

## Penelitian biokimia reseptor fensiklidin : Pengenalan ikatan spesifik reseptor berafinitas rendah

### Biochemical research of phenylclidine reseptor : Inter- action to specific bonding to the lower affinity receptor

Tutus Gusdinar <sup>1\*)</sup> dan Robert Chicheportiche <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung,

<sup>2)</sup> Ecole National Supérieure de Chimie de Montpellier, France

---

#### Abstrak

Telah dibuktikan fensiklidin (PCP) dan tienilfensiklidin (TCP) terfiksasi pada dua situs berlainan yang saling berinteraksi satu sama lain, dengan menggunakan molekul MK-801 pada konsentrasi yang tetap. Dengan menggunakan berbagai molekul obat yang berbeda efek farmakologinya, serta dengan membuat kurva hubungan antar afinitas molekul ( $IC_{50}$ ) terhadap situs berafinitas rendah, dapat dibuktikan bahwa situs berafinitas rendah pada otak besar dan otak kecil tikus memiliki sifat yang sama. Molekul MK-801 menghambat fiksasi  $^3H$ -PCP dan  $^3H$ -TCP mengikuti kurva dua fase, terfiksasi sangat kuat ( $IC_{50}$  berkisar 10 nM) pada reseptor  $^3H$ -PCP berafinitas tinggi, namun terfiksasi sangat lemah ( $IC_{50}$  berkisar 10  $\mu$ M) pada reseptor  $^3H$ -PCP berafinitas rendah. Molekul MK-801 juga dapat membedakan dua situs reseptor  $^3H$ -TCP yang berafinitas tinggi dan yang berafinitas rendah.

**Kata kunci :** fensiklidin – tienilfensiklidin – MK-801 – reseptor berafinitas tinggi – reseptor berafinitas rendah

#### Abstract

Fixed concentration of MK-801 molecule had been used as a specific ligand for differentiating two kinds of phenylclidine (PCP) and thienylphenylclidine (TCP) receptors. By using several drug molecules which have different pharmacological action, as well as such molecular affinity ( $IC_{50}$ ) to the rat brain, it was obtained that both of these interacting receptors had equal character for its higher or lower affinity sites. The MK-801 molecule inhibited much strongly ( $IC_{50}$  is about 10 nM) fixation of  $^3H$ -TCP to its higher affinity receptor and much weakly ( $IC_{50}$  is about 10  $\mu$ M) fixation of  $^3H$ -PCP to its lower affinity receptor. The MK-801 molecule could be used as well for differentiating two  $^3H$ -TCP receptors, the higher and the lower affinity.

**Key words :** phenylclidine – thienylphenylclidine – MK-801 – higher affinity receptor – lower affinity receptor.

---

#### Pendahuluan

Fensiklidin (*Phencyclidine, PCP*) adalah 1-(1-fensikloheksil)piperidin, dikembangkan tahun 1926 sebagai anestetik umum pada proses bedah; pertamakali disintesis Parke Davis dan dipatenkan tahun 1958 sebagai anestetik umum intravena dengan nama dagang Sernyl. Namun

karena memberi efek halusinasi pada pemakainya, penelitian terhadap manusia dihentikan tahun 1965. Tahun 1967 digunakan sebagai anestetik hewan dengan nama dagang Sernylan, namun tahun 1978 ditarik kembali dari pasar karena dikhawatirkan menjadi sumber penjualan PCP yang saat itu dikenal

sebagai obat ilegal dengan berbagai nama jalanan, seperti *PeaCe Pill, Hog, Angel Dust, Angel Mist, DOA, Sheets, Ozone, Wack, Rocket Fuel*; campurannya dengan mariyuana diberi nama antara lain *Killer Joint, Crystal Supergrass*.

Fensiklidin dan analognya bekerja pada sistem syaraf pusat melalui reseptor spesifik. Percobaan fiksasi  $^3\text{H-PCP}$  terhadap homogenat otak tikus Wistar di dalam larutan berkekuatan ion tinggi menunjukkan fiksasi reversibel molekul tersebut terhadap hanya satu tipe situs reseptor jenuh dengan  $K_d = 0,25 \mu\text{M}$  dan  $\beta_{\text{maks}} = 22,4 \text{ pmol/mg protein}$  (Vincent, 1979; Zukin, 1979).

PCP dan turunannya bekerja pula terhadap reseptor  $\mu$ -opiat dan muskarinik (Vincent, 1979), menghambat penangkapan monoamin (DA, NA, 5-HT) oleh sinaptosom (Vignon, 1984) dan memblokir saluran ion natrium dan kalium (Alburquerque, 1979; Tourneur, 1982; Blaustein, 1983). Selain PCP, beberapa analognya seperti ketamin dan SKF-10047 (nalilnormetazolin), menghambat secara non-kompetitif rangsang N-metil-D-aspartat (NMDA), yaitu antagonis salah satu di antara tiga kelompok reseptor glutaminergik (Anis, 1983; Lodge, 1985).

Berbagai cara kerja pada tingkat molekul tersebut diduga merupakan penyebab berbagai efek psikotropik PCP. Korelasi antara efek dengan interaksi molekul terhadap sasarannya dapat dibuktikan melalui percobaan rotarod (uji ataksia) atau pada uji diskriminasi molekul obat, dengan percobaan fiksasi molekul terhadap reseptor  $^3\text{H-PCP}$  (Vincent, 1979; Zukin, 1979; Quirion, 1981).

N-alilnormetazolin (SKF-10047) dan analog PCP merupakan senyawa yang mampu mensubstitusi ikatan  $^3\text{H-PCP}$  (Quirion, 1981; Zukin, 1981). Pengikatan  $^3\text{H-SKF-10047}$  dengan reseptornya terjadi pada dua situs, yakni sebuah situs berafinitas rendah yang dikenal sebagai reseptor PCP dan sebuah situs berafinitas tinggi yang peka terhadap haloperidol dan dikenal sebagai reseptor sigma (Gundlach, 1985).

Dengan menggunakan  $^3\text{H-TCP}$  ( $^3\text{H-thienylphenacylidine}$ ), suatu ligan spesifik terhadap situs PCP (Zukin, 1981), telah dibuktikan bahwa di dalam sistem syaraf pusat tikus, molekul  $^3\text{H-TCP}$  dapat terikat dengan afinitas

rendah di dalam jaringan otak bagian depan terutama pada korteks dan hipokampus, ataupun terikat dengan afinitas tinggi di dalam otak bagian belakang terutama pada otak kecil (Vignon, 1986).

Hasil penelitian menggunakan membran otak tikus dalam larutan dapar Tris-HCl 50 mM; pH 7,7; telah membuktikan perbandingan ikatan  $^3\text{H-PCP}$  dan  $^3\text{H-TCP}$  adalah sebagai berikut : 1) Diperoleh korelasi sangat baik antara  $IC_{50}$  untuk ikatan  $^3\text{H-PCP}$  dan  $^3\text{H-TCP}$  (Zukin, 1981), hal ini menunjukkan bahwa TCP dan PCP terikat pada kompleks molekul yang sama; 2) Kuantitas ikatan maksimum dapat terjadi lebih besar pada  $^3\text{H-PCP}$  (2,4 pmol/mg protein) daripada untuk  $^3\text{H-TCP}$  (1 pmol/mg protein) (Vignon, 1983).

Kedua hal tersebut di atas dapat terjadi jika  $^3\text{H-PCP}$  berikatan dengan lebih banyak situs dibandingkan dengan  $^3\text{H-TCP}$ , atau dapat dinyatakan bahwa  $^3\text{H-TCP}$  berinteraksi secara tidak langsung dengan situs yang telah lebih dulu berikatan dengan  $^3\text{H-PCP}$ , atau kedua situasi tersebut terjadi secara simultan.

Penelitian lain membuktikan bahwa di dalam larutan yang berkekuatan ion rendah (dapar Tris-HEPES 5 mM; pH 7,7)  $^3\text{H-PCP}$  dan  $^3\text{H-TCP}$  dapat berikatan dengan kedua tipe situs tersebut. Situs berafinitas tinggi terhadap kedua ligan jumlahnya sama (1,2 pmol/mg protein) dalam otak besar tikus dan praktis tidak terdapat di dalam otak kecil (80 fmol/mg protein), sedangkan situs berafinitas rendah terdapat dalam jumlah besar (2,8 fmol/mg protein dalam otak besar dan 5,3 pmol/mg protein dalam otak kecil, menggunakan  $^3\text{H-TCP}$ ). Kedua tipe situs reseptor tersebut terdapat pula di dalam otak manusia (Chaudieu, 1987).

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan molekul yang berinteraksi spesifik dengan kedua situs reseptor PCP, untuk itu dipilih molekul MK-801, yakni (+)-5-metil-10,11-dihidro-5-dibenzo-(a,b)-sikloheptena-5, 10-imina maleat, suatu antikonvulsan (Chaudieu, 1987) dan dapat menghambat rangsang reseptor NMDA seperti juga PCP. Berdasarkan analogi bahwa situs yang berafinitas kuat akan terdistribusi sama untuk  $^3\text{H-TCP}$  maupun  $^3\text{H-MK-801}$  (Vignon, 1986), dapat dipelajari interaksi MK-801 terhadap situs

reseptor yang terlebih dulu diduduki oleh  $^3\text{H}$ -TCP maupun  $^3\text{H}$ -PCP.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dalam penelitian ini dapat dibuktikan adanya situs berafinitas rendah untuk  $^3\text{H}$ -TCP sehingga selanjutnya dapat dilakukan karakterisasi farmakologi TCP terhadap situs tersebut dengan menggunakan suatu seri molekul obat.

## Metodologi

### Bahan

Fensiklidin(PCP;N-1-(fenilsiklo-heksil)-piperidin; tienilsiklidin (TCP; N- (1-(2-tienil)-sikloheksil-piperidin; dan analog- analognya : GK-3, GK-4, GK- 13, GK-108, GK-115, GK-144, hasil sintesis Dr. Kamenka, Laboratorium Kimia Organik ENSCM, Montpellier Perancis. Senyawa turunan opiat psikomimetik: N-alilnormetazosin (SKF-10047), dexoadrol, haloperidol, ketamin, semuanya dalam bentuk rasemat, hasil sintesis oleh Dr. Balster, USA. Ligan kolinerjik (nikotin, atropin) dan pemblokade kalsium (verapamil), produk Aldrich. MK-801, [(+)-5-metil-10,11-dihidro-5-dibenzo-(a,b)-sikloheptena5,10-imina maleat], suatu antikonvulsan yang memblokade pengikatan  $^3\text{H}$ -PCP atau  $^3\text{H}$ -TCP terhadap reseptornya, diperoleh sebagai hadiah hasil sintesis Dr. Scaton, LERS Synthelabo. Produk radioaktif : Trisium Fensiklidin ( $^3\text{H}$ -PCP, 51 Ci/mmol), Trisium Tienilsiklidin ( $^3\text{H}$ -TCP, 64 Ci/mmol), produk CEA-CEN Saclay. Cairan sintilasi radioaktif : ACS, produk Amersham. Filter serat kaca GF/B, produk Whatman. Larutan dapar Tris-HCl 50 mM pH 7,7 dan larutan dapar Tris-HCl 25 mM/HEPES 25 mM pH 7,7 dibuat dari Tris-hidroksimetil-aminometana dan asam piperazin-N,N'-bis-(2-etana)- sulfonat, produk Aldrich. Kit larutan pereaksi pengukur kadar protein sesuai metode Hartree.

### Homogenat membran

Homogenat membran dibuat dari otak tikus Wistar yang dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada  $-80^\circ\text{C}$ . Pada hari percobaan, sebanyak 1,5 g otak tikus dihomogenkan dalam 30 mL larutan dapar Tris-HCl 50 mM pH 7,7 selama 30 detik menggunakan alat Ultra Turax (IKA WERK), kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu  $2-8^\circ\text{C}$ .

Sentrifugasi pertama dilakukan pada 20.000 g,  $4^\circ\text{C}$ , selama 30 menit menggunakan alat ultrasentrifuga SORVAL RC-5B. Larutan supernatan dibuang, lalu endapan disuspensikan dalam 30 mL larutan dapar Tris-HCl 50 mM, kemudian dihomogenkan menurut cara di atas mL larutan

Sentrifugasi kedua dilakukan pada 20.000 g,  $4^\circ\text{C}$ , selama 30 menit, endapan disuspensikan dalam 6 mL larutan dapar Tris-HCl 25 mM/HEPES 25 mM pH 7,7 pada suhu  $4^\circ\text{C}$ .

Suspensi membran tersebut merupakan homogenat total yang digunakan untuk percobaan selanjutnya disimpan pada  $4^\circ\text{C}$ . Konsentrasi total protein di dalam suspensi ditentukan dengan metode Hartree (kit pereaksi asam bisinkoninat yang mulai diperkenalkan tahun 1972) menggunakan albumin serum sapi sebagai standar pembanding, lalu konsentrasi protein digenapkan hingga 10 mg/mL.

### Prosedur penelitian

Di dalam tabung reaksi, sejumlah tertentu larutan ligan radioaktif dan larutan obat yang diteliti, lalu volume larutan digenapkan dengan air suling menjadi 2,7 mL. Setelah penambahan 300  $\mu\text{L}$  suspensi membran, diinkubasi selama 50 menit pada suhu  $25^\circ\text{C}$ , kemudian dipipet 3 x 900  $\mu\text{L}$  larutan hasil inkubasi, disaring melalui filter serat kaca GF/B Whatman disertai pengisapan vakum. Sebelum digunakan filter direndam terlebih dahulu selama 24 jam dalam larutan polietilenimina (PEI) 0,05% untuk menghilangkan efek fiksasi non spesifik akibat penyaringan.

Setelah disaring, filter dicuci dengan 2 x 5 mL larutan dapar Tris-HCl 10 mM pH 7,7. Diupayakan siklus pencucian total untuk tiga larutan hasil inkubasi tidak melebihi 20 detik, sedangkan waktu kontak antara larutan dapar pencuci dengan filter tidak melebihi 4 detik.

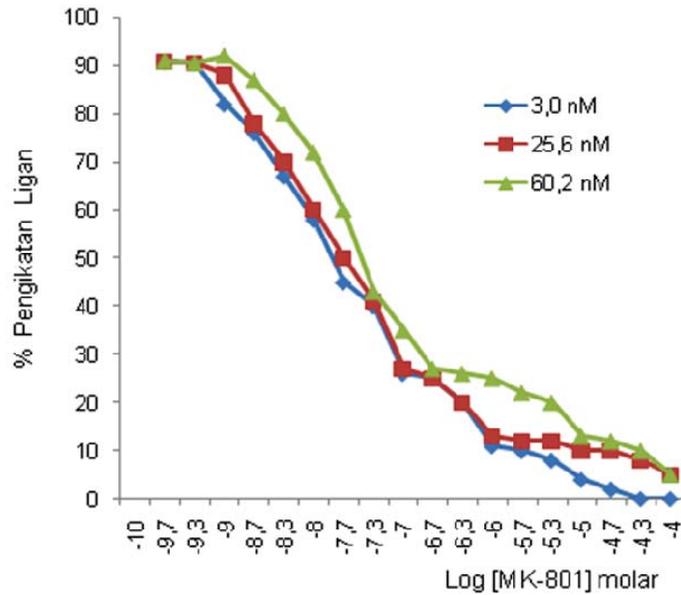
Radioaktivitas yang tertinggal dalam filter diukur setelah terlebih dahulu filter dikocok kuat-kuat dalam 4 mL cairan sintilasi (ACS Amersham) di dalam tabung ukur. Pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan alat penghitung radioaktivitas sinar  $\beta$  (LKB Rackbeta 1214) yang mencatat desintegrasi radioaktif per menit (dpm) dari tiap tabung ukur.

Di samping pengukuran radio aktivitas yang tertinggal dalam filter, diukur juga radioaktivitas dari 50 mL larutan hasil inkubasi yang diambil langsung dengan pipet, untuk menentukan harga radio aktivitas total.

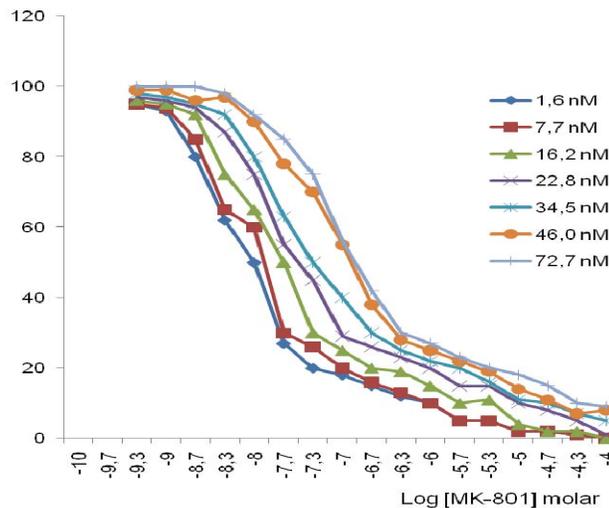
## Hasil Dan Pembahasan

### Efek inhibisi MK-801 terhadap fiksasi $^3\text{H}$ -PCP dan $^3\text{H}$ -TCP

Pada Gambar 1. dapat dilihat efek inhibisi MK-801 terhadap  $^3\text{H}$ -PCP berupa kurva dua fase, menunjukkan ada dua situs reseptor PCP dan MK-801. Pada konsentrasi MK-801 0,5 M kurva tersebut mendatar,



Gambar 1. Kurva efek substitusi MK-801 terhadap pengikatan <sup>3</sup>H-PCP

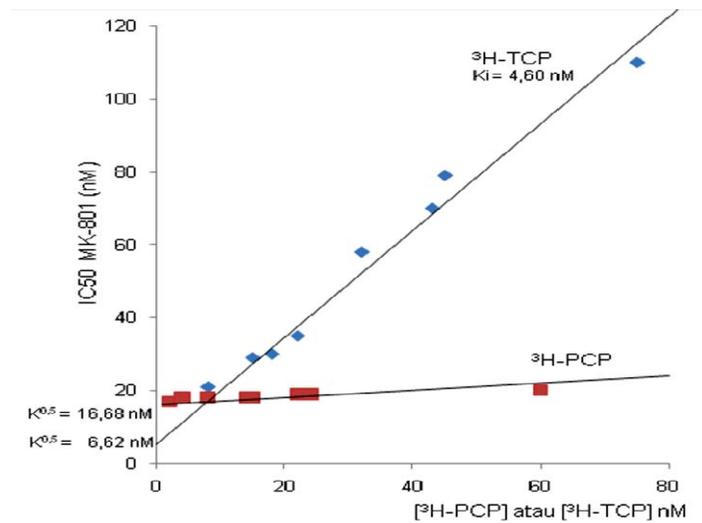


Gambar 2. Kurva efek substitusi MK-801 terhadap pengikatan <sup>3</sup>H-TCP

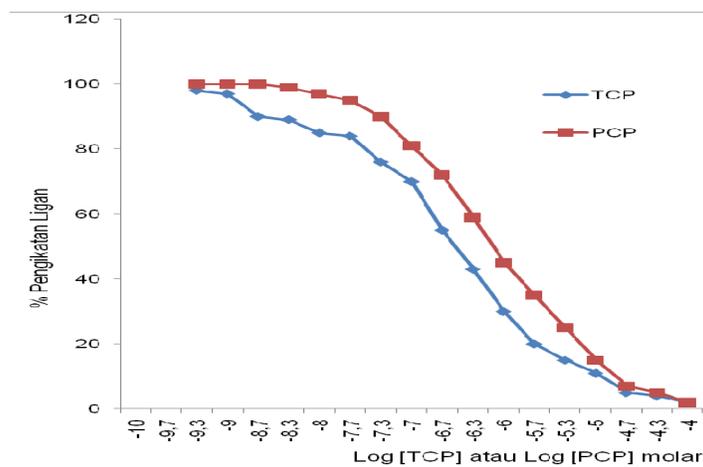
menunjukkan terjadi fiksasi <sup>3</sup>H- PCP pada situs berafinitas rendah yang dapat dihitung dari hasil percobaan fiksasi langsung terhadap membran (Chicheportiche,1987). Hasil percobaan membuktikan molekul MK-801 terfiksasi kuat (IC<sub>50</sub> berkisar 10 nM) pada situs berafinitas tinggi dan terfiksasi lemah (IC<sub>50</sub> berkisar 10 μM) pada situs berafinitas rendah untuk <sup>3</sup>H-PCP.

Gambar 2 juga menampilkan kurva dua fase untuk efek inhibisi MK-801 terhadap

fiksasi <sup>3</sup>H-TCP, namun di sini kurva datar tidak nampak jelas dan lebih rendah daripada yang dihasilkan oleh <sup>3</sup>H-PCP, menunjukkan bahwa memang benar situs reseptor berafinitas rendah untuk <sup>3</sup>H-TCP memiliki kuantitas dua kali lebih kecil daripada situs berafinitas rendah untuk <sup>3</sup>H-PCP. Hal ini menunjukkan bahwa molekul MK-801 dapat digunakan untuk membedakan dua tipe situs reseptor <sup>3</sup>H-TCP, yakni yang berafinitas tinggi dan yang berafinitas rendah.



Gambar 3. Kurva hubungan antara  $IC_{50}$  MK-801 dengan konsentrasi  $^3H$ -PCP dan  $^3H$ -TCP



Gambar 4. Kurva inhibisi  $^3H$ -PCP 10 nM oleh PCP dan TCP pada reseptor berafinitas rendah

Hasil - hasil percobaan tersebut membuka jalan untuk melakukan penelitian lanjut, yaitu menentukan jenis inhibisi MK-801 terhadap fiksasi kedua radioligan tersebut pada situs yang berafinitas tinggi.

Karena sulit membuat kurva Scatchard yang baik untuk membuktikan adanya dua situs reseptor tersebut, maka pada model penelitian ini dilakukan percobaan kompetisi untuk dapat mengukur  $IC_{50}$  molekul MK-801 pada berbagai konsentrasi  $^3H$ -PCP atau  $^3H$ -TCP. Harga  $IC_{50}$  dapat ditetapkan dari bagian pertama kurva,

yaitu yang berkaitan dengan situs berafinitas tinggi.

Gambar 2 menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  untuk MK-801 tidak berubah dengan kenaikan konsentrasi  $^3H$ -PCP. Pada penambahan konsentrasi  $^3H$ -PCP di antara 3 nM dan 10 nM tidak terlihat perubahan  $IC_{50}$  (pada Tabel I dan Gambar 3,  $IC_{50}$  untuk MK-801 berkisar 18 nM). Hasil tersebut menunjukkan dengan jelas MK-801 berinteraksi secara non kompetitif terhadap fiksasi  $^3H$ -PCP pada situs berafinitas tinggi.

Gambar 3 memperlihatkan keadaan sebaliknya,  $IC_{50}$  untuk MK-801 meningkat jika konsentrasi  $^3H$ -TCP naik. Kenaikan konsentrasi  $^3H$ -TCP dari 1,6 nM hingga 72,7 nM meningkatkan secara linier  $IC_{50}$  dari 14 nM hingga 112 nM (Tabel I, Gambar 3). Hasil tersebut membuktikan bahwa  $^3H$ -TCP menghambat secara kompetitif fiksasi MK-801, dan hanya memiliki satu tetapan inhibisi ( $K_i = 4,6$  nM dihitung dari kemiringan kurva pada Gambar 3). Harga  $K_i$  tersebut sama dengan tetapan disosiasi  $^3H$ -TCP pada situs berafinitas tinggi yang diperoleh dengan percobaan fiksasi langsung (Clineschmidt,1982).

Dapat disimpulkan bahwa MK-801 menghambat secara kompetitif fiksasi TCP pada situs reseptornya dan inhibisi secara non kompetitif fiksasi PCP. Dengan kata lain, PCP dan TCP terfiksasi pada dua situs reseptor berbeda yang berinteraksi satu sama lain. Hal itu dapat diperjelas lagi jika dapat ditemukan perubahan konformasi kedua situs tersebut pada saat terjadi fiksasi radioligan terhadap situs reseptornya.

#### **Karakterisasi situs reseptor $^3H$ -PCP berafinitas rendah dengan menggunakan berbagai molekul obat**

Molekul MK-801 dapat memblokir situs reseptor berafinitas tinggi untuk  $^3H$ -PCP dan  $^3H$ -TCP, maka dengan menggunakan molekul tersebut terbuka kemungkinan untuk melakukan berbagai percobaan karakterisasi situs reseptor berafinitas rendah.

#### **Pembuktian situs reseptor $^3H$ -PCP berafinitas rendah**

Molekul MK-801 berinteraksi non kompetitif terhadap situs fiksasi  $^3H$ -PCP. Dengan menggunakan MK-801 pada satu konsentrasi yang tepat, situs berafinitas tinggi dapat diblokade sepenuhnya tanpa mempengaruhi situs berafinitas rendah untuk  $^3H$ -PCP.

Gambar 4 memperlihatkan kurva inhibisi terhadap fiksasi  $^3H$ -PCP, diperoleh dengan menggunakan MK-801 pada konsentrasi tetap dan PCP atau TCP yang tidak bertanda pada konsentrasi bervariasi, dapat dihitung  $IC_{50} = 297$  nM (TCP) dan  $IC_{50} = 556$  nM (PCP). Kedua harga  $IC_{50}$  tersebut berdekatan dengan tetapan kesetimbangan untuk masing-masing

situs berafinitas rendah, yakni  $K_d = 320$  nM ( $^3H$ -TCP) dan  $K_d = 610$  nM ( $^3H$ -PCP) (Chicheportiche,1987; Clineschmidt, 1982).

Hasil di atas memberikan suatu konfirmasi bahwa akibat penambahan MK-801 terjadi fiksasi  $^3H$ -PCP terhadap situs reseptor berafinitas rendah yang diperuntukkan bagi kedua radioligan, yakni  $^3H$ -PCP dan  $^3H$ -TCP.

#### **Karakterisasi farmakologi terhadap situs reseptor $^3H$ -PCP berafinitas rendah**

Percobaan-percobaan dilakukan sama seperti pada butir 2.1. dengan menggunakan berbagai molekul obat yang terdiri atas : 1) Analog PCP yaitu MK-801, TCP, PCP, dexoxadrol, ( $\pm$ ) SKF-10047, (+)ketamin; 2) Pemblokade saluran kalsium yaitu verapamil; 3) Pemblokade mobilisasi kalsium intraseluler yaitu GK-3 (tBu-TCP), GK-144; 4) Pemblokade kuat akumulasi dopamin pada terminal syaraf yaitu GK-3, G-13 (bTCP); 5) Antikolinergik muskarinik yaitu atropin; 6) Agonis nikotinik yaitu nikotin; 7) Antagonis (diduga) situs reseptor sigma opiat yaitu haloperidol. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  pada Tabel II, menunjukkan analog PCP memiliki afinitas lebih besar terhadap situs reseptor  $^3H$ -TCP yang berafinitas tinggi dibandingkan terhadap situs reseptor  $^3H$ -PCP yang berafinitas rendah. Dalam hal ini MK-801 merupakan molekul paling selektif.

Molekul yang bukan analog PCP memiliki selektivitas terbalik. Turunan GK-144 menunjukkan afinitas lebih besar terhadap situs reseptor  $^3H$ -PCP yang berafinitas rendah dibandingkan dengan situs reseptor  $^3H$ -TCP yang berafinitas tinggi. Sedangkan molekul lain (verapamil, atropin, haloperidol) selain memiliki afinitas lemah terhadap situs reseptor  $^3H$ -PCP yang berafinitas rendah, juga tidak dapat terfiksasi pada situs reseptor  $^3H$ -TCP yang berafinitas tinggi.

Dapat disimpulkan, terdapat pemisahan jelas antara situs reseptor yang berafinitas tinggi dan yang berafinitas rendah, baik untuk  $^3H$ -TCP maupun  $^3H$ -PCP. Molekul- molekul tertentu dapat dengan secara jelas membedakan kedua tipe situs reseptor tersebut

#### **Perbandingan situs berafinitas rendah $^3H$ -PCP dalam otak besar dan otak kecil**

Tabel I. Efek substitusi molekul MK-801 terhadap fensiklidin (PCP) dan tienilsiklidin (TCP) yang terikat pada situs reseptor berafinitas tinggi di dalam larutan homogenat otak tikus.

[ <sup>3</sup> H-PCP] nM	IC <sub>50</sub> nM	[ <sup>3</sup> H-TCP] nM	IC <sub>50</sub> nM
3,0	17,8	1,6	14,1
3,9	15,8	7,7	22,4
11,8	17,8	16,2	28,2
12,6	17,4	22,8	31,6
22,8	19,9	24,4	35,5
25,6	19,9	34,5	54,9
60,2	22,4	44,2	70,8
		46,0	79,4
		72,7	112,2

Keterangan : Data diperoleh dari estimasi kurva kurva Gambar 1 dan Gambar 2 sebagai hasil inkubasi selama 50 menit pada suhu 25 °C dalam larutan dapar Tris-HCl + HEPES 5 mM pH 7,7

Tabel II. Perbandingan afinitas berbagai molekul obat terhadap reseptor <sup>3</sup>H-PCP dan <sup>3</sup>H-TCP afinitas tinggi dan afinitas rendah di dalam homogenat otak besar dan otak kecil tikus.

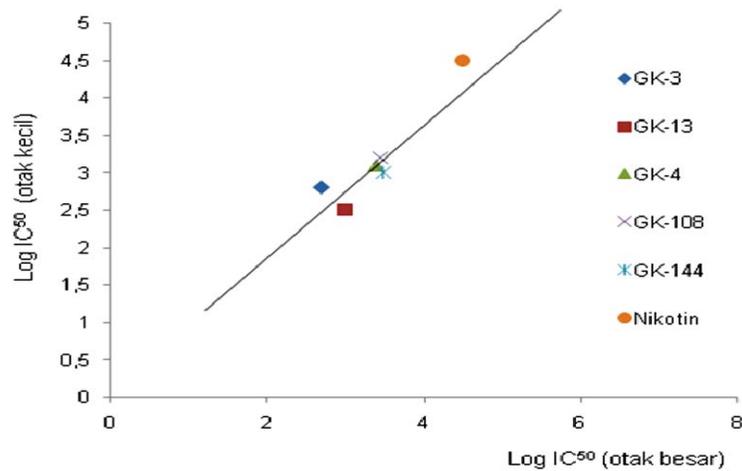
Nama molekul obat	IC <sub>50</sub> (nM) Reseptor afinitas rendah			IC <sub>50</sub> (nM) Reseptor afinitas tinggi	
	3H-PCP (Otak besar)	3H-TCP (Otak besar)	3H-PCP (Otak kecil)	3H-TCP (Otak besar)	
TCP	297	79,4	-	-	9,3
PCP	556	147	-	-	36,9
GK-3 (tBuPCP)	523	1.600	813	-	2.900
GK-13 (BTCP)	853	-	295	-	6.000
Verapamil	1.801	-	-	-	> 100.000
SKF-10047	1.954	1.360	-	-	460
Dexoxadrol	2.241	370	-	-	29,3
GK-4	2.603	-	1.234	-	-
GK-108	3.220	-	1.498	-	-
Atropin	3.675	68.000	-	-	>> 100.000
GK-144	3.680	-	1.005	-	15.000
GK-115	4.010	-	-	-	-
Ketamin	15.736	2.710	-	-	607
Naotin	36.770	-	20.061	-	-
Haloperidol	52.382	-	-	-	>> 100.000
MK-801	10.000	12.000	-	-	11,8

Keterangan : Data IC<sub>50</sub> reseptor berafinitas rendah diperoleh dari estimasi kurva Gambar 4 setelah reseptor berafinitas tinggi diblokade oleh molekul MK-801 200 nM. Inkubasi larutan homogenat selama 50 menit pada suhu 25 °C dalam larutan dapar Tris-HCl + HEPES 5 mM, pH 7,7.

Berdasarkan perbedaan selektivitas molekul obat terhadap situs reseptor <sup>3</sup>H-PCP berafinitas rendah dalam otak besar dan otak kecil (Tabel II), dapat dilakukan penelitian lanjut untuk situs berafinitas rendah tersebut. Dengan menggunakan beberapa molekul obat yang memiliki aktivitas farmakologi berlainan dapat dibuat kurva hubungan antara IC<sub>50</sub> molekul obat terhadap situs berafinitas rendah pada otak besar dan otak kecil. Gambar 5 menunjukkan hubungan linier antara afinitas

obat (GK-4, GK-13, GK-108, GK-144, nikotin) terhadap situs reseptor <sup>3</sup>H-PCP berafinitas rendah. Hanya afinitas molekul GK-3 yang terpencil dari garis korelasi.

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa baik pada otak besar maupun otak kecil situs berafinitas rendah memiliki sifat yang sama.



Gambar 5. Kurva korelasi antara IC<sub>50</sub> dalam otak besar dan otak kecil berbagai molekul yang terikat pada reseptor berafinitas rendah

### Kesimpulan

Data percobaan secara keseluruhan menunjukkan bahwa terjadi pengikatan antara situs reseptor dengan berbagai molekul obat yang diteliti. Hal tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut. Molekul MK-801 menghambat fiksasi <sup>3</sup>H-PCP dan <sup>3</sup>H-TCP mengikuti kurva dua fase. Molekul tersebut terfiksasi dengan sangat kuat (IC<sub>50</sub> berkisar 10 nM) terhadap reseptor <sup>3</sup>H-PCP berafinitas tinggi, namun terfiksasi sangat lemah (IC<sub>50</sub> berkisar 10 μM) terhadap reseptor <sup>3</sup>H-PCP berafinitas rendah. Molekul MK-801 juga dapat membedakan dua situs reseptor <sup>3</sup>H-TCP yang berafinitas tinggi dan yang berafinitas rendah.

Pada situs berafinitas tinggi, MK-801 berinteraksi secara non kompetitif terhadap fiksasi <sup>3</sup>H-PCP dan menghambat secara kompetitif terhadap fiksasi <sup>3</sup>H-TCP (serta sebaliknya) dengan sebuah tetapan inhibisi (K<sub>i</sub> = 4,60 nM) yang berdekatan sekali dengan tetapan disosiasi <sup>3</sup>H-TCP terhadap situs berafinitas tinggi yang diperoleh dengan percobaan fiksasi langsung (K<sub>d</sub> = 4,6 ± 0,3 nM) (Chicheportiche, 1987).

### Daftar Pustaka

Albuquerque, E. X., Tsai, M. C., Aronstam, R., Eldefrawi, A. T., and Eldefrawi, M. E., 1979, Sites of action of phencyclidine II : Interaction with the ionic channel of the nicotinic receptor. *Mol. Pharmacol.*, 18, 167-178.

Dapat disimpulkan bahwa PCP dan TCP terfiksasi pada dua situs berlainan yang saling berinteraksi satu sama lain.

Dengan menggunakan molekul MK-801 pada konsentrasi tetap, diperoleh kurva yang menampilkan fiksasi residual <sup>3</sup>H-PCP pada situs berafinitas rendah. Artinya, molekul MK-801 dapat digunakan sebagai petanda situs berafinitas tinggi dan dengan cara memblokir situs berafinitas tinggi dapat dilakukan penelitian terhadap situs lainnya yang berafinitas lebih rendah.

Molekul-molekul obat tertentu dapat dipakai untuk membedakan dengan jelas kedua tipe situs reseptor, yaitu dengan membandingkan afinitasnya terhadap situs berafinitas tinggi dan situs berafinitas rendah. Dengan menggunakan berbagai molekul obat yang berbeda efek farmakologinya, serta dengan membuat kurva hubungan antar afinitas molekul (IC<sub>50</sub>) terhadap situs berafinitas rendah, dapat dibuktikan bahwa situs berafinitas rendah pada otak besar dan otak kecil memiliki sifat yang sama.

- Anis, N. A., Berry, S. C., Burton, N. R., and Lodge, D., 1983, The dissociative anesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-aspartate. *Brit.J.Pharmacol.*, 79, 565-576.
- Blaustein, M. P., and Ickowicz, R. K., 1983, Phencyclidine in nanomolar concentrations binds to synaptosomes and block potassium channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 80, 3855-3859.
- Chaudieu, I., Chicheportiche, M., Vignon, J., El Harfi, M., Kamenka, J. M., and Vignon, J., 1987, Recherche d'une corrélation entre les sites marqués à la  $^3\text{H-PCP}$  et la  $^3\text{H-TCP}$  dans le SNC de rat. *Eur.J.Med.Chem.*
- Chicheportiche, R., Agid, Y., Chaudieu, I., Gusdinar, T., Agid, J., Journot, L., Kamenka, J. M., and Vignon, J., 1987, *The multiple binding sites of  $^3\text{H-PCP}$  and  $^3\text{H-TCP}$  in the rat and human CNS. in : Sigma and phencyclidine-like compounds as molecular probes in biology.* Domino, E.F. and Kamenka, J. M., Ed. NPP Book Ann Arbor, Michigan.
- Clineschmidt, B. V., Martin, G. E., and Bunting, P. R., 1982, Anticonvulsant activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo-[a,d]-cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant central sympathomimetic and apparent anxiolytic properties. *Drug Dev.Res.*, 2, 123-134.
- Gundlach, A. L., Largent, B. L., and Snyder, S. H., 1985, Phencyclidine and sigma opiate receptors in brain : Biochemical and autoradiographical differentiation. *Eur.J. Pharmacol.*, 113, 465-466.
- Lodge, D., and Johnston, G. A. R., 1985, Effect of ketamine on amino acid evoked release of acetylcholine from rat cerebral cortex in vitro, *Neurosci.Lett.*, 56, 371-375.
- Quirion, R., Hammer, R. P., Jr., Herkenham, M., and Pert, C. B., 1981, Phencyclidine (angel dust) sigma opiate receptor : Visualization by tritium sensitive film. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.*, 78, 5881-5885.
- Tourneur, Y., Romey, G., and Ladzunski, M., 1982, Phencyclidine blockade of sodium and potassium channel in neuroblastoma cells. *Brain Research*, 245, 154-158.
- Vignon, J., Chicheportiche, R., Chicheportiche, M., Kamenka, J. M., Geneste, P., and Ladzunski, M., 1983,  $^3\text{H-TCP}$  : A new tool with high affinity for the PCP receptor in rat brain. *Brain Research*, 280, 194-197.
- Vignon, J., and Ladzunski, M., 1984, Structure-function relationships in the inhibition of synaptosomal dopamine uptake by phencyclidine and analogues. *Biochem.Pharmacol.*, 33, 700-702.
- Vignon, J., Privat, A., Chaudieu, I., Thierry, A., Kamenka, J. M., and Chicheportiche, R., 1986,  $^3\text{H-thienyl-phencyclidine}$  ( $^3\text{H-TCP}$ ) binds to two different sites in rat brain. Localization by radioautographic and biochemical techniques. *Brain Research*, 378, 133-141.
- Vincent, J. P., Kartalowski, B., Geneste, P., Kamenka, J. M., and Ladzunski, M., 1979, Interaction of phencyclidine (angel dust) with a specific receptor in rat brain membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 76, 4678-4682.
- Zukin, E., Kemp, J., Priestley, T., Knight, A., Woodruff, G., and Iversen, L., 1979, The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA*, 76, 5372-5376.
- Zukin, R. S., and Zukin, S. R., 1981, Demonstration of  $^3\text{H-cyclazocine}$  binding to multiple opiate receptor sites. *Mol.Pharmacol.*, 20, 246-254.

---

\* Korespondensi : Dr. Tutus Gusdinar Kartawinata, Apt.  
Sekolah Farmasi ITB, Jl. Ganesha 10, Bandung - 40132  
E-mail:gusdinar@farmasi.itb.ac.id