

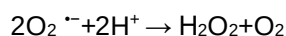
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Epilepsi merupakan gangguan neurologis kronis yang ditandai dengan kejang berulang akibat aktivitas listrik abnormal di otak. WHO (2024) melaporkan lebih dari 50 juta orang di dunia menderita epilepsi, dengan sebagian besar kasus berasal dari negara berpenghasilan rendah dan menengah. Di Indonesia prevalensi epilepsi sebanyak 8,2 per 1.000 penduduk dengan angka insiden mencapai 50 per penduduk. Angka tersebut menegaskan bahwa epilepsi menjadi masalah kesehatan global yang serius. Kondisi ini berdampak luas, tidak hanya pada kesehatan fisik, tetapi juga pada fungsi kognitif, psikososial, dan produktivitas. Oleh sebab itu, penanganan epilepsi yang efektif sangat diperlukan (WHO, 2024; Fitriyani et al., 2023). Pengobatan epilepsi saat ini umumnya menggunakan obat antiepilepsi konvensional. Meskipun banyak pasien merespons baik, sekitar sepertiga penderita mengalami resistensi terhadap obat standar. Kondisi ini membuat pasien tetap mengalami kejang berulang meskipun sudah menjalani terapi. Selain itu, penggunaan obat jangka panjang juga sering menimbulkan efek samping yang cukup mengganggu. Fakta ini mendorong pencarian alternatif terapi yang lebih efektif dan aman (Shankar et al., 2024). Obat antiepilepsi konvensional umumnya bekerja dengan menekan aktivitas listrik abnormal otak. Namun, sebagian besar obat tersebut tidak secara langsung memodulasi stres oksidatif. Hal ini menjadi kelemahan, karena stres oksidatif terbukti berperan penting dalam memperparah epilepsi. Oleh karena itu, dibutuhkan agen yang dapat menghambat kejang sekaligus meningkatkan kapasitas antioksidan. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah penggunaan senyawa alami dengan aktivitas antioksidan tinggi (Li-Ying He et al., 2021).

Stres oksidatif merupakan kondisi yang terjadi ketika produksi spesies oksigen reaktif (ROS) melebihi kapasitas antioksidan endogen. Pada saat kejang, peningkatan aktivitas metabolisme otak memicu pembentukan radikal superoksida ($O_2^{\bullet-}$) secara berlebihan sehingga memicu kerusakan membran lipid, protein, dan DNA neuron (Aguilar et al., 2012). Salah satu sistem pertahanan utama terhadap kondisi tersebut adalah enzim *superoksida dismutase* (SOD), yang bekerja mengkatalisis perubahan radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen melalui reaksi berikut:



Hidrogen peroksida yang terbentuk selanjutnya akan dinetralisasi oleh enzim katalase atau *glutathione peroksidase* sehingga mencegah kerusakan oksidatif lebih lanjut. Namun, penelitian menunjukkan bahwa aktivitas SOD menurun pada kondisi epilepsi. Penurunan ini memperburuk ketidakseimbangan redoks dalam jaringan saraf. Hal ini menjadikan SOD indikator penting dalam menilai tingkat stres oksidatif pada epilepsi (Yilgor & Demir., 2024).

Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian senyawa alami banyak mendapat perhatian. Senyawa bioaktif dari tumbuhan dianggap memiliki efek samping lebih

rendah dan potensi terapeutik tinggi. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa alami yang dikenal dengan sifat antioksidan dan antiinflamasi. Salah satu flavonoid yang banyak diteliti adalah kuersetin, yang ditemukan pada buah, sayur, dan teh. Potensi kuersetin dalam melindungi jaringan saraf menjadikannya kandidat terapi epilepsi (Zhang et al., 2024). Kuersetin merupakan flavonoid alami yang banyak ditemukan pada buah, sayur, dan teh. Senyawa ini telah dikenal luas karena memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, dan neuroprotektif. Kuersetin bekerja dengan menangkap radikal bebas serta meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen. Aktivitas ini menjadikannya kandidat potensial sebagai terapi tambahan pada penyakit yang dipicu stres oksidatif. Salah satunya adalah epilepsi (Akyuz et al., 2021).

Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat yang berkaitan erat dengan struktur kimianya. Senyawa ini memiliki lima gugus hidroksil ($-OH$) pada posisi C-3, C-5, C-7, C-3', dan C-4', serta ikatan rangkap $C2=C3$ yang terkonjugasi dengan gugus karbonil pada C4. Struktur tersebut memungkinkan kuersetin bertindak sebagai donor atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas, termasuk anion superoksida, sehingga mampu menghentikan reaksi berantai oksidatif (Qi et al., 2022; Carrillo-Martínez et al., 2024). Gugus hidroksil pada cincin B, khususnya pada posisi 3' dan 4' yang membentuk struktur katekol, merupakan situs utama donor hidrogen karena memiliki energi disosiasi ikatan $O-H$ yang lebih rendah dan mampu menstabilkan radikal fenoksil melalui delokalisasi elektron, sehingga meningkatkan kemampuan penangkapan radikal bebas (Qi et al., 2022; Zhong et al., 2024). Selain itu, keberadaan ikatan rangkap $C2=C3$ yang terkonjugasi dengan gugus karbonil pada C4 meningkatkan delokalisasi elektron dan kestabilan radikal yang terbentuk setelah donasi hidrogen, sehingga memperkuat aktivitas antioksidan kuersetin secara keseluruhan (Carrillo-Martínez et al., 2024). Selain berperan sebagai antioksidan langsung, kuersetin juga dilaporkan mampu meningkatkan sistem pertahanan antioksidan endogen, termasuk meningkatkan aktivitas enzim superoxide dismutase (SOD), yang berkontribusi dalam menurunkan stres oksidatif pada jaringan otak, khususnya pada kondisi kejang (Tavakoli et al., 2023; Zhang et al., 2024).

Belum banyak studi yang secara spesifik menilai pengaruh kuersetin terhadap aktivitas SOD pada otak mencit yang diinduksi PTZ. Mayoritas literatur hanya menyinggung SOD sebagai bagian kecil dari parameter antioksidan. Akibatnya, kontribusi kuersetin terhadap pemulihan aktivitas SOD belum dapat dipastikan. Hal ini menjadikan penelitian lebih lanjut sangat relevan. Penelitian terbaru mendukung efek protektif kuersetin terhadap kerusakan otak akibat kejang. Tavakoli et al. (2023) menunjukkan bahwa kuersetin mampu menurunkan biomarker stres oksidatif dan inflamasi pada otak tikus model PTZ. Efek tersebut diikuti dengan berkurangnya frekuensi kejang dan peningkatan kapasitas antioksidan. Penelitian Nakhaee dkk. (2021) menunjukkan bahwa kuersetin dosis 10–20 mg/kgBB mampu memperpanjang timbulnya kejang, menurunkan durasi dan keparahan kejang, serta meningkatkan kapasitas antioksidan otak, sedangkan dosis yang lebih tinggi seperti 40 mg/kgBB tidak menunjukkan efek protektif yang optimal bahkan cenderung memberikan efek prokonvulsan. Berdasarkan hal tersebut, dosis kuersetin 20

mg/kgBB dipilih karena masih berada dalam rentang dosis efektif yang memiliki efek neuroprotektif dan antioksidan. Hal ini memperkuat dugaan bahwa kuersetin memiliki mekanisme ganda yaitu menekan kejang dan menghambat stres oksidatif. Dengan demikian, kuersetin memiliki potensi besar sebagai agen antiepilepsi (Nakhaee et al., 2021; Tavakoli et al., 2023).

Model hewan dengan induksi pentilentetrazol (PTZ) digunakan secara luas untuk meniru kondisi epilepsi. PTZ diketahui meningkatkan eksitabilitas neuron dan memicu kejang berulang. Pada penelitian Li et al., (2014) menggunakan PTZ dosis 65 mg/kgBB, dosis tersebut mampu menghasilkan kejang tonik-klonik secara konsisten dengan tingkat mortalitas yang masih rendah dibandingkan dosis yang lebih tinggi. Induksi ini juga menghasilkan peningkatan ROS serta penurunan aktivitas antioksidan, termasuk SOD. Fenomena tersebut memperlihatkan keterkaitan erat antara kejang, stres oksidatif, dan kerusakan neuron. Oleh karena itu, diperlukan intervensi yang mampu menjaga aktivitas SOD untuk mencegah kerusakan lebih lanjut (Tavakoli et al., 2023; Akyüz et al., 2021).

Induksi kejang dengan PTZ telah terbukti menurunkan kapasitas pertahanan antioksidan otak. Kondisi ini memperlihatkan lemahnya sistem perlindungan alam dalam menghadapi stres oksidatif. Apabila tidak dikendalikan, stres oksidatif dapat memperburuk kerusakan neuron. Kerusakan tersebut berkontribusi terhadap peningkatan frekuensi dan keparahan kejang. Dengan demikian, strategi terapeutik yang menargetkan stres oksidatif menjadi sangat penting (Freitas et al., 2021; Patel & Frey, 2022). Data dari penelitian eksperimental mendukung pentingnya modulasi stres oksidatif dalam epilepsi. Tavakoli et al. (2023) melaporkan bahwa stres oksidatif meningkat secara signifikan pada tikus yang diinduksi PTZ. Kondisi ini diikuti dengan penurunan aktivitas enzim antioksidan, termasuk SOD. Fakta ini menunjukkan peran sentral stres oksidatif dalam kerusakan neuron pada epilepsi. Dengan demikian, intervensi yang mampu meningkatkan aktivitas SOD perlu dipelajari lebih lanjut (Nakhaee et al., 2021; Tavakoli et al., 2023).

Beberapa penelitian sebelumnya telah mengeksplorasi potensi kuersetin sebagai agen antioksidan pada model epilepsi. Namun, sebagian besar hanya menilai biomarker umum seperti malondialdehid (MDA) dan kapasitas antioksidan total. Parameter spesifik seperti aktivitas SOD jarang dijadikan fokus utama. Padahal, SOD merupakan enzim kunci dalam pertahanan antioksidan tubuh. Penelitian ini fokus pada pengaruh kuersetin terhadap aktivitas SOD secara spesifik. Belum banyak studi yang menyoroti hubungan langsung antara kuersetin dan SOD pada epilepsi. Dengan mengevaluasi aktivitas SOD, penelitian ini dapat memberikan pemahaman yang lebih jelas tentang mekanisme protektif kuersetin. Hasil penelitian diharapkan menambah bukti ilmiah baru dalam bidang neurofarmakologi. Selain itu, penelitian ini dapat menjadi dasar untuk pengembangan terapi berbasis flavonoid di masa depan (Akyüz et al., 2021).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian kuersetin terhadap aktivitas SOD pada otak

mencit yang diinduksi PTZ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh pemberian kuersetin terhadap aktivitas SOD pada otak mencit yang diinduksi PTZ?

BAB II

METODE PENELITIAN

2. 1 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu alu, batang pengaduk, botol cokelat, cawan porselen, gelas *beaker* (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), gunting bedah, *homogenizer Dounce*, *hotplate*, inkubator, kanula, labu ukur (Pyrex®), lumpang, *microplate reader* (BMG LABTECH® Omega S/N 415-5221), *microtube*, mikropipet, pisau bedah, sendok tanduk, sentrifugasi, spuit 1 cc (Onemed®), timbangan analitik (Ohaus®), vial, *vortex* (Biologix®), *96 well plate*, dan *water bath*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, asam valproate, *aqua pro injection*, hewan coba mencit (*Mus musculus*), kuersetin (Sigma-Aldrich® nomor katalog Q4951-10G), sodium *carboxymethylcellulose* (Na-CMC), pakan standar mencit, pentilentetrazol (RHAWN Nomor Katalog R002208), *SOD Assay Kit* (Sunlong Biotech® nomor katalog AK0583-100T-48S), dan *underpad*.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan Hewan Uji

Pada penelitian ini digunakan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) betina yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sebanyak 20 ekor dengan bobot ± 20 gram. Mencit diaklimatisasi dengan cara ditempatkan dalam kondisi suhu laboratorium, diberi pakan dan minum, serta diadaptasikan dengan lingkungan selama minimal 1 minggu.

2.2.2 Pembuatan Larutan Uji Koloidal Na-CMC 0,5% b/v

Larutan uji koloidal Na-CMC 0,5% b/v dibuat sebanyak 100 mL. Sebanyak 0,5 g serbuk Na-CMC ditimbang dan dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam gelas *beaker* kemudian dilarutkan dengan 50 mL *aquadest* panas sambil diaduk hingga semuanya terlarut dan terbentuk massa kental. Larutan dicukupkan hingga volume 100 mL sehingga didapatkan natrium CMC dengan konsentrasi 0,5% b/v (Haskins et al., 2023).

2.2.3 Pembuatan Suspensi Kuersetin 20 mg/KgBB

Sebanyak 0,02 g kuersetin ditimbang kemudian 10 mL Na-CMC 0,05% yang telah disiapkan sebelumnya ditambahkan secara perlahan ke dalam serbuk kuersetin sambil diaduk hingga terbentuk suspensi yang homogen. Suspensi kuersetin yang diperoleh kemudian diberikan kepada mencit sesuai dengan berat badan masing-masing hewan uji.

2.2.4 Pembuatan Larutan PTZ 65 mg/kgBB

Sebanyak 0,039 g pentilentetrazol (PTZ) ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 6 mL NaCl 0,09%. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan vortex hingga diperoleh larutan homogen. Larutan PTZ yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai penginduksi kejang pada mencit dan diberikan sesuai dengan berat badan masing-masing hewan uji.

2.2.5 Penyiapan Larutan Asam Valproat 300 mg/kgBB

Larutan asam valproat dosis 300 mg/kgBB disiapkan menggunakan sediaan sirup dengan konsentrasi 250 mg/5 mL (50 mg/mL). Perhitungan volume pemberian dilakukan dengan rumus dosis (mg/kgBB) dikalikan berat badan hewan (kg) kemudian dibagi dengan konsentrasi sediaan (mg/mL).

2.2.6 Perlakuan Hewan Uji

Sebelum diberikan perlakuan terlebih dahulu dilakukan pengajuan etik ke Komite Etik Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Hewan uji yang digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*) betina sebanyak 20 ekor diberi perlakuan selama 14 hari dan dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan yang berbeda. Hewan uji diambil secara acak lalu ditimbang, kemudian dikelompokkan menjadi:

1. Kelompok I (Kontrol sehat): Hewan uji tanpa perlakuan
2. Kelompok II: Hewan uji diberikan Na-CMC sebagai pembawa melalui rute peroral selama 14 hari. Pada hari ke-14, hewan uji diinduksi dengan PTZ dosis 65 mg/kgBB 30 menit setelah pemberian Na-CMC.
3. Kelompok III: Hewan uji diberikan kuersetin (20 mg/kgBB) melalui rute peroral selama 14 hari. Pada hari ke-14, hewan uji diinduksi dengan PTZ dosis 65 mg/kgBB 30 menit setelah pemberian Na-CMC.
4. Kelompok IV (Kontrol positif): Hewan uji diberikan asam valproat melalui rute peroral selama 14 hari. Pada hari ke-14, hewan uji diinduksi dengan PTZ dosis 65 mg/kgBB 30 menit setelah pemberian Na-CMC.

2.2.7 Pengambilan Organ

Mencit dieutanasia dengan metode dislokasi servikal. Setelah dipastikan hewan telah mati dan tidak menunjukkan gerakan spontan, dilakukan pengambilan jaringan otak melalui pembedahan kranium. Prosedur pembedahan dilakukan dengan menggunting tulang kranium secara sagital dari arah kaudal (oksipital) menuju rostral (frontal) tepat di antara kedua hemisfer otak. Selanjutnya, otak dilepaskan dari regio basal dengan memisahkannya dari jaringan ikat di sekitarnya (Darwatiek dkk., 2017). Jaringan otak yang diperoleh kemudian dicuci menggunakan *Phosphate-buffered saline* (PBS) dingin untuk menghilangkan sisa darah. Selanjutnya jaringan otak dikeringkan, dimasukkan ke dalam pot sampel, dan disimpan di atas es hingga proses analisis selanjutnya.

2.2.8 Penimbangan Bobot Organ

Otak yang telah diperoleh kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik untuk memperoleh data bobot basah organ secara akurat. Penimbangan dilakukan segera setelah organ diambil untuk mencegah perubahan berat akibat penguapan atau kerusakan jaringan. Data bobot organ kemudian dicatat sebagai salah satu parameter penelitian.

2.2.9 Penyiapan Sampel Biologis

Jaringan otak yang telah diperoleh kemudian dihomogenkan pada kondisi dingin untuk menjaga stabilitas enzim. Proses homogenisasi dilakukan menggunakan *homogenizer Dounce* dalam larutan reagen ekstraksi. Homogenat yang diperoleh kemudian disentrifugasi pada kecepatan $8000 \times g$ selama 10 menit pada suhu 4°C . Selanjutnya, supernatan yang mengandung enzim *Superoxide dismutase* (SOD) dipindahkan ke tabung baru. Supernatan tersebut digunakan secara langsung untuk pengukuran aktivitas SOD atau disimpan sementara pada suhu -80°C .

2.2.10 Penyiapan Reagen Kerja

Reagen yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari kit pengukuran aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD) (*SunLong Biotech nomor katalog AK0583*). Kit terdiri atas beberapa komponen utama, yaitu *extraction reagent*, Reagen I, Reagen II, Reagen III, dan Reagen IV yang disimpan pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$. Sebelum digunakan, reagen dipersiapkan sesuai dengan protokol yang tertera pada kit, seperti berikut:

1. Reagen I, reagen III, dan reagen IV dipanaskan terlebih dahulu menggunakan water bath pada suhu 37°C selama 5 menit sebelum digunakan.
2. Reagen II disiapkan dengan mencampurkan 30 μL reagen II dengan 270 μL aquadest hingga homogen.
3. Reagen IV disiapkan dengan mencampurkan 60 μL reagen IV dengan 240 μL aquadest hingga homogen.

2.2.11 Pengukuran Aktivitas SOD

Pengukuran aktivitas SOD dilakukan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 560 nm. Prosedur analisis meliputi tahap pemanasan alat, penyiapan reagen, inkubasi campuran reaksi, serta pembacaan absorbansi pada 96-well plate untuk memperoleh nilai aktivitas enzim *Superoxide dismutase* (SOD). Sebelum pengukuran dilakukan, microplate reader dipanaskan selama 30 menit dan diatur pada panjang gelombang 560 nm. Selanjutnya disiapkan reagen dan larutan kerja reagen untuk pengisian well. Setiap well kemudian disusun dengan komponen reaksi sesuai dengan volume yang tercantum pada tabel berikut.

Tabel 1. Susunan sumur 96-well plate

Komponen/ Sumur	Volume per sumur (μL)	Volume total (μL)
Blank 1 (B1)	45 μL reagen I + 20 μL Larutan kerja reagen II+35 μL reagen III + 90 μL aquades + 10 larutan kerja reagen IV	200
Blank 2 (B2)	45 μL reagen I +35 μL reagen III + 110 μL aquades + 10 larutan kerja reagen IV	200
Kontrol (C)	20 μL sampel +45 μL reagen I+35 μL reagen III + 90 μL aquades + 10 larutan kerja reagen IV	200
Test/Uji (T)	20 μL sampel +45 μL reagen I+20 μL larutan kerja reagen II+35 μL reagen III + 90 μL aquades + 10 larutan kerja reagen IV	200

Setiap sumur dicampur hingga homogen untuk memastikan komponen bereaksi secara merata. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke 96 *well plate* dan dilakukan pengukuran pada *microplate reader* pada panjang gelombang 560 nm. Apabila terjadi presipitasi, larutan dicampur kembali hingga homogen sebelum pengukuran.

2.2.12 Perhitungan Aktivitas SOD

Nilai absorbansi yang diperoleh dari pembacaan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 560 nm digunakan untuk menghitung persen inhibisi reaksi.

$$\% \text{ inhibisi} = (\Delta AB - \Delta AT) / \Delta AB \times 100\%$$

Nilai persen inhibisi yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan aktivitas enzim SOD mempertimbangkan faktor pengenceran sampel dan berat jaringan.

$$\text{Aktivitas SOD (U/g massa)} = (10 \times P / (1 - P)) : W \times F$$

Keterangan:

- P = persen inhibisi
F = faktor pengenceran
W = massa sampel

2.2.12 Analisis Data

Data hasil pengukuran dikumpulkan dan dianalisis menggunakan statistik dengan bantuan *software* GraphPad Prism. Sebelum dilakukan analisis perbandingan, data diuji normalitas menggunakan uji Shapiro–Wilk. Homogenitas varians diuji menggunakan uji Bartlett's. Data aktivitas SOD dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA, sedangkan data bobot relatif otak dianalisis menggunakan uji non-parametrik Kruskal–Wallis. Data yang diperoleh kemudian disajikan dalam bentuk

tabel dan grafik batang memperlihatkan perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan. Data hasil statistik yang diperoleh kemudian dibahas dan dibuat kesimpulan.