

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penyakit Alzheimer (*Alzheimer's Disease* – AD) adalah abnormalitas yang terjadi di dalam otak yang disebabkan oleh penumpukan plak $A\beta_{1-42}$ (*amyloid-beta*) di ruang ekstraseluler parenkim otak. Kondisi ini menyebabkan degenerasi sel-sel neuron (*neurodegeneration*) dan menjadi pemicu demensia yang mengakibatkan terhambatnya aktivitas sehari-hari karena terjadi penurunan daya ingat dan kesulitan dalam komunikasi (Wildah *et al.*, 2020).

Lebih dari 55 juta orang di seluruh dunia hidup dengan AD pada tahun 2020. Jumlah ini diprediksi akan meningkat menjadi 78 juta pada tahun 2030 dan 139 juta pada tahun 2050. Peningkatan kasus AD sebagian besar akan terjadi di negara-negara berkembang (*Alzheimer's Disease International*, 2020).

Penelitian secara konsisten menunjukkan bahwa wanita memiliki risiko yang lebih besar untuk menderita AD dibandingkan pria. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa wanita juga mengalami penurunan kognitif yang lebih parah dibandingkan laki-laki pada tahap penyakit yang sama (Irvine *et al.*, 2012; Laws *et al.*, 2018; Rosende-Roca *et al.*, 2021).

Pengembangan obat untuk AD sering menghadapi tantangan dimana salah satunya adalah keterbatasan model hewan yang secara tepat dapat mereplikasi kondisi penyakit ini. Model hewan yang valid sangat penting untuk memahami mekanisme patofisiologi AD serta untuk menguji efektivitas dan keamanan terapi baru sebelum diterapkan pada manusia. Namun, hingga saat ini, belum tersedia model hewan yang sepenuhnya mencerminkan kompleksitas AD, terutama yang melibatkan pembentukan plak beta-amiloid, *neurofibrillary tangles*, dan kematian neuron.

Salah satu pendekatan yang digunakan dalam pengembangan model *in vivo* AD adalah dengan penginduksian kondisi menyerupai AD pada hewan coba melalui pemberian hiosin hidrobromida. Induksi ini diketahui dapat menyebabkan gangguan memori dan kognitif melalui mekanisme antagonisme reseptor muskarinik di otak yang dapat memicu efek neurokimia yang mirip dengan kondisi awal AD, seperti peningkatan stres oksidatif dan penurunan kadar antioksidan seperti glutathion. Model hewan coba ini selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk mempelajari perkembangan AD dan efektivitas intervensi terapi farmakologis AD (Wildah *et al.*, 2020; Pocernich & Butterfield, 2012; Anand *et al.*, 2022).



si fisiologis, peningkatan spesies oksigen reaktif (*radical oxygen*) at mengalami netralisasi oleh aktivitas antioksidan endogen, dalam jaringan. Penelitian menunjukkan bahwa kadar glutathion n signifikan pada individu yang menderita AD. Penurunan kadar tkan akumulasi $A\beta_{1-42}$ (Charisis *et al.*, 2021; Pocernich &

Penelitian menunjukkan bahwa akumulasi $A\beta_{1-42}$ di otak dikaitkan dengan beberapa mekanisme, di antaranya penurunan aktivitas dari transporter *ATP-binding cassette* (ABC transporter) B1 (ABCB1) di sawar darah otak (*blood-brain barrier*). Penurunan ini diasosiasikan dengan penghambatan klirens $A\beta_{1-42}$ (Sita *et al.*, 2017; Chai *et al.*, 2020).

Sejauh ini, penelitian *in vivo* yang secara spesifik dilakukan untuk mengetahui efek inhibisi ABCB1 terhadap kadar glutathion plasma pada model tikus betina AD sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menginvestigasi pengaruh penghambatan aktivitas ABCB1 terhadap kadar glutathion pada sampel darah model hewan coba AD. Dalam upaya penghambatan aktivitas ABCB1, penelitian ini akan menggunakan verapamil, salah satu obat Calcium Channel Blockers (CCB). Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan efek penghambatan aktivitas ABCB1 oleh obat tersebut (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2020; Shubbar & Penny, 2020).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana efek dari obat hiosin hidrobromida terhadap kadar glutathion darah pada tikus betina?
2. Bagaimana efek pemberian obat verapamil terhadap kadar glutathion darah pada tikus betina yang diinduksi hiosin hidrobromida?

1.3 Tujuan Penelitia

1. Mengetahui efek dari obat hiosin hidrobromida terhadap kadar glutathion darah tikus betina?
2. Mengetahui efek pemberian obat verapamil terhadap kadar glutathion darah pada tikus betina yang diinduksi hiosin hidrobromida?



BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

II.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat bedah, gelas ukur (Iwaki®), gelas beaker (Iwaki®), spuit 1 ml (Onemed®), timbangan hewan, timbangan analitik, centrifuge, tabung vacutainer (Onehealth®), *Microplate Reader* (BMG LABTECH Omega® S/N 415-5221), *96 well culture plate b8-c-3*, *stirer bar* (Cowie®), tabung effendorf (Onemed®), *micropipette*, reagen reservoir, dan *pipette controller* (ErgoOne FAST®),

II.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alcohol swab, *Aqua Pro Injection* (API), Na-CMC hiosin hidrobromida (Sigma-Aldrich® - nomor katalog S0929), verapamil HCl tablet (80mg), *Glutathione assay kit* (Sigma-Aldrich® - nomor katalog CS0260), NaCl 500 ml (generik), dan aquadest (Waterone ONELAB®).

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sebanyak 24 ekor dengan bobot badan ± 150 gram. Hewan uji tersebut akan dibagi menjadi 6 kelompok. Sebelum perlakuan, hewan coba dipersiapkan dengan baik dengan cara ditempatkan dalam kondisi suhu laboratorium, diberi pakan, diberi minum serta diadaptasikan dengan lingkungan selama minimal 1 minggu.

II.2.2 Perlakuan pada hewan uji

Sebelum diberikan perlakuan pada hewan uji, terlebih dahulu dilakukan pengajuan etik ke Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Hewan uji diambil secara acak lalu dikelompokkan menjadi:

1. Kelompok I (kontrol sehat)

Hewan uji yang tidak diberikan perlakuan apapun

2. Kelompok II (kontrol pembawa API)

Hewan uji diinjeksikan pembawa aqua pro injection melalui rute intraperitoneal



(kontrol pembawa Na-CMC)

injeksikan pembawa Na-CMC melalui rute intraperitoneal

(Hiosin Hidrobromida)

diinjeksikan hiosin hidrobromida (2mg/kgBB) melalui rute intraperitoneal selama 14 hari (Eru *et al*, 2022)

(Hiosin hidrobromida + Verapamil)

Hewan uji diinjeksikan secara intraperitoneal hiosin hidrobromida (2mg/kgBB) lalu setelah 1 jam dilanjutkan dengan pemberian verapamil (5mg/kgBB) secara peroral selama 21 hari (Gimenez dkk., 2017).

6. Kelompok VI (Verapamil)

Hewan uji diberikan verapamil (5mg/kgBB) secara peroral selama 21 hari (Gimenez dkk., 2017).

II.2.3 Pengambilan Sampel Darah Tikus

Tikus yang telah dianestesi dipegang dengan posisi kepala menghadap ke bawah. Tarik kulit sekitar mata menggunakan ibu jari dan jari telunjuk sehingga bola mata timbul. Masukkan pipet kapiler di bagian sinus orbital dan putar pipet kapiler sembari ditekan perlahan. Tunggu hingga pembuluh rusak dan darah keluar dari pipet. Alirkan darah ke dalam tabung vutainer (Hoff, 2000).

II.2.4 Penyiapan Kit Pengukuran Glutation

Pengukuran kadar glutathion dilakukan berdasarkan protokol Glutathione Assay Kit (Sigma-Aldrich® no. katalog CS0260). *Glutathione Assay Kit* terdiri atas:

- 1) *Assay Buffer 5x for Glutathione*
500 mM *potassium phosphate*, pH 7.0, mengandung 5 mM EDTA
- 2) *Glutathione Reductase*
400 unit per ml glutathion reduktase dari ragi roti dalam 3,6 M amonium sulfat, pH 7,0, mengandung 0,1 mM dithiothreitol
- 3) *Glutathione Reduced Standard*
- 4) *5,5' -Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)* [DTNB]
- 5) *5-Sulfosalicylic Acid*;
- 6) *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).
- 7) NADPH

II.2.5 Penyiapan Sampel

Darah yang sudah diambil disentrifugasi 600 x g selama 10 menit untuk memisahkan sel darah merah dan plasmanya. Cuplik 200 µl plasma dan tambahkan 200 µl larutan SSA 5%. Lalu sentrifugasi sampel tersebut dengan kecepatan 10.000 x g selama 10 menit lalu pisahkan supernatan dari endapan yang terbentuk.

II.2.6 Penyiapan Larutan Kerja

1. Larutan 1x *Assay Buffer*

Encerkan 2.4 mL *Assay Buffer* 5x dengan 9,6 mL air (larutan 1x assay buffer)



n glutathion reduktase

µL glutathion reduktase dengan larutan 1x assay buffer sampai volume 250 µL

Tambahkan 228 μL Larutan enzim glutation reduktase dan 228 μL larutan stok DTNB ke dalam 8 mL larutan larutan 1x assay buffer. Homogenkan dan larutan ini dapat disimpan 3 jam pada suhu ruang

4. NADPH (0,16mg/ml)

Cuplik 10 μL NADPH stok dan larutkan dengan 2490 μL larutan 1x assay buffer

II.2.7. Penyiapan larutan standar glutation

Persiapan larutan standar glutation dengan pengenceran serial larutan glutation 50 μM dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Komposisi campuran larutan standar glutation

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)	0	25	25	25	25
nmole GSH dalam 10 μL sampel	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

II.2.8 Pengukuran Kadar Glutation

Pengujian kadar glutation pada sampel darah dilakukan dengan mengatur *plate reader* dengan panjang gelombang 412 nm. Siapkan larutan blanko, larutan kurva dengan berbagai variasi pengenceran, serta sampel yang masing-masing volumenya tertera pada tabel di bawah ini:

Tabel 2. Komposisi campuran setiap larutan dalam pengukuran kadar glutation

Sampel yang diukur	Campur dan inkubasi selama 5 menit			Mulai
	Volume sampel	5% SSA	Larutan kerja	NADPH (0.16 mg/ml)
Blanko	-	10 μL	150 μL	50 μL
Larutan standar	10 μL	-	150 μL	50 μL
Sampel	X μL	10-X	150 μL	50 μL

Adapun prosedur pengukuran kadar glutation:



well plate

% SSA ke dalam well untuk blanko

masing-masing larutan standar glutation yang sudah disiapkan

1/ untuk larutan standar

sampel ke dalam well untuk sampel

50 μL larutan kerja ke semua well menggunakan *multichannel*

6. Homogenkan isi well dengan mengambil dan mengeluarkan larutan secara berulang menggunakan *multichannel pipete*.
7. Inkubasi *well plate* pada suhu ruang selama 5 menit
8. Tambahkan 50 μ l larutan NADPH 0,16 mg/ml menggunakan *multichannel pipete* dan homogenkan kembali.
9. Ukur absorbansi menggunakan *microplate reader*.

II.2.9 Pengukuran Bobot Relatif Organ Ginjal

Pengukuran bobot relatif ginjal tikus dilakukan dengan menimbang bobot badan tikus sebelum dimatikan, setelah itu tikus dimatikan dan diambil organ ginjalnya. Organ ginjal yang sudah diambil lalu dibersihkan dari jaringan lainnya dan ditimbang dengan timbangan analitik (Ermawati *et al.*, 2019). Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk bobot relatif yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bobot relatif organ} = \frac{\text{bobot organ}}{\text{bobot badan}} \times 100\%$$

II.3. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan *software* GraphPad Prism menggunakan statistik parametrik One Way ANOVA yang dilanjutkan dengan *Tukey's post hoc test*. Data hasil statistik yang telah diperoleh kemudian dibahas dan dibuat kesimpulan.

