

**PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN DOSIS 5 μ M
TERHADAP EKSPRESI PROTEIN NRF2 PADA KULTUR SEL
NEURON SH-SY5Y YANG DIINDUKSI GLUKOSA 25 mM**

Tugas Akhir

**Untuk memenuhi syarat memperoleh gelar sarjana
kedokteran**



Oleh :

Muhammad Taufik Rizky Ramadhan Nasution

155070107111034

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

Daftar Isi

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Diabetik Neuropati.....	6
2.2 Stress Oksidatif Pada Diabetik Neuropati	10
2.3 Amlodipin	15
2.4 Sel SH-SY5Y.....	16
2.5 Pengukuran Nrf2.....	17
BAB III KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS	19
3.2 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Deskripsi kerangka konsep :.....	21
3.3. Hipotesis Penelitian.....	22
BAB IV METODE PENELITIAN	23

4.1 Desain Penelitian.....	23
4.2 Sampel Penelitian.....	23
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.4 Alur Kerangka Kerja Penelitian	24
4.5 Variabel Penelitian	24
4.6 Definisi operasional.....	25
4.7 Prosedur Penelitian.....	27
4.8 Pengamatan Sel	32
4.9 Interpretasi Ekspresi Protein Nrf2 dengan CLSM.....	33
4.10 Analisa Data.....	33
4.11 Penghitungan Efek Dosis Amlodipin	33
4.12 Etika Penelitian.....	33
BAB V ANALISIS DATA	34
5.1 Hasil Penelitian.....	34
5.2 Analisis Data	35
5.2.1 Statistik Deskriptif.....	35
5.2.2 Uji Normalitas Data	35
5.2.3 Hasil analisis pengaruh amlodipin (5 μ M) terhadap ekspresi Nrf2 pada Hiperglikemia 25 mM.....	36
5.2.4 Hasil analisis korelasi antara pemberian amlodipin (5 μ M) dan tanpa amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2	38
5.2.5 Penghitungan efek dosis dengan rumus d-type effect size	38
BAB VI Pembahasan Hasil Penelitian.....	40
6.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Protein Nrf2.....	40
6.2 Keterbatasan Penelitian	42
BAB VII PENUTUP.....	43
7.1 Kesimpulan.....	43
7.2 Saran.....	43
Daftar Pustaka.....	44

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN DOSIS TINGGI TERHADAP PROTEIN NRF2 PADA KULTUR NEURON SH-SY5Y yang DIINDUKSI GLUKOSA 25 mM

Oleh :

Muhammad Taufik Rizky Ramadhan Nasution

NIM. 155070107111034

Telah diuji pada

Hari :

Tanggal : 16/04/2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Sri Andarini M. Kes.
NIP. 195804141987012001

Pembimbing I/Penguji II.

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

Pembimbing II/Penguji III

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

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Muhammad Taufik Rizky Ramadhan Nasution. 2019. **Pengaruh Pemberian Amlodipin Dosis 5 μ M Terhadap Ekspresi Protein NRF2 Pada Kultur Sel Neuron SH-SY5Y yang Diinduksi Glukosa 25 mM.** Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dessika Rahmawati, M. Biomed., Sp. S. (2) dr. Indriati Dwi Rahayu M. Kes.

Hiperglikemi pada kultur sel neuron terjadi ketika sel tersebut diberikan induksi glukosa 25 mM. Hiperglikemi akan meningkatkan Ca^{2+} dan akan meningkatkan stres oksidatif di dalam sel. Hal ini menyebabkan teraktivasinya protein NRF2 yang berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk ekspresi enzim-enzim antioksidan. Pada saat terjadi peningkatan stres oksidatif yang kronis akan terjadi penurunan kualitas dari aktivasi enzim-enzim antioksidan. Amlodipin merupakan golongan obat *calcium channel blocker* (CCB) dapat bekerja pada sel saraf dengan berikatan dengan *L-Type Calcium Channel* (LTCC). Amlodipin memiliki efek neuroprotektif pada kultur sel neuron dengan hasil inhibisi kematian sel yang maksimal pada dosis 5 μ mol/L. Tujuan dari penelitian ini adalah Mengetahui efek pemberian amlodipin dosis 5 μ M terhadap ekspresi protein NRF2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM. Pada penelitian ini kultur sel neuron yang diinduksi glukosa 25 mM diberikan perlakuan tanpa amlodipin dan dengan amlodipin 5 μ M. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil uji *independent t test* ($p=0,324$) bahwa tidak ada perubahan ekspresi NRF2 yang signifikan antara kultur sel neuron yang diberi amlodipin dengan tanpa diberi amlodipin. Uji korelasi Spearman menunjukkan ($r= 0,290$; $p= 0,361$) bahwa pemberian amlodipin 5 μ M tidak signifikan meningkatkan ekspresi NRF2. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian amlodipin 5 μ M tidak memberikan efek terhadap ekspresi NRF2 pada kultur sel neuron yang diinduksi glukosa 25 mM.

Kata Kunci: Diabetik neuropati, NRF2, amlodipin, SH-SY5Y.

ABSTRACT

Muhammad Taufik Rizky Ramadhan Nasution. 2019. **The Effect of 5 μM Dosage of Amlodipine on NRF2 Expression in SH-SY5Y Cell Line Induced by 25 mM of Glucose.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dessika Rahmawati, M. Biomed., Sp. S. (2) dr. Indriati Dwi Rahayu M. Kes.

Hiperglicemy on neuron cell culture occurs when the cells are induced by 25 mM of glucose. Hyperglycemic state will increased intracellular Ca^{2+} that lead to increased of oxidative stress in the cell. This causes the activation of antioxidant enzymes by NRF2 protein. Amlodipine is part of calcium channel blocker drug classes that can act on nerve cells through bounding with L-Type Calcium Channel (LTCC). Five $\mu\text{mol/L}$ of amlodipine has neuroprotective effect on neuron cell culture by inhibiting cell death. The purpose of this research is to know the effect of amlodipin dose 5 μM towards expression of the protein NRF2 in SH-SY5Y cell culture induced by 25 mM glucose. In this research on neuron cell culture induced by 25 mM glucose treated without amlodipin and with amlodipin 5 μM . Based on this research obtained independent t test result ($p = 0,324$) that there is no significant change of the NRF2 expression between neuron cell culture treated with amlodipin without amlodipine. Spearman correlation test showed ($r = 0.290$; $p = 0.361$) that treating neuron cell culture by amlodipin 5 μM not significantly increased NRF2 expression. Based on this study it can be concluded that treating neuron cell culture by amlodipin 5 μM did not give effect towards NRF2 expression on neuron cell culture induced 25 mM glucose.

Keywords: Diabetic neuropathy, NRF2, amlodipine, SH-SY5Y.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperglikemi adalah kondisi meningkatnya kadar glukosa dalam darah hingga diatas kadar normal. Hiperglikemi Merupakan suatu tanda yang didapat pada penyakit diabetes mellitus (Soelistyo *et al*, 2015). Diabetes melitus adalah penyakit metabolik kronik yang diakibatkan insulin yang diproduksi oleh sel beta pankreas tidak cukup atau tidak bisa digunakan secara efektif oleh tubuh. Persebaran penderita diabetes di Indonesia menurut Riskesdas pada tahun 2013, proporsi masyarakat yang berumur lebih dari 15 tahun yang menderita diabetes millitus di Indonesia sebesar 6,9% atau dengan perkiraan jumlah 12.191.564 orang. Jumlah ini meningkat dibandingkan dengan tahun 2007 yang menyatakan bahwa masyarakat yang berumur lebih dari 15 tahun yang menderita diabetes millitus di Indonesia sebesar 5,7% (Kementrian Kesehatan RI, 2014).

Keadaan diabetes ini dapat menyebabkan berbagai macam komplikasi. komplikasi dari diabetes sendiri dibagi menjadi dua yaitu komplikasi akut dan kronik. komplikasi akut diabetes terdiri dari krisis hipoglikemi dan hiperglikemi, sedangkan untuk komplikasi kronis terdiri dari makroangiopati dan mikroangiopati. Komplikasi makroangiopati diabetes terdiri dari penyakit jantung koroner, penyakit pembuluh darah perifer, atau penyakit pembuluh darah otak seperti stroke, sedangkan komplikasi mikroangiopati diabetes terdiri dari retinopati, nefropati dan neuropati (Soelistyo *et al.*, 2015). Presentase komplikasi diabetes millitus yang paling banyak dialami pada pasien diabetes millitus yang dirawat di RSCM pada tahun 2011 adalah neuropati yang dialami 54% pasien lalu diikuti oleh retinopati

sebesar 33,4 persen dan proteinuria sebesar 26,5% (Kementrian Kesehatan RI, 2014).

Pengobatan Diabetik neuropati masih memerlukan banyak pengembangan. Walaupun sudah cukup banyak pendekatan farmakologi untuk mengobati diabetik neuropati tetapi, pengobatan yang benar-benar mengintervensi ke akar masalah dari diabetik neuropati selain kontrol yang ketat dari gula darah masih membutuhkan pemahaman yang lebih lanjut, sehingga target terapi yang berpotensi harus terus dikembangkan dan pada masa yang akan datang agen terapi yang bekerja pada level kontrol metabolisme mitokondria akan memperbaiki pengobatan *Dystal symetric polyneuropathy* (DSPN) (Edwards *et al.*, 2008; Singh, Kishore and Kaur, 2014).

Pada kultur sel neuron, hiperglikemi terjadi ketika sel tersebut diberikan induksi glukosa 25mM (Shi and Liu, 2006). Pada sel yang mengalami hiperglikemi dapat terjadi peningkatan dari prekursor *reactive oxygen species* (ROS), sehingga oksidatif stress ikut juga meningkat. Peningkatan ROS ini dapat terjadi akibat disfungsi mitokondria melalui proses gangguan homeostasis ion Ca^{2+} dan gangguan sistem penyangga ion Ca^{2+} di dalam mitokondria dengan cara membatasi jumlah *ATP dependent transport*. Hal ini mengakibatkan peningkatan konsentrasi istirahat ion Ca^{2+} intraseluler, peningkatan secara rendah dan tinggi aliran Ca^{2+} , dan penurunan amplitudo sinyal induksi depolarisasi ion Ca^{2+} (Verkhatsky and Fernyhough, 2014).

Peningkatan dari ion Ca^{2+} yang tidak terkontrol dan akibat terjadinya *Endoplasmic Reticulum* (ER) stress mengakibatkan meningkatnya oksidatif stress di dalam sel. Hal ini menyebabkan teraktivasinya protein NRF2 yang berfungsi

sebagai faktor transkripsi untuk ekspresi enzim-enzim antioksidan. Protein transkripsi NRF2 akan mengekspresikan SOD (*Superoxide Dismutase*) sebagai agen antioksidan, namun pada saat terjadinya peningkatan oksidatif stress menyebabkan penurunan kualitas dari aktivasi enzim-enzim antioksidan di dalam menangkap radikal bebas. Salah satu dari jenis enzim ini adalah SOD (Akki *et al.*, 2018). Hal ini dapat menyebabkan peningkatan pada ROS, sehingga dapat meningkatkan terjadinya apoptosis dan kerusakan pada sel neuron yang mengakibatkan terjadinya neuropati.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) adalah Protein yang berfungsi melindungi sel dari apoptosis dengan cara meningkatkan protein antioksidan sebagai respon dari meningkatnya stress oksidatif. Pada kondisi normal (non-stress) NRF2 memiliki konsentrasi yang rendah di dalam sel dan tertahan di sitoplasma, sedangkan pada saat terjadi peningkatan stress oksidatif maka konsentrasi NRF2 di dalam sel akan meningkat dan NRF2 akan mengalami translokasi ke dalam inti sel untuk meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam respon antioksidan (Rochette *et al.*, 2014).

Amlodipin merupakan salah satu obat dari golongan *calcium channel blocker*. Amlodipin biasa digunakan pada pengobatan penyakit kardiovaskular. Amlodipin termasuk dalam golongan turunan dihydropyridin (Fares *et al.*, 2016). Amlodipin juga dapat bekerja pada sel saraf dengan berikatan dengan *L-Type Calcium Channel (LTCC)* (Shen, Farid and Mcpeek, 2008). Amlodipin memiliki efek neuroprotektif pada kultur sel neuron dalam rentang dosis antara 0,1 – 20 $\mu\text{mol/L}$ dengan hasil inhibisi kematian sel yang maksimal pada dosis 5 $\mu\text{mol/L}$ pada percobaan dengan menggunakan kultur sel SHSRP (Yamagata, Ichinose and Tagami, 2004).

Berdasarkan data-data diatas inilah mengapa peneliti ingin mengetahui lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian amlodipin terhadap konsentrasi NRF2 sebagai salah satu mekanisme aktivasi protein antioksidan dalam terjadinya diabetik neuropati.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian amlodipin dosis 5 μ M dapat meningkatkan ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi protein NRF2 antara pemberian amlodipin dosis 5 μ M dengan tanpa pemberian amlodipin pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM?

1.3 Tujuan penelitian

1.2.1 Tujuan umum

Mengetahui efek pemberian amlodipin terhadap kultur sel neuron SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui efek pemberian amlodipin dosis 5 μ M terhadap ekspresi protein NRF2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM.
2. Mengetahui perbedaan ekspresi protein NRF2 antara kelompok perlakuan dengan pemberian amlodipin dosis 5 μ M dan tanpa pemberian amlodipin pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM.

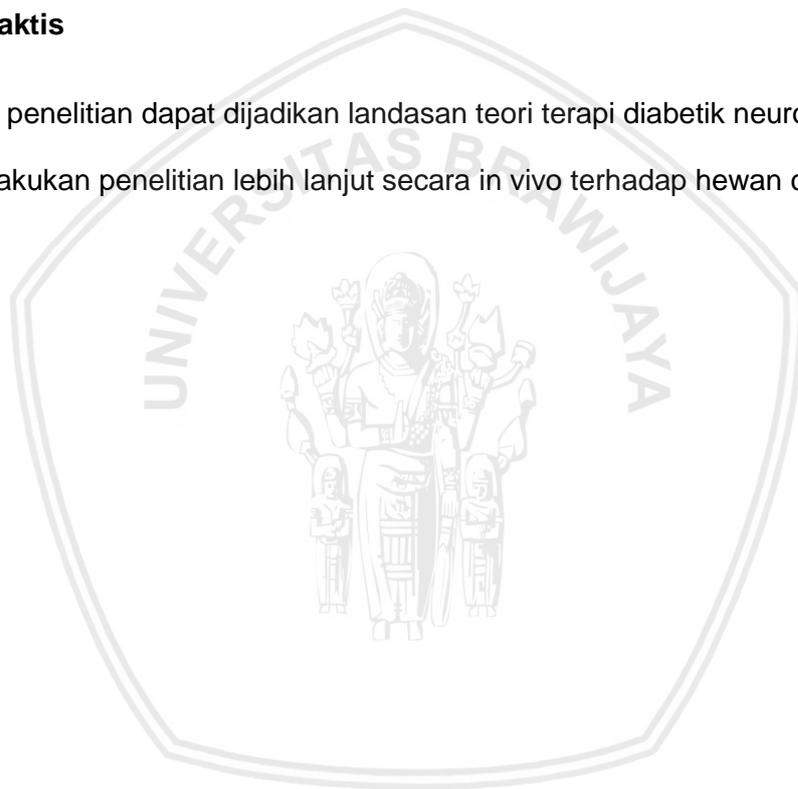
1.4 MANFAAT PENELITIAN

1.4.1 Akademis

Dapat dijadikan kajian untuk menambah keilmuan mengenai peran amlodipin di dalam meningkatkan ekspresi protein Nrf2 pada kondisi hiperglikemi kronis secara in vitro

1.4.2. Praktis

Hasil penelitian dapat dijadikan landasan teori terapi diabetik neuropati agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut secara in vivo terhadap hewan coba.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetik Neuropati

2.1.1 Definisi

Diabetik neuropati merupakan komplikasi kronik dari diabetes yang paling umum. Kondisi neuropati ini dapat mempengaruhi berbagai bagian dari sistem saraf dan manifestasi klinis yang dapat timbul juga berbeda-beda (Pop-busui *et al.*, 2016). Secara definisi diabetik neuropati merupakan adanya gejala atau tanda disfungsi saraf perifer pada pasien diabetes mellitus setelah mengeksklusi penyebab lain (Singh, Kishore and Kaur, 2014).

2.1.2 Manifestasi Klinis

Dystal symetric polyneuropathy (DSPN) adalah bentuk yang paling sering terjadi dari diabetik perifer neuropati. Nervus yang lebih panjang ditubuh lebih sering terpengaruh sehingga gejala yang paling sering dialami pasien biasanya terletak pada kakinya. Pasien bisa mengeluhkan tentang menurun atau hilangnya sensasi atau dapat mengeluhkan nyeri dalam berbagai bentuk seperti iritasi ringan parastesia sampai nyeri neuropatik yang parah (Pickett, 2016). Gejala-gejala khas diabetik neuropati seperti, nyeri, paresthesia, dan hilangnya kemampuan sensoris mempengaruhi 50% pasien dengan morbiditas, mortalitas, dan gangguan kualitas hidupnya. Gejala nyeri seperti rasa terbakar, kesemutan, atau tersetrum didapatkan pada satu pertiga pasien dengan diabetik neuropati dan 20% pasien diabetes mellitus. Gejala ini biasanya memburuk saat malam dan mengganggu tidur. Diabetik neuropati juga terkait dengan beberapa morbiditas lain seperti,

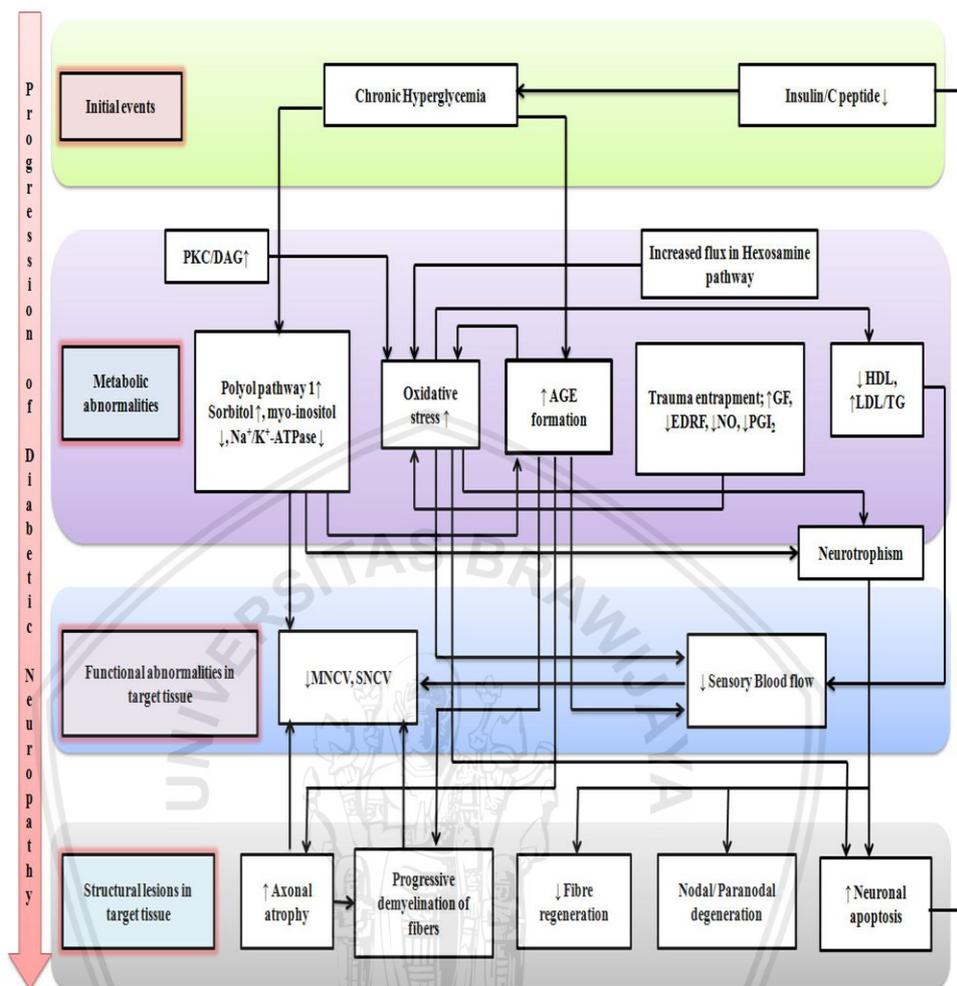
depresi, fraktur kaki, dan ulserasi dan amputasi ekstremitas bawah (Singh, Kishore and Kaur, 2014).

2.1.3 Diagnosis

Diagnosis diabetik neuropati merupakan diagnosis eksklusi dari penyebab neuropati yang lain. Nondiabetik neuropati bisa didapatkan pada pasien diabetes dan membaik dengan pengobatan yang spesifik (Pop-busui *et al.*, 2016). Setiap pasien dengan diabetes harus diperiksa untuk mengetahui perifer neuropati. Pada pasien diabetes tipe 1 pemeriksaan perifer neuropati dilakukan 5 tahun setelah diagnosis ditegakkan, sedangkan pada pasien pemeriksaan perifer neuropati dilakukan pada saat diagnosis ditegakkan. Pemeriksaan yang dilakukan untuk menegakkan diagnosis perifer neuropati adalah 10-g monofilament tes, pinprick test dan sensasi sentuhan atau getaran (Pickett, 2016).

2.1.4 Patofisiologi

Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa patogenesis dari diabetik neuropati merupakan multifaktor tetapi penyebabnya tetap tidak diketahui. Pendapat yang umum tentang patogenesis dari neuropati adalah *adanya stress inflamatory* dan *oxidative* karena disfungsi dari metabolisme sehingga menghancurkan sel saraf (Pop-busui *et al.*, 2016).



Gambar. 1 Patofisiologi diabetik neuropati (Singh, Kishore and Kaur, 2014).

Hiperglikemi mengaktifkan beberapa jalur biokimia termasuk jalur polyol, meningkatkan *advance glycation end product* (AGEs) dan reseptornya, aktivasi protein kinase C (PKC), *mitogen-activated* protein kinase (MAPK), dan menginduksi *nitirite oxide sintase*. Salah satu jalur yang telah dikenal memiliki peran yang cukup signifikan terhadap kerusakan neuron adalah peningkatan AGEs akibat hiperglikemi. Produksi AGEs merusak sel neuron melalui 3 mekanisme yang pertama, AGEs memodifikasi protein intrasel sehingga fungsinya terganggu. Kedua, AGEs memodifikasi komponen matriks ekstraseluler menyebabkan interaksi yang abnormal dengan reseptor protein matriks yang ada

di sel. Ketiga, plasma protein yang dimodifikasi oleh precursor AGEs akan berikatan dengan AGEs reseptor yang berada pada sel endotel, sel makrofag, sel mesangial, dan sel mikroglia, menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS). Ligasi dari reseptor AGEs akan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor-kb* (NF-kb) yang akan mengekspresikan gen pro inflamasi. Terdapat bukti yang cukup meyakinkan dari eksperimen ataupun klinis yang menunjukkan peningkatan pembentukan ROS pada kedua jenis diabetes. Jalur AGE, polyol, PKC, dan heksosamin secara langsung mengganggu kapasitas redoks dari sel melalui pembentukan ROS secara langsung atau deplesi dari komponen yang dibutuhkan pada jalur daur ulang glutation. Jalur ini selalu memicu kerusakan melalui ekspresi dari protein inflamasi yang akan menyebabkan gangguan fungsi neuron dan akhirnya apoptosis dari neuron (Singh, Kishore and Kaur, 2014).

Pemeriksaan autopsi dari saraf tepi pada pasien diabetes menunjukkan hilangnya serabut saraf myelin, proliferasi sel schwan dan perubahan mikrovaskular. Penurunan konduksi saraf sering diasosiasikan dengan demyelinasi segmental dan kelainan metabolik yang terjadi di sel schwann. Demyelinasi segmental umumnya ditemukan pada diabetik neuropati tipe 2 dan atrofi axonal umumnya ditemukan pada diabetik neuropati tipe 1. Kelainan molekuler yang mengakibatkan hal ini diinisiasi oleh fosforilasi dari *ERK1/2*, *p38* dan *JNK MAP-kinases*, dan PKC subunits, yang menghasilkan terganggunya aktivasi dari Na⁺/K⁺-ATPase (Sima and Zhang, 2014).

2.1.5 Pengobatan

Waktu yang dibutuhkan untuk terapi kasus DSPN tidak dapat diprediksi. Terapi sebaiknya dimulai pada saat nyeri dari perifer neuropati mengganggu

aktivitas sehari-hari atau menurunkan kualitas hidup. Ada beberapa prinsip terapi yang dapat membantu pasien dan dokter, yang pertama adalah menentukan tujuan terapi yang realistis karena hasil terapi seringkali tidak menghilangkan total dari gejala yang timbul, yang kedua dosis pengobatan dapat menggunakan dosis efektif yang rendah penambahan dosis dapat dipertimbangkan dengan melihat efek samping yang terjadi. Pengobatan dari DSPN didasarkan pada mekanisme patogenesis dan mengurangi gejala. Pada mekanisme patogenesis pengobatan dapat dilakukan dengan mengontrol gula darah menggunakan obat anti diabetes dan juga terapi mekanisme dasar, menggunakan beberapa golongan obat, seperti aldose reduktase inhibitor, PKC inhibitor, agen yang bekerja pada jalur hexosamine, agen yang bekerja pada jalur AGE, dan ROS inhibitor. Untuk mengurangi gejala terdapat beberapa golongan obat yang dapat digunakan, *tricyclic and tetracyclic antidepressants* (TCA's), *selective serotonin reuptake inhibitors* (SSRI's), *serotonin-norepinephrine reuptakeinhibitors* (SNRI), anticonvulsants, dan opioids (Singh, Kishore and Kaur, 2014). Walaupun sudah cukup banyak pendekatan farmakologi untuk mengobati diabetik neuropati tetapi, pengobatan yang benar-benar menasar ke akar masalah dari diabetik neuropati selain Kontrol yang ketat dari gula darah masih membutuhkan pemahaman yang lebih lanjut dari patogenesis diabetik neuropati itu sendiri. Beberapa hasil penelitian preklis dari obat yang bekerja pada jalur-jalur yang diduga berperan pada patogenesis diabetik neuropati masih membutuhkan waktu untuk diaplikasikan (Edwards *et al.*, 2008). Sehingga target terapi yang berpotensi harus terus dikembangkan dan pada masa yang akan datang agen terapi yang bekerja pada level kontrol metabolisme mitokondria akan memperbaiki pengobatan DSPN (Singh, Kishore and Kaur, 2014).

2.2 Stres Oksidatif Pada Diabetik Neuropati

Stres oksidatif telah ditemukan dan diasosiasikan dengan berbagai macam berkembangnya kelainan saraf yang terjadi pada diabetes seperti penurunan *neurotrophic support*, penurunan *axonal outgrowth*, dan kerusakan DNA pada sel *dorsal root ganglion* (DRG) yang mengakibatkan neuropati. Hal ini didukung oleh banyak penelitian baik *in vivo* ataupun *in vitro* mengenai pengukuran stres oksidatif dan penurunan ROS dengan pemberian antioksidan. Sel mempunyai kemampuan pertahanan untuk menangkal stres oksidatif. Terdapat beberapa antioksidan yang mempunyai peran penting dalam menangkal stres oksidatif tersebut diantaranya, *superoxide dismutase* (SOD), *catalase*, GSH, *glutathione peroxidase*, *polyphenol*, dan flavonoids. Terdapat pula beberapa beberapa enzim yang dapat melindungi sel dari stres oksidatif yang berlebihan diantaranya, *phase II detoxifying enzymes* yang termasuk *glutathione S-transferase*, *UDP glucuronyl transferase*, HO-1, *NADPH-quinone oxidoreductase* (NQO-1) dan *microsomal epoxide hydrolase*. Faktor transkripsi NRF2 telah dikenal sebagai factor yang krusial terhadap regulasi enzim-enzim tersebut dengan interaksinya dengan *antioxidant response element* (ARE) (Negi *et al.*, 2011).

2.2.1 Protein Nrf2

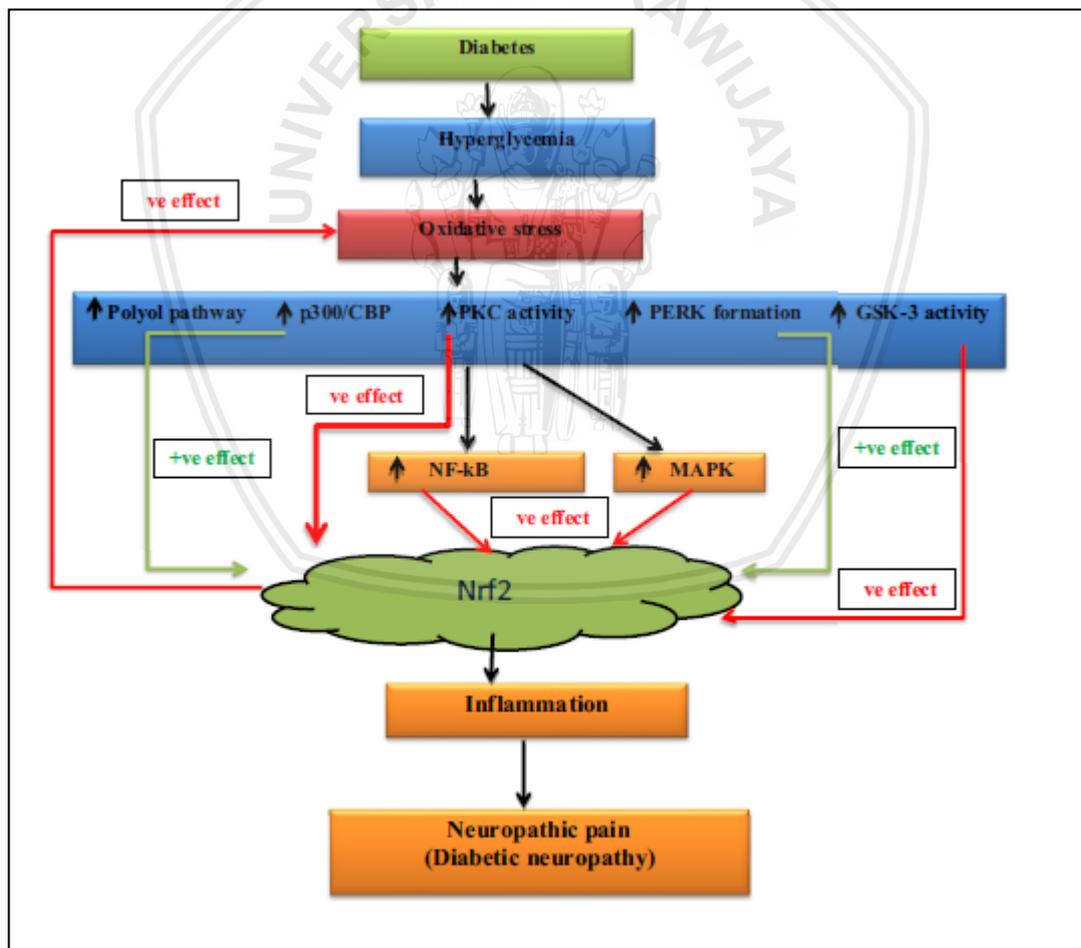
Secara struktur *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) adalah sub-anggota *cap n collar* (CNC) dari *basic leucine zipper* (bZip) *transcription factor* (Ma, 2013). Protein Nrf2 mempunyai fungsi sebagai mekanisme pertahanan primer dari stres oksidatif yang dialami sel (Kumar and Mittal, 2017). Stres oksidatif merupakan suatu keadaan dimana terjadi produksi yang tidak terkontrol dari zat oksidan yaitu, *reactive oxygen dan nitrogen species* (ROS dan RNS). Keadaan ini

dapat menyebabkan terganggunya fungsi seluler dan dapat berkontribusi terhadap berkembangnya sel kanker, penyakit kronis, dan toksisitas (Ma, 2013). Nrf2 yang sering juga disebut sebagai *master regulator* dari respon antioksidan akan merespon keadaan ini dengan memodulasi ekspresi dari ratusan gen, tidak hanya gen yang mengontrol enzim antioksidan tetapi juga gen yang mengatur respon imun dan respon inflamasi. Pada kondisi normal konsentrasi Nrf2 rendah dan berada di sitoplasma sel berikatan dengan Keap1. Akibat respon terhadap stres oksidatif terjadilah serangkaian peristiwa kompleks yang menyebabkan stabilisasi dari Nrf2 dan translokasinya ke nukleus. Di nukleus, Nrf2 akan meregulasi beberapa gen yang terlibat dalam respon antioksidan, yang dimana bagian promotornya mempunyai *antioxidant response element* (ARE) (Rochette *et al.*, 2014). Aktivitas Nrf2 diregulasi oleh ikatannya dengan protein *actin-associated* Keap1 di sitoplasma. Keap1 adalah *zinc-metaloprotein* yang kaya akan sistein yang berfungsi menjaga agar ARE tidak teraktivasi dalam keadaan normal dengan mengikat Nrf2 dengan ikatan kompleks yang stabil. Pada keadaan stres oksidatif terjadi aktivasi Nrf2 dalam merespon sinyal stres diperkirakan akibat rusaknya ikatan dengan Keap1 (Nguyen, Nioi and Cecil, 2009). Residu sistein pada Keap1 termodifikasi sehingga terjadi perubahan formasi dari Keap1 sehingga afinitasnya dengan Nrf2 berkurang (Kumar and Mittal, 2017). Nrf2 yang tadinya tertahan di sitoplasma lepas menuju nukleus untuk melakukan efek transkripsinya (Nguyen, Nioi and Cecil, 2009).

2.2.2 Peran Nrf2 pada diabetik neuropati

Seperti dijelaskan sebelumnya pada saat sel mengalami stress oksidatif maka Nrf2 akan teraktivasi. Ikatan dengan Keap1-Nrf2 akan terlepas dan Nrf2 akan mengalami translokasi ke nukleus. Pada saat sel mengalami hiperglikemi akut

maka Nrf2 akan teraktivasi sebagai respon terhadap stres akibat hiperglikemi tersebut tetapi, pada saat sel mengalami hiperglikemi yang persisten atau kronis maka ekspresi dari Nrf2 akan menurun. Penurunan ekspresi Nrf2 inilah yang akan menyebabkan kerusakan sel akibat menurunnya kemampuan sel dalam menghadapi stres. Pada banyak studi, aktivasi Nrf2 diregulasi oleh ikatannya dengan Keap1 tetapi, penelitian terbaru menunjukkan aktivasi Nrf2 juga diregulasi oleh jalur patologi akibat hiperglikemi seperti jalur polyol, protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK), NF- κ B, GSK3, p300/CBP, dan PERK. (Kumar and Mittal, 2017).



Gambar 2. Skema dari efek mekanisme berbagai jalur patologis terhadap Nrf2 yang menghasilkan diabetic neuropati (Kumar and Mittal, 2017).

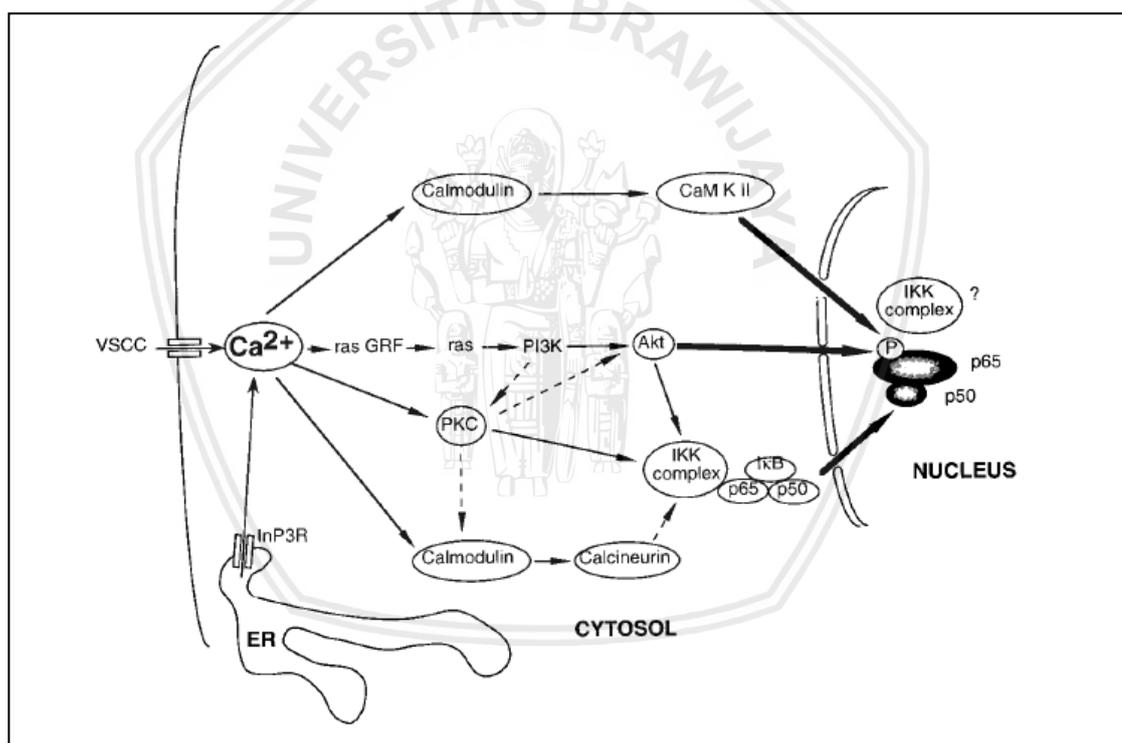
2.2.3 Hubungan Ca^{2+} dengan protein Nrf2

Pada keadaan hiperglikemi kronis ion Ca^{2+} mengalami gangguan homeostasis. Gangguan homeostasis Ca^{2+} telah banyak ditemukan pada berbagai preparat yang diisolasi baik dari hewan yang diinduksi diabetes ataupun pasien diabetes. Salah satu gangguan homeostasis Ca^{2+} yang pertama adalah adanya peningkatan kadar Ca^{2+} istirahat. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kotsyuk menunjukkan bahwa terjadi peningkatan Ca^{2+} istirahat pada neuron DRG tikus diabetes. Pada penelitian tersebut dibuktikan bahwa kadar Ca^{2+} istirahat pada sel neuron DRG yang diambil dari model tikus diabetes tipe 1 meningkat 30% dari pada kontrol. Peningkatan kadar Ca^{2+} bahkan lebih besar pada sel neuron kecil yang diambil dari model tikus diabetes tipe 2 (Ferryhough and Calcutt, 2010).

Ion Ca^{2+} tidak berhubungan secara langsung dengan Nrf2 tetapi, melalui aktivasi NF- κ B. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang meregulasi apoptosis dalam respon stres pada sistem saraf dan berbagai sel dan jaringan lain. Pada penelitian yang dilakukan Lilienbaum pada tahun 2003 dilaporkan bahwa karakteristik penalaran sinyal yang mengaktifkan NF- κ B beriringan dengan masuknya Ca^{2+} ke dalam sitosol. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa pembukaan kanal kalsium pada membran plasma dan pada penyimpanan intraseluler sangat dibutuhkan untuk aktivitas basal NF- κ B. Dilaporkan lebih lanjut terdapat tiga sensor seluler dari level Ca^{2+} intrasel yang secara simultan terlibat dalam langkah yang menghubungkan Ca^{2+} *second messenger* dengan aktivitas NF- κ B yaitu, calmodulin, PKC, dan *p21ras/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway*. Calmodulin memicu aktivitas dari calcineurin sebuah fosfatase yang berperan penting pada aktivitas basal NF- κ B, sementara aktivasi dari calmodulin

kinase II dan jalur Akt kinase menghasilkan *up-regulation* dari potensi transkripsional dari subunit p65 NF-kb (Lilienbaum and Israe, 2003).

Nrf2 dan NF-kb merupakan dua faktor transkripsi utama dalam respon seluler terhadap stres oksidatif. Ketiadaan Nrf2 dapat meningkatkan aktivitas NF-kB sehingga produksi sitokin meningkat, sebaliknya ketiadaan dari NF-kb dapat meningkatkan aktivitas dari Nrf2. Sebuah studi menunjukkan bahwa overekspresi dari p65 akan menurunkan bahkan menghilangkan penyinyalan transkripsi Nrf2-ARE (Kumar and Mittal, 2017).



Gambar 3. Skema hubungan antara Ca^{2+} dan NF-kb (Lilienbaum, 2003).

2.3 Amlodipin

Amlodipin termasuk kedalam golongan obat *calcium channel blocker* (CCB). Golongan obat CCB dibagi lagi menjadi beberapa subdivisi menurut struktur dan fungsinya. Amlodipin termasuk kedalam derivat dihydropyridin. Amlodipin dan *calcium channel blockers* banyak digunakan sebagai obat pada

penyakit kardiovaskular (Fares *et al.*, 2016). Diantara golongan dihydropyridine satu sub-kelas hanya bekerja pada reseptor *L-Type Calcium Channel Blocker* (LTCC) Sedangkan satu sub-kelas lain bekerja pada dua reseptor yaitu, *L-Type Calcium Channel Blocker* dan *T-Type Calcium Channel Blocker* (TTCC). Amlodipin, aranidipine, azelnidipine, barnidipine, benidipine, efonodopine, nicardipine, dan nimodipine bekerja dengan berikatan dengan *L-Type Calcium Channel* dan *T-Type Calcium Channel Blocker* sebagai penghambat sehingga menurunkan influx Ca^{2+} intraseluler (Kopecky, Liang and Bao, 2014). Menurunnya *uptake* Ca^{2+} intaseluler akan mencegah pembentukan radikal bebas dengan mengurangi produksi gugus radikal hidroksil yang dibentuk dari H_2O_2 (*journal of neurochemistry*, 2011). Amlodipin di metabolisme dalam waktu yang lama di dalam tubuh dan memiliki waktu paruh yang lama (> 40 jam). Efek samping dari penggunaan amlodipin adalah pusing, kulit memerah karena vasodilatasi, takikardi, palpitasi karena pengaktifan sekunder refleks sistem saraf simpatis, dan hipertrofi gusi (Fares *et al.*, 2016).

2.4 Sel 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

metastasis tumor di sumsum tulang (Kovalevich and Langford, 2013). 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 47 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 subbtipe neuron yang spesifik seperti neuron adrenergik, kolinergik, ataupun dopaminergik (Shipley, 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 (Shipley, Mangold and Szpara, 2017).

2.5 Pengukuran Nrf 2

Pengukuran ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yakni dengan menggunakan metode western blot yang memakai antibodi spesifik untuk protein Nrf2 dan alat CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope). Prinsip kerja dari

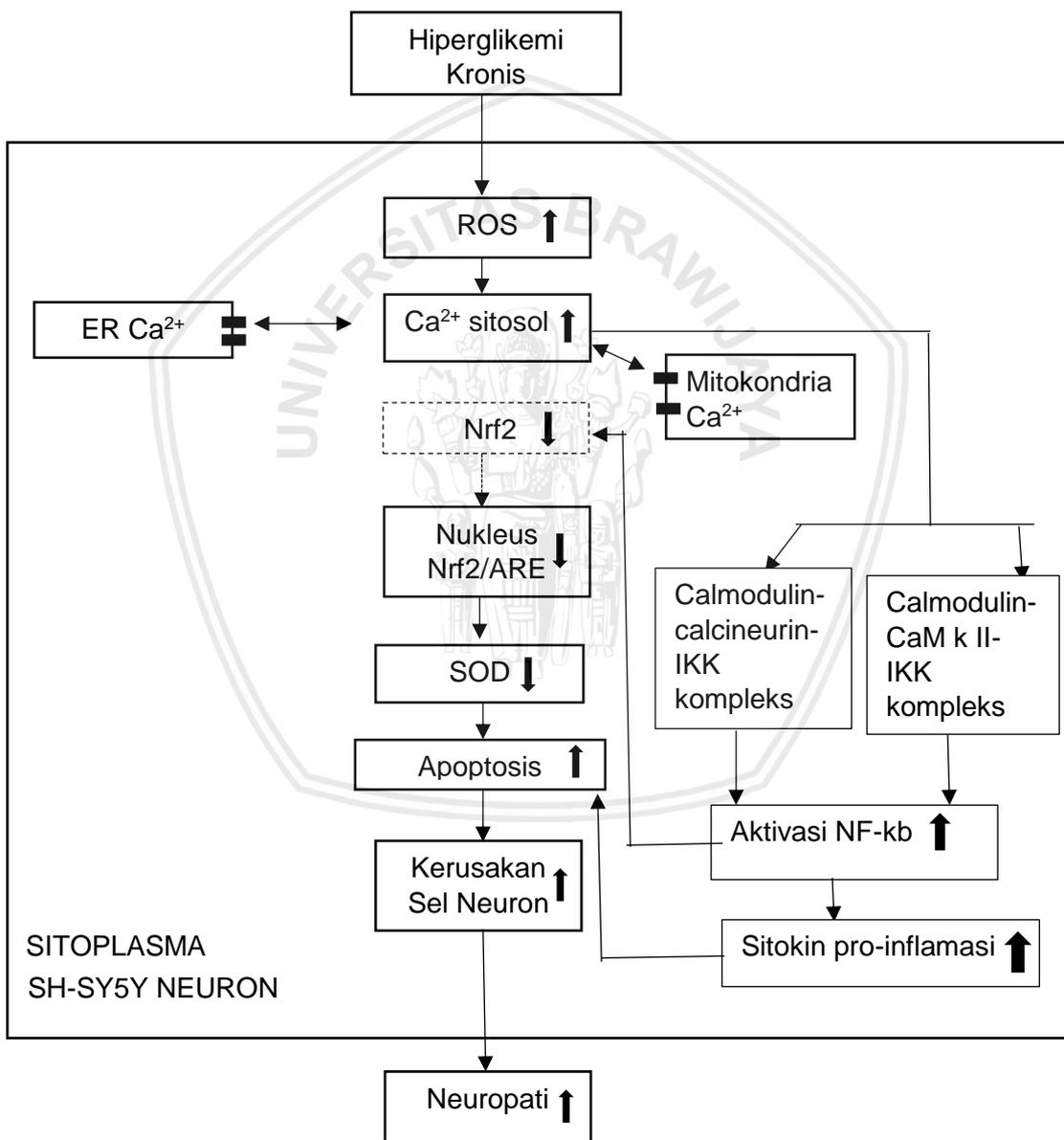
metode western blot adalah ekstrak sel yang mengandung protein Nrf2 berikatan secara spesifik dengan oligonukleotida yang mengandung ARE (Antioxidant Response Element). Kemudian dengan penambahan antibodi primer dan anti-Ig G HRP (Horseradish Peroxidase), maka antibodi akan yang langsung bereaksi terhadap protein Nrf2 dan lebih sensitif untuk dibaca pada spektrofotometri (Active Motif, 2014). Kemudian pengukuran jumlah ekspresi protein Nrf2 dengan menggunakan alat 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 fluorescent protein yang spesifik untuk protein Nrf2 sehingga aktivasi dari protein Nrf2 dapat dilihat dan dihitung jumlahnya melalui warna dari fluorescent yang spesifik untuk protein Nrf2 (Van Tittelboom *et al.*, 2016).

BAB 3

KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep

3.1.1 Kerangka Konsep Sebelum Diberi Amlodipin



————> : Mekanisme

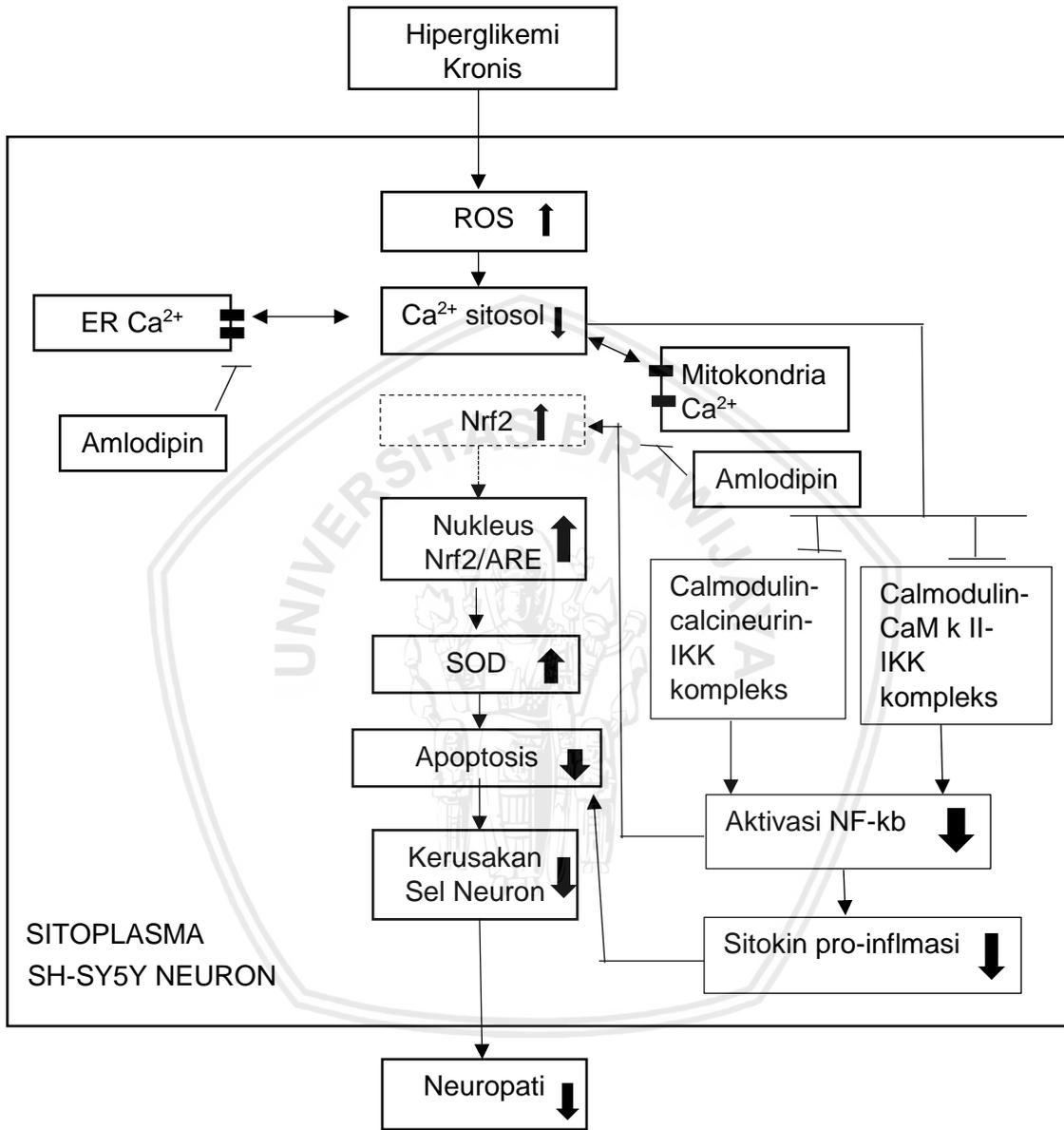
----- : Parameter yang diukur

-----> : Aktivasi

-----> : Meningkat

-----| : Inhibisi

3.1.2 Kerangka Konsep Setelah Diberi Amlodipin



————> : Mekanisme

- - - - - : Parameter yang diukur

- - - - -> : Aktivasi

↔ : Meningkatkan

———| : Inhibisi

SITOPLASMA
SH-SY5Y NEURON

3.2 Deskripsi kerangka konsep :

Pada saat terjadinya suatu keadaan hiperglikemi maka akan menyebabkan homeostasis di dalam tubuh akan mengalami gangguan terutama kadar ion Ca^{2+} yang tidak seimbang di dalam intraseluler dengan ekstraseluler. Ion Ca^{2+} ekstraseluler akan masuk ke intraseluler sehingga, Ion Ca^{2+} intraseluler akan meningkat. Sejalan dengan kondisi ini hiperglikemi mampu untuk meningkatkan ROS sehingga semakin meningkatkan kadar ion Ca^{2+} sitosol. Peningkatan ion Ca^{2+} sitosol juga dapat terjadi akibat disfungsi dari mitokondria sebagai akibat dari kondisi hiperglikemik dan tingginya ion Ca^{2+} di dalam retikulum endoplasma sel. Akibat meningkatnya ion Ca^{2+} intraseluler dan sitosol pada kondisi akut mengakibatkan peningkatan kondisi stres oksidatif di dalam sel sehingga akan meningkatkan ekspresi protein Nrf2 melalui jalur Nrf2-ARE untuk menghasilkan enzim SOD yang berfungsi menangkap radikal bebas (ROS) agar kondisi stres oksidatif di dalam sel dapat diturunkan. Pada kondisi hiperglikemi kronis terjadi penurunan ekspresi protein Nrf2 melalui peran ion Ca^{2+} intraseluler yang mengakibatkan teraktivasi jalur sinyal calmodulin-calcineurin-IKK kompleks dan calmodulin-CaM K II-IKK kompleks yang hasil akhir dari kedua jalur persinyalan ini pada nukleus sel adalah peningkatan stimulasi ekspresi dari protein NF-kb yang menyebabkan meningkatnya sekresi sitokin pro-inflammasi jalur klasik (Lilienbaum and Israe, 2003). Pemberian Amlodipin yang bekerja sebagai *calcium channel blocker*. Amlodipin mampu menghambat pelepasan ion Ca^{2+} yang berasal dari mitokondria dan Retikulum Endoplasma pada reseptor L-TCC. Sehingga dengan menurunnya kadar ion Ca^{2+} di dalam sel mampu untuk menurunkan aktivasi dari Nfkb sehingga merangsang ekspresi dan aktivasi dari protein Nrf2 yang akan meningkatkan ekspresi enzim antioksidan seperti SOD yang akan

menangkap radikal bebas (ROS) untuk mengurangi terjadinya proses apoptosis dari sel neuron SH-SY5Y.

3.3. Hipotesis Penelitian

Pemberian amlodipin dapat meningkatkan ekspresi protein NRF2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM.



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 Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel penelitian ini menggunakan kultur sel SH-SY5Y yang berasal dari *human neuroblastoma cell line* dengan ketentuan sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi : Kultur sel dalam kondisi konfluen dan perlapang pandang dalam kultur dish didapatkan 1×10^4 sel SH-SY5Y.
2. Kriteria Eksklusi : Kultur sel tidak dalam kondisi konfluen dan perlapang pandang dalam kultur dish kurang dari 1×10^4 sel SH-SY5Y.

4.2.2 Besaran Sampel

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

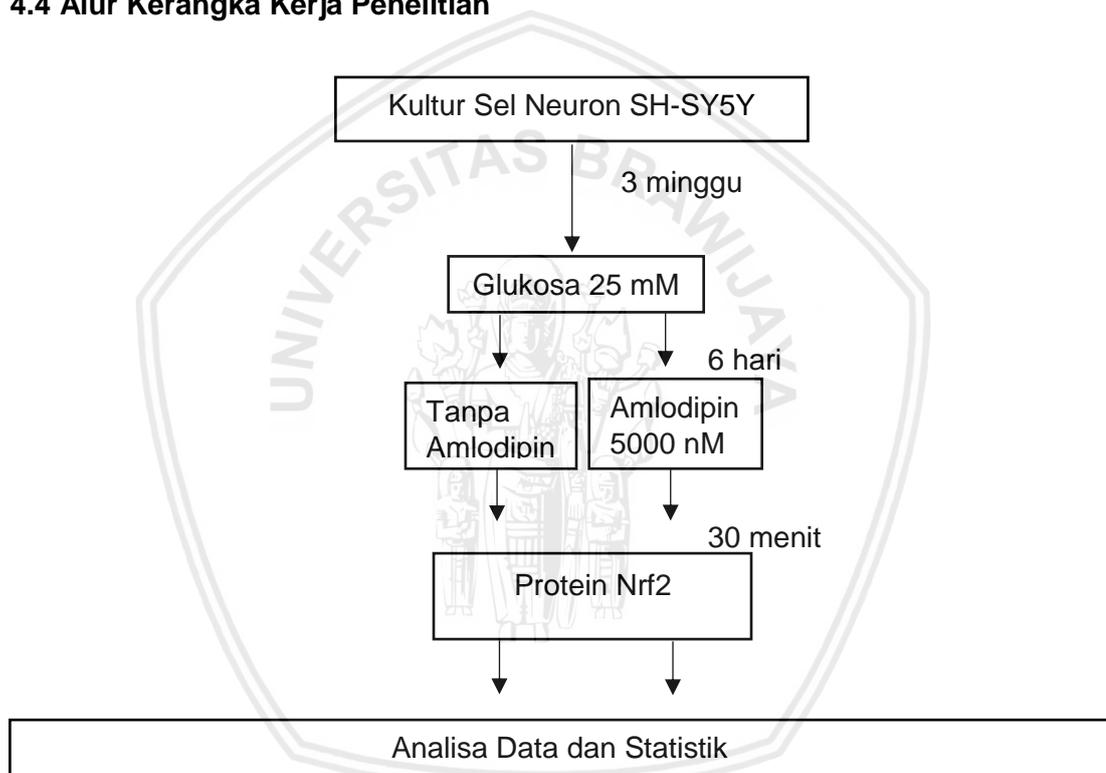
$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

Dimana p adalah jumlah perlakuan/*treatment* sedangkan n adalah jumlah sampel. Pada penelitian ini jumlah perlakuan sebanyak 2 sehingga didapatkan jumlah sampel sebesar 16.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.4 Alur Kerangka Kerja Penelitian



Glukosa : 25 mM dipapar selama 6 hari

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variable Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian amlodipin dengan konsentrasi 5 μ M dan tanpa pemberian amlodipin pada sel neuron kultur SH-SY5Y dan pemberian induksi glukosa dengan konsentrasi 25 mM.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah jumlah ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel neuron SH-SY5Y.

4.6 Definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara mengukur/ cara melarutkan	Hasil ukur/ satuan ukur
Amlodipin	Termasuk dalam golongan dihydropyridine Amlodipin, yang bekerja dengan berikatan dengan <i>L-Type Calcium Channel</i> dan <i>T-Type Calcium Channel Blocker</i> sebagai penghambat sehingga menurunkan influx Ca^{2+} intraseluler (Kopecky, 2014).	Amlodipin sebesar 0,030 mg dilarutkan dalam 15 ml ddH ₂ O. diberikan 1ml kedalam setiap <i>well culture dish</i> .	5 μ M amlodipin.
Hiperglikemi	Suatu monosakarida, D-glukosa dilakukan melalui penambahan pada media kultur dengan dosis 25 mM yang dilarutkan dengan DMSO yang bertujuan untuk memberikan efek hiperglikemik pada sel neuron. Paparan kronik selama 6 hari	Glukosa sebesar 0,0675 gr dilarutkan dalam 15 ml pelarut DMSO. diberikan 1ml kedalam setiap <i>well culture dish</i> .	25 mM glukosa.

NRF2	<p>Sub anggota cap N collar dari Basic leucine zipper (bZip) transcription factor yang akan bertranslokasi menuju nukleus dan berikatan dengan DNA spesifik yaitu, ARE untuk menginisiasi transkripsi gen antioksidan pada keadaan stres oksidatif.</p>	<p>NRF2 diukur dengan menggunakan NRF2 <i>transcription factor assay kit</i>. Lalu dilihat dengan menggunakan <i>confocal laser screening microscopy</i> (CLSM).</p>	<p>Diperoleh hasil dengan satuan aberrant unit (au) yang merupakan banyaknya pancaran protein NRF2 yang berwarna merah akibat adanya antibody yang mengikat.</p>
------	---	--	--

4.7 Prosedur Penelitian

Kultur Cell Line SH-SY5Y

A. Peralatan dan Bahan Kultur Sel

1. Alat dan bahan kultur lengkap terdiri dari mikropipet 1 ml, botol duran 100 ml, stiker label, 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. Panen sel terdiri dari pipet pasteur, mikropipet 1 ml, conical tube dan stiker label/pulpen marker, PBS, tripsin-EDTA 1x (Tripsin 0,25%), dan media kultur.
3. Subkultur terdiri dari pipet pasteur, mikropipet 1 ml, conical tube, culture dish, stiker label/pulpen marker, dan media kultur.
4. Penghitungan sel terdiri dari mikropipet, hemacytometer, counter, mikroskop (inverted/cahaya), dan suspensi sel hasil panen.
5. Induksi Hiperglikemi terdiri dari mikropipet, DMSO, media kultur, dan glukosa.
6. Perlakuan dengan Ca^{2+} *channel blocker* terdiri dari mikropipet, ddH₂O, 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 μ 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 $24-25^{\circ}\text{C}$.
5. Conical tube dibawa ke LAF 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_2 .
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_2 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 diresuspendi 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 CO₂. 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 μ l panen sel, ditambahkan dengan 9 μ l ddH₂O 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 Hiperglikemik

1. Sel Neuron ditumbuhkan pada kultur dish yang terdiri dari 4 *well* dan terdapat *cover glass* steril pada bagian dasarnya, masing-masing berisi 1×10^4 sel neuron.
2. Jika kondisi sel sudah 60% *confluent*, maka dilakukan penambahan methylglyoxal untuk induksi hiperglikemik
3. Glukosa dilarutkan dengan DMSO untuk membuat larutan *stock*. Kemudian glukosa ditambahkan pada media yang akan digunakan sehingga kandungan glukosa pada media adalah 25 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 dilakukan pengamatan morfologi sel.

Perlakuan dengan Amlodipin

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 dosis 5 μM amlodipin.
2. Bahan kimia yang berfungsi sebagai Ca^{2+} *channel blocker* dilarutkan dengan ddH₂O untuk membuat larutan *stock*, kemudian ditambahkan pada medium kultur hingga di dapatkan konsentrasi akhir pada medium kultur yaitu 20 μM
3. Media yang terdapat pada *well* kemudian diaspirasi, dilakukan *washing* dengan PBS sebanyak 2x, setelah itu ditambahkan media yang sudah diberi dengan berbagai dosis Ca^{2+} *channel blocker*
4. Sel kemudian diinkubasi selama 6x24 jam pada inkubator, setelah 6x24 jam dilakukan pengamatan morfologi sel.

Pemeriksaan Nrf2

Memakai – Nrf2 Transcription Factor Assay Kit

1. Siapkan CTFB
2. Tambahkan 90 ml CTFB per sampel baik (80 ml jika menambahkan pesaing dsDNA), 100 ml untuk blk dan NSB sumur).
3. Tambahkan 10 ml sampel Pesaing dsDNA (opsional) untuk sumur yang tepat
4. Tambahkan 25 ml kontrol positif sumur yang tepat

5. Tambahkan 10 ml sampel yang mengandung Nrf2 ke sumur yang tepat
6. Inkubasi semalam di 4 °C atau satu jam pada suhu kamar tanpa agitasi
7. Cuci setiap sumur lima kali dengan 200 ml 1X Wash buffer
8. Tambahkan 100 ml diencerkan Nrf2 primer antibodi per sumur (kecuali sumur blk).
9. Inkubasi satu jam pada suhu kamar tanpa agitasi
10. Cuci setiap sumur lima kali dengan 200 ml 1X Wash Buffer
11. Tambahkan 100 ml antibodi sekunder diencerkan (kecuali sumur blk).
12. Inkubasi satu jam pada suhu kamar tanpa agitasi
13. Cuci setiap sumur lima kali dengan 200 ml 1X Wash Buffer
14. Tambahkan 100 ml mengembangkan solusi per sumur

4.8 Pengamatan Sel

Pengamatan sel SH-SY5Y dilakukan dengan confocal laser screening microscopy (CLSM) dengan perbesaran 400 X.

4.9 Interpretasi Ekspresi Protein Nrf2 dengan CLSM

Penghitungan protein Nrf2 dilakukan menggunakan skala satuan au (*aberrant unit*) yang merupakan banyaknya pancaran dari protein Nrf2 yang berwarna merah akibat adanya antibodi yang mengikat. Penghitungan dilakukan dengan perangkat lunak *Olympus Fluoview Ver4.2a*.

4.10 Analisa Data

Dalam penelitian ini teknik analisis data dilakukan 3 tahapan penghitungan, berturut-turut yaitu uji normalitas data dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, sampel dengan *independent T Test*, uji korelasi Spearman dan *Cohen's d type effect size*.

4.11 Penghitungan Efek Dosis Amlodipin

Penentuan pengaruh efek dosis amlodipin pada kelompok glukosa 25 Mm dengan menggunakan rumus *d type effect size* :

$$d = \frac{M_{group1} - M_{group2}}{SD_{pooled}}$$

Dimana M1 adalah rata-rata pada kelompok 1 dan M2 adalah rata-rata pada kelompok 2. Sedangkan SD_{pooled} di dapatkan dari :

$$SD_{pooled} = \sqrt{(SD_{group1}^2 + SD_{group2}^2)/2}$$

4.12 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memenuhi semua persyaratan etik dan telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tanggal berdasarkan rekomendasi persetujuan etik.

BAB V

ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian pengaruh pemberian amlodipin terhadap ekspresi protein NRF2 pada kultur neuron SH-SY5Y dengan model hiperglikemi kronis. Pada minggu ke 1 hingga minggu ke 3 penelitian dilakukan proses dan penumbuhan sel dari sel kultur neuron SH-SY5Y hingga minimal 80% sel konfluen. Setelah sel konfluen minimal 80% selanjutnya dilakukan panen sel dan subkultur hingga minimal 80% sel menjadi konfluen kembali. Setelah sel siap, maka akan 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 25 mM selama 6 hari. Kemudian dilakukan intervensi amlodipin dengan dosis 5000 nm dan ditunggu hingga 30 menit. Setelah itu, diberikan label Nrf2 assay pada sel kultur neuron SH-SY5Y dan dilakukan pemeriksaan ekspresi protein Nrf2 dengan menggunakan alat CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*).

5.2 Analisis Data

5.2.1 Statistik Deskriptif

Tabel 5.1 Hasil Statistik Deskriptif

Kelompok Perlakuan	Rerata	Standar eror
Glukosa 25 mM tanpa amlodipin	8.3833	0.68456
Glukosa 25 mM + amlodipin 5 μ M	9.2072	0.40380

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 Nrf2 (amlodipin 5000 nm)

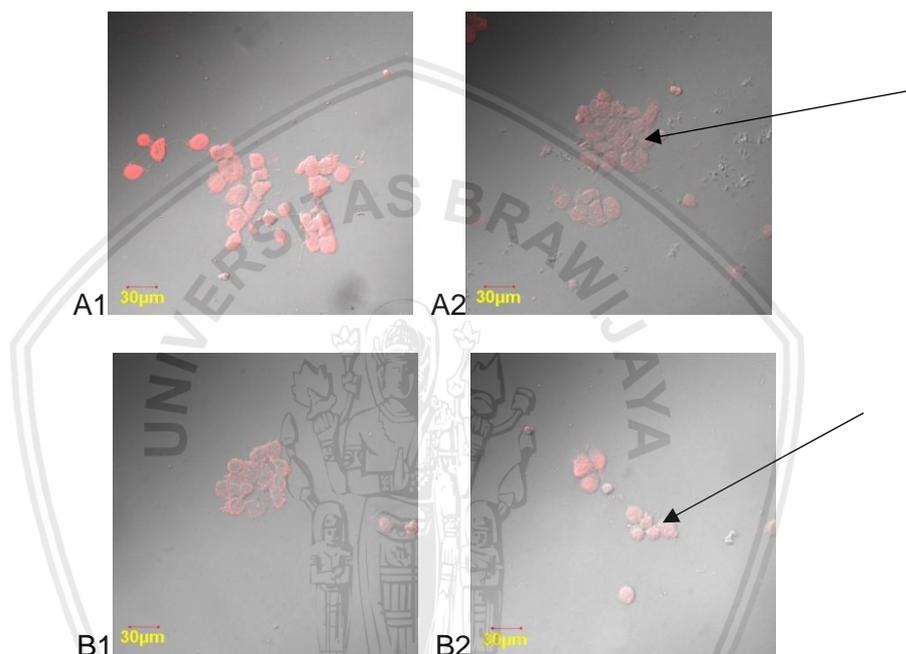
Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
Glukosa 25 mM	0.536	Normal
Glukosa 25 mM + CCB 5 μ m	0.138	Normal

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 menunjukkan bahwa data ekspresi Nrf2 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 (5 μ M) terhadap ekspresi Nrf2 pada Hiperglikemia 25 mM

Pada percobaan yang pertama diperoleh data hasil pengamatan antar kelompok perlakuan hiperglikemia 25 mM. Secara morfologi hasil pengamatan tersebut ditunjukkan pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Ekspresi NRF2 pada kultur neuron dengan perlakuan hiperglikemia (25 mM).

Keterangan: Pada gambar A1, A2 tanpa pemberian amlodipin, gambar B1, B2 diberi perlakuan amlodipin 5 μ M. Tanda panah menunjukan ekspresi NRF2 pada kultur sel neuron SH-SY5Y. (kultur hari ke 6, NRF2 rhodamine berwarna merah, DIC, superimpose, pembesaran 400x). Gambar menunjukan tidak ada perbedaan ekspresi NRF2 antara kelompok sel yang diberi amlodipin 5 μ M dengan kelompok sel yang tidak diberi amlodipin.

Untuk membuktikan pengaruh perlakuan pemberian amlodipin dosis 5 μ M terhadap ekspresi NRF2 pada kultur sel neuron hiperglikemia 25 mM hari keenam. Dilakukan analisis komparasi antara kelompok tanpa pemberian amlodipin dengan kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μ M menggunakan uji t sampel bebas (*independent sample t test*) yang ditunjukkan pada tabel 5.

Tabel 5.3 Hasil perbandingan ekspresi Nrf2 yang kultur neuron hiperglikemia 25 mM

Variabel	Tanpa amlodipin Rerata \pm SD	Amlodipin 5 μ M Rerata \pm SD	<i>p-value</i>
ekspresi NRF2	8.38 \pm 0.68	9.21 \pm 0.40	0.324 > α

Keterangan: Jika *p-value* < 0.05 berarti ada perbedaan yang bermakna dan jika *p-value* > 0.05 berarti tidak ada perbedaan yang bermakna.

Hasil pada tabel 5.2.4 menunjukkan hasil uji t sampel bebas diperoleh bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0.324$) rerata ekspresi Nrf2 antara kelompok tanpa pemberian amlodipin (8.38 \pm 0.68 au) dengan kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μ M (9.21 \pm 0.40 au). Tampak nilai rerata ekspresi NRF2 pada kultur neuron hiperglikemia 25 mM hari keenam tanpa pemberian amlodipin nilainya hampir sama bila dibandingkan dengan rerata ekspresi NRF2 pada kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μ M. Hal ini berarti bahwa bila pada kultur neuron hiperglikemia 25 mM hari keenam diberikan amlodipin dosis 5 μ M akan menunjukkan ekspresi NRF2 yang tidak berbeda dengan yang tanpa diberi amlodipin.

5.2.4 Hasil analisis korelasi antara pemberian amlodipin (5 μ M) dan tanpa amlodipin terhadap ekspresi protein NRF2

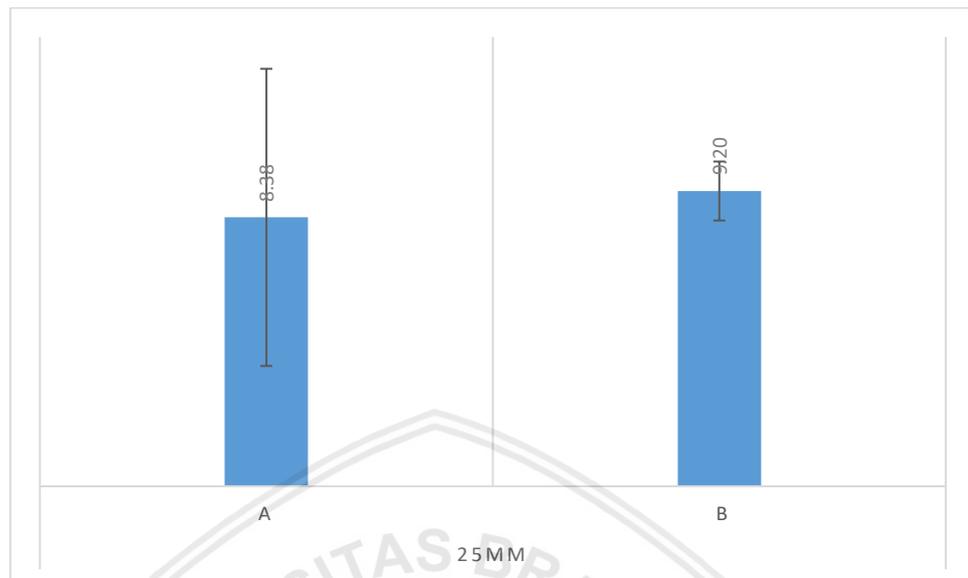
Tabel 5.4 Hasil uji korelasi antara ekspresi NRF2 yang kultur neuron hiperglikemia 25 mM

Correlations			
		Kelompok	NRF 2
Kelompok	Spearman Correlation	1	0,290
	Sig. (2-tailed)		0,361
	N	12	12
NRF 2	Spearman Correlation	0,290	1
	Sig. (2-tailed)	0,361	
	N	12	12

Berdasarkan hasil uji korelasi ekspresi NRF2 antara Kelompok tanpa amlodipin dengan diberikan amlodipin dosis 5 μ M menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar 0.290 dengan $p=0.361$ ($p>0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara kelompok yang tanpa diberi amlodipin dengan kelompok yang diberi amlodipin 5 μ M terhadap ekspresi Nrf2.

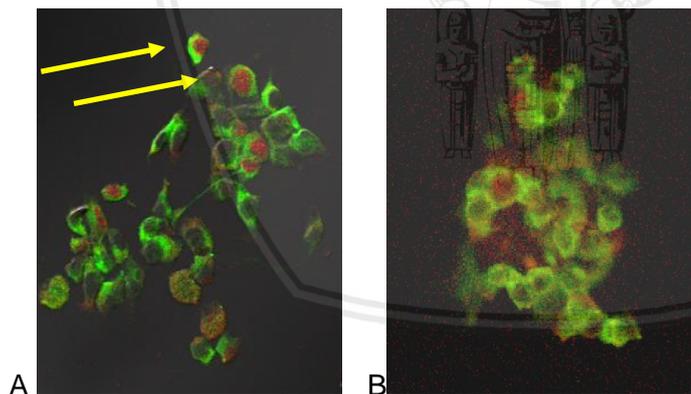
5.2.5 Penghitungan efek dosis dengan rumus *d-type effect size*

Pada kelompok yang induksi glukosa 25 mM pada kultur neuron SH-SY5Y dengan pemberian amlodipin 5 μ M dan tanpa amlodipin di dapatkan efek pemberian obat (d) sebesar 1,61.



Gambar 5.2 Ringkasan histogram rerata ekspresi Nrf2 pada kultur neuron SH-SY5Y dengan intervensi amlodipin 5 μ M dan tanpa amlodipin

Keterangan : A = Tanpa amlodipin, B = Amlodipin 5 μ M



Gambar 5.3 Translokasi NRF2 pada kultur neuron dengan perlakuan hiperglikemia (25 mM) + amlodipin 100 nM.

Keterangan: Pada gambar A merupakan kultur sel neuron yang diinduksi glukosa 25 mM+ amlodipin 100 nM. Tanda panah kuning menunjukan NRF2 yang berkumpul ditengah menandakan adanya translokasi pada kultur sel neuron yang diberi amlodipin translokasi pada kultur sel neuron SH-SY5Y. Gambar B merupakan kultur sel neuron yang diberi amlodipin 10 nM (kultur hari ke 6, NRF2 rhodamine berwarna merah, DIC, superimpose, pembesaran 400x).

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Amlodipin terhadap protein NRF2 yang diinduksi glukosa

25mM

Pada penelitian ini didapatkan hasil uji korelasi antara sel yang tidak diberikan amlodipin dan yang diberikan amlodipin 5 μ M bernilai positif ($r= 0.290$). Hal ini berarti bahwa pemberian amlodipin dapat meningkatkan ekspresi NRF2 walau dengan korelasi lemah. Pada penghitungan dengan rumus *d-type effect size* juga didapatkan nilai *d* sebesar 1,61 yang berarti pemberian amlodipin memberikan *very large* efek terhadap ekspresi NRF2. Hal ini dapat terjadi akibat berbagai faktor yang dapat mengaktifasi NRF2. Pada penelitian tambahan yang dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM dan amlodipin 100 nM menunjukkan translokasi NRF2 menuju nukleus ditandai dengan NRF2 yang berkumpul ditengah. Pada penelitian yang dilakukan oleh Shin pada tahun 2016 mengenai *unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis* yang menunjukkan bahwa *T-type CCB* dapat menurunkan *unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis* dengan mengaktifkan NRF2 dan meningkatkan regulasi enzim dan gen antioksidan yang diregulasinya. Hal ini akibat *T-type CCB* telah terbukti secara signifikan menghambat NF-kb pada sel mesangial (Shin *et al.*, 2016). Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Da hyun pada tahun 2017 mengenai efek sitotoksisitas acetaminofen pada sel hati didapatkan hasil bahwa verapamil yang merupakan, CCB non-dihydropyridin yang bekerja pada *L-Type calcium channel* dan *T-type calcium channel*, dapat mencegah efek sitotoksitas acetaminofen dengan mengaktifkan NRF2. Aktivasi dari NRF2 oleh verapamil ini akibat dari kemampuan

verapamil dapat mempromosi protein p62 yang merupakan protein yang spesifik berinteraksi dengan Keap1 dan secara kompetitif menghambat interaksi antara NRF2 dan Keap1 sehingga terjadi stabilisasi NRF2 dan peningkatan ekspresinya (Gurkoff *et al.*, 2013; Lee, 2017). Pada penelitian yang dilakukan oleh Christina pada tahun 2013 mengenai *acute mountain sickness* (AMS) didapatkan hasil bahwa amlodipin dapat meningkatkan NRF2. Penelitian dilakukan dengan menggunakan sel AREc23 yang merupakan, *breast cancer cell line*, yang dipapar dengan ketinggian tinggi dengan menggunakan ruangan hipobarik lalu diberi amlodipin menunjukkan bahwa amlodipin dapat meningkatkan NRF2 sebagai target samping dari aktivasi jalur PI3K/Akt (Lisk *et al.*, 2013). Jalur PI3K/Akt ini merupakan jalur yang mempunyai peran yang penting terhadap regulasi fungsi sel yang sangat fundamental yaitu proliferasi dan angiogenesis. Aktivasi dari jalur Akt ini juga dapat membuat sel menjadi resisten terhadap sinyal apoptosis (Divolis *et al.*, 2016).

Pada uji *independent T test* didapatkan hasil rerata ekspresi NRF2 yang tidak signifikan perbedaannya antara kelompok sel yang diberi amlodipin 5 μ M dan kelompok sel yang tidak diberi amlodipin. Pada uji korelasi walau didapat koefisien korelasi ($r=0,290$) yang positif tetapi nilai p menunjukkan hasil penelitian ini tidak signifikan. Hal ini berarti pemberian amlodipin 5 μ M tidak berefek pada sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM. Hal ini diperkirakan terjadi akibat faktor-faktor lain yang juga dapat berinteraksi dengan NRF2. Salah satunya yang diregulasi oleh Ca^{2+} adalah IQGAP1. IQGAP1 adalah *scaffolding* protein yang berikatan dengan berbagai macam molekul di sel. Dengan berinteraksi dengan target proteinnya protein IQGAP1 pada beberapa fungsi seluler diantaranya penyinyalan Ca^{2+} /calmodulin, arsitektur sel, penyinyalan CDC42 dan rac, dan β -

catenin-mediated transcription (Briggs and Sacks, 2003). Pada penelitian yang dilakukan oleh Kim pada tahun 2013 menyatakan bahwa IQGAP1 dapat berinteraksi dengan NRF2 dan menyebabkan stabilisasi dari NRF2 dan juga dapat meningkatkan translokasi, aktivasi dan ekspresi dari NRF2. Interaksi antara IQGAP1 dengan target-target proteinnya termasuk NRF2 dapat dimodulasi oleh calmodulin dan hubungannya dengan Ca^{2+} . Peningkatan Ca^{2+} intrasel yang dapat menyebabkan perubahan konformasi dari calmodulin dan diikuti oleh ikatannya dengan target proteinnya. Dengan ini dapat disimpulkan bahwa peningkatan Ca^{2+} dapat meningkatkan *calcium binding protein* dengan IQGAP1 dan meningkatkan aktivasi NRF2 yang berikatan dengan IQGAP1 (Kim *et al.*, 2013). Hambatan Ca^{2+} oleh amlodipin dapat menghambat proses diatas sehingga aktivasi dari NRF2 ikut menjadi terhambat.

6.2 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 16. Pada peneliiian ini menggunakan enam 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 dosis 5 μ M terhadap protein Nrf2 pada kultur sel neuron SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 25 mM, dapat disimpulkan :

1. Pemberian amlodipin dosis 5 μ m pada kultur sel neuron SH-SY5Y yang diinduksi hiperglikemi kronis (glukosa 25 mM) belum dapat menunjukkan hubungan yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi protein Nrf2.
2. Tidak terdapat perbedaan ekspresi NRF2 antara kultur sel neuron yang diberi amlodipin 5 μ M dengan yang tidak diberi amlodipin.

7.2 Saran

1. Jumlah sampel untuk penelitian yang lebih adekuat
2. Penelitian lebih lanjut dengan beberapa dosis amlodipin untuk membandingkan dosis yang optimal untuk meningkatkan ekspresi protein NRF2
3. Penelitian lebih lanjut mengenai faktor-faktor lain yang mempengaruhi ekspresi NRF2 seperti, SOD, translokasi NRF2, NF-kb, PI3K/Akt, dan IQGAP1.

Daftar Pustaka

- Active motif. (2014). Active Motif's TransAM® Nrf2 Kit Manual. Carlsbad: Active motif Inc.
- Agholme, L., Lindström, T., Kågedal, K., Marcusson, J. dan 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), pp.1069-1082.
- Akki, R., Siracusa, R., Morabito, R., Remigante, A., Campolo, M., Errami, M., La Spada, G., Cuzzocrea, S. dan Marino, A. (2018). Neuronal-like differentiated SH-SY5Y cells adaptation to a mild and transient H₂O₂-induced oxidative stress. *Cell Biochemistry and Function*, 36(2), pp.56-64.
- Briggs, M. dan Sacks, D. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO reports*, 4(6), pp.571-574.
- Divolis, G., Mavroeidi, P., Mavrofrydi, O. dan Papazafiri, P. (2016). Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways. *Cell Biology and Toxicology*, 32(5), pp.437-449.
- Edwards, J., Vincent, A., Cheng, H. dan Feldman, E. (2008). Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(1), pp.1-34.
- Fares, H., DiNicolantonio, J., O'Keefe, JH., *et al.* (2016). Amlodipine in hypertension: a first line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcome. *Open Heart*, 3,.
- Fernyhough, P. dan Calcutt, N. (2010). Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium*, 47(2), pp.130-139.
- Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B. dan Berman, R. (2013). Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. *Pharmaceuticals*, 6(7), pp.788-812.

- Kementrian Kesehatan RI (2014) 'InfoDATIN: Situasi dan Analisi Diabetes', pp. 1–2. doi: 24427659.
- Kim, J., Xu, E., Sacks, D., Lee, J., Shu, L., Xia, B. dan Kong, A. (2013). Identification and Functional Studies of a New Nrf2 Partner IQGAP1: A Critical Role in the Stability and Transactivation of Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), pp.89-101.
- Kopecky, B., Liang, R. dan Bao, J. (2014). T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 466(4), pp.757-765.
- Kovalevich, J. dan Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Neuronal Cell Culture*, pp.9-21.
- Kumar, A. dan Mittal, R. (2017). Nrf2: a potential therapeutic target for diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*, 25(4), pp.393-402.
- Lee, D., Park, J., Lee, Y., Sung, S., Lee, Y. dan Bae, S. (2017). The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity. *BMB Reports*, 50(2), pp.91-96.
- Lilienbaum, A. and Israel, A. (2003). From Calcium to NF- B Signaling Pathways in Neurons. *Molecular and Cellular Biology*, 23(8), pp.2680-2698.
- Liu, X. S. (2013). Comparing sample size requirements for significance tests and confidence intervals. *Counseling Outcome Research and Evaluation*, 4(1), 3-12.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401-426.
- Negi, G., Kumar, A., Joshi, R. P., dan Sharma, S. S. (2011). Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle. *Biochemical and biophysical research communications*, 408(1), 1-5.

- Nguyen, T., Nioi, P., dan Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13291-13295.
- Pickett, K. A. (2016). Microvascular complications of diabetes: what's relevant for practice?. *The Journal for Nurse Practitioners*, 12(10), 683-689.
- Pop-Busui, R. *et al.* (2017). Diabetic neuropathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 40(1), 136-154.
- Rochette, L. *et al.* (2014). Biochimica et Biophysica Acta Diabetes , oxidative stress and therapeutic strategies., *BBA - General Subjects*. Elsevier B.V., 1840(9), pp. 2709–2729. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.017.
- Shi, H., dan Liu, K. J. (2006). Effects of glucose concentration on redox status in rat primary cortical neurons under hypoxia. *Neuroscience letters*, 410(1), 57-61.
- Shin, S. dan Chung, S. (2016). [PS 01-09] T-type calcium channel blocker attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis via activation of the NRF2 antioxidant pathway. *Journal of Hypertension*, 34, p.e99.
- Shiple, M. M., Mangold, C. A., dan Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (108), e53193.
- Singh, R., Kishore, L., dan Kaur, N. (2014). Diabetic peripheral neuropathy: current perspective and future directions. *Pharmacological research*, 80, 21-35.
- Soelistyo, A. S., *et al.* (2015). Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan diabetes melitus Tipe 2 di Indonesia 2015. 1st ed. Jakarta: PB Perkeni.
- Van Tittelboom, K., Snoeck, D., Gruyaert, E., Debbaut, B., De Belie, N., Wang, J., dan De Araújo, A. (2015, September). Real-scale testing of the efficiency of self-healing concrete. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting IV: Proceedings of the 4th International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting (ICCRRR-4), 5-7 October 2015, Leipzig, Germany* (p. 443). CRC Press.

Verkhatsky, A., dan Fernyhough, P. (2014). Calcium signalling in sensory neurones and peripheral glia in the context of diabetic neuropathies. *Cell Calcium*, 56(5), 362-371.

Yamagata, K., Ichinose, S., & Tagami, M. (2004). Amlodipine and carvedilol prevent cytotoxicity in cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*, 27(4), 271-282



Lampiran

Lampiran 1 : Uji Normalitas

Tests of Normality							
Kelompok		Kolmogorov-Smirnova			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NRF2	Kelompok	0,190	6	.200*	0,924	6	0,536
	Kontrol						
NRF2	Kelompok	0,271	6	0,190	0,843	6	0,138
	Perlakuan						

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 2 : Hasil Uji Independent T test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
NRF2	Equal variances assumed	3.908	0.076	-1.037	10	0.324	-0.82383	0.79478	-2.59471	0.94704
	Equal variances not assumed			-1.037	8.104	0.330	-0.82383	0.79478	-2.65252	1.00485

Lampiran 3 : Analisis Korelasi

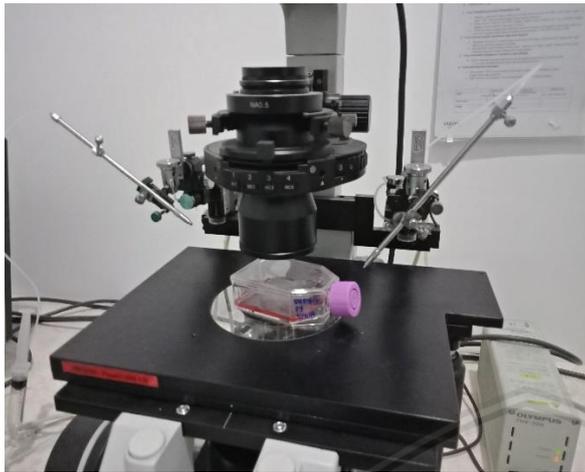
Correlations

		NRF2	Kelompok
Spearman's rho	NRF2	1.000	0.290
			0.361
	N	12	12
Kelompok	NRF2	0.290	1.000
		0.361	
	N	12	12

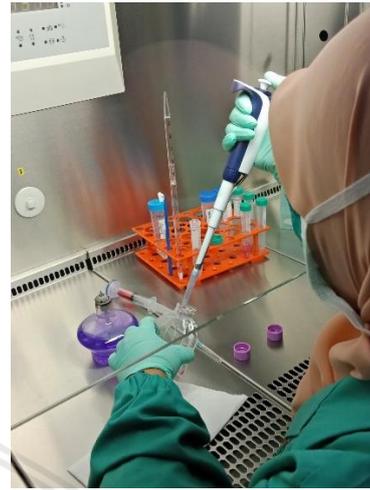
Lampiran 4 : Dokumentasi Penelitian



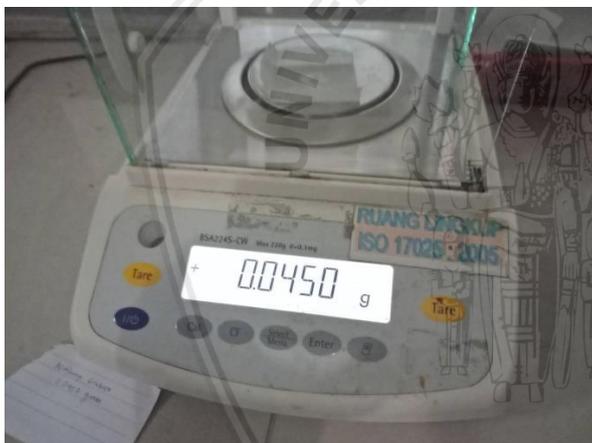
Inkubator tempat kerja melakukan kultur sel



Mikroskop untuk pengamatan hasil kultur sel



Proses Pasase sel



Proses penghitungan glukosa yang digunakan



Proses perlakuan amlodipin



Proses pembuatan cover slips