

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sekitar 50 juta individu di seluruh dunia saat ini, terutama populasi lanjut usia di atas 65 tahun, menderita *Alzheimer's Disease* (AD) (Shah et al., 2023). Di Indonesia, jumlah penderita AD dan demensia lainnya merupakan yang tertinggi di Asia Tenggara. Diperkirakan, kasus akan meningkat sebesar 244%, dari 987.673 kasus pada tahun 2019 menjadi sekitar 3,4 juta kasus pada tahun 2050 (Rusjini & Kariasa, 2023).

Dari sebuah penelitian dilaporkan bahwa dibandingkan pria berusia lanjut, wanita yang berusia lanjut lebih besar mengalami kehilangan jaringan otak pada hipokampus dan lobus parietal yang merupakan area di otak yang penting untuk fungsi kognitif. Hal ini yang menjelaskan wanita rentan mengalami demensia, bahkan di usia 65 tahun angka kejadian AD 2-3 kali lebih tinggi pada wanita dibanding pria (Andriana & Wiyasa, 2017).

AD merupakan penyakit yang ditandai dengan penurunan fungsi kognitif secara progresif yang ditandai dengan pembentukan plak agregasi amiloid-beta ($A\beta$) dan *neurofibrillary tangles* (NFT) di daerah otak (Zhang et al., 2023). Deposisi peptida $A\beta_{1-42}$ merupakan ciri khas AD dan akumulasi ini dapat disebabkan oleh penurunan pembersihan $A\beta_{1-42}$ dari jaringan otak. Salah satu mekanisme yang terlibat pada penurunan proses klirens $A\beta_{1-42}$ adalah penurunan aktivitas fungsional dari ATP-binding cassette (ABC) B1 (ABCB1) di melintasi sawar darah-otak (*blood-brain barrier* - BBB) (Assema et al., 2012; Chai et al., 2020; Sita et al., 2017; Shubbar & Penny, 2020).

Transporter ABC adalah pompa efluks yang bergantung pada ATP membran sel yang mengangkut substrat dari ruang intraseluler ke ekstraseluler. ABCB1 telah terbukti memainkan peran penting dalam menjaga homeostasis di susunan saraf pusat sehingga melindungi otak dari akumulasi zat-zat yang berpotensi beracun (Assema et al., 2012).

Saat ini, banyak individu menerima rejimen pengobatan yang mengandung beberapa obat terapi, di mana satu atau lebih obat tersebut dapat menghambat aktivitas transporter ABC pada sel endotel BBB. Berdasarkan studi, salah satu contohnya yakni verapamil yang merupakan salah satu generasi pertama inhibitor ABCB1. Verapamil terbukti menghambat aktivitas fungsional ABCB1 dengan peningkatan secara signifikan akumulasi selular $A\beta_{1-42}$ pada PBECs (Wang et al., 2006; Wang et al., 2008; Lai et al., 2020; Shubbar & Penny, 2020; Schulz et al., 2023)

Kondisi AD dan penumpukan $A\beta_{1-42}$ dapat menyebabkan kerusakan sel saraf

stimulasi oleh stres oksidatif dan neuroinflamasi (Kumar et al., 2023). melaporkan bahwa kadar glutathion mengalami penurunan signifikan menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Glutathion berfungsi sebagai antioksidan yang melawan spesies oksigen dan nitrogen reaktif. Glutathion



tersedia dalam dua bentuk: bentuk tiol tereduksi (GSH) dan bentuk disulfida teroksidasi (GSSG). Dalam kondisi fisiologis, lebih dari 98% total GSH berada dalam bentuk reduktif. Namun, pada penyakit neurodegeneratif, termasuk AD, kadar GSH menurun seiring bertambahnya usia di korteks, menyebabkan ketidakseimbangan rasio GSH/GSSG. Kelebihan GSSG menyebabkan stres oksidatif akibat peroksidasi yang akhirnya dapat mengakibatkan neurodegenerasi (Charisis et al., 2021; Kumar et al., 2023; Pocernich & Butterfield, 2012; Vaskova et al., 2023).

Kurangnya model hewan yang dapat meniru kondisi AD dengan akurat menjadi salah satu kesulitan dalam pengembangan obat saat ini. Model hewan yang tepat sangat penting dalam pemahaman cara kerja penyakit dan untuk pengujian efektivitas serta keamanan terapi baru sebelum digunakan pada manusia. Namun, hingga saat ini, belum ada model hewan yang sepenuhnya bisa menggambarkan kompleksitas AD, terutama dalam hal pembentukan plak $A\beta_{1-42}$, *neurofibrillary tangles* dan kematian sel saraf.

Salah satu pendekatan dalam pengembangan model *in vivo* Alzheimer adalah dengan menginduksi kondisi yang menyerupai Alzheimer pada hewan melalui pemberian hiosin hidrobromida. Hiosin adalah antagonis reseptor muskarinik yang menghalangi neurotransmisi kolinergik, sehingga menyebabkan penurunan memori dan kognisi pada hewan coba. Penelitian terbaru melaporkan bahwa hiosin meningkatkan akumulasi spesies oksigen reaktif, yang menyebabkan stres oksidatif dan gangguan memori (Yadang et al., 2020). Hiosin, sebagai antagonis reseptor muskarinik, memblokir aktivitas reseptor asetilkolin muskarinik dan dapat menyebabkan amnesia kognitif transien serta perubahan elektrofisiologis, seperti yang terlihat pada AD (Bajo et al., 2015).

Penelitian *in vivo* yang secara khusus mengevaluasi efek penghambatan ABCB1 terhadap kadar glutathion otak pada model tikus betina dengan AD masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penghambatan aktivitas ABCB1 terhadap kadar glutathion pada sampel otak model hewan coba Alzheimer.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana efek pemberian hiosin hidrobromida terhadap kadar glutathion otak tikus betina?
2. Bagaimana efek pemberian verapamil terhadap kadar glutathion otak tikus betina yang diinduksi dengan hiosin hidrobromida?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini, yaitu:
 1. Mengetahui efek pemberian hiosin hidrobromida terhadap kadar glutathion otak tikus betina
 2. Mengetahui efek pemberian verapamil terhadap kadar glutathion otak tikus betina yang diinduksi dengan hiosin hidrobromida



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin pada bulan Januari-Februari 2025.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 96 *well culture plate*, alat bedah, beaker 500 ml dan 250 ml (IWAKI®), *centrifuge*, *centrifuge tube* 15 ml (OneMed®), *dounce glass homogenizer* (GPE®), gelas ukur 50 ml (IWAKI®), lumpang dan alu, mikropipet, *microplate reader* (BMG LABTECH® Omega S/N 415-5221), pipet volume (IWAKI® CTE33), *pipette controller* (ErgoOne FAST®), reagen reservoir, tip mikropipet (Gilson®), sendok tanduk, *magnetic stir bars* (Cowie®), tabung effendorf (OneMed®), tabung vacutainer (OneHealth®), timbangan analitik, dan spoit 1 ml (OneMed®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich® M3148-25ml), alkohol 70% (OneMed®), *alcohol swab*, aquadest (Waterone ONELAB®), Aqua Pro Injection (API) 500 ml (generik), buffer tris HCl pH 7.4 100 ml, *Glutathione Assay Kit* (Sigma-Aldrich® CS0260), hiosin hidrobromida 1 g (Sigma Aldrich® S0929), NaCl 500 ml (generik), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), protease Inhibitor cocktail 1 ml (Sigma Aldrich®), Triton X-100 10 ml (Merck®), dan verapamil HCl 80 mg (generik).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan hewan uji

Pada penelitian ini digunakan hewan coba berupa tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sebanyak 24 ekor dengan bobot badan $\pm$ 150 gram. Tikus diaklimatisasi selama minimal 1 minggu.

2.3.2 Perlakuan hewan uji

Terlebih dahulu dilakukan pengajuan etik ke Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Hewan uji dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan yang berbeda. Hewan uji diambil secara acak lalu ditimbang, kemudian dikelompokkan menjadi:



(kontrol sehat): Hewan uji yang tidak diberikan perlakuan apapun

II (kontrol pembawa): Hewan uji diinjeksikan pembawa API melalui intritoneal selama 21 hari

II (kontrol pembawa): Hewan uji diberikan pembawa Na-CMC melalui intritoneal selama 21 hari

4. Kelompok IV: Hewan uji diinjeksikan hiosin hidrobromida (2 mg/kgBB) secara intraperitoneal selama 21 hari
5. Kelompok V: Hewan uji diberi verapamil (5 mg/kgBB) secara peroral lalu 1 jam setelahnya diinjeksikan hiosin hidrobromida (2 mg/kgBB) secara intraperitoneal selama 21 hari
6. Kelompok VI: Hewan uji diberi verapamil (5 mg/kgBB) secara peroral selama 21 hari

2.3.3 Pengambilan organ dan penimbangan bobot organ

Tikus dimatikan dengan pemberian eter perinhalasi. Tikus dipastikan tidak sadar atau tidak menunjukkan gerakan spontan kemudian dilakukan pengambilan organ otak tikus dengan hati-hati melalui pembedahan kranium. Pembedahan tersebut dilakukan dengan cara menggunting kranium dengan arah sagital dari kaudal (oksipital) menuju ke rostral (frontal), tepat diantara kedua hemisfer otak. Selanjutnya dilakukan pembebasan otak tikus pada regio basal dari jaringan ikat sekitarnya (Darwatik et al., 2017). Setelah otak tikus dikeluarkan, dicuci dengan PBS kemudian dikeringkan dan ditimbang bobotnya menggunakan timbangan analisis.

2.3.4 Ekstraksi lisat otak

Otak tikus dimasukkan ke dalam *dounce glass homogenizer* dan ditambahkan dengan campuran larutan yang mengandung 2-mercaptoethanol 5 mM, protease inhibitor, triton X-100 (0,5%), dan tris HCl 0,1 M pH 7,4 (Paulson et al., 2008; Jiwaji et al., 2022; Galli et al., 1996; Kumpulainen et al., 1979; Qu et al., 2024; Katsuki et al., 2024). Untuk organ otak dengan bobot terberat ditambahkan sebanyak 5 ml campuran larutan, kemudian organ otak dengan bobot lainnya akan dilakukan penyesuaian. Setelah itu, otak tikus dihomogenkan pada suhu 4°C lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 10 menit. Selanjutnya supernatan dicuplik sebanyak 200 µl dan ditambahkan dengan 5% larutan SSA. Kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 x g selama 10 menit lalu dipisahkan supernatan dari endapan yang terbentuk.

2.3.5 Pengujian glutation

Pengujian glutation pada penelitian ini menggunakan *Glutathione Assay Kit* (Sigma-Aldrich® CS0260) dengan komposisi: Assay Buffer 5x for Glutathione, 500 mM potassium phosphate, pH 7.0, mengandung 5 mM EDTA, Glutathione Reductase, 400 unit per ml glutathione reduktase dari ragi roti dalam 3,6 M amonium sulfat, pH 7,0, mengandung 0,1 mM dithiothreitol, Glutathione Reduced Standard, 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) [DTNB], 5-Sulfosalicylic Acid, NADPH, Dimethyl Sulfoxide



dan larutan stok

ng disiapkan yakni sebagai berikut:

ok Solution (1.5 mg/ml): Larutkan 8 mg DTNB dalam 5.33 ml DMSO.

2. NADPH Stock Solution (40 mg/ml): Larutkan 25 mg NADPH dalam 0.625 ml air.
3. Larutan 5% 5-Sulfosalicylic Acid (SSA): Larutkan 2.5 g SSA dalam 50 ml air.
4. Glutathione Standard Stock Solution (GSH) (10 mM): Larutkan GSH dalam 0.1 ml air.

2.3.5.2 Persiapan larutan kerja

Larutan kerja yang disiapkan yakni sebagai berikut:

1. 1× Assay Buffer: Siapkan dengan mencampurkan 2.4 ml Assay Buffer 5× dengan 9.6 ml air.
2. Enzyme Solution (6 units/ml): Campurkan 3.8 µl Glutathione Reductase dengan Assay Buffer hingga volume total mencapai 250 µl.
3. NADPH Solution (0.16 mg/ml): Campurkan 10 µl NADPH Stock Solution dengan 2.5 ml Assay Buffer.
4. Working Mixture: Campurkan 8 ml Assay Buffer dengan 228 µl Enzyme Solution dan 228 µl DTNB Stock Solution.

2.3.5.3 Penyiapan larutan standar glutathione

Larutkan aliquot dari larutan stok glutathione (10 mM) menjadi 50 µM menggunakan larutan 5% 5-Sulfosalicylic Acid (SSA). Serial dilusi larutan standar 50 µM digunakan untuk membuat serangkaian larutan standar dengan melakukan dilusi berurutan, dengan rincian sebagai berikut:

Tabel 1. Serial dilusi larutan standar glutathione

Nomor Well	1	2	3	4	5
Konsentrasi GSH (µM)	50	25	12.5	6.25	3.125
Larutan GSH (µl)	50	25 (dari well 1)	25 (dari well 2)	25 (dari well 3)	25 (dari well 4)
5% SSA (µl)	-	25	25	25	25
nmol GSH dalam 10 µl sampel	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312

2.3.5.4 Pengukuran kadar glutathione

Sampel diukur pada alat Microplate Reader (BMG LABTECH Omega S/N 415-5221). Microplate Reader diatur pada panjang gelombang 412 nm. Siapkan reagen blank, kurva standar, dan sampel pada 96 *well plate* sesuai dengan tabel berikut:



a reaksi pengukuran kadar glutathione

	Campur dan inkubasi 5 menit			Start
si	Volume sampel	5% SSA	Working Mixture	NADPH (0.16 mg/ml)
nk	-	10 µl	150 µl	50 µl

Kurva standar (seri pengenceran)	10 μ l	-	150 μ l	50 μ l
Sampel	X μ l	10-X	150 μ l	50 μ l

Dalam 96 *well plate*, dipipet 10 μ l 5% SSA ke dalam *well* untuk blanko, 10 μ l larutan standar glutation dari masing-masing seri pengenceran ke dalam *well* untuk larutan standar, 10 μ l sampel ke dalam *well* untuk sampel. Kemudian pada semua *well* ditambahkan 150 μ l *working mixture*. *Well plate* diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Lalu ditambahkan 50 μ l NADPH 0,16 mg/ml. Setelah itu *well plate* diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader*.

2.3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dikumpulkan dan dianalisis menggunakan statistik parametrik One Way ANOVA yang dilanjutkan dengan Tukey's *post hoc test* ($p=0,05$) dengan bantuan *software* GraphPad Prism. Data hasil statistik yang diperoleh kemudian dibahas dan dibuat kesimpulan.

