

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alzheimer's Disease (AD) adalah pemicu demensia yang paling umum terjadi pada orang tua dimana penyakit ini akan menyerang sistem saraf otak yang secara *irreversible* dapat memicu degenerasi sel neuron. Kondisi ini berakibat terganggunya aktivitas sehari-hari karena kebingungan mencerna pertanyaan, ingatan yang berantakan dan berujung pada hilangnya kemampuan untuk mengingat, kesulitan berkomunikasi, berpikir jernih, dan terjadinya perubahan perilaku serta kemampuan untuk mengurus diri sendiri (Wildah *et al.*, 2020).

Menurut *World Health Organization* (WHO), pada tahun 2017 sekitar 47 juta orang di seluruh dunia menderita demensia dan tiap tahun ditemukan hampir 10 juta kasus baru. Jumlah ini diprediksi akan terus meningkat menjadi 115 juta pada tahun 2050. Data menyebutkan bahwa Indonesia termasuk ke dalam 10 negara dengan penderita AD tertinggi di dunia (Martina, 2020).

Wanita berisiko dua kali lebih besar menderita AD dibandingkan pria. Hal ini disebabkan oleh adanya peranan level hormon estrogen dalam perubahan fungsi kognitif. Estradiol diperkirakan bersifat neuroprotektif yang berarti dapat membatasi kerusakan akibat stres oksidatif serta sebagai pelindung sel saraf dari toksisitas amiloid pada pasien alzheimer. Wanita yang telah menopause akan mengalami penurunan aktivitas hormon estrogen, sehingga berisiko mengalami perubahan fungsi kognitif dibandingkan dengan pria (Martina *et al.*, 2021).

AD ditandai oleh dua ciri utama yaitu penumpukan plak amiloid beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) di luar sel saraf dan fosforilasi protein tau yang berlebihan di dalam sel saraf (Magadmi *et al.*, 2024). $A\beta_{1-42}$ memiliki peran sentral dalam timbulnya dan perkembangan AD. $A\beta_{1-42}$ diproduksi pada individu normal, tetapi dalam keadaan patologis, molekul ini dapat beragregasi dan memulai perkembangan penyakit. Terdapat banyak bukti bahwa akumulasi $A\beta_{1-42}$ memainkan peran utama dalam disfungsi neuronal dan AD (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2014).

Ciri lain yang terkait dengan patologi AD adalah stres oksidatif yang didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) dan kemampuan sel untuk menetralkannya melalui pertahanan antioksidan, misalnya superoksida dismutase (SOD). Sebagai antioksidan, SOD mengkatalis perubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. Penelitian juga telah melaporkan bahwa terjadi penurunan aktivitas SOD secara



n AD yang menyebabkan terjadinya akumulasi ROS di jaringan oksidatif yang tidak terkontrol akan semakin merusak neuron (Butterfield & Lauderback, 2002; Lewandowski *et al.*, 2018;

ah melaporkan bahwa akumulasi $A\beta_{1-42}$ yang berlebihan di otak an oleh disfungsi transporter *ATP-binding cassette* (ABC) B1 ini berperan pada klirens molekul toksik dari otak. Berdasarkan

penelitian, $A\beta_{1-42}$ diangkut melintasi sel endotel otak dan dikeluarkan dari otak ke dalam sirkulasi darah bekerja sama dengan ABCB1. Oleh karena itu, disfungsi ABCB1 dapat menurunkan tingkat pengeluaran $A\beta_{1-42}$ dari otak (ElAli & Rivest, 2013).

Pengembangan obat untuk AD kerap kali menghadapi hambatan akibat terbatasnya model hewan uji yang representatif terhadap kondisi AD. Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan yaitu dengan pemberian hiosin hidrobromida yang dapat menyebabkan amnesia pada hewan coba (Benedikz *et al.*, 2009). Hiosin hidrobromida merupakan agen parasimpatolitik yang telah dilaporkan menyebabkan amnesia pada manusia. Pada hewan coba, obat ini dengan menyebabkan gangguan proses kognitif dan memori yang dipicu oleh terjadinya malfungsi dan degenerasi neuron di otak. Pemberian obat ini secara kronis juga dapat menyebabkan pengendapan $A\beta_{1-42}$, disfungsi sinaptik, dan gangguan belajar/ingatan, seperti yang terlihat pada AD (Anand *et al.*, 2022).

Penelitian ini ingin mengevaluasi pengaruh pemberian inhibitor ABCB1 terhadap aktivitas SOD pada otak tikus betina yang diinduksi dengan hiosin hidrobromida. Kami menggunakan inhibitor yang telah dilaporkan secara luas memiliki efek penghambatan aktivitas fungsional ABCB1 yaitu verapamil. Obat tersebut dilaporkan sebagai inhibitor kompetitif. Penghambatan transporter ini dapat berkontribusi terhadap penumpukan $A\beta_{1-42}$ di otak yang mempercepat progres AD (Lai *et al.*, 2020; Shubbar & Phenny, 2020; Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

Studi *in vivo* yang secara spesifik meneliti pengaruh pemberian inhibitor ABCB1 terhadap aktivitas SOD otak pada model tikus betina dengan AD masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh dari pemberian inhibitor ABCB1 terhadap aktivitas SOD pada otak tikus betina yang diberikan hiosin hidrobromida.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana efek hiosin hidrobromida terhadap aktivitas SOD otak tikus betina?
2. Bagaimana efek verapamil terhadap aktivitas SOD otak pada tikus betina yang diberikan hiosin hidrobromida?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui efek hiosin hidrobromida terhadap aktivitas SOD otak tikus betina.
2. Untuk mengetahui efek verapamil terhadap aktivitas SOD otak pada tikus betina yang diberikan 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 yaitu 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 vakutainer (OneHealth®), timbangan analitik, dan spoit 1 mL (OneMed®).

Bahan-bahan yang digunakan yaitu 2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich® M3148-25mL), alcohol 70% (OneMed®), *alcohol swab*, aquadest (Waterone ONELAB®), *Aqua Pro Injection* (API) 500 mL (generik), buffer tris HCL pH 7,4, hiosin hidrobromida (Sigma Aldrich® S0929), natrium klorida (NaCl) (generik), *phosphate buffer saline* (PBS), *protease inhibitor cocktail* (Sigma Aldrich®), *SOD determination kit* (Sigma Aldrich® *Catalog number* 19160), triton X-100 (Merck®), dan verapamil HCL (generik).

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah tikus betina (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sebanyak 24 ekor, dengan bobot tubuh sekitar 150 gram. Tikus-tikus tersebut dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kontrol sehat, kontrol pembawa, dan kelompok perlakuan. Sebelum perlakuan dimulai, tikus-tikus ini dipersiapkan dengan baik dengan cara ditempatkan pada suhu laboratorium yang sesuai, diberikan pakan dan minum, serta diadaptasikan dengan lingkungan selama minimal 1 minggu.

2.3.2 Perlakuan Hewan Uji

Sebelum diberikan perlakuan pada hewan uji, terlebih dahulu dilakukan pengajuan etik ke Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Hewan uji yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) sehat dengan berat sekitar



: 24 ekor hewan uji diberi perlakuan dan dibagi ke dalam 6 diambil secara acak lalu ditimbang, kemudian dikelompokkan

ontrol sehat): hewan uji tidak diberikan perlakuan apapun.
ontrol pembawa): hewan uji diinjeksikan *aqua pro injection* peritoneal selama 21 hari.

3. Kelompok III (Kontrol pembawa): hewan uji yang diberikan suspensi Na CMC 0,5% secara peroral selama 21 hari.
4. Kelompok IV: hewan uji yang diinjeksikan oleh hiosin hidrobromida (2mg/kgBB) selama 21 hari melalui rute intraperitoneal.
5. Kelompok V: hewan uji yang diinjeksikan oleh hiosin hidrobromida (2mg/kgBB) melalui rute intraperitoneal dan suspensi verapamil (5 mg/kgBB) secara peroral selama 21 hari.
6. Kelompok VI (Kontrol positif): hewan uji yang diberikan suspensi verapamil (5 mg/kgBB) selama 21 hari melalui rute peroral

2.3.3 Penimbangan Bobot Hewan Uji

Setiap hewan uji ditimbang dengan menggunakan timbangan analisis dan dicatat bobotnya.

2.3.4 Penyiapan Organ Otak Tikus

2.3.4.1 Pengambilan Organ Otak Tikus

Tikus dimatikan dengan cara diberi eter melalui inhalasi. Setelah dipastikan tidak sadar dan tidak menunjukkan gerakan spontan, dilakukan pengambilan jaringan otak melalui pembedahan kranium. Pembedahan dilakukan dengan memotong kranium secara sagital dari bagian kaudal (oksipital) menuju rostral (frontal), di antara kedua hemisfer otak. Selanjutnya, otak tikus dibebaskan dari jaringan ikat di sekitar regio basal (Darwatik *et al.*, 2017).

2.3.4.2 Penyiapan Sampel Biologis

Jaringan otak 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 (14.000 × g selama 5 menit). Supernatan yang mengandung SOD dipindahkan ke tabung baru untuk pengukuran.

2.3.5 Pengukuran Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)

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

1. *Buffer Solution*
2. *Dilution buffer*
3. Larutan Enzim
4. WST

2.3.5.1 Pembuatan Larutan Kerja WST

Larutan kerja WST disiapkan dengan mengencerkan 1 mL larutan WST pengencer.

Larutan Kerja Enzim

Enzim disentrifugasi selama 5 detik, lalu dicampur dengan 15 µL larutan enzim dengan 2,5 mL buffer pengenceran.



2.3.5.3 Uji Protein Terkonsentrasi

Sebanyak 20 μL larutan sampel ditambahkan ke setiap sumur sampel dan blank 2, lalu ditambahkan 20 μL H_2O ultramurni ke blank 1 dan blank 3. Kemudian, 200 μL larutan kerja WST ditambahkan ke tiap sumur dan diaduk. Setelah itu, buffer pengenceran ditambahkan sebanyak 20 μL ke tiap sumur blank 2 dan blank 3. Dan, 20 μL larutan kerja enzim ditambahkan ke tiap sampel dan blank 1, lalu dicampurkan secara menyeluruh. Kemudian, inkubasi plat pada suhu 37°C selama 20 menit. Baca absorbansi pada 450 nm menggunakan mikroplat. Kemudian, dihitung aktivitas SOD.

Tabel 1. Jumlah tiap larutan dalam sampel dan blank 1, 2, dan 3.

	Sampel	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Larutan sampel	20 μL	-	20 μL	-
H_2O Ultramurni	-	20 μL	-	20 μL
Larutan Kerja WST	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Larutan Kerja Enzim	20 μL	20 μL	-	-
Buffer Pengencer	-	-	20 μL	20 μL

2.3.6 Analisis Data

Data SOD yang diperoleh dianalisis dengan analisis *one-way* ANOVA dan uji post-hoc Tukey HSD. Adapun data BB tikus dianalisis dengan *t-test*. Untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok, uji statistik menggunakan level $p < 0,05$ menggunakan aplikasi GraphPad Prism. Data hasil statistik kemudian dibahas dan dibuat kesimpulan.

