

**PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN DOSIS TINGGI TERHADAP PROTEIN
Nrf2 PADA KULTUR SEL SH-SY5Y YANG DI INDUKSI GLUKOSA 50 mM**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Afrizal Alif Azzam Muhyiddin

NIM 155070107111019

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

Daftar Isi

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah.....	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 Hiperglikemi Kronis 2.1.1 Pengertian.....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Diabetik Neuropati.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Hubungan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) dengan Ion Ca^{2+}	Error! Bookmark not defined.
2.4 Hubungan Ion Ca^{2+} dengan protein NfκB	Error! Bookmark not defined.
2.5 Protein Nrf2.....	Error! Bookmark not defined.
2.6 Pengukuran Kadar Protein Nrf2.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 3 KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS	Error! Bookmark not defined.
3.2 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Deskripsi kerangka konsep :	Error! Bookmark not defined.
3.3. Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	Error! Bookmark not defined.

4.1 Desain Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2 Besaran Pengulangan.....	Error! Bookmark not defined.
4.3 Variabel Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.5 Penghitungan efek dosis amlodipin	Error! Bookmark not defined.
4.6 Prosedur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.7 Interpretasi Ekspresi Protein Nrf2 dengan CLSM..	Error! Bookmark not defined.
4.8 Definisi Istilah / Operasional	Error! Bookmark not defined.
4.9 Alur Kerangka Kerja Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
4.10 Analisa Data.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 5 ANALISIS DATA.....	Error! Bookmark not defined.
5.1 Hasil Penelitian	Error! Bookmark not defined.
5.2 Analisis Data	Error! Bookmark not defined.
5.2.1 Statistik Deskriptif.....	Error! Bookmark not defined.
Tabel 5.1 Hasil Uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i> dan <i>Shapiro-Wilk</i>	Error! Bookmark not defined.
5.2.2 Uji Normalitas Data.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.3 Hasil analisis pengaruh amlodipin (5 µM) terhadap ekspresi Nrf2 pada Hiperglikemia 50 mM	Error! Bookmark not defined.
5.2.4 Hasil analisis korelasi antara pemberian amlodipin (5 µM) dan tanpa amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2.....	Error! Bookmark not defined.
5.2.5 Penghitungan efek dosis dengan rumus <i>d-type effect size</i>	Error! Bookmark not defined.
5.2.6 Ringkasan analisis data komparatif	Error! Bookmark not defined.
BAB 6 PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN	Error! Bookmark not defined.
6.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Protein Nrf2	Error! Bookmark not defined.
6.1.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Protein Nrf2 pada Kondisi Hiperglikemi (induksi 50 mM glukosa)	Error! Bookmark not defined.
6.2 Hubungan Ion Ca ²⁺ dengan Protein Nrf2	Error! Bookmark not defined.

6.3 Hubungan Pemberian Amlodipin 5 μ M dengan Tanpa diberikan Amlodipin.....	37
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	38
BAB 7 PENUTUP	Error! Bookmark not defined.
7.1 Kesimpulan	Error! Bookmark not defined.
7.2 Saran.....	Error! Bookmark not defined.
Daftar Pustaka.....	Error! Bookmark not defined.



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN DOSIS TINGGI TERHADAP PROTEIN
Nrf2 PADA KULTUR SEL SH-SY5Y YANG DI INDUKSI GLUKOSA 50 mM

Oleh :

Afrizal Alif Azzam Muhyiddin

155070107111019

Telah diuji pada :

Hari : Selasa

Tanggal : 2 April 2019

Dan telah dinyatakan lulus oleh :

Penguji 1



Wike Astrid Cahayani, S.Ked, M. Biomed
NIK. 2016078912052001

Pembimbing I/Penguji II



dr. Dessika Rahmawati, M.Biomed, Sp.S
NIP. 2016090212112001

Pembimbing II/Penguji III



dr. Indriati Dwi Rahayu, M. Kes
NIK. 197805192005012001

Mengetahui,
Ketua Program Bidang Studi Pendidikan Dokter



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



ABSTRAK

Muhyiddin, Afrizal Alif Azzam, 2019. **Pengaruh Pemberian Amlodipin Dosis Tinggi Terhadap Protein Nrf2 Pada Kultur Sel SH-SY5Y yang Di Induksi Glukosa 50 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 adalah suatu kondisi dimana kadar glukosa di dalam darah > 200 mg/dL. Pada sel kultur dikatakan hiperglikemi apabila pemberian glukosa dalam rentang dosis antara 25 mM – 100 mM. Akibat dari kondisi hiperglikemi di dalam kultur sel SH-SY5Y adalah peningkatan ion Ca^{2+} sitosol yang disebabkan oleh disfungsi/kerusakan pada mitokondria. Akumulasi dari ion Ca^{2+} menyebabkan meningkatnya stress oksidatif terutama ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang akan merusak sel saraf perifer di ikuti dengan mekanisme pertahanan tubuh dengan ekspresi protein Nrf2 sebagai mekanisme perlindungan terhadap ROS. Peneliti ingin mengetahui mengenai peran penurunan ion Ca^{2+} dengan menggunakan amlodipin terhadap protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y. Penelitian ini menggunakan pendekatan uji *independent sample t-test* dan uji korelasi *Pearson*. Pemberian amlodipin dengan dosis 5 μM merupakan variabel independen dan pengukuran protein Nrf2 adalah variabel dependen. Berdasarkan hasil uji komparasi dan uji korelasi antara pemberian amlodipin 5 μM dan tanpa amlodipin terhadap protein Nrf2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang di induksi glukosa dengan konsentrasi 50 mM selama 6 hari adalah $p > 464$ dan nilai koefisien korelasi sebesar 0,223. Dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh yang bermakna dan tidak terdapat hubungan pada pemberian amlodipin 5 μM terhadap protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang di induksi glukosa 50 mM. Perlunya dilakukan penelitian ulang dosis amlodipin secara *in vivo* pada hewan coba, pengkajian lebih lanjut mekanisme peningkatan aktivasi jalur lain yang mampu menurunkan aktivasi protein Nrf2 secara baik *in vivo* maupun *in vitro*, dan penelitian kembali dengan menambah jumlah sampel pada penelitian.

Kata Kunci: Protein Nrf2, amlodipin, hiperglikemi, Kultur SH-SY5Y

ABSTRACT

Muhyiddin, Afrizal Alif Azzam, 2019. **Effect of High Dose Amlodipine to Nrf2 Protein on SH-SY5Y Cell Culture That Induce with Glucose 50 mM.**
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.

Hyperglycemia is a condition in which the glucose levels in the blood > 200 mg/dL. In cell culture is said to be hyperglycemia when administering glucose range in dose between 25 mM – 100 mM. The result of the condition of the hyperglycemia in SH-SY5Y cell culture is increase of Ca^{2+} ion cytosol caused by dysfunction of mitochondria. The accumulation of Ca^{2+} ions lead to increased oxidative stress especially ROS (Reactive Oxygen Species) that will be damaging to the peripheral nerve cells in the body's defense mechanisms follow with the expression of the Nrf2 protein as protection mechanisms against ROS. This research wanted to find out about the role of a decrease in Ca^{2+} ions using amlodipine against Nrf2 protein on SH-SY5Y cell culture. This research use approach to test the independent sample t-test and Pearson correlation test. Amlodipine with doses of 5 μM is the independent variable and expression of Nrf2 protein is the dependent variable. Based on comparisons of test results and test the correlation between amlodipine 5 μM and without, expression protein Nrf2 on SH-SY5Y cell culture that induction with glucose concentration of 50 mM for 6 days is $p > 0.464$ and the correlation coefficient value is 0.223. It can be concluded that there is no meaningful influence and there is no relationship in administering amlodipine 5 μM against the expression of Nrf2 protein on SH-SY5Y cell culture that induction with 50 mM glucose. The need for repeated dose studies amlodipine in *in vivo*, further studies on the mechanism of increasing the activation of another line that is capable of lowering the Nrf2 protein activation in either *in vivo* or *in vitro*, and research again with increase the number of samples in the study.

Keyword: Nrf2 protein, amlodipine, hyperglycemia, SH-SY5Y cell culture

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes mellitus adalah penyakit metabolik kronik yang ditandai dengan adanya hiperglikemia kronis yang diikuti dengan ketidakseimbangan pada metabolisme protein, lemak, maupun karbohidrat. Salah satu etiologi dari diabetes mellitus dapat diakibatkan karena kurangnya sekresi dari hormon insulin atau respon insulin yang tidak efektif atau dari keduanya (Baynest, 2018). Diabetes mellitus sebagai salah satu dari penyakit tidak menular (PTM) memiliki prevalensi yang tinggi di Indonesia. Prevalensi diabetes mellitus di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter dan gejala yang dialami pasien mencapai 6,9% atau sekitar 12 juta orang melalui responden masyarakat Indonesia diatas 15 tahun (Riskesmas, 2018). Diabetes mellitus tidak terkontrol menyebabkan bertambahnya 2,2 juta kematian akibat faktor risiko kardiovaskuler dan penyakit lainnya. Prevalensi kematian akibat diabetes mellitus sebesar 43% dari 3,7 juta kematian terjadi pada usia kurang dari 70 tahun (*World Health Organization*, 2016).

Diabetes mellitus menyebabkan komplikasi baik makrovaskuler maupun mikrovaskuler. Secara mikrovaskuler komplikasi dari hiperglikemi kronis yang dapat terjadi yakni : diabetik retinopati pada mata, diabetik nefropati pada ginjal, dan diabetik neuropati pada saraf. Komplikasi yang dapat terjadi secara makrovaskuler yakni : jantung koroner, stroke, penyakit pembuluh darah arteri tepi (Fowler, 2008). Komplikasi yang sering terjadi yakni diabetik neuropati dapat disebabkan akibat beberapa faktor diantaranya : hiperglikemia yang diikuti dengan

sindrom metabolik, adanya akumulasi sorbitol, stres oksidatif, dan aktivasi 12/15 – *lipoxygenase* dan beberapa faktor lainnya yang mengindikasikan hubungan antara diabetes dengan neuropati perifer. Dampak dari diabetik neuropati dari sisi kualitas hidup adalah masalah gangguan emosi, gangguan fisik, gangguan kesehatan mental, gangguan fungsi sosial, gangguan fungsi fisik, dan gangguan nyeri pada tubuh (Wacana dan Indonesia, 2017).

Salah satu penyebab terjadinya diabetik neuropati adalah terjadinya abnormal homeostasis dari ion kalsium (Ca^{2+}) akibat proses hiperglikemi yang kronis dan tidak terobati. Mekanisme terjadinya neuropati pada kondisi ini adalah terjadinya 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 secara *steady state* konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler, peningkatan secara teratur aliran Ca^{2+} , dan penurunan amplitudo sinyal induksi depolarisasi ion Ca^{2+} (Alexei & Paul, 2014). Peningkatan dari ion Ca^{2+} yang tidak terkontrol dan akibat terjadinya *ER stress* dan disfungsi mitokondria mengakibatkan meningkatnya stres oksidatif di dalam sel. Hal ini akan mengakibatkan aktivasi dari protein Nrf2 melalui jalur Nrf2-ARE-SOD untuk menurunkan stres oksidatif di dalam sel (Motohashi and Yamamoto, 2004). Pada kondisi hiperglikemi akut akan terjadi peningkatan ekspresi protein Nrf2 untuk mengurangi kondisi stres oksidatif di dalam sel. Namun pada kondisi hiperglikemi kronis terjadi penurunan ekspresi protein Nrf2 akibat adanya aktivasi dari jalur Nf κ B, PKC, MAPK, dan aktivitas GSK-3 (Kumar dan Mittal, 2017).

Pada penelitian sebelumnya di dapatkan pemberian amlodipin dengan dosis 4 dan 10 mg/kg pada tikus yang di induksi dengan peningkatan radikal bebas

(ROS) melalui model *acute mountain sickness* mampu meningkatkan ekspresi protein Nrf2 dalam kultur sel mikrovaskuler endotel otak (Schroeder, Hamilton and Irwin, 2014). Dalam hal ini peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM. Sehingga dapat dijadikan landasan ilmu pengetahuan terhadap peran amlodipin terhadap aktivasi protein Nrf2 pada kondisi hiperglikemi kronis.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian amlodipin dosis 5 μ M memberikan efek terhadap ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM?
2. Apakah terdapat hubungan antara pemberian amlodipin dosis 5 μ M dengan tanpa pemberian amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

1. Mengetahui efek pemberian amlodipin terhadap kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 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 50 mM
2. Mengetahui hubungan antara kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μ M dan tanpa pemberian amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Akademis

Penelitian ini dapat menjadi 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 menjadi landasan teori agar dapat dilakukan penelitian lebih lanjut secara in vivo terhadap hewan coba.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperglikemi Kronis

2.1.1 Pengertian

Hiperglikemi adalah suatu keadaan di mana kadar glukosa di dalam darah > 200 mg/dL ((Fernandes *et al.*, 2013). Pemberian glukosa dengan dosis 5 mM selama 6 hari merupakan dalam rentang dosis fisiologis bagi sel kultur (Green *et al.*, 2012). Pada kultur sel pemberian glukosa dalam dosis 25 mM merupakan pemberian yang optimal karena menunjukkan kematian sel dan kadar ROS yang rendah. Pada kultur sel dapat dikatakan hiperglikemi apabila pemberian induksi glukosa dalam rentang dosis 25 mM – 100 mM karena dapat meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), mengakibatkan lingkungan mudah teroksidasi, dan peningkatan kematian sel (Shi dan Liu, 2007).

2.1.2 Patofisiologi

Terjadinya hiperglikemi di dalam sel dapat menyebabkan terjadinya peningkatan prekursor dari ROS sehingga menyebabkan peningkatan stres oksidatif (Yan, 2014). Peningkatan ROS akan merusak sel membran dan bagian-bagian sel yang lain. Hiperglikemi menginduksi glikasi protein yang menyebabkan fungsi abnormal dan aktivasi reseptor *Glycation End Product* (RAGE) yang meningkatkan stres seluler (Yan *et al.*, 2007). Proses ini akan mengakibatkan terjadinya kerusakan sel kultur melalui proses degenerasi akson, *paranodal demyelinisasi*, dan hilangnya serabut mielin dan yang tidak bermielin melalui proses apoptosis dari sel (Ferryhough dan Calcutt, 2010).

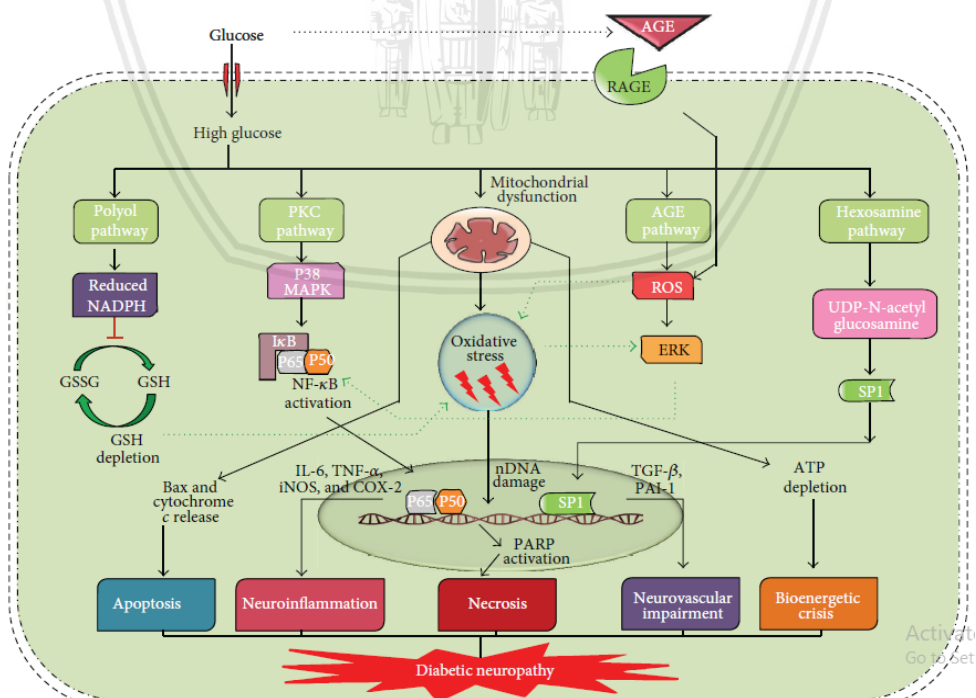
2.1.3 Komplikasi

Hiperglikemi kronis yang tidak tertangani dengan baik dapat mengakibatkan terjadinya komplikasi baik secara mikrovaskuler dan makrovaskuler. Secara mikrovaskuler komplikasi dari hiperglikemi kronis yang dapat terjadi yakni : diabetik retinopati, diabetik nefropati, dan diabetik neuropati. Komplikasi yang dapat terjadi secara makrovaskuler yakni : penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit pembuluh darah arteri tepi (Fowler, 2008).

2.2 Diabetik Neuropati

2.2.1 Pengertian

Diabetik neuropati merupakan penyakit yang disebabkan oleh berbagai faktor pencetus yakni : hiperglikemi yang persisten, insufisiensi mikrovaskuler, stres oksidatif dan stres nitrosatif, dan *autoimmune mediated nerve destruction*.



Gambar 2.1 Patofisiologi Diabetik Neuropati (Sandireddy et al., 2014)

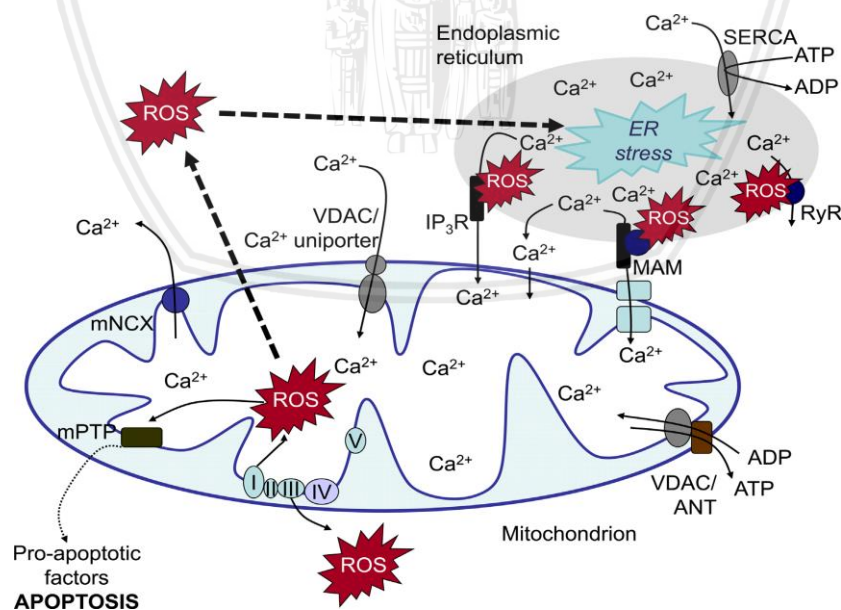
Pada komplikasi dini diabetik neuropati didapatkan gejala : *large fibre neuropathy*, *small fibre neuropathy*, *acute mono neuropathy*, dan *pressure palsies*. Pengobatan yang saat ini dapat diberikan pada pasien dengan komplikasi diabetik neuropati adalah dengan cara : *Intravenous immunoglobulin*, pertukaran plasma untuk *monoclonal gammopathy*, steroid dan azathioprine untuk vaskulitis, dan dihindarkan dari pemakaian obat-obatan yang dapat menyebabkan terjadinya vaskulitis (Vinik *et al.*,2013).

2.2.2 Patofisiologi

Diabetik neuropati dapat terjadi akibat adanya suatu faktor risiko yakni: hiperglikemik yang kronis, dislipidemia, dan resistensi insulin. Akumulasi sorbitol, stres oksidatif, dan aktivasi 12/15-*lipooxygenase* pada saat hiperglikemi yang kronis dapat menjadi indikasi hubungan antara diabetes dengan neuropati perifer. Pada saat terjadi diabetes mellitus terjadi modifikasi (*oxidized* dan *glycated*) dari protein insulin yang berikatan dengan tambahan reseptor. Reseptor yang termasuk di sini adalah transporter yang mentransport glukosa dan lipid ke dalam sel sehingga terjadi akumulasi dari glukosa dan lipid secara intraseluler yang mengakibatkan gangguan pada proses metabolisme dari mitokondria. Modifikasi dari protein reseptor dapat mengakibatkan inisiasi yang berlebihan pada mekanisme persinyalan proses inflammasi yang dapat mengakibatkan meningkatnya ekspresi dan aktivitas oksidatif dan nitrosatif enzim yang produk akhir dari proses ini adalah kerusakan pada saraf tepi (Singh, Kishore dan Kaur, 2013).

2.3 Hubungan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan Ion Ca^{2+}

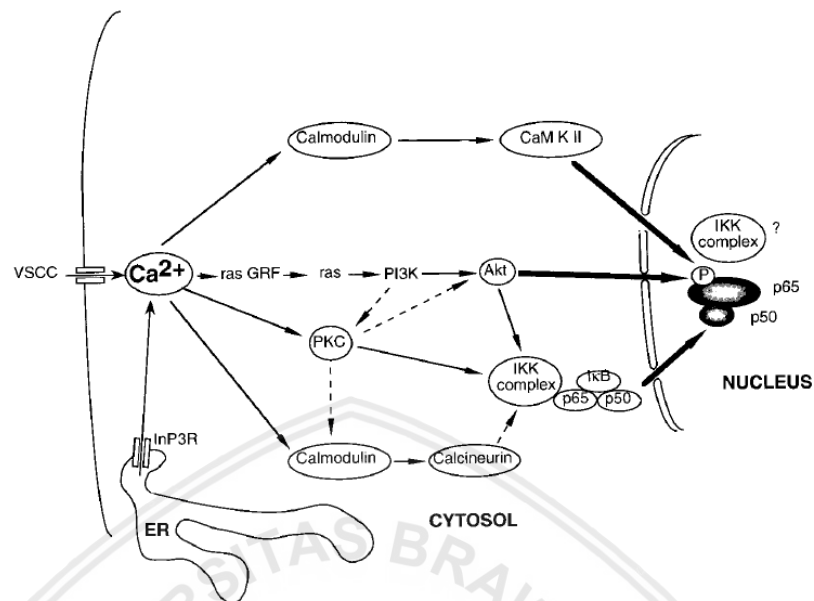
Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan suatu produk dari proses respirasi dan memiliki peranan yang utama di dalam homeostasis, sinyal sel, dan memiliki kemampuan anti-mikroorganisme, dan meningkat drastis apabila sel terpapar oleh lingkungan yang *stress* (Wang *et al.*, 2018). Jenis-jenis dari ROS adalah Superoksida anion, hidrogen peroksida, nitrit oksida, dan peroksinitrit yang berperan di dalam kondisi stress oksidatif suatu sel dan memiliki peranan penting di dalam proses biologis pada kondisi stres oksidatif yang rendah (Hsieh and Yang, 2013). Dalam konsepnya peningkatan ROS akan memengaruhi kadar ion Ca^{2+} sitosol melalui kerusakan pada transporter ion Ca^{2+} yang terdapat pada retikulum endoplasma dan mitokondria sehingga mengganggu homeostasis ion Ca^{2+} dan akan meningkatkan kondisi stres oksidatif di dalam sel sehingga akan meningkatkan proses kematian sel (Ambudkar *et al.*, 2018).



Gambar 2.2 Interaksi antara Ion Ca^{2+} dengan ROS di dalam terjadinya peningkatan stress oksidatif di dalam patofisiologi terjadinya apoptosis (Görlach *et al.*, 2015)

2.4 Hubungan Ion Ca^{2+} dengan protein Nf κ B

Selama kondisi hiperglikemi kronis terjadi peningkatan ion Ca^{2+} intraseluler akibat tingginya akumulasi radikal bebas (ROS) di dalam sel yang akan menyebabkan disfungsi mitokondria dan gangguan penyimpanan ion Ca^{2+} akibat terbatasnya jumlah *ATP dependent transport* (Alexei & Ferryhough, 2014). Dengan meningkatnya ion Ca^{2+} intraseluler 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 κ B (Lilienbaum and Israe, 2003). Akibat dari stimulasi yang terus menerus akan menyebabkan ekspresi yang berlebihan protein Nf κ B sehingga terjadi peningkatan aktivasi dari protein Nf κ B. Protein Nf κ B menyebabkan aktivasi proses inflammasi jalur *classical pathway* melalui perantara mediator-mediator pro-inflammasi seperti : IL-6, TNF- α , iNOS, dan COX-2 (Minhaj *et al.*, 2017). Sehingga peningkatan aktivasi dari protein Nf κ B akan mensupresi kerja dari protein Nrf2 yang berfungsi sebagai penangkap radikal bebas dan mengurangi stress oksidatif (Bellezza *et al.*, 2018). Hal ini menyebabkan terjadinya proses kerusakan dari sel neuron akibat proses inflamasi yang berlangsung terus menerus.

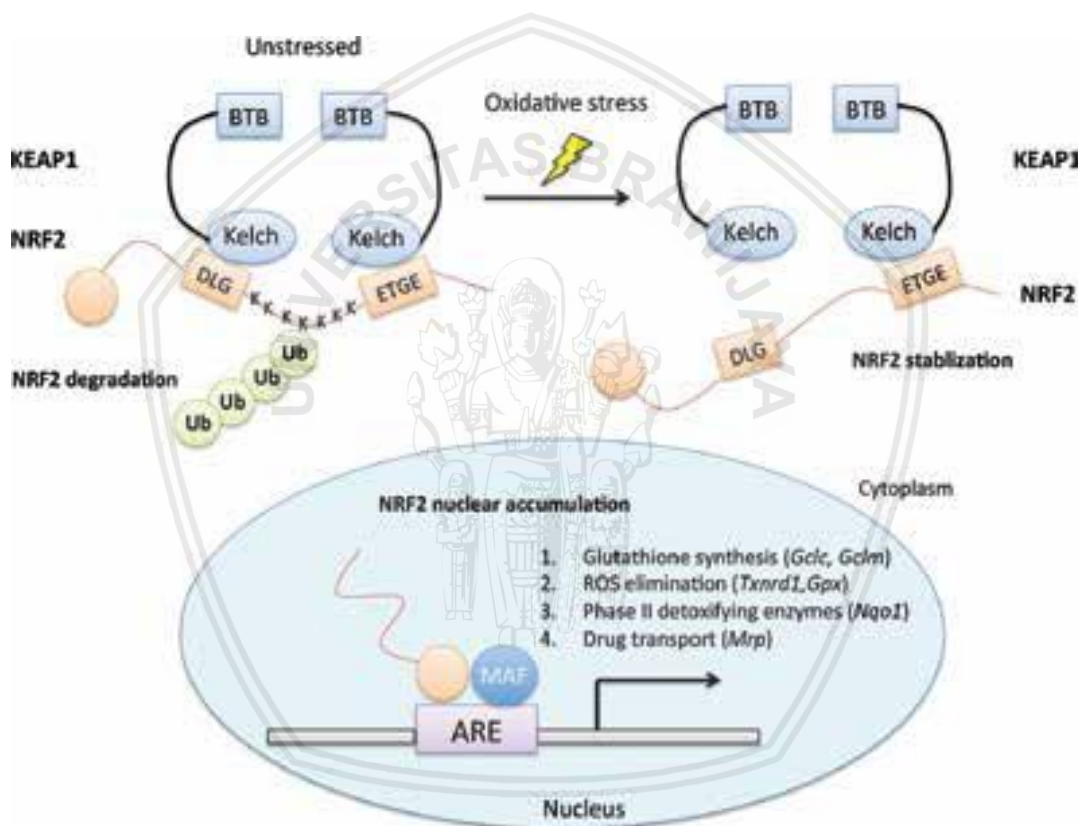


Gambar 2.3 Peran ion Ca^{2+} di dalam aktivasi protein Nf κ B (Lilienbaum and Israe, 2003)

2.5 Protein Nrf2

Secara struktur Nrf2 adalah suatu protein yang terbentuk dari 605 asam amino dan memiliki 7 unit fungsional. Nrf2 adalah suatu protein faktor transkripsi dan merupakan anggota dari Cap 'n' Collar (CNC) golongan protein regulator. Nrf2 berfungsi untuk melindungi sel dari proses apoptosis melalui mekanisme peningkatan ekspresi dari protein antioksidan akibat stress oksidatif yang meningkat di dalam tubuh (Jiménez-osorio, González-reyes, dan Pedraza-chaverri, 2015). Protein Nrf2 teraktivasi melalui jalur Keap1-Nrf2-ARE pada saat adanya suatu variasi dari stress seluler (stress oksidatif, *ER stress*, dan *shear stress*) dan induksi kimia baik yang bersumber dari endogen (Reaktif oksigen dan nitrogen Spesies) maupun sumber eksogen. Protein faktor transkripsi Nrf2 pada kondisi non stress, memiliki konsentrasi yang rendah di dalam sel dan protein ini tertahan di dalam sitoplasma dan berikatan dengan keap 1. Pada saat terjadinya peningkatan stress oksidatif di dalam tubuh, terjadi suatu reaksi kompleks yang

menyebabkan terjadinya stabilisasi dari Nrf2 dan mengalami translokasi pada nukleus suatu sel. Di dalam nukleus, Nrf2 meng-upregulasi ekspresi beberapa gen yang terlibat di dalam respon antioksidan, yang dimana pada daerah promotor DNA terdapat *Antioxidant Response Element* (ARE). Hasil dari jalur ini adalah regulasi ekspresi enzim antioksidatif dan *electrophile conjugating* enzim (Lin et al., 2016).



Gambar 2.4 Proses aktivasi Nrf2 di dalam peningkatan stress oksidatif akibat ion Ca^{2+} (Lin et al., 2016).

2.6 Pengukuran Kadar Protein Nrf2

Pengukuran kadar 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-IgG HRP (*Horseradish Peroxidase*), maka antibodi akan yang langsung bereaksi terhadap protein Nrf2 dan lebih sensitif untuk dibaca pada spektrofotometri (Motif, 2014). Kemudian pengukuran jumlah kadar 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)

2.7 Peran Neuroprotektif Amlodipin Terhadap Sel Neuron

Pada penelitian pencegahan apoptosis sel neuron kortikal yang dipapar oleh kadar oksidatif stress yang tinggi, pemberian amlodipin camsylate (AC) dan amlodipin besylate (BC) terbukti memiliki sifat neuroprotektif. Hal ini dibuktikan dengan pemberian amlodipin camsylate dan amlodipin besylate dosis 100 nm - 1 μ M mampu menurunkan jumlah sel neuron kortikal yang mengalami apoptosis melalui inhibisi pembentukan radikal bebas (Lee *et al.*, 2011). Penelitian pada pemberian vitamin E dengan dosis 100 μ g/mL dan amlodipin dengan dosis 5 μ mol/L pada sel SHSRP terbukti secara poten mampu menurunkan angka apoptosis sel hingga 10%. 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 Amlodipin

Amlodipin merupakan obat jenis Calcium Channel Blocker (CCB)/ calcium antagonist yang sering digunakan di dalam pengobatan penyakit kardiovaskuler. Obat ini merupakan golongan turunan dehidrophyridine (Fares *et al.*, 2016). Mekanisme kerja amlodipin pada sel saraf adalah dengan berikatan dengan reseptor LTCC (L-Type Calcium Channel). Amlodipin bekerja sebagai blocker pada reseptor LTCC (L-Type Calcium Channel) sehingga mengurangi influx Ca^{2+} intraseluler (Bhardwaj *et al*, 2015). 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 *et al.*, 2011). 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). 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).

2.9 Neuron SH-SY5Y

Banyak area pada bidang *neuroscience* terhambat dengan terbatasnya pilihan model *in vitro* yang menyerupai sel neuron dewasa yang mengekspresikan protein manusia (Marcusson, Hallbeck, dan Agholme, 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 *cell line* yang diubah menjadi seperti sel neuron. Sel SH-SY5Y Merupakan salah satu yang paling populer (Kovalevich dan Langford, 2016). Sel SH-SY5Y merupakan subklone dari *cell line* neuroblastoma *parental* SK-N-SH yang pertama kali dihasilkan dari biopsi sum-sum tulang yang mengandung sel seperti neuroblast dan sel epitelial (Shipley, Mangold and Szpara, 2017). Kedua sel ini berasal dari sel jaringan human metastatic neuroblastoma (Biedler, Helson and Spengler, 1973) . SK-N-SH di subklone 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 terdiferensiasi 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, dan Szpara, 2017). Diferensiasi sel SH-SY5Y dapat dilihat dari karakteristik marker neuron yang dihasilkan (Kovalevich dan Langford, 2016). Ketika terdiferensiasi penuh maka sel SH-SY5Y akan mengekspresikan berbagai macam marker neuron yang

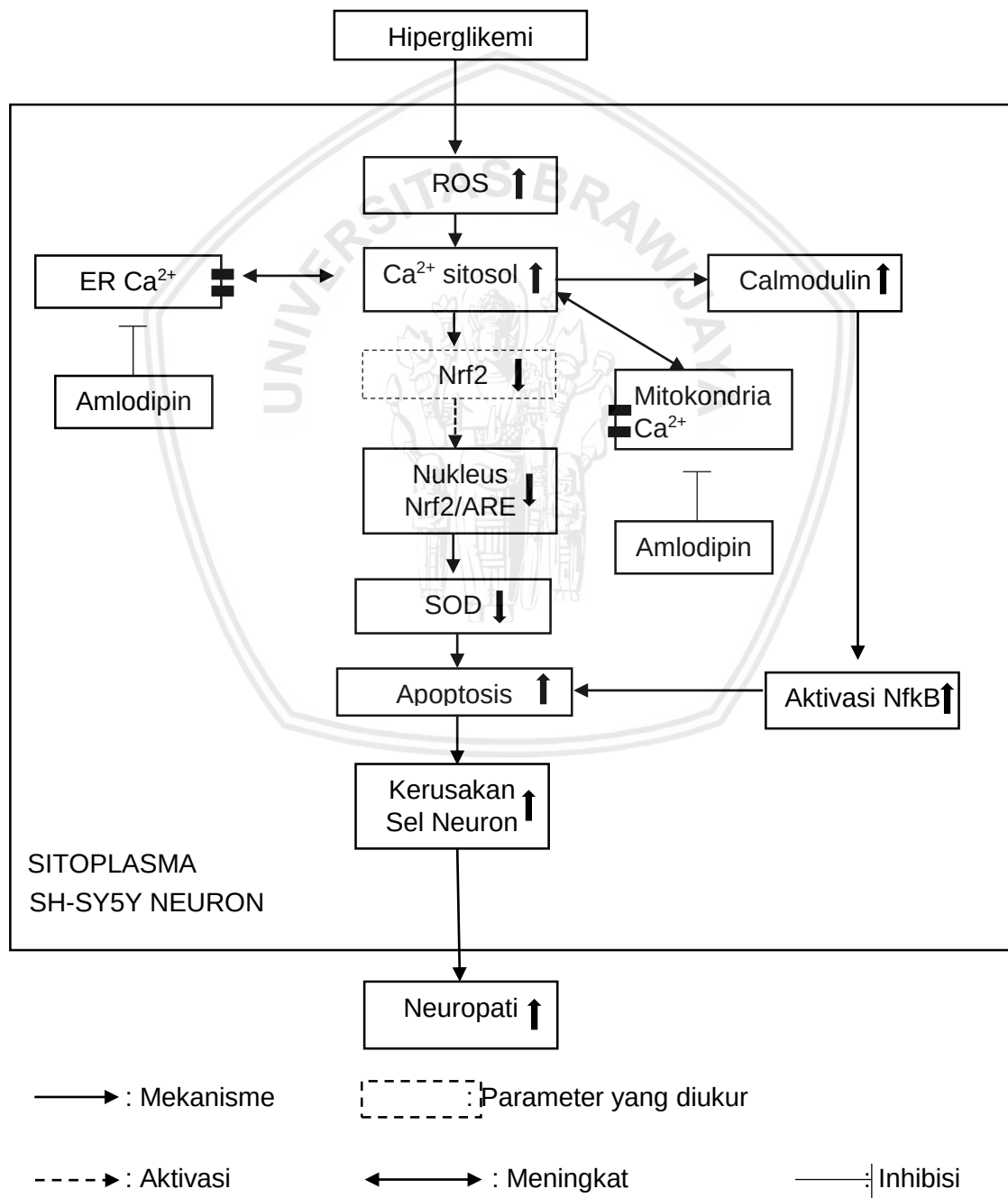
juga diekspresikan oleh sel neuron dewasa seperti, *growth-associated protein* (GAP-43), *neuronal nuclei* (NeuN), *synaptophysin* (SYN), *synaptic vesicle protein II* (SV2), *neuron specific enolase* (NSE) and *microtubule associated protein* (MAP), dan juga akan berkurangnya ekspresi dari marker glial 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, dan Szpara, 2017).



BAB 3

KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS

3.2 Kerangka Konsep



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. Sehingga ion Ca^{2+} yang tinggi di dalam ekstraseluler dibandingkan di dalam intraseluler mengakibatkan Ca^{2+} dalam keadaan *steady state* sehingga banyak ion Ca^{2+} ekstraseluler yang masuk ke intraseluler. 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 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 κ B 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

NfκB 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 meningkatkan kadar protein Nrf2 pada sel kultur neuron SH-SY5Y.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (true experimental design) *post-test controlled group* di laboratorium secara in vitro pada kultur sel SH-SY5Y.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Sampel pada 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 per lapang pandang dalam kultur dish di dapatkan 1×10^4 sel SH-SY5Y.
2. Kriteria eksklusi : kultur sel tidak dalam kondisi konfluen dan per lapang 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 kelompok perlakuan sebanyak 2 seperti yang telah dijelaskan diatas sehingga berdasarkan perhitungan menggunakan rumus tersebut maka akan diperoleh sampel sebanyak 16.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 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 50 mM.

4.3.2 Variabel Tergantung

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

4.4 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 selama 1 bulan yakni tanggal 21 Februari 2019 hingga 21 Maret 2019.

4.5 Penghitungan efek dosis amlodipin

Penentuan pengaruh efek dosis amlodipin pada kelompok glukosa 5 mM, 25 mM, dan 50 mM dengan menggunakan rumus *d type effect size* yakni :

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

Dimana M_1 adalah rata-rata pada kelompok 1 dan M_2 adalah rata-rata pada kelompok 2. Sedangkan SD_{pooled} di dapatkan dari :

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

4.6 Prosedur Penelitian

Kultur *Cell Line* SH-SY5Y

A. Peralatan dan Bahan Kultur Sel

1. Formula 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 (Trypsin 0,25%), dan media kultur.
3. Sub kultur 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-steptomisin 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 μm .

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 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 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, supernatan 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 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 5 mM, 10 mM, 15 mM, dan 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 5 μ M

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 5 μ M.
2. Bahan kimia yang berfungsi sebagai amlodipin dilarutkan dengan ddH₂O untuk membuat larutan *stock*, kemudian ditambahkan pada medium kultur hingga di dapatkan konsentrasi akhir pada medium kultur yaitu 20 μ 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 5 μ M
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

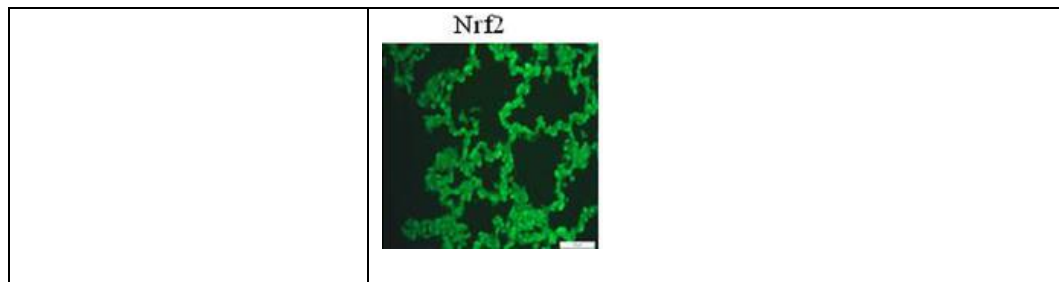
4.7 Interpretasi Ekspresi Protein Nrf2 dengan CLSM

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*.

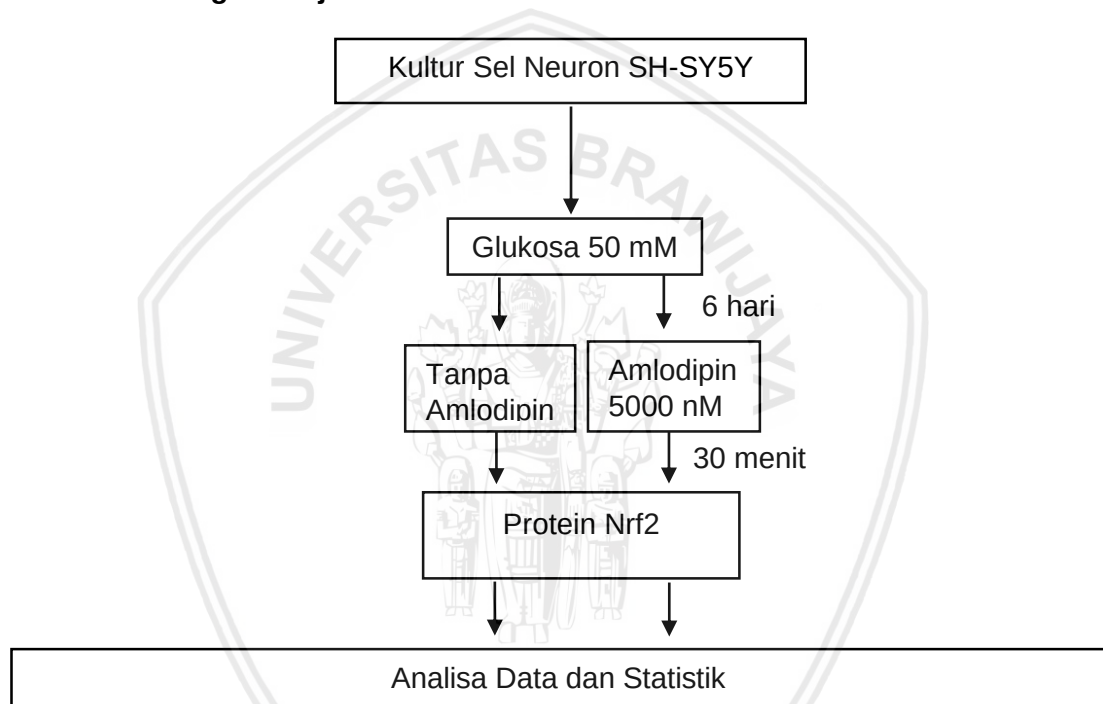
4.8 Definisi Operasional

CCB (Amlodipin)	Amlodipin yang digunakan dalam penelitian ini di dapatkan dari distributor <i>Santa Cruz Biotechnology</i> dengan no katalog CAS 88150-42-9. Amlodipin ini dalam bentuk bubuk yang dilarutkan dalam 75.3 mg/ml ddH ₂ O untuk membuat larutan stok. Pada percobaan kali ini diberikan amlodipin yang terlarut dalam air aquades dengan dosis 5 µM.
-----------------	--

Neuron-Derived cell line SH-SY5Y	Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line di biakan pada medium <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) dengan 15% FBS (<i>Foetal Bovine Serum</i>) dan 2 mM L-glutamine dan disimpan pada suhu 37 °C/5% CO ₂ ; 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 ekstraksi pada inkubasi (<i>passage</i>) ke 29 (Profile, 2016). Sel <i>Human neuroblastoma cell line</i> SH-SY5Y di dapatkan dari distributor <i>CLS Cell Lines Service</i> dengan no katalog 300154.
Hiperglikemi	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).
Protein Nrf2	Untuk mengetahui ada atau tidaknya protein Nrf2 di dalam sel dapat menggunakan metode IFA (<i>Immunofluorescent Assay</i>) dengan pemberian antibodi <i>mouse monoclonal</i> yang bereaksi terhadap antigen manusia dengan distributor <i>Abcam</i> dengan nomer katalog ab89443 Kemudian pada setiap sampel kultur dilihat dengan mikroskop CLSM.



4.9 Alur Kerangka Kerja Penelitian



Glukosa : 50 mM dipapar selama 6 hari

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* dan uji korelasi Pearson.

BAB 5

ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Telah dilakukan penelitian pengaruh pemberian amlodipin dosis tinggi terhadap protein Nrf2 pada kultur neuron SH-SY5Y dengan model hiperglikemi 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 5 μ M dan ditunggu hingga 30 menit. Setelah itu, diberikan label Nrf2 assay pada sel kultur neuron SH-SY5Y dan dilakukan pengecekan kadar protein Nrf2 dengan menggunakan alat CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*).

5.2 Analisis Data

5.2.1 Statistik Deskriptif

Tabel 5.1 Hasil Uji Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wilk

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
NRF 2	Tanpa Amlodipin	0,242	7	,200*	0,922	7	0,485
	Amlodipin 5000 nm	0,200	6	,200*	0,899	6	0,366

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)

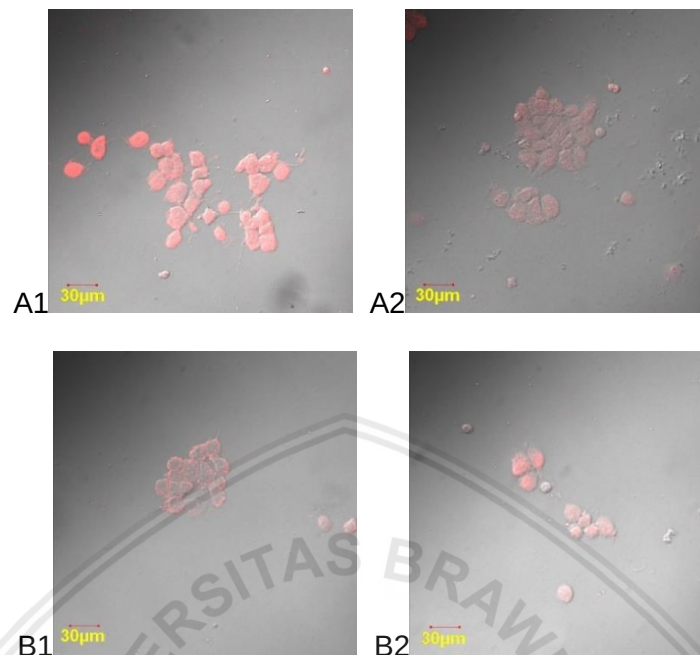
Kelompok Pengamatan	p-value	Distribusi
Glukosa 50 mM	0.485	Normal
Glukosa 50 mM + CCB 5 μ m	0.366	Normal

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 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 50 mM

Pada percobaan yang pertama diperoleh data hasil pengamatan antar kelompok perlakuan hiperglikemia 50 mM. Secara morfologi hasil pengamatan tersebut ditunjukkan pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Ekspresi NRF2 pada kultur neuron dengan perlakuan hiperglikemia (50 mM).

Keterangan: Pada gambar A1, A2 tanpa pemberian amlodipin, gambar B1, B2 diberi perlakuan amlodipin 5 mM. (kultur hari ke 6, NRF2 rhodamine berwarna merah, DIC, superimpose, pembesaran 400x).

Untuk membuktikan pengaruh perlakuan pemberian amlodipin dosis 5 μ M terhadap ekspresi Nrf2 pada kultur neuron hiperglikemia 50 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 5.2.4

Tabel 5.3 Hasil perbandingan ekspresi Nrf2 yang kultur neuron hiperglikemia 50 mM

Variabel	Tanpa amlodipin Rerata $\pm$ SD	Amlodipin 5 μ M Rerata $\pm$ SD	<i>p-value</i>
ekspresi NRF2	8.59 $\pm$ 1.08	9.24 $\pm$ 1.94	0.464 > 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 ($p=0.464$) rerata ekspresi Nrf2 antara kelompok tanpa pemberian amlodipin (8.59 ± 1.08 au) dengan kelompok pemberian amlodipin dosis $5 \mu\text{M}$ (9.24 ± 1.94 au). Tampak nilai rerata ekspresi Nrf2 pada kultur neuron hiperglikemia 50 mM hari keenam tanpa pemberian amlodipin nilainya hampir sama bila dibandingkan dengan rerata ekspresi Nrf2 pada kelompok pemberian amlodipin dosis $5 \mu\text{M}$. Hal ini berarti bahwa bila pada kultur neuron hiperglikemia 50 mM hari keenam diberikan amlodipin dosis $5 \mu\text{M}$ akan menunjukkan ekspresi Nrf2 yang tidak berbeda dengan yang tanpa diberi amlodipin.

5.2.4 Hasil analisis korelasi antara pemberian amlodipin ($5 \mu\text{M}$) dan tanpa amlodipin terhadap ekspresi protein Nrf2

Tabel 5.4 Hasil perbandingan uji korelasi antara ekspresi Nrf2 yang kultur neuron hiperglikemia 50 mM

Correlations			
		Kelompok	NRF 2
Kelompok	Pearson Correlation	1	0,223
	Sig. (2-tailed)		0,464
	N	13	13
NRF 2	Pearson Correlation	0,223	1
	Sig. (2-tailed)	0,464	
	N	13	13

Berdasarkan hasil uji korelasi antara Kelompok tanpa amlodipin dengan diberikan amlodipin dosis $5 \mu\text{M}$ terhadap ekspresi protein Nrf2 di atas menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar 0.223 dengan $p=0.464$ ($p>0.05$),

sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang tidak signifikan antara kelompok yang tanpa diberi amlodipin dengan kelompok yang diberi amlodipin 5 μM terhadap ekspresi Nrf2, dimana terdapat kecenderungan yang lemah semakin tinggi dosis amlodipin yang diberi, maka akan diikuti oleh peningkatan ekspresi protein Nrf2. Demikian sebaliknya.

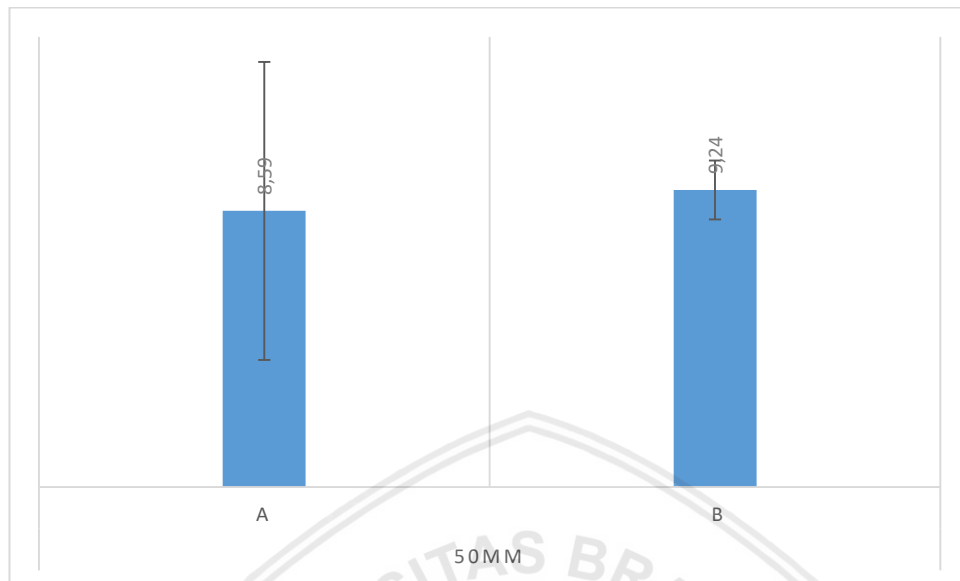
5.2.5 Penghitungan efek dosis dengan rumus *d-type effect size*

Pada kelompok induksi glukosa 50 mM pada kultur neuron SH-SY5Y dengan pemberian amlodipin 5 μM dan tanpa amlodipin di dapatkan efek pemberian obat (d) sebesar 0,45.

5.2.6 Ringkasan analisis data komparatif

Tabel 5.4 Ringkasan hasil *p-value* uji *independent sample t test*

Kelompok Pengamatan	Dosis Amlodipin	Tanpa Amlodipin	<i>p-value</i>
Glukosa 50 mM	5 μM	---	0.464



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

BAB 6

PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN

1.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Protein Nrf2

6.1.1 Pengaruh Amlodipin Terhadap Protein Nrf2 pada Kondisi Hiperglikemi (induksi 50 mM glukosa)

Pemberian amlodipin pada dosis 5 μ M dan tanpa diberikan amlodipin pada kultur neuron SH-SY5Y model hiperglikemi (induksi glukosa 50 mM) kronis mampu meningkatkan ekspresi protein Nrf2 namun tidak signifikan secara statistik. Hal ini sesuai dengan teori yang ada bahwa pemberian induksi glukosa 50 mM pada kultur neuron akan menyebabkan produksi level ROS yang meningkat (Shi and Liu, 2007). Pada saat sel neuron dipapar hiperglikemi kronis (6 hari) terjadi proses mekanisme pertahanan sel terhadap ROS. Salah satunya adalah aktivasi dari sistem Nrf2-ARE pada nukleus sel neuron dan hasil akhirnya adalah produksi enzim antioksidan contohnya adalah SOD (Kanou, Sano and Kohno, 2004). Aktivasi dari sistem Nrf2-ARE-SOD akan menyebabkan penangkapan dari radikal bebas (ROS) sehingga akan mengurangi proses terjadinya kerusakan dari sel SH-SY5Y. Pada penelitian ini terjadi peningkatan ekspresi dari protein Nrf2 setelah pemberian amlodipin walaupun tidak signifikan. Adanya peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada penelitian ini sesuai dengan penelitian menurut Schoeder bahwa pemberian amlodipin dosis 4 dan 10 mg/kg pada tikus yang dengan model *acute mountain sickness* mampu mengaktivasi protein Nrf2 melalui kerja amlodipin pada L-type Calcium Channel pada bagian N binding site (Schroeder, Hamilton, dan Irwin, 2014). Namun pada beberapa kelompok terjadi penurunan ekspresi protein

Nrf2 setelah pemberian amlodipin dosis 5 μM menunjukkan adanya aktivasi jalur lain selain jalur Nrf2 setelah pemberian amlodipin. Diperkirakan salah satu jalur tersebut adalah aktivasi jalur protein Nf κ B yang merupakan protein faktor transkripsi untuk proses inflamasi melalui peran ion Ca^{2+} intraseluler. Ion Ca^{2+} intraseluler akan mengakibatkan teraktivasinya 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 κ B (Lilienbaum and Israe, 2003). Penyebab lain dari hasil penelitian yang tidak signifikan adalah pada kondisi hiperglikemi kronis terjadi penurunan ekspresi protein Nrf2 akibat penurunan aktivitas regulasi protein Nrf2 pada nukleus sehingga menyebabkan aktivitas protein Nrf2 tetap stabil di dalam sitosol walaupun setelah diberikan amlodipin (Kumar dan Mittal, 2017). Diperkirakan pada penelitian ini pemberian amlodipin dengan dosis 5 μM mempengaruhi hasil dari penelitian yang tidak signifikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Lee pada pemberian radikal bebas (H_2O_2) pada sel neuron korteks dari tikus menunjukkan pemberian amlodipin yang bersifat neuroprotektif untuk memulihkan viabilitas dari sel neuron kortikal yang di papar radikal bebas berada pada rentang dosis 100 nM – 1 μM (Lee *et al.*, 2011).

6.2 Hubungan Ion Ca^{2+} dengan Protein Nrf2

Pada penelitian ini didapatkan pada perlakuan induksi glukosa 50 mM yang di berikan amlodipin 5 μM hasil ekspresi protein Nrf2 yang meningkat namun tidak signifikan secara statistik dibandingkan dengan tanpa diberikan amlodipin pada kultur neuron SH-SY5Y melalui pemeriksaan dengan metode *immunofluorescence*. Peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada penelitian ini sesuai dengan teori bahwa peningkatan ion Ca^{2+} intraseluler akibat kondisi sel neuron

yang hiperglikemi kronis akan mengaktivasi protein Nrf2 melalui jalur PRKCA (Protein Kinase C- Alpha) (Kurniawan and Utomo, 2018). Hasil yang tidak signifikan ini di perkirakan pemberian amlodipin pada dosis 5 μM akan mengaktivasi jalur lain yang sesuai dengan penelitian menurut Bellezza yakni peningkatan dari ion Ca^{2+} intraseluler akan meningkatkan aktivasi dari protein Nf κ B dan menurunkan ekspresi protein Nrf2 (Bellezza *et al.*, 2018). Aktivasi dari protein Nf κ B oleh ion Ca^{2+} adalah melalui 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 κ B (Lilienbaum and Israe, 2003).

6.3 Hubungan antara Pemberian Amlodipin 5 μM dengan Tanpa Amlodipin pada Kultur Sel SH-SY5Y yang Diinduksi glukosa 50 mM

Pada penelitian ini terdapat hubungan yang lemah namun tidak signifikan secara statistik antara kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μM dengan kelompok tanpa diberikan amlodipin terhadap peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM. Adanya peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada 54% kelompok perlakuan yang diberikan amlodipin 5 μM sesuai dengan teori menurut Schoeder yakni pemberian amlodipin mengurangi influx ion Ca^{2+} melauai ikatan amlodipin dengan L-type Calcium Channel pada bagian N site binding sehingga akan mengaktivasi protein Nrf2 (Schroeder, Hamilton and Irwin, 2014). Sedangkan adanya penurunan ekspresi protein Nrf2 pada 46% kelompok menunjukkan pemberian amlodipin mampu mengaktivasi jalur lain selain protein Nrf2. Diperkirakan salah satu jalur ini adalah aktivasi protein Nf κ B melalui peran ion Ca^{2+} intraseluler sehingga akan mengurangi aktivasi dari jalur protein Nrf2 walaupun setelah di berikan amlodipin (Bellezza *et al.*, 2018).

Mekanisme inhibisi protein Nrf2 oleh aktivasi jalur NfκB belum sepenuhnya dipahami. Adanya hubungan yang lemah antara kelompok pemberian amlodipin dosis 5 μ M dengan kelompok tanpa diberikan amlodipin juga dapat diakibatkan karena pemberian amlodipin dosis 5 μ M memiliki efek yang lemah yakni sebesar 0,45 dengan perhitungan melalui rumus *d-type effect size*.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini besaran sampel yang digunakan pada perlakuan pemberian amlodipin 5 μ M dan tanpa di berikan amlodipin masing-masing adalah 7 dan 6 sampel. Karena pada penelitian ini terdapat sel yang tidak termasuk di dalam kriteria inklusi dan terbatasnya jumlah sampel yang telah siap untuk di lakukan perlakuan. Padahal penghitungan besaran sampel yang seharusnya digunakan di dalam penelitian ini adalah sebanyak 16 sampel. Hal ini akan memengaruhi hasil dari uji statistik (besaran efek dan nilai alfa) karena besaran sampel yang digunakan di dalam penelitian memiliki hubungan yang sebanding dengan kekuatan dari penelitian (besaran efek dan nilai alfa) sehingga apabila besaran sampel dari penelitian kecil, maka besaran efek dan nilai alfa dari penelitian juga akan kecil (Dumićić dan Žmuk, 2013).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Pengaruh pemberian amlodipin dosis 5 μ M terhadap protein Nrf2 pada kultur neuron SH-SY5Y yang diinduksi glukosa 50 mM, dapat disimpulkan :

1. Pemberian amlodipin dosis 5 μ m pada kultur sel SH-SY5Y yang di induksi hiperglikemi kronis (glukosa 50 mM) tidak memiliki pengaruh terhadap ekspresi protein Nrf2.
2. Tidak terdapat hubungan antara pemberian amlodipin dosis 5 μ M dan tanpa di berikan amlodipin terhadap peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada kultur sel SH-SY5Y.
3. Pemberian amlodipin mampu meningkatkan protein Nrf2 namun tidak secara signifikan secara statistik di perkirakan akibat adanya faktor-faktor seperti aktivasi jalur lain, pemberian amlodipin pada kondisi hiperglikemi kronis, dosis amlodipin yang terlalu tinggi, dan jumlah sampel yang di gunakan dalam penelitian kurang.

7.2 Saran

Perlunya dilakukan pengkajian dan penelitian ulang dosis amlodipin secara in vivo pada hewan coba, pengkajian lebih lanjut mekanisme peningkatan aktivasi jalur Nf κ B yang mampu menurunkan aktivasi protein Nrf2 secara baik in vivo maupun in vitro, dan penelitian kembali dengan menambah jumlah sampel pada penelitian.

Daftar Pustaka

- Ambudkar, I. S. *et al.* (2018) 'HHS Public Access', 60(2), pp. 51–54. doi: 10.1016/j.ceca.2016.06.003.ROS.
- Baynest, H. W. (2018) 'Classification , Pathophysiology , Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus', (May), pp. 1–10. doi: 10.4172/2155-6156.1000541.
- Bellezza, I. *et al.* (2018) 'BBA - Molecular Cell Research Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress', *BBA - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1865(5), pp. 721–733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
- Biedler, J. L., Helson, L., dan Spengler, B. A. (1973) 'Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture', *Cancer Research*, 33(11), pp. 2643–2652. doi: 10.1007/PL00000826.
- Dumičić, K. dan Žmuk, B. (2013) 'USE OF POWER ANALYSIS IN CHOOSING APPROPRIATE SAMPLE SIZE FOR QUALITY INSPECTION', pp. 147–160.
- Fares, H. *et al.* (2016) 'Amlodipine in hypertension : a first-line agent with ef fi cacy for improving blood pressure and patient outcomes', pp. 1–7. doi: 10.1136/openhrt-2016-000473.
- Fernandes, L. *et al.* (2013) 'Effects of Glucose Concentration on Redox Status in Rat Primary Cortical Neurons under Hypoxia', *European Journal of Internal Medicine*. Elsevier B.V., 24, p. e245. doi: 10.1016/j.ejim.2013.08.629.
- Fernyhough, P. dan Calcutt, N. A. (2010) 'Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies', *Cell Calcium*. Elsevier Ltd, 47(2), pp. 130–139. doi: 10.1016/j.ceca.2009.11.008.
- Fowler, M. J. (2008) 'Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes', 26(2), pp. 77–82.

- Görlach, A. *et al.* (2015) 'Redox Biology Calcium and ROS : A mutual interplay', 6, pp. 260–271. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
- 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.
- Hsieh, H. dan Yang, C. (2013) 'Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases', 2013.
- Jiménez-osorio, A. S., González-reyes, S. and Pedraza-chaverri, J. (2015) 'Clinica Chimica Acta Natural Nrf2 activators in diabetes', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 448, pp. 182–192. doi: 10.1016/j.cca.2015.07.009.
- Kanou, K., Sano, M. , dan Kohno, H. (2004) 'A net design for estimating the vertical distribution of larval and juvenile fishes on a tidal mudflat', *Fisheries Science*. Elsevier B.V., 70(4), pp. 713–715. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.017.
- Kementrian Kesehatan RI (2018). Hasil Utama Riskesdas 2018. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kovalevich, J. dan Langford, D. (2016) 'HHS Public Access', pp. 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5.
- Kumar, A. dan Mittal, R. (2017) 'Nrf2 : a potential therapeutic target for diabetic neuropathy', *Inflammopharmacology*. Springer International Publishing. doi: 10.1007/s10787-017-0339-y.
- Kurniawan, S. N. dan Utomo, D. H. (2018) 'Nuclear Factor Erythroid 2 Activation Mediated by PRKCA in Increasing Ca²⁺ Intracellular in Diabetic Condition', 22(2), pp. 159–168. doi: 10.7546/ijba.2018.22.2.159-168.
- 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.
- Lilienbaum, A. dan Israe, A. (2003) 'From Calcium to NF- κ B Signaling Pathways in Neurons', 23(8), pp. 2680–2698. doi: 10.1128/MCB.23.8.2680.

- Lin, T. *et al.* (2016) 'NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response', (December). doi: 10.5772/65141.
- Marcusson, J., Hallbeck, M., dan Agholme, L. (2010) 'An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons', 20, pp. 1069–1082. doi: 10.3233/JAD-2010-091363.
- Minhaj, S. *et al.* (2017) 'Biochimica et Biophysica Acta Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation', *BBA - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1863(2), pp. 585–597. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Motif, A. (2014) 'Active Motif's TransAM® Nrf2 Kit Manual', 2.
- Motohashi, H. dan Yamamoto, M. (2004) 'Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism', *Trends in Molecular Medicine*, 10(11), pp. 549–557. doi: 10.1016/j.molmed.2004.09.003.
- Profile, S. E. E. (2016) 'Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells', (May). doi: 10.3109/10799893.2015.1108337.
- Roglic, G. (2016). WHO Global report on diabetes: A summary. *International Journal of Noncommunicable Diseases*, 1(1), p.3.
- Sandireddy, R. *et al.* (2014) '*Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets*'. *Hindawi Publishing Corporation*, 2014(Figure 1). doi: 10.1155/2014/674987.
- Schroeder, T., Hamilton, K., dan Irwin, D. C. (2014) 'NIH Public Access', pp. 264–273. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.024.Nrf2.
- Shi, H. dan Liu, K. J. (2007) '*Effects of Glucose Concentration on Redox Status in Rat Primary Cortical Neurons under Hypoxia*', *Neurosci Lett.*, 410(1), pp. 57–61.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., dan Szpara, M. L. (2017) 'HHS Public Access',

(108). doi: 10.3791/53193.Differentiation.

Singh, R., Kishore, L., dan Kaur, N. (2013) '*Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions*', *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.phrs.2013.12.005.

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. Available at: <https://biblio.ugent.be/publication/6959236/file/6959258.pdf>.

Vinik, A. I. et al. (2013) '*Diabetic Neuropathy*', *Endocrinology and Metabolism Clinics of NA*. Elsevier Inc, 42(4), pp. 747–787. doi: 10.1016/j.ecl.2013.06.001.

Wacana, D. dan Indonesia, Y. (2017) '*The OROILE and Determinant Factors of QUALITY of Life in Patients with Diabetic . EUROPATHY OROIL dan Faktor Determinan + UALITAS Hidup pada Pasien Neuropati*', 12(5), pp. 38–42. doi: 10.21109/kesmas.

Wang, S. et al. (2018) '*Redox Biology Astrocytic CCAAT / Enhancer-binding protein delta contributes to reactive oxygen species formation in neuroinflammation*', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 16(February), pp. 104–112. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.011.

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

Yan, L. J. (2014) '*Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress*', *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Publishing Corporation. doi: 10.1155/2014/137919.

Yan, S. F. et al. (2007) '*Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging*'.', *Current molecular medicine*, 7(8), pp. 699–710. doi: 10.2174/156652407783220732.



LAMPIRAN

Lampiran 1 : Uji Normalitas

Analisis Hasil Statistik

Asumsi normalitas data

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NRF 2	Tanpa Amlodipin	0,242	7	,200*	0,922	7	0,485
	Amlodipin 5 µM	0,200	6	,200*	0,899	6	0,366

Lampiran 2 : Hasil uji independent-T Test

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
NRF 2	Equal variances assumed	2,423	0,148	-0,758	11	0,464	-0,64738	0,85365	-2,52625	1,23149
	Equal variances not assumed			-0,725	7,555	0,490	-0,64738	0,89252	-2,72682	1,43206

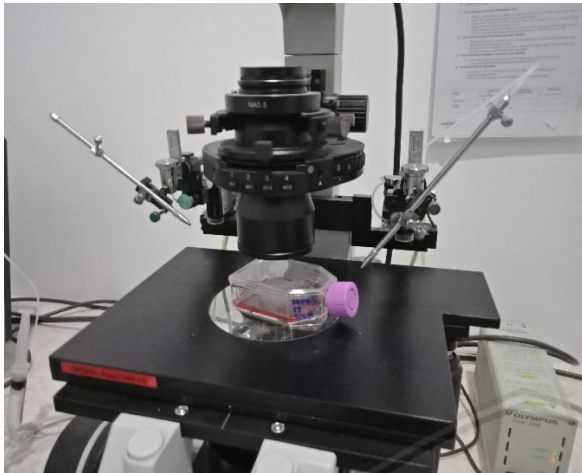
Lampiran 3 : Analisis Korelasi

Correlations			
		Kelompok	NRF 2
Kelompok	Pearson Correlation	1	0,223
	Sig. (2-tailed)		0,464
	N	13	13
NRF 2	Pearson Correlation	0,223	1
	Sig. (2-tailed)	0,464	
	N	13	13

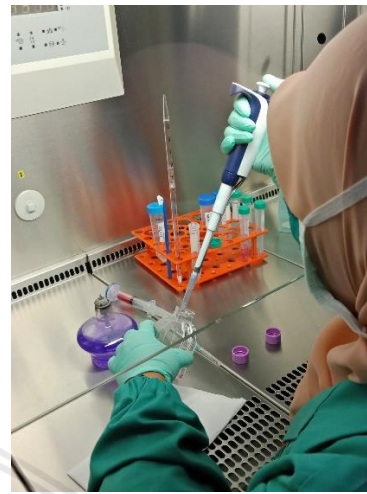
Lampiran 4 : Dokumentasi Penelitian



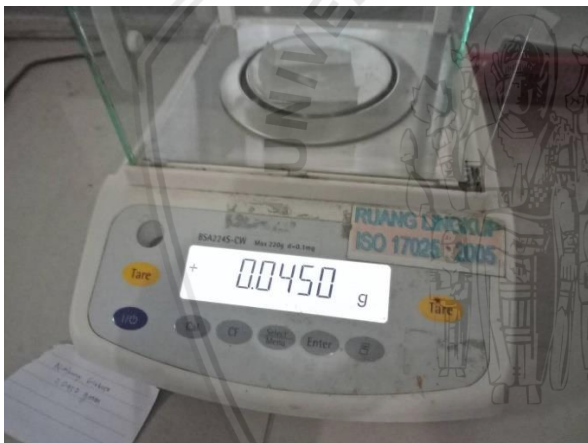
Inkubator tempat kerja proses kultur sel



Mikroskop untuk pengamatan hasil kultur sel



Proses Pasase sel



Proses penghitungan glukosa yang digunakan



Proses perlakuan amlodipin



Proses pembuatan cover slips