

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN GABRB3 DAN KADAR PROTEIN
GABRB3 SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK VALERIAN
(*VALERIANA OFFICINALIS*) PADA MENCIT BALB/c**

**ANALYSIS Of GABRB3 mRNA EXPRESSION and GABRB3 PROTEIN
LEVELS AFTER ADMINISTRATION of VALERIAN EXTRACT
(*Valeriana officinalis*) in BALB/c MICE**



ERWIN MULYAWAN

P0200315011

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN GABRB3 DAN KADAR PROTEIN
GABRB3 SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK VALERIAN
(*VALERIANA OFFICINALIS*) PADA MENCIT BALB/c**

**ANALYSIS Of GABRB3 mRNA EXPRESSION and GABRB3 PROTEIN
LEVELS AFTER ADMINISTRATION of VALERIAN EXTRACT
(*Valeriana officinalis*) in BALB/c MICE**

DISERTASI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Doktor
Program Studi Kedokteran**

Disusun dan Diajukan oleh :

ERWIN MULYAWAN

P0200315011

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

DISERTASI

**ANALISA EKSPRESI mRNA GEN GABRB3 DAN KADAR PROTEIN GABRB3
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK VALERIAN (VALERIANA OFFICINALIS)
PADA MENCIT BALB/c**

Disusun dan diajukan oleh

**ERWIN MULYAWAN
P0200315011**

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 2 Juni 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat


Menyetujui
Komisi Penasehat,



Prof. Dr. dr. Muh. Ramli Ahmad, Sp.An-KMN-KAP
Promotor



Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK
Ko-Promotor



Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam Sp.BS-FICS
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,



dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Erwin Mulyawan

Nomor Pokok : P0200315011

Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin Makassar

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau seluruhnya disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,

yang menyatakan,

Erwin Mulyawan

ABSTRAK

ERWIN MULYAWAN. Analisa Ekspresi mRNA Gen GABRB3 Dan Kadar Protein GABRB3 Setelah Pemberian Ekstrak Valerian (*Valeriana Officinalis*) Pada Mencit BALB/c (dibimbing oleh **Muhammad Ramli Ahmad, Andi Asadul Islam, Muh. Nasrum Massi**)

Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek ekstrak Valerian terhadap peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi pada mencit BALB/c.

Penelitian eksperimental ini menggunakan metode uji preklinik pada hewan dengan menggunakan 20 mencit BALB/c jantan. Desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test-Only Controlled Group*. Subjek penelitian dibagi secara acak menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (Aquadest), kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 g), kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 g) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 g). Obat-obatan diberikan melalui sonde lambung selama tujuh hari berturut-turut. Pengambilan spesimen darah mencit dilakukan pada hari pertama (sebelum pemberian obat) dan pada hari ketujuh (2 jam setelah pemberian obat). Ekspresi mRNA gen GABRB3 diperiksa dengan metode RT-PCR. Kadar protein GABRB3 diukur dengan metode ELISA. Pemeriksaan fungsi koordinasi motorik, berupa tes rotarod dengan kecepatan 20 rpm selama 300 detik, dilakukan pada hari ketujuh untuk menentukan efek sedasi.

Hasil penelitian menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi yang signifikan, dengan nilai $p < 0,05$, pada kelompok kontrol positif dan kedua kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10 g terbukti menimbulkan peningkatan terbesar pada ekspresi mRNA gen GABRB3 sebesar 6,475 dan kadar protein GABRB3 sebesar 2,988, dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hasil tes rotarod pada kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan II dan kelompok kontrol positif menunjukkan efek sedasi yang tidak berbeda secara signifikan dengan rerata waktu 121,44 detik, 156,84 detik dan 181,68 detik. Peningkatan dosis ekstrak Valerian tidak terbukti meningkatkan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi yang lebih besar.

Kata kunci: ekstrak Valerian, mRNA gen GABRB3, protein GABRB3, Diazepam, Sedasi.

ABSTRACT

ERWIN MULYAWAN. Analysis of GABRB3 gene mRNA expression and GABRB3 protein levels after administration of Valerian extract (*Valeriana Officinalis*) in BALB/c mice (Supervised by **Muhammad Ramli Ahmad, Andi Asadul Islam, Muh. Nasrum Massi**)

The aim of this study was to examine the effect of Valerian extract on the increment of GABRB3 gene mRNA expression, GABRB3 protein levels and sedative effect in BALB/c mice.

This experimental study used preclinical test method on animals using 20 male BALB/c mice. The design of this study was Post Test-Only Controlled Group. The subjects of this study were randomly divided into four groups, negative control group (Aquadest), positive control group (Diazepam 0.025 mg/10 g), first treatment group (Valerian extract 2.5mg/ 10 g) and second treatment group (Valerian extract 5 mg/10 g). The drugs were given for seven consecutive days through a gastric gavage. The mice's blood specimens were drawn on the first day (before drugs administration) and on the seventh day (2 hours after drugs administration). GABRB3 gene mRNA expression was examined using RT-PCR. The protein levels of GABRB3 was measured using ELISA. Rotarod test was carried out on the seventh day to determine the effect of sedation.

The results of this study revealed significant increment of GABRB3 gene mRNA expression, GABRB3 protein levels and sedative effect in the positive control group and both of treatment groups ($p\ value < 0.05$). Valerian extract 2.5 mg/10 g had shown the greatest increment in GABRB3 gene mRNA expression by 6.475 and GABRB3 protein levels by 2.988, compared to other groups. Rotarod test results in first treatment group, second treatment group and positive control group showed no significant difference on the sedative effect by mean time of 121.44 seconds, 156.84 seconds and 181.68 seconds. Increasing the dose of Valerian extract was not proven to increase GABRB3 gene mRNA expression, GABRB3 protein levels and sedative effect at a higher level.

Keywords: Valerian extract, GABRB3 gene mRNA, GABRB3 protein, Diazepam, Sedation.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Judul	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Pernyataan Keaslian Disertasi	iv
Abstrak.....	v
Abstract.....	vi
Daftar isi.....	vii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Grafik.....	xv
Daftar Tabel	xvii
Daftar Arti Lambang Dan Singkatan	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Mamfaat Penelitian	5
1.4.1 Mamfaat bagi Peneliti.....	5
1.4.2 Mamfaat bagi Masyarakat	5
1.4.3 Mamfaat bidang Akademis	5
1.4.4 Mamfaat bidang Kedokteran/Praktik Klinik	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Valerian.....	6
2.1.1 Uraian Tumbuhan	6
2.1.2 Klasifikasi	9
2.1.3 Struktur Kimia.....	9
2.1.4 Manfaat Valerian	13
2.1.5 Kandungan Kimia.....	13
2.1.6 Sifat Kimia dan Fisika.....	17
2.1.7 Farmakologi	17
2.1.8 Dosis.....	18
2.1.9 Interaksi Obat.....	20
2.1.10 Efek Samping.....	21
2.1.11 Tinjauan Efek Hipnotik	21
2.1.12 Cara Kerja	22
2.1.13 Toksikologi	22
2.1.14 Hasil dari Penelitian Sebelumnya.....	26
2.2 Gamma-Aminobutyric Acid (GABA).....	27
2.3 Reseptor GABA.....	28
2.3.1 Pengertian.....	28
2.3.2 Klasifikasi	28
2.3.3 Proses Neurotransmisi GABA	32
2.3.4 Molekular Farmakologi Reseptor GABA _A	33
2.3.5 Neurofarmakologi.....	34
2.3.6 Tempat Berikatan dari Ligand Benzodiazepin	35
2.4 Reseptor GABA _A	37
2.4.1 Reseptor	37
2.4.2 Organisasi Gen	39

2.4.3	Sktuktur dari Reseptor GABA _A	42
2.4.4	Lokasi Selular.....	43
2.4.5	Lokasi Subselular	44
2.4.6	Konduksi Ion	44
2.4.7	Mekanisme.....	45
2.4.8	Modulasi Reseptor GABA _A	46
2.4.9	Fungsi dari Invididual Reseptor	48
2.5	Gen GABRB3.....	49
2.5.1	Fungsi	49
2.5.2	Kloning dan Ekspresi.....	50
2.5.3	Struktur Gen.....	50
2.5.4	Karakteristik Biokimia	50
2.5.5	Peta Gen.....	51
2.5.6	Fungsi Gen	52
2.5.7	Epigenetik	53
2.5.8	Sifat Genetik Molekul	55
2.5.9	Sejarah.....	58
2.5.10	Model Hewan	59
2.6	Kesadaran.....	59
2.6.1	Fisiologi Kesadaran.....	59
2.6.2	Bangkitan Potensial Aksi.....	61
2.7	Sedasi.....	63
2.8	Diazepam.....	64
2.8.1	Merk Dagang.....	64
2.8.2	Farmakologi	65
2.8.3	Cara Kerja.....	66
2.8.4	Indikasi.....	67

2.8.5 Kontraindikasi.....	67
2.8.6 Efek Samping.....	67
2.8.7 Interaksi Obat.....	67
2.9 Tes Rotarod	68
2.9.1 Pengertian.....	68
2.9.2 Aplikasi.....	69
2.9.3 Bahan.....	70
2.9.4 Prosedur	70
2.9.5 Hubungan Sedasi dengan Rotarod	72
2.10 Metode ELISA	74
2.10.1 Pengertian.....	73
2.10.2 Aplikasi.....	75
2.10.3 Teknik	75
2.10.4 Jenis.....	76
2.10.5 Bahan.....	76
2.10.6 Material dan alat.....	77
2.11 Pemeriksaan Ekspresi Gen	77
2.11.1 Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA.....	77
2.11.2 Real Time Polymerasi Chain Reaction	78
BAB III KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	
3.1 Kerangka Teori.....	83
3.2 Kerangka Konsep.....	84
3.3 Hipotesis	84
3.4 Variabel.....	85
3.4.1 Variabel Bebas.....	85
3.4.2 Variabel Terikat.....	85
3.4.2 Variabel Terkontrol.....	85

3.5 Definisi Operasional	86
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Desain.....	90
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	91
4.3 Bahan dan Cara	91
4.3.1 Bahan	91
4.3.2 Cara.....	92
4.3.2.1 Prosedur pemberian material/obat	93
4.3.2.2 Prosedur penilaian status tidur mencit.....	94
4.3.2.3 Prosedur ELISA	95
4.3.2.4 Perhitungan Hasil ELISA.....	97
4.3.2.5 Prosedur Ekstraksi Asam Nuklear RNA dan DNA	97
4.3.2.6 Prosedur qRT-PCR untuk Menentukan Profil Ekspresi mRNA Gen Target	99
4.3.2.7 Prosedur Perhitungan Kurva Kalibrasi dengan Ct (<i>cycle threshold</i>).....	101
4.4 Populasi dan Sampel Penelitian.....	101
4.5 Cara Pengambilan Sampel	101
4.6 Cara Perhitungan Sampel	102
4.7 Kriteria Inklusi	103
4.8 Alur Penelitian.....	104
4.9 Pengolahan Data	105
4.10 Uji Statistik	105
4.11 Masalah Etika.....	106
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian	107
5.2 Gambaran Karakteristik Variabel Terikat.....	109

5.3 Variable Terikat: Ekspresi mRNA gen dan Kadar Protein GABRB3.	112
5.3.1 Perbandingan Antara Sebelum dan Sesudah Perlakuan.....	112
5.3.2 Perbandingan Variable Terikat Pada Keempat Kelompok.....	120
5.3.3 Perbandingan Variable Terikat Antara Dua Kelompok.....	124
5.4 Variabel Terikat: Pemeriksaan Koordinasi Motorik (Tes Rotarod).....	133
5.4.1 Perbandingan Pemeriksaan Fungsi Koordinasi Motorik (Tes Rotarod) Dengan Uji Statistik <i>ANOVA</i>	134
5.4.2 Perbandingan Pemeriksaan Koordinasi Motorik (Tes Rotarod) Dengan Uji Statistik <i>Independent T-test</i>	134
BAB VI PEMBAHASAN	
6.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian	137
6.2 Ekspresi mRNA gen GABRB3 dan Kadar Protein GABRB3.....	139
6.2.1 Pengaruh Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Ekspresi mRNA gen GABRB3	139
6.2.2 Pengaruh Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Kadar Protein GABRB3	143
6.3 Efek Sedasi Ekstrak Valerian	146
6.4 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Ekspresi mRNA gen GABRB3, Kadar Protein GABRB3, dan Efek Sedasi.....	150
6.4.1 Dosis Ekstrak Valerian	150
6.4.2 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Ekspresi mRNA gen dan Kadar Protein GABRB3	152
6.4.3 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Efek Sedasi.....	153
6.5 Ringkasan Hasil Penelitian.....	155
6.6 Keterbatasan Penelitian	157

BAB VII SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan dan Saran.....	158
DAFTAR PUSTAKA.....	159

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Morfologi dari <i>Valeriana officinalis</i>	8
Gambar 2. Struktur hidroksi dan aseton	9
Gambar 3. Konsituen kimia dari <i>Valeriana ofifcinalis</i>	12
Gambar 4. Proses Sintesis Neurotransmitter GABA.....	27
Gambar 5 Tempat Ikatan Obat Terhadap Reseptor GABA _A	30
Gambar 6 Struktur Pentametrik Reseptor GABA _A	33
Gambar 7 Tempat Ikatan Benzodiazepin Terhadap Reseptor GABA _A	37
Gambar 8 Reseptor GABA _A dan Sub-Unitnya	39
Gambar 9 Analisis <i>phylogenetic tree</i> dari 19 Gen yang Terkode untuk Sub-Unit Reseptor GABA _A	41
Gambar 10 Pola Ekspresi Gen GABRB3	51
Gambar 11 Lokasi Genomik Gen GABRB3 Pada Lengan Kromosom 15.....	53
Gambar 12 Sistem Aktivasi Retikular	60
Gambar 13 Proses Bangkitan Potensial Aksi	62
Gambar 14 Struktur Kimia Diazepam	65
Gambar 15 Rotarod	70
Gambar 16 Contoh Mesin Real Time PCR.....	79
Gambar 17 Model plot amplikasi tunggal yang menggambarkan nomenklatur yang umum digunakan dalam Quantitative Real Time PCR.....	82

DAFTAR GRAFIK

Halaman

Grafik 1. Box Plot Perbandingan Berat Mencit Setiap Kelompok Selama Tujuh Hari	108
Grafik 2. Box Plot Perbedaan Rerata Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Negatif	114
Grafik 3. Box Plot Perbedaan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Kelompok Kontrol Positif	114
Gambar 4. Box Plot Perbedaan mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan I (Valerian 2,5 mg/10 gr)	115
Grafik 5. Box Plot Perbedaan ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan II (Valerian 5 mg/10 gr)	115
Grafik 6. Box Plot Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Negatif	117
Grafik 7. Box Plot Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Positif	118
Grafik 8. Box Plot Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan I (Valerian 2,5 mg/10 gr)	119
Grafik 9. Box Plot Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan II (Valerian 5 mg/10 gr)	119
Grafik 10. Box Plot Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum Perlakuan Pada Keempat Kelompok	121

Grafik 11. Box Plot Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok.....	122
Grafik 12. Box Plot Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan Pada 4 Kelompok	123
Grafik 13. Box Plot Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan Pada 4 Kelompok	124
Grafik 14. Box Plot Perbedaan Mean Ekspresi mRNA GABRB3 Sebelum Pemberian Obat.....	126
Grafik 15. Box Plot Perbedaan Mean Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan.....	128
Grafik 16. Box Plot Perbedaan Mean Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan	130
Grafik 17. Box Plot Perbedaan Mean Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan	132
Grafik 18. Box Plot Perbedaan Tes Rotarod Pada Kelompok Perlakuan.....	134

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Sistematika dari tanaman <i>Valeriana officinalis</i>	9
Tabel 2.2 Sifat kimia-fisika dari asam valerlinik dan derivatnya	17
Tabel 5.1 Perbandingan Berat Mencit BALB/c Pada Pengamatan Selama Tujuh Hari	108
Tabel 5.2 Perbandingan Dosis Obat Pada Pengamatan Selama Tujuh Hari	109
Tabel 5.3 Uji Normalitas Data Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan.....	111
Tabel 5.4 Uji Normalitas Data Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan	111
Tabel 5.5 Uji Normalitas Tes Rotarod Pada Keempat Kelompok Perlakuan.	112
Tabel 5.6 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Antara Sebelum dan Sesudah Perlakuan.....	113
Tabel 5.7 Perbandingan Antara Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan.....	116
Tabel 5.8 Perbandingan Antara Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok.....	120
Tabel 5.9 Perbandingan Antara Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok.....	123
Tabel 5.10 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum Perlakuan Antara Dua Kelompok	126

Tabel 5.11 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan Antara Dua Kelompok	127
Tabel 5.12 Perbandingan Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan Antara Dua Kelompok.....	129
Tabel 5.13 Perbandingan Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan Antara Dua Kelompok.....	131
Tabel 5.14 Perbandingan Antara Tes Rotarod Pada Keempat Kelompok Perlakuan.....	133
Tabel 5.15 Perbandingan Antara Tes Rotarod Antara Dua Kelompok.....	135

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang	Keterangan
α	: Alfa
Å	: Angstrom
β	: Beta
C	: Celsius
°	: Derajat
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
γ	: Gama
ρ	: Rho
π	: Pi
θ	: Teta

Singkatan	Arti dan Keterangan
ALS	: Amyotrophic Lateral Sclerosis
ADHD	: Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ARAS	: Ascending Reticular Activating System
BB	: Berat Badan
BZ	: Benzodiazepin
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
cm	: Centimeter
Cq	: Quantification Cycle
Ct	: Threshold Cycle
CYP	: Cytochromes P
dsDNA	: Double Stranded Deoxyribonucleic Acid
dkk	: Dan kawan kawan
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELIC	: Erwinia chrysantheri Ligand gated Ion Channel
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPSPs	: Excitatory Postsynaptic Potentials
FDA	: Food and Drug Administration
FIGE	: Field Inversion Gel Electrophoresis

GABA	: Gamma Aminobutyric Acid
GABAA	: Gamma Aminobutyric Acid subtype A
GABAB	: Gamma Aminobutyric Acid subtype B
GABAC	: Gamma Aminobutyric Acid subtype C
GAD	: Glutamic Acid Decarboxylase
GAPDH	: Gliseraldehida-3-Phosphate Dehidrogenase
GLIC	: Gloebacter violaceus Ligand gated Ion Channel
gr	: Gram
HCl	: Hydrochloric acid
HRP	: Horseradish Peroxidase
IUPHAR	: International Union of Basic and Clinical Pharmacology
K ⁺	: Kalium
KCC2	: Anggota transporter kalium-klorida
kg	: Kilogram
L	: Liter
LD	: Lethal Dose
LDT	: Laterodorsal tegmental nuclei
Li	: Litium
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
mRNA	: Messenger Ribonucleic acid
mV	: Milivolt
ng	: Nanogram
nm	: Nanometer
OD	: Optic Density
PET	: Positron Emission Tomography
PDR	: Physician's Desk Reference
PPM	: Parts Per Millon
PPT	: Pedunculopontine
qRT-PCR	: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RAS	: Reticular Activating System
REM	: Rapid Eye Movement
RF	: Reticular Formation
RPM	: Revolutions Per Minute
RNA	: Ribonucleic acid
Reseptor 5-HT3	: Reseptor 5 hydroxytryptamine

SNPs	: Single Nucleotide Polymorphisms
S-S	: Disulfide
SSP	: Sistem Saraf Pusat
TE	: Tris EDTA
Terminal C	: Terminal Karboksilat
Terminal N	: Terminal Amino
UBE3A	: Ubiquitin Protein Ligase
V.	: Valerian
VGAT	: Vesicular GABA Transporter
VLPO	: Ventrolateralpreoptic Nucleus
WHO	: World Health Organization
Zn ²⁺	: Zinc
µg	: Mikrogram
µmol	: Mikromol

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tidur merupakan suatu fenomena fisiologis yang penting dalam menjaga keseimbangan regulasi sistem tubuh. Dibutuhkan waktu sekitar 7-8 jam dalam sehari agar tidur seseorang menjadi efektif (Sadock et al, 2007). Waktu tidur yang tidak efektif biasanya disebabkan oleh gangguan tidur. Salah satu gangguan tidur yang sering terjadi adalah insomnia. Insomnia adalah kesukaran dalam memulai atau mempertahankan tidur yang dapat bersifat sementara atau persisten. Insomnia mempunyai dampak merugikan bagi penderitanya, antara lain insomnia menurunkan kualitas hidup, sebagai pencetus penyakit gangguan jiwa, menurunkan stamina dan menurunkan produktivitas. Dampak insomnia tidak dapat dianggap remeh, karena bisa menimbulkan kondisi yang lebih serius dan membahayakan kesehatan dan keselamatan. Oleh karenanya, setiap penderita insomnia perlu mencari jalan keluar yang tepat.

Menurut WHO, 80% penduduk dunia masih menggunakan obat herbal alami. Salah satu obat herbal yang sering digunakan adalah Valerian, spesies Valerian yang paling sering dimanfaatkan untuk tanaman obat adalah *Valeriana officinalis*. Tumbuhan ini banyak ditemukan di Amerika, Eropa dan Asia. Valerian sering digunakan untuk mengobati gangguan tidur dan sebagai obat penenang, selain itu manfaat lain dari tanaman ini adalah untuk mengurangi gangguan tremor, kram otot dan kram saluran pencernaan (*spasmolitik gastrointestinal*), mengurangi depresi, serta untuk mengobati sakit kepala. Ada tiga bahan kimia utama yang

merupakan bahan aktif dari tanaman ini, diantaranya *essential oil*, asam valerlinik, dan *velenol valepotriates*. Marker utama *Valerian officinalis* adalah asam Valerenat/asam Valerenik dengan turunan gugus hidroksil dan aseton, yang dapat menghambat pemecahan katabolisme enzim, terjadi peningkatan gamma amino butyric acid (GABA) di reseptor otak yang mengakibatkan sedasi.. Dari beberapa penelitian diketahui bahwa konsumsi ekstrak herbal *Valerian* sebanyak 400-450 mg sebelum tidur dapat meningkatkan kecepatan seseorang untuk terlelap dalam tidurnya (Throne Research, Inc, 2004).

Salah satu obat yang paling tua dan paling sering diresepkan untuk mengobati gangguan tidur adalah benzodiazepin, salah satu contohnya diazepam. Benzodiazepin dapat mengobati insomnia dengan cara mengurangi frekuensi terbangun di malam hari, dan meningkatkan durasi waktu tidur. Hal ini terjadi karena benzodiazepin meningkatkan atau mempotensiasi ikatan neurotransmitter inhibitorik mayor yaitu *Gamma-Aminobutyric Acid* (GABA) ke reseptor $GABA_A$. Reseptor ini banyak ditemukan di sistem saraf pusat dan terdiri dari 5 sub-unit protein yaitu 2 sub unit alpha, 2 sub unit beta, and 1 sub unit gamma. Dalam kondisi normal, GABA akan terikat secara lemah ke sub-unit alpha pada reseptor $GABA_A$ dan memfasilitasi masuknya ion klorida yang bermuatan negatif kedalam neuron. Apabila seseorang menggunakan benzodiazepin maka zat ini akan terikat secara alosterik ke sub-unit gamma pada reseptor $GABA_A$ dan membuat GABA terikat pada sub-unit alpha sehingga menyebabkan lebih banyak ion klorida terdifusi kedalam neuron dan terjadi hiperpolarisasi, hal tersebut membuat neuron lebih tidak responsif terhadap stimulasi EPSPs (*Excitatory Postsynaptic Potentials*), dan dengan kata lain akan menekan kerja sistem saraf pusat dan menimbulkan efek ingin tidur (Neuhaus, Trauner, Gruber, & Oelzant, 2008).

Mekanisme kerja Valerian hampir sama dengan mekanisme kerja benzodiazepin, yaitu meningkatkan jumlah ion klorida yang masuk ke dalam neuron sehingga terjadi hiperpolarisasi. Hanya saja Valerian tidak terikat pada sub-unit gamma, namun terikat pada sub-unit beta pada reseptor GABA_A. Selain itu, Valerian juga menghambat metabolisme GABA sehingga jumlah GABA melimpah dan memperpanjang efek hiperpolarisasi (Neuhaus, et al., 2008 ; Yoo, et al., 2008).

Pada penelitian Benke et al (2009), yang berhasil mengidentifikasi target selular dari Valerian pada GABA_A reseptor pada sub-unit $\beta 3$, yang mana reseptor tersebut bekerja memfasilitasi efek penenang atau sedasi pada ekstrak ini. Gen yang mengkode GABA_A reseptor sub-unit $\beta 3$ disebut juga GABRB3, termasuk gen yang mengatur *ligand-gated ion channel*. GABRB3 mengkode setidaknya 13 sub-unit yang berbeda dari multi-sub-unit kanal klorida yang berfungsi sebagai reseptor GABA. Gen ini berada pada lengan panjang kromosom 15 bersama dengan gen yang mengkode sub-unit lainnya. GABRB3 juga berfungsi sebagai reseptor histamin dan memediasi respon selular terhadap histamine, selain itu GABRB3 juga berfungsi sebagai reseptor untuk diazepam dan obat anastesi lainnya seperti fenobarbital (Benke et al., 2009; Yoo, et al., 2008).

Saat ini Valerian diakui dan direkomendasikan sebagai obat sedasi di Eropa dan negara lainnya seperti Australia, China, India, dan Jepang, dan belum banyak penelitian mengenai efek sedasi pada ekstrak valerian dan hubungannya, sehingga penulis ingin menggali lebih lanjut mengenai efek sedasi pada Valerian serta level peningkatan gen mRNA GABRB3 dan kadar protein GABRB3 setelah pemberian ekstrak Valerian.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak valerian memiliki efek sedasi ?
2. Apakah pemberian ekstrak valerian berpengaruh terhadap perubahan ekspresi mRNA gen GABRB3, sebagai gen yang mengkodekan reseptor GABA_A sub-unit Beta ?
3. Apakah pemberian ekstrak valerian berpengaruh dengan perubahan kadar protein GABRB3?
4. Apakah peningkatan dosis ekstrak Valerian dapat meningkatkan
 - a. Level ekspresi mRNA gen GABRB3 ?
 - b. Kadar protein GABRB3 ?
 - c. Efek sedasi secara klinis ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

- Menguji ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 setelah pemberian ekstrak Valerian pada mencit BALB/c

1.3.2 Tujuan Khusus

- Menguji efek ekstrak Valerian dalam peningkatan level ekspresi mRNA gen GABRB3 pada mencit BALB/c.
- Menguji efek ekstrak Valerian dalam peningkatan kadar protein GABRB3 pada mencit BALB/c.
- Menguji efek sedasi secara klinis yang ditimbulkan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi Peneliti

- Penelitian ini diharapkan dapat memperluas wawasan peneliti seputar efek ekstrak Valerian sebagai obat tradisional dan pengaruhnya terhadap kadar protein GABRB3 dan gen GABRB3.

1.4.2 Manfaat bagi Masyarakat

- Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat seputar efek ekstrak Valerian sebagai obat tradisional.

1.4.3 Manfaat bidang Akademis

- Penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan baru khususnya bidang farmakologi mengenai efek sedatif pemberian ekstrak Valerian serta pengaruhnya pada tingkat reseptor dan genetik.
- Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan acuan untuk penelitian berikutnya.

1.4.4 Manfaat bidang Kedokteran/Praktik Klinik

- Penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi mengenai efektifitas ekstrak Valerian sebagai obat tradisional yang memiliki efek sedasi bagi kepentingan klinis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Valerian

2.1.1 Uraian Tumbuhan

Valeriana adalah tanaman dari penduduk asli Eropa dan Asia yang dapat tumbuh hampir di seluruh wilayah negara. Valeriana merupakan genus tanaman berbunga dalam keluarga Caprifoliaceae/Valerianaceae, yang anggotanya biasanya disebut valerian. Di Amerika dan Eropa, Valerian lebih dikenal dengan 'Valium abad ke-19'. Nama Valerian merupakan turunan dari Valerius, dengan sebutan latin "Valere" yang bearti sehat dan kuat (Sundaresan Nandhini, 2018).

Terdapat juga sebutan lain dari Valerian yang digunakan pada berbagai negara di dunia adalah *Setwall* (Inggris), *Valeriana radix* (latin), *Baldrianwurzel* (Jerman), *Phu* (Yunani), *Amantilla*, *All-Heal*, *Baldrian*, *Baldrianwurzel*, *Belgium Valerian*, *Common Valerian*, *Fragrant Valerian*, *Garden Valerian*, *Mexican Valerian*, *Pacific Valerian*, *Valeriana rhizome*, *Valerianaeradix*, *American Valerian*, *Cat's Valerian*, *St. George's herb*, *Ka-no-ko-so*, *Katzenwurzel*, *Kesso root*, *Kissokon*, dan *Vandal Root*. (Fernandez, Wasowski, Paladini, & Marder, 2004). Terdapat lebih dari 250 spesies Valerian yang tersebar di Eropa, Asia, dan Amerika Selatan, beberapa diantaranya adalah *Valeriana officinalis* (*European valerian*), *Valeriana jatamansi* (*Indian or Pakistan valerian*), *Valeriana wallichii*, *Valeriana hardwickii*, *Valeriana microphylla*, *Valeriana longiflora*, *Valeriana*

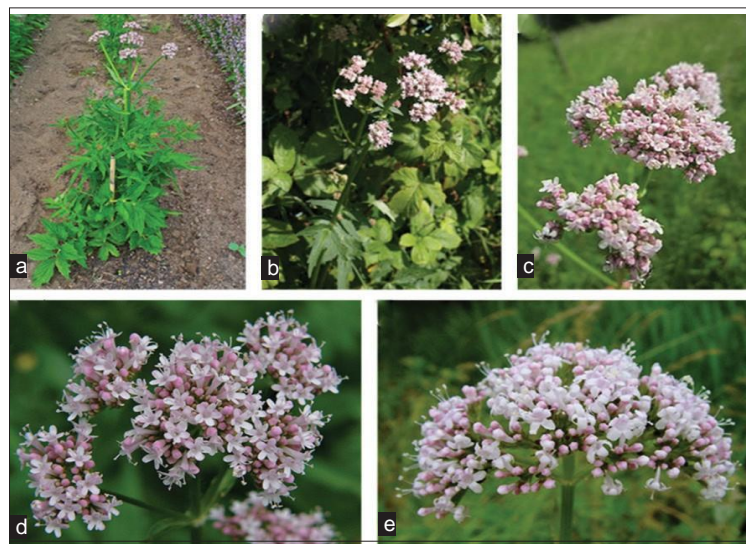
quadrangularis, dll. *Valeriana officinalis* merupakan spesies Valerian yang paling sering dimanfaatkan untuk tanaman obat. (Michael F Caron, 2002)

Valerian telah dikenal sejak zaman Romawi dan Yunani, Hippocrates telah mendeskripsikan khasiat dari tanaman Valerian. Pada abad kedua, Galen menuliskan resep Valerian sebagai obat insomnia. Pada akhir abad ke-16, Fabius Columna melaporkan efektivitas valerian sebagai antikonvulsan, dan selanjutnya ramuan ini sering digunakan sebagai pengobatan untuk berbagai penyakit saraf. Selama abad ke-19, dokter Eklektik umumnya merekomendasikan valerian untuk berbagai penyakit, termasuk penggunaan sebagai antipiretik, afrodisiak, sedatif, dan analgesik. (Barceloux, 2008)

Valerian dapat tumbuh di Indonesia karena tidak membutuhkan syarat yang spesifik untuk tumbuh. Menurut Benke, Valerian dapat tumbuh dengan sinar matahari maupun di tempat teduh dan pada pH 6–7 (Benke, Barberis, Kopp, & Altmann, 2009). *Valeriana officinalis* terdiri dari rhizome, akar dan stolon. Bagian Valerian yang paling sering dipakai sebagai terapi adalah akar ataupun rhizome, berwarna kuning keabu-abuan, kira-kira seukuran sendi jari, dan memiliki bau asam yang kuat setelah kering lama. Akar Valerian merupakan rhizoma yang berbentuk kerucut pendek dan memiliki cabang-cabang ramping dengan ujung ditumbuhi tunas untuk menghasilkan tanaman baru. Hanya satu batang yang tumbuh vertikal dari akar dan tinggi batang dapat mencapai 90 hingga 120 cm. Bentuk batang Valerian adalah bulat beralur, berlubang dan berambut banyak pada bagian dekat pangkal. Batang berakhir dengan dua pasang atau lebih oleh tangkai bunga yang berbentuk kelompok lebar dan datar yang disebut dengan *cyme*. Pada pangkal terdapat daun yang tersusun berpasangan.

Setiap daun terdapat rangkaian segmen yang membentuk lembing yang saling berlawanan. Daun lebih lebar bila berjumlah lebih sedikit dan sebaliknya yaitu lebih sempit bila berjumlah banyak. Panjang dari daun dapat berukuran 5,1 hingga 7,6 cm. Tepi dari daun bergerigi dan permukaan atas terdapat urat daun yang jelas sedangkan pada permukaan bawah terdapat warna yang lebih pucat dan berambut (Fernandez, Wasowski, Paladini, & Marder, 2004).

Valeriana officinalis berbunga pada bulan Juni hingga September. Bunga berukuran kecil, berwarna merah muda dengan bau yang khas yang tidak enak. Mahkota bunga dari Valerian berbentuk tabung dengan bentuk lima buah lobus dengan bagian tengah lobus terdapat tiga buah benang sari. Buah Valerian berupa kapsul yang berisi biji. Di lingkungan yang lembab tumbuhan Valerian dapat tumbuh secara lebih baik. Tanaman Valerian berukuran lebih kecil dengan daun yang lebih sempit bila tanaman tumbuh pada tanah yang tinggi dan daerah yang kering. (Benke, et al., 2009; Fernandez, et al., 2004).



Gambar 1. Morfologi dari *Valeriana officinalis* (a) Tanaman utuh, (b) daun, (c) bunga pada tahap awal, (d) bunga dan (e) batang (Sundaesan Nandhini, 2018).

2.1.2. Klasifikasi

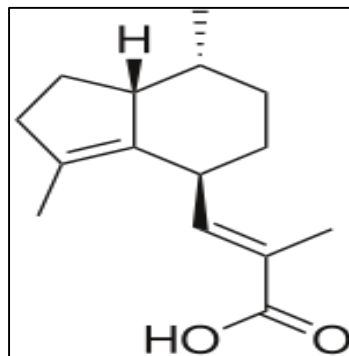
Sistematika dari tanaman *Valeriana officinalis* sebagai berikut:

Tabel 2.1 Sistematika Tanaman *Valeriana officinalis* (Fernandez, Wasowski, Paladini, & Marder, 2004)

<i>Kingdom</i>	Plantae
<i>Divisio</i>	Spermatophyta
<i>Subdivisio</i>	Angiospermae
<i>Class</i>	Dicotyledone
<i>Ordo</i>	Dipsacales
<i>Family</i>	Valerianaceae
<i>Genus</i>	Valeriana
<i>Spesies</i>	<i>Valeriana officinalis</i>
Spesies lain	<i>V. Angtifolia</i> (Cina, Jepang) <i>V. Officinalis</i> (Eropa) <i>V. Wallicinni</i> (India)
Nama umum / Nama dagang	Valerian

2.1.3 Struktur Kimia

Karakteristik primer marker dari *V.officinalis* adalah asam valerenik dengan derivatif grup hidroksi dan asetosi (National Toxicology Program, 2009).



Gambar 2. Struktur hidroksi dan aseton

Asam valerenik (C₁₅H₂₂O₂; mol. wt = 234.33; CAS No. 3569-10-6),

nama lainnya adalah :

2-Propenoic acid, 3-[(4S,7R,7aR)-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-3,7-dimethyl-1H-inden-4-yl]-2-methyl-, (2E)- 2-Propenoic acid, 3-(2,4,5,6,7,7a-hexahydro-3,7-dimethyl-1H-inden-4-yl)-2-methyl-, [4S-[4α(E),7β,7α]]-

Indene-4-acrylic acid, 2,4,5,6,7,7a-hexahydro- α ,3,7-trimethyl- (7Cl, 8Cl)

PubChem CID: 6440940

InChI: 1/C15H22O2/c1-9-4-6-12(8-11(3)15(16)17)14-10(2)5-7-13(9)14/h8-9,12-13H,4-7H2,1-3H3,(H,16,17)/b11-8+/t9-,12+,13-/m1/s1/f/h16H

Smiles: CC1CCC(C2=C(CCC12)C)C=C(C)C(=O)O

Valtrate (C22H30O8; mol. wt. = 422.47; CAS No. 18296-44-1), nama

lainnya adalah :

Baldrisedon

Butanoic acid, 3-methyl-, 1,1'-[(1S,2'R,6S,7aS)-4-[(acetyloxy)methyl]-6,7a-dihydrospiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane]-1,6-diyl] ester

Butanoic acid, 3-methyl-, (1S,2'R,6S,7aS)-4-[(acetyloxy)methyl]-6,7a-dihydrospiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane]-1,6-diyl ester (9Cl)

Butanoic acid, 3-methyl-, 4-[(acetyloxy)methyl]-6,7a-dihydrospiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane]-1,6-diyl ester, [1S-(1 α ,6 α ,7 β ,7 α)]-

Halazuchrome B

Spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane], butanoic acid deriv.

Valepotriate

Valtratum

PubChem CID: 493850

InChI: 1/C22H30O8/c1-12(2)6-18(24)29-17-8-16-15(9-26-14(5)23)10-27-21(20(16)22(17)11-28-22)30-19(25)7-13(3)4/h8,10,12-13,17,20-21H,6-7,9,11H2,1-5H3/t17-,20+,21-,22?/m0/s1

Smiles: C1=COC(C2C1=CC(C23CO3)OC(=O)CC(C)C)OC(=O)CC(C)C

Didrovaltrate (C22H32O8; mol. wt. = 424.48; CAS No. 18296-45-2), nama

lainnya adalah:

Butanoic acid, 3-methyl-, (1S,2'R,4aS,6S,7aS)-6-(acetyloxy)-4a,5,6,7a-tetrahydro-4-[(3-methyl 1-oxobutoxy)methyl]spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-1-yl ester

Butanoic acid, 3-methyl-, 6-(acetyloxy)-4a,5,6,7a-tetrahydro-4-[(3-methyl-1-oxobutoxy)methyl]spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-1-yl ester, [1S-(1 α ,4 $\alpha\alpha$,6 α ,7 β ,7 $\alpha\alpha$)]-

Didrovaltratum

Dihydroisovalpotrate

Dihydroisovaltrate

Dihydroisovaltratum

Spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane], butanoic acid deriv.

PubChem CID: 65689

InChI: 1/C22H32O8/c1-12(2)6-18(24)26-9-15-10-27-21(30-19(25)7-13(3)4)20-16(15)8-17(29-14(5)23)22(20)11-28-22/h10,12-13,16-17,20-21H,6-9,11H2,1-5H3/t16-,17+,20-,21+,22-/m1/s1

Smiles: CC(C)CC(=O)OCC1=COC(C2C1CC(C23CO3)OC(=O)C)OC(=O)CC(C)C

Isovaltrate (C22H30O8; mol. wt. = 422.47; CAS No. 31078-10-1), nama

lainnya adalah:

Butanoic acid, 3-methyl-, (1S,2'R,6S,7aS)-6-(acetyloxy)-6,7a-dihydro-4-[(3-methyl-1-oxobutoxy)methyl]spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-1-yl ester

Butanoic acid, 3-methyl-, 6-(acetyloxy)-6,7a-dihydro-4-[(3-methyl-1-oxobutoxy)methyl]spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-1-yl ester, [1S-(1 α ,6 α ,7 β ,7 α)]-

Isovaltratum

Spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane], butanoic acid deriv.

PubChem CID: 92275

InChI: 1/C22H30O8/c1-12(2)6-18(24)26-9-15-10-27-21(30-19(25)7-13(3)4)20-16(15)8-17(29-14(5)23)22(20)11-28-22/h8,10,12-13,17,20-21H,6-7,9,11H2,1-5H3/t17-,20+,21-,22+/m0/s1

Smiles: CC(C)CC(=O)OCC1=COC(C2C1=CC(C23CO3)OC(=O)C)OC(=O)CC(C)C

Acevaltrate (C24H32O10; CAS No. 25161-41-5), nama lainnya adalah:

(Acetyloxy)valepotriate

Acetovaltrate

Acetoxyvaltrate

Acevaltratum

Butanoic acid, 3-(acetyloxy)-3-methyl-, (1S,2'R,6S,7aS)-4-[(acetyloxy)methyl]-6,7a-dihydro-1-(3-methyl-oxobutoxy)spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-6-yl ester

Butanoic acid, 3-(acetyloxy)-3-methyl-, 4-[(acetyloxy)methyl]-6,7a-dihydro-1-(3-methyl-1-oxobutoxy)spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxiran]-6-yl ester, [1S-(1 α ,6 α ,7 β ,7 α)]-

Spiro[cyclopenta[c]pyran-7(1H),2'-oxirane], butanoic acid deriv.

PubChem CID: 65717

InChI: 1/C24H32O10/c1-13(2)7-19(27)33-22-21-17(16(11-30-22)10-29-14(3)25)8-18(24(21)12-31-24)32-20(28)9-23(5,6)34-

15(4)26/h8,11,13,18,21-22H,7,9-10,12H2,1-6H3/t18-,21+,22-,24+/m0/s1
Smiles: CC(C)CC(=O)OC1C2C(=CC(C23CO3)OC(=O)CC(C)(C)OC(=O)C)C(=CO1)COC(=O)C

Baldrial (C₁₂H₁₀O₄; mol. wt. = 218.21; CAS No. 18234-46-3), nama

lainnya adalah:

*Cyclopenta[c]pyran-7-carboxaldehyde, 4-[(acetyloxy)methyl]-
Cyclopenta[c]pyran-7-carboxaldehyde, 4-(hydroxymethyl)-, acetate
(8CI)*

PubChem CID: 159846

InChI: 1/C₁₂H₁₀O₄/c1-8(14)16-6-10-5-15-7-12-9(4-13)2-3-11(10)12/h2-5,7H,6H2,1H3

Smiles: CC(=O)OCC1=COC=C2C1=CC=C2C=O

Homobaldrial (C₁₅H₁₆O₄; mol. wt. = 260.29; CAS No. 67910-07-0),

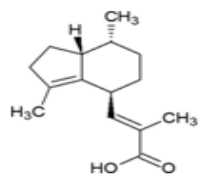
nama lainnya adalah:

Butanoic acid, 3-methyl-, (7-formylcyclopenta[c]pyran-4-yl)methyl ester

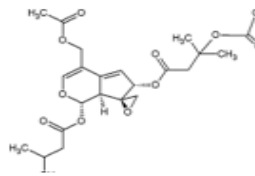
PubChem CID: 49999

InChI: 1/C₁₅H₁₆O₄/c1-10(2)5-15(17)19-8-12-7-18-9-14-11(6-16)3-4-13(12)14/h3-4,6-7,9-10H,5,8H2,1-2H3

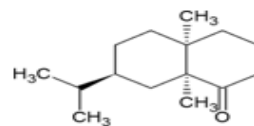
Smiles: CC(C)CC(=O)OCC1=COC=C2C1=CC=C2C=O



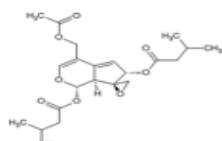
Valerenic acid



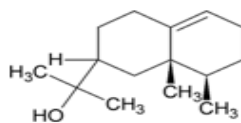
Acevaltrate



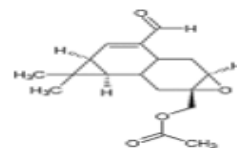
Valeranone



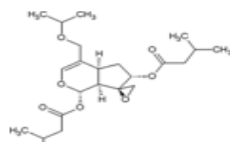
Valtrate



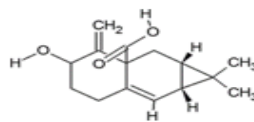
Valeranol



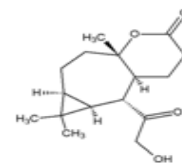
Volvalerenal



Didrovaltrate



Volvalerenic acid



Olvalerelactone

Gambar 3. Konstituen kimia dari *Valeriana officinalis* (Sundaresan Nandhini, 2018)

2.1.4 Manfaat Valerian

Valerian telah digunakan sejak zaman Yunani sebagai obat untuk insomnia dan sering digunakan sebagai obat sedatif, hipnotik, dan ansiolitik hingga saat ini. Pada perang dunia I, Valerian digunakan oleh pada tentara yang berperang sebagai relaksan untuk otot. Cina dan India menjadikan Valerian sebagai obat tradisional. Valerian digunakan dalam mengobati insomnia untuk meningkatkan kualitas tidur, mengurangi waktu induksi dan menurunkan gejala dari insomnia, serta gelisah. Kegunaan lainnya adalah sebagai pengobatan kejang anak, tremor ringan, sindrom kelelahan kronis, nyeri otot dan sendi, dan pada kondisi stres psikologis seperti asma, keadaan histeris, eksitasi berlebihan, hipokondria, sakit kepala, migrain, dan nyeri perut. Selain itu, dilaporkan juga kegunaan Valerian dalam mengatasi kram menstruasi, gejala menopause, herpes zoster, linu panggul, neuralgia, *multiple sclerosis*, epilepsi, dan depresi *Attention Deficit Hyperactivity Disorder* (ADHD). Campuran *lemon balm* (*Melissa officinalis*) dan Valerian (*Valeriana officinalis*) juga digunakan sebagai obat penenang ringan, ansiolitik, dan hipnotik. Ekstrak Valerian dan minyak esensial juga telah digunakan sebagai penyedap rasa untuk makanan dan minuman. Komposisi yang mengandung baldrinal diusulkan sebagai pengobatan hiperplasia prostat jinak. Namun, penelitian yang menguji khasiat dalam Valerian belum pernah dilakukan sehingga belum cukup bukti secara ilmiah bahwa Valerian dapat mengatasi keluhan.

2.1.5 Kandungan Kimia

Menurut *Chemical Information Review Document*, kandungan dari Valerian diukur dengan menggunakan berbagai metode yaitu dengan

kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas/spektrometri massa dan spektrometri absorpsi. Metode tersebut digunakan untuk mengukur konsentrasi kandungan unsur secara kuantitatif di berbagai preparasi (National Toxicology Program, 2009).

Hasil konsentrasi dari asam valerianik dan derivatifnya yang dilaporkan dari produk Valerian dari Australia (n=31) dalam bentuk teh, tablet, kapsul dan cairan dianalisis dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi adalah berkisar antara <0.01 hingga 6.32 mg/g. Konsentrasi dari asam valerianik lebih tinggi pada kapsul bubuk (2.46 mg/g) dibandingkan dengan cair (0.47 mg/mL). (Benke, et al., 2009 ; National Toxicology Program, 2009).

Ekstrak methanol dari rhizome *V.officinalis* dan *V.jatamansi* bubuk yang dikeringkan telah dianalisis dengan metode kromatografi lapis tinggi. Hasil kandungan asam valerianik pada *V.officinalis* adalah 0.42% dan 0.12% pada sampel *V. Jatamansi* (National Toxicology Program, 2009).

Komposisi elemen dari akar Valerian secara komersial terdapat di Argentina. Untuk mengetahui unsur elemen yang terdapat dari akar tersebut dapat digunakan metode spektrometri absorpsi, spektrometri absorpsi elektrotermal atomik atau dengan nebulisasi ultrasonik dengan spektrometri emisi plasma optikal. Konsentrasi dari besi, aluminium, kalsium dan vanadium yang terdapat pada sampel akar adalah 100-10000 mg/kg dan konsentrasi dari mangan, seng, dan timah adalah 10-100 mg/kg sedangkan untuk konsentrasi cadmium adalah 0.0125 mg/kg (Benke, Barberis, Kopp, & Altmann, 2009).

Hasil dari analisis dari hidrodistilasi dari bagian arial dari spesies Valerian liar dari Serbia dan Mortenegro (*V. officinalis* L., *V. panicii* Halacsy et Bald., *V. bertisceae* Pancic, *V. montana* L., and *V. braunii-blanquetii* Lakusic) dengan kromatografi gas/spektrometri massa adalah dilaporkan terdapat α -kessyl asetat (14.4%) dan bornyl asetat (14.2%) di minyak dari *V. officinalis*, terdapat alkohol patchouli (36.8%) di minyak *V. panicii*, dan terdapat asam isovalerik (13.2-39.0%) dan *3-methylvaleric acid* (10.0-30.8%) di minyak dari *V. bertisceae*, *V. montana*, dan *V. braunii-blanquett* (National Toxicology Program, 2009).

Metode kapiler elektroforesis telah dikembangkan untuk mengukur tiga komposisi utama dari *V. Officinalis* yaitu asam valerlinik, asam hidroksivalerlinik, dan asam asetosivalerlinik. Metode ini digunakan untuk menganalisa enam produk Valerian yang telah dipasarkan namun hanya terdapat satu produk yang mengandung jumlah komposisi utama yang dapat terdeteksi yaitu 0.54% asam hidrosivalerlinik dan 0.13% asam valerlinik. Hasil dari metode tersebut dapat dibandingkan dengan hasil dari metode dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi yaitu hasilnya sebanding (National Toxicology Program, 2009).

Komposisi dari asam valerlinik telah dievaluasi di berbagai produk farmasi Valerian seperti pada tablet, kapsul maupun pada obat tetes. Produk yang diekstraksi dengan menggunakan proses maserasi dengan methanol dan di analisa dengan metode kromatografi lapis tipis dan fase terbalik kromatografi cair kinerja tinggi ditemukan konsentrasi dari asam valerlinik adalah 0.03% hingga 2.8% (National Toxicology Program, 2009).

Metode kromatografi gas/spektrometri massa dengan menggunakan ekstraksi cairan dan mikro ekstraksi dari fase padat digunakan untuk mengevaluasi komponen utama yang volatil dari *V.officinalis var. latifolia* dan akar dari *V.officinalis*. Hasil dari teknik evaluasi ini dibandingkan dengan metode ekstraksi hidrodistilasi. Hasil dari perbandingan metode dan kondisi ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan hasil (National Toxicology Program, 2009).

Ekstrak Valerian diambil dari bagian akar dan hasil dari ekstraksi adalah minyak berwarna coklat dengan presentase 0,5 – 2%. Variasi presentase kandungan minyak bergantung pada jenis dari spesies varian, lokasi tumbuh, kelembaban dan juga dari kesuburan tanah. (National Toxicology Program, 2009). Kandungan dari ekstrak Valerian yaitu: (National Toxicology Program, 2009)

1. Monoterpena bornyl acetat, squiterpena dan asam valerik yang disebut *volatile oil*. Asam valerik berguna untuk menghambat katabolisme dari GABA di otak yang mengakibatkan efek sedasi.
2. Non volatil monoterpena (valepotriat) terdiri dari Valeriana-epoxy-triacylates, isovalerohydroxy, iridoide monoterpenes, dan isovaltrate.
3. GABA
4. Hidroksi-pinoresinol
5. Ligan flunafuran dan hidroksi-pinoresinol
6. Alkaloid (actinide, catinine, isovaleramide, Valeriannine, valerine)
7. Glutamin

2.1.6 Sifat Kimia dan Fisika

Tabel 2.2. Sifat Kimia-Fisika Asam Valerinik dan Derivatnya (**National Toxicology Program, 2009**)

Sifat	Informasi						
	Asam valerenik	Valtrate	Didrovaltrate	Isovaltrate	Acevaltrate	Baldrinal	Homobaldrinal
Titik didih (°C)	374,5 ± 21 @ 760 mm Hg	525,9 ± 50,0 @ 760 mm Hg	507,5 ± 50,0 @ 760 mm Hg	525,9 ± 50,0 @ 760 mm Hg	538,7 ± 50,0 @ 760 mm Hg	451,4 ± 30,0 @ 760 mm Hg	462,1 ± 30,0 @ 760 mm Hg
Titik lebur (°C)	140-142	Tidak tersedia	Tidak tersedia	Tidak tersedia	Tidak tersedia	Tidak tersedia	Tidak tersedia
Titik nyala (°C)	273.1 ± 13	226,5 ± 30,2	217,8 ± 30,2	226,5 ± 30,2	229,1 ± 30,2	206,3 ± 24,6	207,5 ± 24,6
Tekanan Uap (mm Hg)	1,22 x 10 ⁻⁶ @ 25 °C	3,75 x 10 ⁻¹¹ @ 25 °C	2,01 x 10 ⁻¹⁰ @ 25 °C	3,75 x 10 ⁻¹¹ @ 25 °C	1,13 x 10 ⁻¹¹ @ 25 °C	2,44 x 10 ⁻⁸ @ 25 °C	1,02 x 10 ⁻⁸ @ 25 °C
Densitas	1,06 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,22 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,20 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,22 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,26 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,29 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr	1,19 ± 0,1 @ 20 °C/ 760 torr
Log P (g/cm ³)	5,127 ± 0,305 @ 25 °C	2,360 ± 0,746 @ 25 °C	2,069 ± 0,722 @ 25 °C	2,360 ± 0,746 @ 25 °C	1,915 ± 0,777 @ 25 °C	-0,937 ± 0,419 @ 25 °C	0,474 ± 0,423 @ 25 °C
Faktor bio-konsentrasi	4632,05 – 1,0 (pH 1-10 @ 25 °C)	36,62 (pH 1-10 @ 25 °C)	21,98 (pH 1-10 @ 25 °C)	36,62 (pH 1-10 @ 25 °C)	16,82 (pH 1-10 @ 25 °C)	1,0 (pH 1-10 @ 25 °C)	1,35 (pH 1-10 @ 25 °C)

2.1.7 Farmakologi

Valerian dapat mempengaruhi reseptor GABA subtype A (GABA_A). Valerian dapat berpengaruh dalam komponen neuron presinaptik yang melepaskan sinaptomal GABA, menghambat reuptake dari GABA, dan dengan GABA transaminase dapat menghambat proses katabolisme GABA. Hipnotik sedatif, anestesi umum, benzodiazepin, dan barbiturat mempunyai target yaitu reseptor GABA_A. Dalam proses tidur reseptor GABA_A sangat berperan penting (Benke, et al., 2009 ; Nazari, et al., 2009).

2.1.8 Dosis Obat

Ekstrak Valerian pada umumnya mempunyai standar 0,3% asam valerenik, walaupun beberapa produk memiliki kandungan hingga 0,8%. Untuk pengobatan insomnia, dosis yang direkomendasikan adalah 300-600 mg atau setara dengan 2-3 gram ekstrak Valerian kering (Hadley and Petry, 2003; Thorne Research, Inc., 2004).

Valerian juga dilaporkan termasuk dalam pengobatan herbal untuk mengobati *Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)*. Dosis untuk anak-anak dengan gangguan tidur pada penderita ADHD kurang dari 15 tahun adalah 220 mg, dapat digunakan tiga kali sehari. (Chan, 2002).

Francis dan Dempster pada tahun 2002 menguji efek *Valeriana edulis* pada subyek manusia dalam hal ini anak-anak dengan defisit intelektual (Francis, A.J.P.; Dempster, R.J.W., 2002). Dosis *Valeriana edulis* standar pada orang dewasa adalah 1500 mg/hari, dan dosis yang mereka gunakan untuk anak-anak adalah 20 mg/kg. Dosis ini terbukti aman dan menunjukkan bahwa Valerian memiliki potensi sebagai pengobatan jangka panjang untuk kesulitan tidur mereka.

Dosis lain yang dianjurkan untuk penggunaan produk Valerian adalah 2-3 gram akar kering dan rimpang per cangkir cairan 1-5 kali per hari hingga 10 gram total; 0,5-1 sendok teh *tincture* (1: 5, 70% etanol) sekali hingga beberapa kali per hari; dan 2-3 gram obat dalam ekstrak sekali hingga beberapa kali per hari. Minyak esensial juga dapat digunakan sebagai aromaterapi untuk membantu dalam relaksasi dan tidur (National Toxicology Program, 2009).

Penelitian mengenai ekstrak Valerian dengan menggunakan mencit sebagai subyek uji coba telah cukup banyak dilakukan namun belum ada yang meneliti hingga level ekspresi gen.

Kakehashi dalam publikasi tahun 2014 memilih dosis Valerian berdasarkan penelitian sebelumnya pada subyek manusia dimana efek toksisitas tidak terdeteksi bahkan pada dosis 5000 ppm. Dosis 50 ppm (5 mg/kgBB/hari), 500 ppm (50 mg/kgBB/hari) dan 5000 ppm (500 mg/kgBB/hari) dikonsumsi oleh mencit (200 gram) dalam 20 ml air minum dalam akan sama dengan 0,05 , 0,5 dan 5 mg/kgBB/hari oleh seorang manusia dengan berat badan rata-rata 50 kg. Faktor konversi dari manusia ke dosis mencit adalah mengalikan dosis manusia dengan 6,16 . Dalam kasus ini, dosis hewan dari 5, 50 dan 500 mg/kgBB akan sama dengan 0.8, 8.1 dan 81.2 mg/kgBB pada manusia (Kakehashi, et al., 2014).

Sementara Al-Majed menyatakan bahwa dosis *Valerian Officinalis* ditentukan oleh tiga faktor yaitu dosis maksimal yang dapat ditoleransi (*Maximum Tolerated Dose*), dosis terapeutik manusia dengan mengacu pada aturan luas permukaan tubuh, dan percobaan pendahuluan yang dilakukan oleh Fehri, et al. pada tahun 1991. Berdasarkan pada *Maximum Tolerated Dose*, dosis Valerian yang dipilih oleh Al-Majed untuk penelitiannya terhadap mencit seberat 20 gram adalah 500, 1000 dan 2000 mg/kg (Chan, et al., 1986). Dosis harian yang direkomendasikan, seperti yang tertulis dalam botol Valerian, untuk manusia dewasa adalah 3060 mg. Menurut aturan rasio luas permukaan mencit (20 gr) dan pria (60 kg), rasio yang dihitung adalah 0,0026 dan dosis Valerian akan menjadi

397,8 mg/kg. Valerian diberikan dalam bentuk suspensi cair dengan sonde lambung selama 7 hari (Al-Majed A., et al., 2006).

Kesimpulan secara umum dari berbagai penelitian mengenai Valerian adalah dosis tunggal 1800 mg (sesuai rekomendasi *PDR for Herbal Medicine* tahun 2000) tidak memberikan pengaruh terhadap psikomotor, kemampuan kognitif atau efek sedasi. Efek sedasi dan perbaikan kualitas tidur baru akan terlihat setelah 1-2 minggu (Gutierrez et al., 2004).

Dosis ekstrak Valerian yang akan digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan mengacu pada dosis umum yang digunakan pada manusia yaitu sebesar 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB. Dosis ini dipilih karena tidak melampaui *Maximum Tolerated Dose* sebesar 51 mg/kgBB seperti yang dikemukakan oleh Al-Majed atau *Maximum Tolerated Dose* sebesar 81,2 mg/kgBB seperti yang dikemukakan oleh Kakeshi. Faktor konversi dari manusia ke dosis mencit dengan berat rata-rata 20 gram adalah mengalikan dosis manusia dengan 12,3 sesuai dengan ketentuan dari FDA . Dalam kasus ini, dosis manusia dari 20 dan 40 mg/kgBB akan sama dengan 250 dan 500 mg/kgBB atau 2,7 dan 5 mg/10 gr, pada mencit dengan berat rata-rata 20 gram.

2.1.9 Interaksi Obat

Menurut penelitian Budzinski et al, pada tahun 2006 yang dilakukan secara *in vitro*, ekstrak Valerian dapat menghambat enzim CYP450 3A4 yang meningkatkan kadar obat terhadap metabolit obat CYP450 3A4 bila diberikan secara bersamaan. Interaksi Valerian antara lain dengan alkohol,

barbiturat dan benzodiazepin yang dapat menimbulkan efek adiktif. Penelitian lain yang dilakukan pada orang sehat, efek Valerian terhadap aktifitas enzim CYP450 3A4 ditemukan memiliki efek yang minimal. Studi yang dilakukan pada subyek yang sehat menunjukkan bahwa maksimum konsentrasi asam valerenik pada serum terjadi pada 1-2 jam setelah pemberian dosis tunggal. Waktu eliminasi paruh pada asam valerenik kurang lebih 1 jam (Budzinski, Foster, Trudeau, & Droui, 2000).

2.1.10 Efek Samping

Efek samping dari Valerian *withdrawal* dapat terjadi pada pemberian obat yang dihentikan secara tiba-tiba pada pemakaian kronik. Efek *hangover* dapat terjadi pada pemberian dosis lebih dari 900 mg. Efek samping Valerian antara lain sakit perut, sakit kepala, gelisah, pusing, tidak tenang, gatal, gangguan gastrointestinal, eksitabiliti dan hipotermi. Penelitian yang dilakukan oleh *Thorne Research* menemukan efek samping dari Valerian sama seperti plasebo. Efek samping dari Valerian sangat jarang di laporkan (Throne Research, Inc, 2004).

2.1.11 Tinjauan Efek Hipnotik

Banyak kandungan dari Valerian yang telah diidentifikasi. Efek hipnotik dari beberapa zat aktif yang terkandung di Valerian bekerja secara sinergis. Asam valerinik menghambat pemecahan dari enzimatik GABA, menyebabkan jumlah GABA dalam ruang sinap tetap tinggi. Ekstrak Valerian mengandung GABA yang bekerja dengan cara mendepresi sistem saraf pusat. Salah satu kandungan dari Valerian yaitu glutamin mempunyai properti untuk melewati sawar darah otak yang selanjutnya

akan dirubah menjadi GABA. Valerian bekerja dengan menghambat *reuptake* GABA, sehingga konsentrasi dari GABA pada celah sinaps tetap tinggi (Leuschner, Muller, & Rudmann, 1993).

2.1.12 Cara Kerja

Valerian sering digunakan untuk pengobatan insomnia dan ansietas. Valerian mempunyai cara kerja yang sama dengan benzodiazepin (Chun-Su, et al, 2004). Benzodiazepin berikatan pada sub-unit gamma sedangkan Valerian berikatan pada sub-unit beta di reseptor GABA_A. Valerian dan benzodiazepin berikatan pada sub-unit yang berbeda namun memiliki efek yang sama yaitu menyebabkan pergerakan klorida kedalam neuron saat neurotransmitter inhibitor utama, GABA, berikatan dengan reseptor GABA_A. Proses dari ikatan ini menyebabkan keadaan hiperpolarisasi. Valerian telah terbukti dapat menurunkan metabolisme dari GABA sehingga GABA dapat bertahan lebih lama (Budzinski, et al., 2000 ; Leuschner, et al., 1993).

2.1.13 Toksikologi

Mayoritas penelitian mengenai efikasi Valerian berfokus pada fungsinya sebagai alat bantu tidur, baik sendiri maupun dikombinasi dengan zat lain. Preparasi Valerian komersial yang paling sering diteliti adalah ekstrak etanol LI 156 (Sedonium).

Sejauh ini belum ada studi yang menyebutkan dosis toksik dari Valerian pada manusia. Francis dan Dempster pada tahun 2002 menguji efek *Valeriana edulis* pada subyek manusia dalam hal ini anak – anak dengan defisit intelektual (Francis, A.J.P.; Dempster, R.J.W., 2002). Dosis

V. edulis standar pada orang dewasa adalah 1500mg/hari, dan dosis yang mereka gunakan untuk anak – anak adalah 20mg/kg. Dosis ini terbukti aman dan menunjukkan bahwa Valerian memiliki potensi sebagai pengobatan jangka panjang untuk kesulitan tidur mereka.

Kejadian toksisitas akut dari studi yang ada terhadap mencit menunjukkan bahwa LD50 dari ekstrak dan minyak Valerian adalah 15.000 mg/kg (secara oral) dan 3.300 mg/kg (secara intraperitoneal). Pemberian suspensi cair Valerian dengan dosis harian 2.000 mg/kg selama 7 hari memberikan efek ereksi pili, hipertermia, kenaikan aktifitas motorik, defekasi, gangguan refleks dan sedasi. (Al-Majed et al., 2006). Pemberian secara intraperitoneal pada dosis 50-400 mg/kg menghasilkan efek yang beragam seperti kurangnya pergerakan spontan, ataksia dan kejang otot. Pada dosis 400 mg/kg didapati kejang berat yang menyebabkan kematian mencit dalam 24 jam berikutnya. Dosis maksimal yang tidak toksik dari ekstrak Valerian yang ada di pasaran terhadap mencit adalah 2,79 gram/kg/hari setelah 8 hari masa percobaan. (Hendriks et al., 1985)

A. Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi

Ketika subyek diberikan satu dosis Valerian (600 mg), konsentrasi serum maksimum asam valerenik (0.9-2.3 ng/mL) terlihat 1-2 jam setelah administrasi. Paruh waktu eliminasi asam valerenik adalah 1.1 ± 0.6 jam (Budzinski, Foster, Trudeau, & Droui, 2000).

B. Hepatotoksisitas

Beberapa kasus hepatotoksisitas telah dilaporkan pada produk yang mengandung ekstrak Valerian. Empat kasus cedera hati sementara

pertama kali dilaporkan pada tahun 1989 dan satu kasus lainnya di tahun 2008 (Throne Research, Inc, 2004).

Empat subyek di Wales yang tidak memiliki riwayat medis yang signifikan akan penyakit hati menunjukkan bukti timbulnya gejala *jaundice* (kulit dan mata terlihat kuning), biasanya dengan urin gelap dan tinja berwarna pucat. Ditemukan bahwa subyek-subyek tersebut mengonsumsi obat-obatan herbal (khususnya Neurelax atau Kalms yang berisi Valerian dan kopiah) untuk menghilangkan stres. Biopsi hati menunjukkan hepatitis akut sedang sampai parah pada dua dari tiga subyek yang mengonsumsi Kalms dan hepatitis agresif kronis dengan fibrosis pada subyek yang mengonsumsi Neurelax. Setelah penghentian obat herbal, hasil dari tes fungsi hati pada empat subyek kembali normal dalam waktu 2-19 bulan. Dipercaya bahwa kopiah dan Valerian adalah komponen hepatotoksik, tetapi, para peneliti sekarang percaya bahwa germander, tanaman dari keluarga mint dan juga diyakini hadir dalam obat-obatan herbal, adalah penyebab kerusakan hati tersebut (Throne Research, Inc, 2004).

C. Reproduksi dan Perkembangan

Tidak ada studi klinis yang melaporkan efek samping pada wanita hamil atau menyusui yang mengonsumsi ekstrak Valerian. Dalam studi klinis fase I, laki-laki yang sehat diberikan lima tablet dari ekstrak Valerian dengan standar 0,43% asam valerenik setiap hari selama 10 hari (tiga kali lipat dosis harian yang dianjurkan). Subyek menunjukkan penurunan persentase bentuk diskinetik dari spermatozoid dan peningkatan sementara persentase spermatozoid normokinetik, tetapi tidak ada efek

negatif pada fertilitas. Parameter fertilitas yang diukur adalah indeks fertilitas Farris, volume ejakulasi, jumlah spermatozoid dalam 1 mL ejakulasi, jumlah total spermatozoid di seluruh ejakulasi, dan persentase spermatozoid normokinetik. Selain itu, tidak ada perubahan signifikan pada testis (bengkak, hiperemia lokal, atau pelebaran pembuluh darah) yang dilaporkan.

D. Imunotoksitas

Ketika diberikan sebagai dosis tunggal kepada 15 relawan sehat, Valerian tidak menunjukkan adanya penekanan respon *wheal* dan *flare* pada tes *skin prick* histamin. Pada pasien eksim atopik / sindroma dermatitis, inhalasi minyak Valerian mengurangi respon kulit *wheal* yang diinduksi oleh alergen lateks (Budzinski, Foster, Trudeau, & Droui, 2000).

E. Efek Sinergis/ Antagonis

Valerian secara sinergis dapat meningkatkan efek sedatif dari barbiturat, anestesi, dan depresan sistem saraf pusat lainnya. Tidak ada potensiasi efek negatif alkohol pada kinerja mengemudi (Nazari, Shaabani, & Nejad, 2009).

F. Efek Enzim

Menurut penelitian oleh Thorne Research pada tahun 2004, pemberian ekstrak akar Valerian (125 mg) tiga kali sehari selama 28 hari untuk subyek yang sehat (diikuti dengan periode *washout* 30 hari) tidak menghasilkan perubahan yang signifikan pada aktivitas sitokrom P450 (CYP) 1A2, 2D6, 2E1, dan 3A4/5. Telah dilaporkan bahwa hanya sejumlah kecil asam valerenik ditemukan dalam produk penelitian, sehingga

hasilnya mungkin tidak dapat mewakili seluruh produk Valerian. Pada subyek yang diberikan dekstrometorfan dan alprazolam untuk mengukur efek Valerian pada CYP2D6 dan aktivitas CYP3A4, masing-masing, administrasi setiap malam, dua tablet suplemen Valerian mengandung 500 mg ekstrak akar Valerian kering (5.51 mg asam valerenum/ tablet) selama 14 hari tidak menimbulkan efek pada aktivitas CYP2D6 dan efek minimal terhadap aktivitas CYP3A4 (Throne Research, Inc, 2004).

2.1.14 Hasil dari Penelitian Sebelumnya

Sebuah penelitian meta-analisis oleh Bent dan kawan - kawan pada tahun 2006, menunjukkan bahwa ekstrak Valerian dapat meningkatkan kualitas tidur tanpa efek samping yang berarti. Namun dari 16 penelitian yang ada, banyak permasalahan dalam metodologi penelitian, dosis yang digunakan sangat bervariasi (225–1215 mg), hingga jangka waktu penelitian (Bent, et al., 2006).

Sebuah penelitian di Semarang oleh Nurun Nisa membuktikan bahwa pemberian jangka pendek dosis ekstrak Valerian sebanyak 28,8mg/kg dan 91 mg/kg pada mencit dapat mempengaruhi aktifitas sistem saraf pusat berupa penurunan aktifitas dan ptosis palpebra namun tidak mempengaruhi waktu induksi tidur (Nisa N, 2009).

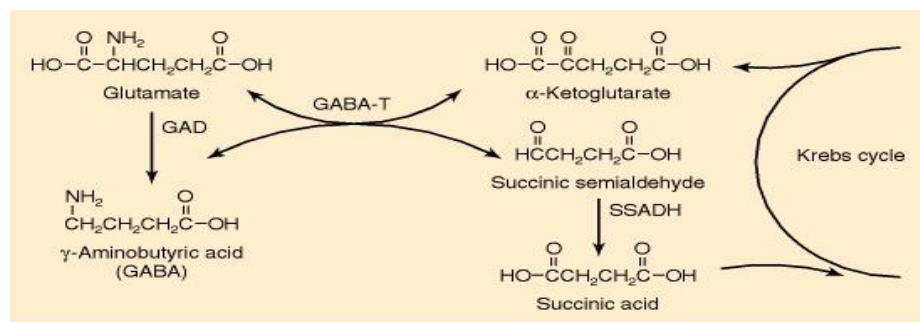
Fachinnetto dan kawan - kawan pada tahun 2007 melakukan penelitian terhadap mencit dengan menggunakan ekstrak Valerian sebesar 200-250 mg/kg, jauh di bawah dosis yang digunakan oleh Almajed dan kawan-kawan pada tahun 2006. Hal ini dilakukan untuk menghindari efek oksidasi di hepar mencit yang telah terjadi sebelumnya. Sebagai akibatnya,

dibutuhkan waktu 8 minggu untuk mendapatkan efek ansiolitik pada mencit (Fachinetto, et al., 2007)

2.2 Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)

GABA adalah salah satu *neurotransmitter* penghambat yang sangat penting sistem saraf pusat (SSP). Sepertiga dari sinaps di otak menggunakan GABA sebagai *neurotransmitter*. GABA memiliki peranan penting untuk mengurangi eksitasi neuron dengan menghambat transmisi impuls saraf pada otak dan juga berperan pada regulasi tonus otot. GABA tergolong dalam asam amino karena memiliki gugus amin. GABA disintesis dari glutamat menggunakan enzim *L-glutamic acid decarboxylase* (GAD) dan asam folat dan *pyridoxal phosphate* sebagai kofaktor. Sintesis tersebut terjadi di otak. Pada akson terminal, GABA disimpan dalam vesikel *GABA transporter* (VGAT) sebelum dilepaskan ke celah sinaps (Spitzer, 2010).

Dalam jurnal yang ditulis Spitzer pada tahun 2010, untuk melakukan aksinya sebagai neurotransmitter penghambat, GABA harus berikatan dengan reseptornya. GABA memiliki dua macam reseptor yang terletak di neuron post-sinaps, yaitu reseptor $GABA_A$ dan $GABA_B$. Kedua reseptor tersebut menyebabkan hiperpolarisasi pada neuron namun dengan mekanisme yang berbeda (Spitzer, 2010).



Gambar 4. Proses Sintesis Neurotransmitter GABA (Olsen & DeLorey, 1999)

2.3 Reseptor GABA

2.3.1 Pengertian

Reseptor GABA (*Gamma-Aminobutyric acid*) merupakan target tempat kerja dari GABA. GABA adalah neurotransmitter inhibitor utama yang berkerja pada 40% dari sistem saraf-saraf pusat mamalia. Reseptor GABA_A adalah *ligand gated ion channel* atau reseptor ionotropik sedangkan reseptor GABA_B adalah reseptor *G protein couple* atau reseptor metabotropik (Rudolph, 2015).

2.3.2 Klasifikasi

Terdapat tiga tipe dari reseptor GABA yaitu GABA_A, GABA_B, dan GABA_C (Rudolph, 2015 ; Takano, et al., 2014 ; Baur, et al., 2010).

A. Reseptor GABA_A

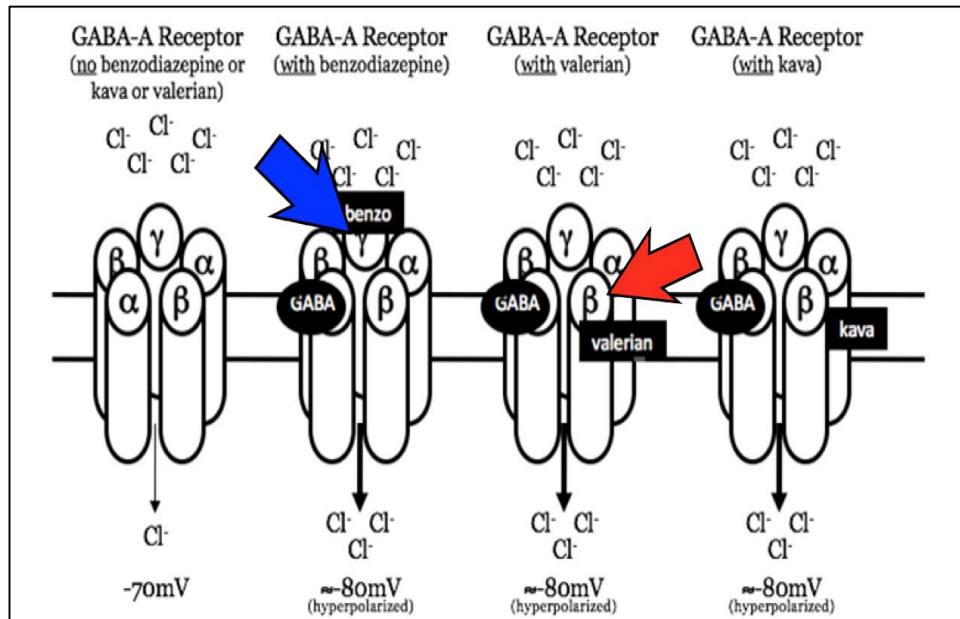
Respon cepat dari reseptor GABA adalah bagian dari *cys-loop ligand gated ion channel*. Respon cepat dari neuron terhadap GABA dihambat oleh bicuculin dan picrotoxin yang disebabkan oleh aktivasi secara langsung oleh kanal anion. Anggota lain dari tipe ini adalah reseptor nikotinik asetilkolin, reseptor GABA_A, glisin dan reseptor 5-HT₃. Semua anggota ini memiliki karakteristik yang sama yaitu memiliki ikatan oleh ikatan disulfida antara 2 residu sistein. Di reseptor GABA_A ionotropik, perikatan antara molekul GABA kepada tempat berikatan di bagian ekstraseluler dari reseptor menginduksi pembukaan dari kanal selektif ion klorida. Peningkatan dari jumlah konduksi dari klorida menyebabkan kebalikan dari arah membran potensialnya dari ion klorida yaitu

pada -65 mV di neuron, menghambat potensial aksi. Mekanisme ini yang menyebabkan timbulnya efek sedasi pada agonis allosterik dari GABA_A. Namun terdapat banyak laporan mengenai kerja eksitasi dari reseptor GABA_A. Fenomena ini terjadi karena terjadinya peningkatan dari konsentrasi ion klorida intraseluler pada keadaan perkembangan dari sistem saraf atau pada beberapa populasi sel. Setelah periode masa perkembangan telah terlewati, terjadi upregulasi dari pompa klorida dan masuk ke sel membran, memompa ion klorida ke ruang ekstraseluler dari jaringan. Pembukaan dari pompa di lanjutkan dengan proses perikatan dari GABA ke reseptor yang menyebabkan terjadi respon inhibisi. Eksitasi yang berlebihan pada reseptor ini akan menginduksi remodeling dari reseptor dan menyebabkan invaginasi dari reseptor GABA. Hasil dari proses tersebut adalah perikatan GABA yang selanjutnya akan terjadi inhibisi dan penghambatan potensial dari post-sinaptik menjadi tidak relevan.

Reseptor GABA_A tergolong dalam reseptor ionotropik yang berhubungan dengan kanal klorida. Reseptor tipe ini memperantai penghambat sinaptik secara cepat. Reseptor GABA_A dihambat dengan cara di blok selektif oleh alkaloid bikukulin dan dapat di modulasi oleh beberapa golongan obat yaitu benzodiazepin, barbiturat dan steroid.

Reseptor GABA_A mempunyai bentuk sebagai kompleks protein heterooligomerik yang mempunyai tempat berikatan dengan GABA dan kompleks tersebut berkaitan dengan kanal ion

klorida. Reseptor GABA_A terdiri atas lima sub-unit yaitu : dua sub-unit alpha, dua sub-unit beta dan satu sub-unit gamma. Reseptor diaktifkan dengan cara terikatnya bagian sub unit alpha, pengaktifan reseptor akan menyebabkan hiperpolarisasi yang disebabkan oleh muatan negatif di sitoplasma.



Gambar 5. Tempat Ikatan Obat Terhadap Reseptor GABA_A

B. Reseptor GABA_B

Respon yang lambat terhadap GABA dimediasi oleh reseptor GABA_B. Kemampuan dari GABA untuk menginhibisi dari pelepasan neurotransmitter tidak dihambat oleh bicuculin, tidak terjadi proses mimikri dari isoguvacine dan tidak bergantung terhadap ion klorida.

Reseptor GABA_B adalah reseptor metabotropik. Aktivitas dari reseptor tipe ini adalah untuk menghambat kerja dari adenilat

siklase dan pembukaan dari kanal ion K⁺ yang hasilnya akan menghambat kerja sistem saraf.

C. Reseptor GABA_C

Reseptor GABA_C adalah subkelas dari ionotropik reseptor GABA, insesitif terhadap tipikal modulator alosterik dari kanal reseptor GABA_A seperti benzodiazepin dan barbiturat. Respon natif dari tipe reseptor GABA_C terjadi di bipolar retinal atau sel horizontal pada spesies vertebrata. Reseptor GABA_C terdiri atas sub-unit ρ (rho) yang berhubungan dengan reseptor GABA_A sub-unit. Istilah reseptor GABA_C sering digunakan, namun GABA_C adalah variasi dari reseptor GABA_A. Pendapat lain mengatakan bahwa perbedaan dari reseptor GABA_C dan GABA_A terlalu banyak yang dapat mendukung pembagian golongan dari dua subkelas dari kedua reseptor GABA. Rekomendasi dari *Nomenclature Committee* dari IUPHAR adalah untuk istilah dari GABA_C tidak dipergunakan karena reseptor GABA_C memiliki hubungan yang dekat dengan reseptor GABA_A dalam sekuensi, struktur dan fungsi. Reseptor ρ harus digolongkan pada ρ subfamily di reseptor GABA_A.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa reseptor GABA_C merupakan golongan dalam reseptor ionotropik yang menyerupai reseptor GABA_A terkait dengan kanal klorida dan dalam memberikan efek untuk menghambat sinaptik secara cepat namun reseptor-reseptor tersebut berbeda dalam biokimia, fisiologi dan farmakologi.

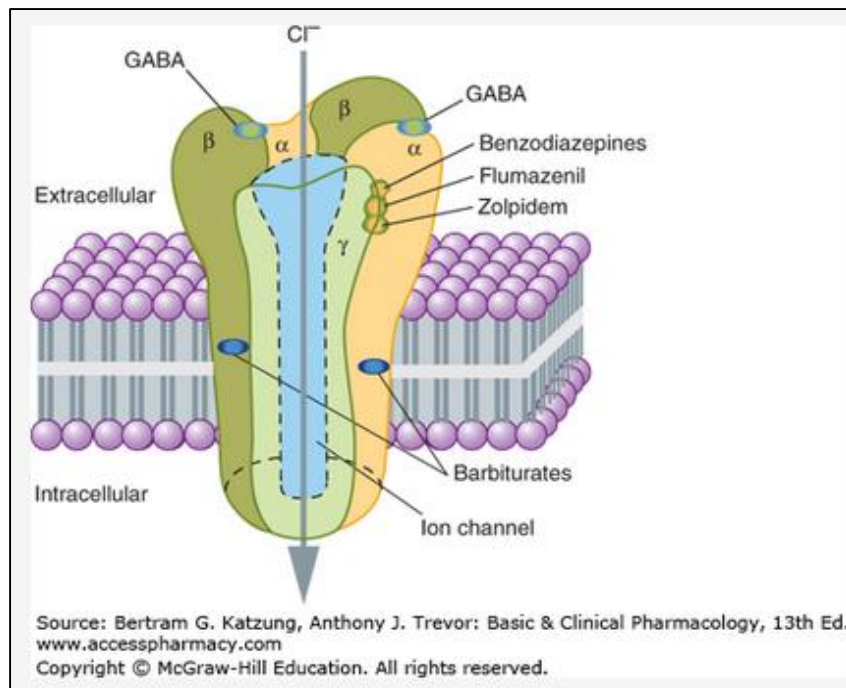
2.3.3 Proses Neurotransmitter GABA

Lokasi dalam proses sintesis dari GABA adalah ujung dari saraf presinaptik. Setelah di sintesis, GABA disimpan di dalam vesikel sebelum dilepaskan. Setelah GABA dilepaskan, GABA berdifusi diantara celah sinap dan akan berikatan pada reseptor sehingga memfasilitasi ion klorida untuk masuk ke dalam sel dan menyebabkan efek pada post-sinaptik. GABA yang telah berikatan dengan reseptor akan diambil kembali yang diikuti dengan tertutupnya kanal dari ion klorida. GABA akan di ambil kembali ke dalam presinaptik atau ke sel gial dalam bentuk GABA. Proses dari pengambilan kembali GABA dibantu dengan transporter GABA. Reseptor GABA_A memiliki tempat berikatan yaitu untuk obat golongan barbiturat dan benzodiazepin. Nama tempat berikatan untuk obat pada reseptor GABA_A adalah tempat berikatan barbiturat (*barbiturates binding site*) dan tempat berikatan benzodiazepin (*benzodiazepine binding site*). Selain tempat berikatan tersebut, reseptor GABA_A juga memiliki sisi alosterik dari reseptor. Efek agonis akan terjadi bila suatu obat berinteraksi atau berikatan dengan sisi alosterik dari reseptor GABA_A. Terbukanya kanal klorida disebabkan dari neurotransmitter dari GABA dan menyebabkan induksi hiperpolarisasi yang menghambat penghantaran dari aksi potensial. Proses yang telah dijelaskan menyebabkan efek dari sedasi dan anestesi. Benzodiazepin yang berikatan pada reseptor GABA_A menimbulkan efek penghambatan transmisi sinaptik. Golongan obat ini meningkatkan afinitas dari reseptor GABA pada tempat ikatannya. Dengan demikian meningkatkan frekuensi dari pembukaan kanal ion klorida dan memberi kesempatan ion klorida untuk mengalir masuk. Ion klorida yang

masuk ke dalam post-sinaptik memberikan efek depresi pada sistem saraf pusat (Fukuchi & Tsuda, 2015).

2.3.4 Molekular Farmakologi GABA_A Reseptor

Benzodiazepin, barbiturat, zolpidem, zaleplon, eszopiclon dan obat lainnya terikat pada komponen molekul reseptor GABA_A di membran neuron yang terdapat di sistem saraf pusat. Reseptor GABA_A berfungsi sebagai kanal ion klorida yang diaktivasi oleh neurotransmitter inhibisi yaitu GABA (Katzung & Trevor, 2015).



Gambar 6. Struktur Pentametrik Reseptor GABA_A (Katzung & Trevor, 2015)

Terdapat banyak reseptor isoform dari reseptor GABA_A. Namun, reseptor GABA_A yang paling sering ditemukan di berbagai regio di otak terdiri atas dua sub-unit α1, dua sub-unit β2 dan satu sub-unit γ2. Pada bentuk reseptor ini, terdapat dua tempat berikatnya GABA yaitu terdapat di

antara sub-unit $\alpha 1$ dan $\beta 2$ dan tempat terikatnya benzodiazepin yaitu diantara sub-unit $\alpha 1$ dan $\gamma 2$. Reseptor $GABA_A$ di area lain dari sistem saraf pusat terdiri dari berbagai kombinasi sub-unit yang bervariasi. Benzodiazepin berikatan pada reseptor tersebut termasuk dalam reseptor dengan isoform yang terdiri dari sub-unit $\alpha 2$, $\alpha 3$, dan $\alpha 5$. Barbiturat juga berikatan dengan berbagai isoform dari reseptor $GABA_A$ namun pada tempat berikatan yang berbeda dari benzodiazepin. Obat seperti zolpidem, zaleplon dan eszopiclone berikat secara selektif hanya pada isoform reseptor $GABA_A$ yang terdapat di sub-unit $\alpha 1$. Variasi dari reseptor $GABA_A$ menyebabkan terdapatnya berbagai macam cara kerja farmakologi dari benzodiazepin dan obat lainnya terhadap reseptor GABA. Benzodiazepin dan obat sedatif-hipnotis mempunyai afinitas yang rendah terhadap reseptor $GABA_B$ (Rang, 2016).

2.3.5 Neurofarmakologi

GABA adalah neurotransmitter inhibitor utama di sistem saraf pusat. Studi elektrofisiologi menemukan bahwa benzodiazepin mempunyai efek GABA inhibisi pada semua level dari neuraxis yaitu pada saraf tulang belakang, hipotalamus, hipokampus, substansia nigra, korteks serebelar dan koreks serebral. Benzodiazepin meningkatkan efisiensi dari efek GABA inhibisi pada celah sinaptik. Benzodiazepin tidak menggantikan GABA tetapi meningkatkan efek GABA secara allosterik tanpa langsung mengaktifkan reseptor $GABA_A$ atau membuka kanal klorida. Peningkatan konduktansi dari ion klorida yang disebabkan oleh interaksi benzodiazepin dengan GABA memberikan efek dalam meningkatkan frekuensi dalam pembukaan kanal.

Barbiturat juga mempunyai efek pada cara kerja dari GABA pada berbagai bagian dari sistem saraf pusat. Cara kerja dari barbiturat dan benzodiazepin berbeda, yaitu barbiturat bekerja dengan meningkatkan durasi dari pembukaan kanal klorida dari reseptor GABA. Pada konsentrasi barbiturat yang tinggi, barbiturat dapat menggantikan GABA (*GABA-mimetic*) yaitu dapat secara langsung mengaktifkan kanal klorida. Proses dari kerja ini dapat berlangsung pada tempat berikatan dari benzodiazepin maupun tempat berikatan lainnya. Kerja dari barbiturat kurang selektif dibanding dengan benzodiazepin karena barbiturat juga menekan kerja dari neurotransmitter eksitasi asam glutamat dengan mengikat reseptor AMPA. Barbiturat juga memberikan efek terhadap membran nonsinaptik yang berkerja secara paralel pada saat memberikan efek terhadap transmisi neuron GABA dan glutamat. Barbiturat yang dapat berkerja pada beberapa tempat menjadi dasar untuk menjadi obat induksi utama pada anestesi umum untuk tindakan pembedahan. Barbiturat memberikan penekanan yang lebih terhadap efek pusat depresi dibandingkan dengan benzodiazepin (Rang, 2016).

2.3.6 Tempat Berikatan dari Ligand Benzodiazepin

Komponen dari reseptor GABA_A adalah makro molekul kanal ion klorida yang berfungsi sebagai tempat berikatan dari benzodiazepin. Tiga tipe dari interaksi reseptor ligand benzodiazepin sebagai berikut: (Rang, 2016)

1. Agonis

Jenis interaksi dari agonis memfasilitasi aksi dari GABA. Interaksi ini terjadi pada berbagai tempat pelekatan dari benzodiazepin. Seperti

yang telah dijelaskan diatas bahwa non-benzodiazepin seperti zolpidem, zaleplon dan eszopiclone adalah agonis selektif di tempat berikatan dari benzodiazepin yang memiliki sub-unit $\alpha 1$. Telah diusulkan tempat berikatan dari benzodiazepin terhadap endogenous ligan karena bahan kimia dengan karakteristik seperti benzodiazepin telah diisolasikan dari jaringan otak hewan yang belum pernah terpapar oleh obat-obat tersebut. Molekul dari non-benzodiazepin telah terdeteksi mempunyai afinitas terhadap tempat berikatan benzodiazepin pada reseptor $GABA_A$ di otak manusia.

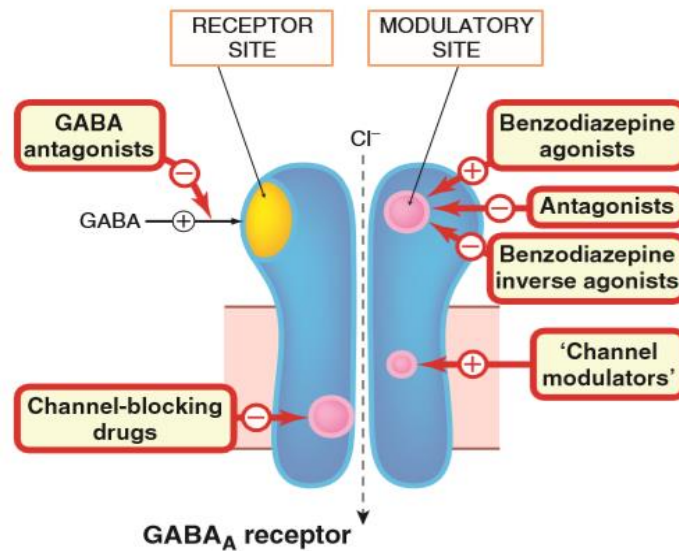
2. Antagonis

Interaksi dari antagonis ditandai dengan turunan dari sintetik benzodiazepin yaitu flumazenil yang menghambat kerja dari aksi benzodiazepin, eszopiclone, zaleplon, zolpidem, namun tidak memberikan efek antagonis pada aksi barbiturat, memprobamate atau ethanol. Pada endogenous neuropeptida tertentu juga mempunyai kemampuan untuk menghambat interaksi dari benzodiazepin terhadap tempat berikatan benzodiazepin.

3. *Inverse* agonis

Interaksi tipe *inverse* agonis bekerja sebagai modulator dari negatif alosterik pada fungsi reseptor GABA. Interaksi oleh benzodiazepin pada reseptor $GABA_A$ dapat menyebabkan ansietas dan kejang. Selain cara kerja secara langsung tersebut, molekul tersebut dapat menghambat efek dari benzodiazepin. Sistem fisiologi dari fungsi modulator endogenous dari GABA di sistem saraf pusat masih tidak jelas. Hingga saat ini, belum dinyatakan bahwa endogenous ligan di tempat perikatan dari benzodiazepin berperan dalam kontrol terhadap

ansietas, pola tidur atau berbagai karakteristik ekspresi dari fungsi sistem saraf pusat.



Gambar 7. Tempat Ikatan Benzodiazepin Terhadap Reseptor GABA_A (Rang, 2016)

2.4 Reseptor GABA_A

2.4.1 Reseptor

Reseptor GABA_A adalah reseptor neurotransmitter inhibitor yang utama pada otak mamalia. Setiap isoform dari reseptor tersebut terdiri atas lima homogenus atau sub-unit yang identikal terletak di sekitar sentral selektif kanal ion klorida yang dikontrol oleh GABA. Jumlah dari isoform yang pasti hingga saat ini masih belum diketahui. Reseptor GABA_A terletak di post-sinaptik membran yang memediasi antara inhibisi neuron yang terjadi pada kisaran waktu milidetik. Reseptor yang terdapat di ekstra-sinaptik membran memberi respon atas GABA dan efek inhibisi yang jangka panjang. Reseptor GABA_A merespon terhadap varietas obat yang sangat luas seperti benzodiazepin, yang sering digunakan sebagai obat

sedatif atau hipnotik dan efek ansiolitik (Schofield, Darlison, Fujita, Burt, & Stephenson, 1987).

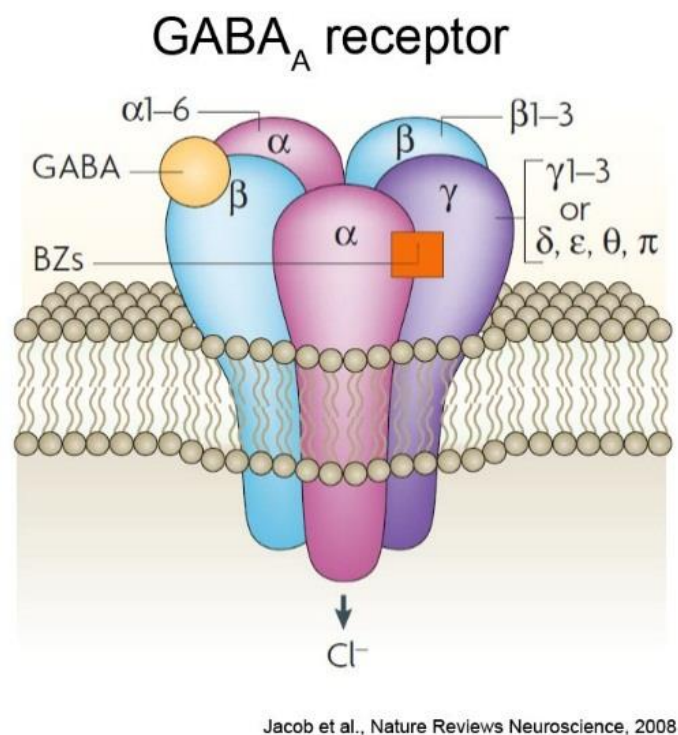
Menurut Schofield, neurotransmitter yang terikat memberikan efek transmisi sinaptik yang cepat dan menyebabkan induksi dari pembukaan kanal di reseptor post-sinaptik. Dua inhibitor reseptor kanal ion adalah reseptor GABA_A dan reseptor glisin. Keduanya adalah selektif anion reseptor. Reseptor GABA_A dari benzodiazepin terdiri atas sub-unit α dan β dan terdapat dokumentasi homologus dari dua sub-unit tersebut dengan yang terdapat di reseptor asetilkolin dan reseptor glisin. Perbedaan dari reseptor GABA_A dengan member lain dari reseptor *Cys loop family* adalah reseptor GABA_A terdapat berbagai farmakologi dari obat yang berikatan dengan reseptor dan natural toksin yang menjadikan reseptor GABA_A menjadi target sangat jarang dibanding dengan kanal protein yang lain. Reseptor GABA_B adalah reseptor *G-protein-coupled* yang memiliki perbedaan secara struktur, fungsi dan sekuensi dari reseptor GABA_A. Reseptor GABA_C adalah salah satu bentuk isoform reseptor GABA_A (Schofield, et al., 1987 ; Sigel, et al., 2012).

Struktur dari reseptor GABA_A sama dengan struktur yang dimiliki oleh famili dari *Cys-loop-type* reseptor kanal ion. Properti unik dari reseptor GABA_A yang membedakannya dengan anggota keluarga ini adalah aktivasi dari GABA ligan. Sekuen asam amino dari satu sub-unit tidak dapat digunakan untuk identifikasi dari tipe ligan dan selektivitas dari kanal ion namun dapat membantu membedakan antara selektif kanal kation atau anion.

Secara keseluruhan reseptor GABA_A adalah protein pentametrik yang terdiri atas sub-unit yang berbeda. Setiap sub-unit mempunyai

karakteristik sekuensi, level ekspresi dan lokasi di neuron yang berbeda. Masih tidak terdapat teori yang jelas bagaimana kolaborasi bersama dari sub-unit untuk membentuk struktur dari reseptor pentametrik.

Agonis dari reseptor GABA_A secara umum disebut GABA (*Gamma-Aminobutyric Acid*). Pada kondisi fisiologis, bentuk asam dari neurotransmitter jarang, oleh karena itu nama dari neurotransmitter itu disebut *γ-aminobutyrate* (Sigel & Steinmann, 2012).



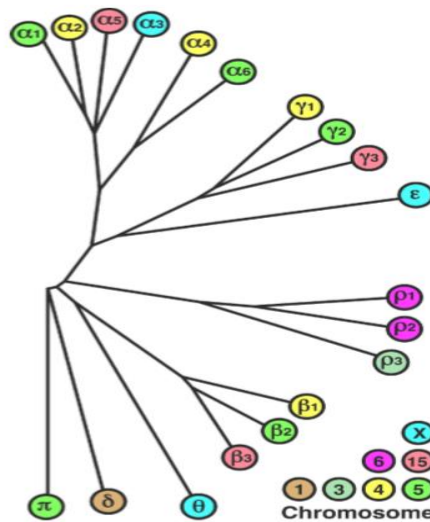
Gambar 8. Reseptor GABA_A dan Sub-Unitnya (Jacob, Moss, & Jurd, 2008)

2.4.2 Organisasi Gen

Menurut Simon J. Wakimoto, reseptor GABA_A adalah member dari *Cys loop ligand-gated ion channel superfamily*. Anggota lain dari keluarga ini adalah reseptor nikotinik asetilkolin, reseptor glisin, reseptor ionotropik 5-HT₃, kanal ion Zn²⁺ yang teraktivasi dan tiga reseptor baru yang

terkristalisasi adalah kanal *glutamate-gated chloride* *Caenorhabditis elegans* dan dua reseptor bakterial GLIC (*Gloebacter violaceus ligand-gated ion channel*) dan ELIC (*Erwinia chrysanthemi ligand-gated ion channel*). Semua member eukariotik dari *Cys loop family* memiliki kesamaan yaitu terdapat residu dari dua sistein yang dipisahkan oleh 13 residu asam amino (Simon, Wakimoto, Fujita, Lalande, & Barnard, 2004).

Struktur yang kompleks pada reseptor GABA_A memberikan fakta bahwa terdapat beberapa sub-unit yang terdapat pada reseptor. Pada manusia terdapat 6 α sub-unit, 3 β sub-unit, 3 γ sub-unit (blok bangunan dari reseptor GABA_c) dan 1 dari tiap ϵ , δ , θ , dan sub-unit Π . Didalam keluarga dari sub-unit terdapat sekitar 70% rangkaian yang telah teridentifikasi dan diantara anggota keluarga yang berbeda telah ditemukan 20% rangkaian atau terdapat kesamaan dari 50% rangkaian. Gen sub-unit dari reseptor GABA_A menunjukkan terdapat pola dasar dari sembilan koding akson dan delapan intron dengan dua pengecualian yaitu δ mempunyai delapan ekson dan γ_3 terdapat 10 ekson. Pada beberapa sub-unit terdapat beberapa variasi namun perbedaan fungsi atau fisiologi dari variasi tersebut belum sepenuhnya ditemukan (Simon, et al., 2004 ; Wu, et al., 2004).



Gambar 9. Analisis *phylogenetic tree* dari 19 Gen yang Terkode untuk Sub-Unit Reseptor GABA_A (Sigel & Steinmann, 2012)

Mayoritas dari koding gen pada sub-unit reseptor GABA_A disusun menjadi empat kluster pada kromosom 4, 5, 15 dan X pada genom manusia. Kluster dari gen tersebut diasumsikan berkontribusi terhadap ekspresi dari gen. Dua kluster dari tiap grup pada empat gen yaitu α_2 , α_4 , β_1 dan γ_1 terdapat pada kromosom 4 dan α_1 , α_6 , β_2 dan γ_2 pada kromosom 5 dan terdapat dua kluster yang memiliki tiga gen yaitu α_5 , β_3 dan γ_3 pada kromosom 15 dan α_3 , ϵ , dan θ pada kromosom X. Kesamaan dari semua kluster yaitu terdapat sub-unit β yang menunjukkan orientasi dari proses transkripsi yang terbalik. Dari analisa *phylogenetic tree* dapat di simpulkan bahwa sub-unit ϵ adalah “ γ -like” dan subnit θ adalah “ β -like”. Dengan fakta tersebut, telah diasumsikan bahwa semua empat kluster berkembang dari kluster yang mempunyai sub-unit α -like, β -like dan γ -like (Darlison, Pahal, & Thode, 2005).

2.4.3 Struktur dari Reseptor GABA_A

Menurut penelitian Ernst M. Bauchard, reseptor GABA_A adalah sebuah protein yang memiliki banyak sub-unit. Sub-unit yang matur mempunyai panjang residu asam amino sekitar 450 dan terdapat kesamaan organisasi topologikal, dapat dilihat pada **Gambar 7**. Hampir setengah dari sub-unit mempunyai domain ekstraselular N-terminal hidrophilik yang terdiri dari *Cys loop* dan empat urutan transmembran (M1-M4). Diantara M3 dan M4 terdapat intraselular loop besar yang terlibat dalam proses modulasi yaitu proses fosforilasi. Terdapat beberapa protein yang didapatkan mempunyai interaksi dengan intraselular loop yang terdapat diantara M3 dan M4 dari sub-unit spesifik reseptor GABA_A. Protein tersebut mempunyai peranan yang penting dalam reseptor *trafficking* dan *anchoring* di sitoskeleton dan membran post-sinaptik. Terminal N dan C dari sub-unit terdapat pada ekstraselular (Ernst, Brauchart, Boesch, & Sieghart, 2003).

Dalam teori, reseptor GABA_A dalam jumlah yang banyak dapat ditemukan dalam satu sel dan pada beberapa kasus tertentu ditemukan lebih dari delapan isoform sub-unit telah ditemukan berekspresi di satu sel. Proses dari RNA *splicing* dan edit berkontribusi dalam diversitas dari reseptor. Isoform dewasa utama secara umum terdiri atas sub-unit α_1 , β_2 dan γ_2 . Terdapat ketidakpastian yang cukup besar mengenai beberapa isoform dari reseptor GABA_A yang terdapat dalam alam. Lima sub-unit yang telah terpilih dari 19 isoform membentuk kompleks dan mengelilingi sentral kanal ion dengan kelima segment dari M2 yang berkontribusi terhadap kanal. Walaupun terdapat sub-unit yang sama berkontribusi

dalam proses formasi dari kanal, namun sub-unit tersebut tersusun secara berbeda. Sub-unit α , β dan γ terjadi kombinasi yang membentuk susunan sub-unit yang tertentu. Fungsi dari reseptor bergantung terhadap komposisi dari sub-unit dan susunannya. Terdapat 30 kemungkinan untuk membentuk reseptor pentametrik dari tiga sub-unit yang berbeda. Kesimpulan dari beberapa studi yang telah dilakukan adalah isoform sub-unit utama terdiri dari sub-unit α_1 , β_2 dan γ_2 yang tersusun $\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2\alpha_1$ *counterclockwise* mengelilingi poros sentral seperti yang terlihat dari eksterior sel.

Bentuk dua dimensi kristal dari reseptor nikotinik asetilkolin dengan resolusi 4 Å dalam bagian membran memberikan konsep secara umum mengenai struktur dari reseptor *Cys loop*. Beberapa bakteri dari reseptor *Cys loop* yang mengalami kristalisasi memiliki derajat homogi terhadap reseptor GABA_A yang rendah. Asetilkolin berikatan dengan protein homologus terhadap terminal-N pada bagian ekstraselular dari reseptor nikotinik asetilkolin telah terkristal. Reseptor GABA_A mempunyai struktur yang sama atau memiliki beberapa kesamaan dengan susunan homogi dari semua protein yang telah terkristal. Struktur kristal dari asetilkolin berikatan dengan protein menginduksi tahap awal dari modeling homologi. Susunan dari dua protein tersebut yang teridentifikasi hanya sekitar 19% dan sebagian besar terdiri atas struktur *loop* yang susah untuk di model (Ernst, Brauchart, Boresch, & Sieghart, 2003).

2.4.4 Lokasi Selular

Lokasi sub-unit reseptor GABA_A pada mencit terdapat pada sistem saraf pusat di level protein, dan ditemukan dengan menggunakan antibodi

dari sub-unit spesifik. Beberapa sub-unit memiliki ekspresi yang luas di seluruh sistem saraf pusat. Sub-unit yang lain mempunyai ekspresi yang terbatas seperti sub-unit yang hanya terekskpresi di satu tipe sel yaitu sel granul serebral. Contoh lain yang distribusinya terbatas adalah sub-unit ρ yang terekskpresi terutama pada retina. Selain pada sistem saraf pusat, reseptor GABA_A dapat ditemukan pada hati, otot halus jalur pernafasan di paru dan di beberapa tipe dari sel imun (Sigel & Steinmann, 2012).

2.4.5 Lokasi Subselular

Reseptor GABA_A terdapat pada post-sinaptik di otak. Transmisi sinaptik menginduksi pelepasan dari GABA dan menyebabkan pembukaan kanal reseptor GABA_A klorida, dengan demikian membuat sedikit peningkatan terhadap konduksi dari anion, yang hasil dari proses tersebut adalah hiperpolarisasi dari membran yang telah depolarisasi. Proses ini disebut sebagai fase inhibisi.

Reseptor GABA_A dapat juga ditemukan pada ekstra-sinaptik dan menyebabkan proses yang disebut sebagai tonik inhibisi. GABA dengan konsentrasi yang rendah dapat membuka reseptor dengan periode yang lebih panjang (Sigel & Steinmann, 2012).

2.4.6 Konduksi Ion

Secara umum reseptor GABA_A adalah kanal selektif *GABA-gated anion* untuk ion klorida dengan permeabilitas terhadap anion bikarbonat. Neurotransmitter eksitasi meningkatkan konduksi kation untuk depolarisasi membran sedangkan neurotransmitter inhibitorik meningkatkan konduksi anion untuk hiperpolarisasi dari membran. Jika gradien dari ion klorida

berkurang karena terjadi *down-regulation* dari KCC2 transporter ion klorida, reseptor GABA_A akan terbuka akan menyebabkan fluks keluar dari anion yang akan menginduksi proses dari depolarisasi membran dan hasilnya adalah eksitasi. Proses ini terlibat dalam nyeri neuropatik. Pada awal perkembangan dan subkompartemen dari neuron, GABA menyebabkan proses dari eksitasi (Schofield, et al., 1987 ; Sigel, et al., 2012).

2.4.7 Mekanisme

Mekanisme pada reseptor GABA_A akan lebih membahas mengenai sub-unit dari isoform yang utama yaitu α , β , γ . Pada tahap pertama, GABA agonis akan berikatan kepada dua tempat berikatan yang terletak pada α/β yang telah menunjukkan perbedaan afinitas terhadap pembukaan dari kanal. Setelah terjadi perikatan, perubahan konformasi akan terjadi yang menyebabkan agonis GABA akan terkunci dalam daerah berikatan. Protein akan mengubah konformasi dan masuk ke satu atau beberapa keadaan tertutup. Perubahan konformasi selanjutnya menginduksi pembukaan *ion pore*.

Residu dari asam amino disebut sebagai proyek *F-loop* dari tempat agonis terhadap kanal ion. Pada sub-unit α , loop ini telah berperan dalam proses dan pada sub-unit γ , loop berkerja dengan benzodiazepin dalam memodulasi kanal. Regio kedua yang berperan dalam pagar kanal adalah loop pendek yang terdapat diantara M2 dan M3. Residu dari lisin yang terdapat pada lokasi ini ditemukan teori bahwa terdapat formasi jembatan garam saat proses berhubungan dengan pagar dan saat terbentuknya jembatan S-S setelah terjadi proses mutasi dari kedua residu tersebut.

Regio ketiga diperkirakan terdapat diantara rantai β_4 - β_5 dari sub-unit β . Masuknya glisin residu menyebabkan reduksi dari potensi pengaruh GABA terhadap pagar kanal. Sebagian besar dari reseptor protein berperan dalam perubahan konformasi dalam proses pagar kanal (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005).

2.4.8 Modulasi Reseptor GABA_A

Reseptor GABA_A dimodulasi dengan modifikasi post-translasi. Pada beberapa protein kinase telah terbukti dengan proses fosforilasi di reseptor sub-unit yang spesifik dengan residu asam amino menyebabkan modulasi dari aktivitas dari kanal tersebut. Modifikasi ini memberikan efek terhadap stabilitas dari permukaan. Selain dari modifikasi secara kovalen, beberapa reseptor yang berhubungan dengan protein terkait dengan proses ini.

Reseptor GABA_A dimodulasi oleh dua molekul endogenus dan mencakup molekul kecil dari eksogenus yang luas. Hipotesis mengenai reseptor GABA_A adalah reseptor tersebut di modulasi oleh banyak campuran molekul, oleh karena itu menyebabkan terdapat banyak rongga di membran yang merupakan tempat dari bagian reseptor. Contoh dari modulator adalah benzodiazepin dan obat lainnya yang berkerja pada tempat yang sama adalah barbiturat, etomidate dan kompetitif antagonis yaitu bicucullin dan bloker kanal picrotoxin. Komposisi dan susunan dari sub-unit menentukan selektivitas dari obat. Kelas pertama dari modulator endogenus yang pertama kali ditemukan adalah neurosteroid. Unsur ini berikatan secara allosterik dan memodulasi pembukaan kanal, selain itu pada konsentrasi yang tinggi berkerja sebagai kanal agnois. Kedua dari

fungsi terjadi secara molekular pada transmembran dari regio sub-unit α dan β . Beberapa sub-unit δ yang terdapat isoform reseptor GABA_A bergantung pada kehadiran dari neurosteroid untuk dapat berikatan dengan GABA. Sub-unit γ yang mempunyai reseptor juga dipengaruhi oleh hal yang sama. Hipotesis mengenai hubungan variasi dalam level steroid pada saat masa menstruasi dari perempuan dengan reduksi kepekaan dari ansietas dan kejang oleh tempat berikatan dari neurosteroid telah dipertimbangkan. *Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol* telah diketahui mempunyai modulasi efek positif terhadap reseptor GABA_A dengan sub-unit β_2 pada tempat berikatan yang terdapat di M4. Hingga saat ini terdapat sedikit informasi mengenai fisiologi dari proses modulasi tersebut. Walaupun telah dilakukan pencarian secara intensif, belum ditemukan modulator endogenus yang berkeja pada tempat berikatan dengan benzodiazepin. Contoh dari modulator eksogenus yaitu benzodiazepin. Benzodiazepin mempunyai afinitas yang tinggi terhadap tempat berikatan yang terletak di sub-unit α/γ . Benzodiazepin klasik seperti valium merupakan modulator allosterik yang memberikan respon positif terhadap GABA. Benzodiazepin tidak membuka kanalanya dengan sendirinya namun mengalami perubahan konformasi di reseptor akibat dari afinitas berikatan yang tinggi oleh benzodiazepin pada tempat berikatannya. Ikatan tersebut meningkatkan afinitas dari pagar kanal oleh GABA ataupun dari tempat berikatan dari agonis lainnya. Hasil dari proses ini adalah GABA yang menghasilkan arus maksimal tetap tidak berpengaruh dan konsentrasi GABA untuk membuka kanal bergeser ke arah konsentrasi GABA yang lebih rendah. Benzodiazepin klasik disebut juga sebagai benzodiazepin agonis. Benzodiazepin agonis dapat menginduksi pembukaan kanal hanya

dengan efikasi yang rendah. Terdapat senyawa yang berkompetisi dengan benzodiazepin untuk menempati tempat berikatan di membran namun hal tersebut tidak dependen terhadap konsentrasi GABA. Ada beberapa senyawa yang berkompetisi dengan GABA dan menyebabkan konsentrasi GABA bergeser ke kanan yaitu modulator allosterik negatif yang disebut benzodiazepin agonis terbaik.

Modulador eksogenus lainnya adalah etanol. Konsentrasi etanol yang tinggi dapat memodulasi fungsi dari banyak protein membran termasuk reseptor GABA_A (Sigel, et al., 2012 ; Khom, et al., 2005).

2.4.9 Fungsi dari Individual Reseptor

Membahas mengenai jumlah reseptor GABA_A yang diekspresikan oleh otak manusia, komposisi dari sub-unit, dan susunan dari sub-unit, maka kita hanya dapat berspekulasi. Eksperimen yang telah dilakukan hanya terbatas pada fungsi dari isoform reseptor sub-unit. Percobaan dengan mencit yang mendapat mutasi point pada α_1 H101R (dan mutasi homologus di α_2 , α_3 , dan α_5) memberikan tempat berikatan untuk benzodiazepin pada sub-unit α atau γ yang sensitif pada obat tersebut. Pada percobaan mengenai tingkah laku dan tidak adanya efek benzodiazepin terhadap hewan percobaan yang terkena mutasi. Di percobaan yang dilakukan sub-unit α_1 dikaitkan dengan sedasi, sub-unit $\alpha_{2/3}$ dengan ansietas, dan sub-unit α_5 dengan memori temporal dan spasial (Darlison, Pahal, & Thode, 2005).

2.5 Gen GABRB3

Gen GABRB3 adalah gen yang mengkodekan protein *Gamma-aminobutyric acid receptor sub-unit beta-3*, salah satu sub-kanal klorida pada reseptor GABA pada manusia.

2.5.1 Fungsi

Gen GABRB3 memberikan kode untuk anggota dari kanal ligan ion pagar. Protein dari gen GABRB3 adalah satu dari 13 sub-unit dari multi sub-unit kanal klorida yang menjadi reseptor GABA, transmitter inhibitor utama dari sistem saraf. Gen ini terletak pada lengan panjang kromosom 15 di dalam kluster yang sama dengan 2 gen lainnya yang mengkodekan sub-unit yang berhubungan dengan famili ini. Struktur dari gen GABRB3 adalah kristal dengan homopentamer $\beta 3$. Mutasi dari GABRB3 mengakibatkan patogenesis dari berbagai kelainan yaitu Sindrom Angelman, Sindrom Prader-Willi dan autisme. Defisiensi gen GABRB3 pada mencit telah diusulkan menjadi model dari kelainan pada autisme.

Reseptor GABA adalah famili protein yang terlibat dalam neurotransmitter GABA-nergik dari sistem saraf pusat mamalia. GABRB3 adalah anggota dari gen famili reseptor GABA_A yang mempunyai struktur heterometrik pentamerik kanal ligan pagar ion yang dimana tempat berkerja dari GABA. Reseptor GABA_A adalah tempat aksi dari berbagai macam farmakologi obat yang penting termasuk barbiturat, benzodiazepin dan etanol (Khom, et al., 2005 ; Kniffin, 2016).

2.5.2 Kloning dan Ekspresi

Wagstaff et al. pada tahun 1991 telah mengisolasi reseptor GABA_A sub-unit beta 3 cDNA dari otak manusia. Komparasi antara sub-unit beta-3 sekuensi asam amino dan sekuensi beta-3 dari mencit, sapi dan ayam menunjukkan terdapat evolusi konservasi tingkat yang tinggi. Sebagian besar perbedaan sekuensi antara spesies terdapat di kluster dekat terminal C dari domain besar intraselular protein. (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005)

2.5.3 Struktur Gen

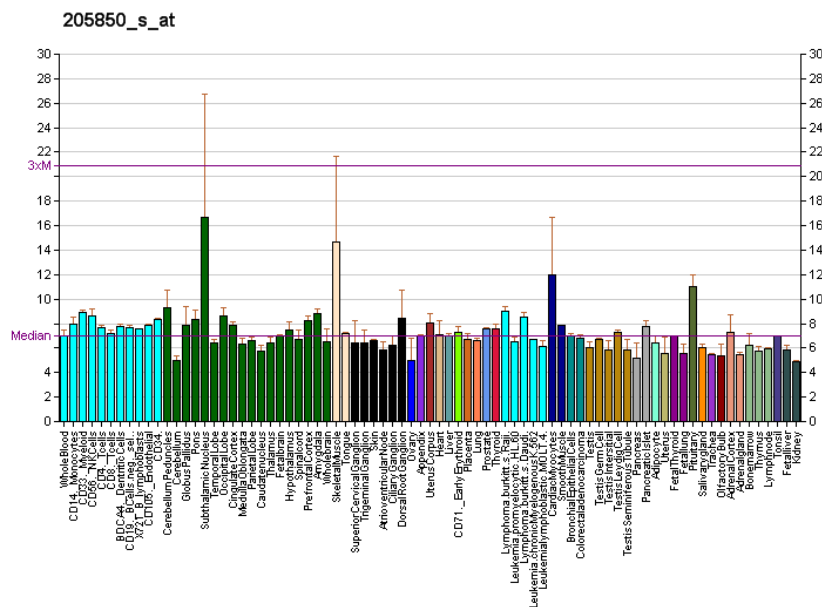
Gen GABRB3 mempunyai 10 ekson termasuk didalamnya adalah 2 alternatif ekson pertama yang mengkodekan signal peptida dan spans 250 kb (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005).

2.5.4 Karakteristik Biokimia

Miller dan Aricesu mendeskripsikan reseptor GABA_A dengan bentuk struktur 3 dimensional dengan beta-3 homopentamer pada manusia dan di 3-angstrom revolusi (Miller & Aricescu, 2014). Struktur ini menampilkan arsitektural elemen yang unik terhadap reseptor eukaryotik loop sistein yang menjelaskan mengenai terjadinya konsekuensi mekanistik yang menyebabkan beberapa mutasi penyakit genetik pada manusia dan menunjukkan peran struktur yang tidak terduga untuk melindungi glikan rantai N. Reseptor yang terkristalisasi berikatan dengan agonis sebelumnya yang tidak diketahui, benzamidin, membuka jalan untuk modulator reseptor GABA_A (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005).

2.5.5 Peta Gen

Wagstaff et al. menunjukkan peta dari GABRB3 terhadap regio 15q yang terjadi pada sindrom Angelman dan sindrom Prader-Willi. Delesi genetik ditemukan pada kedua tipe pasien dengan delesi intersital sitogenetik. Pada pasien sindrom Angelman ditemukan delesi gen yang menyebabkan ketidakseimbangan antara 13;15 translokasi dan pada pasien sindrom Prader-Willi ketidakseimbangan ditemukan pada translokasi 9;15. Wagstaff mengusulkan bahwa reseptor gen dapat berperan dalam patogenesis dalam salah satu atau kedua sindrom tersebut. Gen GABRB3 adalah gen pertama yang mengalami pemetaan pada regio ini. Gen yang berlokasi di kromosom 7 pada mencit memperlihatkan kaitan yang sangat erat dengan 2 gen lainnya yang terdapat pada manusia yang terdapat di regio 15q11-q13 dalam pemetaan gen (Wagstaff, Knoll, Fleming, & Kirkness, 1991).



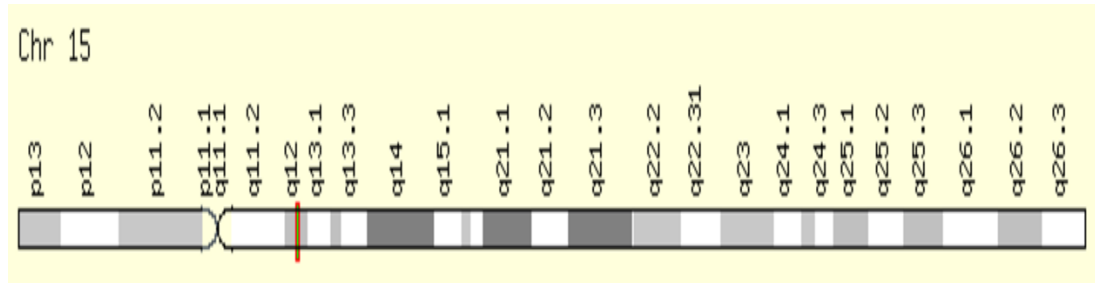
Gambar 10. Pola Ekspresi Gen GABRB3 (biogps.org)

Dengan menggunakan teknik gabungan *field-inversion gel electrophoresis* (FIGE) dan skrining *phage genomic library* dapat membangun resolusi tinggi peta fisik yang meliputi hampir 1.0 Mb di regio proksimal 15q. Dalam peta memperlihatkan bahwa GABRB3 dan GABRA5 (sub-unit gen *gamma-Aminobutyric acid receptor alpha -5*) yang dipisahkan oleh kurang dari 100 kb dan disusun dengan konfigurasi *head-to head*. GABRB3 meliputi kurang lebih 250 kb, sedangkan GABRA5 terdapat sekitar 70 kb. Perbedaan dalam ukuran disebabkan sebagian besar oleh intron 150 kb dalam GABRB3. Penataan kembali kromosom pada 2 pasien dengan sindrom Angelman yang terdapat pada sebagian besar GABRB3 intron. Pada tahun 1994 Russek dan Farb menyatakan bahwa kode gen terhadap gamma-3 form pada reseptor GABA_A terletak pada 15q11-q13 di kluster GABRA5 dan GABRB3 (Khom, et al., 2005 ; Wagstaff, et al., 1991).

2.5.6 Fungsi Gen

Mempelajari perikatan otak dengan flumazenil dengan *positron emission tomography* (PET) pada 4 pasien dengan sindrom Angelman. Pasien 1, 2 dan 3 terdapat delesi maternal 15q11-q13 yang menyebabkan kehilangan dari gen GABRB3 sedangkan pasien ke-4 ditemukan mutasi pada *ubiquitin protein ligase* (UBE3A) dan tidak terdapat mutasi pada gen GABRB3. Potensi perikatan oleh flumazenil yang terjadi di frontal, pariental, hipokampus dan regio serebellar secara signifikan lebih rendah di pasien 1, 2 dan 3 di bandingkan dengan pasien 4. Delesi menyebabkan berkurangnya jumlah dari reseptor GABRB3 yang secara partial dapat

menjelaskan mengenai defisit neurologik di pasien dengan sindrom Angelman.



Gambar 11. Lokasi Genomik Gen GABRB3 Pada Lengan Kromosom 15 (genecards.org)

Ion seng meregulasi reseptor GABA_A dengan cara menghambat fungsi reseptor secara allosterik yang dependen terhadap komposisi dari reseptor sub-unit. Terdapat 3 tempat yang digunakan untuk memediasi proses inhibisi oleh seng yaitu satu terletak di dalam kanal ion dan terdiri dari sub-unit beta-3 his267 dan glu270 dan 2 lainnya terletak dibagian eksternal dari reseptor N-terminal dan membutuhkan koordinasi dari sub-unit alpha 1 glu137 dan his151 dan beta-3 glu182. Karakteristik dari reseptor GABA_A yang memiliki sensitivitas seng yang rendah adalah terdapat sub-unit gamma-2 yang disebabkan oleh gangguan pada 2 dari 3 tempat setelah terjadinya tersusunnya sub-unit (Khom, et al., 2005 ; Wagstaff, et al., 1991).

2.5.7 Epigenetik

Dengan menggunakan kode SNPs di kluster gen reseptor GABA pada kromosom 15q11-q13 dapat mendemonstrasikan bahwa dari 21 *postmortem* dari sampel otak manusia terdapat gen GABRG3, GABRB3 dan GABRA5 yang terekspresikan di korteks serebral (Hogart, Nagarajan,

Patzel, & Yasui, 2006). Sedangkan pada mencit, gen GABRB3 ditranskripsikan secara sama pada kromosom 7 dari kromosom maternal atau paternal dan Nichollas et al. pada tahun 1993 menyimpulkan bahwa ekspresi gen GABRB3 tidak terdapat pada otak dari mencit. Namun terdapat penelitian dari Meguro et al. pada tahun 1997 yang memiliki bukti yang berbeda dengan kesimpulan yang dinyatakan oleh Nichollas, dalam hasil percobaan oleh Meguro ditemukan ekspresi dari gen GABRB3 kromosom tunggal normal manusia kromosom 15 di kromosom paternal mencit A9 hibrid (Wagstaff, et al., 1991; Hogart, et al., 2006; Nicholls, et al., 1993).

Pada sampel otak *postmortem* 4 dari 8 pasien autisme dan 1 dari 5 pasien dengan sindrom Rett terdapat monoalelik atau ekspresi tinggi alelik yang miring dengan lebih dari satu gen GABRB3, GABRA5 atau GABRG3 yang berkorelasi dengan penurunan ekspresi dari GABRB3. Pada autisme dan sindrom Rett ditemukan disregulasi epigenetik dari gen GABRB3, GABRA5 atau GABRG3. Dari kromatin immunopresipitasi assay di sel neuroblastoma dan otak manusia normal menunjukkan MECP2 berikatan pada metilasi lokasi CpG pada tempat intronik di GABRB3, tapi tidak terdapat perbedaan dalam metilasi antara sampel autisme dan kontrol.

Dari studi replikasi DNA pada kromosom 15q11-q13 dengan fluoresensi *in situ* hibridasi terdapat replikasi yang tidak sinkron antara homolog pada sel orang normal dan pasien sindrom Prader-Willi dan pada pasien sindrom Angelman terdapat delesi kromosom 15 namun hal ini tidak terjadi pada pasien sindrom Prader-Willi dengan uniparental maternal disomi. Ditemukan pola berlawanan dari replikasi spesifik alel diantara

lokus homologus yaitu pada gen GABRB3 di awal paternal dan akhir maternal dan pada distal lokus GABRA5 di awal maternal dan akhir paternal (Nicholls, et al., 1993).

2.5.8 Sifat Genetik Molekular

A. Epilepsi Absens Anak

Pada epilepsi absens anak menunjukkan pola kompleks non-mendelian yang diturunkan. Skrining variasi GABRB3 pada 45 pasien anak dengan absens epilepsi telah dilakukan dan ditemukan 4 haplotipe diantara regio promoter dan intron 3. Tes dengan transmisi disequilibrium menunjukkan asosiasi penting dari regio tersebut dengan epilepsi absens pada anak. *Assay reporter gen* menunjukkan indikasi bahwa penyakit tersebut berasosiasi dengan promoter haplotipe 2 menyebabkan penurunan aktivitas dari transkripsi dibandingkan dengan promoter haplotipe 1 yang terjadi ekspresi berlebihan pada sampel kontrol. Dari analisis silico mengusulkan bahwa terdapat pertukaran T dengan C di haplotipe 2 yang menyebabkan rusaknya perikatan dari aktivator N-Oct-3 dari transkripsi spesifik neuron. Sedangkan dari tes pergeseran mobilitas elektroforesis menunjukkan respektif *polymorphism* mengurangi perikatan dari N-Oct-3. Ekspresi dari GABRB3 yang berkurang dapat menjadi salah satu penyebab yang menyebabkan terjadinya perkembangan dari epilepsi absens pada anak.

Ditemukan mutasi GABRB3 pada 3 heterozygous yang berbeda pada gen tersebut di 4 dari 48 keluarga dengan anak yang

menderita epilepsi absens. Beberapa dari pasien menderita kejang tonik klonik general, absens dan dengan kejang yang menghilang setelah umur 12 tahun. Beberapa mutasi karier tidak berpengaruh dalam kejadian ini dan memperlihatkan bahwa terdapat penetrasi yang tidak komplis dari gen GABRB3. Pasien dengan sindrom Angelman dan delesi dari GABRB3 menunjukkan terdapat kejang absens (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005).

B. Insomnia

Skrining SNPs gen reseptor GABA_A pada regio terhadap tempat berikatan ligan pada level protein terhadap alpha-1, beta-3 dan gamma-2 telah dilakukan pada 124 individual. Pada 1 pasien dengan insomnia kronik ditemukan mutasi arg192-to-his di gen GABRB3 pada keadaan heterozygous. Studi fungsi dari Buhr et al. menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan terjadinya insomnia bila terjadi penurunan inhibisi dari GABAergik (Buhr, 2002).

C. Bibir Sumbing Dengan atau Tanpa Celah Langit

Hubungan *disequilibrium* antara GABRB3 dan nonsindromik bibir sumbing dengan atau tanpa celah langit ditemukan. Scapoli et al. pada tahun 2002 menemukan dengan menghilangkan gen GABRB3 pada mencit menyebabkan bibir sumbing dengan celah langit sekunder. Sedangkan pada percobaan yang dilakukan pada Tanabe et al. pada tahun 2000 ditemukan bukti bahwa GABRB3 terlibat dalam kasus bibir sumbing di Jepang (Wagstaff, et al., 1991).

D. Autisme

Terdapat kelainan sitogenetik pada sindrom Prader-Willi atau sindrom Angelman pada regio kritikal yang telah di jelaskan sebelumnya di individual dengan autisme. Analisis asosiasi terhadap marker GARBRB3 yaitu 155CA-2 dengan menggunakan tes transmisi equilibrium dalam 80 keluarga dengan autisme telah di lakukan dan ditemukan bahwa terdapat 4 marker tambahan (69CA, 155CA-1, 85CA dan A55CA-1) terdapat dalam 10kb 155CA-2 yang juga dilakukan assay. Multialelik TDT (P kurang dari 0.002) dan TDT (P kurang dari 0.004) menunjukkan terdapat asosiasi kelainan autis. Gen kompleks reseptor GABA_A terdapat variasi genetik di 15q11-q13 yang berperan dalam kelainan autis.

Sindrom Rett yaitu kelainan dominan *X-linked* disebabkan oleh mutasi MECP dan sindrom Angelman adalah kelainan yang disebabkan oleh defisiensi UBE3A atau maternal 15q11-q13 yang mempunyai fenotip dan genetik yang sama dengan autisme. Hipotesis mengenai defisiensi MECP2 dapat berpengaruh terhadap level ekspresi dari UBE3A dan gen BABRB3. Beberapa cara kuantitatif mengungkapkan kelainan yang signifikan ekspresi UBE3A di 2 mencit dengan strain Mecp2-defisiensi yang berbeda dan di sampel otak untuk Rett, Angelman dan autisme yang dibandingkan dengan sampel kontrol. Meskipun tidak terdapat perbedaan pada ekspresi alel di beberapa transkrip cetak di sampel otak mencit Mecp2-null, namun terdapat penurunan secara signifikan dari ekspresi Ube3a sense diikuti dengan penurunan dari

protein. GABRB3 memperlihatkan penurunan ekspresi secara signifikan pada sampel otak dari multiple Rett, Angelman, autisme dan di menciit dengan defisiensi MECP2. Jalur tumpang tindih pada disregulasi dari gen di kromosom 15q11-q13 pada sindrom Rett, sindrom Angelamn dan autisme dan terdapat keterlibatan MECP2 pada regulasi ekspresi UBE3A dan GABRB3 di *postnatal* otak mamalia (Hogart, et al., 2006 ; Nicholls, et al., 1993).

Dari 166 pasien berkebangsaan Jepang yang tidak mempunyai relasi dengan autisme dan terdapat 412 kontrol ditemukan bukti asosiasi SNP yang terletak pada 2,4 kb telometrik terhadap mikrosatelit 155CA-2 di gen GABRB3 (Tochigi, Kato, Koishi, Kawakubo, & Yamamoto, 2007).

2.5.9 Sejarah

Studi dilakukan terhadap 3 saudara yang mempunyai sindrom Angelman dan dengan delesi salah satu dari gen GABRB3 ditemukan bahwa ibunya terdapat delesi yang sama yang di turunkan dari ayah dari ibu tersebut. Penemuan ini mendukung bahwa GABRB3 adalah gen dari Angelman dan mengindikasi bahwa gen sindrom Angelman dan sindrom Prader-Willi adalah berbeda. Perbedaan tersebut dinyatakan dari transmisi delesi dari kakek terhadap ibu terhadap anak-anak yang terkena delesi tersebut tidak menyebabkan sindrom Prader-Willi (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005; Whiting, Bonnert, MCKernan, Farrar, & Bourdelles, 1999).

2.5.10 Model Hewan

Observasi pada mencit GABRB3-null terlihat defisiensi yang signifikan dalam aktivitas yang berhubungan perilaku sosial yaitu sosialisasi dan bersarang dibandingkan dengan sampel kontrol tipe liar. Mencit GABRB3-null juga memperlihatkan penurunan perilaku penjelajahan dan peningkatan dalam perilaku hiperaktif stereotipik. Selain itu terdapat pengurangan frekuensi dan durasi dari episode dibandingkan dengan sampel kontrol. Sampel jaringan otak dari mencit GABRB3-null terdapat hipoplasia pada serebellar vermis dibandingkan dengan sampel kontrol yang tipe liar. DeLorey et al. pada tahun 2008 menyimpulkan bahwa pada mencit GABRB3-null memberikan model mencit untuk kelainan spektrum autisme (DeLorey, Sahbie, Hashemi, Homanics, & Clark, 2008).

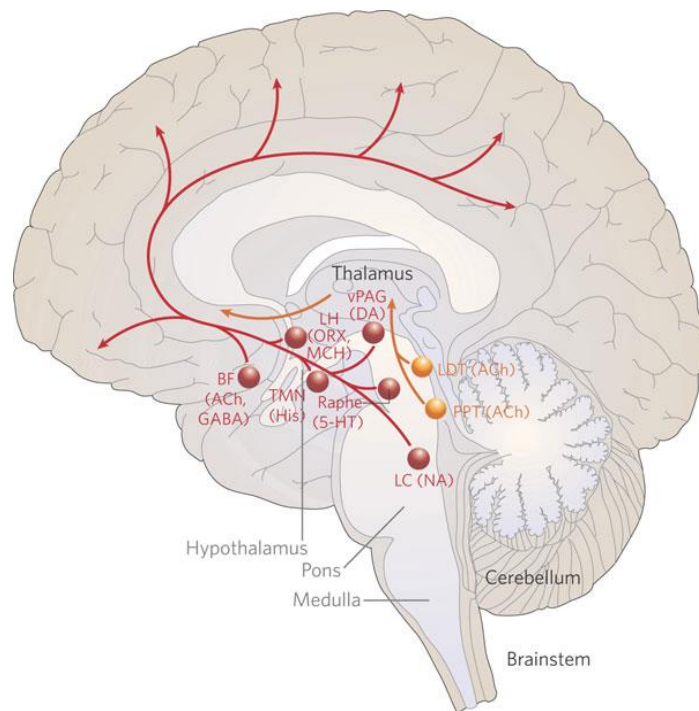
2.6 Kesadaran

2.6.1 Fisiologi Kesadaran

Kesadaran adalah suatu kondisi yang kompleks yang dapat dibagi menjadi dua komponen, yaitu *arousal* dan *awareness*. *Awareness* atau awas adalah kemampuan untuk mengolah dan menyimpan informasi untuk kepentingan interaksi internal maupun eksternal. *Arousal* atau terbangun adalah suatu keadaan tubuh mampu menerima keadaan eksternal yang diperantarai oleh struktur subkortikal, seperti *Reticular Activating System* (RAS).

RAS merupakan bagian *Ascending* dari *Reticular Formation* (RF), yang terdiri dari akson yang terproyeksi pada korteks serebri, baik langsung maupun melalui talamus. Rangsangan yang dapat mengaktifasi RAS dapat berbentuk Rangsang penglihatan dan pendengaran, aktivitas

mental, rangsang dari reseptor nyeri, raba, dan tekanan, dan rangsang dari reseptor anggota gerak dan kepala. RAS yang tidak teraktivasi menyebabkan tidur, suatu kondisi di mana tubuh masih memiliki sebagian kesadaran sehingga seseorang masih dapat dibangunkan. Sedangkan kerusakan RAS menyebabkan koma, suatu kondisi seseorang kehilangan kesadaran secara penuh sehingga tidak bisa dibangunkan (Guyton, 2006).



Gambar 12. Sistem Aktivasi Retikular (Tortora & Derrickson, 2012)

Kesadaran dipertahankan oleh *Ascending Reticular Activating System* (ARAS), yang berasal dari batang otak atas berdekatan dengan sambungan pons dan otak tengah dan berlanjut pada diensefalon, dimana jalurnya bercabang menjadi dua bagian. Cabang pertama mempersarafi talamus, mengaktivasi neuron dan *reticular nuclei* yang penting untuk transmisi *thalamocortical*. Dua struktur kolinergik batang otak dan *basal forebrain* bertindak sebagai pangkal dari proyeksi ini adalah PPT/LDT *nuclei*. Neuron PPT/LDT sangat aktif selama bangun dan *Rapid Eye*

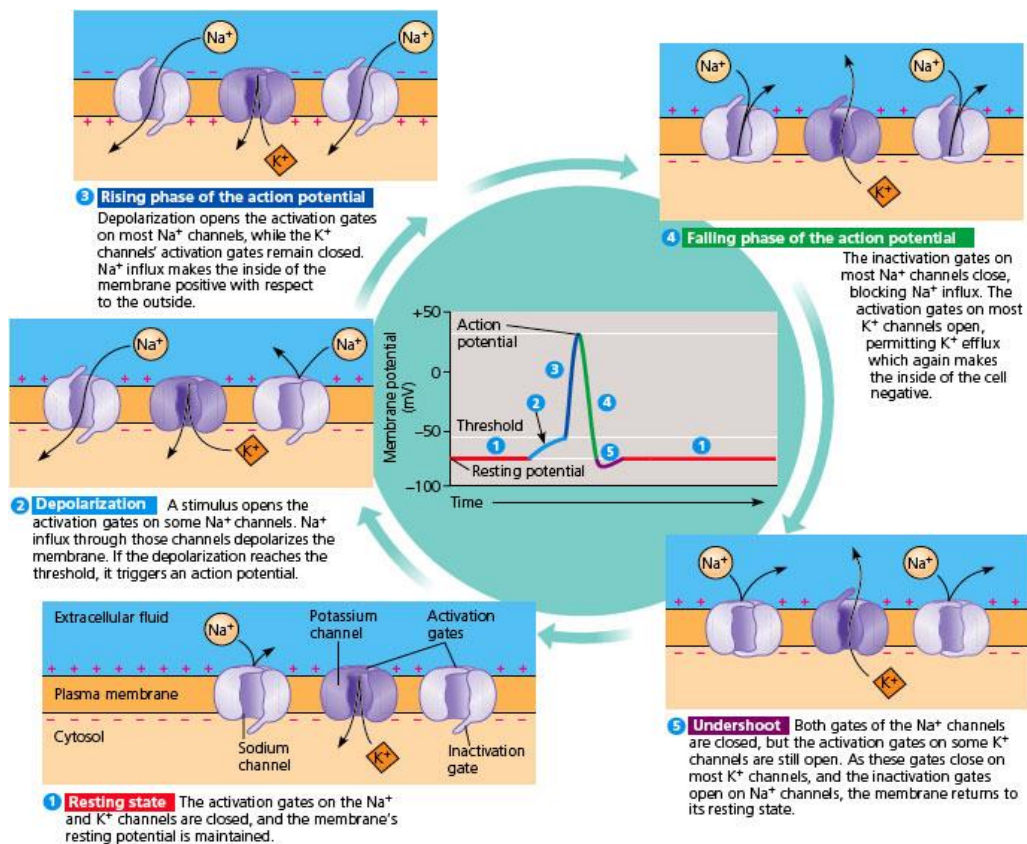
Movement (REM) *sleep*, dan bekerja lebih lambat selama *non-REM sleep*, periode dimana aktivitas korteks berkurang. Transmisi impuls *reticular nucleus* pada talamus meningkatkan eksitabilitas dan kondisi terjaga. Cabang kedua dari ARAS diproyeksikan ke lateral hipotalamus, *basal forebrain*, dan korteks serebri, meliputi neuron noradrenergik pada *locus coeruleus*, *serotonergic dorsal & median raphe nuclei*, *dopaminergic ventralperiaqueductal grey matter*, dan *histaminergic tuberomammillary nucleus*.

Beberapa tambahan aferen *cerebrocortical*, yakni neuron *lateral hypothalamicpeptidergic* yang mengandung *orexin* dan *basal forebrain nuclei* yang mengandung *acetylcholine* atau GABA. Neuron-neuron tersebut bekerja sangat cepat selama bangun, melambat saat NREM *sleep*, dan sedikit aktivitas selama REM *sleep*. Selama tidur, jalur-jalur di atas dihambat oleh neuron *Ventrolateralpreoptic Nucleus* (VLPO). Secara spesifik, neuron VLPO teraktivasi selama tidur. Eferen VLPO mengandung *neurotransmitter* penghambat GABA dan *galanin*, dan berperan penting pada otak mamalia dalam menenangkan sistem ARASs selama tidur (Guyton, 2006).

2.6.2 Bangkitan Potensial Aksi

Potensial aksi atau impuls adalah urutan peristiwa yang terjadi secara cepat yang menurunkan dan membalikkan potensial membran dan kemudian pada akhirnya dikembalikan ke keadaan istirahat. Setiap potensial aksi memiliki dua fase utama, yaitu fase depolarisasi dan fase repolarisasi. Selama fase depolarisasi, potensial membran negatif menjadi kurang negatif, mencapai nol, kemudian menjadi positif. Selama fase

repolarisasi, potensial membran dikembalikan pada keadaan istirahat, yakni -70 mV. Fase repolarisasi diikuti oleh fase setelah hiperpolarisasi, ketika potensial membran untuk sementara menjadi lebih negatif dari tingkat istirahat. Terdapat dua macam *voltage-gated channels* yang membuka dan kemudian menutup selama potensial aksi. Saluran ini terletak di membran plasma akson dan terminal akson. Saluran pertama yang terbuka adalah saluran ion sodium, memungkinkan ion sodium masuk ke dalam sel, sehingga menyebabkan fase depolarisasi. Kemudian saluran ion potasium terbuka, menyebabkan ion potasium keluar dari sel, sehingga menghasilkan fase repolarisasi. Fase setelah hiperpolarisasi terjadi ketika saluran ion potasium tetap terbuka setelah fase repolarisasi berakhir (Guyton, 2006).



Gambar 13. Proses Bangkitan Potensial Aksi (Tortora & Derrickson, 2012)

2.7 Sedasi

Menurut *American Society of Anesthesiologist*, pengertian dari sedasi adalah suatu kondisi turunnya kesadaran pasien terhadap lingkungan sekitar serta reaksi terhadap rangsangan eksternal. Sedasi juga diartikan sebagai obat-obat yang bekerja sebagai penurunan terhadap sistem saraf pusat dengan jalan mengurangi kepekaan korteks atau sistem saraf pusat sehingga aktivitas fisiologis menjadi ringan dan memberikan efek menenangkan pada pemakai, belum sampai kategori tidur.

Sedasi dibagi menjadi beberapa tahap, yaitu (*American Society of Anesthesiologist, 2004*):

- **Sedasi minimal** adalah suatu kondisi yang terinduksi obat, di mana pasien dapat berespon secara normal terhadap perintah verbal. Meskipun fungsi kognitif dan koordinasi fisik melemah karena pengaruh obat, namun refleks jalan napas, fungsi kardiovaskuler dan ventilasi tidak terganggu.
- **Sedasi sedang** (sedasi sadar) adalah suatu keadaan yang terinduksi obat, dimana terjadi depresi kesadaran namun pasien dapat berespon terhadap perintah verbal secara spontan atau setelah diikuti oleh rangsangan taktil ringan. Tidak ada intervensi yang diperlukan untuk mempertahankan patensi jalan napas dan ventilasi spontan memadai. Fungsi kardiovaskular biasanya tidak terganggu.
- **Sedasi dalam** adalah suatu keadaan yang terinduksi obat, dimana terjadi depresi kesadaran dan pasien sulit dibangunkan tetapi dapat berespon terhadap rangsangan berulang atau rangsangan sakit. Pasien memerlukan bantuan untuk menjaga patensi jalan napas karena kemampuan untuk mempertahankan ventilasi spontan tidak memadai. Fungsi kardiovaskuler biasanya tetap terjaga.

- **Anestesia umum** adalah suatu keadaan yang terinduksi obat, dimana terjadi depresi kesadaran dan pasien tidak dapat dibangunkan bahkan oleh rangsangan yang menyakitkan. Pasien membutuhkan bantuan dalam menjaga patensi jalan napas dan ventilasi tekanan positif diperlukan karena kemampuan untuk mempertahankan fungsi ventilasi spontan terdepresi. Fungsi kardiovaskular dalam tahap ini mungkin terganggu.

Sedasi adalah suatu proses yang berkesinambungan, oleh karena itu tidak mudah untuk memprediksi bagaimana pasien secara individu akan merespon terhadap proses ini. Oleh karena itu, praktisi yang hendak mempraktekkan tindakan sedasi pada level tertentu harus mampu menyelamatkan pasien yang tingkat sedasinya menjadi lebih dalam dari yang dikehendaki (American Society of Anesthesiologist, 2004).

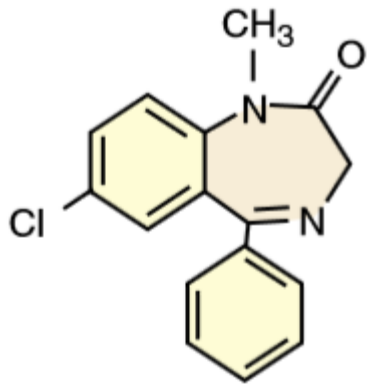
Sedasi dalam dapat meningkat hingga sulit dibedakan dengan anestesi umum. Karakteristik pada keadaan sedasi sedang atau sedasi sadar adalah adanya kemampuan pasien untuk menjaga patensi jalan napas sedangkan pada sedasi dalam atau anestesi umum, refleks protektif jalan napas pasien tidak dapat dipastikan tetap terjaga. Beberapa obat anestesi dapat digunakan dalam dosis kecil untuk menghasilkan efek sedasi. Obat-obat sedatif dapat menghasilkan efek anestesi jika diberikan dalam dosis yang benar (Malamed, 2010).

2.8 Diazepam

2.8.1 Merek Dagang

Diazepam, Diazepin, Valium, Cetalgin, Danalgin, Metaneuron, Proneuron, Valisanbe, Valdimex, Neuropyron, Neurindo, Meparyp dan Stesolid.

2.8.2 Farmakologi



Gambar 14. Struktur Kimia Diazepam (Miller R. , 2015)

Diazepam bekerja pada reseptor GABA. Reseptor GABA adalah kanal inhibitor pada sistem saraf pusat jaras naik. Diazepam adalah GABA agonis yang berikatan secara spesifik pada reseptor benzodiazepin dari GABA yang mengakibatkan inhibisi atau perubahan pada aktivitas dari neurologi. Saat diazepam berikatan, terjadi hiperpolarisasi dari post-sinaptik neuron yang disebabkan oleh GABA yang mengontrol kanal klorida. Klorida adalah ion dengan muatan negatif yang berperan dalam transmisi impuls di bagian neuron. Proses ini meningkatkan aktivitas GABA untuk memasukan ion klorida (influx) pada neuron post-sinaptik. Kation dengan muatan negatif ini menyebabkan perubahan pada aktivitas neurologi yang menurunkan kecepatan dari impuls saraf dengan mengurangi aksi potensial dan laju tembak.

Diazepam berkerja pada area limbik, thalamus dan hipotalamus karena pada area tersebut terdapat aksi untuk meningkatkan proses dari GABA. Pemberian diazepam dapat diberikan pada pasien dalam keadaan kejang atau memperlihatkan gejala aktivitas neurologik yang berlebihan

seperti pada pasien dengan konsumsi kokain atau dengan konsumsi obat perangsang sistem saraf pusat. Pada saat diazepam berikatan dengan reseptor benzodiazepin menyebabkan hiperpolarisasi. Proses hiperpolarisasi melalui peningkatan jumlah dari intraselular klorida yang mengakibatkan penurunan dari aksi potensial dari membran yang menyebabkan neuron menjadi bermuatan negatif. Jumlah dari stimulus yang diperlukan untuk menyebabkan membran menjadi depolarisasi akan meningkatkan. Selain itu, Diazepam juga menyebabkan depresi dari sistem aktivasi retikular yang mengontrol level dari kesadaran (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

2.8.3 Cara kerja

Diazepam adalah turunan dari benzodiazepin. Cara kerja dari diazepam adalah potensiasi inhibisi neuron dengan asam gamma-aminobutirat (GABA) sebagai mediator pada sistem saraf pusat. Diazepam akan dimetabolisme menjadi metabolit aktif yaitu N-desmetildiazepam dan oxazepam. Kadar puncak dalam darah tercapai untuk diazepam 2 mg adalah setelah 1-2 jam setelah pemberian oral, sedangkan untuk waktu paruh bervariasi yaitu antara 20-50 jam dan untuk waktu paruh dari metabolit aktif yaitu dapat mencapai 100 jam tergantung dari usia dan fungsi hati (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

Dosis diazepam yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah dosis manusia sebesar 0,2 mg/kg BB sesuai dengan dosis yang umum digunakan untuk mengurangi rasa cemas dan menimbulkan efek sedasi (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009). Faktor konversi dari manusia ke dosis mencit dengan berat rata-rata 20 gram adalah mengalikan dosis

manusia dengan 12,3 sesuai dengan ketentuan dari FDA . Dalam kasus ini, dosis manusia dari 0,2 mg/kg BB akan sama dengan 2,5 mg/kg BB atau 0,025 mg/10 gr, pada mencit dengan berat rata-rata 20 gram.

2.8.4 Indikasi

Pemberian diazepam diberikan untuk pengobatan jangka pendek dari gejala ansietas. Sebagai terapi tambahan untuk meringankan spasme otot rangka karena proses inflamasi atau trauma. Selain itu, diazepam digunakan untuk meringankan gejala dari penghentian alkohol akut dan premedikasi anastesi (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

2.8.5 Kontraindikasi

Diazepam tidak boleh diberikan pada penderita hipersensitif, bayi dibawah 6 bulan, wanita hamil dan menyusui, depresi pernapasan, glaukoma sudut sempit, gangguan paru akut, dan pada keadaan fobia (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

2.8.6 Efek samping

Mengantuk, ataksia, kelelahan, konstipasi, mual, edema, gejala ekstra pirimidial, jaundice, neutropenia, sakit kepala, hipotensi, perubahan libido, gangguan visual, inkontinensia dan retensi urin (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

2.8.7 Interaksi Obat

Penggunaan bersamaan dengan obat seperti obat depresan untuk susunan saraf pusat atau alkohol dapat mengakibatkan peningkatan dari

efek depresan. Obat seperti cimetidin dan omeprazol mengurangi ekskresi dari benzodiazepin. Rifampisin dapat meningkatkan ekskresi dari benzodiazepin (Pharmacist Prescribing Task Force, 2009).

2.9 Tes Rotarod

2.9.1 Pengertian

Tes rotarod adalah salah satu metode pemeriksaan yang paling sering digunakan untuk memeriksa efek sedasi dan gangguan koordinasi motoric pada mencit yang disebabkan oleh obat baru, karena bersifat *automated* dan tidak memerlukan keahlian khusus untuk menjalankan tes ini. Namun, sensitivitasnya sangat bervariasi tergantung pada sistem saraf yang terpengaruh. Pada tes ini, mencit diseimbangkan di batang yang berputar, dan latensi mereka untuk jatuh dicatat sebagai ukuran (Stanley JL, 2005).

Mencit dapat diuji pada kecepatan yang konstan untuk uji coba yang berbeda atau pada kecepatan yang diakselerasi secara bertahap dari 0 hingga 40 rotasi per menit (rpm) selama 5 menit. Latensi jatuh dari batang dengan kecepatan konstan dianggap sensitif terhadap adanya suatu perubahan biologis yang mempengaruhi koordinasi dan keseimbangan motorik. Kelelahan (*fatigue*) dapat mempengaruhi hasil yang didapatkan dari batang yang diakselerasi. Hasil rotarod sangat jelas pada hewan dengan gangguan fungsi serebelar atau sumsum tulang belakang. (Mann & Chesselet, 2014).

2.9.2 Aplikasi

Tes rotarod pada awalnya digunakan untuk memantau perkembangan penyakit Huntington pada mencit. Tes ini juga dapat digunakan untuk mendeteksi gangguan pada basal ganglia pada mencit. Selain itu, tes rotarod juga dapat mengukur gangguan sensorimotor secara akurat pada beberapa penyakit, termasuk ALS, ataksia serebelar, cedera otak traumatik, dan stroke. (Mann & Chesselet, 2014)

Pada studi oleh Ralvenius dkk (2015) mengenai efek benzodiazepin pada mencit, koordinasi motorik dinilai dengan rotarod yang dipercepat dari 4 hingga 40 rpm dalam 5 menit. Enam puluh menit setelah administrasi diazepam, mencit ditempatkan di rotarod. Lima pengukuran dilakukan per mencit. (Ralvenius, Benke, Acuna, Rudolph, & Zeilhofer, 2015)

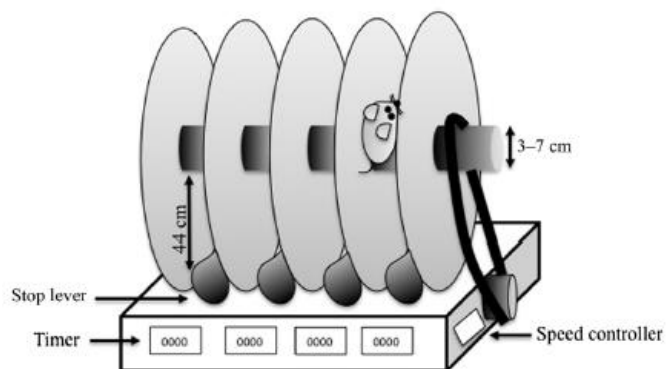
Studi lain oleh Marfu'ah dkk (2013) yang meneliti efek sedasi dari ekstrak daun ubi jalar pada mencit juga menggunakan tes rotarod. Pada studi tersebut, mencit ditempatkan di atas rotarod pada menit ke-15; 30; 60 dan ke-120, lalu dicatat berapa kali mencit jatuh. Sebelum dilakukan pengujian, mencit diadaptasikan di atas rotarod selama 5 menit dengan tujuan untuk mengadaptasikan mencit terhadap rotarod. (Marfu'ah, Sudarso, & Diniatik, 2013)

Penelitian terbaru dilakukan oleh Salazar-Jua´rez dkk (2017) yang meneliti efek mirtazapine pada mencit menggunakan tes rotarod. Pada studi tersebut, tes rotarod dibagi menjadi 2 fase. Pada fase pertama, mencit dilatih untuk bertahan pada batang rotarod, dengan rotasi 20 rpm selama 5 menit. Jika mencit bertahan lebih 3 menit pada setidaknya 2 dari

3 percobaan konsekutif, maka mencit tersebut akan dimasukkan ke dalam penelitian. Pada fase kedua, mencit akan ditempatkan di rotarod pada menit ke-3, 5, 10, 20, 40, dan 60 setelah pemberian obat. Kemampuan mencit untuk bertahan pada batang rotarod (lama bertahan), latensi, dan jumlah jatuh dicatat pada setiap mencit. (Salazar-Jua´rez, 2017)

2.9.3 Bahan

Rotarod adalah alat yang terdiri dari batang bergerigi berdiameter 3–7 cm, kontrol kecepatan, dan tuas yang memicu *timer* untuk berhenti setelah mencit jatuh dari batang. Batang yang halus juga dapat dipakai untuk mengurangi *clinging* guna meningkatkan tingkat kesulitan tes. Diameter dari batang rotarod yang harus digunakan berbeda-beda tergantung pada jenis hewan yang akan diteliti, biasanya mulai dari 3-7 cm. (Mann & Chesselet, 2014)



Gambar 15. Rotarod (Mann & Chesselet, 2014)

2.9.4 Prosedur

Pelatihan dan pengujian dapat dilakukan dengan berbagai kecepatan dan tergantung pada model mencit, laboratorium, dan/atau jenis penelitian. Secara umum, mencit awalnya dilatih untuk berada tetap pada

batang dengan kecepatan putaran 5 rpm konstan. Mencit yang berulang kali jatuh ditempatkan kembali pada rotarod sampai mereka dapat bertahan selama 2 menit. Mencit yang sudah dilatih kemudian diuji pada rotarod yang diakselerasi secara bertahap. Kecepatan putaran dimulai pada 5 rpm dan dipercepat 0,2 rpm per detik. Latensi mencit jatuh dari rotarod kemudian dicatat. Mencit diuji dengan total tiga hingga lima percobaan sebelum dikembalikan ke kandang mereka. Untuk uji rotarod kecepatan konstan, mencit dilatih pada kecepatan yang sama dengan kecepatan yang diuji (misalnya 25 rpm), selama 1 menit dan latensi jatuh dicatat. Empat percobaan harus dilakukan sebelum pengujian selama tiga hari berturut-turut. Pada hari pengujian, tiga hingga lima percobaan dilakukan dengan kecepatan konstan (misalnya 5, 8, 15, 20, 24, 31, 33, atau 44 rpm) dengan *cutoff* 1 menit. Mencit harus dikembalikan ke kandang selama 5–10 menit interval antar percobaan. Karena beberapa mencit dapat "*clinging*" pada batang, latensi mereka untuk jatuh selama tiga putaran berturut-turut dapat dinilai, atau batang dapat dilapisi dengan karet halus (batang halus) untuk mengurangi *clinging* dan/atau mempersulit pengujian. Beberapa mencit juga selalu jatuh ketika ditempatkan pada batang, meskipun sudah dilakukan pelatihan sebelumnya. Mencit seperti ini biasanya langka dan dieksklusi dari penelitian. Pengukuran lain yang dapat dilakukan termasuk durasi berjalan, kecepatan rotarod pada saat mencit jatuh, dan jarak yang ditempuh. (Mann & Chesselet, 2014)

2.9.5 Hubungan Sedasi dengan Rotarod

Tes rotarod pada mencit untuk koordinasi / sedasi motor umumnya digunakan untuk memprediksi sedasi klinis yang disebabkan oleh obat baru. Namun, pengalaman masa lalu menunjukkan bahwa ia tidak memiliki tingkat sensitivitas yang diinginkan untuk dapat memprediksi efek pada manusia (Stanley JL, 2005). Pada mulanya uji rotarod merupakan sebuah teknik instrumental yang digunakan untuk mengukur lamanya waktu seekor binatang dapat tetap berada pada batang yang berputar dan kemudian dikembangkan untuk mengukur efek obat pada koordinasi motorik mencit (Dunham NW, 1957).

Agan farmakologis yang biasanya digunakan seperti relaksan otot (rocuronium, succinylcholine, vecuronium, dll) atau depresan SSP (diazepam, clonazepam, alprazolam, dll) (Moniruzzaman, 2016). Agen farmakologi depresan SSP, menghasilkan efek seperti peringanan dari kecemasan, hambatan, menginduksi relaksasi, tidur, tidak sadar, anestesi umum dan koma. Tujuan semua agen tersebut adalah untuk menghambat rangsangan neuron. Istilah sedasi, hipnotik dan anxiolytic umumnya diterapkan pada setiap penurunan sistem saraf pusat. Dalam dosis yang lebih kecil, banyak dari agen ini yang dapat menyebabkan kantuk, dan lebih professional agen-agen tersebut digunakan sebagai sedasi (Wafford, 2008)(Clauw DJ, 2008).

Ataxia umumnya dipelajari dalam model laboratorium sebagai prediktor sedasi, meskipun ketidakmampuan untuk memisahkan sedasi dan efek koordinasi motorik dapat menjelaskan perbedaan yang diamati antara data klinis dan pra-klinis. Berbagai model mencit saat ini digunakan

untuk menilai ataksia yang diinduksi BZ sebagai prediktor efek sedatif yang diamati di klinik (Stanley JL, 2005).

Tanaman telah digunakan sebagai obat sejak dahulu kala. Obat-obatan dari sumber tanaman digunakan oleh sekitar 80% populasi dunia. Obat-obatan herbal telah teruji oleh waktu untuk keamanan, kemanjuran, penerimaan dan efek samping yang lebih rendah. Sehubungan dengan penelitian Baba (2016) mengungkapkan bahwa Persentase mencit yang jatuh dari batang rota pada kelompok diazepam (1 mg/kg) dan kelompok yang diberi perlakuan *Galphimia glauca* stem methanol extract menunjukkan hasil yang bermakna dengan nilai $P < 0,001$ dibandingkan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan kelompok yang diberikan diazepam memiliki gangguan koordinasi motorik dan memiliki efek sedasi.

Hal ini juga didukung oleh penelitian Stanley (2005) Rotarod digunakan dalam mendeteksi defisit koordinasi motorik yang diinduksi Benzodiazepin pada mencit, dan digunakan juga dalam memprediksi dosis yang menyebabkan sedasi di klinik. Data rotarod disajikan sebagai untuk jatuh dalam hitungan detik (maksimum 120 dtk). Diazepam dan lorazepam secara signifikan mengganggu kinerja rotarod, meskipun dibutuhkan reseptor GABA-A yang relatif tinggi (masing-masing 72% dan 93%) (Stanley JL, 2005).

Pada penelitian Muh.Fitrah (2017) hasil penelitian untuk kelompok konsentrasi kontrol negatif aquadest, rerata waktu mencit bertahan di rotarod pada 0,5 jam pertama yaitu 62,86 detik, setelah 1 jam pemberian infusa rerata waktu mencit bertahan pada rotarod yaitu 83,57 detik. Kontrol positif diazepam, rerata waktu mencit bertahan di rotarod pada 0,5 jam pertama yaitu 37,91 detik, setelah 1 jam pemberian infusa rerata waktu

mencit bertahan pada rotarod yaitu 30,57 detik. Hasil penelitian ini menunjukkan mencit yang bertahan lebih lama, memiliki kurang memiliki efek sedasi (Muh. Fitrah, 2017).

Pada studi yang dilakukan Hendriks et al. (1985) menunjukkan bahwa Valerenic Acid (dari Valrian officialis) memiliki efek depresan sentral yang tidak spesifik setelah pemberian intraperitoneal pada tikus. Pada dosis di atas 100 mg/kg berat badan, efek ditemukan dalam rotarod dan tes traksi. Pada toxic yang lebih tinggi dari itu akan menimbulkan toxic. Aktivitas lokomotor spontan tikus berkurang dengan Valerinic Acid pada dosis 50 mg/kg, dan perpanjangan uji tidur yang diinduksi barbiturat juga ditemukan (Hendriks H, 1985). Menurut studi yang dilakukan Fernandez et al. (2004) V.officinalis terbukti memiliki efek sedative dan memperpanjang waktu tidur pada tikus, seperti yang ditunjukkan. (Fernandez, Wasowski, Paladini, & Marder, 2004). V. officinalis digunakan secara tradisional sebagai sedatif untuk insomnia ringan, selain diindikasikan untuk sifat anxiolytic ketika diberikan dalam dosis yang lebih kecil. (Morazzoni P, 1995).

2.10 Metode ELISA

2.10.1 Pengertian

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang menggunakan bidang imunologi untuk mendeteksi antibodi atau antigen yang terdapat pada suatu sampel. ELISA digunakan sebagai alat diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan dan bidang industri (Hnasko, 2015).

Penggunaan ELISA melibatkan antibodi dengan spesifitas terhadap antigen tertentu. Sampel dengan jumlah antigen yang tidak diketahui akan diimobilisasi pada suatu permukaan solid yang non spesifik (penyerapan pada permukaan) atau spesifik (melalui penangkapan oleh antibodi lain yang spesifik untuk antigen yang sama). Setelah antigen diimobilisasi akan ditambahkan antibodi pendeteksi untuk membentuk kompleks dengan antigen. Antibodi pendeteksi dapat berikatan juga pada enzim atau dapat dideteksi secara langsung oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan enzim melalui biokonjugasi. Di antara tiap tahap, plat dicuci dengan larutan deterjen lembut untuk membuang protein yang kelebihan atau antibodi yang tidak terikat. Setelah tahap pencucian terakhir, dalam plat akan ditambahkan substrat enzimatik untuk memproduksi sinyal yang visibel yang menunjukkan kuantitas antigen dalam sampel. Teknis ELISA yang lama adalah dengan menggunakan substrat kromogenik, terdapat metode-metode terbaru yang lebih sensitif yaitu dengan menggunakan substrat fluorogenik (Hnasko, 2015).

2.10.2 Aplikasi

ELISA dapat mengevaluasi kehadiran dari antigen dan antibodi dalam suatu sampel karena hal tersebut ELISA dapat berguna sebagai metode untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam serum dan mendeteksi adanya antigen. Metode ELISA juga digunakan pada bidang industri makanan yaitu untuk mendeteksi potensial alergen dalam makanan seperti dalam susu, kacang, walnut, telur dan almond. ELISA dapat digunakan dalam bidang toksikologi untuk menguji dugaan secara

cepat pada pembagian kelas obat (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015).

2.10.3 Teknik

Terdapat 2 teknik metode ELISA yaitu teknik kualitatif dan teknik kuantitatif. Teknik kualitatif adalah berdasarkan bahwa tiap antibodi berikatan dengan antigen yang spesifik. Teknik kuantitatif adalah dengan berdasarkan jumlah antigen-antibodi yang ditentukan dengan nilai absorpsi. Teknis kuantitatif menggabungkan spesifitas antibodi dengan kepekaan uji dari enzimatis dengan spektrofotometer biasa atau dengan antigen yang dilekatkan pada enzim (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015)

2.10.4 Jenis

Beberapa tipe dari ELISA yaitu *direct* ELISA, *indirect* ELISA, *sandwich* ELISA, dan *capture* ELISA. *Direct* ELISA adalah tipe yang digunakan untuk kompetisi dan inhibisi ELISA dan untuk deteksi antigen. *Indirect* ELISA untuk deteksi antibodi melalui proses yang terikat pada plat. *Sandwich* ELISA digunakan untuk deteksi antigen dengan antibodi yang terikat pada plat. *Capture* ELISA adalah metode yang digunakan untuk deteksi antibodi melalui *anti human antibody* yang terikat pada plat (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015).

2.10.5 Bahan

Beberapa bahan yang digunakan dalam teknik ELISA adalah bahan padat yang dipakai dalam ELISA termasuk selulosa, dextran

berangkai silang, poliacrilamide, polistiren dan polipropilen. Bentuk dari bahan padat ini dapat berupa butiran, lempeng atau tabung. Antigen dapat dilekatkan secara adsorpsi pasif atau di ikat secara kovalen dengan sianoben-bromida. Bahan lainnya adalah enzim yang dipilih dengan aktivitas yang tinggi misalnya fosfatase alkalis dan peroksidase. Bahan pengabung yang sering dipakai adalah glutaraldehyde. Substrat yang paling baik adalah yang paling stabil, aman, dan tidak berwarna (hanya menjadi berwarna pada saat perubahan enzim). Misalnya pada p-nitrofenilfosfat oleh enzim fosfatase alkasi berubah menjadi p-nitrofenol berwarna kuning (Hnasko, 2015 ; Casini, et al., 2015).

2.10.6 Material dan Alat

Material yang dibutuhkan dalam metode ELISA adalah Antigen Monoclonal Ab, *blocking buffer*, *microplate*, konjugat, substrat, stop sol, sampel serum. Alat yang digunakan dalam metode ELISA adalah 96-Wells microplate, ELISA *test kit*, *multichannel pipette*, dan *micropipette* (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015).

2.11 Pemeriksaan Ekspresi gen

2.11.1 Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA

Boom Original (Boom et al, 1990). Metode Boom merupakan metode yang dilakukan pertama kali oleh Boom et al (1990). Proses isolasi DNA dilakukan dengan cara sebanyak 50 μ L sampel isolat M. tuberculosis ditambahkan dengan 900 μ L buffer lisis L6 dan 40 μ L suspensi diatom. Larutan tersebut divorteks dengan segera \pm 5 detik. Tabung dидiamkan selama 10 menit pada suhu ruangan, kemudian tabung reaksi divorteks

kembali (5 detik) dan disentrifugasi (15 detik) dalam Eppendorf microfuge dengan kecepatan 12.000 x g. Supernatan yang diperoleh dibuang. Pelet yang diperoleh dicuci dengan penambahan 1 mL buffer L2, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Selanjutnya pelet ditambahkan 1 mL dengan etanol 70% (v/v), divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Pelet ditambahkan 1 mL aseton ke dalam tabung, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (Boom, 1990).

Setelah asetonnya dibuang, tabung reaksi dikeringkan pada suhu 56°C dengan penutup dalam keadaan terbuka dan dipanaskan selama 10 menit. Buffer elusi (buffer TE pH 8) ditambahkan dan tabung reaksi ditutup, divorteks dengan cepat dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 56°C. Tabung reaksi divorteks dengan cepat dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 x g dan supernatan yang mengandung DNA dapat digunakan. Proses ini dilakukan di dalam Biological Safety Cabinet Class II (Boom, 1990).

2.11.2 Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A. Pengenalan

Analisis ekspresi gen melibatkan penentuan pola gen yang diekspresikan pada tingkat transkripsi genetik, dalam keadaan tertentu atau dalam sel tertentu. Pengukuran ekspresi gen adalah alat penting yang

digunakan di seluruh penemuan obat, penelitian ilmu kehidupan dan optimalisasi bioproduksi. Analisis ekspresi melibatkan beberapa teknik mulai dari analisis ekspresi gen seluruh genom seperti microarray atau sekuensing RNA, hingga teknik ekspresi gen target yang lebih spesifik seperti teknik qPCR. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. Real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (O'Connell, 2002).

Real time PCR juga meliputi Real Time-RT PCR dimana PCR dilakukan secara Real Time menggunakan enzim *Reverse Transcriptase* secara langsung pada waktu yang bersamaan. Real Time-RT PCR memiliki tambahan siklus *Reverse Transcription* yang memacu perubahan molekul DNA dari molekul RNA.



Gambar 16. Contoh Mesin *Real Time* PCR

B. Prinsip Kerja qPCR

Berdasar pada molekul yang digunakan untuk deteksi, prinsip kerja qPCR dapat dibedakan sebagai berikut:

Prinsip kerja qPCR adalah mendeteksi dan menguantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Arya, 2005).

1. Deteksi target non-spesifik menggunakan pewarnaan DNA

Pada Real Time PCR, pewarna DNA digunakan sebagai reporter fluoresensi untuk memonitor reaksi Real Time PCR. Fluoresensi pada reporter akan terakumulasi seiring dengan proses amplifikasi yang berlangsung. Pencatatan secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung pancaran fluoresensi tiap siklus PCR. Hal tersebut mungkin untuk dilakukan guna memonitor reaksi PCR selama fase eksponensial. Jika grafik digambarkan antara log jumlah awal template dan hubungan peningkatan fluoresensi reporter selama proses Real Time PCR, maka akan didapatkan suatu garis hubungan yang menunjukkan kuantitas gen yang diekspresikan. (Tamam, 2016)

2. Deteksi target spesifik

Terdapat dua jenis reporter fluoresen yang umumnya digunakan dalam qPCR, yaitu Taqman dan SYBR Green. SYBR Green akan berfluoresensi ketika berikatan dengan seluruh double-stranded DNA (dsDNA). Sinyal fluoresens SYBR Green saat berikatan dengan dsDNA direkam setiap siklus sehingga menunjukkan banyak produk yang

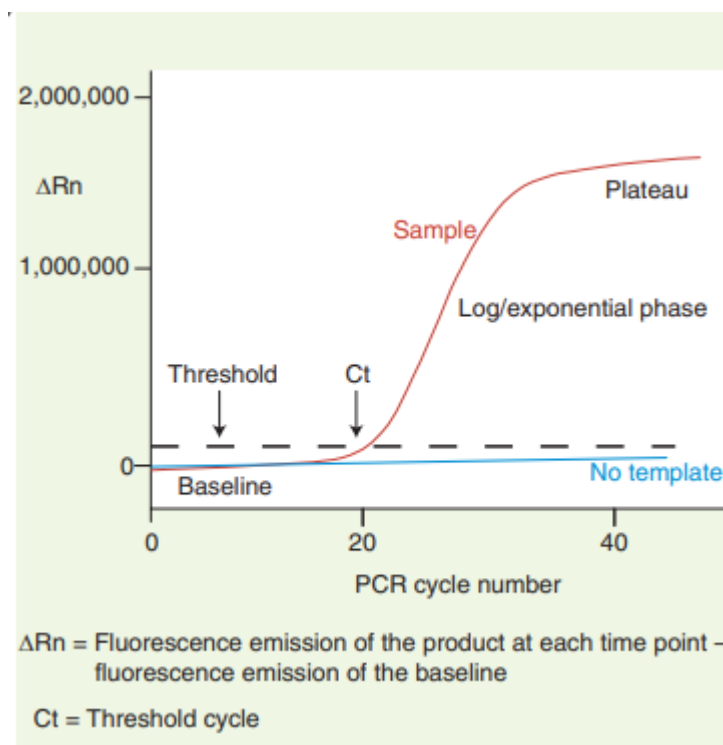
teramplifikasi selama reaksi berlangsung. Semakin banyak template pada awal reaksi, maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai titik saat sinyal fluoresens SYBR Green terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas (threshold) fluoresens yang ditentukan (Bustin, 2000).

Deteksi target spesifik Real Time PCR dilakukan menggunakan beberapa oligonucleotide yang dilabeli pada dua bagian reporter dengan label *fluorescent dye* dan pewarna *quencher dye*. Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Untuk menganalisa tingkat ekspresi gen, cDNA yang telah disintesis dari mRNA diuji secara kuantitatif menggunakan real time PCR. Analisis hasil real time PCR dapat dilakukan secara *absolute quantification* dan *relative quantitation*. Metode *relative quantitation* atau yang dikenal juga dengan *comparative threshold method* menghilangkan kebutuhan akan kurva standar yang digunakan dalam perhitungan absolute quantification dan menggunakan perhitungan secara matematika untuk mengukur tingkat kuantitatif relatif ekspresi dari gen target dengan menggunakan gen referensi dan kalibrator dari jaringan (Arya, 2005).

Untuk mengetahui ekspresi suatu gen maka dibutuhkan gen referensi sebagai pembanding internal (*endogenous control*) jumlah DNA agar tidak terjadi kesalahan interpretasi akibat jumlah DNA yang berbeda. Gen referensi yang digunakan adalah gen yang tidak terpengaruhi oleh lingkungan. Gen yang paling banyak digunakan adalah housekeeping gene seperti actin dan gliseraldehida-3-fosfat-dehidrogenase (GAPDH) (Bustin, 2000).

C. Hasil qPCR

Hasil real time PCR dengan metode comparative threshold meliputi nilai C_q dan relative quantitation. C_q/C_t merupakan hasil fraksi jumlah siklus PCR dimana nilai reporter fluoresensi lebih besar dari tingkat deteksi minimal mesin real time PCR sehingga amplikasi meningkat secara signifikan. Nilai C_q/C_t didapat dari jumlah siklus pada proses PCR yang berpotongan dengan garis threshold. Threshold adalah garis yang menandai peningkatan sinyal fluoresensi secara signifikan berdasarkan variabilitas baseline, namun posisi threshold dapat diatur bebas pada setiap titik di fase eksponensial (Life TechnologiesTM, 2015).

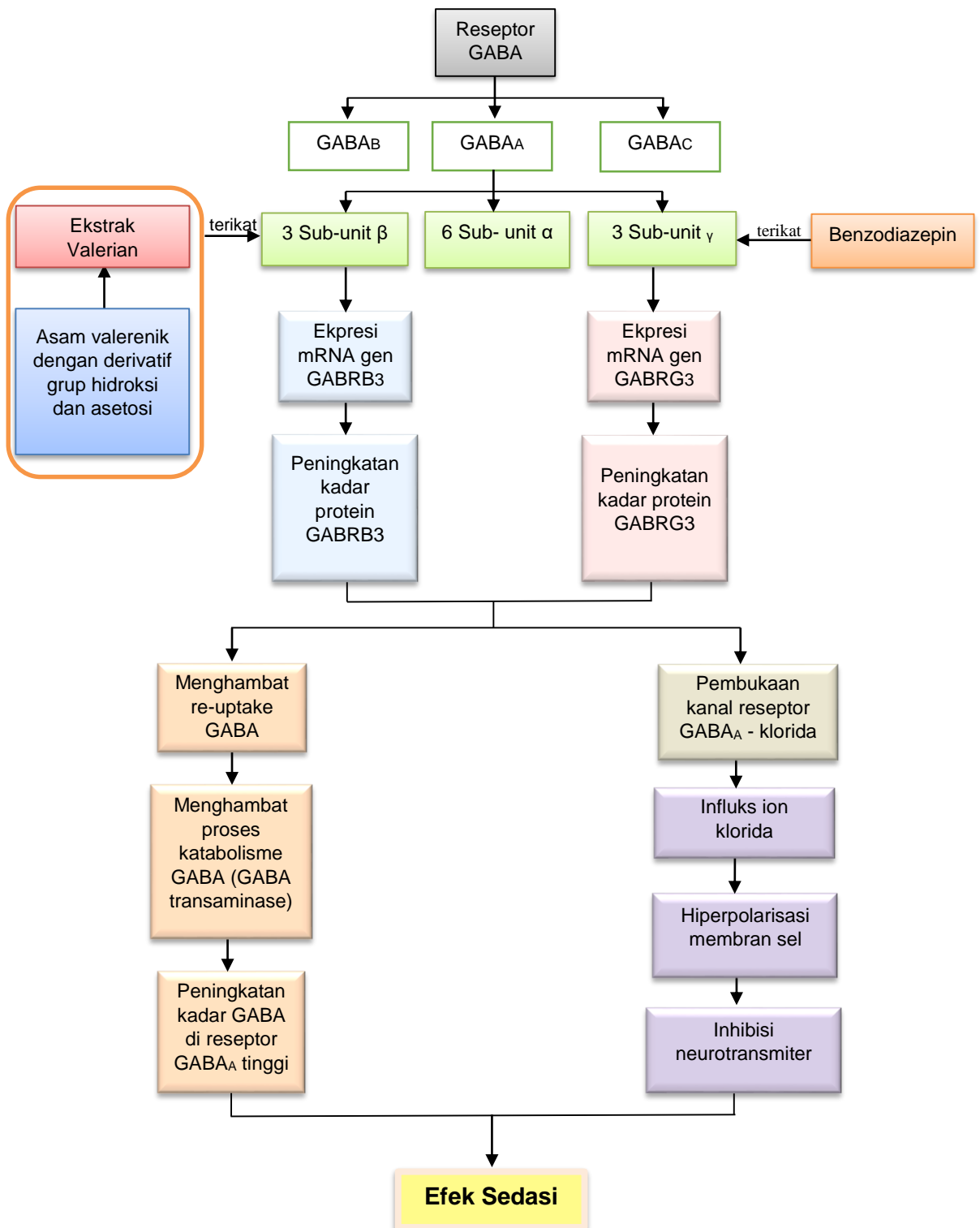


Gambar 17. Model plot amplikasi tunggal yang menggambarkan nomenklatur yang umum digunakan dalam Real Time qPCR (Arya, 2005)

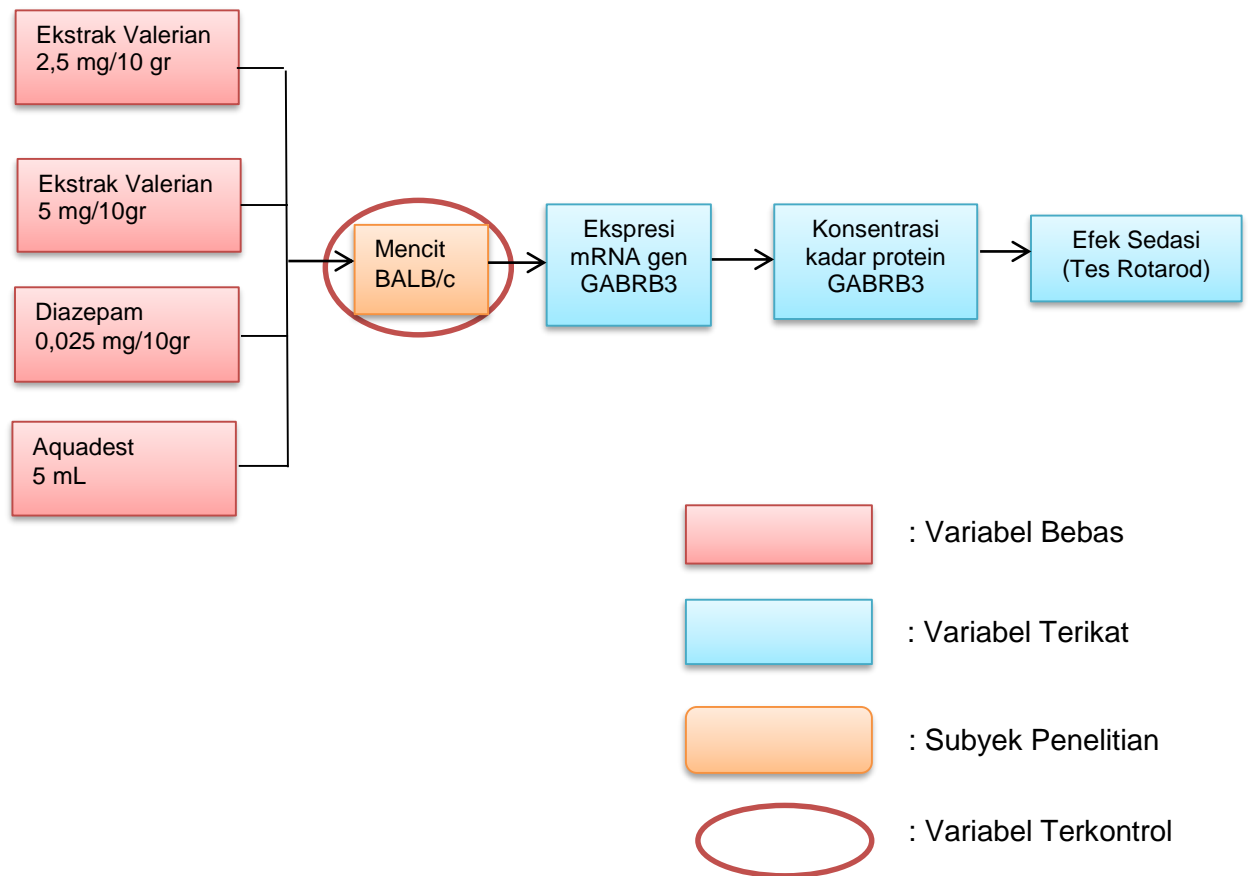
BAB III

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis

Terdapat efek sedasi yang ditunjukkan melalui peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3, peningkatan kadar protein GABRB3 dan pemeriksaan koordinasi motorik (Tes Rotarod) setelah pemberian Ekstrak Valerian (*Valeriana officinalis*) pada mencit BALB/c.

3.4 Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Terdapat empat variabel yang akan mempengaruhi hasil penelitian. Variabel bebas pertama adalah pemberian Aquadest 5 ml pada mencit BALB/c yang disebut sebagai kelompok kontrol negatif. Variabel bebas kedua adalah pemberian Diazepam 0,025 mg/10 gr pada mencit BALB/c yang disebut sebagai kelompok kontrol positif. Variabel bebas ketiga adalah pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10gr pada mencit BALB/c yang disebut sebagai kelompok perlakuan pertama. Variabel bebas keempat adalah pemberian ekstrak Valerian 5 mg/10 gr pada mencit BALB/c yang disebut sebagai kelompok perlakuan kedua.

3.4.2 Variabel Terikat

Terdapat tiga variabel yang diukur pada penelitian ini dan ketiga variabel tersebut merupakan parameter hasil penelitian yang dipengaruhi oleh empat variabel bebas seperti tersebut diatas. Variabel terikat pertama adalah pemeriksaan ekspresi mRNA gen GABRB3 dengan teknik pemeriksaan *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Variabel terikat kedua adalah pemeriksaan kadar protein GABRB3 yang diperiksa dengan teknik pemeriksaan *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Variabel terikat ketiga adalah pemeriksaan efek sedasi pada mencit BALB/c melalui pemeriksaan fungsi koordinasi motorik yang disebut dengan Tes Rotarod.

3.4.3 Variabel Terkontrol

Terdapat variabel yang bersifat tetap atau konstan dalam setiap kelompok yang diperiksa dalam penelitian ini yaitu subyek penelitian

berupa populasi mencit BALB/c berusia 8 minggu dengan berat 25-35 gram dan akan dipelihara dalam kandang berukuran 60 x 30 x 30 cm³ dengan situasi dan kondisi serupa di laboratorium hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

Ekstrak Valerian yang akan diberikan pada mencit BALB/c berasal dari pil yang sudah jadi dan merupakan obat herbal terstandarisasi dengan merek *Blackmores*. Setiap satu pil obat ini mengandung 3,2 mg asam valerininik dan setara dengan 2000 mg akar kering *Valeriana officinalis*. Penelitian ini menggunakan obat yang sudah jadi dan terstandarisasi agar kandungan obat yang diberikan pada setiap mencit sama, sehingga efek obat yang muncul pada eksperimen juga serupa.

3.5 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Indikator	Metode	Skala
1.	Ekstrak Valerian	Obat herbal yang terstandarisasi dengan merek <i>Blackmores Valerian Forte</i> . Setiap satu pil obat ini mengandung 3,2 mg asam valerininik dan setara dengan 2000 mg akar kering <i>Valeriana officinalis</i> . Ekstrak diencerkan dengan Aquadest hingga menjadi	Berat obat	Kuantitatif, obat herbal terstandar merek <i>Blackmore</i>	Nominal

		2 mg/0,1 ml larutan. Obat diberikan melalui sonde lambung dengan menggunakan spuit 1 ml.			
2.	Diazepam	Diazepam termasuk kelompok obat benzodiazepin yang mempengaruhi sistem saraf otak dan memberikan efek penenang. Obat diberikan melalui sonde lambung dengan spuit 1 ml.	Berat obat	Kuantitatif, dibeli dari Kimia Farma	Nominal
3.	Aquadest	Air yang dimurnikan dengan destilasi.	Volume cairan	Kuantitatif dibeli dari Kimia Farma	Nominal
4.	Suhu ruangan	Suhu ruangan tempat pemeliharaan mencit yang nyaman bagi mencit	25 ± 2°C	Suhu akan diukur dengan termometer ruangan	-
5.	Pencahayaan	Metode pencahayaan yang diberikan untuk menyerupai siklus hidup harian mencit	2 jam terang	Diatur peneliti	-
6.	Kandang	Kandang yang dibutuhkan untuk mencit agar dapat hidup nyaman selama penelitian berlangsung	Luas kandang 60x30x30cm untuk 2 ekor mencit dilengkapi dengan	Disediakan oleh laboratorium	-

			tempat makan dan minum	Universitas Hasanuddin	
7.	Makanan	Pelet <i>basal diet</i> yang diberikan kepada mencit selama penelitian berlangsung	Setiap 100 gram berat badan seekor mencit diberikan 5 gram pelet	Makanan dibeli dari laboratorium Universitas Hasanuddin	-
8.	Minuman	Minuman yang diberikan kepada mencit selama penelitian berlangsung	300ml untuk 2 hari untuk satu ekor mencit	-	-
9	Sedasi	Kondisi turunnya kesadaran pasien terhadap lingkungan sekitar serta reaksi terhadap rangsangan eksternal	Uji Rotarod	-	Nominal
10	Uji Rotarod	Teknik instrumental yang digunakan untuk mengukur lamanya waktu mencit dapat tetap berada pada batang yang berputar dengan kecepatan tertentu dan dikembangkan untuk mengukur efek sedasi dan koordinasi motorik pada mencit (Dunham NW, 1957).	Mencit diletakan pada batang rotarod dan diuji pada kecepatan konstan pada kecepatan yang diakselerasi secara bertahap. Mesin rotarod diatur dengan kecepatan 20 rpm (rotasi per menit) selama 300	Disediakan oleh laboratorium Universitas Hasanuddin	Nominal

			detik dan diulang 5 kali dengan interval 10-15 menit. Waktu akan berhenti apabila mencit terjatuh dari batang atau waktu mencapai 300 detik.		
--	--	--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode uji preklinik pada hewan, dengan menggunakan mencit BALB/c jantan. Pendekatan yang digunakan adalah *Post Test-Only Controlled Group Design*, yaitu membandingkan dua jenis terapi pada kelompok unit eksperimental yang hampir sama, dengan satu kelompok diberikan satu jenis terapi, sedangkan yang lain diberikan jenis terapi lain atau tidak diberikan terapi.

Penelitian akan menggunakan bahan berupa ekstrak Valerian yang terstandarisasi dengan merek *Blackmores Valerian Forte*. Setiap satu pil obat ini mengandung 3,2 mg asam valeritik dan setara dengan 2000 mg akar kering *Valeriana officinalis*. Penelitian dilakukan terhadap 20 mencit BALB/c yang akan dibagi secara acak menjadi empat kelompok percobaan yaitu kelompok kontrol negatif yang diberikan Aquadest 5 ml, kelompok kontrol positif yang diberikan Diazepam 0,025 mg/10 gr mencit, kelompok perlakuan I yang diberikan ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr mencit dan kelompok perlakuan II yang diberikan ekstrak Valerian 5 mg/10 gr mencit.

Dosis ekstrak Valerian yang akan digunakan dalam penelitian ini ditentukan dengan mengacu pada dosis umum yang digunakan pada manusia yaitu sebesar 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB. Dosis ini dipilih karena tidak melampaui *Maximum Tolerated Dose* sebesar 51 mg/kgBB seperti yang dikemukakan oleh Al-Majed atau *Maximum Tolerated Dose* sebesar 81,2 mg/kgBB seperti yang dikemukakan oleh Kakeshi. Faktor konversi dari manusia ke dosis

mencit dengan berat rata-rata 20 gram adalah mengalikan dosis manusia dengan 12,3 sesuai dengan ketentuan dari FDA . Dalam kasus ini, dosis manusia dari 20 dan 40 mg/kgBB akan sama dengan 250 dan 500 mg/kgBB atau 2,5 mg/10 gr dan 5 mg/10 gr, pada mencit dengan berat rata-rata 20 gram.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Tempat : Laboratorium Hewan – Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar ,Sulawesi Selatan.

Waktu : April-Mei 2018

4.3 Bahan dan Cara

4.3.1 Bahan

- Mencit BALB/c jantan usia 8 minggu dengan berat 25-35 gram
- Kandang mencit berukuran 60 x 30 x 30 cm³
- Mesin rotarod
- Pakan mencit
- Tempat makan dan minum
- Aquadest
- Sonde lambung
- Ekstrak Valerian
- Diazepam
- qPCR:
 - 1 ul primer forward
 - 1 ul primer reverse
 - SYBR Green qRT-PCR master mix kit

- 12,5 µl dari 2 x SYBR Green qRT-PCR master mix
 - Primer spesifik GAPDH
 - 0,375 µl larutan pewarna referensi
 - 1 µl RT/Rnase
 - 50 µl total volum reaksi
 - Program PCR
 - Mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0,1 ml, USA)
- ELISA:
 - Microelisa Stripplate
 - Standards x 6 vials
 - Sample Diluent
 - HRP-Conjugate Reagent
 - 20x Wash Solution
 - Stop Solution
 - Chromogen Solution A
 - Chromogen Solution B
 - Closure Plate Membrane
 - Sealed Bags
 - Distilled atau deionized water
 - Absorbent papers atau tissue
 - Pipettes dan disposable pipette tips.
 - Pembaca ELISA yang mampu mengukur absorbansi pada 450 nm.
 - Inkubator suhu konstan yang dapat memberikan kondisi inkubasi yang stabil hingga $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

4.3.2 Cara

Ekstrak Valerian yang akan diberikan pada mencit BALB/c berasal dari pil yang sudah jadi dan merupakan obat herbal terstandarisasi dengan merek *Blackmores*. Setiap satu pil obat ini mengandung 3,2 mg asam valerinik dan setara dengan 2000 mg akar kering *Valeriana officinalis*. Penelitian ini menggunakan obat yang sudah jadi dan terstandarisasi agar kandungan obat yang diberikan pada setiap mencit sama, sehingga efek obat yang muncul pada eksperimen juga serupa.

4.3.2.1 Prosedur pemberian material/obat

- a. Mencit akan diadaptasikan selama satu minggu dalam ruangan bersuhu sekitar 25°C, dengan pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap disertai dengan pemberian makanan dan minuman. Mencit akan dibagi menjadi 4 kelompok. Sebelum dilakukan pemberian obat, semua mencit akan dipuasakan selama 3 jam.
- b. Pada hari pertama, sebelum pemberian obat dimulai, mencit akan diambil darahnya sebanyak 1 ml untuk dianalisa dengan menggunakan metode ELISA dan menggunakan *real time* PCR.
- c. Pembagian mencit BALB/c kedalam 4 kelompok percobaan yaitu:
 - Kelompok kontrol negatif diberikan Aquadest 5 ml
 - Kelompok kontrol positif diberikan Diazepam 0,025 mg/10 gr berat mencit
 - Kelompok perlakuan I diberikan bubuk ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr berat mencit yang diberikan kepada mencit melalui sonde lambung dengan bantuan aquadest.

- Kelompok perlakuan II diberikan bubuk ekstrak Valerian 5 mg/10 gr berat mencit yang diberikan kepada mencit melalui sonde lambung dengan bantuan aquadest.
- d. Bahan tersebut diberikan pada mencit selama 1 minggu, dengan akses bebas terhadap makan dan minum setelah pemberian obat.
 - e. Pada hari ke-7, mencit akan dianalisis secara klinis untuk menentukan aktivitas Sistem Saraf Pusat pada 30 menit setelah pemberian obat percobaan. Mencit dinilai status tidurnya dengan melakukan tes rotarod.
 - f. Pada hari ke-7, dua jam setelah pemberian obat, mencit akan diambil darahnya sebanyak 1 ml untuk dianalisa dengan menggunakan metode pemeriksaan *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) dan *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

4.3.2.2 Prosedur penilaian status tidur mencit

Pemeriksaan tes rotarod dilakukan pada mencit yang telah memenuhi kriteria inklusi dan tidak termasuk dalam kriteria eksklusi yang telah diberi perlakuan sesuai dengan prosedur pemberian obat berdasarkan pembagian kelompok percobaan.

Setelah 30 menit pasca pemberian obat, mencit dikeluarkan dari kandang untuk memulai eksperimen. Mencit diletakkan pada batang rotarod, kemudian mesin rotarod dijalankan (300 detik, kecepatan 20 rpm, diulang 5 kali, interval 10-15 menit). *Timer* akan dimulai pada saat mesin rotarod dijalankan. *Timer* akan dihentikan saat mencit jatuh jatuh dari batang rotarod atau hingga waktu

berlalu 300 detik. Tes rotarod positif apabila mencit jatuh dari batang rotarod. Mencit kemudian akan dikembalikan ke kandang untuk istirahat selama minimal 10 menit sebelum penelitian diulang kembali. Tes rotarod ini dilakukan sebanyak 5 kali.

4.3.2.3 Prosedur ELISA

- a. Kumpulkan darah menggunakan EDTA atau heparin sebagai antikoagulan. Sampel di centrifuge selama sekitar 15 menit pada 1500×g (atau 5000 rpm) dalam waktu 30 menit setelah pengumpulan. Kumpulkan supernatan dengan hati-hati, uji segera atau simpan sampel pada -20°C atau -80°C. Hindari siklus pembekuan/pencairan berulang.
- b. Bawa semua reagen dan sampel ke suhu kamar (18°C - 25°C) biarkan selama 30 menit sebelum memulai prosedur pengujian. Jangan gunakan air panas untuk mencairkan sampel atau reagen. Microelisa Stripplate dapat dilepas, lepaskan strip yang tidak digunakan dari bingkai plat, kembalikan ke kantong foil dengan pengering, dan tutup kembali untuk mencegah peredam. Kemudian paket diisi dengan semua reagen, dilusi standar dan sampel serum. Buka *mikroplate strip* dan buat *layout* dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan kedalam *well*.
- c. Tetapkan well Standar, well Sampel dan well Kosong/Kontrol, tambahkan Standar 50 µl untuk setiap well Standar, tambahkan Sampel 50 µl untuk setiap well Sampel, tambahkan Sampel Pengencer 50 µl untuk setiap well Kosong/Kontrol. Semua Standar,

sampel dan Pengencer Sampel ditambahkan dalam rangkap ke pelat.

- d. Tambahkan 100 µl HRP-conjugate reagent ke masing-masing well, tutup dengan Closure Plate Membrane dan inkubasi selama 60 menit pada 37 ° C.
- e. Cuci pelat 4 kali.
- f. Pencucian Manual - Buang campuran inkubasi well ke dalam bak cuci atau wadah limbah yang tepat. Menggunakan pipet atau botol semprot, isi setiap well sepenuhnya dengan *Wash Solution* (1 x), setelah sekitar satu menit diberdirikan, balikkan dan tekan piring ke kertas penyerap atau handuk kertas sampai tidak ada uap air muncul. Ulangi prosedur ini empat kali. Catatan: Pegang sisi-sisi bingkai plat dengan kuat saat mencuci piring untuk memastikan bahwa semua strip tetap berada dalam bingkai.
- g. Pencucian Otomatis - Aspirasi semua sumur, kemudian cuci piring empat kali menggunakan *Wash Solution* (1 x). Selalu sesuaikan mesin untuk menyedot cairan sebanyak mungkin dan mengatur volume pengisian pada 350µl/well/pencucian. Setelah pencucian terakhir, balikkan piring, dan keringkan dengan memukul piring pada kertas penyerap atau handuk kertas sampai tidak ada uap air yang muncul.
- h. Tambahkan Solusi Chromogen A 50µl dan Solusi Chromogen B 50µl ke masing-masing well secara berturut-turut. Kemudian lindungi dari cahaya untuk menetaskan selama 15 menit pada suhu 37 ° C.

- i. Tambahkan 50µl Stop Solution ke masing-masing well. Warna dalam well harus berubah dari biru menjadi kuning.
- j. Baca *Optic Density* (OD) pada 450 nm menggunakan pembaca ELISA dalam waktu 15 menit setelah menambahkan Stop Solution (Sekitar 5 menit adalah waktu terbaik).

4.3.2.4 Perhitungan Hasil Elisa

- a. Rata-rata pembacaan duplikat untuk setiap standar dan sampel untuk mengurangi kepadatan optic density dari Kosong/Kontrol (VB / C).

Standards (concentration):	0	S _I	S _{II}	S _{III}	S _{IV}	S _V	S _{VI}
Mean O.D.(450nm):	V _{B/C}	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆
Adjusted:	0	V ₁ -V _{B/C}	V ₂ -V _{B/C}	V ₃ -V _{B/C}	V ₄ -V _{B/C}	V ₅ -V _{B/C}	V ₆ -V _{B/C}

- b. Menggunakan curve fitting software profesional untuk membuat kurva standar (biasanya sebagian besar kurva adalah linier, dan beberapa kurva adalah kuadrat atau kubik) dan menghitung kadat analit.
- c. Catatan: Setiap variasi suhu lingkungan, peralatan, operasi, pemipaan, pencucian, suhu atau waktu inkubasi, dan usia kit dapat menyebabkan variasi dalam hasil. Setiap pengguna harus mendapatkan kurva standarnya sendiri.

4.3.2.5 Prosedur Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA

- a. Volume sampel sekitar 100 µg/ul jaringan atau darah dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocyanate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat

- no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100.
- b. Selanjutnya diputar dengan kecepatan 12.000 rpm. Sedimen ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50ml H₂O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi di atom ini dapat mengikat 10 µg RNA/DNA jaringan/darah, kemudian dilakukan "vortex" dan disentrifugasi di dalam tabung Eppendorf 1.5 ml dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit.
 - c. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2".
 - d. Selanjutnya divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton.
 - e. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam waterbath pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCL pH 8.0, kemudian dilakukan vortex dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian diinkubasi dalam oven selama 10 menit pada suhu 56°C.
 - f. Lalu dilakukan vortex dan sentrifugasi ulang selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan dari

proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan analisis PCR.

4.3.2.6 Prosedur Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen target

- a. Proses gen spesifik oligonukleotida primer untuk GAPDH sebagai housekeeping gene (internal control). Mendeteksi gen mRNA GABRB3 dengan menggunakan primer spesifik Forward and Reverse. Mendeteksi gen GABRB3 dengan GAPDH (standar housekeeping gene), artinya kedua primer tersebut dikerjakan bersamaan. Perubahan standar GAPDH dihitung sebagai slope.
- b. Protokol PCR dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit. Siklus diulang 38 kali dengan 54°C (30 detik).
- c. Mendeteksi gen GAPDH dengan menggunakan Forward / Sense primer: AGAGGGAAATCGTGCGTGAC; Protokol PCR: 94°C (10 menit); 32 siklus 54°C (30 detik). Dan Reverse / Antisense primer: CAATAGTGATGACCTGGCC GT sesuai dengan protokol Tomomi Yajima, qRT-PCR menggunakan Green qRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen Biorad. Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR.
- d. Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam reaksi, diencerkan 1:500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya.

Mengencerkan 2 x SYBR Green qRT-PCR master mix dan disimpan di atas es.

- e. Mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 4°C dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang.
- f. Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti: campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan) 12,5 µl dari 2 x SYBR Green qRT-PCR master mix ditambah 1 µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna referens dari tahap 1 (opsional) serta 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan.
- g. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan 1 µl RNA percobaan pada setiap tabung reaksi.
- h. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi). Reaksi disentrifugasi dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA)

4.3.2.7 Prosedur Perhitungan Kurva Kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)

- a. Buatlah kalibrasi kurva dimana RNA GAPDH, sebagai housekeeping enzim, digunakan sebagai kontrol endogen.
- b. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi.
- c. Rumus untuk log ng hTR dan GAPDH adalah sebagai berikut:
KONSENTRASI ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).
- d. Untuk menormalkan perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke setiap reaksi, GAPDH adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen.
- e. Normalisasi konsentrasi gen target, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen target di berbagai sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi target oleh konsentrasi GAPDH.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah populasi mencit BALB/c berusia 8 minggu dengan berat 25-35 gram dan akan dipelihara di laboratorium hewan pada laboratorium biologi molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

4.5 Cara Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *random allocation*.

4.6 Cara Perhitungan Sampel

Besar sampel menurut rumus Federer yaitu: $(t-1) (n-1) \geq 15$, dengan (t) adalah kelompok perlakuan dan (n) adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan.

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

$$(3-1) (n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$N \geq 8,5$$

$$N = 9$$

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah sampel tiap kelompok adalah 9 ekor. Jumlah sampel ini akan ditambah 20% dari total sampel setiap kelompoknya sebagai cadangan, yaitu sekitar 2 ekor mencit per kelompok, sehingga jumlah mencit per kelompok uji menjadi 11 ekor mencit. Oleh karena terdapat empat kelompok uji, maka total jumlah sampel adalah 44 ekor mencit BALB/c.

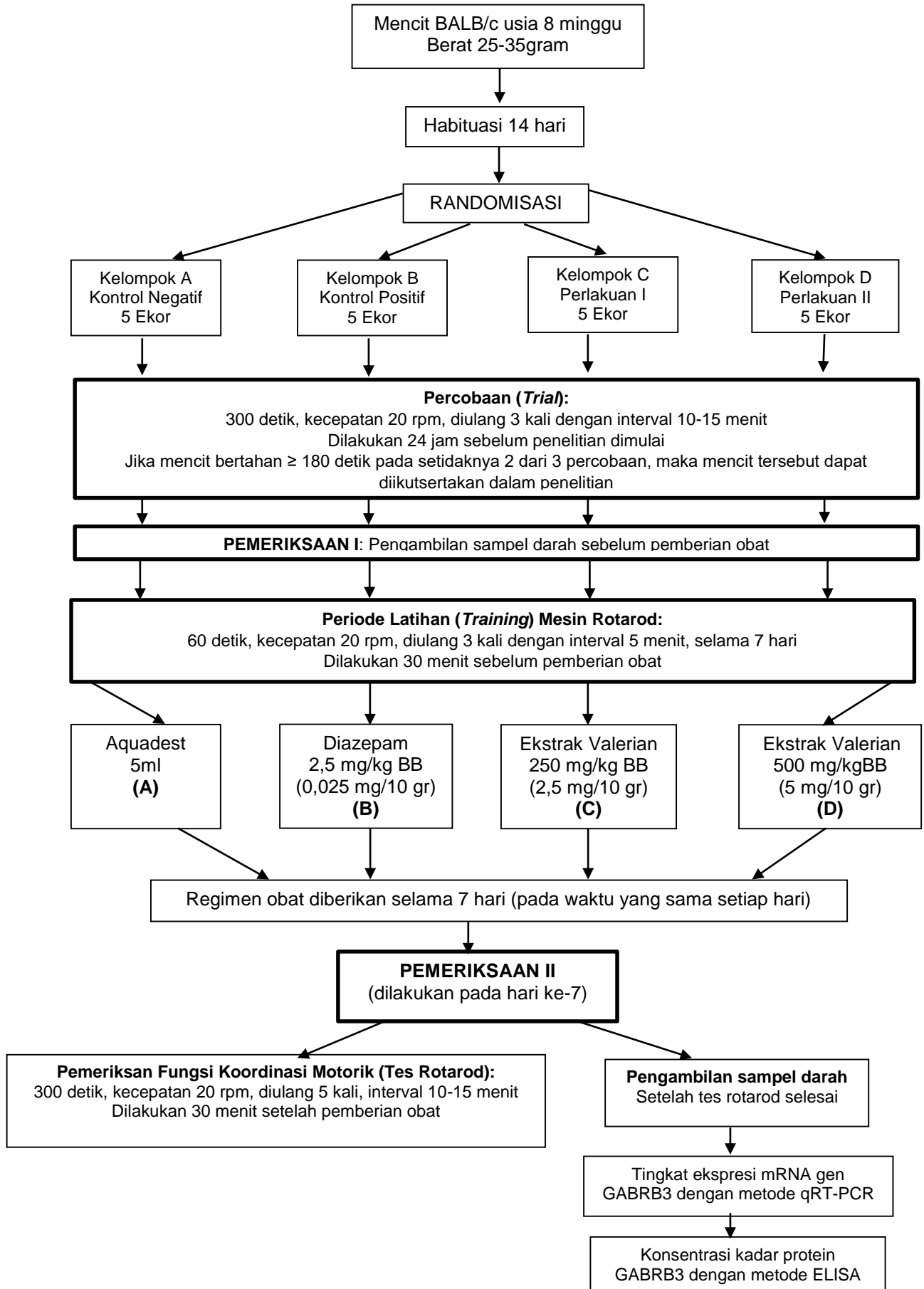
Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada besar sampel minimal menurut WHO untuk penelitian terhadap pengobatan tradisional jangka pendek yang menggunakan hewan yaitu sebanyak 5 (lima) ekor.

4.7 Kriteria Inklusi

4.7.1 Kriteria Inklusi

- Mencit BALB/c jantan berusia 8 minggu.
- Mencit BALB/c dengan berat 25-35 gr.
- Tidak ada kelainan anatomi.
- Mencit BALB/c yang secara fisik sehat dan belum pernah diberikan perlakuan khusus, belum pernah dijadikan hewan percobaan.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Pengolahan Data

Hasil pengamatan akan dianalisis secara analitik dan deskriptif. Data numerik yang sudah terkumpul akan dimasukkan ke dalam data komputer menggunakan program *Stata 15.0*.

4.10 Uji Statistik

Pada penelitian ini akan dilakukan analisa statistik terhadap tiga variabel terikat yang merupakan hasil penelitian. Variabel terikat pertama adalah pemeriksaan ekspresi mRNA gen GABRB3 dengan teknik pemeriksaan *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Variabel terikat kedua adalah pemeriksaan kadar protein GABRB3 yang diperiksa dengan teknik pemeriksaan *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Variabel terikat ketiga adalah pemeriksaan efek sedasi pada mencit BALB/c melalui pemeriksaan koordinasi motorik yang disebut dengan Tes Rotarod.

Analisa statistik akan dilakukan antara populasi mencit yang tersebar ke dalam empat kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan dua kelompok perlakuan. Uji normalitas data akan dilakukan terlebih dahulu dengan menggunakan uji statistik *Shapiro-Wilks*. Adapun teknik analisa statistik yang akan digunakan pada penelitian ini adalah uji *ANOVA* untuk melihat perbedaan numerik pada 4 kelompok, uji *Paired T-test* untuk melihat perbedaan nilai rerata pada kondisi sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing keelompok maupun *Independent T-test* untuk melihat perbedaan nilai rerata baik pada kondisi sebelum dan sesudah perlakuan antara 2 kelompok yang berbeda.

4.11 Masalah Etika

Penelitian ini telah memperoleh Rekomendasi Peseetujuan Etik dengan Nomor 903 / H4.8.4.5.31 / PP36-KOMTEK / 2017 tanggal 31 Oktoebr 2017 dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian

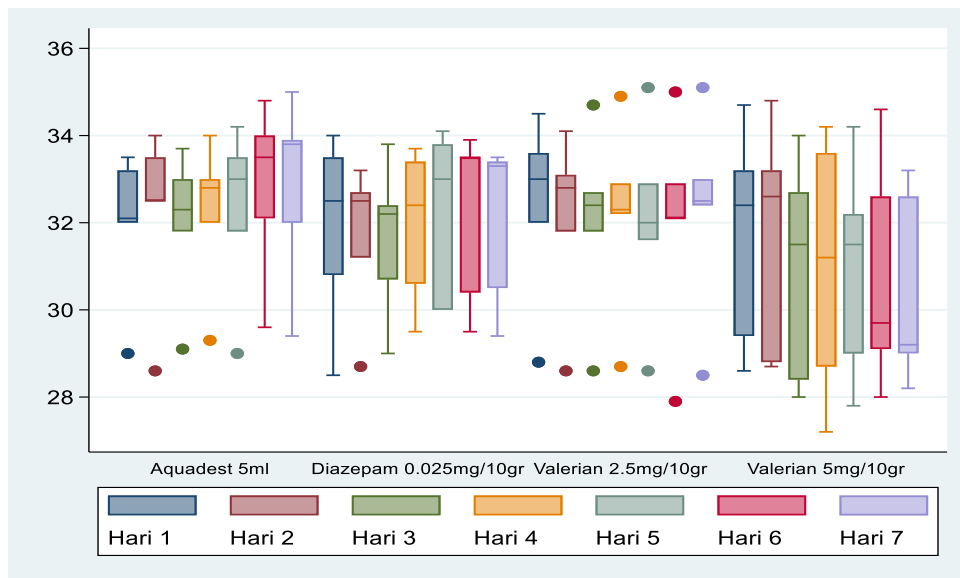
Penelitian ini dilakukan di laboratorium hewan dan laboratorium biologi molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan pada bulan April hingga Mei 2018. Penelitian ini dilakukan terhadap 20 mencit BALB/C jantan berusia 8 minggu, yang dibagi secara acak ke dalam 4 kelompok, agar variasi mencit terbagi secara merata pada setiap kelompok. Keempat kelompok tersebut adalah kelompok kontrol negatif yaitu kelompok Aquadest 5 ml, kelompok kontrol positif yaitu kelompok Diazepam 0,025 mg/10 gr, kelompok perlakuan I yaitu kelompok ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan kelompok perlakuan II yaitu kelompok ekstrak Valerian 5 mg/10 gr. Hasil uji homogenitas antara keempat kelompok berdasarkan berat badan dan dosis obat dapat dilihat pada tabel 5.1 dan 5.2.

Dari tabel 5.1 dibawah, dapat dilihat bahwa berat badan mencit BALB/c pada penelitian ini bervariasi antara 27,2 gram hingga 35,1 gram. Hasil uji statistik *Kruskal Wallis* pada nilai rerata berat mencit BALB/c pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml), kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr), kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan, dengan nilai $p > 0,05$ pada pengamatan sejak hari pertama hingga hari ketujuh. Hal tersebut menunjukkan bahwa berat mencit pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan mempunyai karakteristik yang homogen dan bukan sebagai perancu atau bias yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

Tabel 5.1 Perbandingan Berat Mencit BALB/c Pada Pengamatan Selama Tujuh Hari

Pengamatan	Aquadest	Diazepam	Valerian	Valerian	Min-Maks	Nilai P
	5ml	0,025mg/10gr	2,5mg/10gr	5 mg/10gr		
Mean±SD						
Hari 1	31,96±1,78	31,86±2,24	32,38±2,19	31,66±2,58	28,5-34,7	0,963
Hari 2	32,22±2,13	31,66±1,81	32,08±2,11	31,62±2,74	28,6-34,8	0,955
Hari 3	31,98±1,76	31,62±1,83	32,04±2,21	30,92±2,64	28-34,7	0,841
Hari 4	32,22±1,78	31,92±1,82	32,2±2,24	30,98±3,03	27,2-34,9	0,943
Hari 5	32,3±2,04	32,18±2,03	32,04±2,35	30,94±2,56	27,8-35,1	0,757
Hari 6	32,8±2,04	32,16±2,04	32±2,58	30,8±2,72	27,9-35	0,635
Hari 7	32,82±2,19	32,02±1,93	32,3±2,39	30,44±2,29	28,2-35,1	0,280

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi (SD), minimal, maksimal, dan probalitas (nilai *p*) diuji dengan metode *Kruskal Wallis*, uji statistik dinyatakan bermakna apabila nilai *p* < 0,05.



Grafik 1. *Box Plot* Perbandingan Berat Mencit Setiap Kelompok Selama Tujuh Hari

Dari grafik *Box Plot* (Grafik 1) di atas terlihat bahwa mencit pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) memiliki berat badan yang perbedaannya tidak signifikan dengan mencit pada ketiga kelompok lainnya. Sementara berat mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) menunjukkan dispersi atau standar deviasi yang paling kecil dibandingkan dengan mencit pada

kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr), kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dan kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml).

Tabel 5.2 Perbandingan Dosis Obat Pada Pengamatan Selama Tujuh Hari

Variabel	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Nilai <i>P</i>
	Mean±SD							
Aquadest 5ml	5	5	5	5	5	5	5	1,000
Diazepam 0.025mg/10gr	0,079±0,01	0,079±0,01	0,079±0,01	0,079±0,01	0,080±0,01	0,080±0,01	0,080±0,01	0,998
Valerian 2,5mg/10gr	8,10±0,55	8,02±0,53	8,04±0,55	8,06±0,56	8,02±0,59	8±0,65	8,08±0,59	1,000
Valerian 5mg/10gr	15,84±1,29	15,81±1,37	15,48±1,32	15,5±1,52	15,48±1,28	15,42±1,36	15,22±1,14	0,989

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi (SD), dan probalitas (nilai *p*) diuji dengan metode ANOVA, uji statistik dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$.

Pada tabel 5.2 di atas terlihat bahwa mencit pada kelompok kontrol negatif tidak diberikan obat apapun selain Aquadest 5 ml. Pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) terlihat dosis obat yang diberikan sangat kecil dengan rerata dosis pada hari pertama sebesar 0,079 mg dan terus berkisar pada dosis yang serupa hingga hari ketujuh. Pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) rerata dosis obat yang diberikan adalah 8,1 mg selama 7 hari. Pemberian dosis obat terbesar ditemukan pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan rerata dosis obat 15,84 mg pada hari pertama dan 15,22 mg pada hari ketujuh. Hasil uji statistik ANOVA pada rerata dosis obat setiap kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$.

5.2 Gambaran Karakteristik Variabel Terikat

Terdapat tiga variabel terikat yang diukur pada penelitian ini dan variabel-variabel tersebut merupakan parameter hasil penelitian yang dipengaruhi oleh empat variabel bebas yaitu Aquadest 5 ml, Diazepam 0,025 mg/10 gr, ekstrak

Valerian 2,5 mg/10 gr, dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr. Variabel terikat pertama yang adalah pemeriksaan ekspresi mRNA gen GABRB3 dengan teknik pemeriksaan *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR). Variabel terikat kedua adalah pemeriksaan kadar protein GABRB3 yang diperiksa dengan teknik pemeriksaan *The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Variabel terikat ketiga adalah pemeriksaan efek sedasi pada mencit BALB/c melalui pemeriksaan koordinasi motorik yang disebut dengan tes Rotarod. Rotarod merupakan alat yang biasanya digunakan untuk pengujian efek sedatif-hipnotik. Alat ini digunakan untuk menentukan waktu ketahanan mencit (detik) terhadap perputaran roda dengan kecepatan tertentu. Efek sedatif-hipnotik diperlihatkan dengan semakin cepatnya mencit terjatuh dari rotarod.

Untuk mengetahui apakah data yang digunakan dalam penelitian ini memiliki distribusi data yang merata atau tidak, maka dilakukanlah uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilks*. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui sebaran data acak suatu sampel kecil. Hasil uji normalitas data ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.3 Hasil uji normalitas data kadar protein GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.4 Hasil uji normalitas data pada tes rotarod dapat dilihat pada tabel 5.5.

Hasil uji normalitas data dengan uji *Shapiro-Wilks* pada tabel 5.3 memperlihatkan bahwa ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan pada keempat kelompok mempunyai distribusi data yang normal dengan nilai $p > 0,05$. Demikian pula hasil uji normalitas pada tabel 5.4 memperlihatkan bahwa kadar protein GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan pada keempat kelompok mempunyai distribusi data yang normal dengan nilai $p > 0,05$.

Tabel 5.3 Uji Normalitas Data Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan

No	Variabel	N	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	mRNA GABRB3 Sebelum	20	6,027	0,539	5,059	6,889	6,151	
	Aquadest 5 ml	5	5,88	0,469	5,448	6,409	5,617	0.069
	Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	5,88	0,693	5,059	6,654	5,913	0.577
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5	6,321	0,548	5,509	6,889	6,256	0.598
	Valerian 5 mg/10 gr	5	6,028	0,467	5,379	6,585	6,115	0.951
2.	mRNA GABRB3 Sesudah	20	9,171	2,57	5,622	13,193	8,897	
	Aquadest 5 ml	5	6,046	0,377	5,622	6,603	5,916	0.769
	Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	8,064	0,451	7,529	8,746	8,019	0.885
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5	12,796	0,416	12,158	13,193	12,892	0.563
	Valerian 5 mg/10 gr	5	9,778	0,486	9,048	10,347	9,809	0.898

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, dan median. Kemudian Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilks*, distribusi data dikatakan normal bila nilai $p > 0,05$. Satuan fold change digunakan untuk ekspresi mRNA gen GABRB3.

Tabel 5.4 Uji Normalitas Data Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan

No	Variabel	N	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Protein GABRB3 Sebelum	20	2,098	0,551	0,947	2,646	2,365	
	Aquadest 5 ml	5	2,048	0,409	1,579	2,493	1,933	0,343
	Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	1,869	0,817	0,947	2,623	2,284	0,085
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5	2,371	0,317	1,846	2,646	2,421	0,240
	Valerian 5 mg/10 gr	5	2,102	0,588	1,088	2,508	2,379	0,038
2.	Protein GABRB3 Sesudah	20	3,689	1,281	2,025	5,468	3,118	
	Aquadest 5 ml	5	2,299	0,209	2,025	2,554	2,364	0,825
	Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	2,849	0,152	2,71	3,046	2,783	0,235
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5	5,359	0,1	5,198	5,468	5,377	0,535
	Valerian 5 mg/10 gr	5	4,248	0,738	3,19	4,973	4,527	0,523

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, dan median. Kemudian Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilks*, distribusi data dikatakan normal bila nilai $p > 0,05$. Satuan $\mu\text{mol/L}$ digunakan untuk kadar protein GABRB3.

Tabel 5.5 Uji Normalitas Tes Rotarod Pada Keempat Kelompok Perlakuan

Variabel	N	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
Tes Rotarod (detik)	20	183,71	95,946	7,4	300	215,9	
Aquadest 5 ml	5	274,88	29,332	243	300	288	0,05
Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	181,68	86,214	71,2	282,2	212	0,678
Valerian 2,5 mg/10 gr	5	121,44	109,921	7,4	251	99	0,371
Valerian 5 mg/10 gr	5	156,84	84,893	15,2	221,8	200,4	0,1

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, dan median. Kemudian Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilks*, distribusi data dikatakan normal bila nilai $p > 0,05$

Hasil uji normalitas dengan uji Shapiro-Wilks pada tabel 5.5 memperlihatkan bahwa hasil pemeriksaan fungsi koordinasi motorik (tes rotarod) sesudah perlakuan pada keempat kelompok mempunyai distribusi data yang normal dengan nilai $p > 0,05$.

5.3 Variabel Terikat : Ekspresi mRNA gen GABRB3 dan Kadar Protein

GABRB3

5.3.1 Perbandingan Antara Variabel Terikat Sebelum dan Sesudah

Perlakuan

Untuk mengamati perubahan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 maka dilakukan perbandingan antara nilai sebelum dan sesudah perlakuan pada setiap kelompok. Hasil perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.6, sedangkan hasil perbandingan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.7. Perbedaan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan diuji dengan uji statistik *Paired T-test* karena data berdistribusi normal pada masing-

masing kelompok. Uji *Paired T-test* merupakan uji statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan rerata hanya pada dua kelompok yang berpasangan.

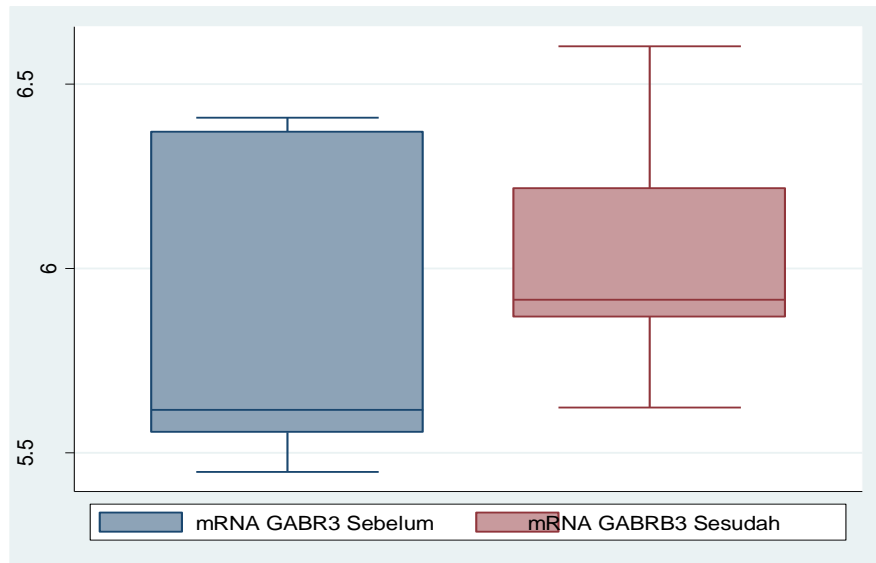
Tabel 5.6 dibawah menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 yang signifikan pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/ 10 gr), perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/ 10 gr) dan perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan nilai $p < 0,0001$. Sementara perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p > 0,05$.

Peningkatan ekspresi paling besar terlihat pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dengan ekspresi awal sebesar 6,321 dan meningkat 2 kali lipat menjadi 12,796 sesudah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$. Pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) juga terlihat peningkatan ekspresi yang signifikan sebesar 3,750 dengan nilai $p < 0,0001$.

Tabel 5.6 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Antara Sebelum dan Sesudah Perlakuan

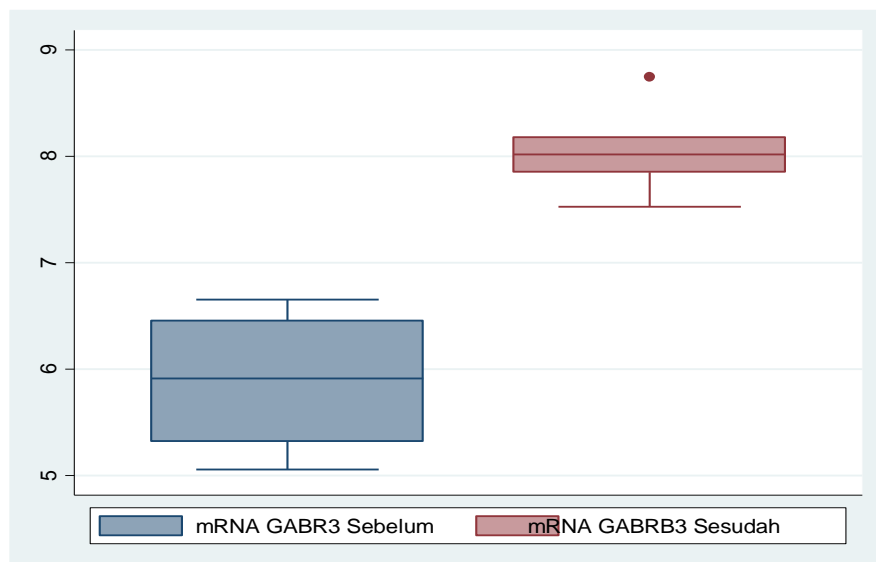
No	Kelompok	N	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	mRNA GABRB3 Kontrol Negatif (Aquadest 5ml)							
	Sebelum Perlakuan	5	5,88	0,469	5,448	6,409	5,617	0,653
Sesudah Perlakuan	5	6,046	0,377	5,622	6,603	5,916		
2.	mRNA GABRB3 Kontrol Positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	5,88	0,693	5,059	6,654	5,913	<0,0001
Sesudah Perlakuan	5	8,064	0,451	7,529	8,746	8,019		
3.	mRNA GABRB3 Perlakuan I (Valerian 2,5 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	6,321	0,548	5,509	6,889	6,256	<0,0001
Sesudah Perlakuan	5	12,796	0,416	12,158	13,193	12,892		
4.	mRNA GABRB3 Perlakuan II (Valerian 5 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	6,028	0,467	5,379	6,585	6,115	<0,0001
Sesudah Perlakuan	5	9,778	0,486	9,048	10,347	9,809		

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai p diuji dengan *Paired T-test*, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$. Satuan fold change digunakan untuk ekspresi mRNA gen GABRB3.



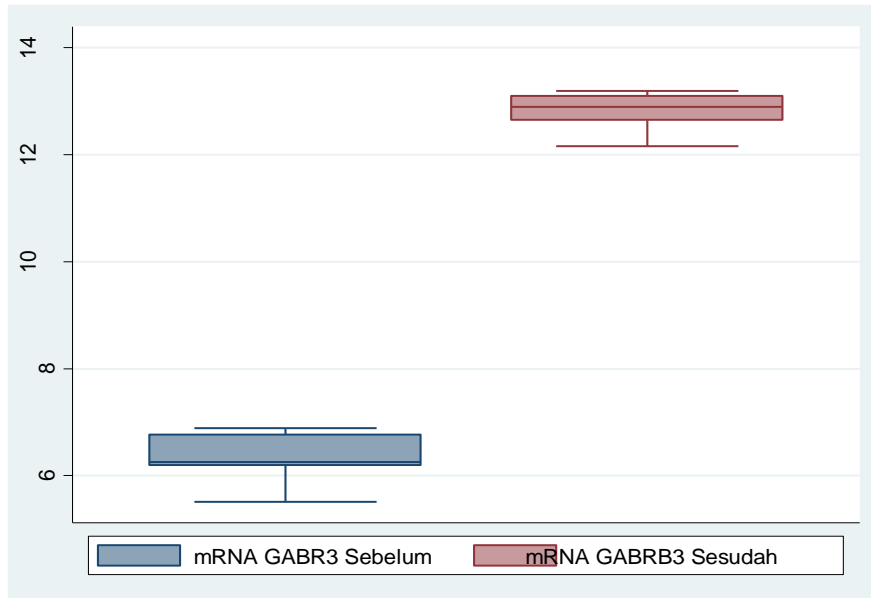
Grafik 2. *Box Plot* Perbedaan Rerata Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Negatif Aquades 5 ml

Dari grafik *box plot* di atas (grafik 2) terlihat perbedaan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah pemberian Aquadest 5 ml, namun perbedaan tersebut tidak signifikan.



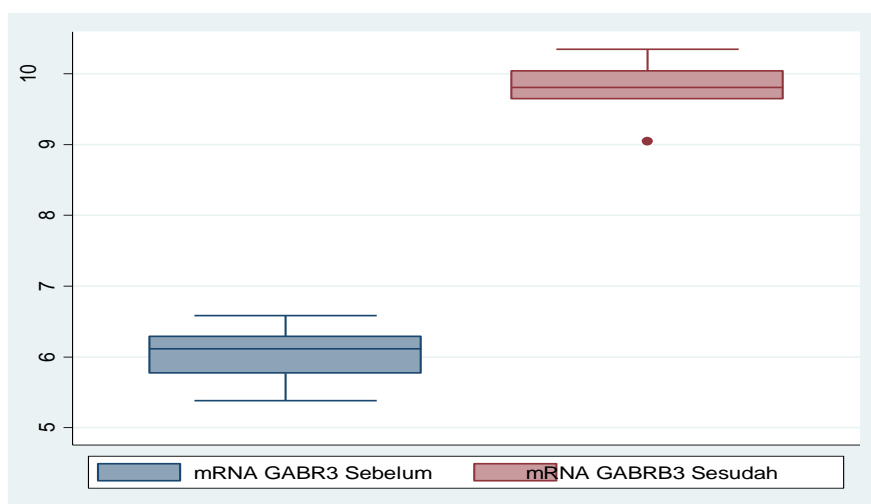
Grafik 3. *Box Plot* Perbedaan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Kelompok Kontrol Positif Diazepam 0,025 mg/10 gr

Dari grafik *box plot* di atas (grafik 3) terlihat peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 yang signifikan sesudah pemberian Diazepam 0,025 mg/10 gr.



Grafik 4. *Box Plot* Perbedaan mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan Valerian 2,5 mg/10 gr

Dari grafik *box plot* di atas (grafik 4) terlihat peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 yang paling besar dan signifikan sesudah pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr.



Grafik 5. *Box Plot* Perbedaan ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan Valerian 5 mg/10 gr.

Dari grafik *box plot* diatas (grafik 5) terlihat peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 yang signifikan sesudah pemberian ekstrak Valerian 5 mg/10 gr.

Tabel 5.7 Perbandingan Antara Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan

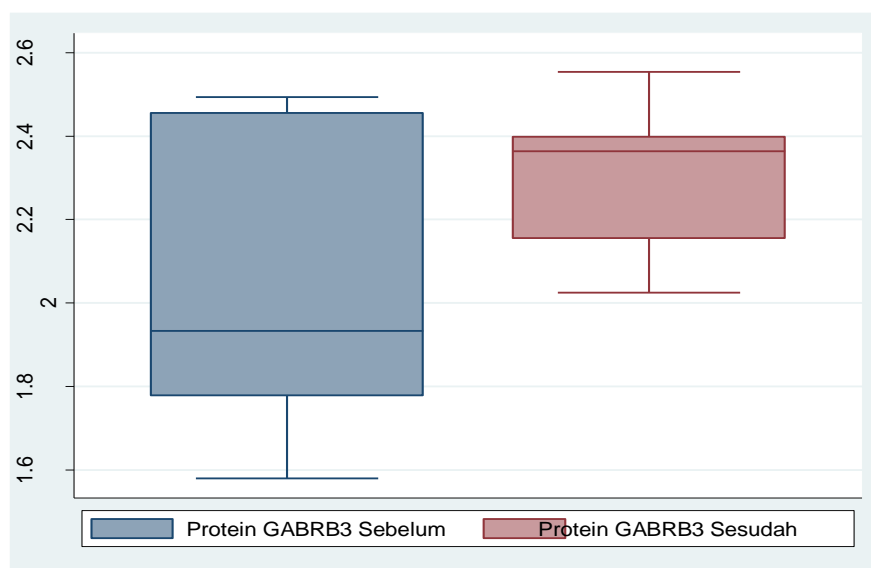
No	Kelompok	N	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Protein GABRB3 Kontrol Negatif (Aquadest 5 ml)							
	Sebelum Perlakuan	5	2,048	0,409	1,579	2,493	1,933	0,341
	Sesudah Perlakuan	5	2,299	0,209	2,025	2,554	2,364	
2.	Protein GABRB3 Kontrol Positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	1,869	0,817	0,947	2,623	2,284	0,067
	Sesudah Perlakuan	5	2,849	0,152	2,71	3,046	2,783	
3.	Protein GABRB3 Perlakuan I (Valerian 2,5 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	2,371	0,317	1,846	2,646	2,421	<0,0001
	Sesudah Perlakuan	5	5,359	0,1	5,198	5,468	5,377	
4.	Protein GABRB3 Perlakuan II (Valerian 5 mg/10 gr)							
	Sebelum Perlakuan	5	2,102	0,588	1,088	2,508	2,379	<0,0001
	Sesudah Perlakuan	5	4,248	0,738	3,19	4,973	4,527	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai *p* diuji dengan *Paired T-test*, uji statistik bermakna bila nilai *p* <0,05. Satuan $\mu\text{mol/L}$ digunakan untuk kadar protein GABRB3.

Tabel 5.7 menunjukkan peningkatan kadar protein GABRB3 yang signifikan pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan nilai *p* <0,0001.

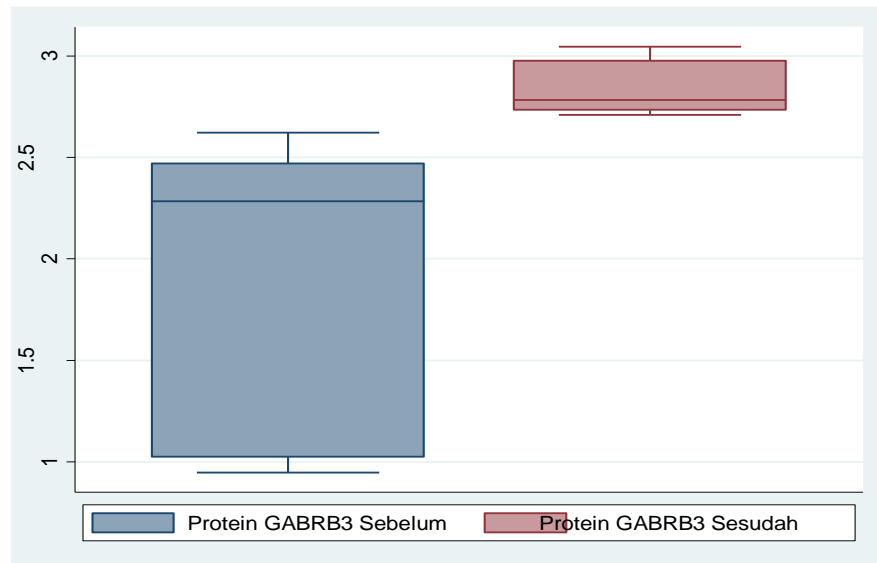
Perbandingan kadar protein GABRB3 pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,341. Perbandingan kadar protein GABRB3 pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,067, meskipun terlihat peningkatan kadar protein dari 1,869 menjadi 2,849 sesudah perlakuan.

Pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) terlihat peningkatan yang signifikan dari 2,371 menjadi 5,359 sesudah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$. Peningkatan kadar protein paling besar terjadi pada kelompok perlakuan I sebesar 2,988. Pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) terlihat peningkatan yang signifikan dari 2,102 menjadi 4,248 setelah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$.



Grafik 6. *Box Plot* Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Negatif Aquades 5 ml

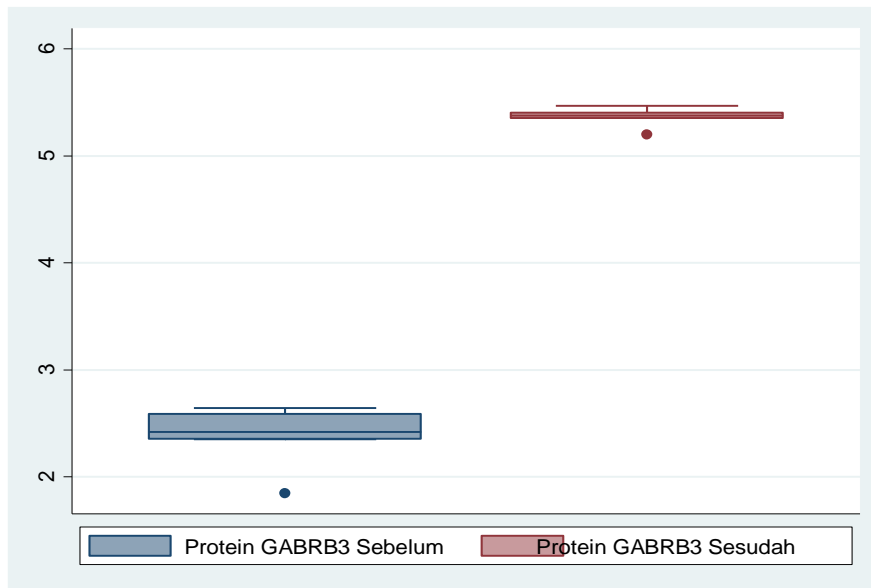
Dari grafik *box plot* (grafik 6) terlihat perbandingan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah pemberian Aquadest 5 ml yang menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan (nilai $p > 0,05$).



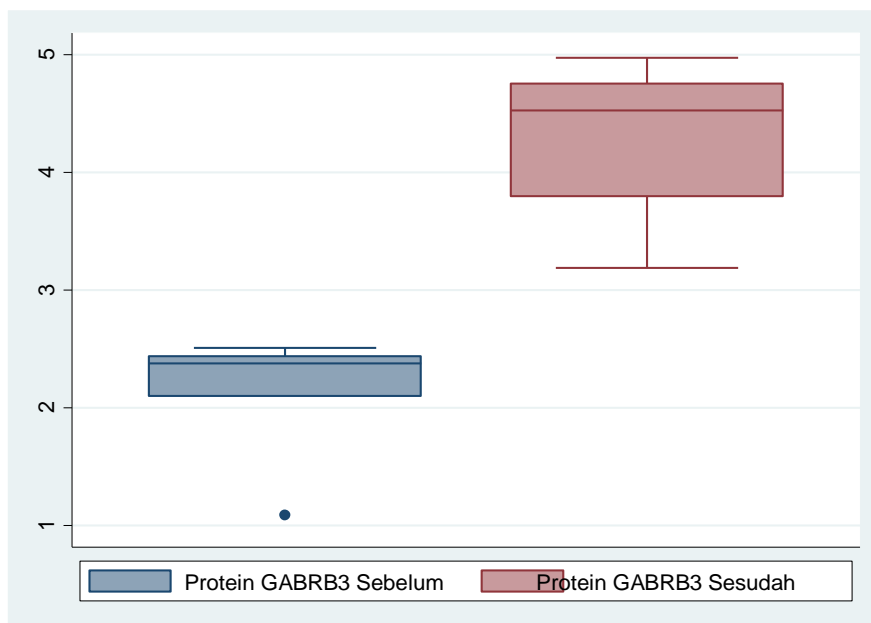
Grafik 7. *Box Plot* Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Kontrol Positif Diazepam 0,025 mg/10 gr

Dari grafik box plot (grafik 7) terlihat kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan menunjukkan rentang nilai yang cukup besar dari nilai terkecil 1 sampai dengan 2,5 dan kemudian mengalami peningkatan sesudah pemberian Diazepam 0,025 mg/10 gr. Meskipun kadar protein GABRB3 meningkat tapi perbedaannya tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,067.

Dari grafik box plot (grafik 8) dibawah terlihat peningkatan kadar protein GABRB3 yang signifikan sesudah pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr. Terlihat dari grafik kadar protein meningkat dari 2,371 menjadi 5,359 dengan nilai $p < 0,0001$. Peningkatan kadar protein paling besar terjadi pada kelompok perlakuan I sebesar 2,988



Grafik 8. *Box Plot* Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan Valerian 2,5 mg/10 gr



Grafik 9. *Box Plot* Perbedaan Kadar Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Pada Kelompok Perlakuan Valerian 5 mg/10 gr

Dari grafik *box plot* (grafik 9) terlihat peningkatan kadar protein GABRB3 yang cukup signifikan sesudah pemberian ekstrak Valerian 5 mg/10 gr dengan

nilai $p < 0,0001$. Namun peningkatan kadar protein GABRB3 ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr).

5.3.2 Perbandingan Antara Variabel Terikat Pada Keempat Kelompok

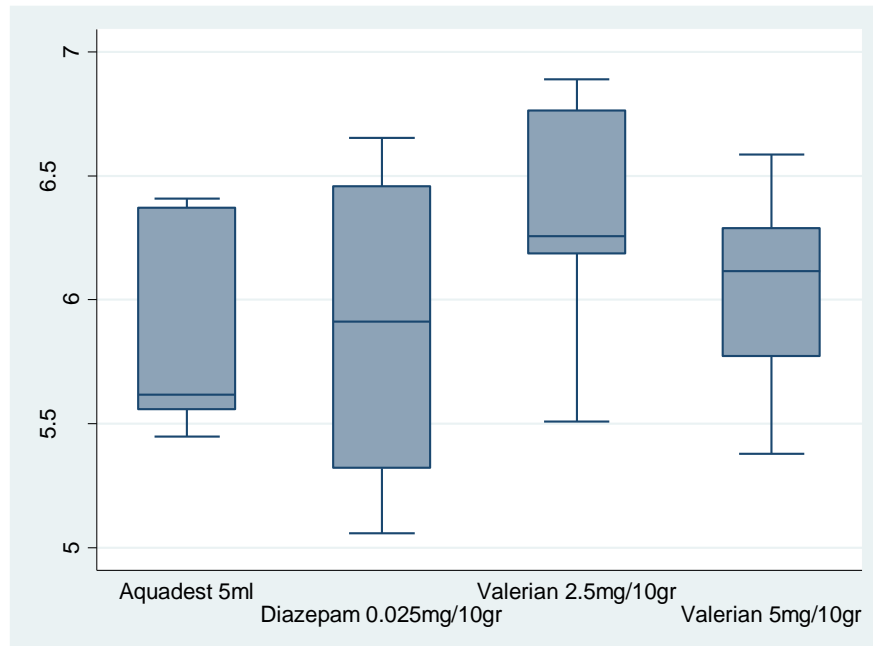
Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan pada keempat kelompok dapat dilihat pada tabel 5.8 dan tabel 5.9. Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 antara sebelum dengan sesudah perlakuan pada keempat kelompok diuji dengan uji statistik ANOVA karena data berdistribusi normal pada keempat kelompok. Uji ANOVA merupakan uji statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan numerik pada keempat kelompok.

Tabel 5.8 Perbandingan Antara Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok

No	Variabel	N	Mean	SD	Median	Min-Max	Nilai P	Nilai F
1. mRNA gen GABRB3 Sebelum								
	Aquadest 5 ml	5	5,88	0,469	5,617	5,448-6,409		
	Diazepam 0.025mg/10 gr	5	5,88	0,693	5,913	5,058-6,654	0,562	0,71
	Valerian 2.5mg/10gr	5	6,321	0,548	6,256	5,509-6,889		
	Valerian 5 mg/10gr	5	6,028	0,467	6,115	5,380-6,585		
2. mRNA gen GABRB3 Sesudah								
	Aquadest 5 ml	5	6,046	0,377	5,916	5,622-6,603		
	Diazepam 0.025mg/10gr	5	8,064	0,451	8,019	7,529-8,745	<0,0001	216,6
	Valerian 2.5mg/10gr	5	12,796	0,416	12,892	12,16-13,19		
	Valerian 5mg/10gr	5	9,778	0,486	9,809	9,048-10,35		

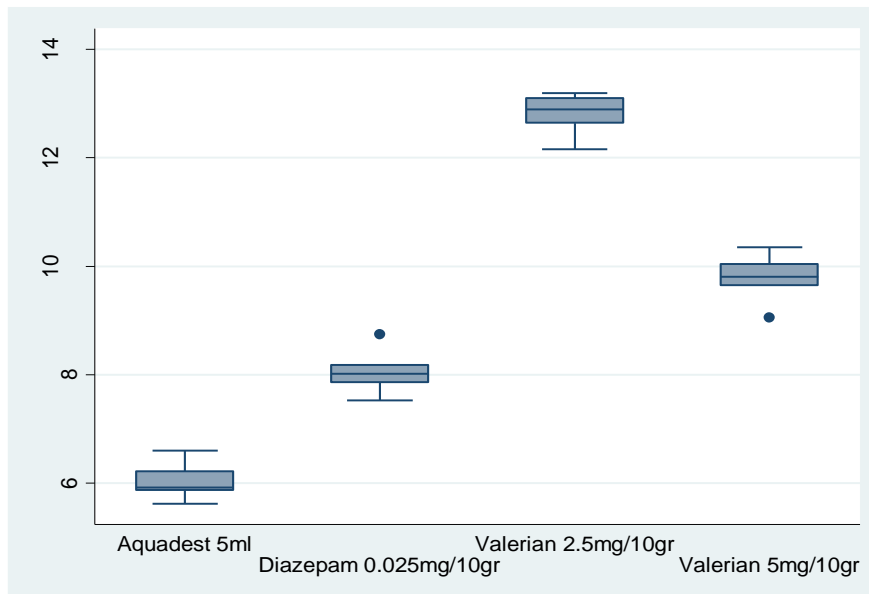
Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, median, minimal, maksimal, nilai p dan nilai F (Uji Serentak/Uji Model Anova) diuji dengan ANOVA, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$. Satuan fold change digunakan untuk ekspresi mRNA gen GABRB3.

Tabel 5.8 menunjukkan perbandingan antara ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,562. Sementara perbandingan antara ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$.



Grafik 10. *Box Plot* Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum Perlakuan Pada 4 Kelompok

Dari grafik *box plot* (grafik 10) di atas terlihat perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan antara keempat kelompok yang menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.



Grafik 11. *Box Plot* Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan Pada 4 Kelompok

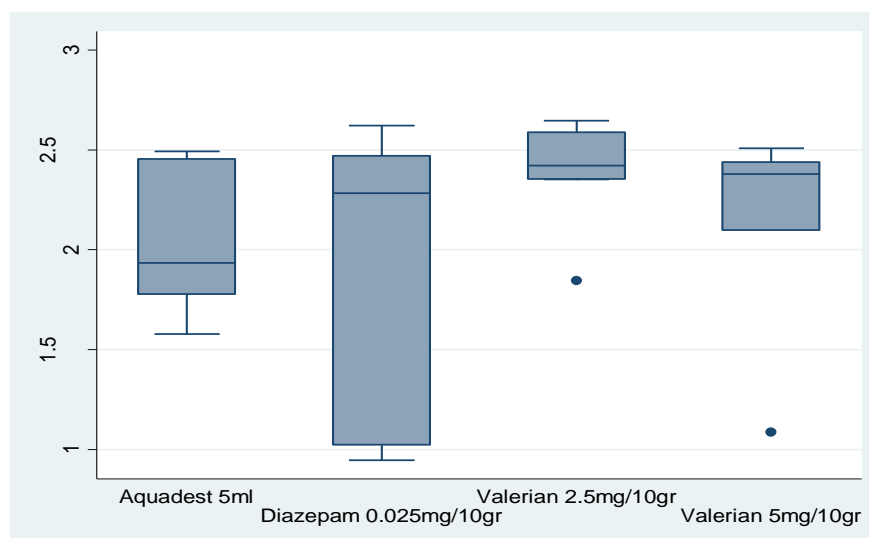
Dari grafik *box plot* (grafik 11) di atas terlihat perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan antara keempat kelompok. Secara visual terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara keempat kelompok. Grafik *box plot* juga menunjukkan kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) memiliki nilai ekspresi terendah, kemudian diikuti kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr). Sementara ekspresi mRNA gen GABRB3 pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) mempunyai nilai rerata yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Tabel 5.9 menunjukkan perbandingan kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,582. Sementara perbandingan antara kadar protein GABRB3 sesudah perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$.

Tabel 5.9 Perbandingan Antara Protein GABRB3 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok

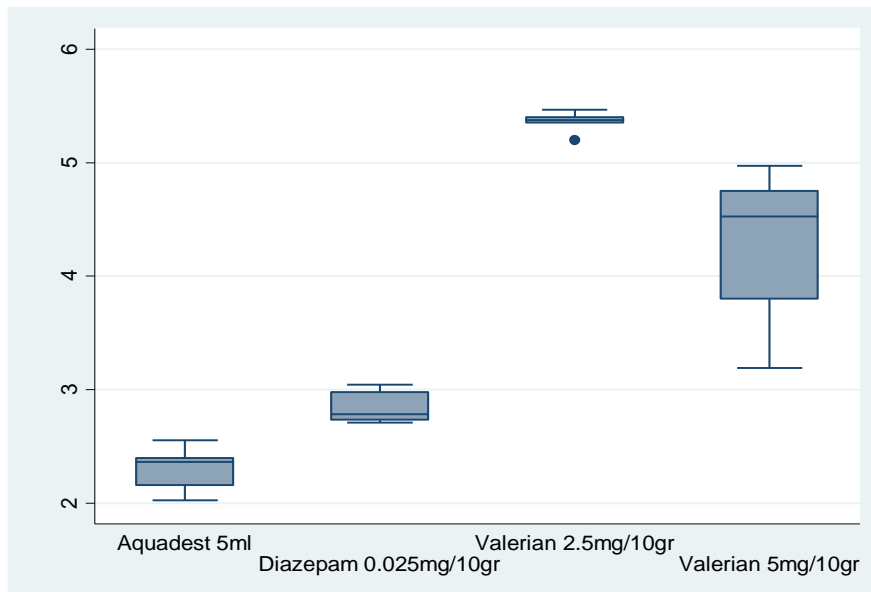
No	Variabel	N	Mean	SD	Median	Min-Max	Nilai P	Nilai F
1 Protein GABRB3 Sebelum								
	Aquadest 5 ml	5	2,048	0,409	1,933	1,579-2,493		
	Diazepam 0.025mg/10gr	5	1,869	0,817	2,284	0,947-2,623	0,582	0,67
	Valerian 2.5mg/10gr	5	2,371	0,317	2,421	1,846-2,646		
	Valerian 5mg/10gr	5	2,102	0,588	2,379	1,088-2,508		
2 Protein GABRB3 Sesudah								
	Aquadest 5 ml	5	2,299	0,209	2,364	2,025-2,554		
	Diazepam 0.025mg/10gr	5	2,849	0,152	2,783	2,710-3,045	<0,0001	61,49
	Valerian 2.5mg/10gr	5	5,359	0,1	5,377	5,198-5,468		
	Valerian 5mg/10gr	5	4,248	0,738	4,527	3,190-4,973		

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, median, minimal, maksimal, nilai *p* dan nilai F (Uji Serentak/Uji Model Anova) diuji dengan ANOVA, uji statistik bermakna bila nilai *p* <0,05. Satuan $\mu\text{mol/L}$ digunakan untuk kadar protein GABRB3.



Grafik 12. Box Plot Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan Pada 4 Kelompok

Dari grafik *box plot* (grafik 12) diatas terlihat perbandingan kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok. Distribusi nilai hampir serupa pada keempat kelompok dan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.



Grafik 13. *Box Plot* Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan Pada 4 Kelompok

Dari grafik *box plot* (grafik 13) terlihat perbandingan kadar protein GABRB3 sesudah perlakuan pada keempat kelompok. Secara visual terlihat adanya perbedaan nilai rerata yang signifikan. Kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) terlihat memiliki nilai rerata terendah, kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr). Nilai rerata protein GABRB3 terlihat paling tinggi pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr).

5.3.3 Perbandingan Variabel Terikat Antara Dua Kelompok

Perbandingan ini dilakukan untuk mengamati perubahan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 dipengaruhi oleh salah satu kelompok perlakuan atau dua kelompok perlakuan yang saling mempengaruhi satu dengan lainnya. Hasil perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 antara dua kelompok sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.10 dan tabel 5.11. Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar

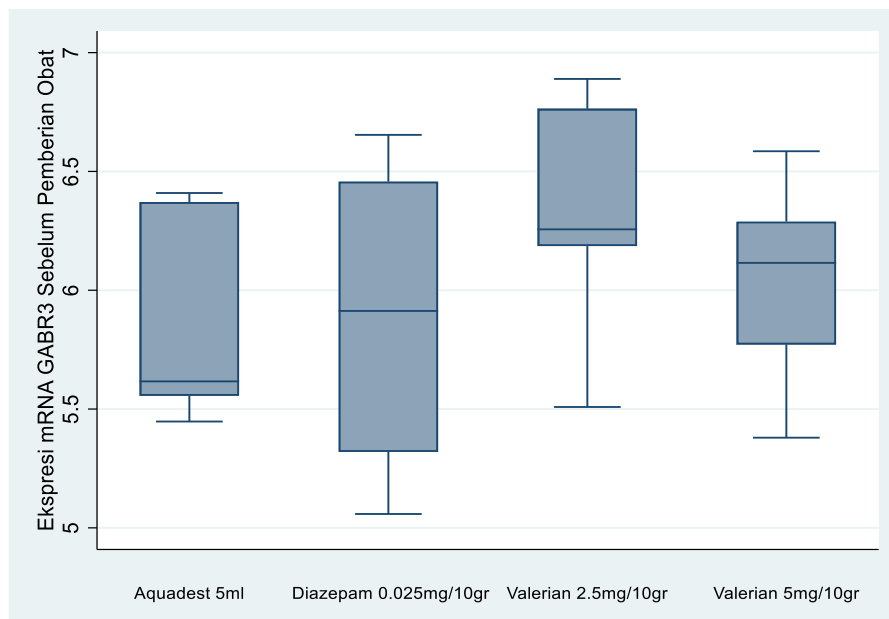
protein GABRB3 baik sebelum dan sesudah perlakuan diuji dengan uji statistik *Independent t-test* karena data berdistribusi normal pada masing-masing kelompok. Uji *Independent t-test* merupakan uji statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan rerata hanya pada dua kelompok yang tidak berpasangan.

Tabel 5.10 menunjukkan perbandingan ekspresi gen GABRB3 sebelum perlakuan antara dua kelompok. Dari hasil uji *Independent T-test* terlihat rerata ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan pada masing-masing kelompok memiliki nilai yang tidak jauh berbeda. Perbandingan nilai rerata antara 2 kelompok pada seluruh perbandingan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif (5,88) dengan kelompok kontrol positif (5,88) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,9990. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif (5,88) dengan kelompok perlakuan I (6,321) maupun dengan kelompok perlakuan II (6,028) juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,209 dan 0,631. Sementara perbandingan antara kelompok kontrol positif (5,88) dengan kelompok perlakuan I (6,321) maupun dengan kelompok perlakuan II (6,028) juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,298 dan 0,703. Perbandingan antara kelompok perlakuan I (6,321) dengan kelompok perlakuan II (6,028) juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,390. Jadi dapat disimpulkan bahwa ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan pada masing-masing kelompok mempunyai nilai rerata yang homogen dan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan menggunakan uji statistik *Independent T-test* karena nilai $p > 0,05$.

Tabel 5.10 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sebelum Perlakuan Antara Dua Kelompok

No	Variabel (n=5)	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Aquadest 5 ml	5,88	0,47	5,448	6,409	5,616	0,999
	Diazepam 0.025 mg/10 gr	5,88	0,693	5,058	6,653	5,913	
2.	Aquadest 5 ml	5,88	0,470	5,448	6,409	5,616	0,209
	Valerian 2.5 mg/10 gr	6,321	0,548	5,509	6,889	6,256	
3.	Aquadest 5 ml	5,88	0,470	5,448	6,409	5,616	0,631
	Valerian 5 mg/10 gr	6,028	0,467	5,379	6,585	6,115	
4.	Diazepam 0.025 mg/10 gr	5,88	0,693	5,058	6,653	5,913	0,298
	Valerian 2.5 mg/10 gr	6,321	0,548	5,509	6,889	6,256	
5.	Diazepam 0.025 mg/10 gr	5,88	0,693	5,058	6,653	5,913	0,703
	Valerian 5 mg/10 gr	6,028	0,467	5,379	6,585	6,115	
6.	Valerian 2.5 mg/10 gr	6,321	0,548	5,509	6,889	6,256	0,390
	Valerian 5 mg/10 gr	6,028	0,467	5,379	6,585	6,115	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai *p* diuji dengan *Independent t-test*, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$.



Grafik 14. *Box Plot* Perbedaan Mean Ekspresi mRNA GABRB3 Sebelum Perlakuan

Dari grafik box plot di atas (Grafik 14) terlihat adanya perbedaan rerata ekspresi mRNA GABRB3 yang tidak signifikan. Terlihat nilai rerata yang sama pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dan kelompok kontrol positif

(Diazepam 0,025mg/10gr). Pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5mg/10gr) terlihat nilai rerata yang sedikit lebih tinggi yaitu 6,321 bila dibandingkan dengan kelompok lainnya, namun nilai-nilai ini menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p>0,05$.

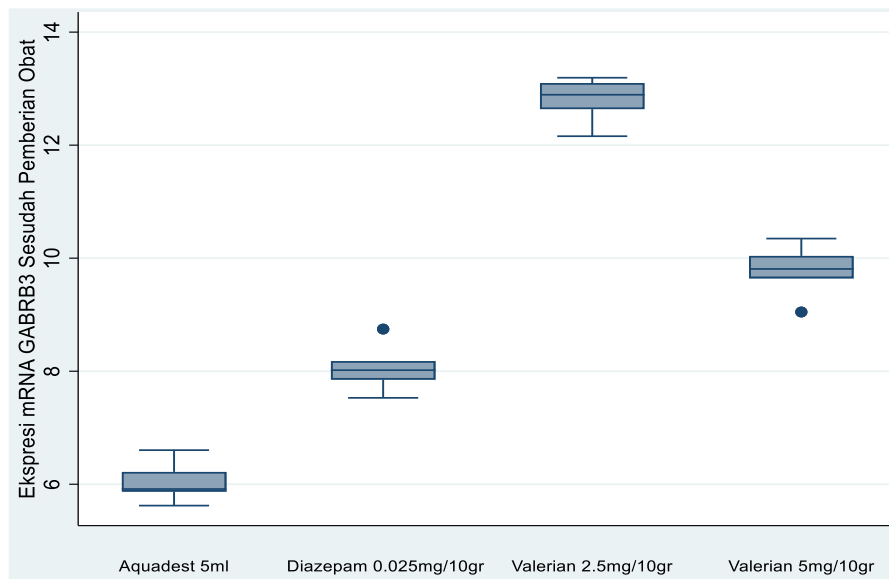
Tabel 5.11 Perbandingan Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan Antara Dua Kelompok

No	Variabel (n=5)	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Aquadest 5 ml	6,046	0,377	5,622	6,603	5,915	<0,0001
	Diazepam 0,025 mg/10gr	8,064	0,451	7,529	8,745	8,019	
2.	Aquadest 5 ml	6,046	0,377	5,622	6,603	5,915	<0,0001
	Valerian 2,5 mg/10 gr	12,796	0,416	12,158	13,193	12,892	
3.	Aquadest 5 ml	6,046	0,377	5,622	6,603	5,915	<0,0001
	Valerian 5 mg/10 gr	9,778	0,486	9,048	10,347	9,809	
4.	Diazepam 0,025 mg/10 gr	8,064	0,451	7,529	8,745	8,019	<0,0001
	Valerian 2,5 mg/10 gr	12,796	0,416	12,158	13,193	12,892	
5.	Diazepam 0.025 mg/10 gr	8,064	0,451	7,529	8,745	8,019	<0,0001
	Valerian 5 mg/10 gr	9,778	0,486	9,048	10,347	9,809	
6.	Valerian 2,5 mg/10 gr	12,796	0,416	12,158	13,193	12,892	<0,0001
	Valerian 5 mg/10 gr	9,778	0,486	39,048	10,347	9,809	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai p diuji dengan *Independent t-test*, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Uji statistik *Independent T-test* pada tabel 5.11 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan antara 2 kelompok yang signifikan pada seluruh perbandingannya dengan nilai $p < 0,0001$. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun dengan kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$. Perbandingan antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa Diazepam 0,025 mg/10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr memberikan pengaruh terhadap peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3. Ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr terlihat memiliki pengaruh paling besar terhadap peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 dengan nilai rerata sebesar 12,796 sesudah perlakuan.



Grafik 15. *Box Plot* Perbedaan Mean Ekspresi mRNA gen GABRB3 Sesudah Perlakuan

Dari grafik *box plot* di atas (grafik 15) terlihat adanya perbedaan rerata ekspresi mRNA gen GABRB3 yang signifikan. Kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) menunjukkan nilai rerata paling tinggi jika dibandingkan dengan nilai rerata kelompok lainnya. Hasil *box plot* menunjukkan rerata ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) mempunyai nilai rerata terendah, kemudian naik secara signifikan pada kelompok positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dan naik secara konsisten pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr), akan tetapi ekspresi mRNA

gen GABRB3 menurun kembali pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr).

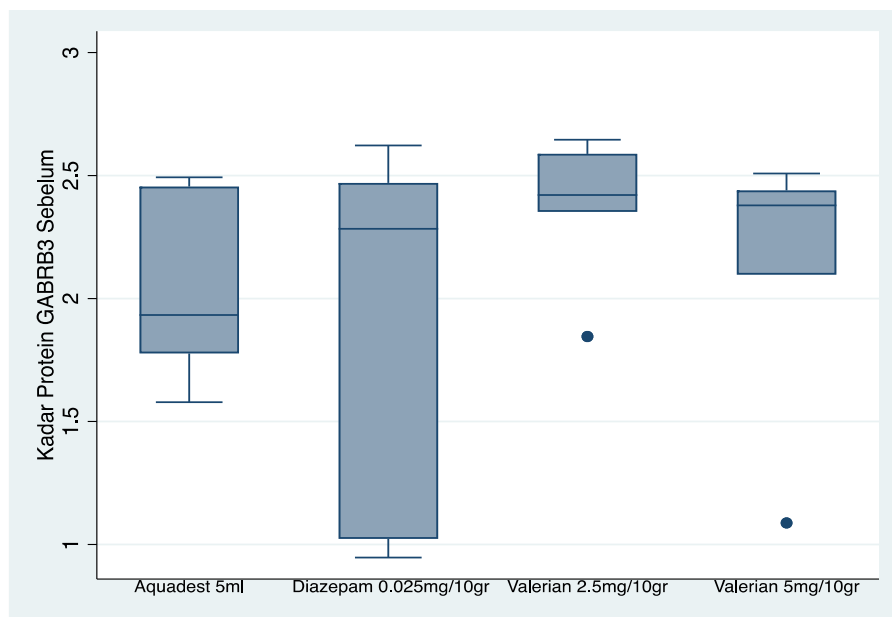
Tabel 5.12 Perbandingan Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan Antara Dua Kelompok

No	Variabel (n=5)	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Aquadest 5 ml	2,048	0,409	1,579	2,493	1,933	0,674
	Diazepam 0,025mg/10gr	1,869	0,817	0,947	2,623	2,284	
2.	Aquadest 5 ml	2,048	0,409	1,579	2,493	1,933	0,201
	Valerian 2,5mg/10gr	2,371	0,317	1,846	2,646	2,421	
3.	Aquadest 5 ml	2,048	0,409	1,579	2,493	1,933	0,868
	Valerian 5mg/10gr	2,102	0,588	1,088	2,508	2,379	
4.	Diazepam 0,025mg/10gr	1,869	0,817	0,947	2,623	2,284	0,237
	Valerian 2,5mg/10gr	2,371	0,317	1,846	2,646	2,421	
5.	Diazepam 0,025mg/10gr	1,869	0,817	0,947	2,623	2,284	0,396
	Valerian 5mg/10gr	2,102	0,588	1,088	2,508	2,379	
6.	Valerian 2,5mg/10gr	2,371	0,317	1,846	2,646	2,421	0,619
	Valerian 5mg/10gr	2,102	0,588	1,088	2,508	2,379	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai *p* diuji dengan *Independent t-test*, uji statistik bermakna bila nilai *p* < 0,05.

Tabel 5.12 menunjukkan perbandingan kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan antara dua kelompok. Dari hasil uji *Independent T-test* terlihat rerata kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada masing-masing kelompok memiliki nilai yang tidak jauh berbeda. Perbandingan nilai rerata antara 2 kelompok pada seluruh perbandingan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Sebagai contoh perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,0674. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,201 dan 0,868. Sementara perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok

perlakuan I maupun dengan kelompok perlakuan II juga menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,237 dan 0,369. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi awal kadar protein GABRB3 pada masing-masing kelompok cukup homogen, sehingga perlakuan yang diberikan dapat menilai apakah akan memberikan perubahan yang signifikan atau tidak.



Grafik 16. Box Plot Perbedaan Mean Kadar Protein GABRB3 Sebelum Perlakuan

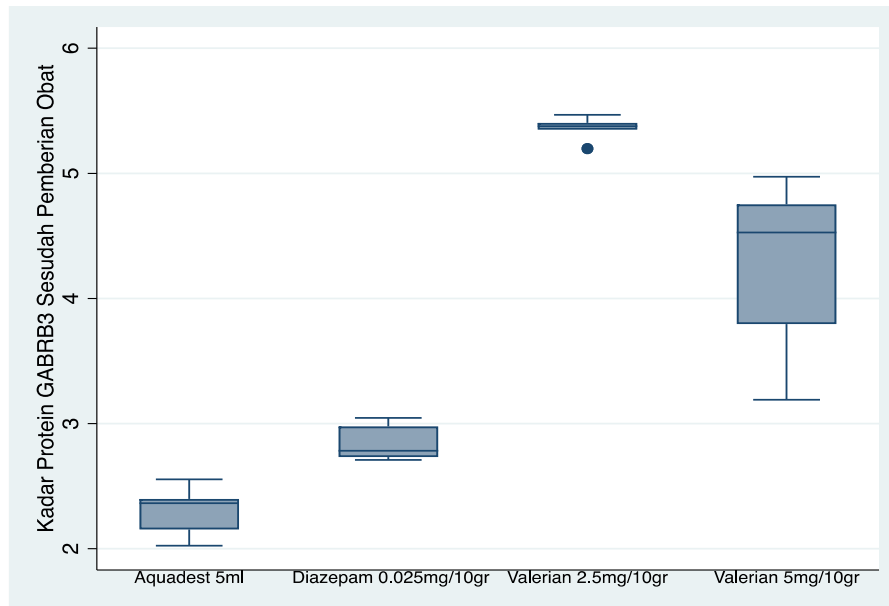
Dari grafik *Box Plot* (Grafik 16) terlihat rerata kadar protein GABRB3 pada masing-masing kelompok sebelum diberikan perlakuan. Kadar protein GABRB3 pada keempat kelompok mempunyai nilai yang tidak jauh berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada masing-masing kelompok bersifat homogen sehingga dapat disimpulkan apabila terjadi perbedaan selanjutnya maka hal tersebut merupakan akibat dari perlakuan yang diberikan.

Tabel 5.13 Perbandingan Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan Antara Dua Kelompok

No	Variabel (n=5)	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1.	Aquadest 5 ml	2,299	0,209	2,025	2,554	2,364	0,001
	Diazepam 0,025 mg/10 gr	2,849	0,152	2,710	3,045	2,783	
2.	Aquadest 5 ml	2,299	0,209	2,025	2,554	2,364	<0,0001
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5,359	0,100	5,198	5,468	5,377	
3.	Aquadest 5 ml	2,299	0,209	2,025	2,554	2,364	<0,0001
	Valerian 5 mg/10 gr	4,248	0,738	3,19	4,973	4,527	
4.	Diazepam 0,025 mg/10 gr	2,849	0,152	2,71	3,045	2,783	<0,0001
	Valerian 2,5 mg/10 gr	5,359	0,1	5,198	5,468	5,377	
5.	Diazepam 0,025 mg/10 gr	2,849	0,152	2,71	3,045	2,783	0,003
	Valerian 5 mg/10 gr	4,248	0,738	3,19	4,973	4,527	
6.	Valerian 2,5 mg/10 gr	5,359	0,100	5,198	5,468	5,377	0,01
	Valerian 5 mg/10 gr	4,248	0,738	3,19	4,973	4,527	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai *p* diuji dengan *Independent t-test*, uji statistik bermakna bila nilai *p* < 0,05.

Hasil uji *independent T-test* pada tabel 15 menunjukkan perbedaan kadar protein GABRB3 yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,001$. Perbandingan kadar protein GABRB3 antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,003$. Sementara perbandingan antara kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II juga menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,01. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr terbukti menyebabkan peningkatan kadar protein GABRB3. Pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr terbukti menimbulkan peningkatan kadar protein GABRB3 yang paling tinggi.



Grafik 17. Box Plot Perbedaan Mean Kadar Protein GABRB3 Sesudah Perlakuan

Dari grafik *Box Plot* (Grafik 17) terlihat adanya perbedaan rerata kadar protein GABRB3 yang cukup signifikan. Kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) terlihat memiliki nilai rerata terendah, kemudian diikuti dengan kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr). Rerata kadar protein GABRB3 yang paling tinggi adalah kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr), sehingga dapat kita temukan suatu data bahwa pada kelompok ekstrak Valerian dengan dosis yang lebih besar yaitu ekstrak Valerian 5 mg/10 gr justru terlihat kadar protein GABRB3 yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr.

5.4 Variabel Terikat: Pemeriksaan Fungsi Koordinasi Motorik (Tes Rotarod)

5.4.1 Perbandingan Pemeriksaan Fungsi Koordinasi Motorik (Tes Rotarod) Antara Empat Kelompok

Perbandingan hasil pemeriksaan fungsi koordinasi motorik pada keempat kelompok dengan uji statistik ANOVA dapat dilihat pada tabel 5.14. Tes rotarod pada keempat kelompok diuji dengan uji statistik ANOVA karena data berdistribusi normal pada keempat kelompok. Uji ANOVA merupakan uji statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan numerik pada keempat kelompok.

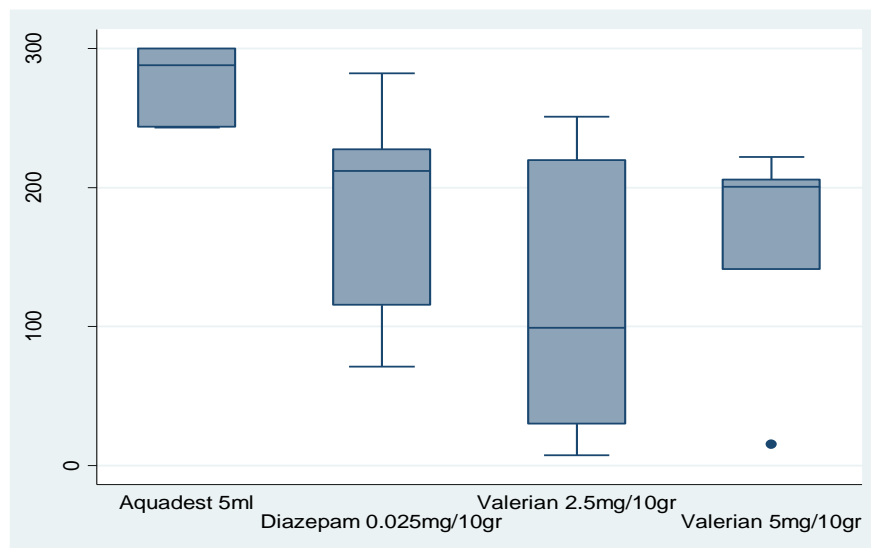
Tabel 5.14 Perbandingan Antara Tes Rotarod Pada Keempat Kelompok Perlakuan

Variable	N	Mean	SD	Median	Nilai P	Nilai F
Tes Rotarod						
Aquadest 5 ml	5	274,88	29,332	288		
Diazepam 0,025 mg/10 gr	5	181,68	86,214	212	0,055	3,12
Valerian 2,5 mg/10 gr	5	121,44	109,921	99		
Valerian 5 mg/10 gr	5	156,84	84,893	200,4		

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, median, minimal, maksimal, nilai *p* dan nilai F (Uji Serentak/Uji Model Anova) diuji dengan ANOVA, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Perbandingan hasil pemeriksaan fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) pada keempat kelompok (Tabel 5.14) menunjukkan perbedaan rerata yang hampir signifikan dengan nilai *p* sebesar 0,055. Kelompok mencit yang paling lama bertahan berputar di rotarod secara berurutan ditemukan pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dengan rerata waktu 274 detik, kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dengan rerata waktu 181 detik. Tabel di atas juga menunjukkan bahwa mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) merupakan kelompok mencit yang paling cepat jatuh dari

rotarod dan hanya mampu bertahan dengan rerata waktu 121,44 detik, bahkan lebih cepat jatuh dibandingkan dengan kelompok mencit pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) yang mampu bertahan dengan rerata waktu 156,84 detik.



Grafik 18. Box Plot Perbedaan Tes Rotarod Pada Kelompok Perlakuan

Dari grafik *box plot* (grafik 18) terlihat bahwa mencit pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) mampu bertahan paling lama pada rotarod, kemudian diikuti dengan kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr), dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr). Mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) terlihat mengalami gangguan fungsi kordinasi motorik terbesar dibandingkan kelompok lainnya.

5.4.2 Perbandingan Pemeriksaan Koordinasi Motorik (Tes Rotarod) Antara Dua Kelompok

Perbandingan hasil pemeriksaan koordinasi motorik (tes rotarod) antara dua kelompok dengan uji statistik *Independent t-test* dapat dilihat pada tabel 5.15.

Perbandingan tes rotaro ini diuji dengan uji statistik *Independent t-test* karena data berdistribusi normal pada masing-masing kelompok. Uji *Independent t-test* merupakan uji statistik yang digunakan untuk melihat perbedaan rerata hanya pada dua kelompok yang tidak berpasangan.

Tabel 5.15 Perbandingan Antara Tes Rotarod Antara Dua Kelompok

No	Variabel (n=5)	Mean	SD	Min	Max	Median	Nilai P
1	Aquadest 5 ml	274,88	29,332	243	300	288	0,04
	Diazepam 0,025mg/10gr	181,68	86,214	71,2	282,2	212	
2	Aquadest 5 ml	274,88	29,332	243	300	288	0,017
	Valerian 2,5mg/10gr	121,44	109,921	7,4	251	99	
3	Aquadest 5 ml	274,88	29,332	243	300	288	0,019
	Valerian 5mg/10gr	156,84	84,893	15,2	221,8	200,4	
4	Diazepam 0,025mg/10gr	181,68	86,214	71,2	282,2	212	0,363
	Valerian 2,5mg/10gr	121,44	109,921	7,4	251	99	
5	Diazepam 0,025mg/10gr	181,68	86,214	71,2	282,2	212	0,658
	Valerian 5mg/10gr	156,84	84,893	15,2	221,8	200,4	
6	Valerian 2,5mg/10gr	121,44	109,921	7,4	251	99	0,584
	Valerian 5mg/10gr	156,84	84,893	15,2	221,8	200,4	

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata/*mean*, standar deviasi, minimal, maksimal, median, dan nilai *p* diuji dengan *Independent t-test*, uji statistik bermakna bila nilai $p < 0,05$.

Uji statistik *Independent t-test* pada tabel 5.15 menunjukkan perbedaan rerata waktu yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr pada mencit BALB/c telah menimbulkan efek sedasi.

Sementara perbandingan rerata waktu antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan juga ditunjukkan pada

perbandingan rerata waktu antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II dengan nilai p sebesar 0,584. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam dan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi yang sebanding atau tidak berbeda signifikan.

BAB VI

PEMBAHASAN

Gangguan tidur seperti insomnia sering terjadi dan berdampak pada penurunan kualitas hidup, pencetus gangguan jiwa serta menurunkan stamina dan produktivitas. Dampak insomnia ini tidak dapat dipandang sebelah mata karena membahayakan kesehatan dan keselamatan jiwa. Sekitar 80% penduduk di dunia masih menggunakan obat herbal alami untuk mencegah insomnia dan salah satu obat herbal yang sering digunakan adalah ekstrak Valerian. *Valeriana officinalis* merupakan salah satu jenis ekstrak Valerian yang sering digunakan dalam pengobatan.

Target selular ekstrak Valerian adalah reseptor GABA_A sub-unit β 3 yang berkaitan dengan ekspresi mRNA gen GABRB3 untuk menyebabkan efek sedasi. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek sedasi yang ditimbulkan oleh ekstrak Valerian serta pengaruh ekstrak Valerian terhadap peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3. Penelitian ini juga hendak memeriksa efek peningkatan dosis ekstrak Valerian dalam meningkatkan ekspresi mRNA GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi pada mencit BALB/c.

6.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan subjek 20 mencit BALB/c jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Hasil pengamatan selama tujuh hari menunjukkan bahwa berat badan mencit pada hari pertama pengamatan hingga hari ketujuh menunjukkan nilai yang relatif konstan dan tidak mengalami banyak perubahan. Uji statistik *Kruskal Wallis* dilakukan untuk membandingkan nilai rerata berat mencit pada keempat kelompok, baik

kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan selama tujuh hari pengamatan. Hasil uji statistik menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antara nilai rerata berat mencit pada keempat kelompok, dengan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa berat mencit pada keempat kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan, mempunyai karakteristik yang homogen dan bukan sebagai perancu atau bias yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

Mencit pada kelompok kontrol negatif hanya mendapatkan perlakuan berupa pemberian Aquadest 5 ml. Pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr), rerata dosis obat yang diberikan sebesar 0,079 mg hingga 0,08 mg dari hari pengamatan pertama hingga hari ketujuh. Pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr), rerata dosis obat yang diberikan sebesar 8,1 mg dan terus berkisar pada dosis yang serupa selama 7 hari pengamatan. Sementara pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr), rerata dosis obat yang diberikan sebesar 15,84 mg hingga 15,22 mg selama 7 hari pengamatan. Dari data tersebut, terlihat bahwa nilai rata-rata dosis obat yang diberikan pada setiap kelompok selama 7 hari memiliki nilai yang hampir serupa dengan perbedaan yang tidak signifikan (nilai $p > 0,05$).

Terdapat 3 variabel terikat yang diukur pada penelitian ini dan ketiga variabel tersebut merupakan hasil penelitian yang dinilai. Ketiga variabel yang diperiksa adalah pemeriksaan ekspresi mRNA gen GABRB3, pemeriksaan kadar protein gen GABRB3 dan pemeriksaan efek sedasi pada mencit BALB/c melalui pemeriksaan koordinasi motorik yang disebut tes Rotarod. Gen GABRB3 yang akan diperiksa pada penelitian ini merupakan gen yang mengatur *ligand-gated channel* dari. Ekstrak Valerian memodulasi reseptor GABA_A subunit $\beta 3$ dan menginduksi influks ion klorida, hiperpolarisasi membran, hingga terjadi penurunan aksi potensial. Berdasarkan studi oleh Benke dan kawan-kawan,

mekanisme ini dianggap sebagai mekanisme utama efek sedatif dari ekstrak Valerian.

6.2 Ekspresi mRNA gen GABRB3 dan Kadar Protein GABRB3

6.2.1 Pengaruh Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Ekspresi mRNA gen GABRB3

Gen GABRB3 adalah gen yang mengkodekan protein reseptor *Gamma-aminobutyric acid* (GABA) sub-unit β_3 , yang merupakan salah satu sub-kanal klorida pada reseptor GABA pada manusia. Protein dari gen GABRB3 merupakan satu dari 13 sub-unit dari multi sub-unit kanal klorida yang menjadi reseptor GABA. GABA adalah neurotransmitter inhibitor utama dari sistem saraf pusat. Gen GABRB3 adalah anggota dari gen famili reseptor GABA_A yang mempunyai struktur heterometrik pentamerik kanal ligan pagar ion yang merupakan tempat kerja dari neurotransmitter GABA. Reseptor GABA_A adalah tempat aksi dari berbagai macam farmakologi obat yang penting termasuk diantaranya barbiturat, benzodiazepin dan etanol (Khom, et al., 2005; Kniffin, 2016). Mayoritas dari koding gen pada sub-unit reseptor GABA_A disusun menjadi empat kluster pada kromosom 4, 5, 15 dan X pada genom manusia. Kluster dari gen tersebut diasumsikan berkontribusi terhadap ekspresi dari gen. Terdapat dua kluster yang memiliki tiga gen yaitu α_5 , β_3 dan γ_3 pada kromosom 15. Kesamaan dari semua kluster yaitu terdapat sub-unit β yang menunjukkan orientasi dari proses transkripsi yang terbalik (Darlison, Pahal, & Thode, 2005).

Dengan menggunakan kode SNPs di kluster gen reseptor GABA pada kromosom 15q11-q13 dapat mendemonstrasikan bahwa dari 21 *postmortem* sampel jaringan otak manusia terdapat gen GABRB3 yang terekspresikan di

korteks serebral (Hogart, Nagarajan, Patzel, & Yasui, 2006). Sementara pada mencit gen GABRB3 ditranskripsikan melalui mekanisme yang sama pada kromosom 7 dari kromosom maternal atau paternal. Nichollas et al. pada tahun 1993 menyimpulkan bahwa ekspresi gen GABRB3 tidak terdapat pada otak dari mencit. Namun terdapat penelitian dari Meguro et al. pada tahun 1997 yang memiliki bukti yang berbeda dengan kesimpulan yang dinyatakan oleh Nichollas. Meguro menemukan ekspresi gen GABRB3 pada kromosom paternal mencit A9 hibrid (Wagstaff, et al., 1991; Hogart, et al., 2006; Nicholls, et al., 1993).

Penelitian mengenai ekstrak Valerian dengan menggunakan mencit sebagai subjek uji coba telah cukup banyak dilakukan namun belum ada yang meneliti hingga level ekspresi gen. Mayoritas penelitian mengenai efikasi ekstrak Valerian hanya berfokus pada fungsinya sebagai alat bantu tidur, baik yang hanya menguji efikasi dari Valerian itu sendiri maupun dikombinasi dengan zat lain.

Pada penelitian ini dilakukan perbandingan antara nilai ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan pada 20 mencit yang menjadi subjek penelitian dengan uji statistik *Paired t-test* dan didapatkan kenaikan signifikan nilai ekspresi mRNA gen GABRB3 dari 6,027 sebelum perlakuan menjadi 9,171 sesudah perlakuan.

Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok juga dilakukan dengan uji statistik *Paired t-test* dengan hasil tidak adanya perbedaan signifikan pada nilai ekspresi sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok kontrol negatif dengan nilai $p > 0,05$. Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok kontrol positif, perlakuan I dan perlakuan II menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$. Rerata ekspresi mRNA gen GABRB3 antara

sebelum dan sesudah perlakuan pada kelompok perlakuan I menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kenaikan hingga dua kali lipat. Perbedaan rerata tersebut paling signifikan secara statistik dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, dengan nilai $p < 0,0001$.

Demikian pula halnya dengan hasil uji ANOVA pada keempat kelompok menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Sesudah perlakuan barulah terlihat peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 yang signifikan pada masing-masing kelompok dengan nilai $p < 0,0001$. Kelompok kontrol negatif memiliki ekspresi mRNA gen GABRB terendah lalu diikuti oleh kelompok kontrol positif. Kelompok perlakuan I (ekstra Valerian 2,5 mg/10 gr) memiliki rerata ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya, termasuk lebih tinggi dari kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr).

Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan antara dua kelompok dengan uji statistik *Independent t-test* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada semua perbandingan antara 2 kelompok dengan nilai $p < 0,0001$. Perbandingan ini menunjukkan ekspresi mRNA GABRB3 sesudah perlakuan pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) memiliki rerata terendah, kemudian naik secara signifikan pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dan naik secara konsisten pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr). Rerata ekspresi mRNA GABRB3 kemudian turun pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr). Perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 antara kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dengan kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan nilai rerata yang paling besar dengan nilai $p < 0,0001$. Sedangkan perbandingan antara

kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dengan kedua kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,001$.

Hasil-hasil penelitian di atas membuktikan bahwa pemberian ekstrak Valerian dapat meningkatkan level ekspresi mRNA gen GABRB3 yang mengkodekan reseptor *Gamma-aminobutyric acid* sub-unit $\beta 3$, salah satu sub-kanal klorida pada reseptor GABA pada manusia, dimana hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan Darlison dkk pada tahun 2005 dimana gen GABRB3 berkontribusi terhadap ekspresi melalui reseptor GABA_A sub-unit $\beta 3$. (Darlison, Pahal, & Thode, 2005).

Hasil penelitian ini didukung oleh studi eksperimental yang dilakukan oleh Khom dkk dan studi meta-analisis yang dilakukan oleh Bent dkk. Khom dkk (2005) melakukan studi terkait pengaruh asam valerenat terhadap reseptor GABA_A sub-unit β . Asam Valerenat merupakan marker utama dari *Valerian officinalis*. Hasil yang didapatkan pada studi tersebut menunjukkan bahwa asam valerenat dapat memodulasi reseptor GABA_A sub-unit $\beta 3$, menyebabkan penurunan tingkat pergerakan, dan menginduksi efek sedasi pada mencit secara signifikan. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Bent dan kawan-kawan pada tahun 2006 juga menyimpulkan bahwa ekstrak Valerian dapat meningkatkan kualitas tidur. (Bent, 2006) (Khom, Baburin, Timin, Hohaus, & Sieghart, 2005)

Penelitian lain oleh Benke dan kawan-kawan mengidentifikasi bahwa target selular ekstrak Valerian terdapat pada reseptor GABA_A yaitu pada sub-unit $\beta 3$ yang memfasilitasi efek penenang atau sedasi. Gen yang mengkode reseptor GABA_A sub-unit $\beta 3$ disebut dengan GABRB3. Gen GABRB3 juga mengatur *ligand-gated ion channel*. Selain itu, gen ini juga mengkode 13 sub-unit lainnya dari multi sub-unit kanal klorida yang berfungsi sebagai reseptor GABA. GABRB3 juga

berfungsi untuk reseptor Diazepam dan obat anestesi lainnya, seperti fenobarbital (Benke, Barberis, Kopp, & Altmann, 2009).

Hasil-hasil yang didapatkan pada penelitian sebelumnya yang telah dijelaskan diatas, dapat disimpulkan bahwa penanda utama *Valerian officinalis* yaitu asam valerenat dan asam valerat memodulasi reseptor GABA_A sub-unit β3 kemudian menghambat re-uptake GABA dan katabolisme enzim GABA transaminase, terjadi peningkatan kadar GABA di reseptor GABA_A di otak sehingga menimbulkan sedasi. Gen GABRB3 berkontribusi terhadap ekspresi melalui reseptor GABA_A sub-unit β3. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini dimana ditemukan adanya perbedaan rerata kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA GABRB3 yang signifikan sesudah pemberian ekstrak Valerian pada kedua kelompok perlakuan ekstrak Valerian. Meskipun penelitian terkait ekstrak Valerian yang menggunakan subyek uji coba mencit sudah cukup banyak dilakukan, namun hingga saat ini belum ada studi yang meneliti pengaruh ekstrak Valerian hingga ke tingkat ekspresi gen.

6.2.2 Pengaruh Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Kadar Protein

GABRB3

Reseptor GABA (*Gamma-Aminobutyric acid*) merupakan target tempat kerja dari neurotransmitter GABA. GABA adalah neurotransmitter inhibitor utama yang berkerja pada 40% dari sistem saraf pusat mamalia. Reseptor GABA_A adalah *ligand gated ion channel* atau reseptor ionotropik sedangkan reseptor GABA_B adalah reseptor *G protein couple* atau reseptor metabotropik (Rudolph, 2015).

GABA adalah salah satu *neurotransmitter* penghambat yang sangat penting dalam sistem saraf pusat (SSP). GABA memiliki peranan penting untuk mengurangi eksitasi neuron dengan menghambat transmisi impuls saraf pada otak

dan juga berperan pada regulasi tonus otot. GABA tergolong dalam asam amino karena memiliki gugus *amine* (Spitzer, 2010). Dalam jurnal yang ditulis Spitzer pada tahun 2010, untuk melakukan aksinya sebagai neurotransmitter penghambat, GABA harus berikatan dengan reseptornya. GABA memiliki dua macam reseptor yang terletak di neuron post-sinaps, yaitu reseptor GABA_A dan GABA_B.

Ekstrak valerian dapat mempengaruhi reseptor GABA subtype A (GABA_A). Valerian dapat berpengaruh dalam komponen neuron presinaptik yang melepaskan sinaptomal GABA, menghambat reuptake dari GABA, dan dengan GABA transaminase dapat menghambat proses katabolisme GABA. Hipnotik sedatif, anestesi umum, benzodiazepin, dan barbiturat mempunyai target yaitu reseptor GABA_A. Dalam proses tidur reseptor GABA_A sangat berperan penting (Benke, et al., 2009 ; Nazari, et al., 2009).

Pada penelitian ini dilakukan perbandingan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan pada 20 mencit yang menjadi subjek penelitian, terlihat terdapat peningkatan kadar protein GABRB3 dari 2,098 sebelum perlakuan menjadi 3,689 sesudah perlakuan.

Perbandingan kadar protein GABRB3 antara sebelum dan sesudah perlakuan pada masing-masing kelompok juga dilakukan dengan uji statistik *Paired t-test*. Hasil perbandingan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan pada pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dan kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr). Kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada kelompok kontrol positif adalah 1,869, sementara kadar protein sesudah perlakuan adalah 2,849. Perbandingan antara kedua nilai tersebut menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p adalah 0,067. Meskipun perbandingan tersebut menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan terlihat bahwa nilai p mendekati

0,05. Menurut penulis hal tersebut terjadi karena kurangnya subjek penelitian yang digunakan pada penelitian ini, yaitu 5 ekor mencit BALB/c setiap kelompok. Selain itu penilaian efek suatu obat secara klinis dapat digunakan untuk menyikapi perbandingan yang menunjukkan perbedaan yang hampir signifikan.

Pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) terlihat peningkatan kadar protein GABRB3 yang signifikan antara sebelum dan sesudah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$. Peningkatan kadar protein GABRB3 terbesar terjadi pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dengan kadar protein sebesar 5,359 dibandingkan dengan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan kadar protein 4,428. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak Valerian tidak berbanding lurus dengan peningkatan kadar protein GABRB3.

Hasil Uji ANOVA pada keempat kelompok menunjukkan bahwa kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan, tetapi sesudah perlakuan terlihat perbedaan yang signifikan pada kadar protein GABRB3 dengan nilai $p < 0,0001$. Sesudah perlakuan terlihat bahwa kadar protein GABRB3 pada keempat kelompok mempunyai nilai rerata yang berbeda signifikan. Kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) terlihat memiliki nilai rerata terendah, kemudian diikuti dengan kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr). Kadar protein GABRB3 terlihat paling tinggi pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) sebesar 5,359 yang kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) sebesar 4,428.

Perbandingan kadar protein GABRB3 sesudah perlakuan antara dua kelompok dengan uji statistik *Independent t-test* menunjukkan perbedaan kadar protein GABRB3 yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol

negatif dengan kelompok kontrol positif maupun kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$. Perbandingan kadar protein GABRB3 antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,003$. Sementara perbandingan antara kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II juga menunjukkan perbedaan signifikan dengan nilai p sebesar 0,01. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/10 gr terbukti menyebabkan peningkatan kadar protein GABRB3. Pemberian ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr terbukti menimbulkan peningkatan kadar protein GABRB3 yang paling tinggi.

6.3 Efek Sedasi Ekstrak Valerian

Menurut *American Society of Anesthesiologist*, pengertian dari sedasi adalah suatu kondisi turunnya kesadaran pasien terhadap lingkungan sekitar serta reaksi terhadap rangsangan eksternal (*American Society of Anesthesiologist*, 2004). Valerian telah digunakan sejak zaman Yunani sebagai obat untuk insomnia dan sering digunakan sebagai obat sedatif, hipnotik, dan ansiolitik hingga saat ini. Valerian digunakan sebagai pengobatan insomnia untuk meningkatkan kualitas tidur, mengurangi waktu induksi dan menurunkan gejala dari insomnia, serta gelisah. Banyak kandungan dari Valerian yang telah diidentifikasi. Efek sedative-hipnotik dari beberapa zat aktif yang terkandung di Valerian bekerja secara sinergis. Asam valerik menghambat pemecahan dari enzimatik GABA, menyebabkan jumlah GABA dalam ruang sinap tetap tinggi. Ekstrak Valerian juga mengandung GABA yang bekerja dengan cara mendepresi sistem saraf pusat. Salah satu kandungan lain dari ekstrak Valerian yaitu glutamin mempunyai properti untuk melewati sawar darah otak yang selanjutnya akan dirubah menjadi

GABA. Valerian juga bekerja dengan menghambat reuptake GABA, sehingga konsentrasi dari GABA pada celah sinaps tetap tinggi (Leuschner, et al., 1993).

Pada penelitian ini dilakukan uji statistik ANOVA untuk mengetahui perbedaan numerik pada keempat kelompok penelitian. Hasil uji statistik menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan pada kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA gen GABRB3 pada keempat kelompok. Namun kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA GABRB3 sesudah perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan keduanya memiliki nilai $p < 0,0001$. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Valerian telah meningkatkan ekspresi mRNA dan kadar protein GABRB3 sebagai penanda adanya efek sedasi yang ditimbulkan oleh ekstrak Valerian.

Hasil uji statistik ANOVA pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan rerata waktu yang hampir signifikan dengan nilai p sebesar 0,055. Kelompok mencit yang paling lama bertahan berputar di rotarod secara berurutan ditemukan pada kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dengan rerata waktu 274 detik, kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dengan rerata waktu 181 detik. Mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) merupakan kelompok mencit yang paling cepat jatuh dari rotarod dan hanya mampu bertahan dengan rerata waktu 121,44 detik, bahkan lebih cepat jatuh dibandingkan dengan kelompok mencit pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) yang mampu bertahan dengan rerata waktu 156,84 detik. Tes rotarod ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak Valerian sebesar 2,5 mg/10 gr dan 5 mg/10 gr terbukti menimbulkan gangguan fungsi koordinasi motorik atau efek sedasi pada mencit BALB/c.

Hasil uji statistik *Independent t-test* pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) menunjukkan perbedaan rerata waktu yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi. Sementara perbandingan rerata waktu antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan juga ditunjukkan pada perbandingan rerata waktu antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II dengan nilai p sebesar 0,584. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam dan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi yang sebanding dan peningkatan dosis ekstrak Valerian menunjukkan perbedaan efek sedasi yang tidak signifikan.

Hasil pemeriksaan koordinasi motorik ini sesuai dengan hasil pada pemeriksaan kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA gen GABRB3, dimana terdapat peningkatan signifikan pada kedua kelompok perlakuan (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) bila dibandingkan kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dengan nilai $p < 0,05$. Berdasarkan temuan ini, dapat dilihat bahwa kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan paling signifikan baik pada kadar protein GABRB3, ekspresi mRNA gen GABRB3 dan tes rotarod. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Khom S, dkk (200%) dimana asam valerat menyebabkan penurunan pergerakan yang signifikan (Khom, 2005). Penelitian ini didukung juga oleh penelitian yang dilakukan oleh Al-Majed pada tahun 2006 yang

menunjukkan bahwa pemberian suspensi Valerian dengan dosis harian 2.000 mg/kg selama 7 hari memberikan efek ereksi pili, hipertermia, defekasi, gangguan refleks dan efek sedasi. (Al-MAjed,2006)

Ekstrak Valerian mempunyai cara kerja yang sama dengan benzodiazepin (Chun-Su, et al, 2004). Benzodiazepin berikatan pada sub-unit gamma sedangkan Valerian berikatan pada sub-unit beta di reseptor GABA_A. Valerian dan benzodiazepin berikatan pada sub-unit yang berbeda namun memiliki efek yang sama yaitu menyebabkan pergerakan klorida ke dalam neuron saat neurotransmitter inhibitor utama, GABA, berikatan dengan reseptor GABA_A. Proses dari ikatan ini menyebabkan keadaan hiperpolarisasi. Valerian telah terbukti dapat menurunkan metabolisme dari GABA sehingga GABA dapat bertahan lebih lama, sehingga efek sedasi yang ditimbulkan cocok digunakan sebagai pengobatan insomnia karena efeknya tersebut dapat meningkatkan kualitas tidur (Budzinski, et al., 2000 ; Leuschner, et al., 1993).

Diazepam, sebagai obat dari golongan Benzodiazepin, digunakan pada penelitian ini sebagai kontrol positif yang telah dikenal memiliki efek sedasi. Hasil pemeriksaan fungsi koordinasi motorik melalui tes rotarod juga menunjukkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan gangguan pada fungsi koordinasi motorik. Penelitian ini juga membuktikan bahwa pemberian Diazepam dan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi yang sebanding, seperti tertulis pada penelitian oleh Khom S (2005) dan Budzinski (2000).

6.4 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan

Ekspresi mRNA gen GABRB3, Kadar Protein GABRB3, dan Efek Sedasi

6.4.1 Dosis Ekstrak Valerian

Menurut studi yang dilakukan oleh Nisa Nurul (2009), dosis ekstrak Valerian 28,8 mg/kg dan 91 mg/kg pada mencit dapat mempengaruhi aktivitas sistem saraf pusat yang ditandai dengan penurunan aktivitas dan ptosis palpebra, namun tidak mempengaruhi waktu induksi tidur. Penelitian lain oleh Fachientto (2007) menggunakan mencit untuk penelitian dengan dosis ekstrak Valerian 200-250 mg/kg, namun dosis yang digunakan masih lebih kecil dibandingkan dengan dosis pada penelitian oleh Al-Majed dan kawan-kawan pada tahun 2006. Penggunaan dosis kecil ini ditujukan untuk menghindari efek oksidasi hepar mencit yang telah terjadi sebelumnya, karena bila terjadi kondisi tersebut maka dibutuhkan waktu 8 minggu guna mendapatkan efek ansiolitik pada mencit.

Hasil penelitian dan dosis ekstrak Valerian yang digunakan pada penelitian ini didukung oleh studi yang dilakukan oleh Kakeshi pada tahun 2014. Kakeshi menentukan dosis ekstrak Valerian berdasarkan penelitian sebelumnya yang melibatkan manusia sebagai subjek. Dalam penelitiannya Kakeshi mengungkapkan bahwa efek toksisitas tidak terdeteksi bahkan pada dosis 500 mg/kg/hari. Dosis ekstrak Valerian yang digunakan sebesar 5, 50 dan 500 mg/kg/hari diberikan dalam larutan Aquadest 20 ml dengan menggunakan tikus dengan berat badan rata-rata 200 gram sebagai subjek penelitian. Studi ini juga mengungkapkan faktor konversi yang digunakan untuk mengubah dosis dari manusia ke tikus dengan mengalikan dosis manusia dengan 6,16. Sehingga dosis

ekstrak Valerian 5, 50 dan 500 mg/kg pada tikus menjadi 0,8, 8,1 dan 81,2 mg/kg pada dosis manusia.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Al-Majed (2006) dosis ekstrak Valerian ditentukan oleh tiga faktor yaitu dosis maksimum yang dapat ditoleransi, luas permukaan tubuh dan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan. Dosis maksimum yang dapat ditoleransi adalah 500, 1000, dan 2000 mg/kg yang digunakan untuk mencit dengan berat rata-rata 20 gram. Menurut aturan luas permukaan tubuh bahwa dosis 397,8 mg/kg digunakan karena rasio 20 gram mencit menyerupai 60 kg manusia.

Gutierrez (2004) menyimpulkan dari berbagai penelitian sebelumnya bahwa dosis tunggal 1.800 mg ekstrak Valerian akan memicu efek sedatif dan meningkatkan kualitas tidur setelah dikonsumsi selama 1-2. Dalam penelitian ini ekstrak Valerian diberikan dalam bentuk suspensi cairan melalui sonde lambung selama 7 hari berturut-turut. Dosis Diazepam 0,2 mg/kg biasanya digunakan untuk mengurangi kecemasan dan memicu efek sedasi.

Faktor konversi dosis manusia ke dosis mencit dengan berat rata-rata berat 20 gr adalah dengan mengalikan dosis manusia dengan 12,3 sesuai dengan ketentuan FDA, yaitu dosis manusia 20 dan 40 mg/BB menjadi 250 mg/kg (2,5 mg/10 gr) dan 500 mg/kgBB (5 mg/10gr), maka pada penelitian ini ditetapkan penggunaan dosis ekstrak Valerian sebesar 2,5 mg/10 gr dan 5 mg/10 gr.

6.4.2 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Perubahan Ekspresi Mrna gen GABRB3 dan Kadar Protein GABRB3

Hasil pemeriksaan ekspresi mRNA gen GABR3 dan kadar protein GABRB3 sesudah perlakuan pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) menunjukkan fakta yang menarik. Ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) memiliki rerata 12,796. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) yang memiliki rerata 9,778 dengan yang nilai $p < 0,05$ sehingga disimpulkan sebagai perbedaan yang bermakna.

Kadar protein GABRB3 pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) memiliki rerata 5,359. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg) yang memiliki rerata 4,428 dengan nilai $p < 0,05$ sehingga disimpulkan sebagai perbedaan yang bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak Valerian sebanyak 2 kali dari 2,5 mg menjadi 5 mg ternyata tidak berbanding lurus dengan peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABR3. Sehingga dapat disimpulkan dari hasil data penelitian ini bahwa peningkatan dosis ekstrak Valerian tidak meningkatkan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3.

6.4.3 Pengaruh Peningkatan Dosis Ekstrak Valerian Terhadap Efek Sedasi

Hasil uji statistik ANOVA pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan rerata waktu yang hampir signifikan dengan nilai p sebesar 0,055. Kelompok mencit yang paling lama bertahan berputar di rotarod secara berurutan adalah kelompok kontrol negatif (Aquadest 5 ml) dengan rerata waktu 274 detik, kemudian diikuti oleh kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) dengan rerata waktu 181 detik. Mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) merupakan kelompok mencit yang paling cepat jatuh dari rotarod dan hanya mampu bertahan dengan rerata waktu 121,44 detik, bahkan lebih cepat jatuh dibandingkan dengan kelompok mencit pada kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) yang mampu bertahan dengan rerata waktu 156,84 detik. Hasil tes rotarod ini menunjukkan bahwa mencit pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) mengalami gangguan fungsi koordinasi motorik terbesar dibandingkan kelompok lain. Dapat pula disimpulkan bahwa efek sedasi terbesar terlihat pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr). Hasil uji rotarod ini dapat menunjukkan bahwa peningkatan dosis Valerian dari 2,5 mg ke 5 mg tidak meningkatkan efek sedasi pada mencit BABLB/c.

Hasil uji statistik *Independent t-test* pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) menunjukkan perbedaan rerata waktu yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi. Sementara

perbandingan rerata waktu antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai $p > 0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan juga ditunjukkan pada perbandingan rerata waktu antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II dengan nilai p sebesar 0,584. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam dan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi yang sebanding dan peningkatan dosis ekstrak Valerian menunjukkan perbedaan efek sedasi yang tidak signifikan.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan tes rotatod yang paling signifikan sesudah perlakuan. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Khom S, dkk (2005) dimana asam valerianat menyebabkan penurunan pergerakan motorik yang signifikan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis ekstrak Valerian dari 2,5 mg/10 gr menjadi 5 mg/10 gr tidak serta merta meningkatkan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi pada mencit BALB/c.

Dari hasil uji statistik yang telah dibahas pada bab sebelumnya terlihat bahwa hasil penelitian ini konsisten dengan hasil penelitian sebelumnya dimana ekstrak Valerian terbukti memiliki efek sedasi yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 dan kadar protein GABRB3 pada mencit BALB/c sesudah perlakuan.

6.5 Ringkasan Hasil Penelitian

1. Homogenitas subyek penelitian ditunjukkan dengan tidak adanya perbedaan signifikan antara nilai rerata berat mencit pada keempat kelompok, dengan nilai $p > 0,05$.
2. Peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB3 signifikan pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/ 10 gr), perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/ 10 gr) dan perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan nilai $p < 0,0001$.
3. Peningkatan ekspresi mRNA gen GABRB paling besar terlihat pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr), dengan ekspresi awal sebesar 6,321 dan meningkat 2 kali lipat menjadi 12,796 sesudah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$.
4. Peningkatan kadar protein GABRB3 signifikan pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) dan kelompok perlakuan II (ekstrak Valerian 5 mg/10 gr) dengan nilai $p < 0,0001$.
5. Perbandingan kadar protein GABRB3 pada kelompok perlakuan I (ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr) terlihat peningkatan yang signifikan dan paling besar dari 2,371 menjadi 5,359 sesudah perlakuan dengan nilai $p < 0,0001$.
6. Perbandingan kadar protein GABRB3 pada kelompok kontrol positif (Diazepam 0,025 mg/10 gr) menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,067, meskipun terlihat peningkatan dari 1,869 menjadi 2,849 sesudah perlakuan.
7. Hasil uji ANOVA pada perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,562. Sementara

perbandingan ekspresi mRNA gen GABRB3 sesudah perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$.

8. Hasil uji ANOVA pada perbandingan kadar protein GABRB3 sebelum perlakuan pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai p sebesar 0,582. Sementara perbandingan antara kadar protein GABRB3 sesudah perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,0001$.
9. Hasil uji ANOVA pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) pada keempat kelompok menunjukkan perbedaan rerata waktu yang hampir signifikan dengan nilai p sebesar 0,055.
10. Hasil uji statistik *Independent t-test* pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) menunjukkan perbedaan rerata waktu yang signifikan pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif maupun pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam 0,025 mg/ 10 gr, ekstrak Valerian 2,5 mg/10 gr dan ekstrak Valerian 5 mg/ 10 gr pada mencit BALB/c terbukti menimbulkan efek sedasi.
11. Hasil uji statistik *Independent t-test* pada fungsi koordinasi motorik (tes Rotarod) menunjukkan perbedaan rerata waktu yang tidak signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kedua kelompok perlakuan dengan nilai $p > 0,05$. Perbedaan yang tidak signifikan juga ditunjukkan pada perbandingan rerata waktu antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II dengan nilai p sebesar 0,584. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian Diazepam dan ekstrak Valerian pada mencit BALB/c terbukti

menimbulkan efek sedasi yang sebanding dan peningkatan dosis ekstrak Valerian menunjukkan perbedaan efek sedasi yang tidak signifikan.

12. Peningkatan dosis ekstrak Valerian dari 2,5 mg/ 10 gr menjadi 5 mg/ 10 gr tidak serta merta meningkatkan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 dan efek sedasi pada mencit BALB/c.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini disadari masih terdapat beberapa kelemahan maupun keterbatasan yang disebabkan oleh:

1. Banyaknya variasi kemasan ekstrak Valerian yang tersedia dan belum jelasnya standarisasi yang baku dari pengolahan ekstrak Valerian.
2. Mesin rotarod yang digunakan merupakan prototipe tiruan yang diciptakan secara khusus untuk penelitian ini dengan tujuan menguji fungsi koordinasi dan keseimbangan berdasarkan jumlah putaran per menit.
3. Belum adanya penelitian sebelumnya yang mampu membuktikan bahwa ekstrak Valerian menimbulkan efek sedasi melalui mekanisme peningkatan kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA gen GABRB3. Penelitian sebelumnya hanya memeriksa efek sedasi yang ditimbulkan oleh ekstrak valerian melalui uji klinis.
4. Tidak dilakukan biopsi jaringan otak mencit untuk mengetahui kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA gen GABRB3 melalui pemeriksaan immunohistokimia.
5. Metode pemberian obat secara oral pada mencit yang membuka kemungkinan terjadinya kesalahan mekanisme pemberian obat sehingga efek obat yang diharapkan tidak timbul.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Ekstrak Valerian terbukti menimbulkan efek sedasi dengan mekanisme kerja berikatan pada reseptor GABA_A sub-unit β 3
2. Pemberian ekstrak Valerian akan meningkatkan level ekspresi mRNA gen GABRB3, sebagai gen yang mengkodekan reseptor GABA_A sub-unit β 3.
3. Pemberian ekstrak Valerian akan meningkatkan kadar protein GABRB3.
4. Peningkatan dosis ekstrak Valerian tidak serta merta meningkatkan ekspresi mRNA gen GABRB3, kadar protein GABRB3 maupun efek sedasi dalam derajat yang lebih besar.

Saran yang dapat diberikan:

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis standar bahan baku ekstrak Valerian yang dapat digunakan pada penelitian selanjutnya.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa ekstrak Valerian menimbulkan efek sedasi melalui mekanisme peningkatan kadar protein GABRB3 dan ekspresi mRNA GABRB3.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut di bidang patologi anatomis untuk biopsi jaringan otak mencit untuk mengetahui pengaruh kadar protein GABRB3 pada pemberian ekstrak Valerian.
4. Diperlukan penelitian dengan menggunakan pemeriksaan immunohistokimia untuk mengetahui pengaruh ekspresi mRNA GABRB3 pada pemberian ekstrak Valerian pada mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Majed A, Al-Yahya A, et al. 2006. Studies on Cytological and Biochemical Effects of Valerian in Somatic and Germ Cells of Swiss Albino Mice. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1830–1837.
- American Society of Anesthesiologist. 2004. Continuum of Depth of Sedation : Definition of General Anesthesia and levels of Sedation / Analgesia.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. 2005. *Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219.
- Barceloux, D.G. 2008. Valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Medical Toxicology of Natural Substances*(pp. 617-622). US: John Wiley&Sons.
- Baur R, Kaur K and Sigel E.2010. Diversity of Structure and Function of $\alpha 1\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A Receptors (Comparison with $\alpha 1\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ GABA_A Receptors. *Journal of Biological Chemistry* : 17398-17405.
- Benke D, Barberis A, et al. 2009.GABA_A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of Valerian root extracts. *Neuropharmacology* : 174-81.
- Bent S, Padula A, et. al. 2006. Valerian for sleep: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Med* 119 (12): 1005 – 1012.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., &van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3), 495–503.
- Budzinski Jason W, Foster B, et al. 2000. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tincture. *Phytomedicine* : 273-282.
- Buhr A, Bianchi M, et al. 2002.Functional characterization of the new human GABA_A receptor mutation $\beta 3(R192H)$. *Human Genetica* : 154-160.
- Bustin, S. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.
- Butchbach M, Edwards J and Burghes A. 2007. Abnormal motor phenotype in the SMN $\Delta 7$ mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiology of Disease*: 207-219.
- Casini D, Fontani P, et al. 2015. A Rapid ELISA Method to Improve the Automated Test Throughput. *Analytical & Bioanalytical Techniques*.

- Chan, Eugene. 2002. The Role of Complementary and Alternative Medicine in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Developmental and Behavioral Pediatrics* 23: S37 – S45.
- Chun-Su Yuan, Sangeeta M, et al. 2004. The Gamma-Aminobutyric Acidergic Effects of Valerian and Valerenic Acid on Rat Brainstem Neuronal Activity. *Anesthesia and Analgesia*: 353-8.
- Cohen Daniel L and Toro Yanisa Del. 2008. A Case of Valerian-Associated Hepatotoxicity. *Journal of Clinical Gastroenterology* : 961.
- Clauw DJ, Mease P, Palmer RH, Gendreau RM, Wang Y. 2008. Milnacipran for the treatment of fibromyalgia in adults: a 15-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose clinical trial. *Clin Ther.* 2008;30(11):1988-2004.
- Darlison M, Pahal I and Thode C. 2005. Consequences of the Evolution of the GABAA Receptor Gene Family. *Cellular and Molecular Neurobiology* : 607-624.
- DeLorey T, Sahbie P, et al. 2008. GABRB3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*: 207-220.
- Donath F, Quispe S, et al. 2003. Critical Evaluation of the Effect of Valerian Extract on Sleep Structure and Sleep Quality. *Pharmacopsychiatry* 33:47±53.
- Dunham, N. W., & Miya, T. S. 1957. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice. College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 46(3), 208–209.
- Ernst M, Brauchart D, et al. 2003. Comparative modeling of GABAA receptors: limits, insights, future developments. *Neuroscience*: 933-943.
- Fachinnetto R, Villarinho J G, et al. 2007. Valeriana Officialis does not Alter the Orofacial Dyskinesia induced by Haloperidol in Rats: Role of Dopamine receptor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 31: 1478–1486.
- Fernandez S, Wasowski C, et al. 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* : 399-404.
- Francis, A.J.P. and Dempster, R.J.W. 2002. Effect of Valerian, Valeriana edulis, on sleep difficulties in Children with intellectual deficits: randomized trial. *Phytomedicine* 9 : 273 – 279.

- Fukuchi Mamoru and Tsuda Masaaki. 2015. GABA-driven excitatory neurotransmission: gene regulation by excitatory GABA and its possible role in the developing brain. *Neurotransmitter*: 2: e480
- Gutierrez S, Ang-Lee M, et.al. 2004. Assessing Subjective and Psychomotor Effects of the Herbal Medication Valerian in Healthy Volunteers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 78: 57–64
- Guyton A and Hall J. 2006. Textbook of medical physiology 6th edition. Philadelphia : Saunders.
- Hadley S and Petry J. 2003. Valerian. *Am Fam Physician* 67:1755-8.
- Hallam Karen T, James S. Olver, et al. 2003. Comparative cognitive and psychomotor effects of single doses of Valeriana officinalis and triazolam in healthy volunteers. *Human Psychopharmacology* : 619-625.
- Hendriks H, Bos R, Woerdenbag HJ, Koster AS. 1985. Central Nervous Depressant Activity of Valerenic Acid in the Mouse. *Planta medica*; 51: 28 – 31
- Hnasko R. 2015. ELISA Methods and Protocols. Human Press
- Hogart A, Nagarajan R, et al. 2006. 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Human Molecular Genetics* : 691–703.
- Jacob Tija C., Moss Stephen J. and Jurd Rachel. 2008. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Neuroscience* : 331-343.
- Kakeshi A, Kato A, et al. 2014 Valerian Inhibits Rat Hepatocarcinogenesis by Activating GABA(A) Receptor-Mediated Signaling. *PLoS ONE* 9(11): e113610.
- Katzung Betram G and Trevor Anthony J. 2015. Basic and Clinical Pharmacology 13th edition. San Francisco : McGraw-Hil.
- Khom S, Baburin I, et al. 2005. Pharmacological Properties of GABAA Receptors Containing α Sub-units. *Molecular Pharmacology*: 640-649.
- Kniffin Cassandra L. 2016. Gamma-Aminobutyric Acid Receptor Beta 3: GABRB3. OMIM.
- Leuschner J, Muller J and Rudmann M. 1993. Characterization of the central nervous depressant activity of a commercially available Valerian root extract. *Arzneimittelforschung* : 638-641.
- Life Technologies. 2015. Basics of real-time PCR. Dilihat pada 28 April 2020 from website: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-lifetechnologies-update-flr.pdf>

- Malamed S.2010. Sedation 5th edition. St. Louis : Mosby Elsevier.
- Mann, A. 2014. Techniques for Motor Assessment in Rodents. In: Movement Disorders. London: Elsevier.
- Marfu'ah, I., Sudarso, & Diniatik. (2013). EFEK SEDASI DARI VARIASI DOSIS EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR (IPOMOEA BATATAS L) PADA MENCIT. 10(1).
- Michael F Caron, J. E. 2002. Valerian: A Practical Review for Clinicians. Nutrition in Clinical Care 2(4): 250-257.
- Miller Paul S. and Aricescu A. Radu. 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. Nature.
- Miller Ronald. 2015. Miller's Anesthesia 8th edition. Philadelphia : Elsevier Saunders.
- Moniruzzaman, M., Sharoti Bhattacharjee, P., Rahman Pretty, M., & Sarwar Hossain, M. 2016. Sedative and Anxiolytic-Like Actions of Ethanol Extract of Leaves of *Glinus oppositifolius*(Linn.) Aug. DC. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: 1–8.
- Morazzoni P, Bombardelli E 1995. Valeriana officinalis: traditional use and recent evaluation of activity. Fitoterapia 66: 99-112.
- National Toxicology Program Chemical Information Review Document for Valerian (*Valeriana officinalis* L) [CAS No8057-49-6] and Oils [CAS No8008-88-6]. 2009. New York : U.S Department of Health and Human Services.
- Nazari F, Shaabani S and Nejad Ebrahimi, S. 2009. Investigation of Valeriana officinalis L. from Iran.57 th International Congress and Annual Meeting of the GA. - Geneva, Switzerland. Planta Medica : 75-79.
- Muh. Fitrah, S. S. (2017). Uji EFEKTIVITAS INFUSA SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendens*) TERHADAP EFEK SEDASI PADA MENCIT (*Mus musculus*). *Jurnal Farmasi Falkutas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alaudin*, 5(3), 184-192.
- Neuhaus W, TraunerG, et al. 2008. Transport of a GABA A Receptor Modulator and Its Derivatives from Valeriana officinalis L . s. l. Across an in Vitro Cell Culture Model of the Blood-Brain Barrier.Planta Medica: 1338- 1344.
- Nicholls R, Gottlieb W, et al. 1993. Evaluation of potential models for imprinted and nonimprinted components of human chromosome 15q11-q13 syndromes by fine-structure homology mapping in the mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences: 2050-2054.
- Nisa Nurul. 2009. Efek Hipnotik Ekstrak Valerian pada Mencit BALB/c. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Bagian Farmakologi.

- O'Connell J. 2002. The basics of RT-PCR. Some practical considerations. *Methods Mol Biol.* 193:19-25.
- Olsen Richard W and DeLorey Timothy M. 1999. *Basic Neurochemistry : Molecular, Cellular and Medical Aspects* 6th edition. Philadelphia : Lippincott – Raven.
- Palermo Neto J, Sakate M and Florio J. 1997. Developmental and behavioral effects of postnatal amitraz exposure in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*: 989-997.
- Pharmacist Prescribing Task Force. 2009. *Prescribing by Pharmacists: Information Paper*. CJHP.
- Ralvenius, W. T., Benke, D., Acuna, M. A., Rudolph, U., & Zeilhofer, H. U. (2015). Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor subtype. *6*(6803).
- Rang, H. (2016). *Pharmacology* 8th edition. London: Elsevier: Churchill Livingstone.
- Rudolph U. 2015. Diversity and functions of GABA receptors : A Tribute to Hanns Möhler, Part A, Volume 72. Academic Press.
- Sadock BJ, Sadock VA. 2007. *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry* 10th edition. Philadelphia: Wolter Kluwer.
- Salazar-Jua´rez, A. (2017). Chronic dosing with mirtazapine does not produce sedation in rats. 39.
- Schofield P, Darlison M, et al. 1987. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*: 221-227.
- Sigel E and Steinmann M. 2012. Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptor. *Journal of Biological Chemistry*: 40224-40231.
- Simon J, Wakimoto H, et al. 2004. Analysis of the Set of GABA_A Receptor Genes in the Human Genome. *Journal of Biological Chemistry*: 41422-41435.
- Spitzer N. 2010. How GABA generates depolarization. *The Journal of Physiology*: 757-758.
- Stanley, J. L., Lincoln, R. J., Brown, T. A., McDonald, L. M., Dawson, G. R., & Reynolds, D. S. 2005. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *Journal of Psychopharmacology*, 19(3), 221–227.

- Sundaresan Nandhini, K. B. (2018). Valerian Officialis: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), 36-41.
- Takano K, Yatabe M, et al. 2014. Characteristic Expressions of GABA Receptors and GABA Producing/Transporting Molecules in Rat Kidney. *PLoS One* : p.e105835.
- TAMAM, M. B. (2016). *Pengertian dan Prinsip Kerja Real Time PCR*. Dilihat pada 28 april 2020 dari website *Generasi Biologi*.
- Throne Research, Inc. 2004. Monograph: Valeriana Officinalis. *Alternative Medicine Review*: 438-441.
- Tochigi M, Kato C, et al. 2007. No evidence for significant association between GABA receptor genes in chromosome 15q11–q13 and autism in a Japanese population. *Journal of Human Genetics*: 985-989.
- Tortora G J and Derrickson B. 2012. *Principles of Anatomy & Physiology* 13th edition. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc.
- Wafford, K. A., & Ebert, B. 2008. Emerging anti-insomnia drugs: tackling sleeplessness and the quality of wake time. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(6), 530–540.
- Wagstaff J, Knoll J, et al. 1991. Localization of the gene encoding the GABA_A receptor beta-3 sub-unit to the Angelman/Prader-Willi region of human chromosome 15. *The American Society of Human Genetics*: 330-337.
- Whiting P, Bonnert T, et al. 1999. Molecular and Functional Diversity of the Expanding GABA_A Receptor Gene Family. *Annals NY Acad Sci*.
- Wu Cathy and Nebert D. 2004. Update on genome completion and annotations: Protein Information Resource. *Human Genomics*: 229-233.
- Yoo H, Chung S, et al. 2008. Association of the GABRB3 microsatellite marker in gamma-aminobutyric acid-A receptor beta 3 sub-unit gene with autism spectrum disorders in Korean trios. *Annals of General Psychiatry*: 190.