



## Belakang

# BAB I PENDAHULUAN

Seiring bertambahnya usia populasi global, jumlah pasien *Alzheimer's Disease* (AD) terus meningkat. Pada tahun 2017, sekitar 47 juta orang di seluruh dunia mengalami demensia dengan hampir 10 juta kasus baru terdeteksi setiap tahunnya. Diperkirakan jumlah ini akan terus meningkat hingga mencapai 115 juta pada tahun 2050 (*World Health Organization*, 2021). Indonesia termasuk dalam sepuluh negara dengan angka demensia tertinggi di dunia dan Asia Tenggara dengan angka kasus AD sekitar 1,2 juta penderita demensia pada tahun 2016 (Martina, 2020).

Penelitian lain menunjukkan bahwa perempuan memiliki risiko lebih tinggi terkena AD dibandingkan laki-laki. Studi terbaru juga mengindikasikan bahwa penurunan kognitif pada perempuan lebih berat daripada laki-laki meskipun berada pada tahap penyakit yang sama (Irvine *et al.*, 2012; Laws *et al.*, 2018). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh faktor biologis dan hormonal yang berhubungan dengan menopause pada wanita (Hebert *et al.*, 2013).

AD ditandai oleh penurunan fungsi kognitif secara progresif yang ditandai dengan pembentukan plak akibat agregasi *amiloid-beta* ( $A\beta$ ) dan *neurofibrillary tangles* (NFT) di otak (Zhang *et al.*, 2023). Akumulasi peptida  $A\beta_{1-42}$  merupakan ciri khas dari penyakit ini. Pembersihan  $A\beta_{1-42}$  yang melintasi sawar darah-otak (*blood-brain barrier* – BBB) dimediasi oleh transporter efluks ATP-binding cassette (ABC), terutama ABCB1 (Chai *et al.*, 2020; Sitaet *al.*, 2017).

Saat ini, banyak individu menerima pengobatan yang melibatkan beberapa terapi di mana satu atau lebih obat dapat menghambat aktivitas transporter ABC pada sel endotel BBB. Beberapa contohnya adalah obat penghambat kanal kalsium verapamil. Obat ini telah dilaporkan oleh sejumlah penelitian memiliki efek penghambatan aktivitas fungsional ABCB1 secara signifikan pada model yang digunakan (Lai *et al.*, 2020; Shubbar & Penny, 2020; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Upaya penemuan dan pengembangan obat untuk AD menghadapi tantangan berat, terutama terkait dengan ketersediaan hewan coba yang mampu meniru kondisi patologis AD secara akurat. Oleh karena itu, salah satu metode pengembangan model *in vivo* untuk AD dilakukan dengan melakukan penginduksian hewan coba dengan senyawa tertentu, misalnya Hiosin hidrobromida, untuk memicu kondisi-kondisi yang menyerupai AD.

Hiosin hidrobromida adalah senyawa antikolinergik yang dapat menembus sawar darah otak dan dilaporkan dapat menyebabkan gangguan memori dan kognitif melalui mekanisme inhibisi reseptor muskarinik di otak. Penghambatan reseptor ini dapat menyebabkan perubahan kimiawi pada neuron di otak yang pada akhirnya memicu kondisi pada fase inisiasi AD, di antaranya adalah induksi stres oksidatif yang ditandai dengan penurunan fungsi antioksidan endogen, misalnya superoksida dismutase (SOD) yang kemudian diikuti oleh peningkatan spesies



aktif (*radical oxygen species* –ROS) (Jansen et al., 2015; Wildah et al., 2012; Anand et al., 2022).

Penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara kadar SOD. Penurunan kadar SOD menyebabkan penumpukan radikal bebas yang dapat merusak sel saraf dan menyebabkan degenerasi saraf (Flynn & Melov, 2013; Butterfield & Lauderback, 2002).

Studi yang memfokuskan kajiannya pada investigasi efek verapamil sebagai inhibitor ABCB1 terhadap level SOD pada model tikus betina AD sangat terbatas dan tidak komprehensif. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengamatan terhadap permasalahan tersebut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana efek pemberian hiosin hidrobromida terhadap kadar SOD hati pada tikus betina?
2. Bagaimana efek pemberian verapamil terhadap kadar SOD hati model tikus betina yang diberikan hiosin hidrobromida?

## 1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana efek pemberian hiosin hidrobromida terhadap kadar SOD hati pada tikus betina?
2. Untuk mengetahui efek pemberian verapamil terhadap kadar SOD hati model tikus betina diberikan hiosin hidrobromida?



## an Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bedah, alat-alat gelas, alu, lumpang, *microplate reader*, sentrifugasi, timbangan analitik, tabung vakutainer, spuit 1 cc dan 10 cc, vortex, dan 96 well plate.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *alcohol swab*, *aqua pro injection*, hiosin hidrobromida injeksi, NaCl, PBS, SOD *determination kit* (Sigma-Aldrich® Catalog Number 19160), Trizma-HCl dan verapamil

## 2.2 Metode Penelitian

### 2.2.1 Penyiapan Hewan Uji (*Rattus norvegicus*)

Yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan bobot tubuh  $\pm 150$  gram. Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok. Sebelum perlakuan dilakukan, tikus-tikus tersebut diaklimatisasi selama minimal 7 hari.

### 2.2.2 Penginduksian Hewan Coba dengan Hiosin Hidrobromida

Penginduksian hewan coba menggunakan 2 mg/kgBB hiosin hidrobromida melalui injeksi intraperitoneal selama 21 hari.

### 2.2.3 Perlakuan Hewan Uji

Sebelum perlakuan diberikan kepada hewan uji, pengajuan etik dilakukan ke Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Sebanyak 24 ekor hewan uji dibagi ke dalam 6 kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok I (kontrol sehat)  
Hewan uji yang tidak diberi perlakuan apapun
2. Kelompok II (kontrol pembawa *aqua pro injection*)  
Hewan uji diinjeksi dengan *aqua pro injection* secara intraperitoneal
3. Kelompok III (kontrol pembawa NaCMC 0,5%)  
Hewan uji diberi NaCMC 0,5% secara peroral
4. Kelompok IV  
Hewan uji diinjeksi dengan hiosin hidrobromida (2mg/kgBB) selama 21 hari secara intraperitoneal
5. Kelompok V  
Hewan uji diinjeksi dengan hiosin hidrobromida (2 mg/kgBB) secara intraperitoneal kemudian diberikan verapamil (5 mg/kgBB) secara peroral dengan selang waktu 1 jam selama 21 hari
6. Kelompok VI  
Hewan uji diinjeksi dengan oleh verapamil (5 mg/kgBB) secara peroral selama 21 hari

### 2.2.4 Pengambilan Organ Hati Tikus

Tikus dimatikan dengan cara diinduksi menggunakan eter melalui inhalasi. Setelah memastikan bahwa tikus tidak sadar, dilakukan pengambilan jaringan hati melalui pembedahan.



### Analisa Organ Hati

Hati dikeluarkan dari tubuh hewan lalu dibersihkan dari jaringan lemak. Organ dicuci dengan PBS lalu dikeringkan. Organ ditimbang dengan timbangan analitik.

#### 2.2.6 Penyiapan Sampel Biologis

Jaringan hati diperfusi dengan PBS untuk menghilangkan eritrosit. Jaringan kemudian dihomogenisasi menggunakan *Dounce homogenizer* dalam Trizma-HCl 0,1 M dingin, pH 7,4, yang mengandung 0,5% Triton X-100, 5 mM merkaptoetanol, dan inhibitor protease. Homogenat kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C (12.000 × g selama 10 menit). Supernatan yang mengandung SOD dipindahkan ke tabung baru untuk pengukuran kadar SOD.

#### 2.2.7 Pengukuran Kadar SOD

Pengukuran kadar SOD dilakukan berdasarkan protokol dari *Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich nomor katalog 19160)*. Assay kit ini terdiri atas:

1. Buffer uji (*Assay buffer*)
2. Buffer pengencer (*Dilution buffer*)
3. SOD
4. WST (*Water-Soluble Tetrazolium Salt*)
5. Xantin oksidase

#### 2.2.8 Pembuatan Larutan WST

Larutan kerja WST disiapkan dengan mengencerkan 1 mL larutan WST (*Water-Soluble Tetrazolium Salt*) dengan 19 mL larutan penyangga.

#### 2.2.9 Pembuatan Larutan Kerja Enzim

Larutan kerja enzim disentrifugasi selama 5 detik, lalu dicampur dengan pipet, dan diencerkan 15 µL larutan enzim dengan 2,5 mL buffer pengenceran.

#### 2.2.10 Uji Protein Terkonsentrasi

Sebanyak 20 µL larutan sampel ditambahkan ke setiap sumur sampel dan blank 2, sedangkan 20 µL H<sub>2</sub>O ultramurni ditambahkan ke blank 1 dan blank 3. Selanjutnya, 200 µL larutan kerja WST ditambahkan ke setiap sumur dan diaduk. Setelah itu, 20 µL buffer pengenceran ditambahkan ke blank 2 dan blank 3. Kemudian, 20 µL larutan kerja enzim ditambahkan ke setiap sampel dan blank 1, lalu dicampurkan secara merata. Plat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Absorbansi diukur pada 450 nm menggunakan mikroplat, dan aktivitas SOD dihitung.

#### 2.2.11 Analisis Data

Data hasil penelitian dikumpulkan dan dianalisis menggunakan One-Way ANOVA setelah memenuhi seluruh asumsi yang dilanjutkan uji post hoc comparison uji Tukey menggunakan aplikasi *GraphPad Prism 9*. Data hasil statistik yang diperoleh kemudian dibahas dan dibuat kesimpulan.