 1 dan 10 nmol/mencit untuk genistein secara *intracerebroventricular* (icv) 30 menit sebelum injeksi morfin 10 mg/kg. 30 menit setelah pemberian morfin efek anti nyeri ditentukan pada hari 0, 1, 3, 5 dan 7.

3.3.4. Analisis statistik

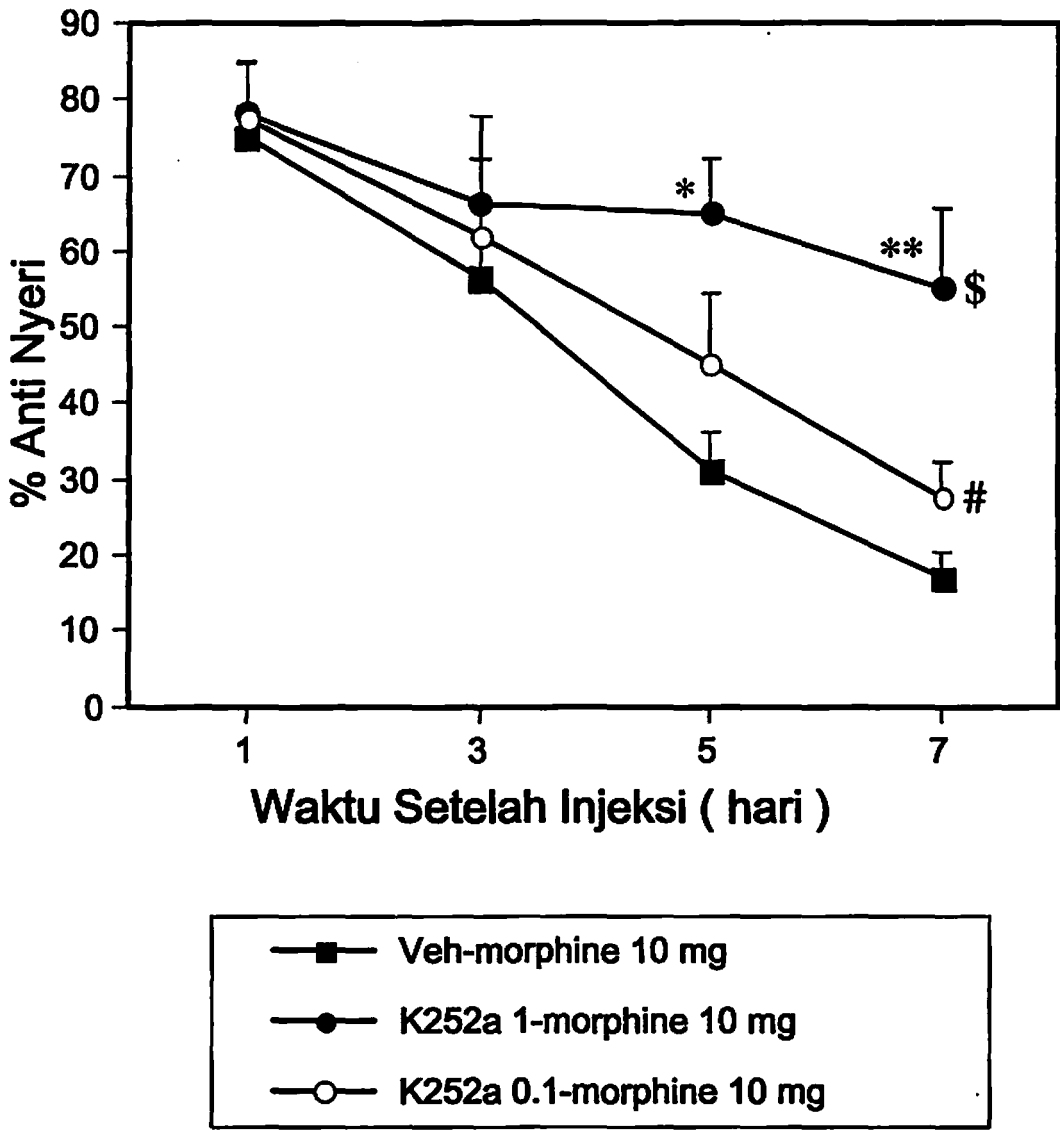
Efektivitas penghambatan pengembangan toleransi obat anti nyeri morfin oleh *tyrosine kinase inhibitor* (K252a dan genistein) dibandingkan dengan kontrol negatif (hanya mendapat saline) dan kontrol positif (hanya mendapat morfin) diuji dengan anova. Jika ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan uji Bonferroni/Dunn.

B A B 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

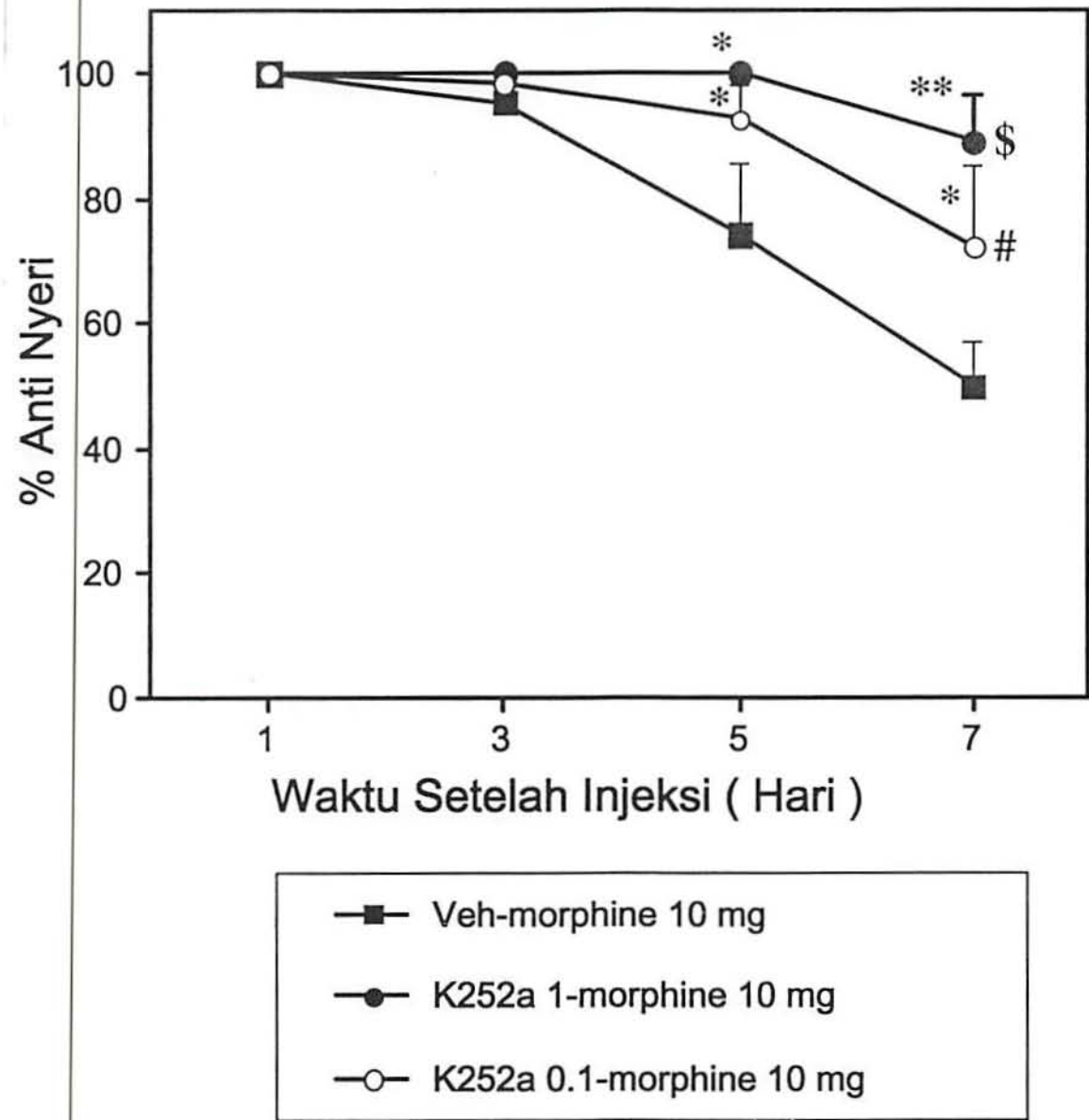
Pemberian subkutan agonis reseptor opioid mu morfin 10 mg/kg pada hewan coba mencit galur ICR menghasilkan potensi anti nyeri yang kuat yang diukur baik dengan metode *tail flick test* maupun *hot plate test*. Pemberian berulang sehari sekali selama 7 hari akan menimbulkan penurunan secara bermakna potensi anti nyeri obat-obat tersebut seperti yang terlihat pada gambar 2. Penurunan secara bermakna terjadi mulai pada hari ke 5. Ini menunjukkan bahwa stimulasi reseptor opioid dengan agonisnya secara kronik mengakibatkan desensitisasi reseptor tersebut. Selanjutnya reseptor tersebut mengalami internalisasi dimana reseptor yang berada pada membran sel akan dibawa masuk ke dalam sitoplasma dan akhirnya dihancurkan. Dengan demikian akan terjadi *down-regulation* dari reseptor opioid tersebut (Lefkowitz, 1998; Li *et al*, 2000; Tanowitz dan von Zastrow 2002). *Down-regulation* ini akan menyebabkan penurunan jumlah reseptor yang mampu berikatan secara efektif dengan agonis. Akibatnya potensi agonis akan mengalami penurunan.

Pada penelitian ini dilakukan upaya untuk mendapatkan senyawa aktif yang dapat menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin kronik dengan menggunakan tirosin kinase inhibitor seperti K252a dan genistein. Seperti terlihat pada gambar 2 dengan data *hot plate test*, praperlakuan K252a secara icv pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menghambat terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=1.57$; $p=0.24$). Sementara pemberian K252a secara icv pada dosis 1 nmol/mencit dapat menghambat secara bermakna terjadinya pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=6.53$; $p=0.02$). Penghambatan mulai terjadi pada hari ke 5 setelah pemberian K252a. Hal yang sama terjadi pada pengamatan dengan metode *tail flick test* seperti terlihat pada gambar 3, dimana kelompok yang mendapatkan K252a secara icv pada dosis 0.1 nmol/mencit sehari sekali selama 7 hari tidak mampu menurunkan secara bermakna terjadinya toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh morfin ($F_{(1,12)}=3.35$; $p=0.09$). Sementara kelompok yang mendapatkan K252a pada dosis 1 nmol/mencit menunjukkan kemampuan penghambatan

pada pengembangan toleransi anti nyeri yang diinduksi oleh morfin ($F_{(1,14)}=15.24$; $p=0.002$). Ini menunjukkan bahwa K252a mampu menghambat terjadinya pengembangan toleransi yang ditimbulkan oleh morfin.



Gambar 2. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,12)} = 1.57$; $p=0.24$) dan \$ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 6.53$; $p=0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.



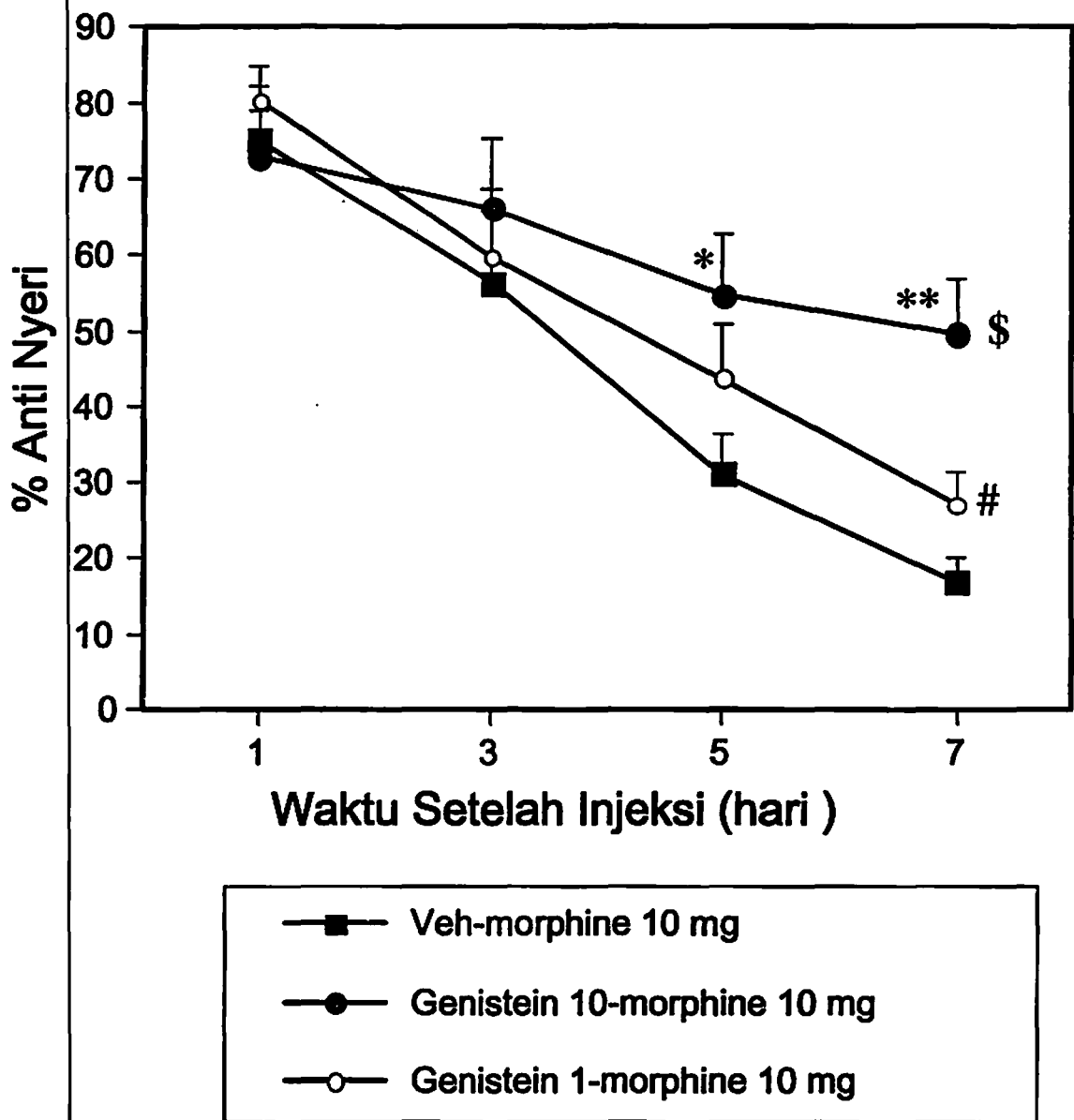
Gambar 3. Efektivitas K252a pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,12)} = 3.35$; $p=0.09$) dan S menunjukkan ($F_{(1,14)} = 15.24$; $p<0.002$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.



Penggunaan tirosin kinase inhibitor yang lain yaitu genistein, juga menghasilkan data yang konsisten. Pengamatan dengan menggunakan *hot plate* menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 10 nmol/mencit secara icv sehari sekali selama 7 hari dapat menghambat secara signifikan terjadinya toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,14)}=3.49$; $p=0.02$), sementara pada dosis 1 nmol/mencit tidak memberikan aktivitas penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri ($F_{(1,15)}=1.58$; $p=0.23$) seperti terlihat pada gambar 4.

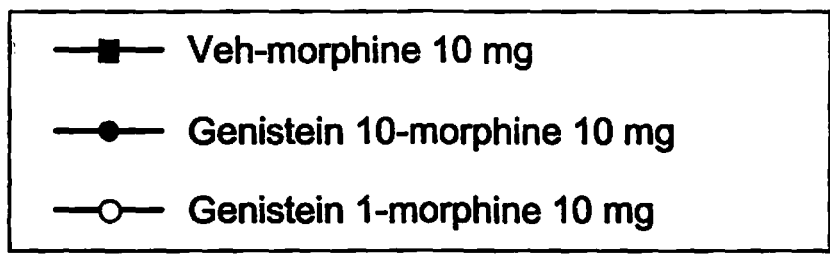
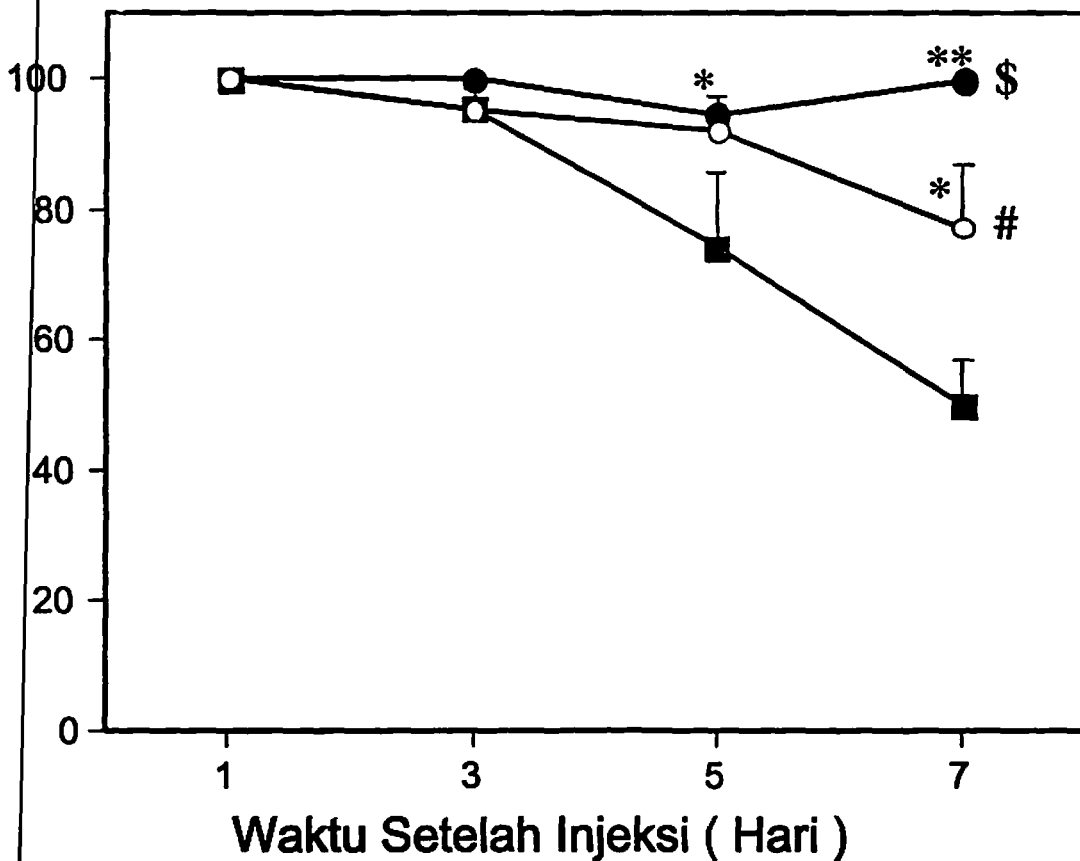
Pengamatan dengan menggunakan metode *tail flick test* seperti pada gambar 5 menunjukkan bahwa pemberian genistein dengan dosis 1 dan 10 nmol/mencit dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri yang ditimbulkan oleh morfin ($F_{(1,15)}=4.73$; $p=0.05$ untuk dosis 1 nmol dan $F_{(1,14)}=20.35$; $p=0.0005$ untuk dosis 10 nmol).

Bagaimanapun juga mekanisme penghambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri dengan praperlakuan tirosin kinase inhibitor belum jelas sampai saat ini. Beberapa pustaka menyebutkan bahwa pemberian morfin yang akan berikatan dengan reseptor opioid mu yang akan mengaktifkan *G-protein coupled-receptor*. Signal ini akan diteruskan untuk memberikan efek farmakologi seperti anti nyeri, euphoria dan lokomotor. Setelah sel syaraf yang mempunyai reseptor opioid teraktifasi, sel tersebut juga akan melepaskan protein kecil yang dikenal sebagai *reelin* yang merupakan faktor *neuronal migrating protein*. Ikatan antara reelin dengan reseptornya, apolipoprotein A (Apo A) akan mengaktifkan tirosin kinase untuk menghasilkan respon sebagai mekanisme adaptasi (Rice and Curran, 2001; Ohshima *et al*, 2001; Bock *et al* 2004).



Gambar 4. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *hot plate test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,15)} = 1.58$; $p=0.23$) dan ^s menunjukkan ($F_{(1,14)} = 3.49$; $p=0.02$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.

% Anti Nyeri



Gambar 5. Efektivitas genistein pada penghambatan pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh penggunaan morfin kronik yang ditentukan dengan metode *tail flick test*. Tanda # menunjukkan ($F_{(1,15)} = 4.73$; $p=0.05$) dan $^{\$}$ menunjukkan ($F_{(1,14)} = 20.36$; $p=0.0005$) dibandingkan pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik. Tanda * menunjukkan $p<0.05$ dan ** menunjukkan $p<0.001$ dibandingkan dengan hari yang sama pada kelompok yang hanya mendapat morfin secara kronik.

B A B 5 KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan data farmakologi menunjukkan bahwa *tyrosine kinase inhibitor*, 252a dan genistein, dapat secara efektif menghambat pengembangan toleransi anti nyeri yang disebabkan oleh morfin.

Untuk mengetahui mekanisme hambatan pada pengembangan toleransi anti nyeri obat-obat opioid, maka perlu dilakukan penelitian pada tingkat molekuler seperti perubahan ketersediaan reseptor dalam membran sel, perubahan protein penghantar sinyal maupun ekspresi reseptor dan protein tersebut baik *spinal cord* maupun otak.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- ock HH, Jossin Y, May P, Berger O, Herz J (2004) Apolipoprotein E receptors are required for reelin-induced proteosomal degradation of the neuronal adaptor protein disabled-1, *J. Biol. Chem.* 279: 33471-33479.
- owsher, D. (1991) Neurogenic pain syndromes and their management, *Br. Med. Bull.* 7: 644-666.
- lark, R.W., Harris, J. (2004) The organization of motor responses to noxious stimuli, *Brain Res. Rev.* 46: 163-172.
- bjouhr, L., Lawson, S.N. (2004) Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals, *Brain Res. Rev.* 46: 131-145.
- arry, E.M., Jones, E., Fleetwood-Walker, S.M.(2004) Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals, *Brain Res. Rev.* 6: 216-224.
- andwerker, H.O., Anton, F., Reeh, P.W. (1987) Discharge patterns of different cutaneous nerve fibres from the rat's tail during prolonged noxious mechanical stimulation, *Exp. Brain Res.* 65: 493-504.
- arden, R.N. (2005) Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis, and treatment, *The Neurologist* 11: 111-122.
- arden, R.N., (2000) A clinical approach to complex regional pain syndrome, *Clin. J. Pain* 16: S26-S32.

- Hotib, J., Narita, M., Suzuki, M., Yajima, Y. and Suzuki, T. (2004) Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of μ - and δ -opioid receptor functions after repeated stimulation of κ -opioid receptors. *Neuropharmacology* **46**, 531-540.
- Leffkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**: 18677-18680.
- Morris, R., Cheunsuang, O., Stewart, A., Maxwell, D. (2004) Spinal dorsal horn neuron targets for nociceptive primary afferents: do single neuron morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the level, *Brain Res. Rev.* **46**: 173-190.
- Mishima T, Ogawa M, Veerana, Hirasawa M, Longenecker G, Ishiguro K, Pant HC, Brady RO, Kulkarni AB, Mikoshiba K (2001) Synergic contributions of cyclin-dependent kinase 5/p35 and reelin/Dab-1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain, *Proc. Nat. Acad. Sic. USA* **98**: 2764-2769.
- Nice DS, Curran T (2001) Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development, *Ann. Rev. Neurosci.* **24**: 1005-1039
- Reddon, L.U. (2004) Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates, *Brain Res. Rev.* **46**: 123-130
- Rowitz, M., von Zastrow, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptor to lysosomes, *J. Biol. Chem.* **277**: 50219-50222
- von Kroff, M., Dworkin, S.F., Le Resche, L. (1990) Graded chronic pain status: an epidemiologic evaluation, *Pain* **40**: 279-291.

n Zastrow, M. (2001) Role of endocytosis in signaling and regulation of G-protein-coupled receptors. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 500-504.

n 1.

il pengamatan dengan metode *hot plate test* pada mencit yang
 idapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan K252a 0.1
 i 1 nmol/mencit (i.c.v.)

| Perlakuan | BW | Waktu menunjukkan hewan coba merasakan panas (detik) | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|--|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Pre1 | Pre2 | Ave Pre | Pre 1 | Day 1 | Pre 3 | Day 3 | Pre 5 | Day 5 | Pre 7 | Day 7 | |
| A | 26.99 | 5.2 | 6.1 | 5.65 | 5.7 | 25.5 | 4.3 | 27.8 | 4.5 | 19.9 | 5.0 | 9.1 | |
| A | 24.97 | 4.0 | 3.3 | 3.65 | 3.6 | 27.7 | 4.0 | 18.6 | 5.4 | 10.8 | 3.4 | 8.1 | |
| A | 25.70 | 3.2 | 3.7 | 3.45 | 3.5 | 21.0 | 4.3 | 30.0 | 6.4 | 11.2 | 5.6 | 15.0 | |
| A | 26.28 | 3.5 | 3.6 | 3.55 | 3.5 | 20.7 | 3.2 | 14.0 | 3.9 | 10.2 | 3.4 | 8.2 | |
| A | 26.24 | 3.6 | 3.8 | 3.70 | 3.7 | 25.4 | 3.9 | 17.8 | 4.0 | 16.0 | 4.9 | 7.8 | |
| A | 25.12 | 3.8 | 3.2 | 3.50 | 3.5 | 20.2 | 4.6 | 13.5 | 3.1 | 9.7 | 4.7 | 8.7 | |
| A | 24.48 | 3.5 | 3.8 | 3.65 | 3.6 | 25.9 | 3.3 | 10.7 | 3.2 | 11.2 | 4.6 | 6.9 | |
| A | 25.58 | 5.1 | 4.0 | 4.55 | 4.5 | 21.5 | 3.7 | 15.9 | 4.8 | 10.3 | 4.7 | 6.8 | |
| B | 26.42 | 3.2 | 3.2 | 3.20 | 3.0 | 30.0 | 2.9 | 18.0 | 4.3 | 10.3 | 3.9 | 9.3 | |
| B | 25.06 | 3.5 | 5.0 | 4.25 | 3.5 | 30.0 | 4.0 | 25.6 | 3.1 | 26.7 | 3.2 | 16.0 | |
| B | 25.82 | 3.7 | 3.9 | 3.80 | 2.7 | 22.4 | 4.0 | 23.0 | 3.0 | 16.1 | 4.0 | 11.4 | |
| B | 24.76 | 4.0 | 3.2 | 3.60 | 3.7 | 22.9 | 4.0 | 10.2 | 2.7 | 12.9 | 2.1 | 7.7 | |
| B | 24.10 | 4.2 | 4.5 | 4.35 | 4.0 | 18.8 | 2.7 | 27.4 | 3.7 | 12.1 | 3.9 | 8.5 | |
| B | 23.24 | 3.1 | 2.7 | 2.90 | 3.1 | 20.1 | 4.5 | 15.9 | 3.8 | 14.8 | 2.8 | 11.4 | |
| C | 26.96 | 4.8 | 6.0 | 5.40 | 5.4 | 30.0 | 5.0 | 16.6 | 4.9 | 14.8 | 5.6 | 8.7 | |
| C | 24.76 | 3.6 | 3.6 | 3.60 | 3.6 | 30.0 | 4.7 | 30.0 | 3.5 | 23.6 | 6.1 | 21.1 | |
| C | 24.10 | 3.7 | 3.8 | 3.75 | 3.8 | 22.4 | 4.0 | 30.0 | 4.9 | 26.1 | 5.4 | 22.2 | |
| C | 23.24 | 3.5 | 3.6 | 3.55 | 3.5 | 22.9 | 4.4 | 27.1 | 3.7 | 26.3 | 3.7 | 25.0 | |
| C | 25.13 | 3.2 | 4.4 | 3.80 | 3.8 | 18.8 | 3.8 | 14.8 | 2.7 | 14.9 | 4.2 | 18.8 | |
| C | 23.61 | 4.1 | 3.9 | 4.00 | 4.0 | 20.1 | 4.0 | 10.9 | 3.8 | 21.9 | 3.2 | 13.7 | |
| C | 24.51 | 4.8 | 4.2 | 4.50 | 4.5 | 30.0 | 5.4 | 28.4 | 3.9 | 24.8 | 5.9 | 30.0 | |
| C | 27.13 | 3.2 | 3.3 | 3.25 | 3.2 | 19.8 | 4.5 | 13.0 | 3.9 | 14.4 | 5.0 | 10.0 | |

gan: A: Vehikel-morfin 10 mg
 B: K252a 0.1 nmol/mencit - morfin 10 mg
 C: K252a 1.0 nmol/mencit - morfin 10 mg

Rata-rata hasil pengamatan

| | n | X | SD | SE |
|--------------------------------|---|--------|--------|--------|
| Veh-Morphine10, % Day 1 | 8 | 75.038 | 11.015 | 3.894 |
| Veh-Morphine10, % Day 3 | 8 | 56.286 | 26.124 | 9.236 |
| Veh-Morphine10, % Day 5 | 8 | 31.148 | 14.458 | 5.112 |
| Veh-Morphine10, % day 7 | 8 | 16.920 | 9.525 | 3.367 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 1 | 8 | 78.156 | 18.795 | 6.645 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 3 | 8 | 66.303 | 31.997 | 11.313 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 5 | 8 | 64.971 | 20.206 | 7.144 |
| K252a(1)-Morphine 10, % day 7 | 8 | 55.064 | 29.771 | 10.525 |
| K252a(0.1)-Morphine10, % Day 1 | 6 | 77.548 | 18.380 | 7.504 |
| K252a(0.1)-Morphine10, % Day 3 | 6 | 61.817 | 25.187 | 10.282 |
| K252a(0.1)-Morphine10, % Day 5 | 6 | 45.147 | 22.562 | 9.211 |
| K252a(0.1)-Morphine10, % day 7 | 6 | 27.704 | 11.200 | 4.572 |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Anova

| | | | F | P | | | |
|---------------------------|----|-----------|----------|--------|--------|--------|-------|
| | 2 | 7345.568 | 3672.784 | 3.571 | .0483 | 7.141 | .585 |
| | 19 | 19544.258 | 1028.645 | | | | |
| グループ名称未設定のコンパ外変数 #1 | 3 | 22856.643 | 7618.881 | 29.116 | <.0001 | 87.349 | 1.000 |
| グループ名称未設定のコンパ外変数 #1 * Gro | 6 | 3832.389 | 638.732 | 2.441 | .0360 | 14.646 | .785 |
| グループ名称未設定のコンパ外変数 #1 * 対象 | 57 | 14915.150 | 261.669 | | | | |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|--|---------|--------|-------|---|
| Veh-Morphine10, K252a(1)-Morphine 10 | -21.276 | 21.048 | .0157 | S |
| Veh-Morphine10, K252a(0.1)-Morphine10 | -8.206 | 22.735 | .3553 | |
| K252a(1)-Morphine 10, K252a(0.1)-Morph | 13.070 | 22.735 | .1477 | □ |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0167.

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|------------------|--------|--------|--------|---|
| % Day 1, % Day 3 | 15.419 | 13.332 | .0025 | S |
| % Day 1, % Day 5 | 29.591 | 13.332 | <.0001 | S |
| % Day 1, % day 7 | 43.124 | 13.332 | <.0001 | S |
| % Day 3, % Day 5 | 14.172 | 13.332 | .0052 | S |
| % Day 3, % day 7 | 27.705 | 13.332 | <.0001 | S |
| % Day 5, % day 7 | 13.533 | 13.332 | .0075 | S |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0083.

n 2.

il pengamatan dengan metode *tail flick test* pada mencit yang dapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan K252a 0.1 (1 nmol/mencit (i.c.v.)

| Perlakuan | BW | Waktu menunjukkan hewan coba merasakan panas (detik) | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|--|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Pre1 | Pre2 | Ave Pre | Pre 1 | Day 1 | Pre 3 | Day 3 | Pre 5 | Day 5 | Pre 7 | Day 7 | |
| A | 26.99 | 3.5 | 3.0 | 3.25 | 3.2 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 3.8 | 8.3 | |
| A | 24.97 | 4.2 | 2.5 | 3.35 | 3.4 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.7 | 4.9 | 3.2 | 5.2 | |
| A | 25.70 | 3.3 | 3.5 | 3.40 | 3.4 | 10.0 | 3.3 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.0 | 8.9 | |
| A | 26.28 | 3.2 | 2.8 | 3.00 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 8.7 | 2.4 | 9.8 | 2.8 | 6.4 | |
| A | 26.24 | 2.5 | 3.2 | 2.85 | 2.9 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 2.8 | 4.4 | 2.3 | 6.4 | |
| A | 25.12 | 3.3 | 2.2 | 2.75 | 2.8 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.4 | 6.1 | |
| A | 24.48 | 2.3 | 3.1 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 3.2 | 8.7 | 2.9 | 7.6 | 2.9 | 5.1 | |
| A | 25.58 | 2.4 | 3.0 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 2.0 | 10.0 | 2.5 | 8.3 | 2.3 | 5.2 | |
| B | 26.42 | 3.2 | 3.2 | 3.20 | 3.0 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 4.3 | 9.3 | 3.9 | 7.3 | |
| B | 25.06 | 3.5 | 5.0 | 4.25 | 3.5 | 10.0 | 4.0 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | |
| B | 25.82 | 3.7 | 3.9 | 3.80 | 2.7 | 10.0 | 4.0 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 4.0 | 6.0 | |
| B | 24.76 | 4.0 | 3.2 | 3.60 | 3.7 | 10.0 | 4.0 | 10.0 | 2.7 | 10.0 | 2.1 | 10.0 | |
| B | 24.10 | 4.2 | 4.5 | 4.35 | 4.0 | 10.0 | 2.7 | 10.0 | 3.7 | 10.0 | 3.9 | 10.0 | |
| B | 23.24 | 3.1 | 2.7 | 2.90 | 3.1 | 10.0 | 4.5 | 9.5 | 3.8 | 8.0 | 2.8 | 6.0 | |
| C | 26.96 | 2.6 | 2.6 | 2.60 | 2.6 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 2.6 | 7.3 | |
| C | 24.76 | 3.6 | 3.3 | 3.45 | 3.5 | 10.0 | 3.8 | 10.0 | 2.7 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | |
| C | 24.10 | 2.7 | 2.5 | 2.60 | 2.6 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | |
| C | 23.24 | 2.3 | 2.9 | 2.60 | 2.6 | 10.0 | 3.5 | 10.0 | 2.0 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | |
| C | 25.13 | 3.3 | 2.8 | 3.05 | 3.0 | 10.0 | 3.9 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.7 | 10.0 | |
| C | 23.61 | 3.2 | 2.7 | 2.95 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.7 | 10.0 | 3.6 | 10.0 | |
| C | 24.51 | 3.4 | 3.8 | 3.60 | 3.6 | 10.0 | 3.7 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 6.4 | |
| C | 27.13 | 3.5 | 3.1 | 3.30 | 3.3 | 10.0 | 3.9 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 3.5 | 10.0 | |

Perlakuan: A: Vehikel-morfin 10 mg
 B: K252a 0.1 nmol/mencit - morfin 10 mg
 C: K252a 1.0 nmol/mencit - morfin 10 mg

Rata-rata hasil pengamatan

| | n | X | SD | SE |
|---------------------------------|---|---------|--------|--------|
| Veh-Morphine10, % Day 1 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| Veh-Morphine10, % Day 3 | 8 | 95.289 | 8.725 | 3.085 |
| Veh-Morphine10, % Day 5 | 8 | 74.157 | 32.184 | 11.379 |
| Veh-Morphine10, % day 7 | 8 | 49.885 | 19.698 | 6.964 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 1 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 3 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| K252a(1)-Morphine 10, % Day 5 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| K252a(1)-Morphine 10, % day 7 | 8 | 89.011 | 20.737 | 7.331 |
| K252a(0.1)-Morphine 10, % Day 1 | 6 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| K252a(0.1)-Morphine 10, % Day 3 | 6 | 98.485 | 3.711 | 1.515 |
| K252a(0.1)-Morphine 10, % Day 5 | 6 | 92.577 | 13.121 | 5.357 |
| K252a(0.1)-Morphine 10, % day 7 | 6 | 72.253 | 31.211 | 12.742 |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Anova

| | | F | P | | | | |
|--|----|-----------|----------|--------|--------|--------|-------|
|) | 2 | 4946.391 | 2473.196 | 7.015 | .0052 | 14.029 | .891 |
| - 名称未設定の JPA 外変数 #1 | 19 | 6699.081 | 352.583 | | | | |
| - 名称未設定の JPA 外変数 #1 * Gro <input type="checkbox"/> | 3 | 11812.687 | 3937.562 | 17.798 | <.0001 | 53.393 | 1.000 |
| - 名称未設定の JPA 外変数 #1 * 対象o <input type="checkbox"/> | 6 | 4106.265 | 684.378 | 3.093 | .0108 | 18.560 | .889 |
| | 57 | 12610.812 | 221.242 | | | | |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bonferroni/Dunn

Bonferroni/Dunn : 名称未設定の JPA 外変数 #1

効果 : Group

有意水準 : 5 %

行の除外: Tol/TKI-mrp(TF)

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|---|---------|--------|-------|---|
| Veh-Morphine10, K252a(1)-Morphine 10 | -17.420 | 12.323 | .0015 | S |
| Veh-Morphine10, K252a(0.1)-Morphine 10 | -10.996 | 13.310 | .0430 | |
| K252a(1)-Morphine 10, K252a(0.1)-Morph <input type="checkbox"/> | 6.424 | 13.310 | .2205 | |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています :

p値<.0167.

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|------------------|--------|--------|--------|---|
| % Day 1, % Day 3 | 2.126 | 12.259 | .6372 | |
| % Day 1, % Day 5 | 11.422 | 12.259 | .0136 | |
| % Day 1, % day 7 | 29.787 | 12.259 | <.0001 | S |
| % Day 3, % Day 5 | 9.295 | 12.259 | .0427 | |
| % Day 3, % day 7 | 27.661 | 12.259 | <.0001 | S |
| % Day 5, % day 7 | 18.365 | 12.259 | .0001 | S |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0083.

13.

1 pengamatan dengan metode *hot plate test* pada mencit yang dapat morfin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan genistein 1 10 nmol/mencit (i.c.v.)

| Perlakuan | BW | Waktu menunjukkan hewan coba merasakan panas (detik) | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|--|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Pre1 | Pre2 | Ave Pre | Pre 1 | Day 1 | Pre 3 | Day 3 | Pre 5 | Day 5 | Pre 7 | Day 7 |
| A | 26.99 | 3.5 | 3.0 | 3.25 | 3.2 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 3.8 | 8.3 |
| A | 24.97 | 4.2 | 2.5 | 3.35 | 3.4 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.7 | 4.9 | 3.2 | 5.2 |
| A | 25.70 | 3.3 | 3.5 | 3.40 | 3.4 | 10.0 | 3.3 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.0 | 8.9 |
| A | 26.28 | 3.2 | 2.8 | 3.00 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 8.7 | 2.4 | 9.8 | 2.8 | 6.4 |
| A | 26.24 | 2.5 | 3.2 | 2.85 | 2.9 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 2.8 | 4.4 | 2.3 | 6.4 |
| A | 25.12 | 3.3 | 2.2 | 2.75 | 2.8 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.4 | 6.1 |
| A | 24.48 | 2.3 | 3.1 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 3.2 | 8.7 | 2.9 | 7.6 | 2.9 | 5.1 |
| A | 25.58 | 2.4 | 3.0 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 2.0 | 10.0 | 2.5 | 8.3 | 2.3 | 5.2 |
| D | 26.42 | 4.5 | 5.5 | 5.00 | 5.0 | 23.2 | 5.8 | 24.1 | 7.9 | 21.1 | 6.8 | 14.4 |
| D | 25.06 | 4.5 | 3.8 | 4.15 | 4.2 | 29.5 | 5.6 | 24.6 | 4.5 | 18.2 | 4.5 | 16.7 |
| D | 25.82 | 3.2 | 3.0 | 3.10 | 3.1 | 20.8 | 5.5 | 9.0 | 5.0 | 10.3 | 4.8 | 9.3 |
| D | 26.40 | 5.0 | 4.1 | 4.55 | 4.5 | 23.6 | 4.4 | 18.0 | 4.5 | 26.7 | 3.6 | 16.0 |
| D | 25.86 | 4.1 | 3.7 | 3.90 | 3.9 | 25.2 | 4.3 | 25.6 | 4.4 | 16.1 | 4.8 | 11.4 |
| D | 26.16 | 4.4 | 3.6 | 4.00 | 4.0 | 30.0 | 3.1 | 23.0 | 3.3 | 12.9 | 3.3 | 7.7 |
| D | 26.39 | 3.6 | 4.1 | 3.85 | 3.8 | 21.1 | 3.4 | 10.2 | 5.3 | 12.1 | 4.4 | 8.5 |
| D | 25.86 | 5.2 | 4.4 | 4.80 | 4.8 | 28.4 | 4.8 | 27.4 | 4.5 | 14.8 | 5.4 | 11.4 |
| D | 25.62 | 4.0 | 5.2 | 4.60 | 4.6 | 22.3 | 4.2 | 15.9 | 7.5 | 12.4 | 4.5 | 8.5 |
| E | 25.51 | 4.5 | 4.0 | 4.25 | 4.2 | 23.6 | 3.4 | 22.6 | 5.1 | 15.5 | 4.7 | 18.7 |
| E | 27.80 | 3.1 | 4.0 | 3.55 | 3.5 | 30.0 | 3.9 | 30.0 | 5.0 | 29.5 | 5.1 | 23.8 |
| E | 23.82 | 4.5 | 4.6 | 4.55 | 4.5 | 30.0 | 4.5 | 20.0 | 4.7 | 23.8 | 4.5 | 22.2 |
| E | 23.23 | 3.7 | 5.3 | 4.50 | 4.5 | 17.6 | 4.2 | 10.6 | 3.5 | 16.9 | 3.8 | 8.7 |
| E | 24.37 | 3.3 | 4.4 | 3.85 | 3.9 | 14.5 | 4.1 | 8.8 | 4.6 | 11.8 | 3.0 | 9.3 |
| E | 26.54 | 4.2 | 4.8 | 4.50 | 4.5 | 30.0 | 3.7 | 19.6 | 4.1 | 17.7 | 4.2 | 15.8 |
| E | 25.47 | 3.7 | 4.5 | 4.10 | 4.1 | 23.8 | 4.5 | 21.2 | 3.3 | 17.9 | 3.5 | 19.7 |
| E | 25.58 | 4.2 | 5.5 | 4.85 | 4.8 | 14.7 | 3.7 | 16.0 | 3.8 | 13.4 | 3.4 | 16.2 |

gan: A: Vehikel-morfin 10 mg;
 D: Genistein 1 nmol/mencit - morfin 10 mg
 E: Genistein 10 nmol/mencit - morfin 10 mg

Rata-rata=hasil-pengamatan

| | n | X | SD | SE |
|------------------------------|---|--------|--------|-------|
| Veh-Morphine10, % Day 1 | 8 | 75.038 | 11.015 | 3.894 |
| Veh-Morphine10, % Day 3 | 8 | 56.286 | 26.124 | 9.236 |
| Veh-Morphine10, % Day 5 | 8 | 31.148 | 14.458 | 5.112 |
| Veh-Morphine10, % day 7 | 8 | 16.920 | 9.525 | 3.367 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 1 | 9 | 80.270 | 13.684 | 4.561 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 3 | 9 | 59.817 | 26.694 | 8.898 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 5 | 9 | 43.675 | 21.097 | 7.032 |
| Genis1-Morphine 10, % day 7 | 9 | 27.132 | 12.829 | 4.276 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 1 | 8 | 72.809 | 26.335 | 9.311 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 3 | 8 | 56.079 | 26.245 | 9.279 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 5 | 8 | 54.751 | 22.415 | 7.925 |
| Genis10-Morphine 10, % day 7 | 8 | 49.512 | 20.273 | 7.168 |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Anova

F P

| | | | | | | |
|----|-----------|----------|--------|--------|---------|-------|
| 2 | 2920.770 | 1460.385 | 1.386 | .2710 | 2.772 | .257 |
| 22 | 23178.144 | 1053.552 | | | | |
| 3 | 27856.103 | 9285.368 | 48.282 | <.0001 | 144.846 | 1.000 |
| 6 | 4100.933 | 683.489 | 3.554 | .0041 | 21.324 | .939 |
| 66 | 12692.795 | 192.315 | | | | |

詳)

ー名称未設定の「外変数 #1

ー名称未設定の「外変数 #1 * Gro

ー名称未設定の「外変数 #1 * 対象

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 |
|---|---------|--------|-------|
| Veh-Morphine10, Genis1-Morphine 10 | -7.875 | 20.434 | .3288 |
| Veh-Morphine10, Genis10-Morphine 10 | -13.440 | 21.027 | .1119 |
| Genis1-Morphine 10, Genis10-Morphine 10 | -5.564 | 20.434 | .4878 |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：

p値<.0167.

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|------------------|--------|--------|--------|---|
| % Day 1, % Day 3 | 18.717 | 10.669 | <.0001 | S |
| % Day 1, % Day 5 | 32.998 | 10.669 | <.0001 | S |
| % Day 1, % day 7 | 45.182 | 10.669 | <.0001 | S |
| % Day 3, % Day 5 | 14.280 | 10.669 | .0005 | S |
| % Day 3, % day 7 | 26.465 | 10.669 | <.0001 | S |
| % Day 5, % day 7 | 12.185 | 10.669 | .0028 | S |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0083.

n 4.

l pengamatan dengan metode *tail flick test* pada mencit yang mendapat fin 10 mg (s.c.) atau praperlakuan dengan genistein 1 atau 10 nmol/mencit .)

| Perlakuan | BW | Waktu menunjukkan hewan coba merasakan panas (detik) | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|--|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Pre1 | Pre2 | Ave Pre | Pre 1 | Day 1 | Pre 3 | Day 3 | Pre 5 | Day 5 | Pre 7 | Day 7 | |
| A | 26.99 | 3.5 | 3.0 | 3.25 | 3.2 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 3.8 | 8.3 | |
| A | 24.97 | 4.2 | 2.5 | 3.35 | 3.4 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.7 | 4.9 | 3.2 | 5.2 | |
| A | 25.70 | 3.3 | 3.5 | 3.40 | 3.4 | 10.0 | 3.3 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.0 | 8.9 | |
| A | 26.28 | 3.2 | 2.8 | 3.00 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 8.7 | 2.4 | 9.8 | 2.8 | 6.4 | |
| A | 26.24 | 2.5 | 3.2 | 2.85 | 2.9 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 2.8 | 4.4 | 2.3 | 6.4 | |
| A | 25.12 | 3.3 | 2.2 | 2.75 | 2.8 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | 3.4 | 6.1 | |
| A | 24.48 | 2.3 | 3.1 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 3.2 | 8.7 | 2.9 | 7.6 | 2.9 | 5.1 | |
| A | 25.58 | 2.4 | 3.0 | 2.70 | 2.7 | 10.0 | 2.0 | 10.0 | 2.5 | 8.3 | 2.3 | 5.2 | |
| D | 26.42 | 3.0 | 3.4 | 3.20 | 3.2 | 10.0 | 3.4 | 8.8 | 3.0 | 10.0 | 3.3 | 10.0 | |
| D | 25.06 | 2.7 | 3.2 | 2.95 | 3.0 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 2.6 | 8.6 | 3.3 | 6.2 | |
| D | 25.82 | 3.7 | 2.2 | 2.95 | 3.0 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.8 | 9.1 | 2.9 | 10.0 | |
| D | 26.40 | 2.8 | 3.6 | 3.20 | 3.2 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 3.4 | 10.0 | |
| D | 25.86 | 3.1 | 2.7 | 2.90 | 2.9 | 10.0 | 3.5 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 2.8 | 10.0 | |
| D | 26.16 | 2.2 | 2.6 | 2.40 | 2.4 | 10.0 | 3.9 | 8.4 | 1.9 | 8.3 | 2.4 | 4.5 | |
| D | 26.39 | 2.5 | 2.4 | 2.45 | 2.5 | 10.0 | 3.6 | 10.0 | 3.5 | 8.8 | 2.6 | 9.7 | |
| D | 25.86 | 2.8 | 3.3 | 3.05 | 3.0 | 10.0 | 3.7 | 10.0 | 3.2 | 10.0 | 3.1 | 8.4 | |
| D | 25.62 | 3.6 | 2.8 | 3.20 | 3.2 | 10.0 | 4.1 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | 3.4 | 6.8 | |
| E | 25.51 | 3.0 | 2.6 | 2.80 | 2.8 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 2.7 | 8.5 | 2.9 | 10.0 | |
| E | 27.80 | 4.2 | 4.0 | 4.10 | 4.1 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.6 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | |
| E | 23.82 | 3.2 | 2.6 | 2.90 | 2.9 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.7 | 8.9 | 3.4 | 10.0 | |
| E | 23.23 | 2.6 | 3.9 | 3.25 | 3.2 | 10.0 | 3.5 | 10.0 | 3.5 | 9.4 | 3.4 | 9.8 | |
| E | 24.37 | 2.9 | 3.7 | 3.30 | 3.3 | 10.0 | 2.8 | 10.0 | 2.0 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | |
| E | 26.54 | 3.6 | 3.5 | 3.55 | 3.5 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 2.6 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | |
| E | 25.47 | 3.0 | 3.1 | 3.05 | 3.0 | 10.0 | 2.9 | 10.0 | 2.8 | 10.0 | 2.5 | 10.0 | |
| E | 25.58 | 3.0 | 4.3 | 3.65 | 3.6 | 10.0 | 3.0 | 10.0 | 3.5 | 10.0 | 3.1 | 10.0 | |

gan: A: Vehikel-morfin 10 mg;
 D: Genistein 1 nmol/mencit - morfin 10 mg
 E: Genistein 10 nmol/mencit - morfin 10 mg

Rata-rata hasil pengamatan

| | n | X | SD | SE |
|------------------------------|---|---------|--------|--------|
| Veh-Morphine10, % Day 1 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| Veh-Morphine10, % Day 3 | 8 | 95.289 | 8.725 | 3.085 |
| Veh-Morphine10, % Day 5 | 8 | 74.157 | 32.184 | 11.379 |
| Veh-Morphine10, % day 7 | 8 | 49.885 | 19.698 | 6.964 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 1 | 9 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 3 | 9 | 95.065 | 9.996 | 3.332 |
| Genis1-Morphine 10, % Day 5 | 9 | 92.126 | 9.601 | 3.200 |
| Genis1-Morphine 10, % day 7 | 9 | 77.243 | 28.935 | 9.645 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 1 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 3 | 8 | 100.000 | 0.000 | 0.000 |
| Genis10-Morphine 10, % Day 5 | 8 | 94.394 | 8.307 | 2.937 |
| Genis10-Morphine 10, % day 7 | 8 | 99.621 | 1.071 | .379 |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Anova

| | 自由度 | 平方和 | 平均平方 | F値 | p値 | ラムダ | 検出力 |
|---|-----|-----------|----------|--------|--------|--------|-------|
| | 2 | 5664.418 | 2832.209 | 8.945 | .0014 | 17.891 | .961 |
| | 22 | 6965.440 | 316.611 | | | | |
| 名称未設定の因子外変数 #1 | 3 | 9056.990 | 3018.997 | 16.252 | <.0001 | 48.756 | 1.000 |
| 名称未設定の因子外変数 #1 * Gro <input type="checkbox"/> | 6 | 6386.104 | 1064.351 | 5.730 | <.0001 | 34.378 | .997 |
| 名称未設定の因子外変数 #1 * 対象 <input type="checkbox"/> | 66 | 12260.217 | 185.761 | | | | |

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|---|---------|--------|-------|---|
| Veh-Morphine10, Genis1-Morphine 10 | -11.276 | 11.202 | .0160 | S |
| Veh-Morphine10, Genis10-Morphine 10 | -18.671 | 11.527 | .0004 | S |
| Genis1-Morphine 10, Genis10-Morphine 10 | -7.395 | 11.202 | .1012 | |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0167.

Hasil analisis statistik dengan menggunakan Bunferroni/Dunn

| | 平均値の差 | 棄却値 | p値 | |
|------------------|--------|--------|--------|---|
| % Day 1, % Day 3 | 3.284 | 10.486 | .3974 | |
| % Day 1, % Day 5 | 12.898 | 10.486 | .0014 | S |
| % Day 1, % day 7 | 24.350 | 10.486 | <.0001 | S |
| % Day 3, % Day 5 | 9.614 | 10.486 | .0151 | |
| % Day 3, % day 7 | 21.066 | 10.486 | <.0001 | S |
| % Day 5, % day 7 | 11.452 | 10.486 | .0041 | S |

この表内の比較は、次のp値を基準として比較しています：
p値<.0083.

