

SIGNAL TRANSDUKSI DARI FORSKOLIN PADA KONTRAKSI OTOT JANTUNG

PAMERAN

01 DEC 1998

Ketua Peneliti :

Drh. TUTIK JUNIASTUTI.

SELESAI

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan
DIP Nomor : 172/XXIII/3/--/1997 Tanggal 31 Maret 1997
Kontrak Nomor : 085/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1997
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud
Nomor Urut : 22

- *CARDIOVASCULAR SYSTEMS*
- *FORSKOLIN*

1000
100

636.089 61

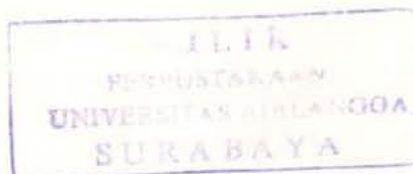
Jun
S-1

SIGNAL TRANSDUKSI DARI FORSKOLIN PADA KONTRAKSI OTOT JANTUNG

Ketua Peneliti :

Drh. TUTIK JUNIASTUTI.

3000 336 983141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan

DIP Nomor : 172/XXIII/3/--/1997 Tanggal 31 Maret 1997

Kontrak Nomor : 085/P2 IPT/DPPM/LITMUD/V/1997

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud

Nomor Urut : 22

Laporan Penelitian

**SIGNAL TRANSDUKSI DARI FORSKOLIN
PADA KONTRAKSI OTOT JANTUNG**

Peneliti :

Tutik Juniastuti, Drh.

Sri Agus Sudjarwo, PhD., Drh.

Iwan Sahrial Hamid, Drh.

3000 336 983141



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Oleh : DP3M – LITMUD 1997/1998

No. 085/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997 Tgl. 20 Mei 1997

No. Urut : 22



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | 10. Puslit / Kesehatan Reproduksi |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum | 7. Puslit Olahraga | |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C, Jl. Mulyorejo Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995246, Surabaya 60115

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
 LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. a. Judul Penelitian | : Signal Transduksi dari Forskolin Pada Kontraksi Otot Jantung |
| b. Macam Penelitian | : <input checked="" type="checkbox"/> Fundamental, <input type="checkbox"/> Terapan, <input type="checkbox"/> Pengembangan, <input type="checkbox"/> Institusional. |
| c. Kategori Penelitian | : <input type="checkbox"/> I, <input checked="" type="checkbox"/> II, <input type="checkbox"/> III, <input type="checkbox"/> IV. |
| 2. Kepala Proyek Penelitian | |
| a. Nama Lengkap dengan Gelar | : Tutik Juniastuti, Drh. |
| b. Jenis Kelamin | : ♀ / P |
| c. Pangkat/Golongan dan NIP | : Penata Muda Tk I/IIIb/132 0149 018 |
| d. Jabatan Sekarang | : Asisten Ahli / Staf Pengajar |
| e. Fakultas / Jurusan | : Kedokteran Hewan |
| f. Univ. / Inst. / Akademi | : Universitas Airlangga |
| g. Bidang Ilmu yang Diteliti | : Farmakologi |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | : 3 (tiga) orang |
| 4. Lokasi Penelitian | : Lab. Farmakologi FK Unair |
| 5. Kerjasama dengan Instansi lain | |
| a. Nama Instansi | : - |
| b. A l a m a t | : - |
| 6. Jangka Waktu Penelitian | : 6 (enam) bulan |
| 7. Biaya yang Diperlukan | : Rp. 5.000.000,00 |
| 8. Seminar Hasil Penelitian | : |
| a. Dilaksanakan Tanggal | : 20 Januari 1998 |
| b. Hasil Penelitian | : <input type="checkbox"/> Baik Sekali <input checked="" type="checkbox"/> Baik <input type="checkbox"/> Kurang <input type="checkbox"/> Sedang |

Mengetahui
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair,

DR. Ismudiono, MS, Drh.

NIP. 130 687 297

Surabaya, 9 Maret 1998

Ketua Peneliti,

Tutik Juniastuti Drh.

NIP. 132 049 018

Menyetujui
 Ketua Lembaga Penelitian Unair,

Prof. Dr. Noor Cholies Zaini
 NIP. 130 355 372

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian	: Signal Transduksi dari Forskolin pada Kontraksi Otot Jantung
Ketua Peneliti	: Tutik Juniastuti, Drh.
Anggota Peneliti	: - Sri Agus Sudjarwo, PhD., Drh. - Iwan Sahrial Hamid, Drh.
Fakultas/Puslit	: Kedokteran Hewan UNAIR
Sumber Biaya	: DP3M - LITMUD 1997/1998 No. 085/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997 Tgl. 20 Mei 1997, No. Urut : 22

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan signal transduksi dari kontraksi yang disebabkan oleh forskolin pada otot jantung kelinci

Sejumlah 30 ekor kelinci jantan, berat badan 2 – 2,5 kg dengan umur 6 – 8 bulan digunakan sebagai hewan percobaan. Kelinci tersebut dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan perincian sebagai berikut : Jantung dari 6 ekor kelinci, masing-masing diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M (Perlakuan I). Jantung dari 6 ekor kelinci diberi Amiloride dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M (Perlakuan II), Jantung dari 6 ekor kelinci diberi Verapamil dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M (Perlakuan III), Jantung dari 6 ekor kelinci masing-masing diberi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA 5mM kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M (Perlakuan IV) dan Jantung dari 6 ekor kelinci, diberi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA 5 mM dan Ryanodine dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M (Perlakuan V).

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Analisa Varian (Uji F) yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa verapamil, larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dengan ryanodin dapat menghambat kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin. Dan juga amiloride dapat menghambat kontraksi ini walaupun tidak berbeda nyata.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa forskolin secara langsung dapat mengaktifkan adenilat siklase sehingga dapat meningkatkan produksi siklik AMP. Peningkatan siklik AMP ini akan membuka kanal kalsium yang dapat mengakibatkan masuknya ion kalsium ke dalam sel. Masuknya ion kalsium ke dalam sel ini juga karena adanya pertukaran ion kalsium dan natrium yang disebabkan oleh siklik AMP. Siklik AMP juga dapat menyebabkan pelepasan ion kalsium dari sarkoplasmik retikulum melalui ryanodine receptor (calcium release channel). Masuknya ion kalsium ke dalam sel (kalsium influk) dan pelepasan kalsium (kalsium release) menyebabkan peningkatan kalsium myoplasmik yang dapat mempengaruhi myofibril dari otot jantung untuk mengadakan kontraksi.

SUMMARY

**THE SIGNAL TRANSDUCTION OF CONTRACTION INDUCED BY
FORSKOLIN IN CARDIAC MUSCLE**

Tutik Juniastuti, Sri Agus Sudjarwo and Iwan Sahrial Hamid

Departement of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine

Airlangga University, Surabaya

The signal transduction of contraction induced by forskolin were studied on isolated cardiac muscle of rabbit. Forskolin induced concentration-dependent contraction in cardiac muscle. Verapamil at 1 μ M inhibited the increases in cardiac muscle tension induced by forskolin, suggesting that inhibitory effect is mainly due to a decrease calcium influx than Na^+ - Ca^{2+} exchange. In calcium -- free 5 mM EGTA containing solution significantly inhibited cardiac muscle contraction induced by forskolin. Addition ryanodine in calcium -- free 5 mM EGTA -- containing solution more strongly inhibited cardiac muscle contraction induced by forskolin than in calcium -- free 5 mM EGTA -- containing solution. These results suggest than forskolin induced cardiac muscle contraction by increasing calcium influx from calcium extracellular and calcium release from sarcoplasmic reticulum. In conclusion, our results suggest that the contraction induced by forskolin in rabbit cardiac muscle is due to activation of adenylyl cyclase induced increase cyclic AMP intracellular. This effect may increase calcium influx and calcium release followed by an increase in myosin phosphorylation.

(Rest.Inst. Faculty Of Veterinary Medicine Airlangga University :
085/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997, 20 Mei 1997)

KATA PENGANTAR

Dengan rahmat dan karunia Allah SWT., penelitian yang berjudul "Signal transduksi dari forskolin pada kontraksi otot jantung" akhirnya dapat terselesaikan dengan baik.

Tim peneliti dengan prasarana dan sarana yang terbatas telah berusaha untuk dapat menjelaskan mengenai adanya interaksi dari kalsium intrasel dengan siklik AMP intrasel yang disebabkan oleh forskolin pada otot jantung, sehingga dari penelitian ini diharapkan dapat mengikuti perkembangan yang sangat pesat mengenai penelitian subseluler farmakologi pada saat ini.

Penelitian ini dapat terselenggara atas biaya : DP3M - LITMUD 1997/1998 No. 085/P2IPT/DPPM/LITMUD/V/1997 Tgl. 20 Mei 1997. Sehubungan dengan itu, tim peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Surabaya
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya
4. Semua pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini.

Akhir kata tim peneliti berharap semoga laporan dari hasil penelitian ini dapat berguna untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi

Surabaya, Desember 1997

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Hipotesa Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Forskolin	5
2.1.1. Kimia forskolin	5
2.1.2. Mekanisme kerja forskolin	6
2.1.3. Kinetik dari forskolin dalam meningkatkan siklik AMP pada sel	7
2.1.4. Efek forskolin pada jantung	8
2.2. Penghambat Kanal Kalsium	10
2.2.1. Klasifikasi dari penghambat kanal kalsium	11
2.2.2. Type dari <i>voltage-dependent calcium channel</i>	12
2.2.3. Mekanisme kerja penghambat kanal kalsium	13
2.3. Na^+ - Ca^+ Exchanger	14
2.3.1. Mekanisme kerja dari Na^+ - Ca^+ exchanger	15
2.3.2. Penghambat Na^+ - Ca^+ exchanger	15

2.4. Ryanodine	16
2.5. Kontraksi Otot Jantung	17
2.5.1. Peran kalsium pada kontraksi otot jantung	17
2.5.2. Peran siklik AMP pada kontraksi otot jantung	17
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
3.1. Tujuan Penelitian	19
3.1.1. Tujuan umum	19
3.1.2. Tujuan khusus	19
3.2. Manfaat Penelitian	19
IV. METODE PENELITIAN	20
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	20
4.2. Materi Penelitian	20
4.2.1. Bahan penelitian	20
4.2.2. Hewan percobaan	20
4.2.3. Alat penelitian	20
4.3. Metode Penelitian	20
4.4. Rancangan Penelitian dan Analisis Data Hasil Penelitian	22
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
5.1. Hasil Penelitian	23
5.1.1. Pengaruh pemberian forskolin pada otot jantung secara invitro ...	23
5.1.2. Efek amilorid pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	25

5.1.3. Efek verapamil pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	26
5.1.4. Efek larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA pada traksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	28
5.1.5. Efek kombinasi dari larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	30
5.2. Pembahasan	33
5.2.1 Efek forskolin pada kontraksi otot jantung terpisah dari kelinci ..	33
5.2.2. Efek amiloride pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	33
5.2.3. Efek verapamil pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	34
5.2.4 Efek inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA pada kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin	35
5.2.5. Efek inkubasi dari kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin pada kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin	36
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1. Kesimpulan	37
6.2. Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	23
Tabel 2. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan pretreatment 1 μ M Amiloride	25
Tabel 3. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan pretreatment 1 μ M Verapamil	27
Tabel 4. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah 5 mM EGTA	29
Tabel 5. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah 5 mM EGTA dan 1 μ M Ryanodin	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur kimia dari forskolin dan analognya	6
Gambar 2. Struktur kimia penghambat kanal kanal kalsium	10
Gambar 3. Struktur kimia penghambat $\text{Na}^+ - \text{Ca}^+$ Exchanger	16
Gambar 4. Reaksi yang dikatalisis oleh adenilat siklase dan phosphodiesterase.	18
Gambar 5. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin	24
Gambar 6. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment dan tanpa pretreatment Amiloride $1 \mu\text{M}$	26
Gambar 7. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment Amiloride $1 \mu\text{M}$, pretreatment Verapamil $1 \mu\text{M}$ dan tanpa pretreatment	27
Gambar 8. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment Amiloride $1 \mu\text{M}$, pretreatment Verapamil $1 \mu\text{M}$, inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan tanpa pretreatment	29
Gambar 9. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment Amiloride $1 \mu\text{M}$, pretreatment Verapamil $1 \mu\text{M}$, inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA, inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan Ryanodin dan tanpa pretreatment atau inkubasi	31

DAFTAR LAMPIRAN

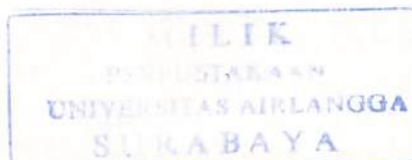
Lampiran 1. Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin.....	43
Lampiran 2. Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment Amiloride 1 μ M	44
Lampiran 3. Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment Verapamil 1 μ M	45
Lampiran 4. Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA	46
Lampiran 5. Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan Ryanodin	47

I. PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG MASALAH

Kalsium mempunyai peranan yang sangat penting pada aktivitas biologis dari berbagai macam sel, seperti pada proses kontraksi dari otot, pembentukan dan pelepasan transmitter dari sel endokrin dan neuron, pengaturan aktivitas enzim, pengaturan permeabilitas membran dll (Trautwein dan Pelzer, 1987). Telah dilaporkan bahwa adanya peningkatan kalsium intraselluler dapat menyebabkan kontraksi pada berbagai macam otot polos, otot rangka dan otot jantung (Endoh, 1991; Somylo, 1994) Kalsium intraselluler dapat meningkat karena adanya peningkatan kalsium influk (masuknya kalsium dari ekstrasel ke intrasel) melalui pembukaan kanal kalsium, kanal kalium, pertukaran ion kalsium dengan ion natrium dan juga karena adanya peningkatan pelepasan kalsium (kalsium release) dari tempat penyimpanannya didalam sel (pelepasan kalsium dari sarkoplasmik retikulum) melalui Ryanodin reseptor (Abe, 1992., Lynn, 1993). Didalam sel otot polos atau otot jantung, kalsium ini akan berikatan dengan kalmodulin atau troponin C menjadi kalsium kalmodulin atau kalsium troponin C kompleks yang dapat mengaktifkan enzim myosin light chain kinase, yang selanjutnya dapat menyebabkan terjadinya myosin phosphorilasi, kemudian myosin ini akan berinteraksi dengan aktin sehingga dapat terjadi kontraksi sel otot (Somylo, 1994).

Dengan diketemukannya penghambat kanal kalsium (Calcium channel blocker) tipe L seperti nifedipin (Dihydropyridine), verapamil (phenylalkylamin) yang dapat menghambat masuknya ion kalsium kedalam sel (kalsium influk) dan penghambat pelepasan kalsium seperti ryanodin, maka bahan-bahan ini dapat digunakan untuk membuktikan serta menjelaskan keterlibatan kalsium (kalsium influk dan kalsium release) pada proses kontraksi otot. Hagiwara at al. (1993) telah melakukan penelitian dengan



mengukur kalsium intrasel (kalsium influk dan kalsium release) dan kontraksi otot polos pembuluh darah secara bersamaan dengan alat Fluorimeter (CAF 100, Japan spectroscopic) dengan menggunakan indikator kalsium Fura 2 AM, yang hasilnya menunjukkan bahwa felodipin, nifedipin dan verapamil dapat menghambat kontraksi dengan cara menghambat kalsium influk melalaui L tipe kanal kalsium tanpa mempengaruhi pelepasan kalsium. Demikian juga pada otot jantung, inkubasi dengan verapamil dapat menyebabkan tertutupnya L tipe kanal kalsium sehingga dapat menghambat masuknya ion kalsium kedalam sel yang akhirnya dapat menghambat kontraksi, dan verapamil ini tidak mempengaruhi pelepasan kalsium dari sarkoplasmik retikulum (Callewaert et al, 1988). Sedangkan Shah et al, 1994 melaporkan bahwa pretreatment dengan ryanodin dapat menghambat pelepasan kalsium dari sarkoplasmik retikulum yang disebabkan oleh agonist seperti isoproterenol, phosphodiesterase inhibitor sehingga dapat menghambat kontraksi otot jantung. Dan juga dilaporkan bahwa kontraksi otot jantung dan otot polos pembuluh darah tergantung pada kalsium ekstrasel dan intrasel sedangkan otot rangka hanya tergantung pada kalsium intrasel. Hal ini telah terbukti bahwa pemakaian larutan ringer tanpa kalsium dan dengan menambah EGTA maka akan menghambat kalsium influk pada otot polos dan otot jantung sehingga dapat terjadi hambatan pada kontraksi otot polos (Sudjarwo et al, 1995) dan otot jantung (San-Andreas et al, 1994) , sedangkan pada otot rangka tidak terjadi hambatan pada kontraksi (Martin et al, 1989). Disamping kalsium, peningkatan siklik AMP intrasel juga mempunyai peranan yang penting pada kontraksi dan relaksasi otot. Pada otot polos pembuluh darah dan saluran pernapasan, peningkatan pembentukan siklik AMP intra sel dapat menyebabkan terjadinya relaksasi otot. Hal ini karena pembentukan siklik AMP yang meningkat dapat menyebabkan tertutupnya L tipe kanal kalsium sehingga dapat menghambat kalsium influk dan mengaktivasi kalsium sequestrasi. Hambatan kalsium influk dan aktivasi dari kalsium sequestrasi ini akan menyebabkan penurunan kalsium intrasel yang akhirnya dapat menghambat fosforilasi

dari myosin light chain sehingga dapat terjadi relaksasi (Abe 1989). Sebaliknya pada otot jantung, peningkatan pembentukan siklik AMP dapat menyebabkan kontraksi (Earl, 1986., Mubagwa, 1993). Alexander et al, 1986 melakukan penelitian dengan menganalisa siklik AMP dari otot jantung yang mengalami kontraksi akibat pemberian isoproterenol dan dibutyryl siklik AMP, yang hasilnya menunjukkan bahwa ada hubungan antara kontraksi dengan peningkatan siklik AMP. Hal ini karena isoproterenol melalui reseptor beta adrenergik akan mengaktivasi adenilat siklase sehingga dapat terjadi peningkatan siklik AMP sedangkan dibutyryl siklik AMP secara langsung (tanpa melalui reseptor) dapat mengaktivasi siklik AMP. Interaksi antara peningkatan kalsium intrasel dengan peningkatan siklik AMP intrasel pada relaksasi otot polos sudah diketahui dengan jelas, sedangkan pada kontraksi otot jantung belum diketahui. Oleh karena itu sangat perlu dilakukannya penelitian mengenai peran kalsium pada kontraksi otot jantung akibat adanya peningkatan pembentukan siklik AMP.

De Souza et al (1983) dari Hoechst pharmaceutical research di Bombay, India telah berhasil mengisolasi bahan aktif yang mempunyai efek kardiotonik dari akar tanaman *Coleus forskohlii* Briq yang diberi nama Forskolin. Forskolin ini merupakan salah satu senyawa yang dapat mengaktivasi secara langsung pada adenilat siklase sehingga dapat menyebabkan peningkatan pembentukan siklik AMP pada berbagai macam sel. Dengan diketemukannya Forskolin maka preparat ini telah dipakai secara luas sebagai bahan untuk meneliti mekanisme kerja dari siklik AMP diberbagai macam tipe dari sel (Abe, 1989). Pemberian Forskolin dapat menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah dan saluran pernapasan, hal ini karena forskolin dapat meningkatkan pembentukan siklik AMP yang dapat menghambat peningkatan kalsium intra sel. Sebaliknya pada otot jantung, forskolin dapat meningkatkan pembentukan siklik AMP sehingga dapat terjadi kontraksi otot jantung. Sedangkan peranan kalsium intrasel pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh peningkatan siklik AMP akibat pemberian Forskolin belum diketahui dengan jelas.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai interaksi antara kalsium intrasel dengan siklik AMP intrasel yang disebabkan oleh forskolin sehingga dapat diketahui signal transduksi dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang di atas maka pada penelitian ini terdapat masalah yang perlu diteliti yaitu :

1. Apakah kalsium ekstrasel dapat mempengaruhi kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin (aktivator siklik AMP)
2. Apakah forskolin dapat meningkatkan kalsium intrasel (kalsium influk dan kalsium release) sehingga dapat menyebabkan kontraksi otot jantung
3. Apakah forskolin dapat menyebabkan pertukaran ion kalsium dengan ion natrium sehingga dapat menyebabkan kontraksi otot jantung

1.3. HIPOTESA PENELITIAN

Peningkatan pembentukan siklik AMP yang disebabkan oleh forskolin dapat mengakibatkan ion kalsium ekstrasel melalui pembukaan kanal kalsium (kalsium influk), pelepasan ion kalsium dari sarkoplasmik retikulum (kalsium release) dan pertukaran ion kalsium dengan ion natrium sehingga dapat menyebabkan kontraksi pada otot jantung.

II. TINJAUAN PUSTAKA

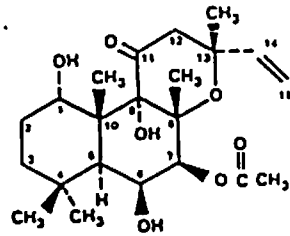
2.1. FORSKOLIN

DeSouza et al (1983) dari Hoechst Pharmaceutical research di Bombay, India, melakukan ekstraksi metanol dari akar tanaman *Coleus Forskohlii* Briq dan mensekrening khasiat farmakologi dari ekstrak ini. Pada tikus, pemberian ekstrak metanol dari akar tanaman *Coleus Forskohlii* Briq ini memperlihatkan efek hypotensi. Selanjutnya dari ekstrak metanol akar tanaman *Coleus Forskohlii*, telah berhasil diisolasi bahan aktifnya sebanyak 0,1 % dari berat kering akar tanaman, yang diberi nama Forskolin. Forskolin ini mempunyai efek pada berbagai macam sel seperti merangsang lipolysis pada adiposit tikus, menghambat agregasi platelet manusia, merangsang pertumbuhan tulang rawan dari embrio ayam, merangsang sekresi amilase pada kelenjar parotid tikus, mempunyai efek pada metabolime dan pembentukan vitamin D pada sel ginjal ayam, menyebabkan broncho dilatasi, menyebabkan relaksasi otot polos pembuluh darah, mempunyai efek inotropik positif (kontraksi) jantung terpisah dari guinea pig dll.

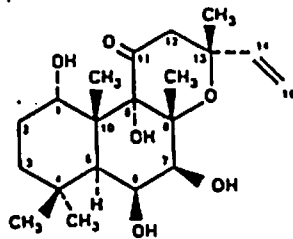
2.1.1. Kimia Forskolin

Dengan tehnik Spektroskopik NMR dan X ray Crystallographi, De Souza et al (1983) telah berhasil menentukan struktur kimia dari forskolin dan analog forskolin yang diisolasi dari akar tanaman *Coleus Forskohlii* Briq. Struktur kimia dari forskolin adalah 7 beta-acetoxy -8, 13 epoxy-1 alpha, 6beta, 9 alpha-trihydroxylabd-14-en-11-one, sedangkan struktur kimia dari analog forskolin adalah 7-desacetyl, 6-acetyi-7-desacetyl, 9-deoxy dan 1,9-dideoxy forskolin (Gambar 1).

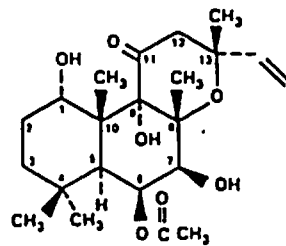
Forskolin mempunyai Berat Molekul 410 dengan komposisi $C_{22}H_{34}O_7$. Senyawa ini larut dalam pelarut organik dan kurang larut dalam air.



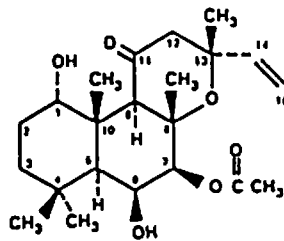
FORSKOLIN (I)



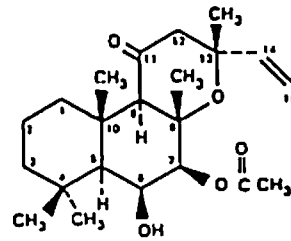
7-DESACETYLFORSKOLIN (II)



6-ACETYL-7-DESACETYLFORSKOLIN (III)



9-DEOXYFORSKOLIN (IV)



1,9-DIDEOXYFORSKOLIN (V)

Gambar.1. Struktur kimia dari forskolin dan analognya

2.1.2. Mekanisme Kerja Forskolin

Forskolin bekerja pada organ sasarannya dengan mengaktifasi adenilat siklase melalui katalitik subunit yang terdapat pada membran sel. Adenil siklase akan mengubah ATP menjadi 3,5-adenosin monophosphat siklik (siklik AMP). Peningkatan pembentukan

siklik AMP ini akan mempengaruhi fungsi dari sel organ sasaran. Forskolin dapat meningkatkan pembentukan siklik AMP intrasel pada hampir semua jaringan dari mamalia.

Dengan mengukur kalsium intrasel dan kontraksi secara bersamaan pada otot polos pembuluh darah dan saluran pernapasan, forskolin yang merupakan salah satu aktivator adenilat siklase, dapat meningkatkan pembentukan siklik AMP intrasel. Peningkatan siklik AMP ini akan menghambat kalsium influk melalui L tipe kanal kalsium dan mengaktivasi kalsium sequestrasi yang menghasilkan penurunan kalsium intrasel dan akhirnya akan menyebabkan vasodilatasi maupun bronchodilatasi (Abe et al, 1989; Tajimi et al, 1995). Peningkatan siklik AMP ini juga dapat menghambat fosforilasi dari myosin tanpa mempengaruhi aktivitas myosin light chain kinase (Stull et al, 1990). Sedangkan pada otot jantung terpisah, forskolin dapat menyebabkan kontraksi otot jantung (efek inotropik positif). Hal ini karena forskolin dapat menyebabkan fosforilasi dari myosin light chain sebagai akibat adanya peningkatan siklik AMP intrasel (Lindemann and watanabe, 1985). Tetapi interaksi antara siklik AMP dengan kalsium intrasel pada kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin ini belum diketahui dengan jelas.

2.1.3. Kinetik Dari Forskolin Dalam Meningkatkan siklik AMP Pada Sel

Meningkatnya siklik AMP intrasel yang ditimbulkan oleh forskolin, terjadi cepat dan umumnya bersifat reversibel. Waktu yang diperlukan untuk mensintesa siklik AMP intrasel yang maksimal hanya perlu dalam beberapa menit, tetapi pada sel S49 dan C6-2B glioma yang ganas, forskolin dalam mensintesa siklik AMP intrasel memerlukan waktu yang agak lama (Barovsky et al, 1983). Dengan adanya beta adrenergik agonis epinephrin, dapat memperpendek waktu yang diperlukan untuk pembentukan siklik AMP oleh forskolin pada sel S49. Waktu pembentukan siklik AMP ini, tampaknya ada hubungannya dengan N protein. N_s protein akan memperpendek waktu dari forskolin dalam meningkatkan siklik AMP, sebaliknya N_i protein akan memperpanjang. Meningkatnya

siklik AMP yang ditimbulkan oleh forskolin tidak bisa secepat yang ditimbulkan oleh hormon, misalnya pada platelet, forskolin merangsang sintesa siklik AMP maksimal dalam waktu 2 menit, sedangkan hormon prostaglandin D₂ (PGD₂) hanya perlu waktu 30 detik (Siegl et al, 1982).

Konsentrasi dari siklik AMP intrasel yang ditimbulkan oleh forskolin ditentukan oleh kecepatan adenilat siklase dalam mensintesa dan kecepatan dari siklik nukleotid phosphodiesterase dalam menghidrolisis siklik AMP. Pada sel dan jaringan yang berbeda maka waktu yang diperlukan untuk mencapai konsentrasi maksimal siklik AMP oleh forskolin juga berbeda seperti pada otak 5 menit (Daly et al, 1992), sel C6-2B glioma tikus 30 menit (Barovsky, 1983), sel GH4 pituitary 15 menit (Evans et al, 1984), otot lokus ekstensor 10 menit dan pada platelet manusia 2 menit (McNall et al, 1985).

Pada sel dan jaringan, konsentrasi dari siklik AMP yang ditimbulkan oleh forskolin setelah mencapai maksimum akan mengalami penurunan. Hal ini dikarenakan adanya desensitisasi dari adenilat siklase yang tergantung pada siklik AMP dan adanya induksi dari aktivitas phosphodiesterase (Darfler et al, 1982). Metabolisme dari forskolin pada sel dan jaringan belum pernah dilaporkan.

2.1.4. Efek Forskolin Pada Jantung

Forskolin ini ditemukan karena aktivitasnya sebagai kardiotonik dan aktivitas ini akhirnya menjadi dasar aktivitas molekuler farmakologinya yaitu aktivasi dari adenilat siklase. Senyawa lain yang dapat meningkatkan siklik AMP intrasel pada otot jantung diketahui mempunyai aktivitas kardiotonik. Efek kardiotonik ini berhubungan dengan meningkatnya kekuatan dan kecepatan dari kontraksi.

Telah dilakukan penelitian mengenai efek forskolin pada jantung guinea pig, yang hasilnya menunjukkan bahwa forskolin dapat meningkatkan kekuatan kontraksi, aliran koroner dan konsumsi oksigen (Lindner, 1978). Epinephrine juga dapat meningkatkan

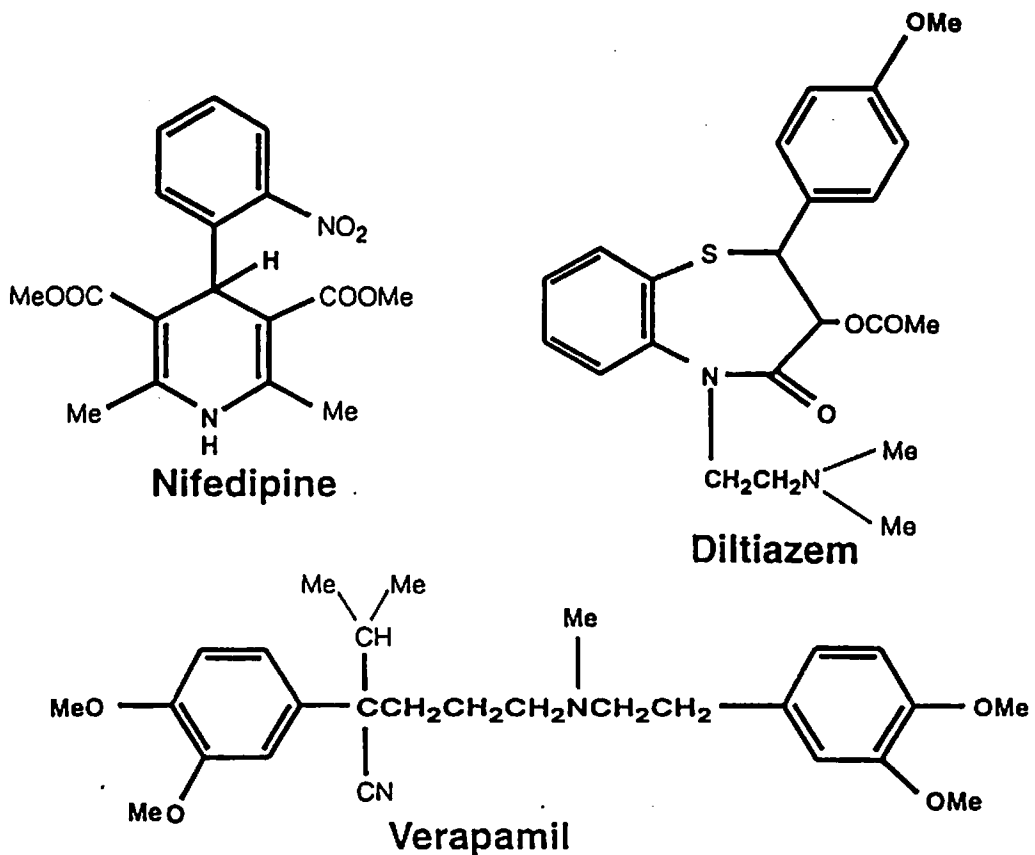
kekuatan kontraksi dan konsumsi oksigen, tetapi efek dari epinephrine ini lama kerjanya lebih pendek daripada forskolin. Kekuatan kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin sama dengan yang ditimbulkan oleh digoxin yang merupakan Na^+K^+ - ATPase inhibitor, tetapi lama kerja dari digoxin lebih lama dari pada forskolin. Efek dari forskolin tidak dihambat oleh propranol, hal ini menunjukkan bahwa beta adrenergik reseptor tidak terlibat pada respon yang ditimbulkan oleh forskolin.

Forskolin menghasilkan efek inotropik positif pada sediaan atrium dari kelinci dan otot papilari manusia (Rodger et al, 1984). Forskolin juga meningkatkan kekuatan kontraksi pada atrium yang dirangsang dengan listrik. Pada konsentrasi yang sangat rendah yaitu antara $0.06 \mu\text{M}$ - $0.5 \mu\text{M}$, forskolin memperlihatkan peningkatan kekuatan kontraksi yang linear. Meningkatnya kekuatan kontraksi yang disebabkan oleh forskolin ini berhubungan dengan meningkatnya kadar siklik AMP yang dapat mengaktivasi protein kinase A (Metzger et al, 1984). Alexander et al, 1986 melaporkan bahwa forskolin menunjukkan peningkatan siklik AMP pada ventrikel myosite yang sedang kontraksi tergantung pada dosis yang diberikannya dan efek ini dihambat oleh adenosin. Forskolin dengan dosis $0.6 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$ dapat menyebabkan depolarisasi pada ventrikel myosit sehingga dapat terjadi kontraksi (Egan et al, 1988).

Forskolin dapat menyebabkan kontraksi otot papilari dengan EC_{50} $5 \mu\text{M}$ dan kontraksi maksimum yang dicapai sama dengan yang dihasilkan oleh isoproterenol. Forskolin dan isoproterenol menyebabkan kontraksi pada otot papilari ini berhubungan dengan adanya peningkatan siklik AMP (Rodger et al, 1984). Mula kerja dari forskolin untuk menyebabkan kontraksi pada otot papilari lebih lambat dari pada isoproterenol, tetapi lama kerjanya lebih panjang dari pada isoproterenol.

2.2.PENGHAMBAT KANAL KALSIMUM

Penghambat kanal kalsium adalah sekelompok obat yang bekerja dengan menghambat masuknya ion kalsium melewati slow channel yang terdapat pada membran sel (sarkolema). Struktur kimia penghambat kanal kalsium sangat berbeda satu sama lainnya (gambar. 2). Obat ini pertama kali dilaporkan mempunyai efek kronotropik dan inotropik negatif oleh Hass dan Hartfelder, 1962. Hal ini terjadi karena terhambatnya arus masuk ion kalsium kedalam sel jantung (Fleckenstein et al, 1967). Nama lain yang biasa dipakai untuk obat ini adalah calcium antagonist, calcium entry blocker atau calcium channel blocker.



Gambar. 2. Struktur kimia penghambat kanal kalsium.

Secara umum ada 2 macam kanal kalsium pada membran sel eksitabel yaitu Voltage-operated channel (VOC) atau Voltage-dependent channel (VDC) yang dapat terbuka karena adanya depolarisasi, dan Receptor-Operated channel (ROC) yang terbuka oleh norepinephrine dan neurotransmitter lain tanpa terjadi depolarisasi. Voltage-dependent channel dapat terlibat dalam berbagai macam proses pada aktivitas sel yang meliputi kontraksi, neurosekresi dan pembukaan dari kanal yang lain. Pada sistem kardiovaskuler, Kass et al, 1994 menunjukkan bahwa kanal kalsium merupakan kunci untuk mempertahankan aktivitas elektrik dan mekanik dari otot jantung. Kemudian obat-obat yang dapat menghambat kanal kalsium dapat dipakai untuk pengobatan pada berbagai macam penyakit kardiovaskuler yang meliputi hipertensi, angina dan baru-baru ini penghambat kanal kalsium dikembangkan untuk digunakan dalam pengobatan congestive heart failure, cardiomyopathy, atherosclerosis dan gangguan vascular perifer maupun cerebral (Triggle, 1991).

2.2.1. Klasifikasi Dari Penghambat Kanal Kalsium

Ada tiga kelompok penghambat kanal kalsium, yang pertama adalah kelompok penghambat kanal kalsium inorganik seperti Co, Ni, Cd, La dan Mn. kelompok kedua adalah toksin peptide seperti w-conotoxin dan w-agatoxin. Kelompok penghambat inorganik dan toxin peptide ini tidak mempunyai kegunaan klinik oleh karena toksik, hanya dipakai untuk keperluan penelitian. Sedangkan kelompok ketiga, adalah kelompok penghambat kanal kalsium organik yang berdasarkan struktur kimianya, dapat dibedakan menjadi 5 golongan sebagai berikut :

1. Golongan dehydropyridin : Nifedipine, nikardipine, felodipine, amlodipine
2. Golongan phenylalkylamine : Verapamil, gallopamil (D600), tiapamil
3. Golongan benzothiazepittle : Diltiazem
4. Golongan piperazine : Cinarizin, flunarizin

5. lain-lain : Prenilamin, perheksilin

Golongan dehydropyridine, phenylalkyllamine dan benzothiazepin dapat menghambat secara selektif kanal kalsium (90 - 100 %), sedangkan golongan lainnya menghambat kanal kalsium (50 - 70 %) dan kanal natrium.

2.2.2. Type Dari Voltage-Dependent Calcium Channel.

Untuk menerangkan mekanisme molekuler dari multipel type kanal kalsium yang terjadi pada berbagai proses sel maka telah ditetapkan klasifikasi dari kanal kalsium ini. Telah diketahui ada empat type dari voltage dependent calcium channel yaitu type L, N, P dan type T yang dapat dibedakan berdasarkan kinetik, konduktansi dan sensitivitas yang dimilikinya (Fos et al, 1987)

L type kanal kalsium dapat teraktivasi pada voltase tinggi dan sangat sensitif terhadap penghambat dari golongan dihydropyridine seperti nifedipine, nitrendipine dan nimodipine, golongan phenylalkyllamine seperti verapamil dan D600, dan golongan benzothiazepine seperti diltiazem. L type kanal kalsium dapat memicu untuk terjadinya eksitasi-kontraksi coupling pada otot rangka, otot polos dan otot jantung, dan mengontrol pelepasan hormon atau transmitter dari sel endokrin dan neuron. L type kanal ini terdiri dari beberapa subunit yang diketahui sebagai alpha 1, alpha 2, beta, gama dan teta yang masing-masing mempunyai fungsi berbeda. Alpha 1 dan alpha 2 subunit berfungsi sebagai tempat untuk fosforilasi yang tergantung siklik AMP (Spedding et al, 1992).

N type Kanal kalsium sebagian besar terdapat pada neuron dan dihambat ireversibel oleh w-conotoxin (Tsien, 1991). w-conotoxin menghambat pelepasan transmitter pada berbagai neuron mamalia, hal ini memperkuat hipotesa bahwa kalsium influk yang melalui N type calcium channel dapat mengontrol pelepasan neurotransmitter. N type kanal kalsium juga tampak memainkan peran pada migrasi neuron yang immature (Komuro et al, 1992).

P type kanal kalsium, pertama ditemukan pada sel purkinje yang terdapat pada berbagai neuron (Mintz, 1992). P type kanal kalsium ini dapat teraktivasi pada voltase tinggi dan selektif dihambat oleh w-agatoxin tetapi tidak sensitif terhadap dehydropyridine dan w-conotoxin. P type kanal kalsium ini mempunyai peran yang penting pada depresi purkinje neuron cerebellum dalam waktu yang lama.

T type kanal kalsium telah diketahui dapat teraktivasi pada voltase rendah, dan cepat diinaktivasi (Carbone et al, 1984). Kanal ini relatif sensitif terhadap Ni^{2+} , amiloride dan oktanol tetapi resistan terhadap dihydropyridine dan w-conotoxin. T type calcium channel ini penting untuk aktivitas pacemaker pada jantung dan neuron.

2.2.3. Mekanisme Kerja Penghambat Kanal Kalsium

Pada otot jantung, otot polos dan otot rangka, ion kalsium terutama berperan dalam peristiwa kontraksi. Untuk kontraksi otot jantung dan otot polos memerlukan ion kalsium yang lebih besar berasal dari luar sel dari pada yang berasal dari dalam sel (dari tempat penyimpanan ion kalsium di sarkoplasmik retikulum). Sebaliknya pada otot rangka memerlukan ion kalsium yang berasal dari dalam sel lebih besar dari pada yang berasal dari luar sel, oleh karena itu penghambat kanal kalsium ini sangat kuat menghambat kontraksi otot jantung dan otot polos, sedangkan hambatannya pada kontraksi otot rangka sangat lemah.

Masuknya ion kalsium dari luar sel terutama melalui slow channel. Slow channel ini berbeda dengan fast natrium channel yang melewatkan ion natrium dari ruang ekstrasel menuju ruang intrasel dan dihambat oleh tetrodoksine. Kanal kalsium tidak dihambat oleh tetrodoksine. Kanal kalsium ini dapat terbuka karena adanya depolarisasi yaitu pada Voltage-Dependent Channel, dan dapat juga karena adanya perangsangan pada reseptor yang teraktivasi oleh bahan-bahan seperti neurotransmitter, hormon polipeptida dan metabolit asam arakidonat yaitu pada Receptor Operated Channel. Terbukanya kanal

kalsium ini dapat meningkatkan kalsium sitosolik karena adanya kalsium influk dari ekstrasel dan kalsium release dari sarkoplasmik retikulum, sehingga dapat terjadi kontraksi.

Pada otot jantung, penghambat ion kalsium ini terutama bekerja pada L type Voltage-Dependent Channel sehingga dapat menyebabkan tertutupnya channel sebagai akibat adanya hyperpolarisasi pada membran sel dan selanjutnya akan terjadi hambatan masuknya ion kalsium ke dalam sel (kalsium influk) dan juga terjadi hambatan pelepasan kalsium dari sarkoplasmik retikulum, dan hal ini akan dapat menyebabkan penurunan kalsium sitosolik, yang akhirnya dapat menghambat kontraksi otot jantung.

2.3. Na^+ - Ca^{2+} Exchanger.

Pertukaran ion natrium dengan ion kalsium pertama kali dilaporkan terdapat pada akson cumi-cumi (Baker et al, 1969) dan jantung guinea pig (Reuter et al, 1968), kemudian didapatkan pada berbagai macam jaringan (Schnetkamp et al, 1995). Pertukaran ion natrium dengan ion kalsium pada plasma membran memberikan kontribusi dalam mengatur konsentrasi ion kalsium intrasel. Disisi lain pertukaran ion natrium dan ion kalsium pada mitokondria mempunyai peran untuk mempertahankan konsentrasi ion kalsium intramitokondria tetap rendah yaitu dengan ekstrusi ion kalsium. Pada otot jantung, banyak perhatian yang terfokuskan pada pertukaran ion ini, karena pertukaran ion ini mempunyai peran pada masuknya ion kalsium ke dalam sel sehingga dapat mempengaruhi kontraksi, pada mekanisme ekstrusi ion kalsium dari sel dan berperan sebagai mediator pada efek inotropik dari glikosida jantung (Bouchard et al, 1993).

Pada tahun 1990, teknik biologi molekuler modern telah dipakai untuk penelitian pada pertukaran Na^+ - Ca^{2+} , dan banyak informasi mengenai hubungan struktur dengan fungsi, dan adanya berbagai isoform dari Na^+ - Ca^{2+} exchanger. Pada jantung, NCX1 merupakan type Na^+ - Ca^{2+} exchanger yang pertama kali berhasil di kloning dari otot

jantung anjing (Nicoll et al. 1990). Selanjutnya dua isoform dari $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger yaitu NCX2 dan NCX3 dikloning dari otak tikus putih (Nicoll et al. 1996).

2.3.1. Mekanisme Kerja Dari $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger

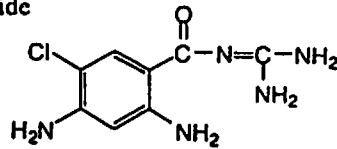
$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger bekerja pada transportasi ion kalsium yang menyeberang melalui membran sel dan bertukar dengan ion natrium dengan arah bolak-balik. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger pada otot jantung menyebabkan bertukarnya untuk setiap tiga ion natrium dengan satu ion kalsium (Reeves et al, 1984), dan $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger pada ROS (Rod Outer Segment) menyebabkan setiap empat ion natrium bertukar dengan setiap ion kalsium ditambah satu ion kalium, hal ini menunjukkan bahwa reaksi pertukaran ini adalah elektrogenik (Lagnado et al, 1990). $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger pada otot jantung juga mengkatalisa pertukaran ion kalsium dengan ion kalsium dan ion natrium dengan ion natrium (Slaughter et al, 1983). Siklus pertukaran ion natrium dengan ion kalsium, dan reaksinya dapat dijelaskan sebagai pergerakan terpisah dari ion natrium dan ion kalsium. Pertukaran ion natrium dengan ion kalsium ini terlibat dalam pengaturan konsentrasi ion kalsium intrasel yaitu melalui ekstrusi ion kalsium (kalsium efluk) yang akan menyebabkan menurunnya kalsium intrasel, dan kalsium influk yang akan menyebabkan meningkatnya kalsium intrasel.

2.3.2. Penghambat $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger

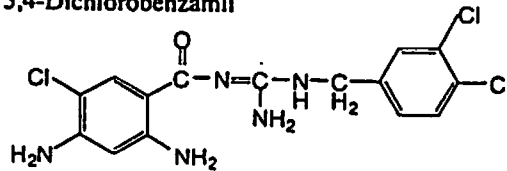
Amiloride dan derivatnya 3,4 dichlorobenzamil (gambar. 3) telah diidentifikasi yang relatif efektif sebagai penghambat dari pertukaran ion natrium dengan ion kalsium (Kleyman et al, 1988). Pertukaran ion natrium dengan ion kalsium juga dapat dihambat oleh beberapa senyawa seperti alkohol (Michaelis et al , 1987), tricyclicantidepressant (Lavoie et al, 1990), calmodulin antagonists (Kimura et al. 1993) dan taurin (Matsuda et al, 1989).

B. Chemicals

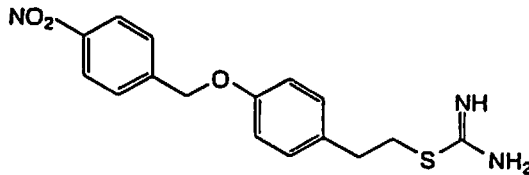
Amiloride



3,4-Dichlorobenzamil



No.7943



Gambar.3. Struktur Kimia Penghambat $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ Exchanger

.2.4. Ryanodine

Ryanodine merupakan salah satu penghambat calcium release channel (ryanodine reseptor) pada sarkoplasmik retikulum dari otot rangka, otot polos dan otot jantung. Ryanodine ini diisolasi dari tanaman alkaloid ryanodine dan digunakan secara luas sebagai bahan penelitian farmakologi molekuler untuk mengevaluasi peran kalsium release dari sarkoplasmik retikulum pada otot rangka (Martin et al, 1989), otot polos (Abe, 1992) dan otot jantung (Luo et al, 1995).

2.5. Kontraksi Otot Jantung

Kontraksi otot jantung dapat disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi ion kalsium dalam sitoplasmik dan meningkatnya kadar siklik AMP intrasel.

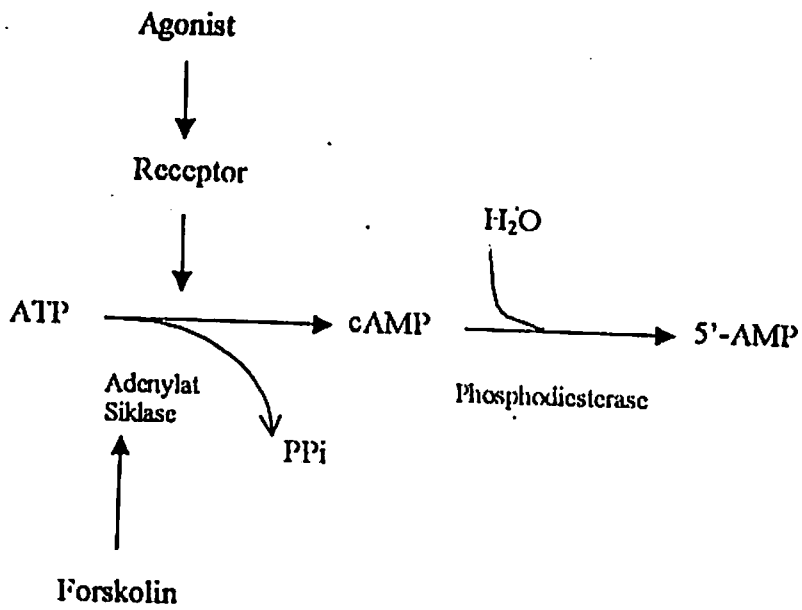
2.5.1. Peran Kalsium Pada Kontraksi Otot Jantung

Konsentrasi ion kalsium myoplasmik mempunyai peran yang sangat penting pada proses terjadinya eksitasi kontraksi koupling pada otot jantung. Konsentrasi ion kalsium myoplasmik ini dapat meningkat karena adanya kalsium influk (masuknya ion kalsium dari ekstrasel kedalam sel) melalui kanal kalsium (VOC dan ROC) akibat adanya depolarisasi atau rangsangan pada reseptor, pertukaran dengan ion natrium, dan adanya pelepasan ion kalsium dari sarkoplasmik retikulum melalui ryanodine reseptor (calcium release channel). Peningkatan kalsium myoplasmik akan berikatan dengan troponin C dan membentuk ikatan kalsium troponin C kompleks yang dapat mengaktivasi myosin light chain kinase yang inaktiv menjadi aktif. Myosin light chain kinase yang aktif ini dapat menyebabkan myosin untuk mengadakan phosphorilasi sehingga dapat berikatan dengan aktin dan akhirnya dapat terjadi kontraksi otot jantung.

2.5.2. Peran siklik AMP Pada Kontraksi Otot Jantung

Isoproterenol melalui beta adrenoceptor dan dibutyryl siklik AMP (aktivator adenilat siklase) dapat bekerja pada otot jantung dengan mengaktivkan adenilate siklase. Adenilate siklase ini akan mengubah ATP menjadi 3', 5'- siklik adenosin mono phosphat, disingkat sebagai cAMP (gambar. 4). Siklik AMP diinaktifkan oleh phosphodiesterase menjadi 5' adenosin mono phosphat (5' AMP). Metil xantin seperti kafein dan teofilin menghambat reaksi phosphodiesterase. Pemberian isoproterenol dan dibutyryl siklik AMP dapat meningkatkan kadar siklik AMP dalam sel. Peningkatan kadar siklik AMP ini akan mengaktifkan protein kinase A yang tergantung pada siklik AMP, sehingga dapat terjadi

phosphorilasi pada myosin. Myosin phosphorilasi ini akan berinteraksi dengan aktin dan dapat mengakibatkan kontraksi pada otot jantung.



Gambar 4. Reaksi yang dikatalisis oleh adenilat siklase dan phosphodiesterase

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

3.1.1. Tujuan Umum

Untuk menjelaskan signal transduksi dari kontraksi yang disebabkan oleh forskolin (aktivator siklik AMP) pada otot jantung terpisah (langendorf) dari kelinci

3.1.2. Tujuan Khusus

1. Untuk menjelaskan peran kalsium ekstraseluler pada kontraksi otot jantung akibat adanya peningkatan pembentukan siklik AMP yang disebabkan oleh forskolin
2. Untuk menjelaskan peran kalsium intraseluler (Ca^{2+} influk dan Ca^{2+} release) pada kontraksi otot jantung akibat adanya peningkatan pembentukan siklik AMP yang disebabkan oleh forskolin

3.2. MANFAAT PENELITIAN

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai :

1. Informasi bagi peneliti lain mengenai interaksi antara peningkatan siklik AMP dan kalsium intrasel pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin
2. Landasan teori untuk menjelaskan mekanisme kerja dari obat-obat yang menyebabkan kontraksi otot jantung karena adanya peningkatan pembentukan siklik AMP

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya pada tanggal 4 Agustus 1997 sampai dengan tanggal 20 Nopember 1997.

4.2. Materi Penelitian

4.2.1. Bahan penelitian

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah : Forskolin, Verapamil, Amiloride, EGTA = Ethylene Glycol bis (beta Aminoethyl ether) N,N' tetra acetic acid, Adrenalin, Ryanodine yang diperoleh dari Sigma chemical industries dan larutan ringer yang dibuat dari campuran 1,8 mM CaCl₂, 127 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄ dan 5 mM glukose

4.2.2. Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah kelinci jantan lokal dengan berat badan 2 – 2,5 kg dan umur 6 – 8 bulan, yang diperoleh dari peternakan kelinci di Batu, Malang.

4.2.3. Alat penelitian

Alat-alat yang dipakai pada penelitian ini adalah : Isolated organ bath (langendorf) dan alat pencatatnya, gunting, pinset, becker glass

4.3. Metode Penelitian

Kelinci dibunuh dengan cara disembelih dan dadanya dibuka secepat mungkin. Seluruh paru-paru dan jantungnya diambil dan dimasukkan ke dalam tabung gelas yang berisi larutan ringer dengan suhu 37°C yang dialiri O₂ 95% dan CO₂ 5%.

Jantung dipisahkan dari paru-paru dan jaringan sekitarnya serta diusahakan agar darah yang masih ada dalam jantung dikeluarkan semuanya. Kemudian jantung dihubungkan dengan alat dari langendorf dengan memasukkan kanula dari alat tersebut pada aorta. Tekanan larutan ringer dari reservoir diatur sedemikian rupa hingga didapatkan kontraksi yang optimal. Dengan jarum kait yang halus, jantung dihubungkan dengan alat pencatat. Pada penelitian ini dapat dilakukan berbagai percobaan dengan perincian sebagai berikut :

Perlakuan I:

Jantung dari 6 ekor kelinci, masing-masing diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M dengan maksud untuk mendapatkan gambaran dari hubungan antara dosis dan efek dari forskolin

Perlakuan II:

-Jantung dari 6 ekor kelinci, diberi Amiloride dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui adanya pengaruh peningkatan pembentukan siklik AMP terhadap pertukaran ion kalsium dengan ion natrium.

Perlakuan III:

-Jantung dari 6 ekor kelinci, diberi verapamil dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui adanya interaksi antara kanal kalsium dengan peningkatan pembentukan siklik AMP

Perlakuan IV:

-Jantung dari 6 ekor kelinci, masing-masing diberi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA 5 mM kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M dengan maksud untuk mengetahui pengaruh kalsium ekstrasel pada kontraksi akibat forskolin.

Perlakuan V:

-Jantung dari 6 ekor kelinci, diberi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA 5 mM dan ryanodine dosis 10^{-6} M kemudian diberi forskolin dengan dosis 10^{-10} M sampai 10^{-6} M.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui adanya interaksi antara kanal kalsium release pada sarkoplasmik retikulum dengan peningkatan pembentukan siklik AMP.

3.4. Rancangan Percobaan Dan Analisis Data Hasil penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Data dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan Analisa Varian (uji F). Bila terdapat perbedaan yang bermakan dari perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

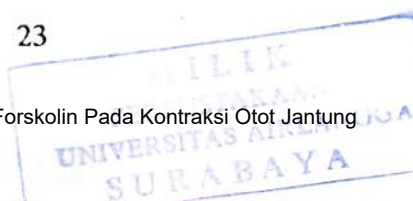
Dari pengamatan dan penghitungan data hasil penelitian yang dilakukan dengan uji statistik analisa varian dan dilanjutkan dengan uji BNT maka diperoleh hasil sebagai berikut:

5.1.1. Pengaruh pemberian forskolin pada otot jantung secara invitro

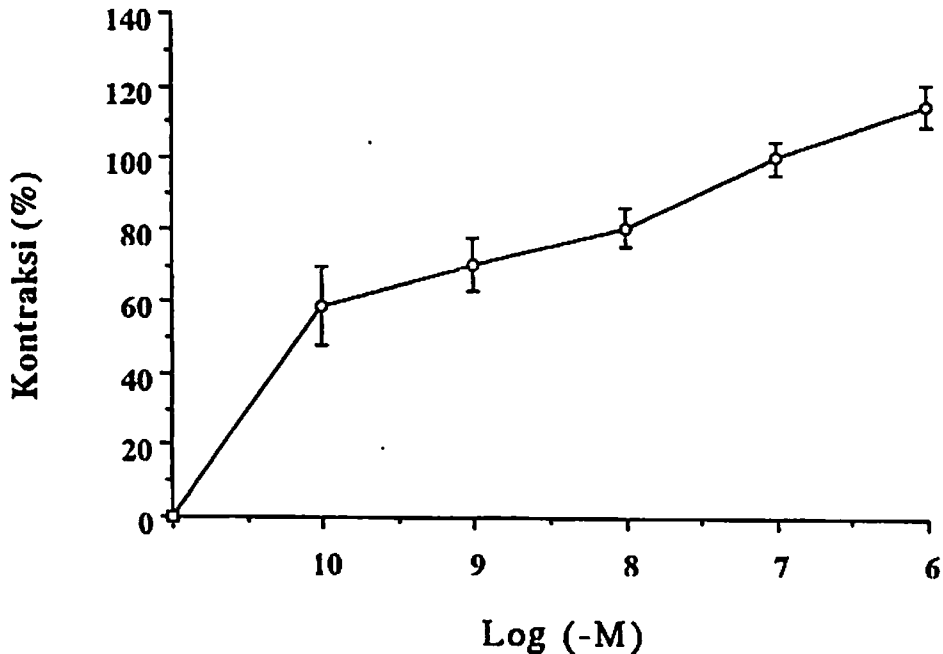
Pada otot jantung terpisah dari kelinci, pemberian forskolin dengan dosis 10^{-10} M - 10^{-6} M dapat menyebabkan kontraksi. Mula kerja (onset of action) dari forskolin adalah cepat dan dapat mencapai kontraksi yang konstan. Sifat kontraksi dari forskolin ini adalah reversibel. Hasil rata-rata dan simpangan baku dari penghitungan kekuatan kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dosis 10^{-10} - M - 10^{-6} M dapat dilihat pada tabel.1.

Tabel, 1, Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh Forskolin

Ulangan	Kelompok Forskolin				
	Dosis (M)				
	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
1	70.8	79.2	87.5	104.2	125
2	40.7	60.1	72.3	96.4	110.7
3	62.4	73.2	78.6	94.8	113.5
4	68.1	76.3	84.2	106.3	119.3
5	56.5	68.7	82.9	102.4	114.7
6	53.7	65.5	79.2	99.2	108.4
\bar{X}	58.7	70.5	80.8	100.6	115.3
SD	10.9	7.1	5.3	4.5	6.1



Dari hasil uji statistik BNT, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara dosis forskolin yang diberikan dengan kontraksi yang ditimbulkannya.



Gambar.5. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin (lingkaran terbuka)

Pada gambar. 5 diatas menunjukkan adanya hubungan antara dosis forskolin yang diberikan dengan besarnya kontraksi yang ditimbulkannya. Semakin besar dosis yang diberikan semakin meningkat pula kekuatan kontraksi yang ditimbulkannya. Terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) pada kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin antara dosis 10^{-10} dengan dosis 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M, antara dosis 10^{-9} dengan dosis 10^{-7} , 10^{-6} M antara dosis 10^{-8} dengan dosis 10^{-7} , 10^{-6} M, dan antara dosis 10^{-7} dengan dosis 10^{-6} .

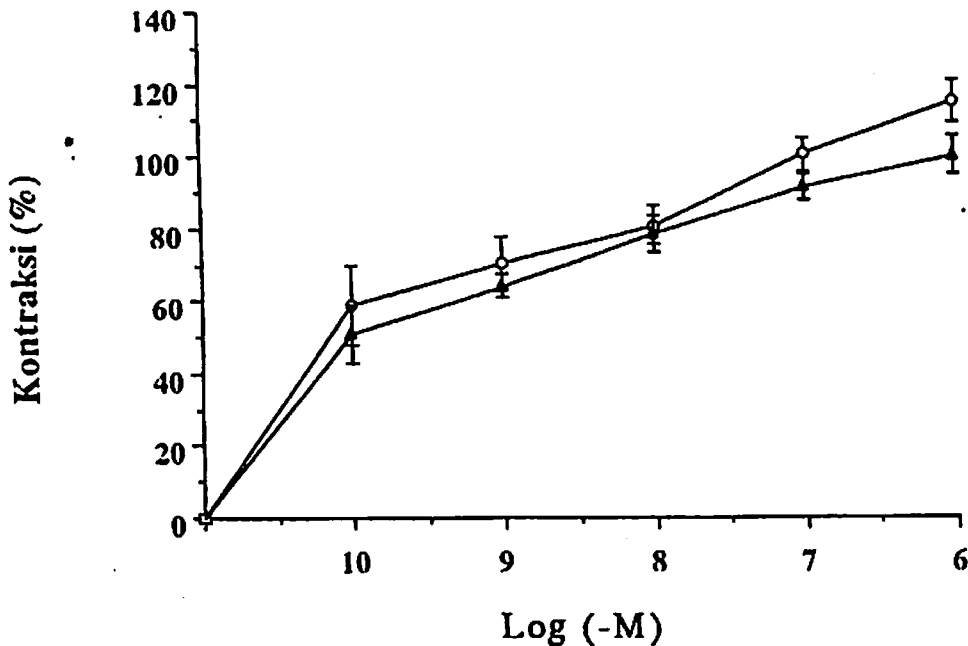
5.1.2. Efek amilorid pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Pretreatment dengan $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor Amiloride dosis $1 \mu\text{M}$, dapat menyebabkan hambatan yang tidak bermakna pada kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dosis $10^{-10} \text{ M} - 10^{-6} \text{ M}$. Hasil rata-rata dan simpangan baku pretreatment dengan amiloride pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel.. 2. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh Forskolin dengan pretreatment $1 \mu\text{M}$ Amiloride

Ulangan	Kelompok Forskolin dengan pretreatment $1 \mu\text{M}$ Amiloride				
	Dosis (M)				
	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
1	51.9	66.7	85.2	88.9	96.3
2	41.5	63.1	70.4	90.1	100.2
3	63.4	68.4	78.5	96.7	104.7
4	48.6	59.1	75.6	87.6	94.3
5	55.3	65.3	81.2	94.3	108.7
6	44.3	61.6	79.8	89.8	97.1
X	50.8	64.1	78.4	91.2	100.2
SD	7.9	3.4	5.1	3.5	5.5

Dari uji statistik analisa varian (uji F-test) tidak terdapat perbedaan antara kelompok pretreatment dan kelompok tanpa pretreatment dengan amilorid dosis $1 \mu\text{M}$ pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dosis $10^{-10} \text{ M} - 10^{-6} \text{ M}$.



Gambar. 6. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment (segitiga tertutup) dan tanpa pretreatment (lingkaran terbuka) amiloride $1 \mu\text{M}$.

Pada gambar.6 diatas menunjukkan bahwa pretreatment amiloride dapat menggeser kurva dosis respon kontraksi dari forskolin kekanan, tetapi hambatan amiloride ini tidak menyebabkan perbedaan yang bermakna dengan yang tanpa pretreatment amilorid. Dari uji BNT, tidak terdapat perbedaan antara pretreatment dan tanpa pretreatment dengan amilorid pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dengan dosis yang sama.

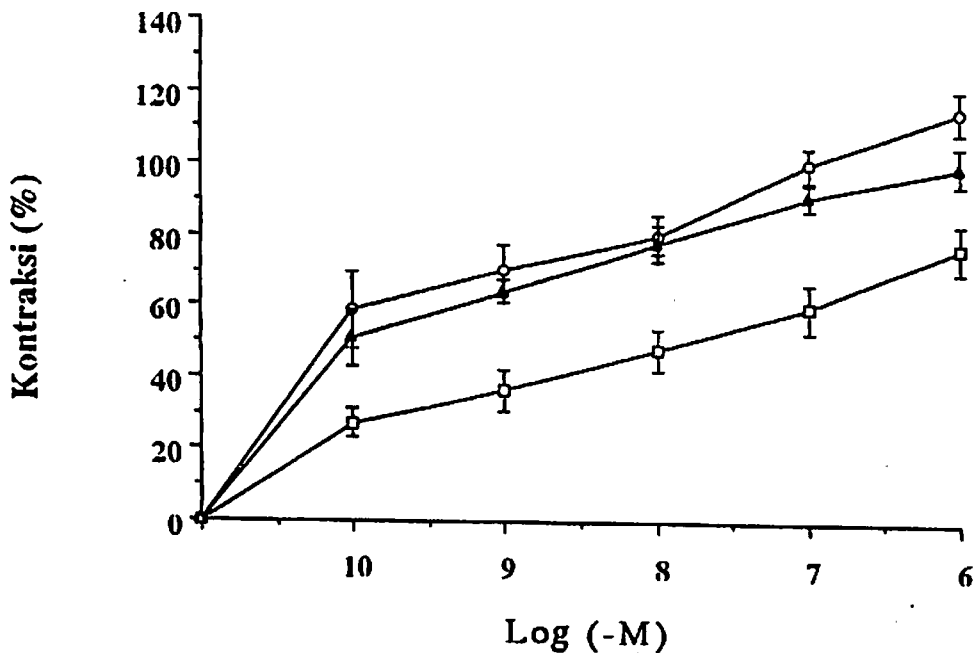
5.1.3. Efek verapamil pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Pretreatment dengan L type calcium channel blocker verapamil dosis $1 \mu\text{M}$, dapat menghambat sebagian dari kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dosis 10^{-10} - 10^{-6} M. Verapamil lebih kuat menghambat kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin dari pada amilorid. Hasil rata-rata dan simpangan baku hambatan verapamil pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel. 3. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh Forskolin dengan pretreatment 1 μ M Verapamil

Ulangan	Kelompok Forskolin dengan pretreatment 1 μ M Verapamil				
	Dosis (M)				
	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
1	24	28	40	48	64
2	21.5	34.6	46.5	58.4	76.1
3	30.2	40.3	52.1	67.1	84.3
4	28.7	43.4	55.2	64.1	79.4
5	31.5	38.4	49.7	62.8	80.5
6	27.3	32.5	43.1	59.3	79.4
X	27.2	36.2	47.8	59.9	77.3
SD	3.8	5.6	5.7	6.7	7.1

Dari uji statistik analisa varian (uji. F-test) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara kelompok pretreatment dan kelompok tanpa pretreatment dengan verapamil 1 μ M dan juga dengan pretreatment verapamil pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dosis 10⁻¹⁰ M - 10⁻⁶ M.



Gambar. 7. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment amiloride 1 μ M (segitiga tertutup), pretreatment verapamil 1 μ M (segitiga terbuka), dan tanpa pretreatment (lingkaran terbuka).

Pada gambar.7 diatas menunjukkan bahwa pretreatment dengan verapamil dapat menggeser kurva dosis respon kontraksi yang disebabkan oleh forskolin kekanan. Dari uji BNT, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara pretreatmet dan tanpa pretreatment verapamil dan juga dengan pretreatment amilorid terhadap kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dengan dosis yang sama. Walaupun ada efek hambatan dari verapamil, kontraksi yang diebabkan oleh forskolin masih tergantung pada dosis yang diberikan. semakin meningkat konsentrasi dari forskolin semakin besar pula kontraksi yang ditimbulkannya.

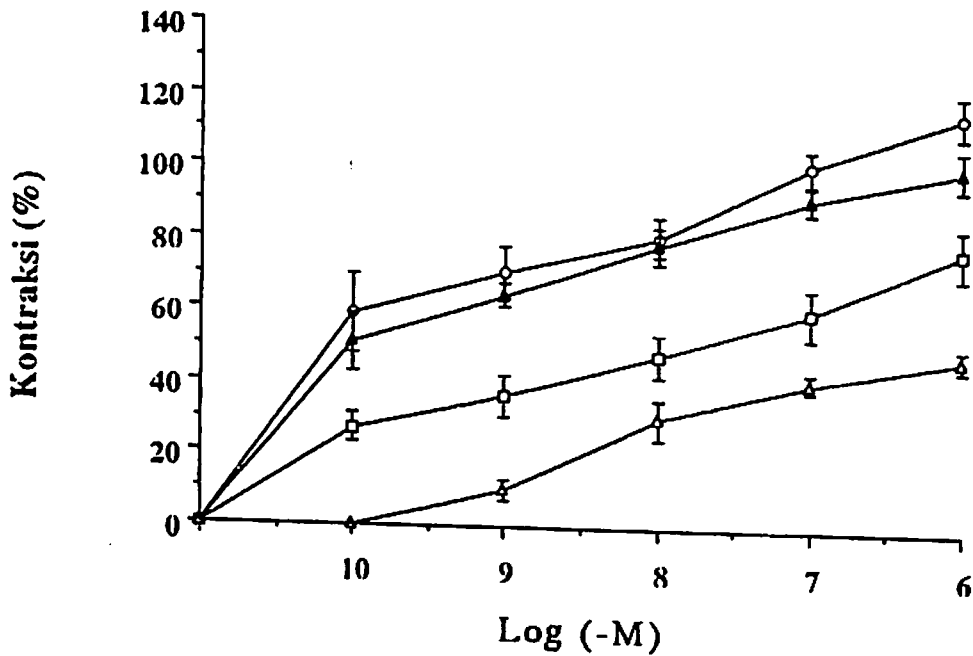
5.1.4. Efek larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium dan ditambah dengan senyawa pengikat kalsium EGTA, dapat menyebabkan hambatan total dan sebagian dari kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dosis 10^{-10} M - 10^{-6} M. Hasil rata-rata dan simpangan baku hambatan larutan ringer tanpa kalsium dan EGTA pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dapat dilihat pada tabel 4.

Dari uji statistik analisa varian (uji F-test) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara kelompok yang diinkubasi dan yang tanpa diinkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin. Dan juga terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara kelompok yang diinkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dengan pretreatment verapamil $1 \mu\text{M}$ pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin.

Tabel. 4. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh Forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah 5 mM EGTA

Ulangan	Kelompok Forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA				
	Dosis (M)				
	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
1	0	14.3	37.1	42.8	48.6
2	0	8.3	26.7	43.7	51.3
3	0	6.7	21.8	39.4	46.5
4	0	9.8	33.4	40.2	50.4
5	0	8.3	32.5	41.8	47.8
6	0	11.8	29.8	36.7	42.7
X	0	9.9	30.3	40.8	47.9
SD	0	2.8	5.4	2.6	3.1



Gambar. 8. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment amiloride 1 μM (segitiga tertutup), pretreatment verapamil 1 μM (segi empat terbuka), inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA (segitiga terbuka), dan tanpa pretreatment (lingkaran terbuka).

Pada gambar. 8 diatas menunjukkan bahwa inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dapat menggeser kurva dosis respon kontraksi yang

disebabkan oleh forskolin yang diberi pretreatment dan tanpa pretreatment verapamil kekanan. Hambatan yang disebabkan oleh inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA lebih kuat dari pada yang disebabkan oleh pretreatment verapamil. Dari uji BNT, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara inkubasi dengan larutan ringer tanpa calcium yang ditambah dengan EGTA, dengan pretreatment serta tanpa pretreatment verapamil terhadap kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dengan dosis yang sama. Inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dapat menyebabkan total hambatan terhadap kontraksi dari forskolin dosis 10^{-10} M dan menyebabkan hambatan sebagian terhadap kontraksi dari forskolin dosis 10^{-9} M - 10^{-6} M.

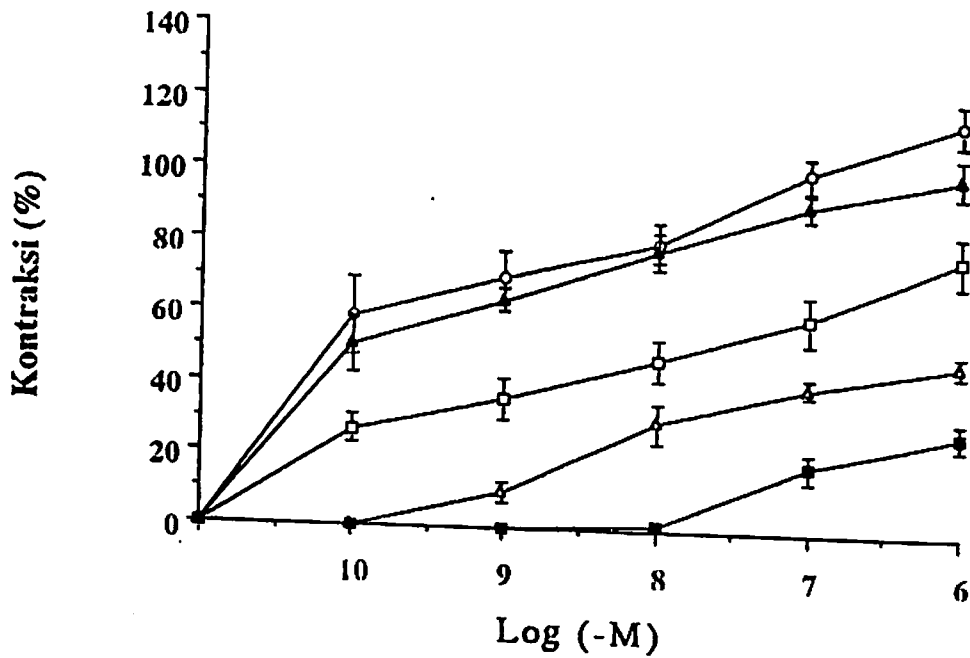
5.1.5. Efek kombinasi dari larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan senyawa pengikat kalsium EGTA dan Ryanodin dosis $1 \mu\text{M}$, dapat menyebabkan hambatan total dan sebagian dari kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dosis 10^{-10} M - 10^{-6} M. Hasil rata-rata dan simpangan baku hambatan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan Ryanodin pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dapat dilihat pada tabel 5.

Dari uji statistik analisa varian (uji F-test) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.01$) antara kelompok yang diinkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan Ryanodin, dengan yang diinkubasi dan tanpa diinkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA, serta dengan pretreatment verapamil pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin.

Tabel. 5. Rata-rata kekuatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh Forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah 5 mM EGTA dan 1 μM Ryanodin

Ulangan	Kelompok Forskolin dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan Ryanodine				
	Dosis (M)				
	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
1	0	0	0	21.3	31.9
2	0	0	4	15.7	27.4
3	0	0	0	24.5	33.7
4	0	0	2.5	18.4	26.7
5	0	0	0	13.9	23.4
6	0	0	0	17.9	29.1
X	0	0	1.1	18.6	28.6
SD	0	0	1.7	3.8	3.6



Gambar. 9. Kurva dosis respon dari kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment amiloride 1 μM (segitiga tertutup), pretreatment verapamil 1 μM (segi empat terbuka), inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA (segitiga terbuka), inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan ryanodine (segi empat tertutup) dan tanpa pretreatment atau inkubasi (lingkaran terbuka).

Pada gambar.9 diatas menunjukkan bahwa inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan Ryanodin dapat menggeser kurva dosis respon

kontraksi yang disebabkan oleh forskolin yang diberi pretreatment dan tanpa pretreatment verapamil serta yang diinkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA kekanan. Hambatan yang disebabkan oleh inkubasi kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan Ryanodin lebih kuat dari pada yang disebabkan oleh inkubasi dengan larutan ringer yang ditambah EGTA, dan yang disebabkan oleh pretreatment verapamil. Dari uji BNT, terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) antara inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan ryanodine, dengan yang diinkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA, serta dengan pretreatment dan tanpa pretreatment verapamil terhadap kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dengan dosis yang sama. Inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dengan ryanodin dapat menyebabkan total hambatan terhadap kontraksi dari forskolin dosis 10^{-10} M - 10^{-8} M dan menyebabkan hambatan sebagian terhadap kontraksi dari forskolin dosis 10^{-7} M - 10^{-6} M.



5.2. Pembahasan

Telah dilakukan serangkaian eksperiment untuk mengetahui dan menjelaskan signal transduksi dari kontraksi yang disebabkan oleh forskolin pada otot jantung terpisah (langendorf) dari kelinci. Rangkaian eksperiment ini terdiri dari efek forskolin pada otot jantung, efek pretreatment verapamil, amilorid, inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan inkubasi kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodine pada kontraksi yang disebabkan oleh forskolin..

5.2.1 Efek forskolin pada kontraksi otot jantung terpisah dari kelinci

Pemberian forskolin dosis 10^{-10} M - 10^{-6} M dapat menyebabkan kontraksi otot jantung. Ada hubungan antara kekuatan kontraksi yang ditimbulkan oleh forskolin dengan besarnya dosis yang diberikannya. semakin besar dosis forskolin yang diberikan semakin kuat kontraksi yang ditimbulkannya. Metzger et al, 1981 melaporkan bahwa forskolin merupakan salah satu aktivator adenilat siklase (dapat secara langsung mengaktivasi adenilat siklase) sehingga dapat menghasilkan peningkatan pembentukan siklik AMP, yang akhirnya dapat menyebabkan kontraksi. Besarnya dosis forskolin mempengaruhi kadar siklik AMP intrasel yang terbentuk dan hal ini akan mempengaruhi kekuatan kontraksi yang ditimbulkannya. Pada penelitian ini belum diketahui pada dosis berapa dari forskolin dapat menyebabkan kontraksi maksimum pada otot jantung dan berapa EC_{50} nya.

5.2.2. Efek amiloride pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Amiloride dan derivatnya telah diidentifikasi sebagai penghambat yang selektif terhadap pertukaran ion Natrium dengan ion kalsium ($Na^{2+}-Ca^{2+}$ exchanger) (Kaczorowski, 1989 ; Kleyman,1988). Pretreatment dengan Amiloride dosis $1 \mu M$ dapat menghambati kontraksi yang disebabkan oleh forskolin, walaupun hambatan amiloride ini

tidak berbeda bermakna dengan yang tanpa pretreatment amiloride. Telah dilaporkan bahwa amiloride mempunyai efek hambatan pada inotropik positif (kontraksi) dari otot jantung (Matsuda, 1984) dan mempunyai aktivitas antiarrhythmik (Duff, 1991). Efek hambatan pada kontraksi otot jantung oleh amiloride karena adanya hambatan masuknya ion kalsium (calcium influk) kedalam sel melalui pertukaran ion natrium dengan ion kalsium (Pierce, 1993). Dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa dosis amiloride yang diberikan masih kurang besar sehingga tidak mampu menghambat kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin.

5.2.3. Efek verapamil pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin

Pretreatment dengan L type penghambat kanal kalsium verapamil dapat menghambat kontraksi yang disebabkan oleh forskolin dosis 10^{-10} M - 10^{-6} M. Hal ini menunjukkan bahwa Voltage - Dependent Channel terlibat pada proses kontraksi yang disebabkan oleh forskolin. Pemberian verapamil ini dapat mengakibatkan tertutupnya Voltage - Dependent Channel sehingga akan menghambat masuknya ion kalsium kedalam sel (kalsium influk) dan terjadi penurunan kalsium intrasel, yang akhirnya dapat terjadi hambatan kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin. L type penghambat kanal kalsium dari golongan phenylalkylamine seperti verapamil dan D600, golongan dihydropyridines (DHP) seperti nitrendipine dan nifedipine, telah diketahui dapat menghambat kontraksi dan masuknya ion kalsium kedalam sel (kalsium influk) pada otot jantung (Fleckenstein et al, 1985; Pott & Lipp, 1987). Pada otot jantung, pemberian isoproterenol (aktivator dari beta adrenoseptor) dapat mengaktifasi protein kinase A yang tergantung siklik AMP. Protein kinase A ini akan berikatan dengan c-terminal dari alpha 1 subunit yang terdapat pada Voltage-Dependent Calcium Channel dan hal ini akan membuka kanal kalsium yang dapat menyebabkan peningkatan kalsium influk (Yatani, 1987). Dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pemberian forskolin dapat mengaktifasi secara langsung adenilat

siklase sehingga dapat terjadi peningkatan pembentukan siklik AMP. Siklik AMP ini akan mengaktivasi protein kinase A yang kemudian akan berikatan dengan c-terminal dari alpha 1 subunit yang terdapat pada L type Voltage-Dependent Calcium Channel dan hal ini akan membuka kanal kalsium yang dapat meningkatkan masuknya kalsium kedalam sel sehingga akhirnya dapat terjadi kontraksi otot jantung.

5.2.4 Efek inkubasi dari kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA pada kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin

Inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dapat menghambat kontraksi yang disebabkan oleh forskolin. Hambatan Inkubasi dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA lebih kuat bila dibandingkan dengan hambatan dari pretreatment verapamil maupun amiloride. Telah dilaporkan bahwa kontraksi pada otot jantung dan otot polos sangat tergantung pada ion kalsium ekstrasel dan intrasel, sedangkan kontraksi otot rangka hanya tergantung pada intrasel. Inkubasi dengan larutan yang bebas kalsium dengan ditambah EGTA dapat menghambat kontraksi yang disebabkan oleh isoproterenol dan endothelin pada otot jantung (Vigne et al, 1990) dan endothelin pada otot polos pembuluh darah (Sudjarwo et al, 1995). Hal ini karena inkubasi dengan larutan tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dapat menghambat kalsium influk sebagai akibat tidak adanya ion kalsium ekstrasel, tetapi tidak menghambat kalsium intrasel yaitu pelepasan kalsium dari sarkoplasmik retikulum, sehingga kalsium release ini dapat berperan dalam menyebabkan kontraksi. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA, forskolin dapat menyebabkan peningkatan ion kalsium intrasel dengan cara melepaskan ion kalsium dari tempat penyimpanannya yaitu pada sarkoplasmik retikulum sehingga dapat mengakibatkan kontraksi.

5.2.5. Efek inkubasi dari kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin pada kontraksi otot jantung akibat pemberian forskolin

Inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodine dapat menyebabkan hambatan pada kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin. Efek hambatan dari kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin ini lebih kuat dari pada yang ditimbulkan oleh inkubasi hanya dengan larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA. Hal ini menunjukkan bahwa ryanodin mempunyai efek hambatan pada kontraksi otot jantung. Ryanodine merupakan spesifik inhibitor pada pelepasan kalsium dan bekerja pada reseptor ryanodine yang terdapat di sarkoplasmik retikulum. Protein kinase A dapat mengadakan fosforilasi pada ryanodin reseptor sehingga dapat meningkatkan respon pada pelepasan kalsium (Valdivia et al, 1995). Dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa pada larutan ringer yang bebas kalsium, forskolin dapat melepaskan kalsium yang berasal dari sarkoplasmik retikulum melalui ryanodin reseptor yang diaktivasi oleh protein kinase A yang tergantung pada siklik AMP.

Pada inkubasi dengan kombinasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah EGTA dan ryanodin, forskolin masih dapat menyebabkan kontraksi otot jantung. Hal ini karena forskolin dapat meningkatkan sensitivitas dari myofilament terhadap ion kalsium, dan forskolin dapat melepaskan kalsium yang berasal dari mitokondria.

VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan :

1. Forskolin dapat menyebabkan kontraksi otot jantung tergantung pada dosis yang diberikannya. Semakin besar dosis forskolin yang diberikan semakin meningkat kekuatan kontraksi otot jantung yang ditimbulkannya.
2. Forskolin dapat menyebabkan kontraksi otot jantung yang dipengaruhi oleh adanya kalsium ekstrasel
3. Forskolin dapat menyebabkan kontraksi otot jantung yang dipengaruhi oleh adanya peningkatan kalsium intrasel (kalsium influk dan kalsium release)

6.2. SARAN

1. Perlu meningkatkan dosis forskolin untuk mengetahui efek kontraksi maksimal dan EC_{50} nya pada otot jantung
2. Perlu dilakukan pengukuran secara langsung kadar siklik AMP dan kadar kalsium di dalam sel otot jantung yang disebabkan oleh forskolin
3. Perlu dilakukan penelitian mengenai interaksi siklik AMP dengan enzim-enzim dan kontraktilelemen yang dapat mempengaruhi kontraksi otot jantung

DAFTAR PUSTAKA

- Abc, A. and Karaki, H. 1989. Effect of forskolin on cytosolic Ca^{2+} level and contraction in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249:895-904.
- Abc, A. and Karaki, H. 1992. Mechanism underlying the inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP in vascular smooth muscle. *Eur.J.Pharmacol.* 211:305-311
- Alexander,GC.; Gerrit and Luiz, B. 1986. Antagonism of forskolin effect by adenosine in isolated heart and ventricular myocytes. *Am.J.Physiol.* 19:11769-11777.
- Baker, PF; Blaustein, MP.; Hodgkin, AL. And Steinhardt, RA. 1986. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J.Physiol.* 200:431-458.
- Barovsky, K.; Pedone, C. And Brother, G. 1983. Forskolin stimulated cyclic AMP accumulation mediates protein synthesis dependent refractoriness in C6-2B rat glioma cells. *J.Cyc.Nucl.Pro.Phos.Res.* 9:181-189.
- Bouchard, RA.; Clark, RB. And Giles, WR. 1993. Role of sodium - calcium exchange in activation of contraction in rat ventricle. *J.Physiol.*472:391-413.
- Carbone, E. And Lux, HD. 1984. A low voltage activated fully in activating channel in vertebrate sensory neurones. *Nature.* 310:501-502.
- Callewaert, G.; Cleemann, L. And Morad, M. 1988. Epinephrine enhances Ca^{2+} current-regulated Ca^{2+} release and Ca^{2+} reuptake in rat ventricular myocytes. *Proc.Natn.Acad.Sci. USA.* 85:2009-2013.
- Daly, JW.; Pedgett, W. And Seamon, KB. 1992. Activation of cyclic AMP generating system in brain membrane and slices by the diterpene forskolin-augmentation of receptor mediated responses. *J.Neurochem.* 38:532-544.
- Darfler, FJ.; Mahan, LC.; Koachman, AM. And Insel, PA. 1982. Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involve the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase. *J.Biol.Chem.* 257:1901-1907.
- De Souza, NJ.; Dohadwalla, AN. And Reden, J. 1983. Forskolin: A labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory and adenylate cyclase activating properties. *Mrd.Res.Rev.* 3:201-219.
- Duff, HJ.; Brown, CE.; Cragoe, EJ. And Rahmberg, M. 1991. Antiarrhythmic activity of amiloride mechanism. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 17:879-888.

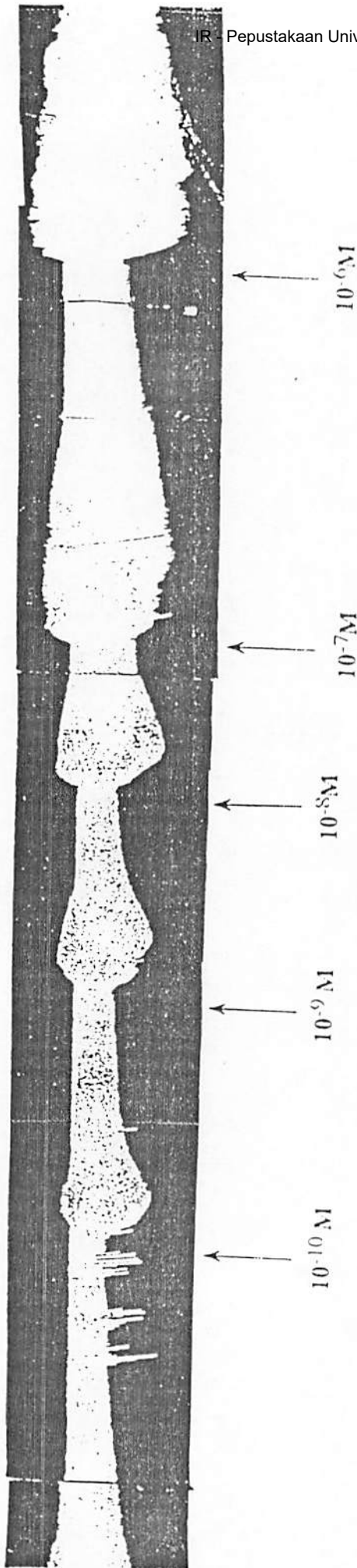
- Earl, CQ.; Linden, J. And Weglicki, WB. 1986. Inhibition of cyclic AMP dependent protein kinase activity by the cardiotonic drugs amrinone and milrinone. 39:1901-1908.
- Egan, TM.; Noble, D.; Noble, SJ.; Powell, T.; Twist, VW. And Yamaoka, K. 1988. On the mechanism of isoprenaline and forskolin induced depolarization of single guinea pig ventricular myocytes. *J.Physiol.* 400:299-320.
- Endoh, M. 1991. Signal transduction of myocardial alpha 1-adrenoceptor regulation of ion channel intracellular calcium and force of contraction, a review. *J. App.Cardiol.* 6:379-399.
- Evans, MI. And McKnight, GS. 1984. Regulation of the ovalbumin gene. Effect of insulin, adenosine 3'5' monophosphate and estrogen. *Endocrinology.* 115:368-377.
- Fleckenstein, A. 1995. Calcium antagonist and calcium agonist: fundamental criteria and classification, in Bayer symposium IX cardiovascular effect of dihydropyridine type calcium antagonist and agonist, edited by Fleckenstein, A.; Van Breemen, C.; Gross, R and Hoffmeister, F. Pp 3-31. Berlin. Heidelberg. Springer-verlag.
- Fleckenstein, CG.; Jankey, J. and Frey, M. 1967. Fundamental cardiovascular effects of Ca antagonist and their therapeutic significance when combined with cardiac glycosides. *Pracklin Klin. Geriatr.* 7:269-284.
- Fos, AP.; Nowycky, MC. And Tsien, RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium current in chick sensory neurones. *J.Physiol.* 394:149-172.
- Hagiwara, S.; Mitsui, M. And Karaki, H. 1993. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J.Pharmacol.* 234:1-7.
- Hass, H. And Hartfelder, G. 1962. Alpha isopropyl-N-methyl-N-homoveratryl-gamma-amino propyl-3-4-dimethoxyphenyl acetonitril. *Arzneim Forsch.* 12:549-558.
- Kaczorowski, GJ.; Slaughter, RS.; King VI and Garcia, MI.. 1989. Inhibitor of sodium calcium exchange : identification and development of probes of transport activity. *Biochem.Biophys. Acta.* 988:287-302.
- Kass, R. 1994. Molecular pharmacology of cardiac L type calcium channel In handbook of membrane channel. Ed by Peraccia C. Pp 187-198. Academic Press, New York.

- Kimura, M.; Aviv, A. and Reeves, JP. 1993. K^+ dependent Na^+ / Ca^{2+} exchange in human platelet. *J.Biol. Chem.* 268:6874-6877.
- Kleyman, TR. And Cragoe, EJ. 1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J.Membr.Biol.* 105:1-21.
- Komuro, IL and Rakic, P. 1992. Selective role of N type calcium channel in neuronal migration. *Science.* 257:806-809.
- Lagnado, L. And McNaughton, PA. 1990. Electrogenic properties of the Na-Ca exchange. *J. Membr. Biol.* 113:177-191.
- Lavoie, PA.; Beauchamp, G. And Elie R. 1990. Tricyclic antidepressant inhibit voltage dependent calcium channel and Na^+ - Ca^{2+} exchange in rat braincortex synaptosomes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68:1414-1418.
- Lindemann, JP. and Watanabe, AM. 1985. Muscarinic cholinergic inhibition of beta adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca transport in guinea pig ventricle. *J.Biol.Chem.* 260:13122-13129.
- Lindner, E.; Dohadwalla, AN. And Bhattacharya, BK. 1978. Positive inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivate isolated from *Colcus forskohlii* Forskolin. *Arzneim Forsch.* 28:284-289.
- Lynn, S.; Morgan, JM.; Gillespie, JL. and Greenwell, JR. 1993. A novel ryanodine sensitive calcium release mechanism in cultured human myometrial smooth muscle cells. *Febs. Lett.* 330:227-230.
- Luo, DL. And Li WH. 1995. Evoked tensions in rabbit aorta by emptying intracellular Ca stores with cyclopiazonic acid, thapsigargin and ryanodine. *Chung. Kuo. Yao. Li. Hsueh. Pao.* 16:280-284.
- Martin, WF.; Graham, DL. And Ian, RN. 1989. The action of ryanodine on rat fast and slow intact skeletal muscle. *J.Physiol.* 414:399-413.
- Matsuda, T.; Gamba, T.; Baba, A. and Iwata, H. 1989. Inhibition by taurine of Na^+ - Ca^{2+} exchange in sarcolemmal membrane vesicles from bovine and guinea pig hearts. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 94:335-3339.
- McNall, SJ. and Mansour, TI. 1985. Forskolin activation of serotonin stimulated adenylyl cyclase in the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochem. Pharmacol.* 34:1683-1688.

- Metzger, H. and Lindner, E. 1984. The positive inotropic acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Arzneim Forsch.* 31:1248-1250.
- Michaelis, M.L.; Michaelis, E.K.; Naunly, E.W and Glatton, N. 1987. Effect of chronic alcohol administration on synaptic membrane $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger. *J. Biol.Chem.* 271:13385-13391.
- Mintz, I.M.; Adams, M.E. And Bean, B.P. P type calcium channel in rat central and peripheral neuron. *Neuron.* 9:85-95.
- Nicoll, P.A.; Hryshko, L.V.; Matsuoka, S.; Frank, J.S and Phillipson, K.D. 1996. Mutation of amino acid residues in the putative trans membrane segment of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger. *J.Biol.Chem.* 271:13385-13391.
- Pierce, G.N.; Cole, W.C.; Link, K.; Messoeli, H.; Maddaford, T.G.; Chen, Y.J.; McPherson, C.D.; Jain, S. And Sontage, D. 1993. Modulation of cardiac performance by amiloride and several selected derivatives of amiloride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265:1280-1291.
- Pott, C. And Lipp, P. 1987. Dual effect of the Ca calmodulin antagonist fendeline on Ca current in single cardiac cells. *J. Mol. Cell.*
- Reeves, Jp. And Hall, C.C. 1994. The stoichiometry of the cardiac sodium calcium exchange system. *J. Biol.Chem.* 259: 7733-7739.
- Reuter, H. And Seitz, N. 1968. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J.Physiol.* 195:451-470.
- Rodger, I.W. And Shahid, M. 1984. Forskolin cyclic nucleotides and positive inotropism in isolated papillary muscle of the rabbit. *Br.J. Pharmacol.* 81:151-159.
- San Andreas, M.D.; Gonzales, F.; Encinas, T.; de Vicente, M.L.; Rodriguez, C. And San Andreas, M.I. 1994. Effect of verapamil, sodium nitroprusid, tetrodoxin and caffeine on the electrical transmural stimulation induced contraction in the reticular groove smooth muscle of adult cattle. *Zentralbe-veterinarmed A.* 41:683-689.
- Schnetkamp, P.P. 1995. How does the retinal rod $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ exchanger regulate cytosolic Ca^{2+} . *J.Biol.Chem.* 270:13231-13239.
- Shah, N.; Than, N.; White, E.; Bennet, K.C. and Orchard, C.H. The role of the sarcoplasmic reticulum in the response of isolated ferret cardiac muscle to beta adrenergic stimulation. *Exp.Physiol.* 79:929-941.

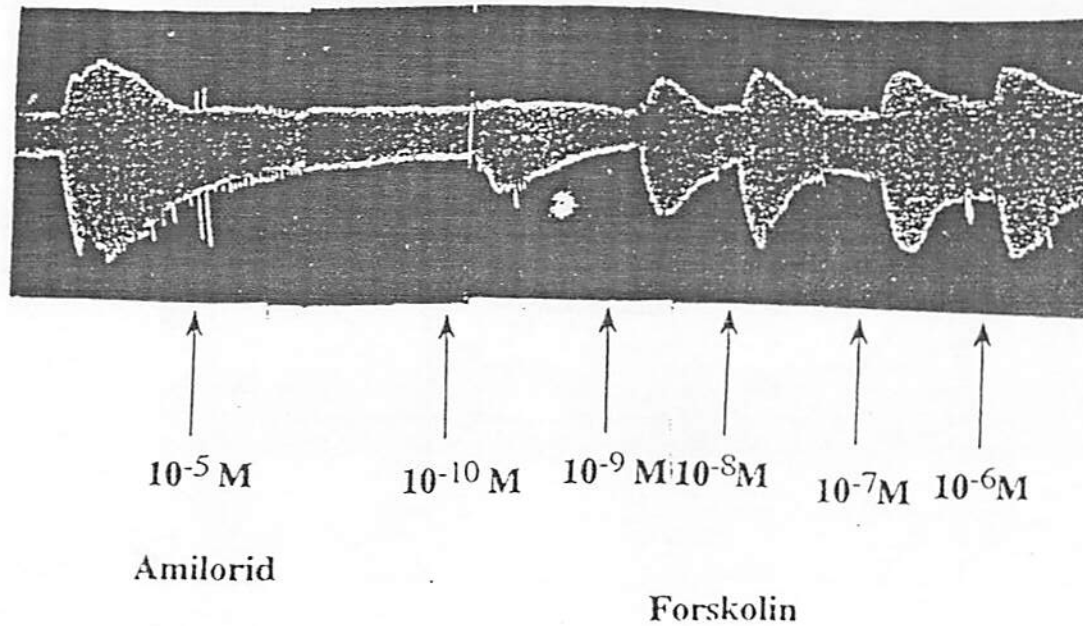
- Siegl, AM.; Daly, JW. And Smith, JB. 1982. Inhibition of aggregation and stimulation of cyclic AMP generation in intact human platelet by the diterpene forskolin. *Mol. Pharmacol.* 21:680-687.
- Slaughter, RS.; Sutko, JL. and Reeves, JP. Equilibrium calcium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicle. *J.Biol Chem.* 258:3183-3190.
- Somlyo, AP. And Somlyo, AV. 1994. Smooth muscle: Excitation-contraction coupling, contractile regulation and the cross bridge cycle. *Alcohol Clin. Exp.Res.* 18:138-143.
- Speeding, M. 1985. Activators and inactivators of Ca²⁺ channel: New perspective. *J.Pharmacol.* 16:319-343.
- Stull, JT.; Hsu, LC.; Transey, MG. and Kamm, KE. 1990. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 27:16683-16690.
- Sudjarwo, SA.; Hori, M.; Tanaka, T.; Matsuda, Y.; and Karaki, H. 1995. Coupling of the endothelin ETA and ETB receptors to Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in vascular smooth muscle. *Eur. J.Pharmacol.* 289:197-204.
- Tajimi, M.; Hori, M.; Mitsui, M.; Ozaki, H. And Karaki, H. 1995. Inhibitory effect forskolin on myosin phosphorylation dependent and independent contraction in bovine tracheal smooth muscle. *J.Smooth Muscle. Res.* 31:129-142.
- Tratwein, W. And Pezer, D. 1987. Modulation of calcium channel function by phosphorylation in guinea pig ventricular cells and phospholipid bilayer membrane. *Circ.Res.* 61:117-123.
- Triggle, DJ. 1991. Calcium channel drugs: Structure-function relationship and selectivity of action. *J. Cardiovasc.Pharmacol.* 18:S1-S6.
- Valdivia, HH.; Kaplan, JH.; Ellis-Davies, GC and Lederer, WJ. 1995. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptor modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science.* 267:1997-2000.
- Vigne, P.; Breitmayer, JP.; Robert, M. And Frelin, C. 1990. Endothelin mobilizes Ca²⁺ from a caffeine and ryanodine insensitive intracellular, pool in atrial cells. *J.Biol.Chem.* 265:6782-6787.
- Yatani, A.; Imoto, Y.; Codina, J.; Hamilton, SL.; Brown, AM. And Birn, BL. 1988. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, Gs, also stimulates dihydropyridine sensitive Ca²⁺ channel. *J.Biol. Chem.* 263:9887-9895

Lampiran 1.



Forskolin

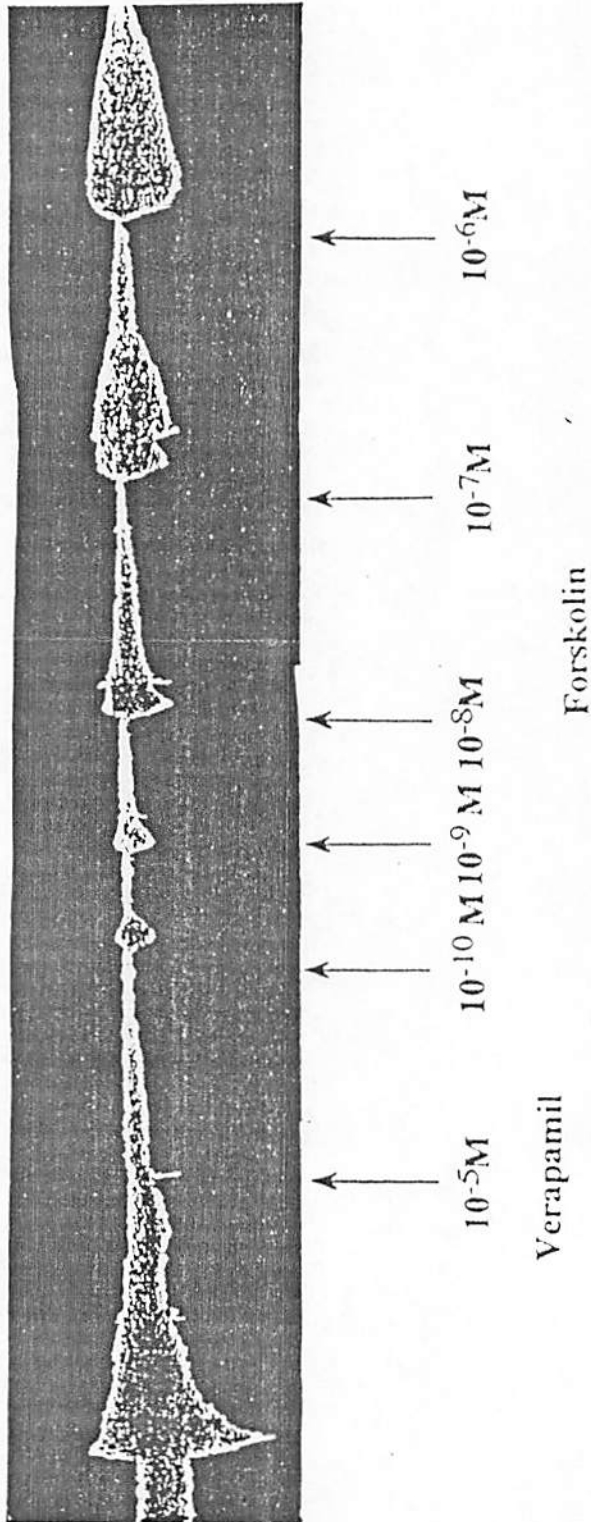
Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin



Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment

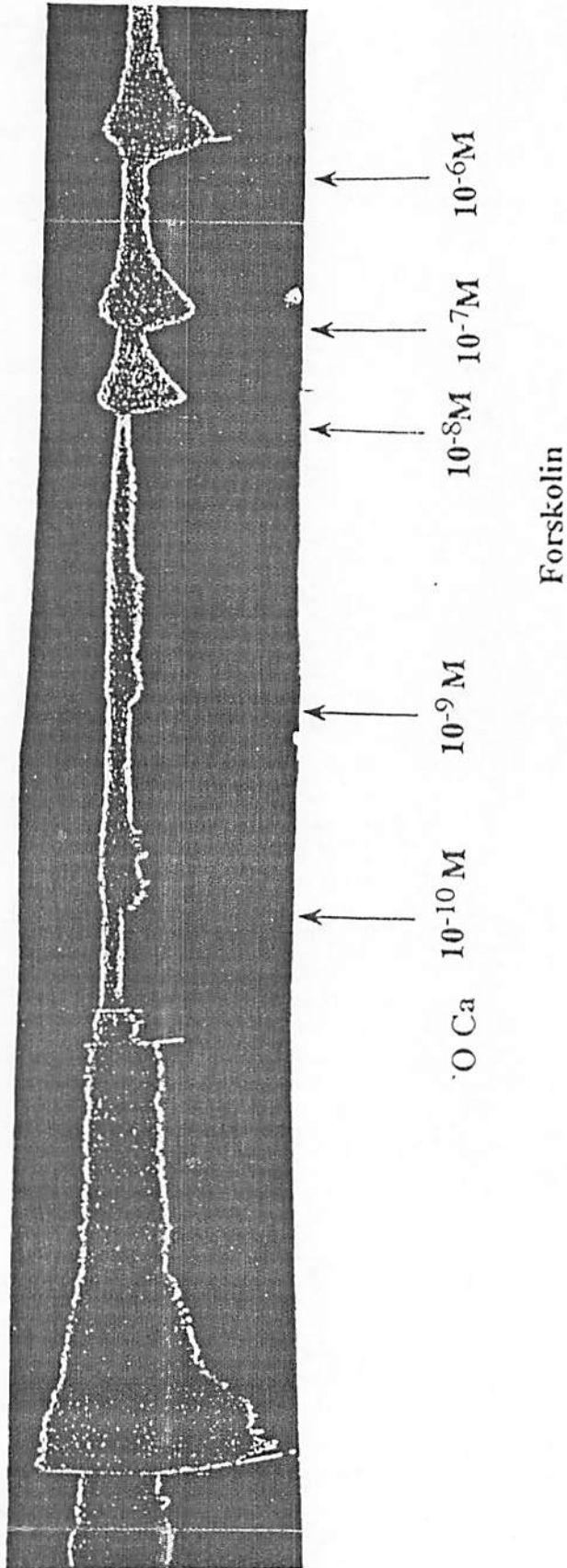
Amilorid 1 μ M

Lampiran 3.



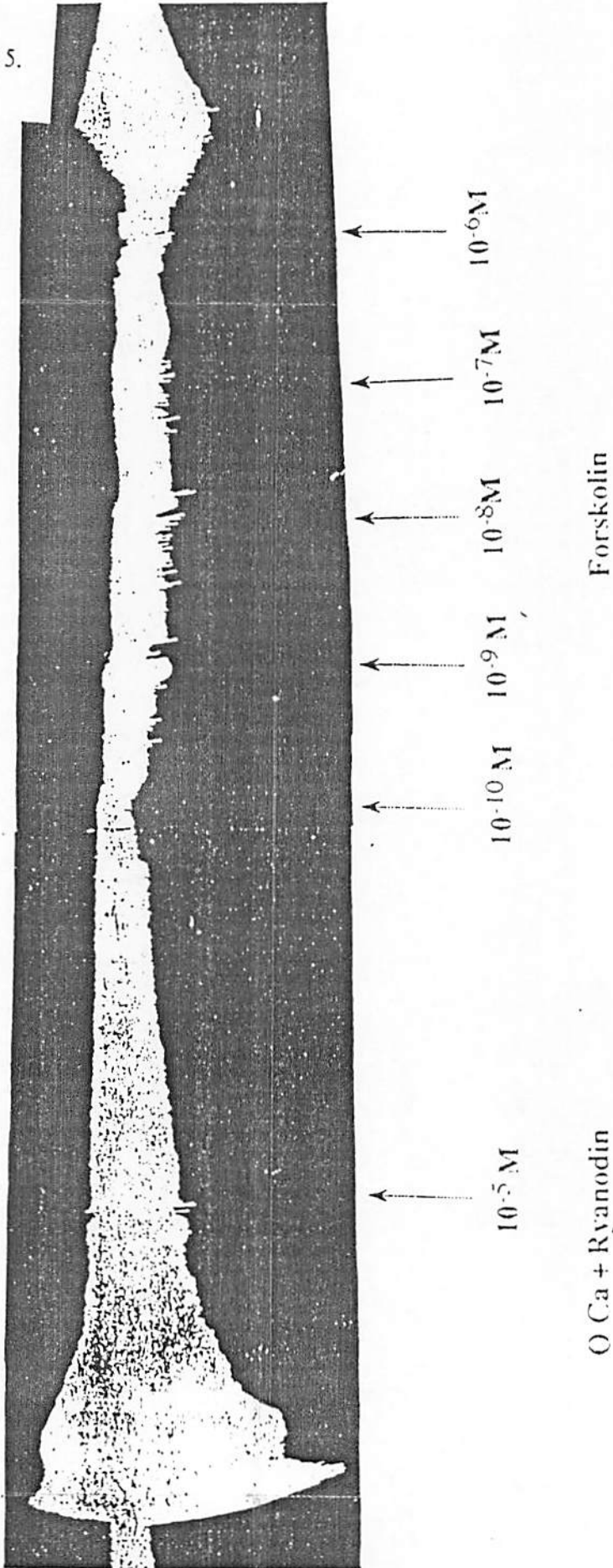
Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya pretreatment

Verapamil 1 μ M



Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA

Lampiran 5.



Kontraksi otot jantung yang disebabkan oleh forskolin dengan adanya inkubasi larutan ringer tanpa kalsium yang ditambah dengan EGTA dan Ryanodin

*** CELL MEANS ***

KJANTUNG
by TREAT
DOSE

Total Population

49.44
(150)

TREAT

	1	2	3	4	5
	85.16	49.68	76.95	25.75	9.68
(30)	(30)	(30)	(30)	(30)

DOSE

	1	2	3	4	5
	27.35	36.12	47.66	62.22	73.87
(30)	(30)	(30)	(30)	(30)

		DOSE				
		1	2	3	4	5
TREAT	1	58.70	70.50	80.78	100.55	115.27
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	2	27.20	36.20	47.77	59.95	77.28
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	3	50.83	64.03	78.45	91.23	100.22
(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	
4	.00	9.87	30.22	40.77	47.88	
(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	
5	.00	.00	1.08	18.62	28.70	
(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	

* * * ANALYSIS OF VARIANCE * * *

KJANTUNG
by TREAT
DOSE

EXPERIMENTAL sums of squares
Covariates entered FIRST

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig of F
Main Effects	168124.071	8	21015.509	802.022	.000
TREAT	125255.732	4	31313.933	1195.044	.000
DOSE	42868.338	4	10717.085	408.999	.000
2-Way Interactions	2646.082	16	165.380	6.311	.000
TREAT DOSE	2646.082	16	165.380	6.311	.000
Explained	170770.153	24	7115.423	271.548	.000
Residual	3275.397	125	26.203		
Total	174045.550	149	1168.091		

150 cases were processed.
0 cases (.0 pct) were missing.

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int	for Mean
Grp 1	6	58.7000	10.9754	4.4807	47.1822	TO 70.2178
Grp 2	6	70.5000	7.1136	2.9041	63.0348	TO 77.9652
Grp 3	6	80.7833	5.3011	2.1642	75.2203	TO 86.3464
Grp 4	6	100.5500	4.5148	1.8431	95.8121	TO 105.2879
Grp 5	6	115.2667	6.0408	2.4661	108.9274	TO 121.6059
Grp 6	6	27.2000	3.8074	1.5543	23.2045	TO 31.1955
Grp 7	6	36.2000	5.6032	2.2875	30.3199	TO 42.0801
Grp 8	6	47.7667	5.6828	2.3200	41.8030	TO 53.7304
Grp 9	6	59.9500	6.6648	2.7209	52.9559	TO 66.9441
Grp10	6	77.2833	7.0198	2.8658	69.9166	TO 84.6501
Grp11	6	50.8333	7.9220	3.2342	42.5198	TO 59.1469
Grp12	6	64.0333	3.4326	1.4013	60.4311	TO 67.6356
Grp13	6	78.4500	5.0572	2.0646	73.1429	TO 83.7571
Grp14	6	91.2333	3.5007	1.4291	87.5597	TO 94.9070
Grp15	6	100.2167	5.5159	2.2519	94.4281	TO 106.0052
Grp16	6	.0000	.0000	.0000	.0000	TO .0000
Grp17	6	9.8667	2.7689	1.1304	6.9610	TO 12.7724
Grp18	6	30.2167	5.4057	2.2069	24.5438	TO 35.8895
Grp19	6	40.7667	2.5508	1.0414	38.0898	TO 43.4435
Grp20	6	47.8833	3.0760	1.2558	44.6553	TO 51.1113
Grp21	6	.0000	.0000	.0000	.0000	TO .0000
Grp22	6	.0000	.0000	.0000	.0000	TO .0000
Grp23	6	1.0833	1.7440	.7120	-.7469	TO 2.9136
Grp24	6	18.6167	3.8244	1.5613	14.6033	TO 22.6300
Grp25	6	28.7000	3.7197	1.5186	24.7965	TO 32.6035
Total	150	49.4440	34.1773	2.7906	43.9298	TO 54.9582

Variable KJANTUNG
By Variable LSD

Multiple Range Tests: LSD test with significance level .05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 3.6196 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 2.80

(*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

```

G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G G
r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r r
P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P P
1 2 2 2 1 2 2 1 1 2 1 1 1 1 1 1
6 1 2 3 7 4 6 5 8 7 9 8 0 1 1 9 2 2 0 3 3 4 5 4 5

```

Mean	LSD	
0000	Grp16	
0000	Grp21	
0000	Grp22	
1 0833	Grp23	
9 8667	Grp17	* * * *
18 6167	Grp24	* * * * *
27 2000	Grp 6	* * * * * *
28 7000	Grp25	* * * * * *
30 2167	Grp18	* * * * * *
36 2000	Grp 7	* * * * * * * * *
40 7667	Grp19	* * * * * * * * *
47 7667	Grp 8	* * * * * * * * * * *
47 8833	Grp20	* * * * * * * * * * *
50 8333	Grp11	* * * * * * * * * * *
58 7000	Grp 1	* * * * * * * * * * * * *
59 9500	Grp 9	* * * * * * * * * * * * *
64 0333	Grp12	* * * * * * * * * * * * *
70 5000	Grp 2	* * * * * * * * * * * * * * *
77 2833	Grp10	* * * * * * * * * * * * * * *
78 4500	Grp13	* * * * * * * * * * * * * * *
80 7833	Grp 3	* * * * * * * * * * * * * * *
91 2333	Grp14	* * * * * * * * * * * * * * * * *
100 2167	Grp15	* * * * * * * * * * * * * * * * *
100 5500	Grp 4	* * * * * * * * * * * * * * * * *
115 2667	Grp 5	* * * * * * * * * * * * * * * * *

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp16	Grp21	Grp22	Grp23
Mean	.0000	.0000	.0000	1.0833

Subset 2

Group	Grp17
Mean	9.8667

Subset 3

Group	Grp24
Mean	18.6167

Subset 4

Group	Grp 6	Grp25	Grp18
Mean	27.2000	28.7000	30.2167

Subset 5

Group	Grp 7	Grp19
Mean	36.2000	40.7667

Subset 6

Group	Grp 8	Grp20	Grp11
Mean	47.7667	47.8833	50.8333

Subset 7

Group	Grp 1	Grp 9	Grp12
Mean	58.7000	59.9500	64.0333

Subset 8

Group	Grp 2
Mean	70.5000

Subset 9

Group	Grp10	Grp13	Grp 3
Mean	77.2833	78.4500	80.7833

Subset 10

Group	Grp14
Mean	91.2333

Subset 11

Group	Grp15	Grp 4
Mean	100.2167	100.5500

Subset 12

Group	Grp 5
Mean	115.2667
