

**PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP EKSPRESI MAP2 PADA  
KULTUR NEURON SH-SY5Y YANG DIINDUKSI HIPERGLIKEMIA KRONIS**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Farhan Adi Pratama**

**NIM. 155070100111062**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

## DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.4.1 Manfaat Akademis .....	3
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Diabetes Mellitus .....	5
2.1.1 Pengertian dan Epidemiologi Diabetes Mellitus .....	5
2.1.2 Patofisiologi Diabetes Mellitus .....	5
2.2 Neuropati Diabetes .....	6
2.3 Ion Ca <sup>2+</sup> (Kalsium) .....	8
2.4 <i>Microtubule Associated Protein 2</i> (MAP2) .....	9
2.5 Pengukuran Kadar MAP2 .....	11
2.6 Amlodipin .....	11
2.7 Neuron SH-SY5Y .....	12
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	14
3.2 Deskripsi Kerangka Konsep .....	15
3.3 Hipotesis Penelitian .....	15
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Desain Penelitian .....	16
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	16
4.3 Variabel Penelitian .....	16
4.4 Besaran Sampel .....	16
4.5 Standar Operasional Prosedur .....	17
4.6 Prosedur Penelitian .....	18
4.7 Cara Pengukuran Ekspresi MAP2.....	25



4.8 Alur Kerangka Kerja Penelitian .....	26
4.9 Analisis Data .....	26
<b>BAB V HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN</b>	
5.1 Hasil Penelitian .....	27
5.2 Analisis Data .....	27
5.2.1 Statistik Deskriptif .....	27
5.2.2 Uji Normalitas Data .....	28
5.2.3 Hasil Analisis Pengaruh Amlodipin (10 nM dan 100 nM) Terhadap Ekspresi MAP2 pada Hiperglikemia 50 mM .....	28
5.2.4 Hasil Analisis Efek Dosis Amlodipin (10 nM dan 100 nM) Terhadap Ekspresi MAP2 pada Hiperglikemia 50 mM .....	31
<b>BAB VI PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN</b>	
6.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Ekspresi MAP2 pada Kondisi Hiperglikemi (induksi 50 mM glukosa) .....	32
6.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekspresi MAP2 .....	33
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	35
<b>BAB VII PENUTUP</b>	
7.1 Kesimpulan .....	36
7.2 Saran .....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	38
<b>LAMPIRAN</b> .....	45



HALAMAN PENGESAHAN  
TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP EKSPRESI MAP2 PADA  
KULTUR NEURON SH-SY5Y YANG DIINDUKSI HIPERGLIKEMIA KRONIS

Oleh:

Farhan Adi Pratama

NIM. 155070100111062

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 16 April 2019

Dan dinyatakan lulus oleh:

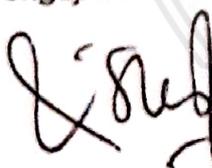
Penguji I,



Edwin Widodo, SSi, MSc.

NIP. 198105042005011001

Penguji II/Pembimbing I



dr. Dessika Rahmawati, M.Biomed, Sp.S  
NIP. 2016098212112001

Penguji III/Pembimbing II



dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes  
NIP. 197605192005012001

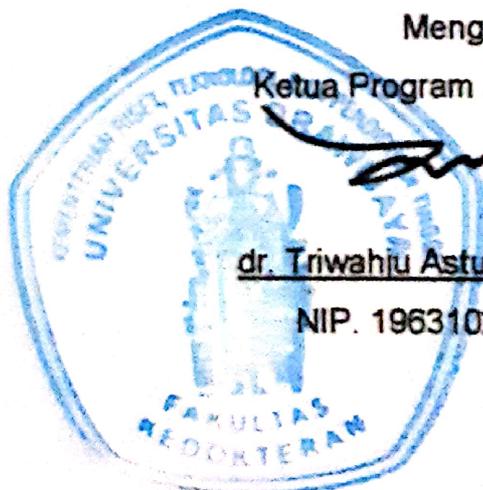
Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran



dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P (K)

NIP. 196310221996012001



## ABSTRAK

Pratama, Farhan Adi. 2019. **Pengaruh Pemberian Amlodipin Terhadap Ekspresi MAP2 pada Kultur Neuron SH-SY5Y yang Diinduksi Hiperglikemia Kronis.** Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dosen Pembimbing: (1) dr. Dessika Rahmawati, M.Biomed, Sp.S (2) dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes.

Hiperglikemi adalah kadar glukosa darah lebih dari 240 mg/dl disertai dengan penurunan sekresi insulin dan kerja insulin atau keduanya. Pada sel kultur dikatakan hiperglikemi apabila pemberian glukosa dalam dosis antara 25 mM – 100 mM. Akibat dari kondisi hiperglikemi terjadi peningkatan ion  $Ca^{2+}$  sitosol yang menyebabkan disfungsi pada mitokondria. Akumulasi dari ion  $Ca^{2+}$  menyebabkan meningkatnya stress oksidatif. Stres oksidatif akan meningkatkan aktivitas calpain (*Calcium Activated Neural Protease*) menyebabkan MAP2 (*Microtubule Associated Protein 2*) menurun sehingga akan meningkatkan kematian sel. MAP2 merupakan protein sitoskeletal yang berikatan dengan aktin dan filamen di mikrotubulus yang berfungsi dalam difensiasi dan plastisitas neuron. Pemberian amlodipin yang berikatan dengan reseptor *L-type Calcium Channel* (LTCC) dapat mengurangi influks ion  $Ca^{2+}$  intraseluler. Berkurangnya influks ion  $Ca^{2+}$  intraseluler akan menurunkan stres oksidatif dan aktivitas calpain sehingga dapat meningkatkan MAP2. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek pemberian amlodipin terhadap ekspresi MAP2 pada sel kultur neuron SH-SY5Y. Penelitian ini menggunakan pendekatan uji normalitas, uji anova dan uji korelasi *spearman*. Berdasarkan hasil uji anova pada pemberian amlodipin 10 nM, 100 nM dan tanpa amlodipin terhadap ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5 yang diinduksi glukosa 50 mM selama 6 hari terjadi penurunan MAP2 ( $p=0,082$ ) artinya, pemberian amlodipin 10 nM, 100 nM dan tanpa pemberian amlodipin tidak memiliki pengaruh terhadap MAP2. Berdasarkan hasil uji korelasi *spearman* terdapat hubungan yang kuat ( $p=0,011$ ) ( $r=-0,791$ ) artinya semakin tinggi pemberian dosis amlodipin akan menurunkan ekspresi MAP2.

Kata Kunci: MAP2, amlodipin, hiperglikemi, Kultur neuron SH-SY5Y

## ABSTRACT

Pratama, Farhan Adi. 2019. **The Effect of Amlodipine to MAP2 on Neurons Culture SH-SY5Y that induced by Chronic Hyperglycemia** . Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dessika Rahmawati, M.Biomed, Sp.S (2) dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes.

Hyperglycemia is a blood glucose level of more than 240 mg / dl ,accompanied by a decrease in insulin secretion and insulin action or both. In culture cells it is said to be hyperglycemic when administering glucose in doses between 25 mM - 100 mM. As a result of hyperglycemic conditions there is an increase in cytosolic  $Ca^{2+}$  ions which cause mitochondrial dysfunction. The accumulation of  $Ca^{2+}$  ions causes increased oxidative stress. Oxidative stress will increase the activity of Calcium Activated Neural Protease causing MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) to decrease which will increase the cell death. MAP2 is a cytoskeletal protein that binds to actin and filaments in microtubules that function in differentiation and plasticity of neurons. The administration of amlodipine which binds to the L-type Calcium Channel receptor (LTCC) can reduce the intracellular  $Ca^{2+}$  ion influx. The reduced intracellular  $Ca^{2+}$  ion influx will reduce oxidative stress and Calcium Activated Neural Protease activity, and caused the MAP2 increases. The aim of research is to determine on the effects of amlodipine on the expression of MAP2 in SH-SY5Y neuron culture cells. This study uses the normality test, ANOVA test and spearman correlation test. Based on the results of the Anova test on the administration of 10 nM, 100 nM and without amlodipine on the expression of MAP2 in culture of SH-SY5 neurons, which were 50 mM glucose for 6 days there was decrease in MAP2 ( $p = 0.082$ ) means that administration of amlodipine 10 nM, 100 nM and without amlodipine did not have effect in MAP2. Based on Spearman correlation test results, there was a strong relationship ( $p = 0.011$ ) ( $r = -0.7791$ ) means that the higher the dose of amlodipine, the lower the MAP2 expression.

Keywords: MAP2, amlodipine, hyperglycemia, SH-SY5Y neuron culture



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) adalah kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia karena kelainan kerusakan sekresi insulin, aksi insulin, atau keduanya. Penyebab utama hiperglikemia adalah penurunan sekresi insulin dan kerja insulin, Hiperglikemia kronik dengan DM berhubungan dengan kerusakan jangka panjang, kegagalan dari berbagai organ seperti mata, ginjal, saraf, hati, dan pembuluh darah (American Diabetes Association, 2014). Penderita diabetes militus ditandai dengan poliuria, polidipsia, polifagia dengan penurunan berat badan. Diabetes militus dalam jangka panjang dapat menimbulkan kelainan makrovaskular dan mikrovaskular (Putri, N. H. K., & Isfandiari, M. A. 2013). Prevalensi diabetes mellitus di dunia pada kelompok orang dewasa sekitar umur 20-79 tahun mempengaruhi 285 juta orang pada tahun 2010 dan akan terjadi peningkatan 439 juta orang pada tahun 2030. Diantara tahun 2010 dan 2030 diprediksi adanya peningkatan 69 % dengan diabetes mellitus yang berada pada negara yang berkembang dan peningkatan 20 % pada negara maju (Shaw, J. E., dkk., 2010).

Komplikasi diabetes mellitus terbanyak di RSUP Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta (RSCM) adalah 54 % neuropati pada tahun 2011 (Supriyadi, S., & Susmini, S. 2019). Neuropati adalah kerusakan neuron di sistem saraf bahkan bisa mempengaruhi organ lainnya. Pada kondisi hiperglikemia akan mengalami gangguan metabolisme sel sehingga sel mengalami gangguan dalam menetralkan radikal bebas selama proses metabolik yang menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat mengakibatkan neuropati. Hal ini diakibatkan dari gangguan

metabolisme, sinyal sel, transmisi sel bahkan ke kematian sel. Stres oksidatif yang meningkat akan mengakibatkan gangguan fungsi seluler. Meningkatnya stres oksidatif menyebabkan turunnya fungsi *Microtubule Associated Protein-2* (MAP2) sehingga memicu terjadinya kerusakan struktur mikrotubulus pada neuron dan gangguan transmisi aksonal (Zhang, J. and Dong, X. 2012).

Pada saat kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan *Calcium Activated Neural Protease* (calpain) dikarenakan stres oksidatif dan ion Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) yang meningkat (Stalker, Skvarka and Scalia, 2003). Peningkatan ion Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) akan menyebabkan influks kalsium dari ekstraseluler, mobilisasi kalsium yang berlebihan, eliminasi yang terbatas dari sitoplasma (Nugroho, A. E. 2006). Amlodipin merupakan obat antagonis kalsium. Obat ini biasanya dipakai sebagai obat antihipertensi dan antiangina. Cara kerja dari obat ini adalah menghambat masuknya ion kalsium melalui membran ke dalam otot polos vaskular dan otot jantung sehingga mempengaruhi kerja kontraksi otot polos vaskular dan otot jantung Alegantina, S., & Isnawati, A. (2015). Mekanisme kerja amlodipin pada sel saraf adalah dengan berikatan dengan reseptor L-Type Calcium Channel (LTCC) sehingga dapat mengurangi influx  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler (Bhardwaj *et al.*, 2015). Pencegahan apoptosis sel neuron kortikal yang dipapar oleh kadar oksidatif stres yang tinggi, pemberian *Amlodipin Camsylate* (AC) dan *Amlodipin Besylate* (BC) terbukti memiliki sifat neuroprotektif (Yamagata, Ichinose and Tagami, 2004).

Banyak area pada bidang ilmu neurologi terhambat dengan terbatasnya pilihan model *in vitro* yang menyerupai sel neuron dewasa yang mengekspresikan protein manusia (Agholme *et al.*, 2010). Penggunaan sel neuron primer mamalia yang berasal dari jaringan embrionik sistem saraf pusat terbatas karena fakta bahwa, sekali sel ini terdiferensiasi maka tidak lagi dapat diperbanyak. Untuk

mengatasi keterbatasan ini maka dapat digunakan garis sel yang diubah menjadi seperti sel neuron. SH-SY5Y Merupakan salah satu yang paling umum digunakan (Kovalevich and Langford, 2013).

Penggunaan Amlodipin pada kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis diharapkan mampu untuk menjadi pengobatan maupun pencegahan agar tidak terjadi komplikasi, yang khususnya neuropati.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah pemberian Amlodipin dapat meningkatkan ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan mekanisme pemberian amlodipin sebagai terapi dalam menghambat terjadinya neuropati pada diabetes.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- 1 Mengetahui apakah pemberian Amlodipin dapat meningkatkan ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis.
- 2 Mengetahui apakah perbedaan dosis amlodipin dapat meningkatkan ekspresi MAP2.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Akademis**

1. Menambah dasar teori mengenai mekanisme dan pengaruh amlodipin terhadap neuropati diabetes

2. Dapat dijadikan kajian untuk menambah keilmuan pada pengobatan neuropati diabetes.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Dapat digunakan salah satu terapi pada pengobatan diabetik neuropati.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Diabetes Mellitus

##### 2.1.1 Pengertian dan Epidemiologi

Diabetes mellitus adalah kelompok penyakit metabolik yang ditandai oleh hasil hiperglikemia dari kerusakan sekresi insulin, aksi insulin, atau bisa keduanya. Hiperglikemia adalah suatu keadaan kadar glukosa di dalam darah lebih dari 240 mg/dl. Penyebab utama hiperglikemia adalah penurunan sekresi insulin dan kerja insuli atau bisa keduanya. Hiperglikemia kronik berhubungan dengan kerusakan jangka panjang, disfungsi dan kegagalan dari berbagai organ seperti mata, ginjal, saraf, hati, dan pembuluh darah (American Diabetes Association, 2014). Penderita DM tipe 2 lebih banyak daripada DM tipe 1, berdasarkan epidemiologi DM terdapat peningkatan angka insidensi dan prevalensi DM tipe 2 di dunia. WHO memprediksi adanya kenaikan penderita DM di Indonesia dari 8,4 juta tahun 2000 menjadi 21,3 juta tahun 2030. Jadi didapatkan kesimpulan bahwa penderita DM yaitu diprediksi 2-3 kali lipat pada tahun 2030 (Soelistijo, A. S. *et al.* 2011).

##### 2.1.2 Patofisiologi

DM adalah ketidakseimbangan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. Gambaran utamanya adalah hiperglikemia yang disebabkan oleh sekresi insulin dan kerja insulin ataupun keduanya. Penderita DM tipe 2 mengalami resistensi insulin dan disfungsi sel  $\beta$  pankreas. Resistensi insulin menyebabkan insulin tidak bisa bekerja secara optimal sehingga sel  $\beta$  pankreas harus mensekresi insulin dengan kualitas yang lebih besar untuk mempertahankan homeostasis glukosa darah.

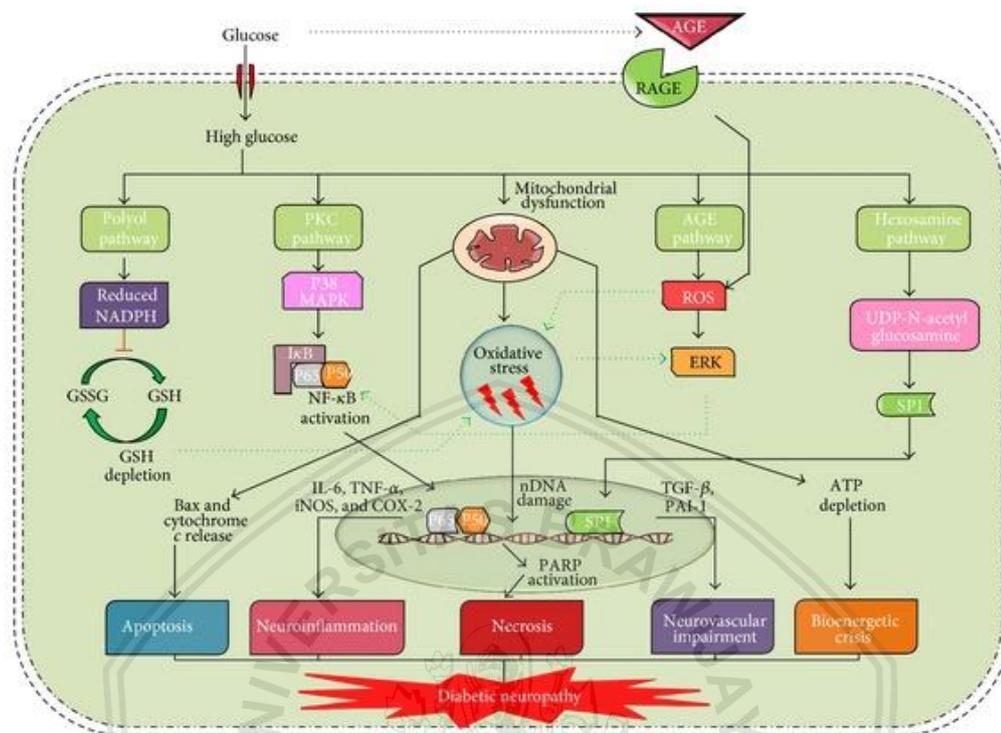
Gejala hiperglikemia ditandai dengan poliuria, polidipsi, polifagia dan penurunan berat badan. Komplikasi dari hiperglikemia yaitu neuropati yang menyebabkan ulkus ekstremitas di bawah, amputasi, nefropati yang menyebabkan gagal ginjal dan neuropati otonom (American Diabetes Association, 2014).

Komplikasi terbanyak penyakit DM yaitu neuropati. Neuropati diabetes adalah adanya kerusakan saraf yang bersifat fokal atau difus akibat dari hiperglikemia kronis. Prevalensi penyakit DM yang mengalami komplikasi neuropati yaitu 50 % (Desnita, 2018).

## 2.2 Neuropati Diabetes

Neuropati diabetes adalah hilangnya atau rusaknya neuron karena hiperglikemia dalam jangka waktu yang lama. Kelainan patologi ditandai dengan hilangnya serabut saraf dan degenerasi aksonal. Pada kondisi neuropati biasanya ditandai rasa kesemutan di ekstremitas, nyeri dan mati rasa di ekstremitas. Gejala bisa melibatkan sistem saraf sensoris atau motorik maupun sistem saraf otonom. Kondisi pasien DM 50 % akan berkembang menjadi neuropati pasien DM (Ahamed, M. M., & Banji, O., 2012).

Proses terjadinya neuropati diabetes berawal dari hiperglikemia yang mengakibatkan terjadinya peningkatan aktivasi jalur poliols, sintesis *advance glycosilation end products* (AGEs), pembentukan radikal bebas dan aktivitas protein kinase. Aktivitas berbagai jalur tersebut berujung pada kurangnya vasodilatasi, sehingga aliran darah ke saraf menurun sehingga menyebabkan neuropati diabetes.



**Gambar 2.2** Patofisiologi Neuropati Diabetik (Sandireddy, Yerra and Areti, 2014).

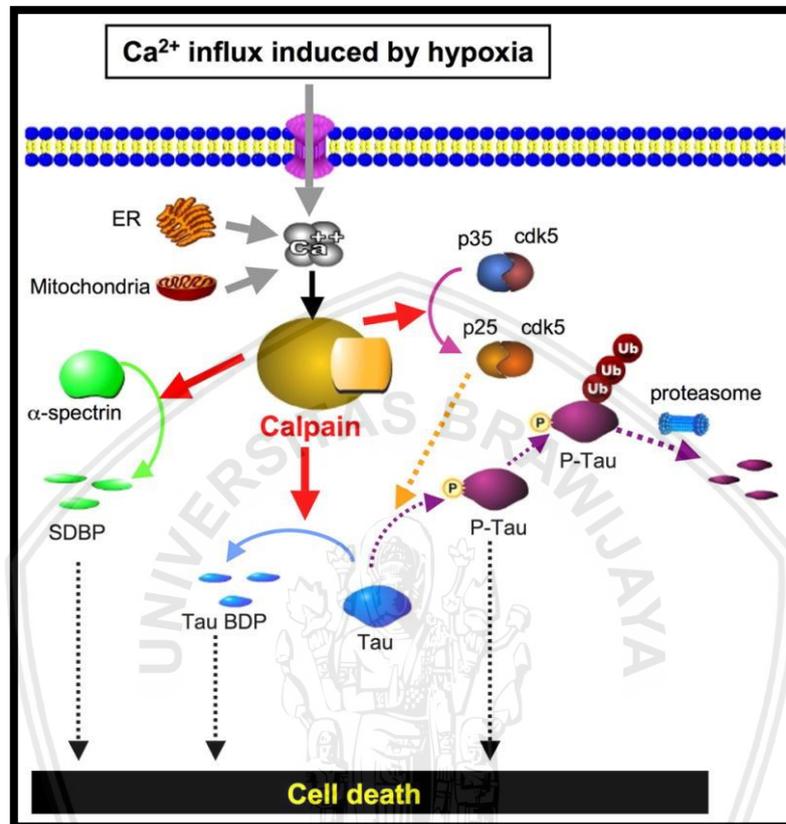
Ada beberapa mekanisme yang berpengaruh pada patogenesis neuropati diabetes yaitu (i) peningkatan jalur polioliol menyebabkan akumulasi sorbitol dan glukosa, pengurangan myoinositol. Akibat turunya myoinositol menyebabkan gangguan transportasi aksonal dan kerusakan struktur saraf, (ii) aktivasi jalur PKC yang berlebihan, (iii) peningkatan aktivitas mitokondria menyebabkan produksi ROS tinggi, (iv) peningkatan *advance glycosilation end products* (AGEs) menyebabkan permeabelitas dan interaksi sel terganggu, (v) peningkatan jalur *hexosamine* (Sandireddy, Yerra and Areti, 2014).

### 2.3 Ion $\text{Ca}^{2+}$ (Kalsium)

Pada saat kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan ion kalsium dan stress oksidatif menyebabkan aktivitas calpain meningkat. Peningkatan calpain menyebabkan proses inflamasi terhambat dengan cara penurunan NO sehingga akan mengakibatkan disfungsi vascular (Stalker, Skvarka and Scalia, 2003). Peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  berimplikasi dalam berbagai sistem saraf perifer yaitu nyeri neuropatik dan polineuropati diabetes. Pada kondisi hiperglikemia terjadi peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan disfungsi mitokondria. Peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  di retikulum endoplasma (RE) dan mitokondria menyebabkan penurunan produksi ATP, hal ini diakibatkan berkurangnya reseptor insulin. Peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  di retikulum endoplasma dan mitokondria menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan turunnya proses sintesis protein, modifikasi posttranslational yang mempengaruhi berkurangnya suplai *voltage-gated* ke akson sehingga menyakibatkan penurunan kecepatan konduksi saraf (Ferryhough, P., & Calcutt, N. A., 2010).

Meningkatnya ion  $\text{Ca}^{2+}$  di intraseluler akan meningkatkan aktivitas calpain. Calpain merupakan kelompok enzim sistein protease sitoplasmik yang aktivitasnya tergantung ion  $\text{Ca}^{2+}$ , berfungsi modulasi sinyal transduksi, fusi membran, proliferasi, differensiasi dan apoptosis sel. Calpain berperan dalam proteolisis sejumlah protein intrasel yang berhubungan dengan pengikatan membran yang diikuti autolisis. Peningkatan ion  $\text{Ca}^{2+}$  akan menyebabkan perubahan konformasi, yang menyebabkan domain IIa dan IIb saling berdekatan untuk membentuk situs katalitik fungsional, ketika tidak ada kalsium menyebabkan subdomain IIa dan IIb saling terpisah secara structural. Sehingga aktivitas calpain diatur oleh ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,

semakin tinggi aktivitas dari calpain akan menyebabkan kerusakan pada sel (Hardiany, 2013).



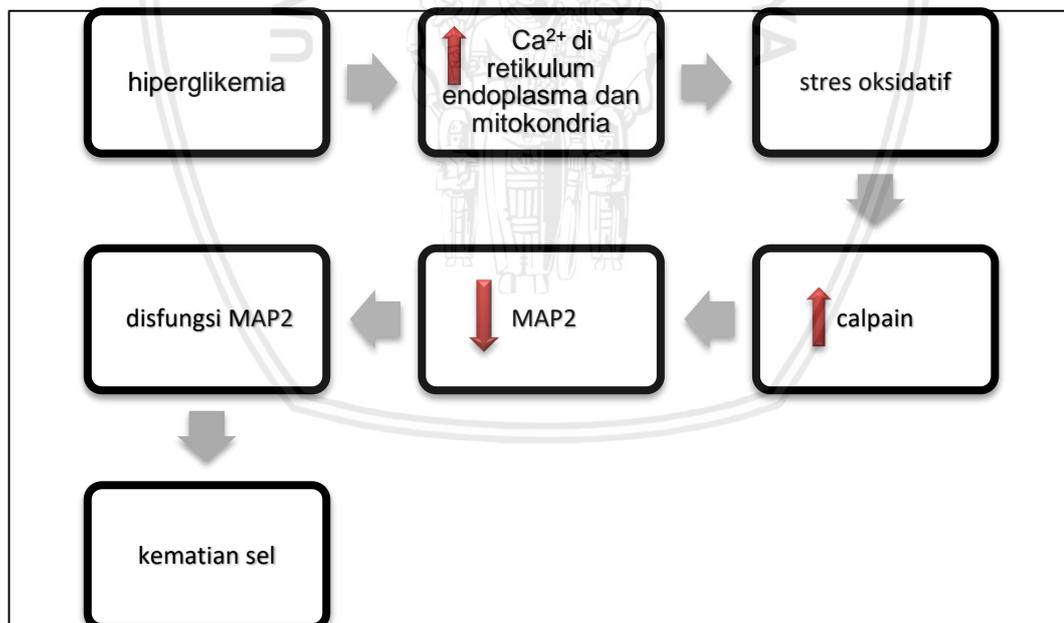
Gambar 2.3 Mekanisme Aktivasi Calpain (Wöfl *et al.*, 2009).

Influx ion Ca<sup>2+</sup> di intraseluler akan meningkatkan stress oksidatif menyebabkan aktivitas calpain yang berlebihan. Aktivitas calpain yang berlebihan menyebabkan kerusakan *Microtubule Associated Protein Tau* (MAPT) dan *alpha spectrin* kemudian akan meningkatkan kematian sel (Wöfl *et al.*, 2009).

#### 2.4 *Microtubule Associated Protein 2 (MAP2)*

*Microtubule Associated Proteins* (MAPs) termasuk protein vertebra MAP2, MAP4, dan Tau. MAP2 banyak berada di dendrit dan sel-sel yang bersifat *cholinoceptive*. MAP2 berikatan mikrotubul dan F actin untuk proses neurophogenik, inisiasi aksonal. MAP2 berperan pada diffensiasi dan plastisitas

neuron yaitu respon neuronal untuk faktor pertumbuhan, neurotransmitter, dan aktivitas sinapsis (Dehmelt and Halpain, 2004). Plastisitas neuron bisa dilihat dari dendrit dan spina yang berfungsi sebagai jaringan komunikasi dan berperan pada integritas sinapsis. Dendrit merupakan proses perpanjangan dari soma yang berfungsi sebagai sinap untuk menerima informasi sedangkan spina merupakan bagian post sinaps yang berfungsi mencegah difusi protein. Penurunan fosforilasi MAP2 akan mengalami perubahan patologis pada dendrit dan spina yang terjadi pada sel saraf (Irawan, V. 2015). Ada 2 jenis MAP2 yaitu *High Molecular Weight MAP2* (HMWMAP2) terdiri dari MAP2<sub>a</sub> dan MAP2<sub>b</sub> yang diekspresikan di neron sedangkan *Low Molecular Weight MAP2* (LMWMAP2) terdiri dari MAP2<sub>c</sub> dan MAP2<sub>d</sub> berada di sel glia.



Gambar 2.4 Mekanisme disfungsi dari MAP2

Keadaan Hiperglikemia akan meningkatkan influks kalsium di retikulum endoplasma dan mitokondria sehingga dapat menyebabkan stres oksidatif dan mengaktifkan *Calcium Activated Neural Protease* (calpain). Aktivitas calpain akan menyebabkan disfungsi dari MAP2 yaitu kerusakan struktur mikrotubul, kelainan

transmisi akson dan dendrit. Mekanisme MAP2 di neuron berinteraksi dengan tubulin binding domain, pengaturan aksonal dan transmisi organel di akson dan dendrit (Zhang, J. and Dong, X. 2012). Pada saat terjadi aktivitas calpain yang meningkat akan mendegradasi MAP2 terutama di akson dan dendrit sehingga terjadi penurunan fungsi dendrit dan akson. Penurunan fungsi dendrit dan akson akan mengalami kematian sel (Higuchi *et al.*, 2005).

## 2.6 Pengukuran Kadar MAP2

Pengukuran kadar MAP2 pada kultur sel sel SH-SY5Y yakni dengan memakai antibodi monoklonal spesifik untuk MAP2 dan alat CLSM (*Confocal Lasser Scanning Microscope*). Prinsip kerja dari antibodi monoklonal adalah ekstrak sel yang mengandung MAP2 berikatan dengan antibodi konjugasi biotin, enzim konjugasi avidin dan reaksi enzim ditambahkan asam sulfur yang akan akan mengubah warna, maka antibodi akan bereaksi terhadap MAP2 dan lebih sensitif untuk dibaca di spektrofotometri (Company, 2010). Kemudian pengukuran jumlah kadar MAP2 dengan menggunakan CLSM. Alat ini dapat digunakan untuk pemeriksaan objek biologis atau ilmu medis pada potongan yang tipis pada spesimen hidup dan tetap dengan ukuran ketebalan maksimal 100 micrometer. Prinsip penggunaan CLSM pada penelitian ini adalah dengan ditambahkan antibodi yang spesifik untuk MAP2 sehingga aktivasi dari MAP2 dapat dilihat dan dihitung jumlahnya melalui warna dari *fluorescent* yang spesifik untuk MAP2 (Van Tittelboom *et al.*, 2016).

## 2.7 Amlodipin

Amlodipin merupakan obat antagonis kalsium golongan dihidropiridin dengan menghambat masuknya ion kalsium secara selektif. Obat ini biasanya

dipakai sebagai obat antihipertensi dan antiangina. Amlodipin mempunyai efek pada otot polos vaskular dan otot jantung. Efeknya adalah vasodilator arteri perifer yang dapat menyebabkan turunnya resistensi vaskular dan penurunan hipertensi. (Alegantina, S., & Isnawati, A., 2015). Mekanisme kerja amlodipin pada sel saraf adalah dengan berikatan dengan reseptor L-Type Calcium Channel (LTCC) sehingga dapat mengurangi influx  $Ca^{2+}$  intraseluler (Zhang et al., 2002). Dengan berkurangnya proses uptake  $Ca^{2+}$  intraseluler, maka akan mencegah terjadinya proses pembentukan radikal bebas melalui pengurangan produksi gugus radikal hidroksil yang dibentuk dari  $H_2O_2$  di dalam sel (Lee, H.-H. Park, *et al.*, 2011).

Pencegahan apoptosis sel neuron kortikal yang dipapar oleh kadar oksidatif stres yang tinggi, pemberian *Amlodipin Camsylate* (AC) dan *Amlodipin Besylate* (BC) terbukti memiliki sifat neuroprotektif. Vitamin E bertindak sebagai antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas sehingga mampu mencegah proses apoptosis dan nekrosis dari sel SHSRP. Sedangkan amlodipin dengan dosis farmakologi antara (10 – 100 nM) mampu untuk mencegah influks ion  $Ca^{2+}$  sehingga penggunaan amlodipin + vitamin E dapat bersifat sebagai neuroprotektif yang poten (Yamagata, Ichinose and Tagami, 2004).

## 2.8 Neuron SH-SY5Y

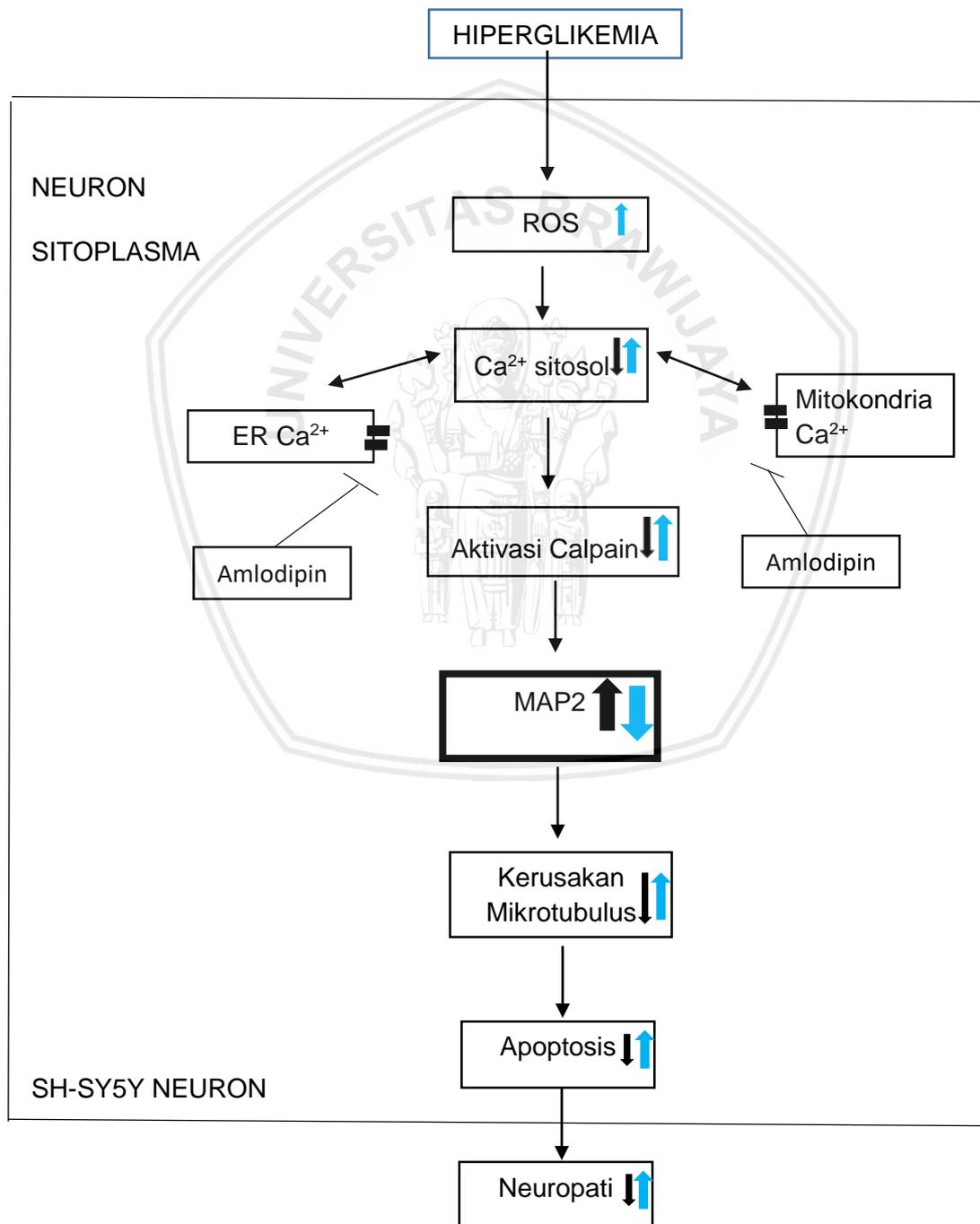
Banyak area pada bidang *neuroscience* terhambat dengan terbatasnya pilihan model *in vitro* yang menyerupai sel neuron dewasa yang mengekspresikan protein manusia (Agholme *et al.*, 2010). Penggunaan sel neuron primer mamalia yang berasal dari jaringan embrionik sistem saraf pusat terbatas karena fakta bahwa, sekali sel ini terdiferensiasi maka tidak lagi dapat diperbanyak. Untuk mengatasi keterbatasan ini maka dapat digunakan garis sel yang diubah menjadi

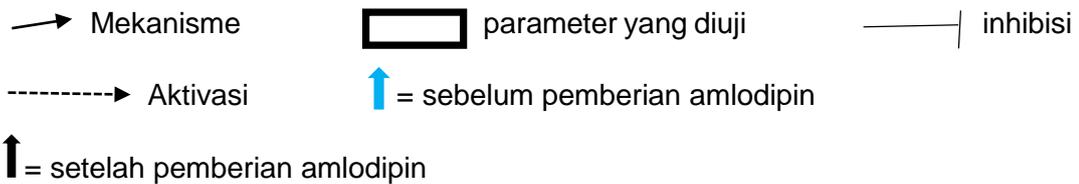
seperti sel neuron. SH-SY5Y Merupakan salah satu yang paling populer (Kovalevich and Langford, 2013). SH-SY5Y merupakan subklone dari garis sel neuroblastoma parental SK-N-SH yang pertama kali dihasilkan dari biopsi sumsum tulang yang mengandung sel yang menyerupai neuroblast dan sel yang menyerupai epitel. SK-N-SH disubklone sebanyak tiga kali, pertama menjadi SH-SY, lalu menjadi SH-SY5, dan yang terakhir menjadi SH-SY5Y. Sel SH-SY5Y mempunyai kariotipe yang stabil terdiri dari 46 kromosom dan dapat didiferensiasi dari sel yang menyerupai neuroblast sampai sel neuron dewasa melalui berbagai macam mekanisme termasuk penggunaan asam retinoat, *phorbol esters*, dan spesifik neurotropin seperti *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*. Bukti terbaru menyatakan bahwa penggunaan metode yang berbeda dapat menjadikan sel SH-SY5Y dapat terdiferensiasi menjadi subtipe neuron yang spesifik seperti neuron adrenergik, kolinergik, ataupun dopaminergik (Shiple, Mangold and Szpara, 2017). Diferensiasi sel SH-SY5Y dapat dilihat dari karakteristik marker neuron yang dihasilkan (Kovalevich and Langford, 2013). Ketika terdiferensiasi penuh maka sel SH-SY5Y akan mengekspresikan berbagai macam marker neuron yang juga diekspresikan oleh sel neuron dewasa seperti, *Growth-Associated Protein (GAP-43)*, *Neuronal Nuclei (NeuN)*, *Synaptophysin (SYN)*, *Synaptic Vesicle Protein II (SV2)*, *Neuron Specific Enolase (NSE)* and *Microtubule Associated Protein (MAP)*, dan juga akan berkurangnya ekspresi dari marker glial seperti *Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)*. Pembuangan *BDNF* akan menyebabkan sel menjadi apoptosis yang menyatakan bahwa keberlangsungan hidup sel SH-SY5Y yang terdiferensiasi tergantung dari faktor tropik, serupa seperti sel neuron dewasa (Shiple, Mangold and Szpara, 2017).

BAB III

KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep





### 3.2 Deskripsi kerangka konsep :

Pada suatu keadaan hiperglikemia maka akan menyebabkan homeostasis di dalam tubuh mengalami gangguan terutama kadar ion kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) yang tidak seimbang di dalam intaraseluler dalam ekstraseluler mengakibatkan banyak kalsium ekstraseluler yang masuk ke dalam intraseluler. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang tinggi di dalam ekstraseluler dibandingkan di dalam intraseluler mengakibatkan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam keadaan *steady state* sehingga banyak kalsium ekstraseluler yang masuk ke dalam intraseluler. Kondisi hiperglikemia mampu meningkatkan ion  $\text{Ca}^{2+}$  meningkat menyebabkan ROS semakin tinggi. Peningkatan ion kalsium dari sitosol juga dapat terjadi akibat disfungsi dari mitokondria dan tingginya ion kalsium di dalam retikulum endoplasma sel, hal ini akan menyebabkan peningkatan aktivasi calpain. Aktivasi calpain yang berlebihan akan menyebabkan penurunan dari MAP2 dan kerusakan mikrotubulus sehingga dapat menyebabkan apoptosis sel yang meningkat. Pemberian Amlodipin yang bekerja menginhibisi pelepasan ion kalsium yang berasal dari mitokondria dan retikulum endoplasma. Sehingga diharapkan dapat meningkatkan MAP2 dan menghambat proses terjadinya apoptosis dari suatu sel saraf.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian Amlodipin dapat meningkatkan Ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronik.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) di laboratorium secara in vitro pada kultur sel neuron.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Proses kultur dan pengukuran semua parameter terkait dan morfologi neuron dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian ini dilaksanakan tanggal 21 Februari – 21 Maret 2019.

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan tanpa amlodipin, pemberian amlodipin dengan konsentrasi 10 nM dan 100 nM pada sel neuron kultur SH-SY5Y dan pemberian induksi glukosa dengan konsentrasi 50 mM.

Variabel tergantung dari penelitian ini Ekspresi MAP2 di dalam sitosol sel kultur neuron SH-SY5Y.

#### 4.4 Besaran Sampel

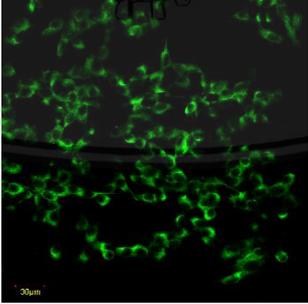
Penentuan besarnya sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus besaran sampel menurut Federer untuk penelitian eksperimental yaitu :

$$(n-1)(p-1) \geq 16$$

Dimana p adalah jumlah perlakuan/*treatment* sedangkan n adalah jumlah sampel. Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan sebanyak 3 seperti yang telah dijelaskan diatas sehingga berdasarkan perhitungan menggunakan rumus tersebut maka akan diperoleh sampel sebanyak pengulangan 9 kali. Dalam penelitian ini terdapat 3 sampel yang bisa dihitung dengan imageJ karena sampel yang lain menunjukkan gambar yang kurang bagus dan selnya beberapa ada yang mati sehingga tidak bisa dihitung dengan imageJ.

#### 4.5 Standar Operasional Prosedur

CCB (Amlodipin)	Amlodipin yang digunakan dalam penelitian ini di dapatkan dari distributor Santa Cruz Biotechnology dengan no katalog CAS 88150-42-9. Amlodipin ini dalam bentuk bubuk yang dilarutkan dalam 75.3 mg/ml ddH <sub>2</sub> O untuk membuat larutan stok. Pada percobaan kali ini diberikan amlodipin yang terlarut dalam air aquades dengan dosis 10 nM dan 100 nM dengan durasi 30 menit.
<i>Neuron-Derived cell line</i> SH-SY5Y	Human neuroblastoma SH-SY5Y cells di biakan pada Roswell Park Memorial Institute medium dengan 15% FBS (Foetal Bovine Serum) dan 2 mM L-glutamine dan disimpan pada suhu 37 °C/5% CO <sub>2</sub> ; 0,25% trypsin/EDTA digunakan untuk inkubasi ( <i>passage</i> ) sel-sel setiap 3 – 5 hari dengan dilusi 1:5 atau ketika mencapai konfluensi 90%. RNA di

	<p>ekstraksi pada inkubasi (<i>passage</i>) ke 29 (Profile, 2016). Sel Human Neuroblastoma cell line SH-SY5Y di dapatkan dari distributor CLS Cell Lines Service dengan no katalog 300154.</p>
Hiperglikemi	<p>Induksi dilakukan dengan pemberian D-Glucose yang dilarutkan dengan DMSO pada media kultur dengan dosis 50 mM yang bertujuan untuk memberikan efek hiperglikemi pada sel neuron. Paparan kronik selama 6 hari (Green <i>et al.</i>, 2012).</p>
MAP2	<p>Penanda spesifik untuk sitoskeleton dan penanda fenotip neuron. Pengecatan MAP2 dilihat dengan immunostaining, <i>cell imaging</i> dengan CLSM. Penanda warna menunjukkan reaksi ikatan antibodi MAP2. Ekspresi MAP2 mempunyai satuan <i>byte</i>.</p> <p>MAP2</p> 

#### 4.6 Prosedur Penelitian

##### Kultur Neuron SH-SY5Y

##### A.Peralatan dan Bahan Kultur Sel

1. Alat dan bahan formula kultur lengkap terdiri dari mikropipet 1 ml, botol duran 100 ml, penisilin-streptomisin 1% (1 ml), fetal bovine serum qualified 10% (10 ml), glutamin (2 mM), glukosa (21 mM), bikarbonat (38 mM), dan media MEM.
2. Alat dan bahan panen sel terdiri dari pipet pasteur, mikropipet 1 ml, conical tube dan stiker label/pulpen marker, PBS, tripsin-EDTA 1x (Trypsin 0,25%), dan media kultur.
3. Alat dan bahan subkultur terdiri dari pipet pasteur, mikropipet 1 ml, conical tube, culture dish, stiker label/pulpen marker, dan media kultur.
4. Alat dan bahan penghitungan sel terdiri dari mikropipet, hemacytometer, counter, mikroskop (inverted/cahaya), dan suspensi sel hasil panen.
5. Alat dan bahan induksi Hiperglikemia terdiri dari mikropipet, DMSO, media kultur, dan glukosa.
6. Alat dan bahan perlakuan dengan  $Ca^{2+}$  channel blocker terdiri dari mikropipet, ddH<sub>2</sub>O, media kultur, dan  $Ca^{2+}$  channel blocker.

## B. Prosedur Kerja

### **Cell Thawing dan penumbuhan sel**

1. Disiapkan media kultur berupa penisilin-streptomisin 1% (1 ml), Fetal bovine serum qualified 10% (10 ml), glutamin (2mM), glukosa (21 mM), bikarbonat (38mM), dan media MEM. Media yang telah dicampur difilter dengan membran ukuran 0,2  $\mu$ m.
2. Sel dikeluarkan dari nitrogen cair atau freezer -80°C dan diletakkan pada suhu kamar sehingga mencair.
3. Suspensi sel diambil dengan mikropipet dan sel dimasukkan setetes demi setetes ke dalam media kultur yang telah disiapkan.

4. *Conical tube* ditutup dengan rapat dan disentrifugasi pada kecepatan 900 rpm selama 10 menit dengan suhu 24-25°C.
5. *Conical tube* dibawa ke LAF (*Laminar Air Flow*) kemudian disterilkan dengan alkohol 70%.
6. *Conical tube* dibuka dan supernatan (media kultur) dituang ke dalam pembuangan.
7. Ditambahkan 4 ml media kultur baru dan dilakukan sentrifugasi kedua dengan kecepatan 900 rpm selama 10 menit.
8. Sel ditransfer ke dalam flask kultur masing-masing 2 ml.
9. Ditambahkan media kultur 5 ml pada masing-masing flask kultur.
10. Kondisi sel diamati dengan mikroskop kemudian sel dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub>.
11. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan viabilitasnya, jika sudah tumbuh baik maka dapat dilakukan sub kultur. Sub kultur dilakukan jika sel sudah *confluent*. Jika belum maka media diganti dan dilakukan inkubasi kembali.

#### **Panen Sel**

1. Sel diambil dari inkubator CO<sub>2</sub> amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% *confluent*.
2. Media dibuang dengan menggunakan pipet pasteur steril.
3. Sel dicuci 2 kali dengan PBS.
4. Ditambahkan tripsin-EDTA secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
5. Ditambahkan media kultur untuk menginaktifkan tripsin. Resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol).

6. Keadaan ini diamati di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
7. Sel yang telah lepas satu-satu ditransfer ke dalam *conical* steril baru.

### Subkultur

1. Media di dalam flask dibuang dan sel dicuci dengan PBS 15 ml sebanyak 2 kali
2. Ditambahkan tripsin/EDTA 2 ml dan sel diinkubasi dalam inkubator selama 5 menit hingga sel terlepas.
3. Sel yang sudah terlepas diambil  $\pm 300\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam *conical* yang lain. Ditambahkan 7 ml media kultur dan resuspensi kembali, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit.
4. Pellet diresuspensi dengan media kultur, kemudian dimasukkan ke dalam flask. Sel diamati di bawah mikroskop lalu dimasukkan inkubator.
5. Selanjutnya pembiakan sel dilakukan dengan mengganti media kultur secara berkala sehingga diperoleh kerapatan sel yang diinginkan.

### Penghitungan Sel

1. Sel diambil dari inkubator CO<sub>2</sub>. Panen sel yang dilakukan setelah sel 80% konfluen.
2. Media dibuang dengan menggunakan pipet pasteur steril.
3. Sel dicuci 2 kali dengan PBS
4. Ditambahkan tripsin-EDTA secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3-5 menit
5. Ditambahkan media  $\pm 2-3$  ml untuk menginaktifkan tripsin. Resuspensi sel dengan *pipetting* sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol)

6. Keadaan sel diamati di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
7. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, supernatant dibuang dan endapan sel diresuspensi dengan menggunakan 1 mL media kultur.
8. Diambil 1  $\mu$ l panen sel, ditambahkan dengan 9  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O dan dipipetkan ke *hemacytometer*
9. Sel dihitung di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya biasa) dengan *counter*
10. Sejumlah sel yang diperlukan ditransfer ke ke dalam *conical* yang lain dan ditambahkan sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki

### **Induksi Hiperglikemia**

1. Sel Neuron ditumbuhkan pada kultur dish yang terdiri dari 4 *well* dan terdapat *cover glass* steril pada bagian dasarnya, masing-masing berisi  $1 \times 10^4$  sel neuron.
2. Jika kondisi sel sudah 90% *confluent*, maka dilakukan penambahan methylglyoxal untuk induksi hiperglikemia
3. Glukosa dilarutkan dengan DMSO untuk membuat larutan *stock*. Kemudian glukosa ditambahkan pada media yang akan digunakan sehingga kandungan glukosa pada media adalah 50 mM
4. Media yang ada pada masing-masing *well* diaspirasi kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 2x, setelah itu ditambahkan dengan media baru yang sudah mengandung glukosa.
5. Sel kemudian diinkubasi selama 6x24 jam pada inkubator. Setelah 6x24 jam dilakukan pengamatan morfologi sel.

### **Perlakuan dengan Amlodipin 10 nM dan 100 nM**

1. Beberapa kelompok sel neuron yang ditumbuhkan pada *culture dish* yang terdiri dari 4 *well* dan terdapat *cover glass* pada bagian dasarnya, baik yang sudah diinduksi dengan glukosa untuk kondisi hiperglikemik maupun sel kontrol, diberi perlakuan dengan amlodipin dosis 10 dan 100 nM.
2. Amlodipin dilarutkan dengan ddH<sub>2</sub>O untuk membuat larutan *stock*, kemudian ditambahkan pada medium kultur hingga di dapatkan konsentrasi akhir pada medium kultur yaitu 20  $\mu$ M
3. Media yang terdapat pada *well* kemudian diaspirasi, dilakukan *washing* dengan PBS sebanyak 2x, setelah itu ditambahkan media yang sudah diberi dengan amlodipin dosis 10 nM dan 100 nM
4. Sel kemudian diinkubasi selama 30 menit pada inkubator, setelah 30 menit dilakukan pengamatan morfologi sel.

### **Pengukuran MAP2 dengan *immunofluorescence***

#### **A. Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam pengukuran kalsium intraseluler antara lain pinset, mikropipet, *slide glass*, PBS, Tween 20, BSA, Triton-X, antibodi untuk penanda protein terkait (antibodi MAP2), antibodi sekunder dan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).

#### **B. Prosedur kerja**

1. Total 8 kelompok perlakuan sel neuron yang sudah ditumbuhkan, diaspirasi, medianya dan kemudian dibilas dengan menggunakan PBS sebanyak 2x.

2. Sel kemudian diinkubasi dalam etanol absolut dingin pada suhu ruang selama 5 menit dan setelah itu diinkubasi kembali dengan 4 % paraformaldehid dalam PBS pH 7,4 selama 10 menit suhu ruang.
3. Sel dicuci dengan PBS dingin sebanyak 3 x
4. Sampel diinkubasi selama 10 menit dengan PBS yang mengandung 0,1-0,25% Triton X-100. Kemudian sel dicuci dengan PBS 3x masing-masing selama 5 menit.
5. Sel diinkubasi dengan 1% BSA, 22,52 mg/mL glisin dalam PBST (PBS+0,1% Tween 20) selama 3 menit untuk memblokir ikatan yang tidak spesifik dengan antibody.
6. Sel diinkubasi dengan antibody penanda protein terkait (antibodi untuk MAP2) yang sebelumnya dilarutkan pada PBST yang didalamnya juga terkandung BSA 1%. Inkubasi dilakukan selama 1 jam pada suhu ruang.
7. Setelah masa inkubasi selesai, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3x masing-masing 5 menit.
8. Selanjutnya sel diinkubasi dengan antibody monoklonal dalam 1% BSA selama 1 jam suhu ruang dan di tempat yang gelap.
9. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3x masing-masing 5 menit dan dilakukan di tempat yang gelap.
10. Setelah itu sel siap untuk diamati dengan *Confocal laser scanning microscopy* (CLSM) dengan pengukuran 400 x.

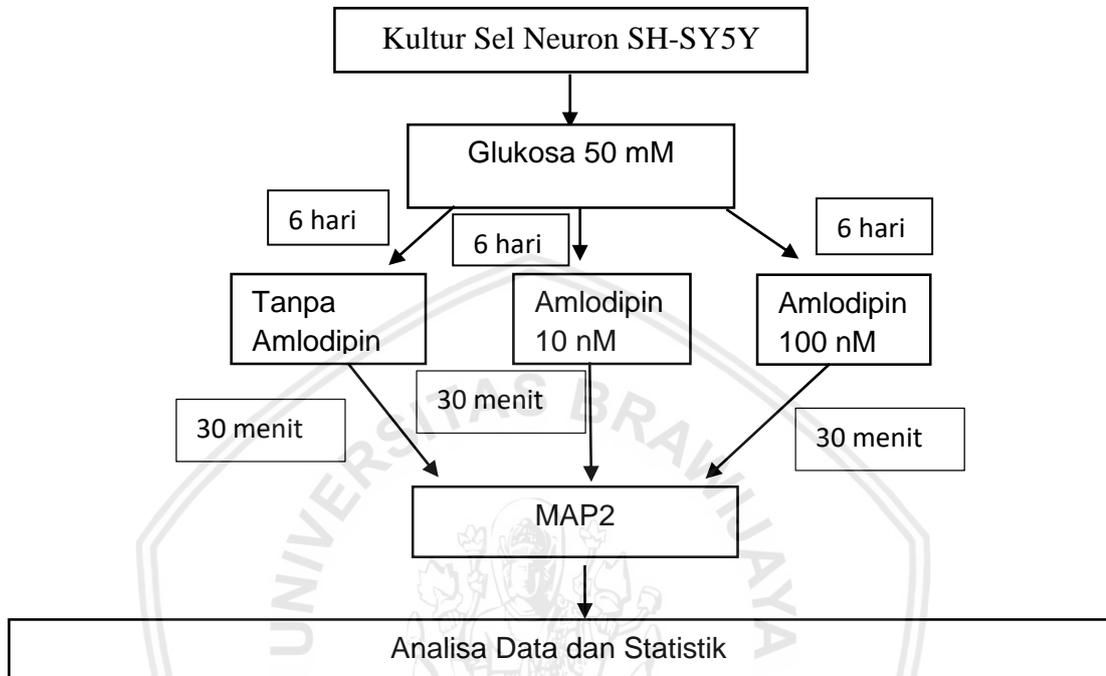
#### 4.7 Cara Pengukuran Ekspresi MAP2

Ekspresi MAP2 dinilai dengan membandingkan intensitas warna pada mikroskop lapang gelap. Intensitas warna dihitung menggunakan aplikasi imageJ 25.0 untuk windows 64 bit dan dinyatakan dalam satuan *byte* (0-255). Langkah perhitungan intensitas warna adalah sebagai berikut :

1. Buka aplikasi imageJ
2. Klik File/open/buka foto yang akan dinilai intensitasnya
3. Klik Image/type/8 bit
4. Klik image/*threshold*/atur batas bawah dan atas 10 dan 255
5. Klik wand pada toolbar dan tandai daerah tujuan (ROI, *region of interest*), lalu tekan tombol T pada keyboard
6. Buka kembali foto yang sama kemudian klik hasil pada langkah sebelumnya pada ROI *manager*
7. Kemudian tekan tombol M untuk menilai intensitas warna
8. Intensitas warna akan muncul sebagai rata-rata warna seluruh pixel pada ROI

#### 4.8 Alur Kerangka Kerja Penelitian

##### Kerangka Kerja Penelitian



Glukosa 50 mM dipapar selama 6 hari.

#### 4.9 Analisa Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data uji normalitas data, homogenitas, uji komparasi Anova, dan juga uji korelasi Spearman.

## BAB V

### ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian pengaruh pemberian amlodipin terhadap ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5Y dengan model hiperglikemia kronis. Pada minggu ke 1 hingga minggu ke 3 penelitian dilakukan proses *thawing* dari sel kultur neuron SH-SY5Y hingga sel konfluen. Setelah sel konfluen dilakukan *plating* pada *well* 24 dengan dimasukkan terlebih dahulu *cover slips* sebanyak 24 buah ke dalam *well*. Kemudian dilakukan pengamatan hingga 3 hari sampai jumlah sel dirasa cukup untuk dilakukan intervensi dengan glukosa. Diberikan induksi glukosa terhadap sel SH-SY5Y dengan konsentrasi 50 mM selama 6 hari. Kemudian dilakukan intervensi amlodipin dengan dosis 10 nM dan 100 nM ditunggu hingga 30 menit. Setelah itu, diberikan label MAP2 assay pada sel kultur neuron SH-SY5Y dan dilakukan pengecekan kadar MAP2 dengan menggunakan alat CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*).

#### 5.2 Analisis Data

##### 5.2.1 Statistik Deskriptif

Tabel 5.1 Hasil uji Shapiro-Wilk

amlodipin		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
MAP2	amlodipin 0	0,813	3	0,145
	amlodipin 10	0,992	3	0,833
	amlodipin 100	0,786	3	0,082

### 5.2.2 Uji Normalitas Data

Hasil penelitian dilakukan uji normalitas dahulu untuk menentukan metode analisis data yang berikutnya digunakan. Uji normalitas yang digunakan yaitu *Saphiro wilk test* dikarenakan sampel kurang dari 50. Berikut adalah hasil dari uji normalitas *Saphiro-wilk*.

**Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas data ekspresi MAP2**

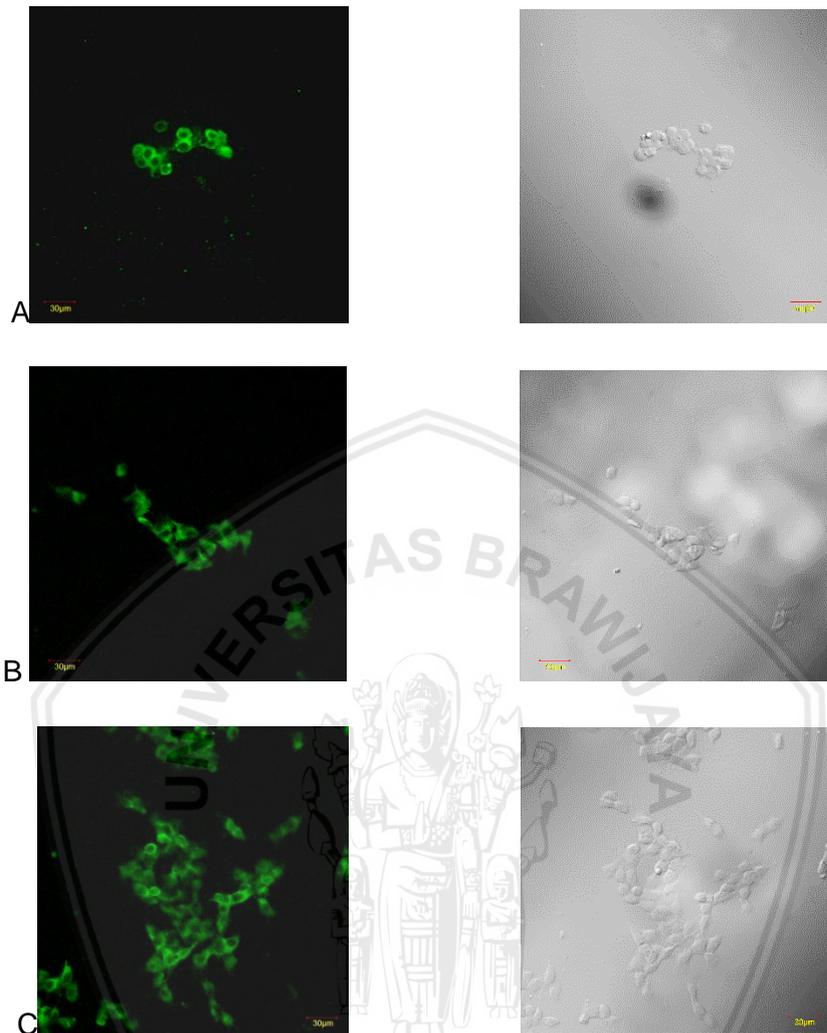
Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
<b>Glukosa 50 mM</b>	0.145	Normal
<b>Glukosa 50 mM + CCB 10 nM</b>	0.833	Normal
<b>Glukosa 50 mM + CCB 100 nM</b>	0.082	Normal

Keterangan: Jika p-value < 0.05 berarti data tidak terdistribusi normal dan jika p-value > 0.05 berarti data berdistribusi normal

Pada Tabel 5.2.1 menunjukkan bahwa data MAP2 untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai p-value yang semuanya lebih besar dari 0.05. Jadi semua data telah terbukti terdistribusi normal sehingga terpenuhi uji prasyarat parametrik.

### 5.2.3 Hasil analisis pengaruh amlodipin (10 nM dan 100 nM) terhadap Ekspresi MAP2 pada hiperglikemia 50 mM

Pada percobaan yang pertama diperoleh data hasil pengamatan antar kelompok perlakuan hiperglikemia 50 mM. Secara morfologi hasil pengamatan tersebut ditunjukkan pada gambar 5.2.4.



**Gambar 5.1 Ekspresi MAP2 pada kultur neuron dengan perlakuan hiperglikemia (50 mM).**

**Keterangan:** Pada gambar A tanpa pemberian amlodipin, gambar B diberi perlakuan amlodipin 10 nM dan C diberikan amlodipine 100 nM. (kultur hari ke 6, MAP2 pembesaran 400x).

Secara non statistik didapatkan gambar A, B, C didapatkan semakin menurunkan ekspresi MAP2 artinya semakin tinggi dosis amlodipin akan menurunkan ekspresi MAP2 pada kultur neuron hiperglikemia 50 mM hari keenam. Untuk membuktikan pengaruh perlakuan pemberian amlodipin dosis 10 nM dan 100 nM terhadap ekspresi MAP2 pada kultur neuron hiperglikemia 50 mM hari keenam. Dilakukan analisis komparasi antara kelompok tanpa pemberian

amlodipin dengan kelompok pemberian amlodipin dosis 10 nM dan 100 nM menggunakan uji anova yang ditunjukkan pada tabel 5.2.

**Tabel 5.3 Hasil Uji Anova MAP2**

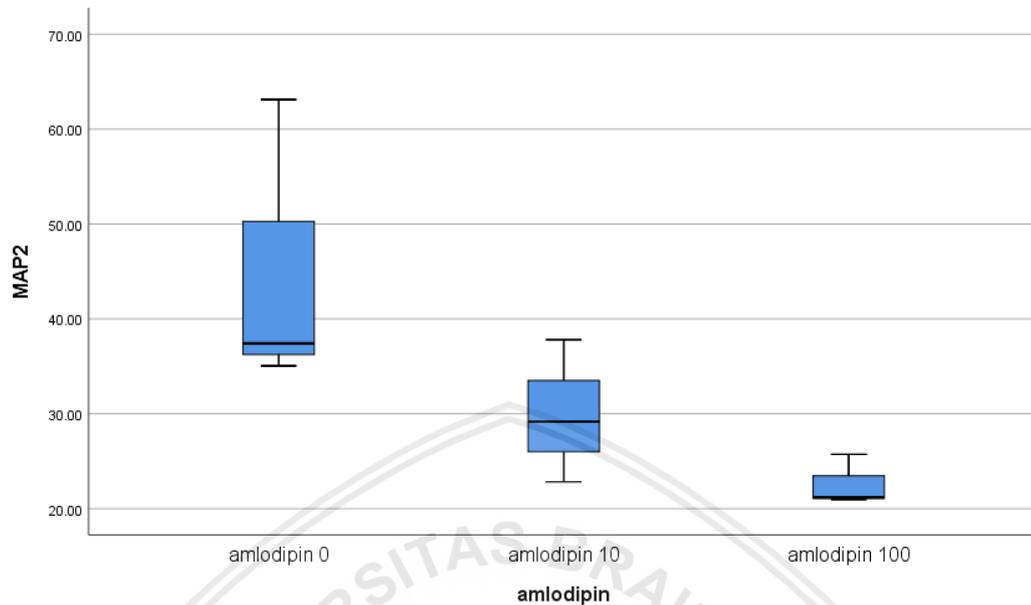
Variable	p-value
Glukosa 50 mM	0.082

**Keterangan:** Jika  $p\text{-value} < 0.05$  berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika  $p\text{-value} > 0.05$  berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Hasil pada tabel 5.2 menunjukkan hasil uji anova diperoleh bahwa tidak ada perbedaan bermakna diantara ke tiga kelompok. Hal ini berarti bahwa bila pada kultur neuron hiperglikemia 50 mM hari keenam diberikan amlodipin dosis 10 nM, 100 nM, dan tanpa pemberian amlodipin tidak menunjukkan perbedaan statistik MAP2 yang bermakna.

MAP2								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
amlodipin 0	3	45,1933	15,56913	8,98884	6,5175	83,8692	35,05	63,12
amlodipin 10	3	29,9320	7,52270	4,34323	11,2446	48,6194	22,82	37,81
amlodipin 100	3	22,6237	2,68745	1,55160	15,9477	29,2997	20,96	25,72
Total	9	32,5830	13,26712	4,42237	22,3850	42,7810	20,96	63,12

**Gambar 5.2 Tabel rerata ekspresi MAP2 (byte) pada kultur neuron SH-SY5Y dengan intervensi amlodipin 10 nM, 100 nM dan tanpa amlodipin**



**Gambar 5.2 Ringkasan histogram rerata ekspresi MAP2 (*byte*) pada kultur neuron SH-SY5Y dengan intervensi amlodipin 10 nM, 100 nM dan tanpa amlodipin**

Pada gambar 5.2 ditunjukkan histogram rerata ekspresi MAP2 pada semua kelompok. Ditunjukkan rerata ekspresi MAP2 yang semakin menurun.

#### **5.2.4 Hasil Analisis Efek Dosis Amlodipin (10 nM dan 100 nM) Terhadap Ekspresi MAP2 Pada Hiperglikemia 50 mM**

**Tabel 5.4 Hasil Uji Korelasi Spearman ekspresi MAP2**

Variable	p-value	Koefisien Korelasi
Glukosa 50 mM	0.011	-0.791

Pada tabel 5.3 ditunjukkan hasil korelasi yang signifikan ( $p=0,011$ ) dan negatif kuat ( $r=-0,791$ ). Artinya, semakin tinggi dosis amlodipin maka akan semakin menurunkan nilai MAP2.

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Ekspresi MAP2 pada Kondisi Hiperglikemia (induksi 50 mM glukosa)

Pada kultur neuron SH-SY5Y model hiperglikemia (induksi glukosa 50 mM) yang diberikan amlodipin 10 nM, 100 nM dan tanpa diberikan amlodipin menunjukkan penurunan ekspresi MAP2 namun tidak signifikan secara statistik artinya, pemberian amlodipin 10 nM dan 100 nM tidak dapat menunjukkan peningkatan ekspresi MAP2. Hasil penelitian ini tidak sesuai dengan hipotesis dan dasar teori. Hal ini kemungkinan pada penelitian ini induksi hiperglikemi kronis selama 6 hari pada kultur neuron SH-SY5Y akan meningkatkan ion  $Ca^{2+}$  di dalam sel. Hal ini akan menyebabkan proses aktivasi dari *calcium dependent cellular*, salah satu jenisnya adalah protein fosfolipase C dan pelepasan asam arakidonat yang akan menyebabkan terjadinya proses peroksidase dari lipid pada membran sel sehingga dapat menyebabkan morfologi sel yang berubah (Newcomb-Fernandez, J. K., *et al.*, 2001). Pemberian induksi glukosa 50 mM selama 6 hari pada kultur neuron akan menyebabkan influks kalsium yang meningkat dan stres oksidatif (Wang *et al.*, 2018). Ketika sel neuron dipapar hiperglikemia selama 6 hari akan terjadi pertahanan sel terhadap radikal bebas. Berbagai aktivasi transmisi sinaps yang mengatur MAP2 yaitu *metabotropic glutamate receptors* (mGluRs), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases* (CaM K) dan *protein kinase C* (PKC) menyebabkan tingginya fosforilasi dari MAP2 sehingga menyebabkan tingginya MAP2. Pada

penelitian ini tingginya ekspresi MAP2 diakibatkan oleh proses aktivasinya di dalam melawan oksidatif stress yang meningkat akibat induksi glukosa 50 mM melalui *metabotropic glutamate receptors* (mGluRs), *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases* (CaMKs) dan protein kinase C (PKC) (Dudek and Fields, 2001)

Pemberian amlodipin sebagai *Calcium Channel Blocker* diharapkan mampu meningkatkan ekspresi MAP2 yang bekerja pada reseptor LTCC (*L-Typed Calcium Channel*) sehingga mengurangi influks ion  $Ca^{2+}$  intraseluler (Zhang *et al.*, 2002). Pada penelitian ini menunjukkan penurunan ekspresi MAP2 setelah pemberian amlodipin namun tidak signifikan. Hal ini kemungkinan disebabkan kerusakan membran mitokondria yang mengakibatkan meningkatnya ion  $Ca^{2+}$  intraseluler akibat pemberian amlodipin dengan dosis 10 dan 100 nM. Tingginya ion  $Ca^{2+}$  intraseluler menyebabkan disfungsi dari MAP2 melalui jalur calpain sehingga terjadi penurunan fungsi MAP2. Pada penelitian Leeds pada penelitian di kultur *neuron cerebellar granule cells* (CGCs) meneliti dosis amlodipin 0,1-1000 nM menunjukkan pemberian amlodipin dosis 10nM merupakan dosis maksimal untuk memulihkan viabilitas dari sel neuron di papir radikal bebas karena semakin tinggi pemberian dosis amlodipin akan mengakibatkan penurunan proteksi neuron. Sedangkan dosis neuroprotektif yang poten dan untuk menjaga apoptosis dari sel neuron yang terbaik berada pada dosis 5 nM (Leeds *et al.*, 2003). Sehingga pemberian amlodipin dengan dosis 10 dan 100 nM dapat menurunkan ekspresi MAP2.

## 6.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekspresi MAP2

Pemberian amlodipin pada dosis 10 nM dan 100 nM yang yang diinduksi glukosa 50 mM pada kultur neuron SH-SY5Y menunjukkan penurunan ekspresi

MAP2 namun tidak signifikan secara statistik. Hal ini ditunjukkan melalui hasil dari pengamatan menggunakan pemeriksaan dengan metode *immunofluorescence* yang menunjukkan semakin sedikitnya ekspresi MAP2 yang terlihat. Mekanisme terjadinya penurunan dari MAP2 pada sel SH-SY5Y adalah pemberian amlodipin yang bekerja sebagai *Calcium Channel Blocker* pada reseptor LTCC (*L-Type Calcium Channel*) pada sel neuron mampu menurunkan ion  $Ca^{2+}$  intraseluler. perlakuan setelah diberikan amlodipin 10 nM dan 100 nM di dapatkan hasil ekspresi MAP2 yang lebih rendah dibandingkan dengan tanpa diberikan amlodipin. Hal ini dikarenakan pemberian amlodipin pada 10 dan 100 nM semakin menurunkan ekspresi MAP2 dan akan mengaktivasi jalur lain. Hal ini sesuai dengan penelitian menurut Ahluwalia yakni penurunan ion  $Ca^{2+}$  intraseluler akan mengurangi aktivasi *calmodulin-dependent protein kinase* (CaM K) menyebabkan MAP2 yang terfosforilasi semakin turun diakibatkan antibodi yang menempel di MAP2 lebih sedikit. Penurunan fosforilasi MAP2 akan menurunkan MAP2 dilihat dari *immunofluorescence* (Ahluwalia, 2000).

Ada aktivasi lain yang mengakibatkan penurunan MAP2, menurut Hoskison tahun 2007 bahwa aktivasi reseptor *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA) akan menghambat potensial post sinaps dan meningkatkan aktivasi calpain menyebabkan penurunan MAP2. Selain Aktivasi reseptor NMDA, ada juga aktivasi *calmodulin-dependent protein phosphatase 2B* (calcineurin) yang menurunkan fosforilasi MAP2 yang menyebabkan MAP2 menurun (Hoskison *et al.*, 2007). Pemberian amlodipin pada dosis 10 nM pada induksi glukosa 50 nM lebih meningkatkan ekspresi MAP2 daripada 100 nM. Hal ini diperkirakan karena pemberian amlodipin memiliki efek terhadap MAP2 melalui besarnya pemberian dosis. Pada penelitian menurut Leeds pemberian amlodipin dengan dosis 10 nM

dan 100 nM pada kultur sel granuler cerebellum didapatkan viabilitas sel lebih baik pada pemberian amlodipin dengan dosis 10 nM. Hal ini dikarenakan pemberian amlodipin dengan dosis 100 nM akan meningkatkan depolarisasi dari sel melalui glutamat sehingga akan mengaktivasi reseptor NMDA (*N-Metil-D-Aspartat*) yang bersifat eksotoksitas bagi sel melalui perannya dalam menurunkan fosforilasi dari MAP2 dan aktivasi enzim *nitric oxide synthase* sehingga terjadi penurunan ekspresi MAP2 dan peningkatan proses apoptosis dari sel (Leeds *et al.*, 2003).

### 6.3 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini sampel yang didapatkan kurang dari besaran sampel yang dihitung menggunakan rumus besaran sampel Federer. Pada penghitungan besaran sampel didapatkan besar sampel yang diperlukan pada penelitian ini berjumlah 9. Pada peneliian ini menggunakan 3 sampel pada setiap kelompok yang diukur hal ini akan mempengaruhi nilai signifikansi dari uji statistik yang dilakukan. Besaran sampel yang adekuat merupakan hal yang penting untuk dapat mencapai hasil kekuatan statistik yang tinggi. Kekuatan statistik yang rendah seringkali sejalan dengan besaran sampel yang tidak adekuat (Liu, 2013).

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh pemberian amlodipin 10 nM dan 100 nM terhadap ekspresi MAP2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemi kronis, dapat disimpulkan :

1. Pemberian amlodipin dosis 10 nM dan 100 nM pada kultur neuron SH-SY5Y yang diinduksi hiperglikemi kronis (glukosa 50 mM) tidak dapat menunjukkan kenaikan ekspresi MAP2.
2. Perbedaan dosis amlodipin tidak dapat menunjukkan perbedaan kenaikan ekspresi MAP2.
3. Pemberian amlodipin tidak dapat menunjukkan kenaikan ekspresi MAP2 kemungkinan adanya faktor-lain seperti aktivasi jalur lain yakni melalui adanya NMDA dan calcineurin di neuron setelah pemberian amlodipin.

#### 7.2 Saran

1. Perlunya jumlah sampel untuk penelitian yang lebih adekuat
2. Perlunya dilakukan pengkajian dan penelitian ulang dosis amlodipin pada sel kultur neuron SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemi kronis terhadap ekspresi MAP2 dan perlunya pengkajian kembali untuk mengetahui efek samping pemberian amlodipin terhadap sel neuron.
3. Perlu melihat faktor yang mempengaruhi MAP2, seperti ion  $Ca^{2+}$  dan calpain.

4. Perlu melihat faktor-faktor lain yang dapat menurunkan ekspresi MAP2, seperti adanya aktivasi jalur lain dari yaitu NMDA dan calcineurin di neuron setelah pemberian amlodipin



### Daftar Pustaka

- Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J., & Hallbeck, M. (2010). An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(4), 1069-1082.
- Ahluwalia, B. (2000). Low Levels Of Ethanol Stimulate And High Levels Decrease Phosphorylation In Microtubule-Associated Proteins In Rat Brain: An In Vitro Study. *Alcohol and Alcoholism*, 35(5), pp.452-457.
- Alegantina, S., & Isnawati, A. (2015). Profil Disolusi Tablet Amlodipin dan Perbandingan Kadar Dua Produk Generik dengan Produk Inovator. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 5(1), 11-18.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- Company, K. B. (2010). 'Human Microtubule Associated', 2, pp. 1–6.

Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004). 'Protein family review The MAP2 / Tau family of microtubule-associated proteins', pp. 1–10.

Desnita, R. (2018). Hubungan Derajat Neuropati Dengan Keseimbangan Fungsional Pada Pasien Neuropati Diabetik. *Jurnal Keperawatan Muhammadiyah*, 2(2).

Dudek, S. M., & Fields, R. D. (2001). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in somatodendritic compartments: roles of action potentials, frequency, and mode of calcium entry. *Journal of Neuroscience*, 21(2), RC122-RC122.

Fernyhough, P., & Calcutt, N. A. (2010). Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell calcium*, 47(2), 130-139.

Green, C. J. et al. (2012) 'Glucagon Like Peptide-1-Induced Glucose Metabolism in Differentiated Human Muscle Satellite Cells Is Attenuated by Hyperglycemia', *PLoS ONE*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pone.0044284.

Hardiany, N. (2013). Cathepsin dan Calpain: Enzim Pemecah Protein dalam Sel. *eJournal Kedokteran Indonesia*, 1(1).

Higuchi, M. *et al.* (2005). 'Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors', *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp. 15229–15237. doi: 10.1074/jbc.M500939200.

Hoskison, M., Yanagawa, Y., Obata, K. and Shuttleworth, C. (2007). Calcium-dependent NMDA-induced dendritic injury and MAP2 loss in acute hippocampal slices. *Neuroscience*, 145(1), pp.66-79.

Irawan, V. (2015). *Proliferasi dan Plastisitas Neuronal*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In *Neuronal cell culture* (pp. 9-21). Humana Press, Totowa, NJ.

Leeds, P. R. *et al.* (2003) 'Inhibition of Excessive Neuronal Apoptosis by the Calcium Antagonist Amlodipine and Antioxidants in Cerebellar Granule Cells', *Journal of Neurochemistry*, 72(4), pp. 1448–1456. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721448.x.

Lee, Y. J. *et al.* (2011). 'ssAmlodipine besylate and amlodipine camsylate prevent cortical neuronal cell death induced by oxidative stre', *Journal of Neurochemistry*, 119(6), pp. 1262–1270. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07529.x.

Muneer Ahamed, M. and Banji, O. (2012). A Review On Diabetic Neuropathy And Nephropathy | *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*. [online] *Ijpsr.com*. Available at: <http://ijpsr.com/bft-article/a-review-on-diabetic-neuropathy-and-nephropathy/?view=fulltext> [Accessed 4 Apr. 2019].

Newcomb-Fernandez, J. K., Zhao, X., Pike, B. R., Wang, K. K., Kampfl, A., Beer, R., & Hayes, R. L. (2001). Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen–glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(11), 1281-1294.

Nugroho, A. E. (2006). Hewan percobaan diabetes mellitus: patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *Biodiversitas*, 7(4), 378-382.

Putri, N. H. K., & Isfandiari, M. A. (2013). Hubungan Empat Pilar Pengendalian DM Tipe 2 dengan Rerata Kadar Gula Darah. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 1(2), 234-243

Sandireddy, R., Yerra, V. G., Areti, A., Komirishetty, P., & Kumar, A. (2014). Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. *International journal of endocrinology*, 2014.

Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4-14.

Shiple, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (108), e53193.

Soelistijo, A. S. *et al.* (2011). *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*

Stalker, T., Skvarka, C. and Scalia, R. (2003). A novel role for calpains in the endothelial dysfunction of hyperglycemia. *The FASEB Journal*, 17(11), pp.1511-1513.

Supriyadi, S., & Susmini, S. (2019). Hubungan Kadar Gula Darah Sewaktu Dengan Gejala Neuropati Perifer Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Penelitian Keperawatan*, 5(1).

Van Tittelboom, K. *et al.* (2016). 'Real-scale testing of the efficiency of self-healing concrete', *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting IV*, 1979(21), pp. 443–450.

Wölfel, M. *et al.* (2009). 'NIH Public Access', *Cytometry*, 73(11), pp. 1043–1049. doi: 10.1002/cyto.a.20594. Use.

Yamagata, K., Ichinose, S. and Tagami, M. (2004). 'Amlodipine and Carvedilol Prevent Cytotoxicity in Cortical Neurons Isolated from Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats', *Hypertension Research*, 27(4), pp. 271–282. doi: 10.1291/hypres.27.271.

Zhang, J. and Dong, X. (2012). Dysfunction of microtubule-associated proteins of MAP2/tau family in Prion disease. *Prion*, 6(4), pp.334-338.

Zhang, X., Loke, K., Mital, S., Chahwala, S. and Hintze, T. (2002). Paradoxical Release of Nitric Oxide by an L-Type Calcium Channel Antagonist, the R+ Enantiomer of Amlodipine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(2), pp.208-214.



## LAMPIRAN

Lampiran 1 : Uji Normalitas

### Analisis Hasil Statistik

#### Asumsi normalitas data

amlodipin		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
MAP2	amlodipin 0	0,358	3		0,813	3	0,145
	amlodipin 10	0,207	3		0,992	3	0,833
	amlodipin 100	0,370	3		0,786	3	0,082

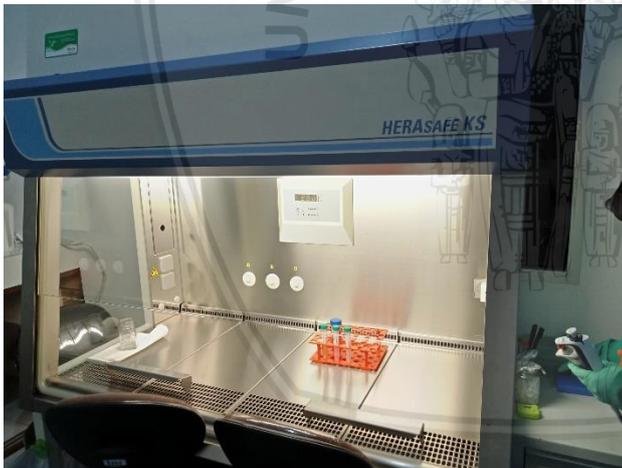
Lampiran 2 : Hasil uji anova

ANOVA					
MAP2					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	795,710	2	397,855	3,898	0,082
Within Groups	612,422	6	102,070		
Total	1408,132	8			

## Lampiran 3 : Analisis Korelasi

<b>Correlations</b>				
<b>SPEARMAN</b>			amlodipin	MAP2
Spearman's rho	amlodipin	Correlation Coefficient	1,000	-.791*
		Sig. (2-tailed)		0,011
		N	9	9
	MAP2	Correlation Coefficient	-.791*	1,000
		Sig. (2-tailed)	0,011	
		N	9	9

## Lampiran 4 : Dokumentasi Penelitian



Inkubator tempat kerja proses kultur sel



Mikroskop untuk pengamatan hasil kultur sel



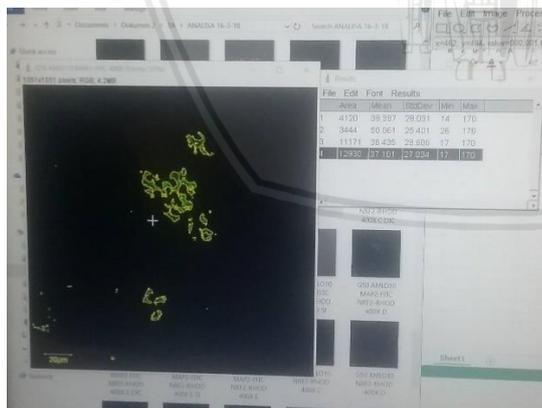
Proses penghitungan glukosa



Proses Pasase sel



Proses perlakuan amlodipin



Perhitungan data ekspresi MAP2