

**PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP KALSIMUM DAN
APOPTOSIS PADA KULTUR SEL NEURON *CELL LINE* SH-SY5Y
MANUSIA YANG DIPAPAR HIPERGLIKEMI KRONIS**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Spesialis Saraf



Oleh :

dr. Ariesia Dewi Ciptorini

158071200111001

Pembimbing:

Dr. dr. Shahdevi Nandar Kurniawan, Sp.S(K)

Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

dr. Harun Al Rasyid, MPH

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I NEUROLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

KATA PENGANTAR.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ABSTRAK.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

ABSTRACT.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

DAFTAR ISI.....II

DAFTAR TABEL.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

DAFTAR GAMBAR.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

DAFTAR SINGKATAN.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

BAB 1.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

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..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

1.4.1 Manfaat akademis.....*Error! Bookmark not defined.*

1.4.2 Manfaat klinis.....*Error! Bookmark not defined.*

BAB 2.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TINJAUAN PUSTAKA.....ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2.1 NEUROPATI DIABETES MELITUS..... ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

2.1.1 Definisi Neuropati Diabetes Melitus.....*Error! Bookmark not defined.*

2.1.2 Epidemiologi Neuropati Diabetes Melitus.....*Error! Bookmark not defined.*



2.1.3	<i>Klasifikasi Neuropati Diabetes Melitus</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.4	<i>Patofisiologi Neuropati Diabetes Melitus</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.5	<i>Advanced Glycation End Product (AGEs)</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.6	<i>Jalur Poliol</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.7	<i>Jalur Protein Kinase C (PKC)</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.8	<i>Peran Stres Oksidatif</i>	Error! Bookmark not defined.
2.1.9	<i>Kalsium dan Apoptosis</i>	Error! Bookmark not defined.
2.2	AMLODIPIN PADA NEURON	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.3	NEURON KULTUR <i>DORSAL ROOT GANGLION (DRG)</i>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BAB 3	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
	KERANGKA KONSEP	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.1	KERANGKA KONSEP	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.2	HIPOTESIS PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BAB 4	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1	DESAIN PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2	TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.3	SAMPEL PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.4	BESAR SAMPEL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.5	VARIABEL DAN DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.5.1	<i>Variabel Bebas</i>	Error! Bookmark not defined.
4.5.2	<i>Variabel Tergantung</i>	Error! Bookmark not defined.
4.5.3	<i>Definisi Operasional</i>	Error! Bookmark not defined.
4.6	ALAT DAN BAHAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.7	PROSEDUR PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.8	ANALISA DATA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.9	ETIKA PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.



4.10 DIAGRAM ALUR PENELITIAN **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

BAB 5 **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

5.1 DESKRIPSI HASIL PENELITIAN..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

5.2 PENGARUH HIPERGLIKEMIA TERHADAP EKSPRESI KALSIMUM DAN CASPASE 3 PADA KULTUR SEL *HUMAN NEURON SH-SY5Y*..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

5.2.1 *Uji Beda Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Kalsium pada kultur sel human neuron SH-SY5Y tanpa pemberian amlodipin*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.2 *Uji Beda Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Caspase 3 pada kultur sel human neuron SH-SY5Y tanpa pemberian amlodipin*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3 PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP EKSPRESI KALSIMUM DAN CASPASE 3 PADA KULTUR SEL *HUMAN NEURON SH-SY5Y* **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

5.3.1 *Pengaruh Pemberian Amlodipine terhadap Ekspresi Kalsium pada kondisi normoglikemia*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3.2 *Pengaruh Pemberian Amlodipine Terhadap Ekspresi Kalsium pada Kondisi Hiperglikemia*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3.3 *Pengaruh Pemberian amlodipine terhadap ekspresi Caspase 3 pada kondisi normoglikemia*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3.4 *Pengaruh Pemberian Amlodipine Terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Kondisi Hiperglikemia*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.3.5 *Pengaruh pemberian amlodipine 2µM terhadap Ekspresi Caspase 3 pada kultur sel human neuron SH-SY5Y*..... **Error! Bookmark not defined.**

5.4 UJI KORELASI EKSPRESI KALSIMUM DAN CASPASE 3 PADA KULTUR SEL *HUMAN NEURON SH-SY5Y*..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

BAB 6 **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

PEMBAHASAN **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

6.1 PENGARUH PAPAN HIPERGLIKEMI KRONIS PADA EKSPRESI KALSIMUM INTRASEL.. **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

6.2 PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP EKSPRESI KALSIMUM INTRASEL..... **ERROR!**
BOOKMARK NOT DEFINED.

6.3 PENGARUH PAPARAN HIPERGLIKEMI KRONIS TERHADAP KADAR CASPASE-3 INTRASEL
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

6.4 PENGARUH PEMBERIAN AMLODIPIN TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 INTRASEL **ERROR!**
BOOKMARK NOT DEFINED.

6.5 KORELASI KADAR KALSIMUM DAN APOPTOSIS PADA SEL NEURON.. **ERROR! BOOKMARK NOT
 DEFINED.**

BAB 7.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

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.**

LAMPIRAN 1. KETERANGAN LAIK ETIK.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

LAMPIRAN 2. RATA-RATA EKSPRESI**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

LAMPIRAN 3. UJI NORMALITAS DAN UJI T TIDAK BERPASANGAN..... **ERROR!**
BOOKMARK NOT DEFINED.

LAMPIRAN 4. UJI KORELASI PEARSON.....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

LAMPIRAN 5. DOKUMENTASI PENELITIAN**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok kelainan metabolik umum yang ditandai dengan adanya hiperglikemia, akibat gangguan metabolisme terutama glukosa (PERKENI, 2015). Prevalensi penderita DM pada tahun 2015 di dunia diperkirakan sekitar 415 juta jiwa dan ini diestimasikan semakin naik menjadi 642 juta jiwa pada tahun 2040. Peningkatan tersebut diperkirakan terutama terjadi di negara berkembang, salah satunya adalah Indonesia. Bahkan, di tahun 2015, Indonesia merupakan negara ketujuh penderita DM terbesar di dunia yang mencapai 10 juta jiwa (Shaukat, 2017) (Sandireddy *et al.*, 2014).

Sebagai akibat dari meningkatnya prevalensi DM, terjadi pula peningkatan komplikasi kronik dari diabetes, termasuk neuropati diabetikum (Said, 2007). Neuropati diabetikum adalah kelainan yang mengenai saraf perifer, otonom dan saraf kranialis yang berhubungan dengan diabetes melitus (Pasnoor *et al.*, 2013).

Neuropati diabetes melitus (DM) adalah komplikasi dari diabetes kronis yang paling sering terjadi dan dari waktu ke waktu mempengaruhi lebih dari 60% dari semua pasien. Patogenesis neuropati DM belum sepenuhnya diketahui.

Mekanisme klasik dan yang dipercaya sampai dengan saat ini adalah hiperglikemia yang mengaktifkan berbagai jalur metabolik seperti poliol jalur, jalur protein kinase C (PKC), jalur *advanced glycation end products* (AGE), dan jalur hexosamine.

Semua jalur ini dikenal dapat menyebabkan neuropati DM melalui mediasi produksi ROS mitokondria. Stres oksidatif dan jalur-jalur klasik dalam kombinasi mengaktifkan faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa enhancer of B cells*

(NF- κ B) dan *speciality protein-1* (SP-1), yang mengakibatkan peradangan saraf dan gangguan pembuluh darah. *Poly-ADP ribose polymerase* (PARP) dimediasi NADH/ATP yang dapat menyebabkan disfungsi saraf karena kegagalan berbagai proses terkait energi di neuron. (ERK: *extracellular related kinase*, IL-6: *interleukin-6*, iNOS: *inducible nitric oxide synthase*, COX-2: *cyclooxygenase-2*, TGF- β : *transforming growth factor- β* , dan PAI-1: *plasminogen activator inhibitor-1*) (Vinik *et al.*, 2013).

Kondisi hiperglikemia akan menyebabkan sorbitol terbentuk secara berlebihan melalui jalur poliol, disfungsi mitokondria, terbentuknya *advanced glycation end products*, dan pada akhirnya akan terjadi hiperaktivasi poly-ADP ribosyl polymerase (PARP), mitogen activated protein kinase (MAPK), dan protein kinase C (PKC). Semua jalur ini berperan dalam menimbulkan stres oksidatif. Kondisi ini dalam jangka panjang akan menyebabkan rusaknya serabut saraf perifer, dan pada akhirnya menimbulkan neuropatik diabetes (Sandireddy *et al.*, 2014)

Pada neuropati diabetes terdapat gangguan sinyal Ca^{2+} , dimana akan menyebabkan naiknya kadar dari kalsium intraseluler istirahat, penurunan aktivasi transport kalsium dan penurunan stimulus yang meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} .

Pada neuron sensorik dari hewan eksperimental dengan diabetes ditemukan pula gangguan sinyal Ca^{2+} (Fernihough and Nigel. A, 2011).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Russell *et al.* didapatkan peningkatan marker stress oksidatif pada neuron DRG hewan coba diabetik (ZDF-HF) dan gangguan toleransi glukosa (ZDF-N) dibandingkan dengan kontrol. Terjadinya hiperglikemi dapat mengakibatkan perlambatan konduksi saraf, peningkatan stress

oksidatif dan aktivasi jalur apoptosis yang mempengaruhi sel neuron DRG (Peeraer *et al.*, 2011).

Penggunaan neuron DRG pada kultur merupakan model penelitian yang sesuai untuk kanal ion dan kombinasi dengan teknik lain seperti biologi molekuler dan *in vivo* elektrofisiologi (Pasnoor *et al.*, 2013). Pemberian amlodipin diharapkan akan mengurangi kadar Ca^{2+} sitosol, yang selanjutnya akan mengurangi apoptosis sehingga kerusakan neuron akan berkurang dimana merupakan penyebab neuropatik diabetes.

1.2 Rumusan masalah

1. Bagaimana pengaruh paparan hiperglikemia kronis terhadap kadar *Calcium cytosol* (Ca^{2+}) dan apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y?
2. Bagaimana pengaruh pemberian amlodipin terhadap kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemi kronik?
3. Bagaimana hubungan kadar kalsium sitosol terhadap apoptosis pada kultur neuron kultur SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis?
4. Bagaimana hubungan kadar kalsium sitosol terhadap apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis dan amlodipin?

1.3 Tujuan penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh paparan hiperglikemia kronis terhadap kadar *Calcium cytosol* (Ca^{2+}) dan apoptosis pada neuron kultur SH - SY5Y
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian amlodipin terhadap kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis pada neuron kultur SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemi kronik?
3. Untuk mengetahui hubungan kadar kalsium sitosol terhadap apoptosis pada kultur sel neuron SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis?
4. Untuk mengetahui hubungan kadar kalsium sitosol terhadap apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis dan amlodipin?

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat akademis

- a. Penelitian ini bermanfaat untuk mengembangkan ilmu pengetahuan dan praktek klinis penggunaan amlodipin sebagai terapi neuropati diabetes
- b. Penelitian ini bermanfaat untuk mengetahui pengaruh amlodipin terhadap konsentrasi *Calcium cytosol* (Ca^{2+}) dan apoptosis pada neuron kultur SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronik tergantung dosis

1.4.2 Manfaat klinis

Penelitian ini diharapkan dapat dipertimbangkan menjadi dasar penggunaan amlodipin sebagai terapi neuropati akibat paparan hiperglikemia kronik di masyarakat sehingga dapat mengurangi angka morbiditas penderita neuropati diabetes.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Neuropati Diabetes Melitus

1.1.1 Definisi Neuropati Diabetes Melitus

Neuropati diabetes adalah gangguan saraf perifer yang terjadi pada penderita diabetes melitus akibat penyakit tersebut, dimana kemungkinan penyebab neuropati yang lain telah disingkirkan (Boulton *et al.*, 2005). Neuropati diabetikum dapat diklasifikasikan menurut onset dan durasi serangan, ataupun menurut manifestasi klinis dan saraf yang terkena. Berdasarkan onset serta durasi serangan dapat dibagi menjadi dua, yaitu neuropati akut dan kronis. Bentuk neuropati diabetikum yang paling banyak adalah polineuropati simetris distal atau yang biasa disebut sebagai polineuropati diabetikum (PNP-DM), yaitu kerusakan saraf tepi sensorik dan atau motorik yang bersifat *length-dependent* dan simetris di kedua ekstremitas akibat hiperglikemia, terkait gangguan metabolisme, faktor risiko kardiovaskuler, dan gangguan mikrovaskuler (Pasnoor *et al.*, 2013).

Konferensi San Antonio 1988, *American Academy of Neurology* (AAN), *American Association of Electrodiagnostic Medicine* (AAEM) dan *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation* (AAPM&R) mengemukakan definisi polineuropati diabetikum, polineuropati diabetikum (PNP-DM) jika didapatkan gejala atau tanda disertai hasil abnormal pada hasil konduksi hantar saraf (KHS). Polineuropati diabetikum merupakan bentuk paling umum dari neuropati perifer akibat diabetes (England *et al.*, 2014).

1.1.2 Epidemiologi Neuropati Diabetes Melitus

Prevalensi penderita DM di dunia pada tahun 2015 diperkirakan sekitar 415 juta jiwa dan ini diestimasikan meningkat menjadi 642 juta jiwa di tahun 2040.

Sementara jumlah penderita DM di Indonesia pada tahun 2015 diperkirakan sebanyak 10 juta jiwa, sehingga Indonesia merupakan negara ketujuh dengan penderita DM terbanyak di dunia (Sandireddy *et al.*, 2014b)(Shaukat, 2017).

Prevalensi PNP-DM sangat bervariasi antarpelitian, dikarenakan belum adanya pedoman standar dalam kriteria diagnostiknya. Berdasarkan penelitian oleh (Pasnoor *et al.*, 2013), kurang lebih dua pertiga pasien dengan DM mengalami polineuropati perifer, sementara Vinik, *et al.* (1992) menyebutkan bahwa polineuropati terjadi pada 80% pasien diabetes (Vinik *et al.*, 1992).

Faktor penyebab utamanya adalah hiperglikemi, dan faktor lain yang menyebabkan antara lain usia, durasi, merokok, hipertensi, peningkatan triglesiridin, peningkatan BMI, konsumsi alkohol, dan berat badan yang meningkat(England *et al.*, 2014).

1.1.3 Klasifikasi Neuropati Diabetes Melitus

Klasifikasi polineuropati DM antara lain dibagi menjadi polineuropati DM simetris dan asimetris. Polineuropati simetris adalah tipe yang paling sering terjadi, merupakan neuropathy yang *length dependent* (Pasnoor *et al.*, 2013).

Tabel 2.1 Klasifikasi Polineuropati DM (Pasnoor *et al.*, 2013)

Polineuropati simetris	Asimetrik/ Focal and multifocal neuropathy
Defisit menetap :	Diabetik lumbosacral radiculoplexopathy
Distal sensoris polineuropati	<i>Truncal Neuropathies</i>
Distal sensoris polineuropati pada early onset DM	<i>Cranial Neuropathies</i>
<i>Pseudosyringomyelic neuropathy</i>	<i>Limb Mononeuropathies</i>
<i>Pseudotabetic neuropathy</i>	
Neuropati otonom	
Gejala episodik:	
Diabetik neuropathy cachexia	
Neuropati Hiperglikemi	
<i>Treatment induce Diabetic Neuropathy</i>	

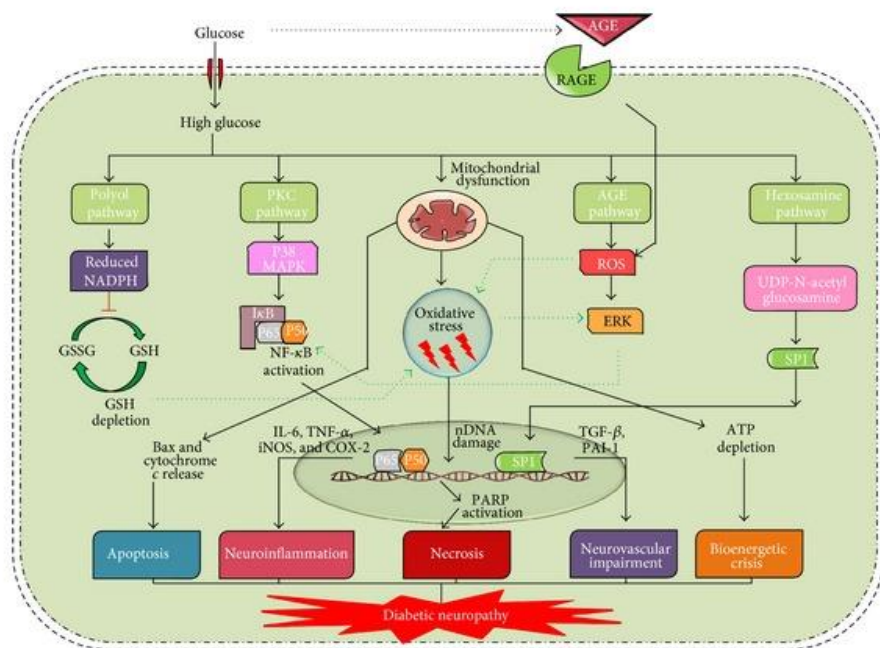
1.1.4 Patofisiologi Neuropati Diabetes Melitus

Mekanisme patologi dari neuropati diabetikum tidak dapat dijelaskan karena penyebab tunggal, dan berbagai macam hipotesis telah diduga perannya.

Secara luas, penyebab polineuropati DM ini dihipotesis karena kelainan metabolik, vaskular, dan hipotesis gangguan neuroregenerasi (Pasnoor *et al.*, 2013) (Said, 2007).

a. Patogenesis metabolik

Pengaruh hiperglikemia persisten telah lama diteliti menyebabkan kerusakan saraf. Setidaknya terdapat lima jalur terjadinya polineuropati akibat hiperglikemia yaitu perubahan metabolisme asam lemak, jalur polioli, aktivasi protein kinase C oleh 1,2-diacylglycerol, produk glikasi, dan stres oksidatif ((Pasnoor *et al.*, 2013) (Veves *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 Patofisiologi Neuropati DM (Sandireddy *et al.*, 2014b)

Salah satu penyebab utama untuk semua komplikasi ini adalah *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan hasil dari proses yang dimulai dan diperkuat oleh kronis hiperglikemia. Kelebihan glukosa intraseluler menyebabkan peningkatan fluks melalui satu atau lebih jalur metabolisme glukosa, dan hiperglikemia yang berkepanjangan akan menyebabkan terjadinya komplikasi kronis diabetes termasuk neuropati DM (Sandireddy *et al.*, 2014b).

b. Patogenesis vaskuler

Telah didalilkan bahwa hipoksia atau iskemia terlibat dalam PNP-DM. Studi ultrastruktural dari (Dyck *et al.*, 2001) telah menunjukkan bahwa peningkatan degenerasi di daerah membran basal dan sel endotel berhubungan dengan keparahan polineuropati. Pada tingkat yang lebih makroskopik, studi tentang distribusi kerusakan serabut saraf diabetes juga menunjukkan gangguan vaskuler. Dalam studi tersebut, pola kehilangan serabut saraf multifokal masih

bisa diidentifikasi dalam saraf sural. Johnson et al, mengidentifikasi perubahan dalam perineurium dan epineurium sekitarnya yang menyerupai pada vaskulitis saraf perifer. Meskipun perubahan ultrastruktur pembuluh darah bisa menjelaskan bentuk morfologis iskemia ini, ada bukti bahwa hiperglikemia kronik mungkin menghasilkan hipoksia atau iskemia (Dyck *et al.*, 2001; Pasnoor *et al.*, 2013)

Pada suatu penelitian menyebutkan bahwa aktivasi jalur komplemen dan terbentuknya kompleks serangan membrane (*membrane attacking complex/MAC*) dapat menyebabkan kerusakan pembuluh darah dan berpengaruh pada sirkulasi di endoneurium tersebut. (Pasnoor *et al.*, 2013; Vinik *et al.*, 2013).

c. Patogenesis imunologi/inflamasi

Patogenesis yang dimediasi sistem imun dipaparkan pada sejumlah kasus PNP-DM. Pada suatu studi dari neuropati asimetris proksimal yang menunjukkan hilangnya serabut saraf asimetris, didapatkan pula peradangan epineural limfositik menyerupai vaskulitis. Krendel, *et al* menemukan peradangan perivaskuler yang sama pada 7 dari 10 pasien dengan neuropati lumbosakral asimetris. Studi oleh Mayo Clinic pada neuropati diabetes proksimal, 2 dari 6 biopsi saraf sural menunjukkan infiltrat inflamasi mononuklear perivaskuler. Younger, *et al* membiopsi 20 pasien dengan neuropati diabetes, 6 dengan simetris distal dan 14 dengan neuropati asimetris. Tujuh pasien memiliki peradangan pembuluh epineurial pada potongan parafin, 2 dengan neuropati distal simetris dan 5 dengan neuropati asimetris. Dengan imunohistokimia, angka kejadian pasien yang menderita microvaskulitis sel T mengalami

peningkatan menjadi 12 (60% dari pasien dilakukan biopsi) terutama sel T CD8+. Kehadiran tumor nekrosis faktor, interleukin-6, interleukin-1b, interleukin-1a, dan C5b-9 di beberapa spesimen menopang penelitian untuk mengetahui patogenesis yang dimediasi system imun pada neuropati radikulopati diabetikum, sel mononuklear parivaskuler ditemukan di semua 33 pasien biopsi, yang sebagian besar juga menunjukkan perubahan iskemia (Pasnoor *et al.*, 2013)

1.1.5 Advanced Glycation End Product (AGEs)

Hiperglikemia mempercepat pembentukan AGEs melalui karbohidrat reaktif protein, asam nukleat, atau lipid. Kelompok ini cenderung merusak fungsi biologis protein, yang akibatnya mempengaruhi fungsi selular. AGEs ekstraseluler juga berikatan dengan reseptor AGE (RAGE) dan memulai inflamasi, mengaktifkan oksidase NADPH, dan menghasilkan stres oksidatif. Respon inflamasi jangka panjang meregulasi RAGE dan merangsang *nuklear factor kappa B* (NFkB). Secara kolektif, kerusakan biokimia yang disebabkan oleh AGEs menyebabkan pendukung neurotropik berkurang, gangguan aliran darah saraf, gangguan integritas neuronal, dan gangguan mekanisme perbaikan (Wu, 2008).

Pembentukan AGEs terjadi melalui glikosilasi nonenzimatik pada protein seller akibat dari peningkatan glukosa intraseluler. Pembentukan AGEs terjadi akibat glikosilasi dan protein jaringan. Glikosilasi nonenzimatik adalah produk dari interaksi glucose dengan protein antara lain kelompok amino. Pada keadaan hiperglikemik kronik glukosa yang berlebihan akan bergabung dengan asam amino pada protein jaringan atau sirkulasi. Pada saat awal akan terbentuk produk

glikosilasi awal yang reversible yang kemudian terbentuk AGEs yang irreversible.

Konsentrasi AGE akan naik pada orang dengan diabetes melitus. Pada endotel mikrovaskuler, AGE mencegah terbentuknya prostasiklin dan menyebabkan induksi PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) sehingga menyebabkan agregasi trombosit dan stabilisasi fibrin, memudahkan thrombosis. Mikrothrombus yang dirangsang oleh AGE menyebabkan hipoksik local dan terjadi peningkatan angiogenesis dan terjadilah mikroangiopati. Inhibisi pembentukan AGE dapat menghambat klinis neuropati diabetic (Wu, 2008).

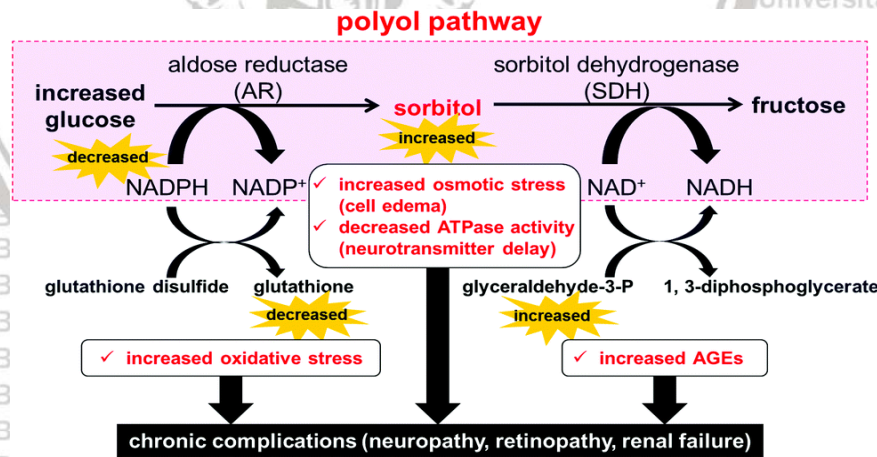
1.1.6 Jalur Poliol

Hiperglikemia menyebabkan peningkatan glukosa intraseluler pada saraf, menyebabkan gangguan pada jalur glikolisis normal. Kelebihan glukosa mengaktifkan jalur poliol dan menghasilkan sorbitol dan kemudian fruktosa oleh reduktase aldosa dan sorbitol dehidrogenase. Peningkatan fluks poliol menyebabkan hiperosmolaritas intraseluler oleh akumulasi sorbitol dan kompensasi pengeluaran osmolit lain seperti mioinositol, taurin, dan adenosin. Pada gilirannya, kekurangan mioinositol menyebabkan kekurangan fosfatidilinositol dan sedikitnya produksi adenosin trifosfat (ATP). Semua proses ini menyebabkan aktivitas yang berkurang dari Na^+/K^+ -ATPase dan PKC, terganggunya transport aksonal dan gangguan struktural saraf, yang selanjutnya menyebabkan potensial aksi yang tidak normal. *Aldosa reduktase-mediated* mengurangi perubahan glucose menjadi sorbitol terkait dengan konsumsi NADPH, dikarenakan NADPH dibutuhkan untuk regenerasi dari *reduced glutathion* (GSH), yang langsung berkontribusi untuk stress oksidatif. Disamping itu, terbentuknya fruktosa dari

sorbitol menyebabkan glikasi, menurunkan NADPH, dan meningkatkan AGEs yang kesemuanya menyebabkan ketidak seimbangan (Kawano, 2014).

Perubahan dari metabolisme poliol saraf tepi berdampak pada sebagai faktor sentral pada patogenesis dari neuropati diabetikum. Aldose reduktase merubah glukosa menjadi sorbitol (seperti poliol) menggunakan nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) sebagai koenzim. Sorbitol lebih lanjut dikonversi menjadi fruktosa oleh sorbitol dehidrogenasi menggunakan nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) sebagai koenzim, membentuk jalur *bypass* poliol dari metabolisme glukosa (Kawano, 2014)

Pada kondisi diabetes dimana terjadi peningkatan kadar glukosa, menghasilkan perubahan aktivitas aldose reduktase, yang meningkatkan kadar sorbitol intraseluler dan bahkan tekanan osmotik intraseluler. Kondisi ini menginduksi gangguan fungsional dan struktural dari sel dan jaringan. Patofisiologi jalur poliol dapat dilihat pada gambar 2.2. (Kawano, 2014)



Gambar 2.2 Jalur Poliol (Gessei *et al.*, 2015)

1.1.7 Jalur Protein Kinase C (PKC)

Hiperglikemi mengawali sintesis dari aktivator protein kinase C endogen, diacylglycerol. Kelebihan aktivasi dari protein kinase C-Betha 2 pada jaringan kardiovaskular pada hewan coba diabetes telah dilaporkan. Perubahan dari protein kinase vaskular berpengaruh pada permeabilitas, kekuatan kontraktilitas, dan pengaruh pada proliferasi sel (Kawano, 2014).

Kelebihan dari aktivasi protein kinase C menyebabkan iskemia pada saraf tepi melalui peningkatan permeabilitas vaskular dan penebalan pada membran basalis dan menyebabkan neuropati (Kawano, 2014).

1.1.8 Peran Stres Oksidatif

Radikal bebas merupakan faktor utama dalam terjadinya neuropati DM melalui peningkatan proses glikolitik. Stres oksidatif dan oksigen reaktif spesies (ROS) menghubungkan mediator fisiologis dan inisiator metabolik yang terlibat dalam kerusakan progresif serabut saraf, disfungsi, dan gangguan neuropati DM.

Simultan dengan radikal bebas selama proses glikolitik, stres oksidatif membahayakan DNA mitokondria, protein, dan membran. Bahkan, kerusakan mitokondria terjadi karena pembentukan surplus ROS atau nitrogen reaktif spesies (RNS). Hiperglikemia menginduksi perubahan mitokondria seperti pelepasan sitokrom C, aktivasi caspase 3, perubahan biogenesis dan fisi, yang semua menyebabkan kematian sel yang terprogram. Pengurangan potensial aksi mitokondria (MMP) dengan ATP yang mengakibatkan masuknya glukosa. Proses ini menyebabkan surplus transport elektron oksidan ke dalam mitokondria.

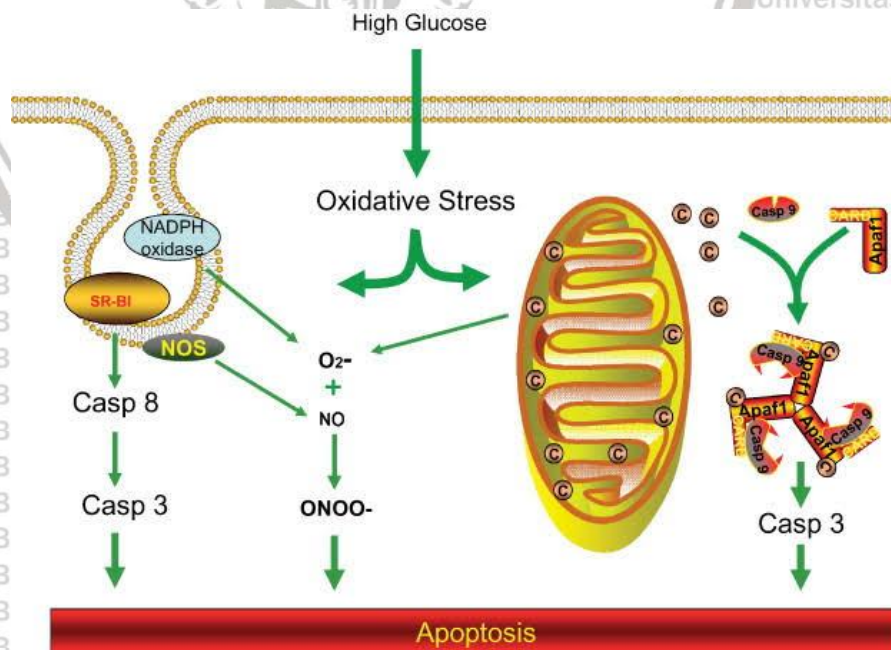
Neurotropik pendukung seperti neurotropin-3 (NT-3) dan faktor pertumbuhan saraf (NGF) juga menurun akibat cedera mitokondria. Stres oksidatif dalam

hubungannya dengan hiperglikemia yang mengaktivasi poly ADP-ribose polymerase (PARP) yang selanjutnya memotong nicotinamide adenin dinukleotida (NAD^+) menjadi nicotinamide dan ADP-ribose residu. Proses ini berlanjut dengan hubungan ke protein nuklear dan menyebabkan perubahan transkripsi dan ekspresi gen, depleksi NAD^+ , stres oksidatif, dan pengalihan glikolisis intermediet menjadi jalur patogenik lain seperti PKC dan AGEs (Gambar 2.3). Secara kolektif, polioliol, AGEs, PKC, hexosamine, dan PARP, semua berkontribusi terhadap kerusakan saraf secara bersama-sama. Jalur AGEs dan polioliol terbuka memodifikasi kapasitas redoks dari sel baik dengan melemahnya komponen yang dibutuhkan dari glutasi atau dengan produksi langsung dari ROS. Jalur hexosamine, PKC, dan PARP menunjukkan kerusakan yang dimediasi melalui ekspresi protein inflamasi (Hosseini and Abdollahi, 2013)

Banyak mekanisme yang meregulasi jalur high glucose induced apoptosis. Salah satunya yaitu pembentukan superoxide. Mitokondria sangat berperan dalam memediasi glucose induce apoptosis. Glukosa yang tinggi mengganggu transport electron yang menghasilkan peningkatan oksidasi oksigen oleh koenzim Q dan pembentukan superoksida. Superoksida kemudian bereaksi dengan nitrit oksida untuk membentuk peroksinitrit, molekul yang sangat toksik. Peroksinitrit menyebabkan disfungsi dari protein, oksidasi lipid dan memodifikasi DNA, yang menyebabkan apoptosis dan nekrosis sel. Oleh karena itu hiperglikemia dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas dan stress oksidatif. High glucose induced stress oksidatif akan melalui jalur metabolisme glukosa itu sendiri. Reduksi glukosa menjadi sorbitol oleh aldose reductase akan menggunakan NADPH yang sebaliknya akan mengganggu pembentukan NADPH dari reduced glutathione

(GSH) yang akan menyebabkan kerusakan DNA. Pemberian l-cysteine akan meningkatkan glutathione yang mencegah glucose induced DNA damage dan efek proteksi dari l cysteine akan dihilangkan oleh inhibitor γ -glutamylcysteine synthase, enzim yang mengubah sistein menjadi glutathione (Smart and Li, 2007).

Selain perannya sebagai sumber ROS, rongga intramembrane mitokondria mengandung berbagai protein yang dilepaskan ke dalam sitosol untuk menyebabkan kematian sel. Salah satunya yang paling banyak diteliti yaitu protein proapoptosis, sitokrom-c, yang akan memediasi molekul adaptor apoptosis protease activating factor 1 (Apaf-1) ketika ada ATP dan membentuk apoptosom. Setiap apoptosom dapat mengambil 7 dimer caspase-9, (enzim protease apoptosis) yang menyebabkan aktivasi enzim. Hal ini menyebabkan proteolitik dan maturasi katalitik enzim caspase-3 dan caspase lain yang memediasi apoptosis. (smart and li, hyperglycemia cell death. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.3 (Smart and Li, 2007)



Gambar 2.3 Aktivasi caspase 3 melalui jalur stress oksidatif

1.1.9 Kalsium dan Apoptosis

Ada konsensus yang berkembang bahwa berbagai bentuk kematian sel (nekrosis, apoptosis dan autofagi) diperrankan oleh kalsium (Ca^{2+}). Apoptosis merupakan proses eliminasi sel yang penting untuk embriogenesis, perkembangan dan homeostasis jaringan. Disregulasi atau gangguan apoptosis memiliki konsekuensi yang merusak. Telah diketahui bahwa konsentrasi kalsium sitosol [Ca^{2+}] merupakan kunci dari fungsi seluler seperti kontraksi, sekresi hormon dan neurotransmitter dan modulasi metabolisme (Berridge, Lipp and Bootman, 2000) (Rizzuto and Pozzan, 2019) (Clapham, 2007). Selain itu, Ca^{2+} juga memiliki fungsi utama dalam pembelahan mitosis berbagai jenis sel, dan sebaliknya dalam regulasi kematian sel (Pinton *et al.*, 2008). Diketahui bahwa kelebihan Ca^{2+} seluler menyebabkan aktivasi protease dan fosfolipase yang menyebabkan pembengkakan mitokondria. Namun, data terbaru menyatakan fungsi Ca^{2+} juga berperan dalam pengaturan jenis kematian sel lainnya. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa peningkatan [Ca^{2+}] terjadi, baik pada tahap awal dan akhir dari jalur apoptosis. Patofisiologi hubungan Ca^{2+} dan apoptosis terlihat pada gambar 2.4. (Pinton *et al.*, 2008). Efek kalsium intrasel dalam patofisiologi neuropati terlihat pada gambar 2.5.

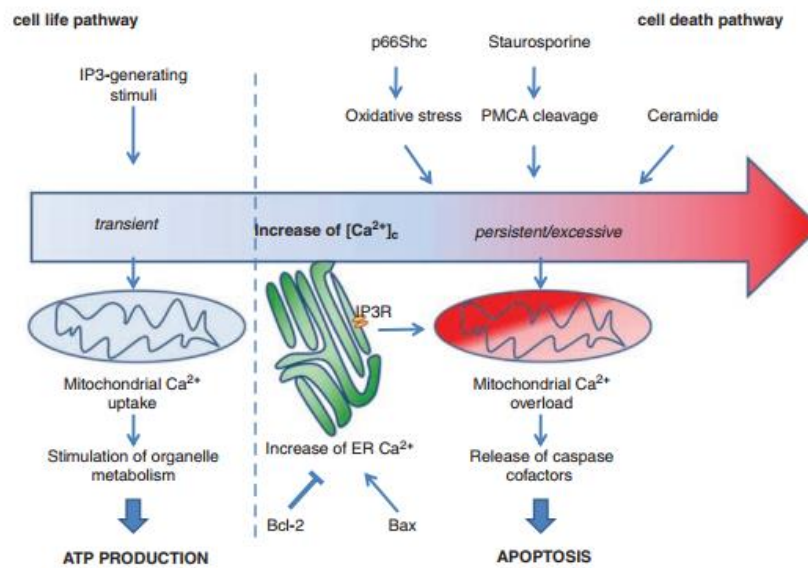
Studi mengenai homeostasis Ca^{2+} pada apoptosis menunjukkan hubungan dengan protein Bcl-2. Bcl-2 telah terdeteksi terkait dengan bagian luar membran mitokondria, ER, nukleus dan sitoplasma (Rizzuto and Pozzan, 2019). Bcl-2 menurunkan regulasi pemasukan Ca^{2+} melalui membran plasma. Pada prinsipnya, penurunan Ca^{2+} di ER dapat menyebabkan aktivasi masuknya Ca^{2+} , dan dengan

demikian menginduksi elevasi Ca^{2+} yang berkepanjangan antara lain apoptosis yang dimediasi Ca^{2+} (Pinton *et al.*, 2008).

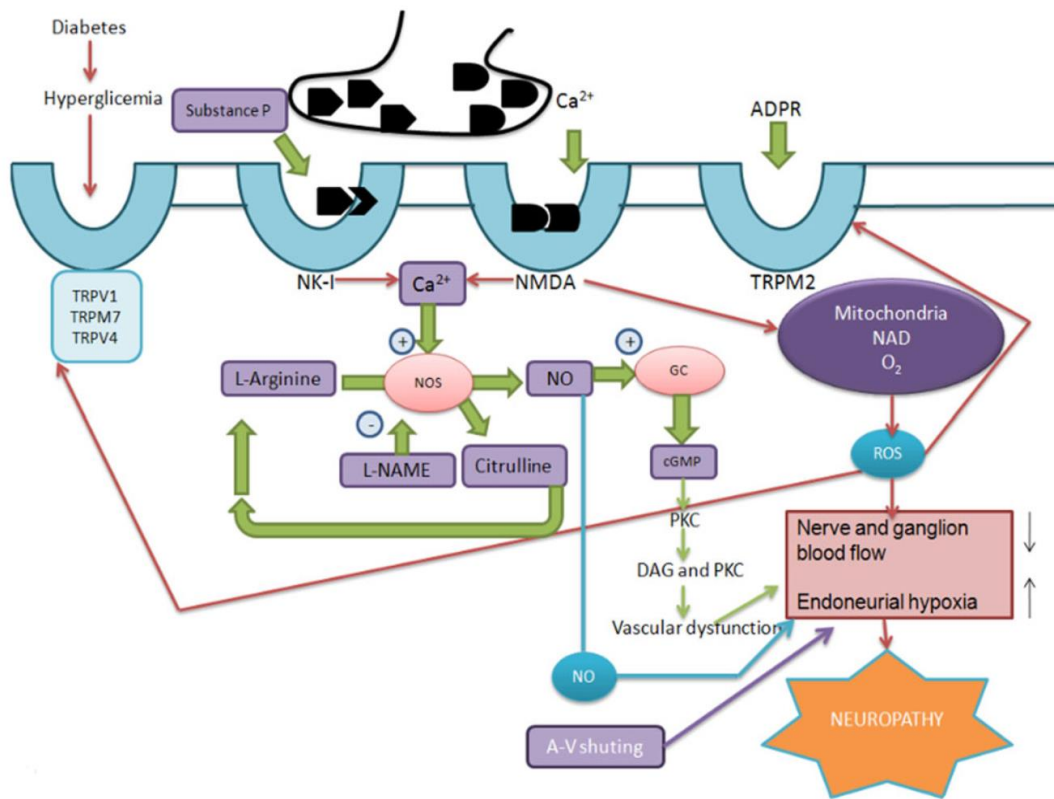
Endoplasmik reticulum (ER) dan mitokondria dihubungkan secara fungsional melalui sinyal Ca^{2+} . Selama sinyal Ca^{2+} , beberapa Ca^{2+} secara berkala dilepaskan ke sitoplasma melalui reseptor *inositol 1,4,5-trisphosphate* (InsP_3Rs).

Sedangkan hampir seluruh Ca^{2+} dikembalikan ke ER oleh pompa *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase* (SERCA), sebagian masuk ke mitokondria melalui *voltage-dependent anion channel* (VDAC) di *outer mitochondrial membrane* (OMM), dan melalui uniporter di *inner mitochondrial membrane* (IMM). Ca^{2+} di matrix mitokondria kemudian kembali ke ER melalui serangkaian exchangers, kanal, dan pompa. Pertama, Ca^{2+} meninggalkan matrix melalui exchanger $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dan memasuki sitoplasma melalui VDAC. Saat di sitoplasma, Ca^{2+} dapat dibawa kembali ke ER oleh pompa SERCA (Davidson and Duchen, 2006)

Neuropati sensorik DM berkaitan dengan gangguan homeostasis dan sinyal Ca^{2+} pada neuron DRG. Peningkatan influx Ca^{2+} ditemukan pada beberapa sel neuron sensori hewan coba termasuk tikus BioBred/Worchester (BB/W) dan STZ-tikus diabetes. Saraf sensori STZ-tikus diabetes menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA dari *voltage-gated calcium channel*. Peningkatan masuknya kalsium pada diabetes juga berhubungan dengan gangguan modulasi G protein – coupled dari fungsi kanal kalsium (Wu, 2008).



Gambar 2.4 Perbedaan kalsium dalam aktivasi metabolisme dan apoptosis (Pinton *et al.*, 2008)



Gambar 2.5 Patofisiologi kelebihan Ca^{2+} intrasel dalam neuropati

Sel meregulasi kadar Ca^{2+} intrasel. Kelebihan Ca^{2+} intra sel akan menyebabkan aktivasi proses tidak tepat yang secara normal terjadi pada kadar Ca^{2+} rendah, menyebabkan gangguan metabolisme dan kematian sel. Kelebihan muatan Ca^{2+} terutama melalui N-methyl-aspartate (NMDA) reseptor, memberikan efek toksik pada neuron. NMDA reseptor mediated Ca^{2+} entry memicu sinyal kaskade neurotoksik yang melibatkan aktivasi neuronal nitrit oksida synthase (nNOS), pembentukan ROS toksik dan NO dan aktivasi dari protein proapoptosis poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). Diabetes dan hiperglikemia akan menstimulasi influx Ca^{2+} menuju sitosol

melalui kanal TRP dengan mengaktifasi produksi ROS. Depolarisasi yang terus menerus pada membrane mitokondria dan peningkatan pembentukan ROS akan mengaktifasi kanal transient receptor potential (TRP) seperti TRP-melastatin 2 (TRPM-2), TRP vanilloid (TRPV) dan voltage gate Ca²⁺ channel (VGCC) dan influx Ca²⁺ akan meningkat dengan aktivasi via ROS. Jalur molekuler ini menyebabkan gejala neurologis. (Naziroğlu, Merve Dikici and Dursun, 2012)

1.2 Amlodipin pada Neuron

Obat-obatan antagonis Ca²⁺, berperan sebagai antioxidant dan melindungi dari stress oksidatif serta kerusakan lebih lanjut. Diketahui bahwa stress oksidatif berperan penting terhadap patogenesis molecular terutama mempengaruhi regulasi redox sinyal selular. Stress oksidatif berhubungan dengan adanya radikal bebas yang diketahui sebagai *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Velena *et al.*, 2016).

Kalsium antagonis dan antioksidan dapat memodifikasi proses patologis yang berkaitan dengan stress oksidatif dengan cara mempengaruhi potensial sinyal redox selular (Velena *et al.*, 2016).

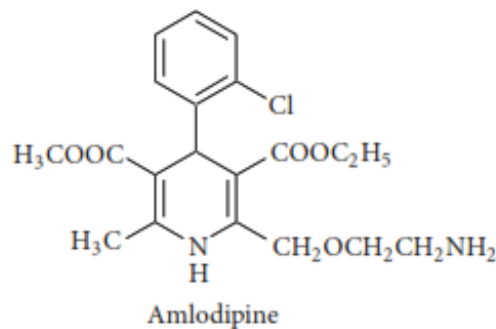
Amlodipin, (RS)-3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (AML), memiliki efek antioksidan pada pembuluh darah in vitro dan generasi ketiga dihydropyridine CCB yang banyak digunakan sebagai terapi pasien hipertensi. Amlodipine diketahui memiliki afinitas tertinggi (amlodipine > verapamil >> diltiazem) untuk membrane bilayer. Aktivitas antioksidan amlodipine berkaitan dengan sifat reduksinya atau donor hydrogen. Kemampuan donasi proton dan electron pada molekul peroksidase lipid menghambat proses LP (Velena *et al.*, 2016).

Amlodipin bekerja sebagai efektor ROS dan NOS pada beberapa system model stress oksidatif. Sifat antioksidan dari amlodipine yang telah diteliti oleh Vitolina *et al* baik secara in vitro maupun in vivo, ditemukan bahwa sifat

antioksidan amlodipine menghambat kerusakan oksidatif lipid, terutama yang berkaitan dengan sel membrane dan partikel lipoprotein (LDL) (Velena *et al.*, 2016).

Pada kondisi eksperimental *in vitro*, amlodipine menunjukkan aktivitas antioksidan dan ARA, dengan cara menghambat pembentukan peroksidasi lipid dan menangkap ROS. Konsentraasi amlodipine 2ng/mL mampu menurunkan dialdehyde malonic dan aktivitas superoxide dismutase (SOD) dalam darah. Terapi antihipertensi dengan amlodipine menurunkan stress oksidatif di area otak dan menurunkan tekanan darah tanpa meningkatkan reflek pada aktivitas saraf simpatis (Velena *et al.*, 2016).

Efek oksidatif H₂O₂ menyebabkan kanal Ca terbuka, sehingga sifat redoks dari CCB DHP dapat menambah ciri CCB. 1,4-DHP memiliki aktivitas modulasi stress oksidatif spectrum luas. DHP memiliki sifat mengurangi dan menghambat lipid peroksidasi, bekerja sebagai reduktan pada system kima sederhana, dan stabilisasi berbagai system biologis (LDL, mitokondria, mikrosom, sel, dan jaringan) terhadap stress oksidatif (Velena *et al.*, 2016).



Gambar 2.6 Struktur turunan 1,4-dihydropyridine (Velena *et al.*, 2016)

1.3 Neuron Kultur Dorsal Root Ganglion (DRG)

Kultur sel neuron telah banyak diketahui merupakan ala yang ampuh dalam menjawab pertanyaan terkait neurobiologi; bentuk neurit/akson dan elongasi,

sinaps, pelepasan neurotransmitter, sinyal elektrik, dan protein intraseluler yang mana semuanya dapat menggunakan kultur neuron primer.

Kultur saraf primer dapat digunakan untuk mempelajari dasar-dasar respon seluler dan molekuler terhadap gangguan eksternal atau internal ke sistem homeostasis saraf dan berfungsi sebagai model patologi *in vitro* yang baik (Melli and Höke, 2009).

Sel neuron DRG merupakan sel saraf sensori yang bekerja pada susunan saraf perifer dan pusat. Sel ini terletak di ganglion sumsum tulang belakang bagian *dorsal root* dan memiliki akson eferen yang mentransmisikan stimulus sensori ke system saraf pusat. Penggunaan neuron sensori DRG memiliki beberapa keuntungan: 1) neuron sensori DRG menggambarkan target seluler utama dari neurotoksisitas diabetik; 2) memungkinkan untuk memperkaya populasi neuronal dengan neuron NGF-dependen yang secara klinis paling sering rentan; 3) memungkinkan untuk co-culturing neuron DRG dengan sel Schwann yang terlibat pada neuropati diabetic secara elektrofisiologi dan patologi ultrastructural (Melli and Höke, 2009)

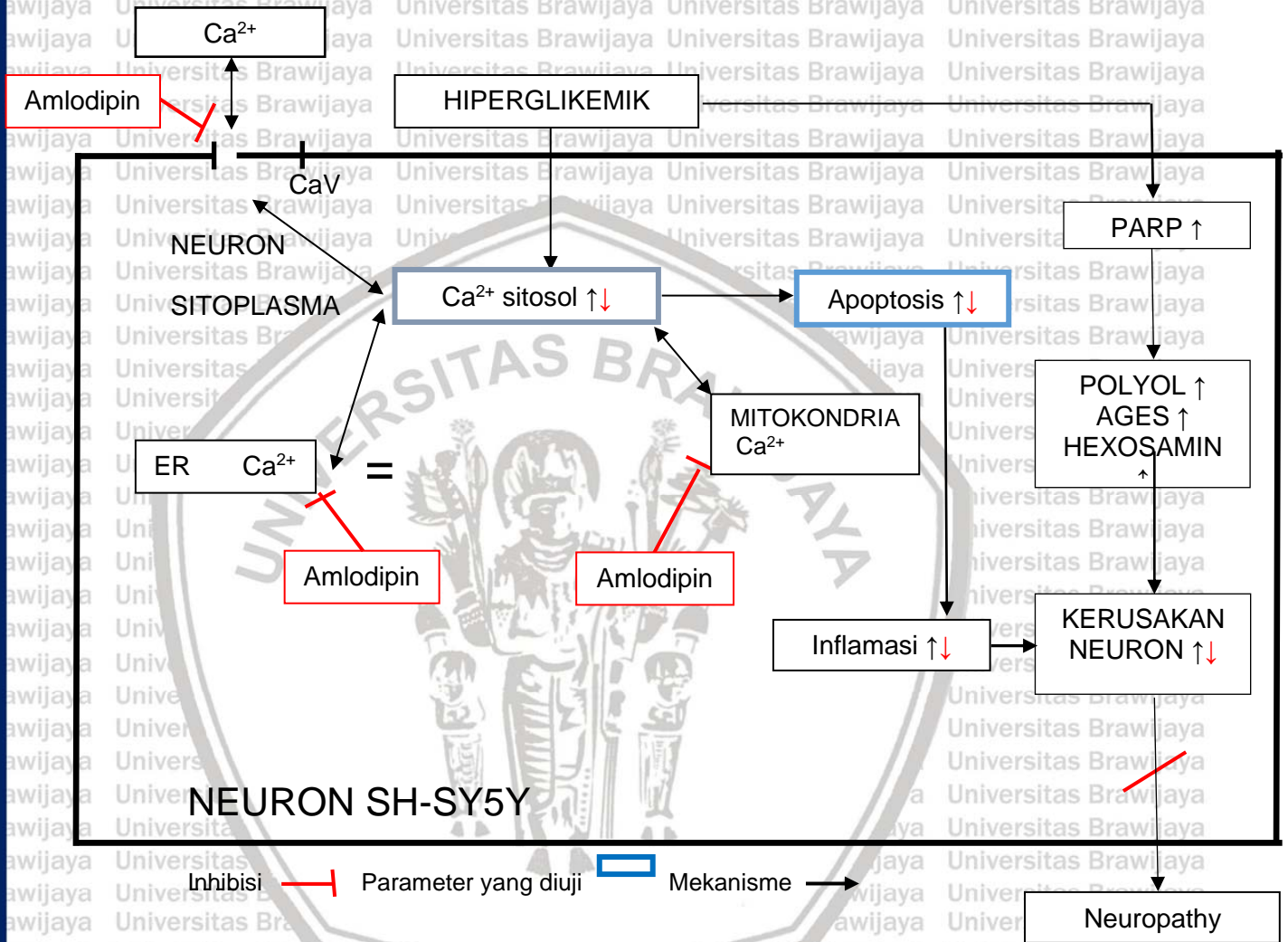
Pemisahan untuk kultur neuron DRG dari sel schwan dan sel glia lainnya. Pemisahan neuron sensori dapat dipertahankan dalam kultur selama > 10 hari, dan dapat dilakukan perekaman elektrofisiologi, gambaran kalsium, dan transfer gen viral. Seluruh proses ekstraksi dan kultur dapat dilakukan dalam waktu kurang dari 7 jam. Sel neuron DRG dibagi menjadi 3 kategori berdasarkan ukuran sel soma: kecil, sedang, besar. Secara umum, sel DRG neuron dengan ukuran diameter < 30µm diduga nociceptors, sedangkan neuron berukuran diameter besar (>30µm) diduga non-nociceptive, klasifikasi ini berdasarkan penelitian sebelumnya

mengenai hubungan kecepatan konduksi dengan ukuran sel neuronal (Pasnoor *et al.*, 2013)



BAB 3
KERANGKA KONSEP

1.1 Kerangka konsep



Hiperglikemi melalui jalur poliol dan pembentukan AGE dapat meningkatkan dianggap menjadi penyebab utama berbagai mekanisme downstream, termasuk stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan membrane serta sistem seluler lainnya. Pada penelitian disebutkan bahwa penurunan dini dari suatu sistem intraseluler yang berhubungan, yaitu sinyal

homeostasis kalsium sitosol dan fisiologi mitokondria (Fernyhough and Nigel. A, 2011).

Homeostasis calcium (Ca^{2+}) pada sel saraf yang mengalami gangguan atau tidak normal dan gangguan fungsi mitokondria juga dapat terjadi pada neuropati karena diabetes. Manifestasi terutama dari berubahnya sinyal kalsium terjadi pada membrane plasma dan kalsium di intraselular pada neuron sensoris dan berhubungan dengan ketidaknormalan ER. Terganggunya sinyal kalsium aksonal pada neuropati diabetes akan menyebabkan munculnya degenerasi aksonal pada neuropati perifer (Fernyhough and Nigel. A, 2011).

Pada kondisi hiperglikemi terjadi peningkatan kalsium *voltage-dependent* sel neuron SH-SY5Y. Mekanisme ini menyatu pada tingkat stress oksidatif dan mengaktifkan PARP yang diketahui menyebabkan akumulasi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dan mengganggu sinyal kalsium (Wu, 2008).

Amlodipin diharapkan dapat mengembalikan stabilitas dan homeostasis calcium intraselular sehingga dapat mencegah mekanisme *down regulate* pada kondisi inflamasi dan apoptosis, sehingga dapat mengurangi rusaknya neuron yang merupakan penyebab terjadinya neuropati diabetes.

1.2. Hipotesis penelitian

Berdasar pada kerangka konsep penelitian, di ajukan hipotesis penelitian antara lain:

1. Paparan Hiperglikemia kronis pada neuron kultur sel SH - SY5Y *cell line* manusia akan meningkatkan kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis

2. Penambahan amlodipin pada neuron kultur sel SH - SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemi kronis akan menurunkan kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis sel
3. Adanya hubungan antara *calcium cytosol* dan apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemia kronis
4. Adanya hubungan antara kalsium sitosol dan apoptosis pada neuron kultur sel SH - SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemia kronis dan amlodipin



BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental, memakai neuron sel kultur SH - SY5Y *cell line* dari manusia. Tujuan utama penelitian ini yaitu mengetahui adanya pengaruh atau hubungan pemberian amlodipine terhadap kalsium sitosol dan apoptosis pada neuron sel kultur SH-SY5Y *cell line* yang terpapar hiperglikemik kronis. Pada penelitian ini menggunakan neuron *cell line* manusia yaitu sel SH-SY5Y yang didapatkan dari neuroblastoma yang dilaporkan dapat dipakai juga untuk penelitian pada saraf tepi. Pada induksi hiperglikemi kronis, sel dipapar selama 6hari, dengan glukosa konsentrasi 50mM. *Calcium Channel Blocker* yang digunakan yaitu amlodipin dimana titik kerjanya pada membran sel, amlodipine juga yang memiliki pengaruh di retikulum endoplasma dan di mitokondria. Apoptosis diamati menggunakan metode Caspase 3.

1.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang meliputi tahapan kultur sel, induksi hiperglikemia, paparan amlodipin, pewarnaan dan pengukuran parameter terkait dilakukan di

Laboratorim Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian ini berlangsung pada bulan Maret-September 2019.

1.3 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel neuron sel SH - SY5Y *cell line*.

Sel selanjutnya ditempatkan di tabung dalam keadaan beku dengan suhu - 80°C lalu diletakkan dalam tangki nitrogen cair. Sel selanjutnya disimpan pada tabung steril dalam bentuk aliquot untuk menghindari *multiple thawing*.

1.4 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer pada penelitian eksperimental, antara lain:

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

Pada rumus di atas p merupakan jumlah perlakuan/ treatment sementara n yaitu jumlah sampel yang digunakan. Banyaknya kelompok perlakuan yang dipakai sejumlah 4 sesuai dengan yang telah disebutkan sebelumnya, sehingga sampel yang digunakan adalah sebanyak 6 berdasarkan perhitungan dari rumus Federer tersebut.

1.5 Variabel dan Definisi Operasional Variabel Penelitian

1.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan di penelitian ini yaitu dosis amlodipin sementara untuk kadar glucose yang dipakai untuk menyebabkan keadaan hiperglikemia, dibagi menjadi kelompok:

- Kelompok A: merupakan kelompok yang dipapar glukosa 25 mM. Dimana kelompok A1 tidak diberi amlodipine, kelompok A2 diberikan amlodipine 2 μ M.

- Kelompok B: merupakan kelompok yang dipapar glukosa 50 mM. Dimana kelompok B1 tidak diberi amlodipine, kelompok B2 diberikan amlodipine 2 μ M.

Penelitian oleh Russel et al, menyebutkan bahwa pada kondisi normoxia, konsentrasi glukosa kurang dari 25mM atau lebih dari 25mM dapat menginduksi kematian sel yang terprogram melalui caspase 3. Sedangkan banyak penelitian menyebutkan bahwa sel neuron primer membutuhkan konsentrasi basal glukosa lebih tinggi (~25 mM) dibandingkan sel non-neuronal (~5 mM), diakibatkan tingginya tingkat metabolisme dan kebutuhan energy pada neuron aktif, daripada sel non-neuron (Shao and Bayraktutan, 2013).

1.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung terdiri dari konsentrasi *calcium cytosol* (Ca^{2+}) dan apoptosis pada Neuron kultur sel *SH-SY5Y* Cell Line.

1.5.3 Definisi Operasional

1. Amlodipin, (RS)-3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (AML), memiliki efek antioksidan pada pembuluh darah *in vitro* dan generasi ketiga dihydropyridine CCB yang banyak digunakan sebagai terapi pasien hipertensi. Amlodipine diketahui memiliki afinitas tertinggi (amlodipine > verapamil >> diltiazem) untuk membrane bilayer. Aktivitas antioksidan amlodipine berkaitan dengan sifat reduksinya atau donor hydrogen.

Kemampuan donasi proton dan electron pada molekul peroksidase lipid menghambat proses LP (Velena et al., 2016).

Efek oksidatif H₂O₂ menyebabkan kanal Ca terbuka, sehingga sifat redoks dari CCB DHP dapat menambah ciri CCB. 1,4-DHP memiliki aktivitas modulasi stress oksidatif spectrum luas. DHP memiliki sifat mengurangi dan menghambat lipid peroksidasi, bekerja sebagai reduktan pada system kima sederhana, dan stabilisasi berbagai system biologis (LDL, mitokondria, mikrosom, sel, dan jaringan) terhadap stress oksidatif (Velena et al., 2016).

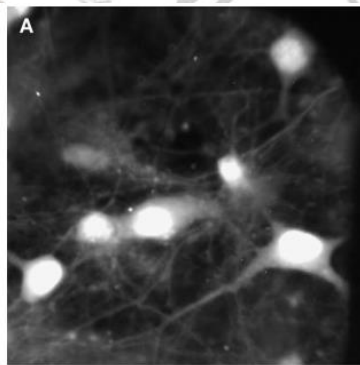
2. Hiperglikemia:

Kondisi hiperglikemia diinduksi dengan cara menambahkan suatu monosakarida, yaitu D-glukosa pada media culture dengan dosis 25 mM dan 50 mM supaya memunculkan efek hiperglikemia pada kultur sel neuron. Paparan kronis diberikan selama 6hari (Vincent et al., 2010).

3. Calcium cytosol (Ca²⁺):

Calcium cytosol adalah ion kalsium intraselular yang merupakan kunci dari fungsi selular seperti kontraksi, sekresi hormon dan neurotransmitter dan modulasi metabolisme (Berridge, Lipp and Bootman, 2000) (Rizzuto and Pozzan, 2019) (Clapham, 2007). Selain itu, Ca²⁺ juga memiliki fungsi utama dalam pembelahan mitosis berbagai jenis sel, dan sebaliknya dalam regulasi kematian sel (Pinton et al., 2008). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa peningkatan [Ca²⁺] terjadi, baik pada tahap awal dan akhir dari jalur apoptosis.

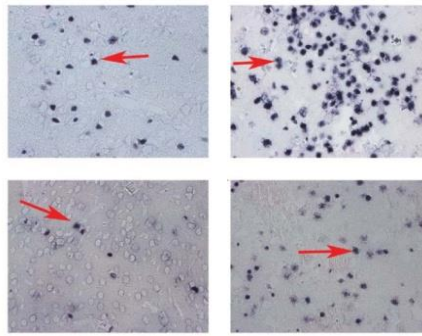
Neuropati sensorik DM berkaitan dengan gangguan homeostasis dan sinyal Ca^{2+} pada neuron. Peningkatan influx Ca^{2+} ditemukan pada beberapa sel neuron sensori hewan coba termasuk tikus BioBred/Worchester (BB/W) dan STZ-tikus diabetes. Peningkatan masuknya kalsium pada diabetes juga berhubungan dengan gangguan modulasi G protein – coupled dari fungsi kanal kalsium (Wu, 2008). Pengamatan kalsium ion menggunakan pewarnaan Fluo-3 dengan memakai *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) untuk memvisualisasikan perpendaran (*fluorescence*) dari panjang gelombang calcium yang sensitif terhadap fluorophore (Feng, 2012).



4. Apoptosis

Merupakan kematian sel dimana berubahnya sel (menyusut) dan kondensasi nuklear, fragmentasi DNA, dan formasi apoptosis bodies.

Pengukuran apoptosis memakai Caspase 3 kit. Setelah fragmentasi DNA kemudian dihitung sel yang mengalami apoptosis dan hasilnya dilaporkan berupa apoptosis index (Darzynkiewicz *et al*, 2008; Garrity *et al.*, 2003).



5. Human Neuron *SH-SY5Y* Cell Line:

SH-SY5Y merupakan sekelompok badan sel pseudo-unipolar yang mana memiliki fungsi yaitu menghantarkan impuls sensorik aferen dari reseptor saraf perifer ke medula spinalis dan sistem saraf pusat yang berada lebih proksimal dari saraf perifer. (Zhang & Verkman, 2015; Krames, 2015).

SH - SY5Y adalah derivat turunan dari *human neuroblastoma cell* yang sering dipakai sebagai model *in vitro* pada penelitian - penelitian neuronal.

Sel neuroblastoma manusia *SH - SY5Y* (The European Collection of Cell Culture) didapatkan dari CLS Cell Lines Service dengan nomor katalog 300154 (Uğuz *et al*, 2016; (Yin, Baillie and Vetter, 2016).

1.6 Alat dan Bahan

Alat dan bahan untuk Kultur sel neuron *SH-SY5Y* Cell Line

1. Media kultur menggunakan micropipet 1ml, botol duran 100ml, sticker label, penisiline-streptomisin 1% (1ml), FBS qualified 10 % (10ml), glutamine (2 mM), glucose (21 mM), bikarbonate (38 mM) dan media MEM.

2. Panen sel menggunakan pipet pasteur, micropipet 1ml, tabung steril dan sticker label/pena marker, Phosphate Buffered Saline, tripsin - EDTA 1 kali (Tripsin 0,25%) serta media culture.
3. Subkultur menggunakan pipet pasteur, micropipet 1ml, tabung steril, culture dish, sticker label/pena penanda dan media culture.
4. Perhitungan sel menggunakan micropipet, hemasitometer, counter, mikroskop (inverted / cahaya) dan suspensi sel hasil pemanenan.

Alat dan bahan untuk Induksi Hiperglikemi dan Perlakuan dengan CCB

1. Induksi hiperglikemia menggunakan micropipet, DMSO, media kultur, dan glucose.
2. Perlakuan menggunakan Penghambat Kanal Kalsium yaitu micropipet, ddH₂O, media culture, serta Penghambat Kanal Kalsium.

Alat dan bahan untuk pengukuran konsentrasi kalsium sitosol (Ca²⁺) dan apoptosis

1. Pengukuran kalsium sitosol (Ca²⁺) terdiri dari pinset, micropipet, kaca slide, fura-2 / AM, Pluronic - F127, EBSS, media culture, ionomisin, dan *Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)*
2. Pengukuran apoptosis dengan metode Caspase 3 terdiri dari micropipet, Phosphate Buffered Saline, proteinase - K, H₂O₂, *Caspase 3 fragmentasi DNA labeling*, substrat DAB, Mayer Hematoxillen, entelan, aquades, *cover glass, slide glass*, pinset, dan mikroskop cahaya

1.7 Prosedur Penelitian

Kultur Cell Line

A. Peralatan dan Bahan Kultur Sel

1. Formula kultur lengkap menggunakan micropipet 1ml, botol duran 100ml, sticker label, penisiline-streptomisin 1 % (1ml), FBS qualified 10 % (10ml), glutamine (2mM), glucose (21mM), bikarbonate (38mM), serta media MEM.
2. Panen sel menggunakan pipet pasteur, micropipet 1ml, tabung steril dan sticker lale/pena marker, Phosphate Buffered Saline, tripsin - EDTA 1 kali (Tripsin 0,25 %), serta media culture.
3. Sub kultur menggunakan pipet pasteur, micropipet 1ml, tabung steril, culture dish, sticker lale/pena penanda, dan media culture.
4. Perhitungan sel menggunakan micropipet, hemasitometer, counter, mikroskop (inverted / cahaya), dan suspensi sel hasil panen.
5. Induksi Hiperglikemia menggunakan micropipet, DMSO, media culture, dan glucose.
6. Perlakuan menggunakan Penghambat Kanal Kalsium antara lain mikropipet, ddH₂O, media culture, dan Penghambat Kanal Kalsium.

B. Prosedur Kerja

Cell thawing dan penumbuhan sel

1. Pesiapan media kultur yang terdiri dari penisiline-streptomisin 1% (1ml), FBS qualified 10 % (10ml), glutamine (2 mM), glucose (21 mM),

bikarbonat (38 mM) dan media MEM. Selanjutnya media kultur di filter menggunakan membrane yang berukuran 0,2 μ m.

2. Sel yang akan digunakan dikeluarkan dari nitrogen cair atau freezer -80 $^{\circ}$ C dan dibiarkan pada suhu ruangan hingga cair.

3. Pengambilan sel menggunakan micropipet lalu masukkan secara perlahan kedalam media kultur yang telah dipersiapkan.

4. Tabung steril di tutup dengan rapat lalu di sentrifugasi dengan kecepatan 900rpm selama 10 menit dengan suhu 24-25 $^{\circ}$ C.

5. Tabung steril dibawa ke LAF selanjutnya disterilkan dengan alcohol 70%.

6. Tabung steril di buka dan supernatan (media kultur) di tuang ke dalam pembuangan.

7. Sejumlah 4ml media kultur baru ditambahkan dan disentrifugasi kembali dengan 900rpm selama 10 menit

8. Kedalam flask kultur masing - masing dimasukkan sel sejumlah 2 ml.

9. Ke dalam tiap-tiap flask kultur dimasukkan media kultur sebanyak 5 ml.

10. Dilakukan pengamatan kondisi sel dengan mikroskop lalu sel di masukkan kedalam incubator CO₂.

11. Diamati viabilitas setelah 24 jam, jika sel bertumbuh dengan baik maka dilanjutkan pada tahap sub kultur. Sub kultur dapat dilakukan jika sel sudah konfluen. Jika sel masih belum konfluen maka dilakukan penggantian media dan sel diinkubasi kembali.

Panen Sel

1. Pengambilan sel dari inkubator CO₂ dan dilakukan pengamatan kondisi sel. Jika sel 80% konfluen maka sel dapat dipanen
2. Media kultur di buang dengan menggunakan pipet pasteur steril
3. Pencucian sel dilakukan sebanyak 2 kali menggunakan larutan Phosphate Buffered Saline
4. Dilakukan penambahan tripsin-EDTA secara rata dan sel diinkubasi di dalam incubator selama 3 menit
5. Dilakukan penambahan media kultur untuk menginaktifkan tripsin. Resuspensi sel menggunakan pipet sampai sel terlepas satu persatu (tidak bergerombol)
6. Dilakukan pengamatan kondisi sel menggunakan mikroskop. Jika sel masih bergerombol lakukan resuspensi lagi
7. Setelah sel terlepas satu persatu selanjutnya dipindahkan ke tabung steril yang lain.

Sub kultur

1. Media kultur yang berada dalam flask di buang lalu dilakukan pencucian menggunakan Phosphate buffered saline 15ml sebanyak 2x
2. Dilakukan penambahan trypsin/EDTA sebanyak 2 ml lalu dilakukan inkubasi sel dalam inkubator selama 5 menit sehingga sel lepas
3. Setelah sel lepas ambil \pm 300 μ l dan masukkan ke dalam tabung steril lainnya. Lakukan penambahan media kultur sebanyak 7 ml dan resuspensi kembali, lalu sentrifugasi dengan kecepatan 1000rpm selama 8 menit.

4. Resuspensi pelet menggunakan media culture, lalu masukkan ke dalam flask. Amati sel dengan mikroskop lalu masukkan ke dalam incubator.
5. Sel dibiakkan dengan penggantian media culture secara berkala hingga didapatkan kerapatan sel yang diharapkan.

Penghitungan Sel

1. Dilakukan pengambilan sel dari incubator CO₂. Setelah sel 80% *confluent* selanjutnya sel dapat dipanen.
2. Media di buang dengan menggunakan pipet pasteur steril.
3. Dilakukan pencucian sel sebanyak 2 kali dengan Phosphate Buffered Saline.
4. Dilakukan penambahan tripsin - EDTA dengan rata dan inkubasi di dalam incubator selama 3 - 5 menit.
5. Dilakukan penambahan media ± 2 – 3 ml untuk menonaktifkan tripsin. Resuspensi sel menggunakan pipet hingga sel lepas satu-persatu (tidak bergerombol).
6. Amati kondisi sel dengan mikroskop. Resuspensi lagi apabila masih ada sel yang bergerombol.
7. Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000rpm selama 10 menit, supernatan dipisahkan dan endapan sel di resuspensi dengan menggunakan 1 mL media kultur.
8. Ambil 1 μ l sel yang telah dipanen, lalu tambahkan dengan 9 μ l ddH₂O dan dipipetkan ke hemasitometer.

9. Dilakukan penghitungan sel menggunakan mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya biasa) dengan *counter*.
10. Sejumlah sel yang di perlukan dipindahkan ke dalam tabung steril yang lain dan tambahkan sesuai dengan konsentrasi sel yang diinginkan.

Induksi hiperglikemia

1. Penumbuhan sel neuron pada kultur dish yang terdiri dari 4 *well* dan diletakkan kaca penutup steril pada sisi dasarnya, tiap-tiap *well* berisi 1×10^4 sel neuron.
2. Apabila keadaan sel sudah 60% konfluen, selanjutnya ditambahkan methylglyoxal untuk menginduksi hiperglikemia.
3. Larutkan glucose dengan DMSO untuk membuat larutan stok. Selanjutnya dilakukan penambahan glucose di media yang akan dipakai sampai kandungan glucose pada media adalah 5mM, 25mM dan 50mM.
4. Media yang terdapat pada tiap-tiap *well* di aspirasi lalu di cuci dengan Phosphate Buffered Saline sebanyak 2x, kemudian tambahkan dengan media baru yang sudah mengandung glucose.
5. Selanjutnya sel dilakukan inkubasi selama 6x24 jam pada incubator. Setelah 6x24 jam lakukan pengamatan morfologi sel.

Perlakuan dengan Penghambat Kanal Kalsium

1. Sejumlah kelompok sel neuron yang ditumbuhkan pada *culture dish* yang terdiri dari 4 *well* dan terdapat *cover glass* pada bagian bawahnya, baik yang telah di induksi dengan glucose untuk keadaan hiperglikemia maupun

sel kontrol, diberi perlakuan menggunakan berbagai dosis Penghambat Kanal Kalsium yaitu amlodipin.

2. Bahan kimia yang memiliki fungsi sebagai Penghambat Kanal Kalsium dilarutkan menggunakan ddH₂O untuk membuat larutan stok, selanjutnya di tambahkan ke dalam media kultur sehingga di dapatkan konsentrasi akhir pada media culture yaitu 10nM dan 100nM.
3. Media yang berada dalam *well* kemudian di aspirasi, lakukan pencucian menggunakan Phosphate Buffered Saline sebanyak 2 kali, kemudian tambahkan media yang telah diberi dengan berbagai dosis Penghambat Kanal Kalsium.
4. Sel lalu di inkubasi selama 6 x 24 jam di dalam incubator. Setelah 6 x 24 jam lakukan pengamatan Calcium dan Caspase 3.

Pengukuran Konsentrasi Kalsium Sitosol

1. Pada total 4 kelompok perlakuan sel neuron yang telah di tumbuhkan, lakukan aspirasi media lalu bilas dengan menggunakan Phosphate Buffered Saline sebanyak 2 kali.
2. Selanjutnya sel di beri perlakuan dengan fluo-3. Sel di inkubasi selama 30 - 60 menit. Sejak dari tahapan ini hingga pengamatan, semuanya dikerjakan pada keadaan gelap.
3. Setelah diinkubasi, selanjutnya lakukan proses *recovery* dengan menambah larutan EBSS dan inkubasi pada suhu 37⁰ C selama 30 menit.
4. Sebelum sel divisualisasi, sel di inkubasi selama 2 menit.

5. *Cover glass* yang ada pada bagian bawah *well* di ambil memakai pinset sterile dan diletakkan di atas *slide glass*, jauhkan dari paparan cahaya yang berlebihan.
6. Lakukan visualisasi sel dengan *confocal laser scanning microscopy* menggunakan eksitasi 364 nm dengan emisi yang di koleksi dari 515-560 nm.

Pengamatan apoptosis dengan metode Caspase 3

1. Sel dikerok dengan scrapper diresuspensi dengan Phosphate Buffered Saline (1x10 pangkat 6)
2. Sel difiksasi dgn 1% PFA dalam Phosphate Buffered Saline kondisi dingin, inkubasi 15 menit
3. Sentrifus 300xg selama 5 menit, supernatan dibuang
4. Sel dicuci dengan Phosphate Buffered Saline disentrifus 300xg (diulangi 1x lg)
5. Pelet diresuspensi dlm Phosphate Buffered Saline
6. Ditambah ethanol 70% dingin, inkubasi 30 menit di -20 drjt
7. Sel diresuspensi, sentrifus 300xg selama 5 menit, buang ethanol dgn aspirasi
8. Sel diresuspensi dengan wash buffer, sentrifus 300xg selama 5 menit, supernatan dibuang (diulangi 1x lg)
9. Sel diresuspensi dengan DNA labelling solution, inkubasi selama 60 menit 37 drjt, goyang setiap 15 menit

10. Ditambah rinse buffer, sentrifus 300xg, 5 menit, buang supernatan (ulangi 1x lg)
11. Resuspensi dengan antibody solution (anti brdu-fitc) inkubasi tempat gelap 30 menit RT
12. Ditambahkan PI/rnase A solution, inkubasi 30 menit gelap RT
13. Sel dianalisa dengan flowcytometry

1.8 Analisa Data

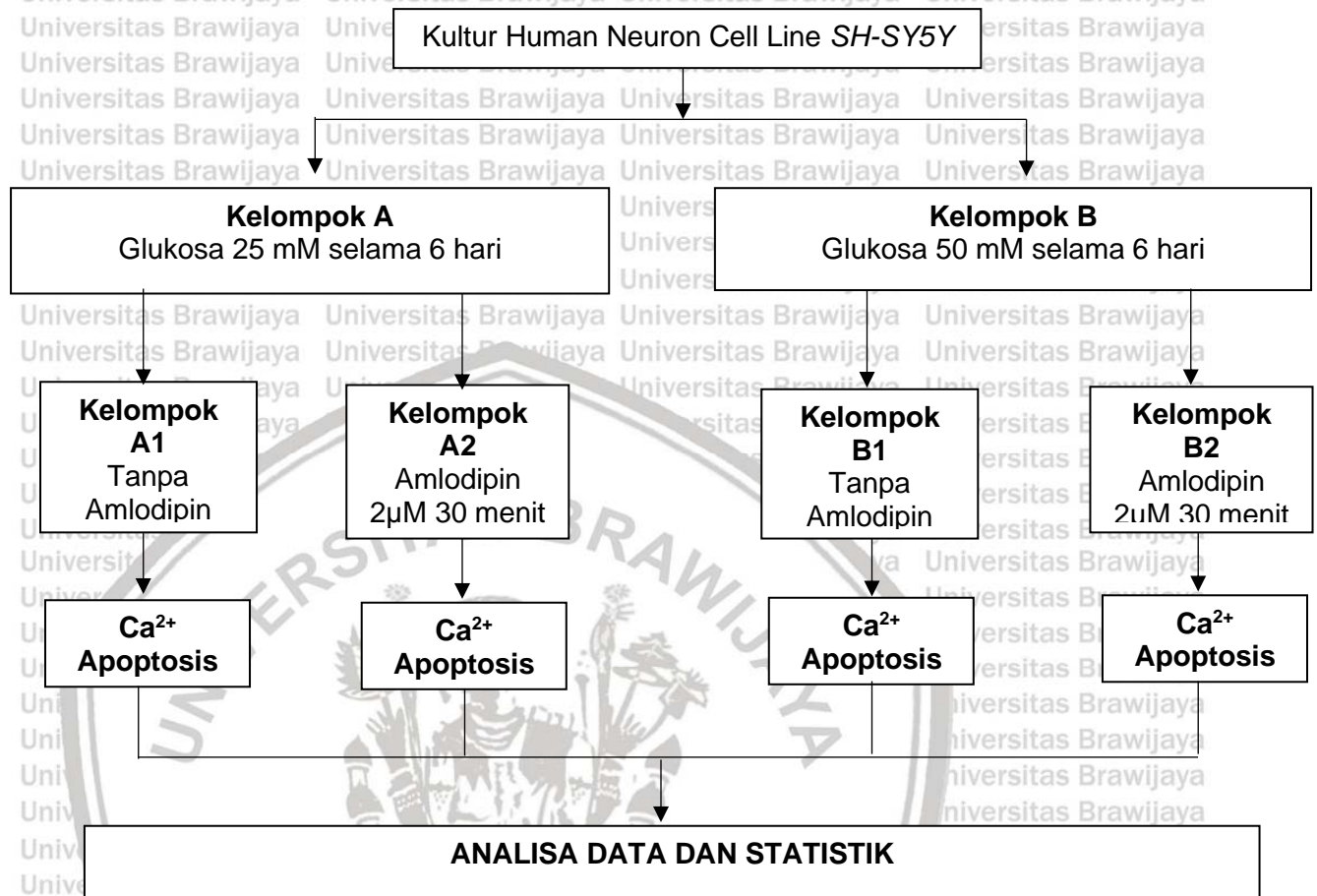
Data yang didapatkan dianalisa secara berkelompok dengan cara menghitung mean/rata-rata masing-masing kelompok yang selanjutnya diuji menggunakan uji statistik yang sesuai. Data yang diperoleh ditunjukkan sebagai mean \pm standard deviasi ($X \pm SD$) dari tiap-tiap kelompok yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik.

Normalitas dan homogenitas data dilakukan sebelum pengujian. Data dikatakan normal jika nilai uji normalitas *kolmogorov-smirnov* (jika jumlah sampel besar) atau *saphiro-wilk* (jika jumlah sampel kecil) bernilai $>0,05$ dan atau homogen dengan nilai uji *homogeneity of variance* $>0,05$.

1.9 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memenuhi semua persyaratan etik dan telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang dengan Nomor 685-KEP-UB pada tanggal 7 Februari 2017.

1.10 Diagram Alur Penelitian





BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

1.1 Deskripsi Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Lembaga Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dari bulan Maret hingga September 2019. Penelitian ini menggunakan kultur *human neuron SH-SY5Y* sebagai sampel penelitian dan menggunakan desain penelitian sebenarnya (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* dengan *randomized post test only controlled group design* pada kultur sel SH-SY5Y.

Pada penelitian ini diamati ekspresi kalsium dan apoptosis (dengan metode caspase 3) yang masing-masing terbagi menjadi 4 kelompok. Keempat kelompok tersebut terbagi menjadi kelompok:

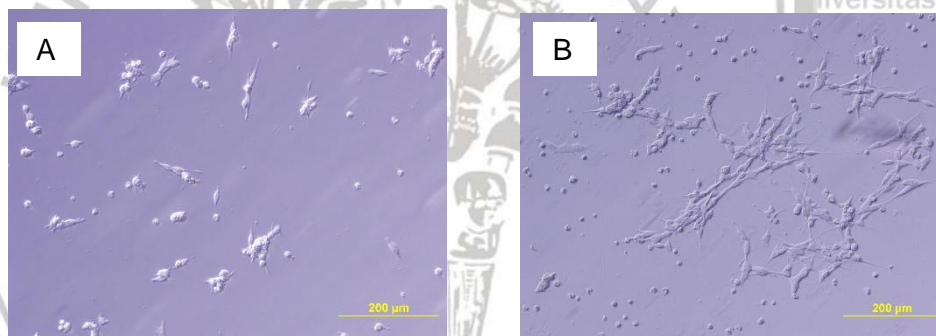
- a) kultur *human neuron SH-SY5Y* yang dipapar glukosa 25 mM dan tidak mendapatkan amlodipin;
- b) kultur *human neuron SH-SY5Y* yang dipapar glukosa 25 mM dan mendapatkan amlodipin 2 μ M;
- c) kultur *human neuron SH-SY5Y* yang dipapar glukosa 50 mM dan tidak mendapatkan amlodipin;
- d) kultur *human neuron SH-SY5Y* yang dipapar glukosa 50 mM dan mendapatkan amlodipin 2 μ M.

Pada pengamatan kalsium digunakan 6 well untuk masing-masing kelompok pengamatan sementara pada pengamatan caspase 3 menggunakan 3 well untuk masing-masing kelompok pengamatan. Paparan glukosa diberikan secara

kronis pada masing-masing kelompok selama 6 hari, selanjutnya diberikan amlodipin selama 30 menit.

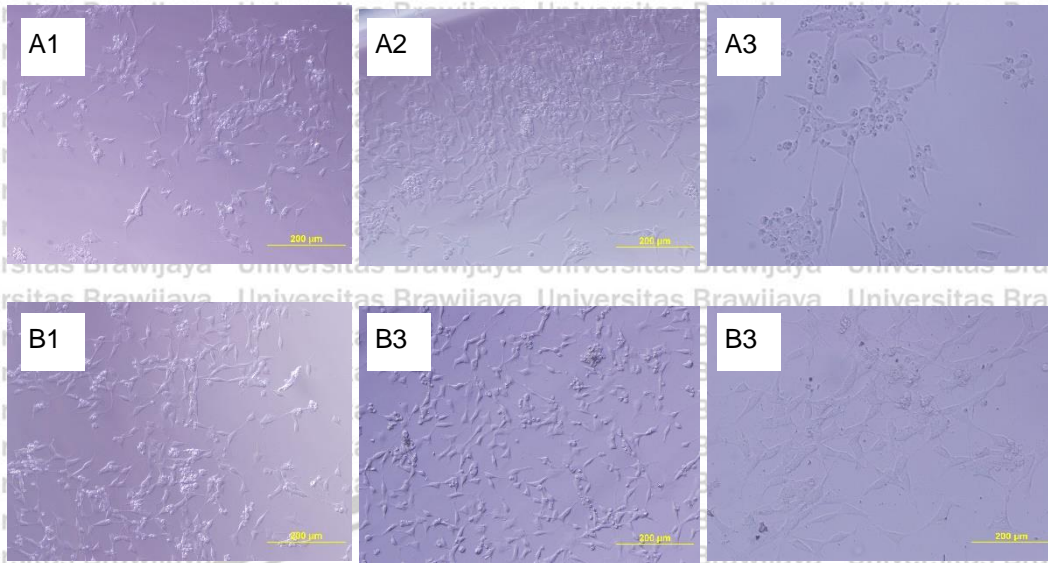
Penelitian diawali dengan thawing dimana sel di keluarkan dari nitrogen cair atau freezer -80°C dan disimpan pada suhu ruang hingga cair. Sel dimasukkan ke meda kultur berupa penisiline-streptomisine 1 % (1 ml), FBS qualified 10% (10ml), glutamine (2mM), dan media MEM. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 10 menit lalu dipindahkan pada flask yang kemudian diberi media kultur.

Setelah 24 jam diamati viabilitas, apabila sel berkembang dengan baik maka dapat dilanjutkan pada tahap sub kultur. Sub kultur dikerjakan apabila sel sudah konfluen atau padat. Media kultur harus di ganti setiap 4 – 7 hari (Kovalevich and Langford, 2016).

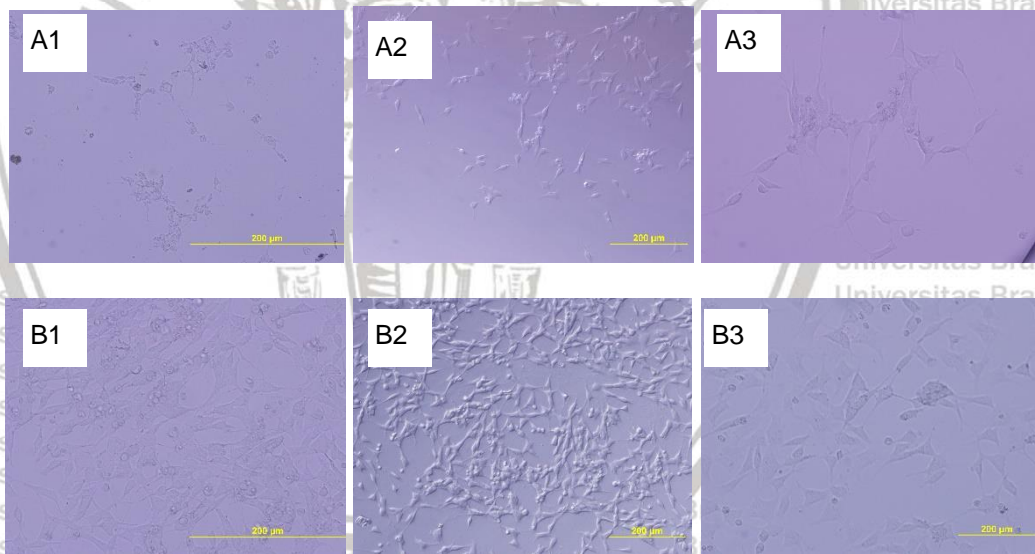


Gambar 5.1 Kultur sel *Human Neuron SH-SY5Y* sebelum perlakuan yang akan diamati ekspresi (A) Kalsium dan (B) Caspase 3

Setelah sel confluent, selanjutnya dilakukan induksi hiperglikemia. dilakukan penambahan methylglyoxal untuk induksi hiperglikemik. Glukosa di tambahkan ke dalam media kultur yang akan dipakai hingga kandungan glukosa di dalam media adalah 25 mM dan 50 mM.



Gambar 5.2 Kultur sel *Human Neuron SH-SY5Y* yang akan diamati ekspresi Kalsium, diberi perlakuan (A1) Glukosa 25 mM hari-0. (A2) Glukosa 25 mM hari-3. (A3) Glukosa 25 mM hari-6. (B1) Glukosa 50 mM hari-0. (B2) Glukosa 50 mM hari-3. (B3) Glukosa 50 mM hari-6.



Gambar 5.3 Kultur sel *Human Neuron SH-SY5Y* yang akan diamati ekspresi Caspase 3, diberi perlakuan (A1) Glukosa 25 mM hari-0. (A2) Glukosa 25 mM hari-3. (A3) Glukosa 25 mM hari-6. (B1) Glukosa 50 mM hari-0. (B2) Glukosa 50 mM hari-3. (B3) Glukosa 50 mM hari-6.

Pengamatan ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada kultur *human neuron SH-SY5Y* dilakukan pada hari ke-6 dengan menggunakan mikroskop konfokal, masing-masing diambil 6 lapang pandang kultur *human neuron SH-SY5Y* secara acak.

Ekspresi Kalsium sebelum diamati dengan mikroskop konfokal, kultur *human neuron SH-SY5Y* difiksasi dan diwarnai dengan immunostaining fluo-3, sedangkan untuk Caspase 3 dilakukan pewarnaan terlebih dahulu kemudian difiksasi dengan PFA 4%.

Ekspresi Kalsium dan Caspase 3 diamati dan diukur melalui pemeriksaan immunostaining pada sampel kultur *human neuron SH-SY5Y* menggunakan mikroskop konfokal pembesaran 400x. Sel yang mengekspresikan Kalsium akan berpendar berwarna hijau dan sel yang mengekspresikan Caspase 3 akan berpendar berwarna merah. Pengukuran dilakukan dengan cara menghitung rerata sel *human neuron SH-SY5Y* yang mengekspresikan Kalsium dan Caspase 3. Data karakteristik rerata ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada pengamatan hari ke-6 disajikan pada tabel 5.2.

Tabel 5.1 Deskripsi karakteristik hasil pemeriksaan ekspresi Kalsium dan Caspase-3

Kelompok	Rerata Ca ± SD	Rerata Casp3 ± SD
Glukosa 25 mM	40.45 ± 9.91	10.46 ± 2.66
Glukosa 50 mM	63.86 ± 16.82	19.27 ± 4.68
Glukosa 25 mM + Amlodipin 2 µM	24.60 ± 7.52	7.10 ± 1.90
Glukosa 50 mM + Amlodipin 2 µM	39.31 ± 11.44	11.05 ± 3.70

1.2 Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada kultur sel *human neuron SH-SY5Y*

Ekspresi Kalsium dan caspase-3 pada kultur *human neuron SH-SY5Y* dari masing-masing kelompok perlakuan diamati pada hari ke-6. Tabel 5.1 menyajikan perbedaan rata-rata ekspresi Ca²⁺ sitosol dan Caspase 3 pada kultur *human neuron*

SH-SY5Y dari masing-masing kelompok perlakuan yang diamati pada hari ke-6. Uji statistik yang digunakan untuk menilai uji beda rerata ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada masing-masing kelompok perlakuan adalah uji parametrik T independen (*independent t-test*).

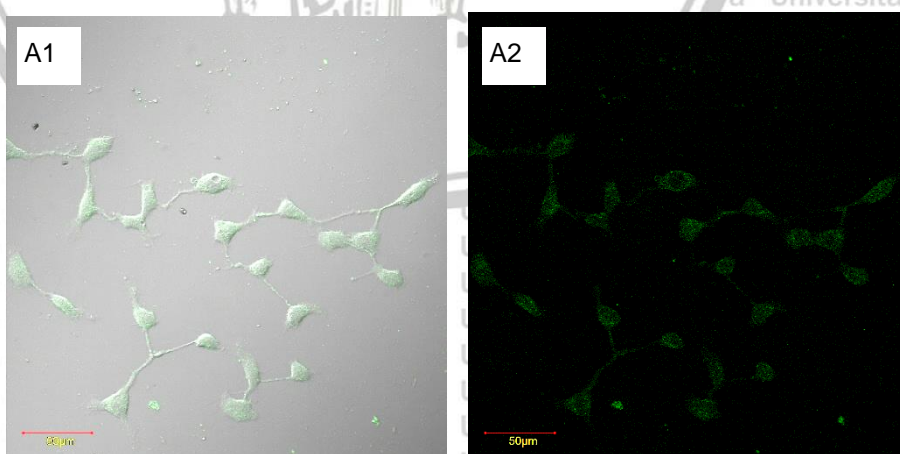
1.2.1 Uji Beda Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Kalsium pada kultur sel *human neuron SH-SY5Y* tanpa pemberian amlodipin

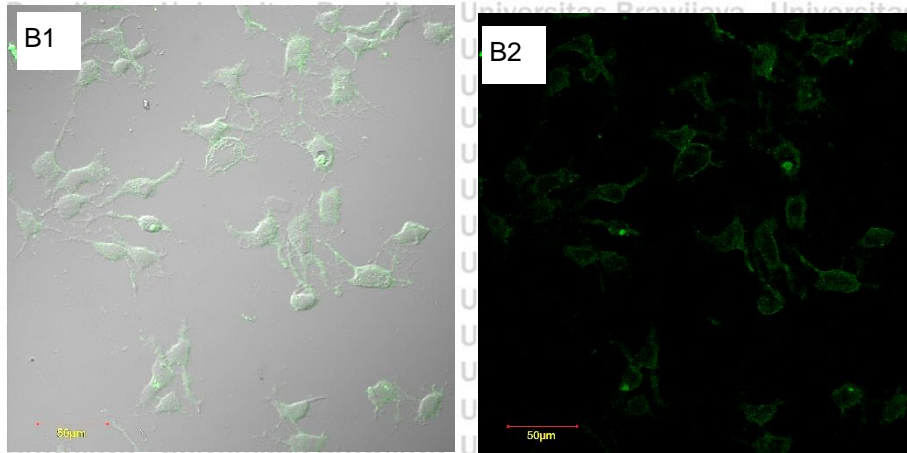
Tabel 5.2 Pengaruh Hiperglikemi terhadap Ekspresi Kalsium pada Sel Neuron SH-SY5Y

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji normalitas	p-value
Glukosa 25 mM (Normoglikemia kontrol) (N = 33)	40.45 ± 9.91	0.142	0.004 (< 0.05)
Glukosa 50 mM (Hiperglikemia kontrol) (N = 34)	63.86 ± 16.81	0.222	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh hiperglikemi terhadap ekspresi kalsium sitosol dapat dilihat pada Tabel 5.3. Nilai $p = 0.004$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi kalsium sitosol pada sel SH-SY5Y normoglikemi dan hiperglikemia.





Gambar 5.4. Pengamatan Ekspresi Kalsium pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi kontrol dan hiperglikemi kontrol (A1) Perlakuan normoglikemi kontrol SI (superimposed). (A2) Perlakuan normoglikemi kontrol (fluoresensi). (B1) Perlakuan hiperglikemi kontrol SI. (B2) Perlakuan hiperglikemi (fluoresensi)

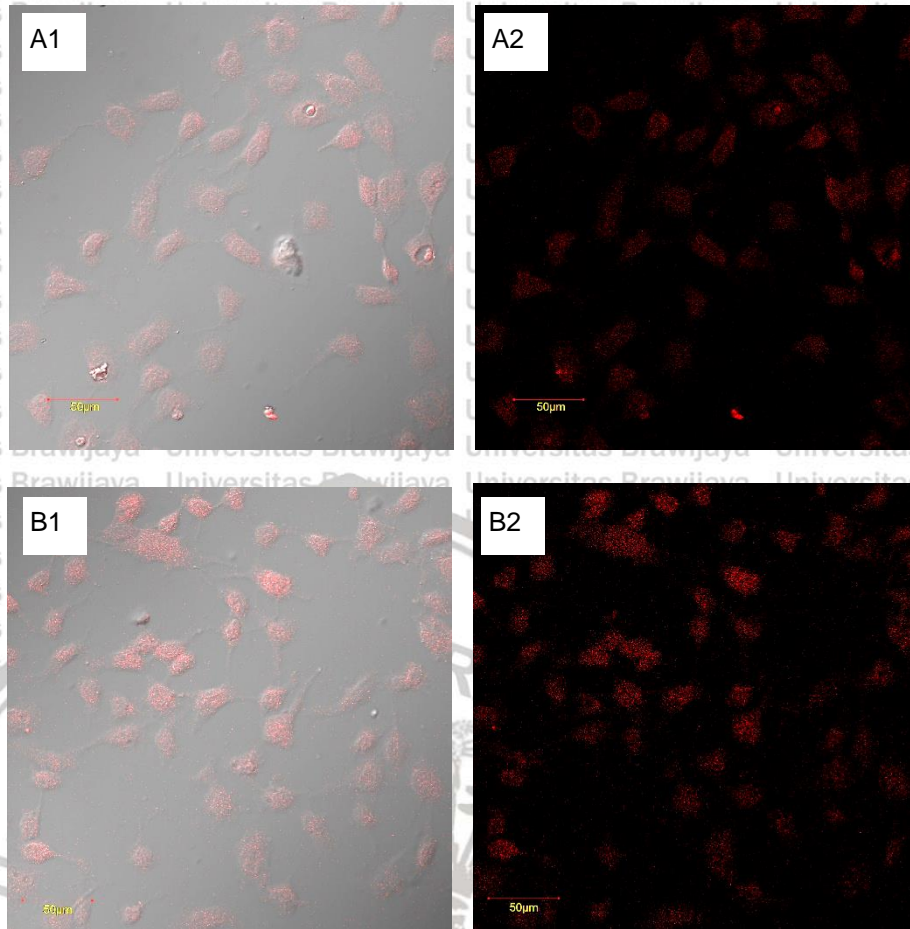
1.2.2 Uji Beda Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Caspase 3 pada kultur sel *human neuron SH-SY5Y* tanpa pemberian amlodipin

Tabel 5.3 Pengaruh Hiperglikemia terhadap Ekspresi Caspase 3 pada sel Neuron SH-SY5Y

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji normalitas	p-value
Glukosa 25 mM (Normoglikemia kontrol) (N = 31)	10.46 ± 2.66	0.06	<0.001 (<0.05)
Glukosa 50 mM (Hiperglikemia kontrol) (N = 63)	19.27 ± 4.68	0.2	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh hiperglikemi terhadap apoptosis yang dilihat dari ekspresi caspase-3 dapat dilihat pada tabel 5.4. Nilai $p = 0.001$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi caspase-3 pada sel SH-SY5Y normoglikemi dan hiperglikemia.



Gambar 5.5 Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi kontrol dan hiperglikemi kontrol (A1) Perlakuan normoglikemi kontrol SI (superimposed). (A2) Perlakuan normoglikemi kontrol (fluoresensi). (B1) Perlakuan hiperglikemi kontrol SI. (B2) Perlakuan hiperglikemi (fluoresensi)

1.3 Pengaruh Pemberian Amlodipin Terhadap Ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada Kultur Sel *human neuron SH-SY5Y*

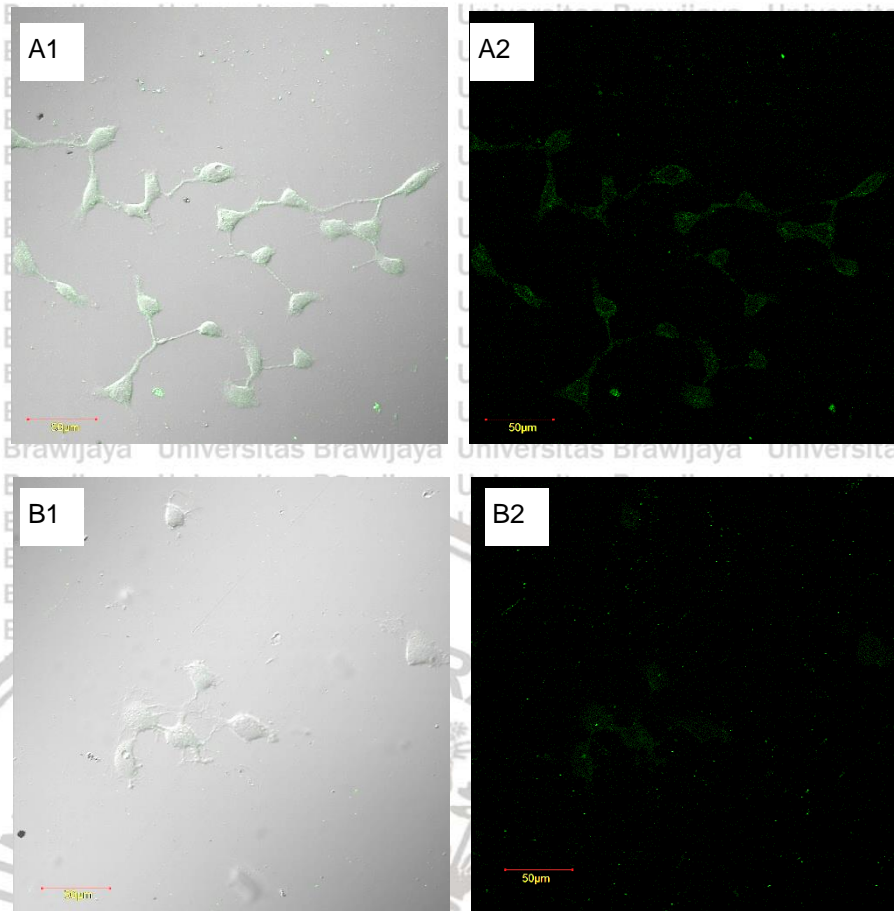
1.3.1 Pengaruh Pemberian Amlodipine terhadap Ekspresi Kalsium pada kondisi normoglikemia

Tabel 5.4 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Kalsium pada Sel Neuron SH-SY5Y pada kondisi normoglikemi

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji normalitas	p-value
Glukosa 25 mM (Normoglikemia Kontrol) (N = 33)	40.45 ± 9.91	0.142	<0.001 (< 0.05)
Glukosa 25 mM + Amlodipin 2 µM (Normoglikemia amlodipin) (N = 43)	24.60 ± 7.53	0.064	

Keterangan : nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada eksperimen kedua dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin pada ekspresi kalsium kelompok sel neuron normoglikemi. Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh amlodipin pada terhadap ekspresi kalsium sitosol sel normoglikemi dapat dilihat pada tabel 5.5. Nilai $p = 0.001$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi kalsium sitosol pada sel SH-SY5Y normoglikemi yang diberi amlodipin dan tanpa amlodipin. Pemberian amlodipin menurunkan rerata ekspresi Ca^{2+} sitosol pada sel normoglikemia.



Gambar 5.6 Pengamatan Ekspresi Kalsium pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi tanpa dan dengan amlodipin
(A1) Perlakuan normoglikemi kontrol SI (superimposed). **(A2)** Perlakuan normoglikemi kontrol (fluoresensi). **(B1)** Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin SI. **(B2)** Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin (fluoresensi)

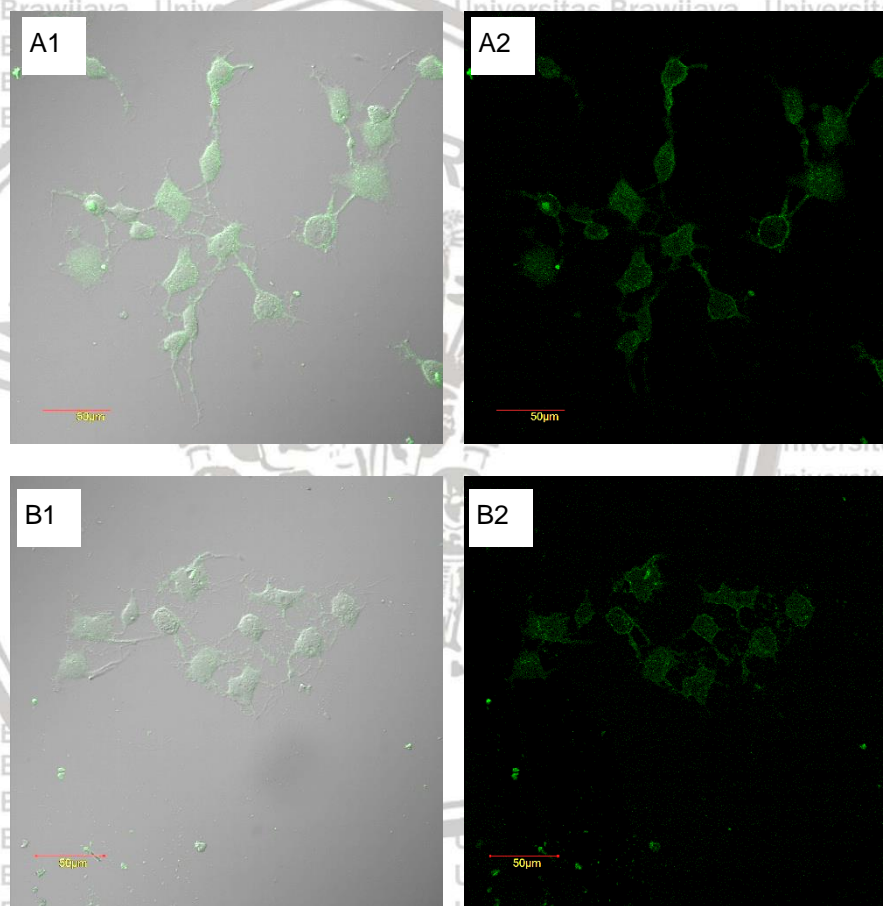
1.3.2 Pengaruh Pemberian Amlodipine Terhadap Ekspresi Kalsium pada Kondisi Hiperglikemia

Tabel 5.5 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Kalsium pada Sel Neuron SH-SY5Y pada kondisi hiperglikemi

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji normalitas	p-value
Glukosa 50 mM (Hiperglikemia kontrol) N = 34	63.86 ± 16.82	0.222	0.015 (< 0.05)
Glukosa 50 + amlodipin 2 µM (Hiperglikemi amlodipine) N= 40	39.31 ± 11.43	0.434	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada eksperimen selanjutnya dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin pada ekspresi kalsium kelompok sel neuron hiperglikemia. Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh amlodipin terhadap ekspresi kalsium sitosol sel hiperglikemia dapat dilihat pada tabel 5.6. Nilai $p = 0.015$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi kalsium sitosol pada sel SH-SY5Y hiperglikemi yang diberi amlodipin dan tanpa amlodipin. Pemberian amlodipin menurunkan rerata ekspresi Ca^{2+} sitosol pada sel hiperglikemia.



Gambar 5.7 Pengamatan Ekspresi Kalsium pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan hiperglikemia tanpa dan dengan amlodipin
(A1) Perlakuan hiperglikemia kontrol SI (superimposed). **(A2)** Perlakuan hiperglikemia kontrol (fluoresensi). **(B1)** Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin SI. **(B2)** Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin (fluoresensi)

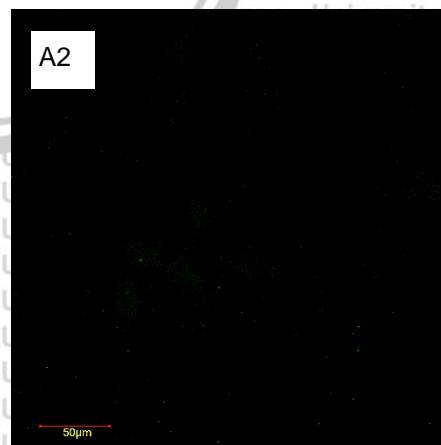
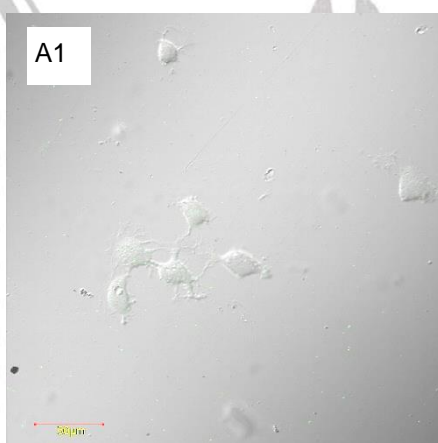
5.2.3 Pengaruh Pemberian Amlodipine 2 μ M Terhadap Ekspresi Kalsium pada Kultur sel *human neuron SH-SY5Y*

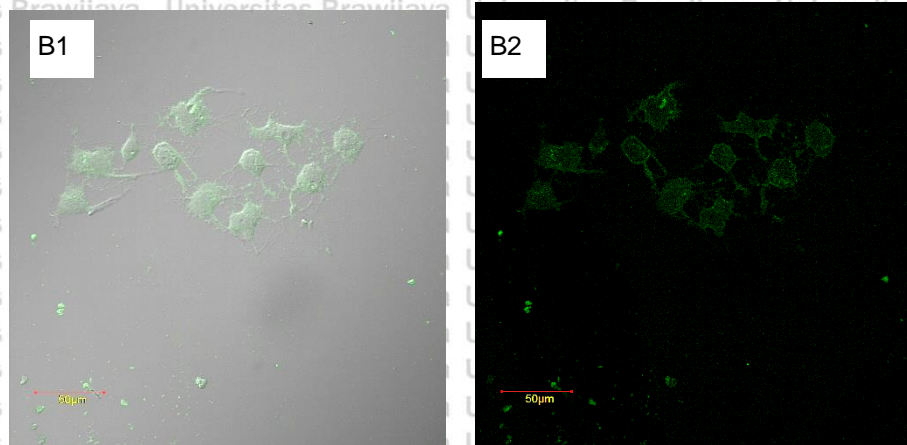
Tabel 5. 6 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Kalsium pada Sel Neuron SH-SY5Y

Perlakuan	Rerata \pm SD	Uji Normalitas	p-value
Glukosa 25 mM + amlodipin 2 μ M (Normoglikemi amlodipine) N= 43	24.60 \pm 7.53	0.064	0.021 (< 0.05)
Glukosa 50+ amlodipin 2 μ M (hiperglikemi amlodipine) N= 40	39.31 \pm 11.44	0.434	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada eksperimen selanjutnya dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin 2 μ M pada ekspresi kalsium kelompok sel neuron normoglikemi dibandingkan hiperglikemia. Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh amlodipin terhadap ekspresi kalsium sitosol antara sel normoglikemi dan hiperglikemia dapat dilihat pada tabel 5.7. Nilai $p = 0.021$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi kalsium sitosol antara sel SH-SY5Y normoglikemi dan hiperglikemi yang diberi amlodipin 2 μ M. Dengan pemberian amlodipin, rerata ekspresi Ca^{2+} sitosol sel hiperglikemia lebih tinggi daripada sel normoglikemia.





Gambar 5.8 Pengamatan Ekspresi Kalsium pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi dan hiperglikemia dengan amlodipin (A1) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin SI (superimposed). (A2) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin (fluoresensi). (B1) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin SI. (B2) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin (fluoresensi)

1.3.3 Pengaruh Pemberian amlodipine terhadap ekspresi Caspase 3 pada kondisi normoglikemia

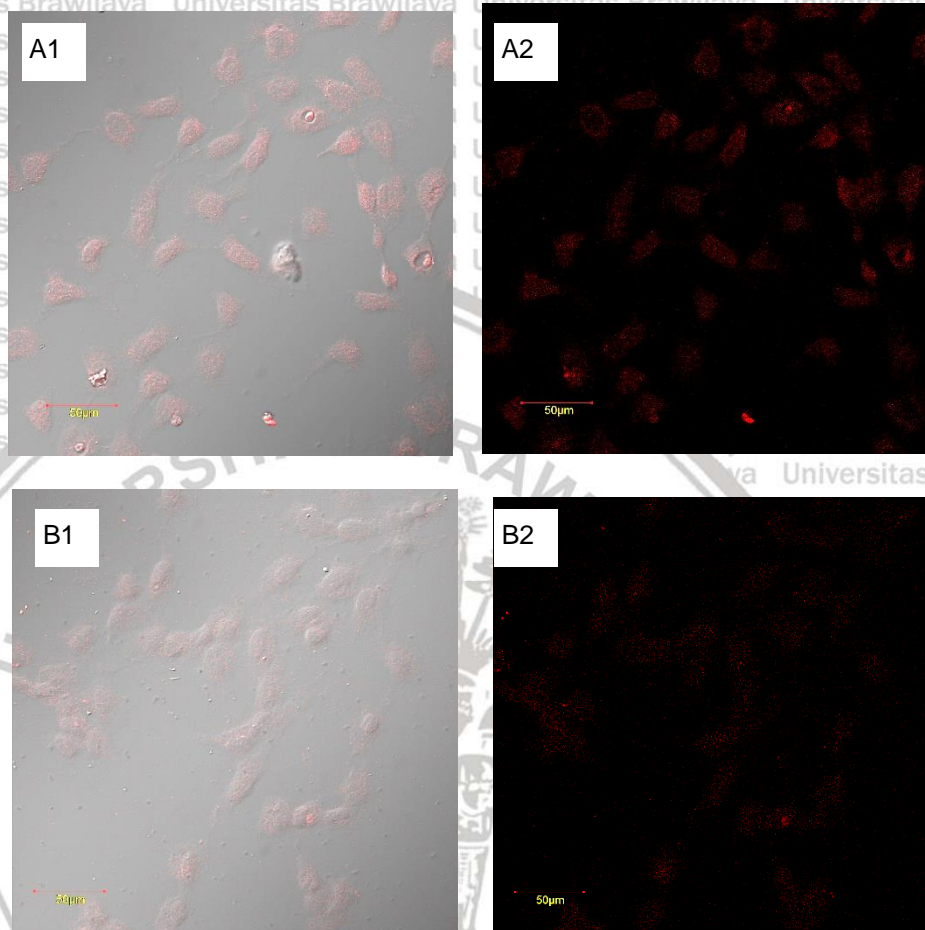
Tabel 5.7 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Sel Neuron SH-SY5Y pada kondisi normoglikemi

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji Normalitas	p-value
Glukosa 25 mM (normoglikemi kontrol) N = 31	10.46 ± 2.67	0.6	0.001 (< 0.05)
Glukosa 25 mM + amlo dipin 2 µM (normoglikemi amlodipine) N = 86	7.1 ± 1.9	0.2	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Eksperimen dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin pada ekspresi caspase-3 kelompok sel neuron normoglikemi. Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh amlodipin pada terhadap ekspresi caspase-3 sel normoglikemi dapat dilihat pada tabel 5.8. Nilai $p = 0.001$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang

bermakna ekspresi caspase-3 pada sel SH-SY5Y normoglikemi yang diberi amlodipin dan tanpa amlodipin. Pemberian amlodipin menurunkan rerata ekspresi caspase-3 pada sel normoglikemia.



Gambar 5.9 Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi tanpa dan dengan amlodipin (A1) Perlakuan normoglikemi kontrol SI (superimposed). (A2) Perlakuan normoglikemi kontrol (fluoresensi). (B1) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin SI. (B2) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin (fluoresensi)

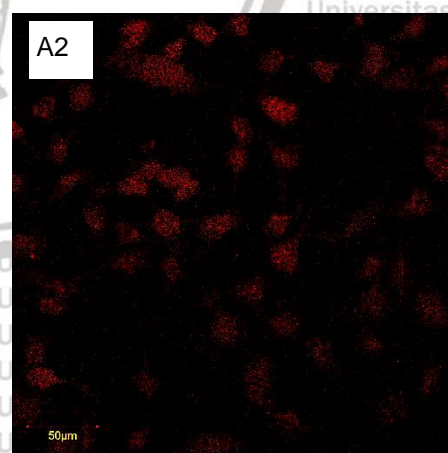
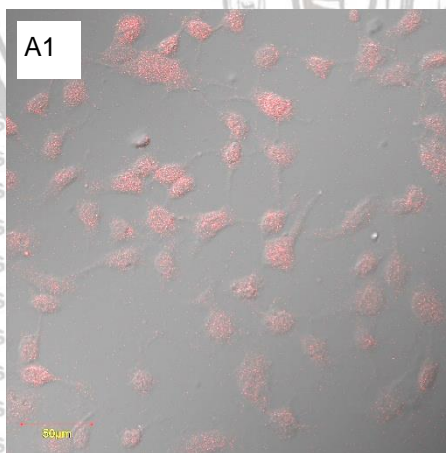
1.3.4 Pengaruh Pemberian Amlodipine Terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Kondisi Hiperglikemia

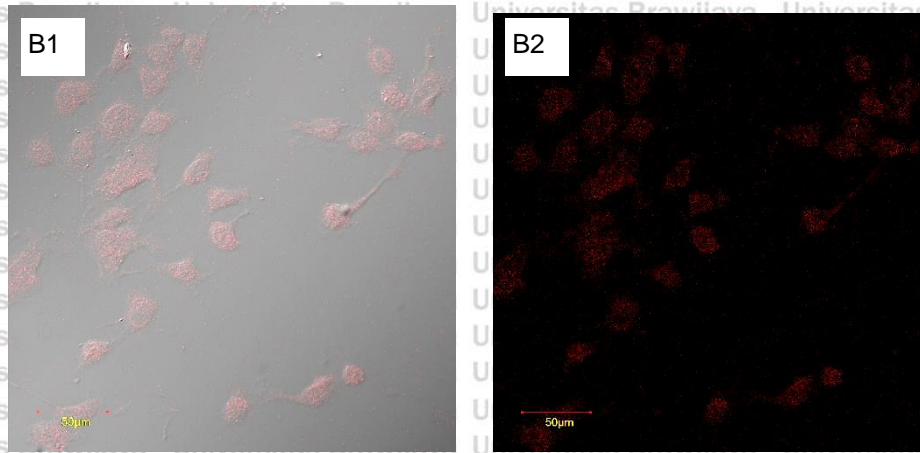
Tabel 5.8 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Sel Neuron SH-SY5Y pada kondisi hiperglikemi

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji normalitas	p-value
Glukosa 50 mM (hiperglikemi kontrol) N = 63	19.27 ± 4.68	0.2	0.027 (< 0.05)
Glukosa 50 mM + amlodipin 2 μM (hiperglikemi amlodipine) N = 94	11.05 ± 3.69	0.087	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada eksperimen selanjutnya dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin pada ekspresi caspase-3 kelompok sel neuron hiperglikemia. Hasil Uji Beda (independen T Test) pengaruh amlodipin terhadap ekspresi caspase-3 sel hiperglikemia dapat dilihat pada tabel 5.8. Nilai $p = 0.027$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi caspase-3 pada sel SH-SY5Y hiperglikemi yang diberi amlodipin dan tanpa amlodipin. Pemberian amlodipin menurunkan rerata ekspresi caspase-3 pada sel hiperglikemia.





Gambar 5.10 Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan hiperglikemia tanpa dan dengan amlodipin (A1) Perlakuan hiperglikemia kontrol SI (superimposed). (A2) Perlakuan hiperglikemia kontrol (fluoresensi). (B1) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin SI. (B2) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin (fluoresensi)

1.3.5 Pengaruh pemberian amlodipine 2µM terhadap Ekspresi Caspase 3 pada kultur sel *human neuron SH-SY5Y*

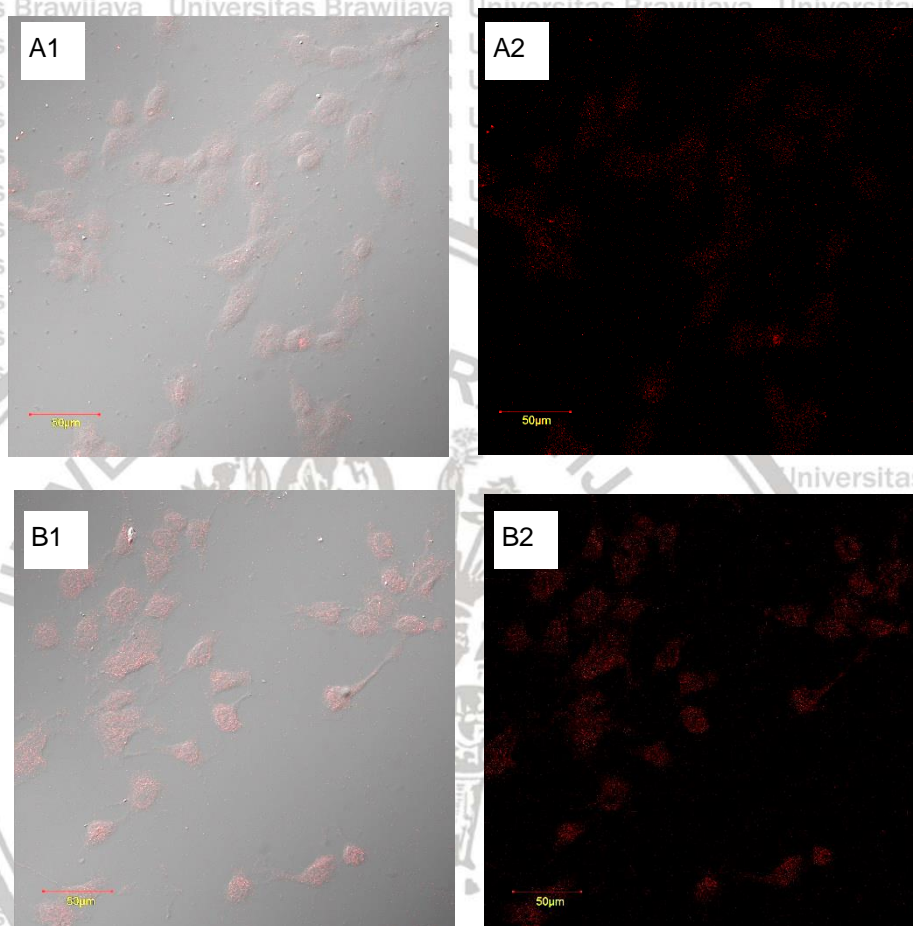
Tabel 5.8 Pengaruh Pemberian Amlodipin terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Sel Neuron SH-SY5Y

Perlakuan	Rerata ± SD	Uji Normalitas	p-value
Glukosa 25 mM + amlodipin 2 µM (normoglikemi amlodipin) N= 86	7.1 ± 1.9	0.2	<0.001 (< 0.05)
Glukosa 50 mM + amlodipin 2 µM (hiperglikemi amlodipine) N = 94	11.05 ± 3.7	0.087	

Keterangan: nilai $p < 0.05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Pada eksperimen selanjutnya dilakukan untuk melihat pengaruh amlodipin 2 µM pada ekspresi caspase-3 kelompok sel neuron normoglikemi dibandingkan hiperglikemia. Hasil Uji Beda (independen T Test), pengaruh amlodipin terhadap ekspresi caspase-3 antara sel normoglikemi dan hiperglikemia dapat dilihat pada

tabel 5.9. Nilai $p < 0.001$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ekspresi caspase-3 antara sel SH-SY5Y normoglikemi dan hiperglikemi yang diberi amlodipin 2 μM . Dengan pemberian amlodipin, rerata ekspresi caspase-3 pada sel hiperglikemia lebih tinggi daripada sel normoglikemia.



Gambar 5.11 Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada sel neuron SH-SY5Y pada perlakuan normoglikemi dan hiperglikemia dengan amlodipin (A1) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin SI (superimposed). (A2) Perlakuan normoglikemi dengan amlodipin (fluoresensi). (B1) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin SI. (B2) Perlakuan hiperglikemia dengan amlodipin (fluoresensi)

1.4 Uji Korelasi Ekspresi Kalsium dan Caspase 3 pada kultur sel *human neuron SH-SY5Y*

Berdasarkan hasil uji korelasi pearson (Tabel 5.10) antara ekspresi Ca^{2+} dengan caspase -3 pada sel hiperglikemi tanpa amlodipin menunjukkan nilai p

<0.001 dan koefisien korelasi sebesar 0.98 (korelasi kuat). Artinya didapatkan hubungan yang bermakna antara kadar Ca²⁺ dan caspase -3 (apoptosis sel).

Selain itu dari hasil uji korelasi antara ekspresi Ca²⁺ dengan caspase-3, sel hiperglikemi yang diberi amlodipin menunjukkan nilai p< 0.001 dengan koefisien korelasi r=0,985 (korelasi kuat). Artinya didapatkan hubungan yang signifikan antara kadar Ca²⁺ dan caspase 3 (apoptosis sel) pada sel hiperglikemia setelah diberi amlodipin.

Tabel 5.10 Uji Korelasi Ekspresi Nrf2 dan Ekspresi SOD pada sel neuron SH-SY5Y pada kondisi Hiperglikemi

Tabel 5.9 Uji Korelasi Ekspresi Nrf2 dan Ekspresi SOD pada sel neuron SH-SY5Y pada kondisi Hiperglikemi

Perlakuan	Hiperglikemi tanpa amlodipin	Hiperglikemi dengan amlodipin
Korelasi Pearson Ekspresi Kalsium dengan Caspase 3	0.980	0.985
P-value	<0.001	<0.001

Keterangan: p<0.05 berarti ada korelasi yang bermakna, p>0.05 berarti tidak ada korelasi yang bermakna

BAB 6

PEMBAHASAN

1.1 Pengaruh Paparan Hiperglikemi Kronis Pada Ekspresi Kalsium Intrasel

Penelitian eksperimental ini menggunakan kultur sel neuron SH-SY5Y cell line manusia yang dipapar kronik hiperglikemia. Berdasarkan hasil penelitian ini, ekspresi Ca^{2+} pada sel normoglikemi dibandingkan dengan hiperglikemi, terdapat perbedaan rerata hasil ekspresi Ca^{2+} (40.45 dan 63.86). Sel yang terpapar hiperglikemia memiliki kadar Ca^{2+} intraseluler yang lebih tinggi dibandingkan dengan normoglikemia. Dari hasil analisis independen T Test, terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0.000$), ekspresi Ca^{2+} sel normoglikemi dan hiperglikemi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Verkhratsky, 2008 yang menyebutkan bahwa pemberian paparan glukosa kronis dapat meningkatkan kadar Ca^{2+} intrasel neuron. Penelitian yang dilakukan oleh Boldizar et al., 2002 juga menunjukkan hiperglikemia dapat meningkatkan basal sitosolik kadar kalsium pada sel T manusia. Peningkatan influx Ca^{2+} ditemukan pada beberapa sel neuron sensori hewan coba termasuk tikus BioBred/Worchester (BB/W) dan STZ-tikus diabetes. Saraf sensori STZ-tikus diabetes menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA dari *voltage-gated calcium channel*. Sedangkan pada manusia dengan neuropati sensorik akibat diabetes, disebutkan berkaitan dengan adanya gangguan homeostatis dan sinyal Ca^{2+} pada neuron DRG (Gibson, 2008; Verkhratsky and Fernyhough, 2008). Perubahan Ca^{2+} signaling telah diteliti pada beberapa penelitian menggunakan hewan coba yang diinduksi diabetes. Abnormalitas Ca^{2+} homeostasis banyak ditemukan pada penelitian pada jaringan otot, jantung, otot polos, sel

sekresi, sel darah, ginjal dan osteoblast. Abnormalitas ini bermanifestasi peningkatan konsentrasi resting intraselular Ca^{2+} , penurunan aktivitas Ca^{2+} transporter dan penurunan stimulus evoked Ca^{2+} signaling (Fernyhough and Nigel. A, 2011)

1.2 Pengaruh Pemberian Amlodipin Terhadap Ekspresi Kalsium Intrasel.

Amlodipin merupakan generasi ketiga dari dihydropiridine Ca^{2+} antagonis dan digunakan sebagai obat antihipertensi. Amlodipine telah diketahui memiliki berbagai efek neuroproteksi secara in vitro maupun in vivo model cerebral ischemia.

Amlodipine juga disebutkan memiliki peran dalam mencegah kerusakan neuron akibat iskemia pada tikus. (Lukic-Panin *et al.*, 2007). Salah satu mekanisme jalur apoptosis sel yaitu pembentukan ROS akibat peningkatan Ca^{2+} intraseluler.

Kelebihan Ca^{2+} intraseluler sendiri akan diuptake oleh mitokondria. Hal ini menyebabkan pembentukan ROS. Sehingga beberapa kanal kation seperti transient receptor potential melastatin 2 dan voltage gated Ca^{2+} akan terbuka oleh peningkatan produksi ROS. Pembentukan ROS ini akan dihambat oleh efek antioksidan amlodipine (Lee *et al.*, 2011).

Penelitian terhadap efek amlodipine terhadap kadar Ca^{2+} intraseluler sel neuron yang dipapar hiperglikemia masih belum banyak dilakukan. Pada penelitian ini, hasil ekspresi Ca^{2+} pada sel normoglikemi dan normoglikemi + amlodipine 2 mg menunjukkan perbedaan rata-rata (mean 40.45 vs 24.60). Berdasarkan analisis T test independent terdapat perbedaan signifikan ($p = 0.000$) ekspresi Ca^{2+} antara sel normoglikemi dan normoglikemi yang dipapar amlodipine. Ekspresi Ca^{2+} pada sel normoglikemi yang dipapar amlodipine dan hiperglikemi yang dipapar amlodipine memiliki rerata yang berbeda yaitu (24.60 vs 39.30). Dari analisis T test

didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=0.000$) ekspresi kalsium intrasel antara sel normoglikemi yang dipapar amlodipine dan sel hiperglikemi yang dipapar amlodipine.

Hasil ekspresi Ca^{2+} pada sel hiperglikemia kontrol dan hiperglikemia amlodipine terdapat perbedaan nilai rata-rata yaitu (63.86 dan 39.30). Hasil analisis independent T test menunjukkan perbedaan signifikan ekspresi Ca^{2+} pada hiperglikemi control dan hiperglikemi + amlodipine. Hal ini menunjukkan terdapat penurunan kadar Ca^{2+} intrasel pada sel hiperglikemi yang telah dipapar amlodipin dibandingkan dengan sel tanpa pemberian amlodipine.

Penelitian yang dilakukan oleh Warnock et al. menyebutkan bahwa pada CLN3 disease terjadi neurodegenerasi yang berkaitan dengan peningkatan kadar kalsium intraseluler yang ditunjukkan pada peningkatan etoposide induced apoptosis pada pengecatan TUNEL. Amlodipin yang sebelumnya telah diketahui memiliki efek penurunan intraseluler kalsium yang tinggi pada CLN3 siRNA knockdown pada SH-SY5Y sel neuroblastoma, juga mampu menurunkan kadar kalsium intraseluler pada *CLN3 protein inhibited primary cortical neuron*. Amlodipine memiliki kemampuan memblok L-type voltage Ca^{2+} kanal dan juga berefek pada Ntype dan P/Q type calcium channel yang memiliki efek neuroproteksi sehingga mengindikasikan mereka memiliki kemampuan untuk mengobati berbagai penyebab kerusakan neuron selain pada CLN3 disease. Amlodipine secara signifikan menurunkan Ca^{2+} intrasel yang meningkat pada CLN3 protein inhibited cell dan menormalkannya seperti konsentrasi yang terlihat pada control. (Warnock et al., 2013)

Kelebihan Ca^{2+} intra sel akan menyebabkan aktivasi proses tidak tepat yang secara normal terjadi pada kadar Ca^{2+} rendah, menyebabkan gangguan metabolisme dan kematian sel. Kelebihan muatan Ca^{2+} terutama melalui N-methyl-aspartate (NMDA) reseptor, memberikan efek toksik pada neuron. NMDA reseptor mediated Ca^{2+} entry memicu sinyal kaskade neurotoksik yang melibatkan aktivasi neuronal nitrit oksida synthase (nNOS), pembentukan ROS toksik dan NO dan aktivasi dari protein proapoptosis poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1).

Diabetes dan hiperglikemia akan menstimulasi influx Ca^{2+} menuju sitosol melalui kanal TRP dengan mengaktivasi produksi ROS. Depolarisasi yang terus menerus pada membrane mitokondria dan peningkatan pembentukan ROS akan mengaktivasi kanal transient receptor potential (TRP) seperti TRP-melastatin 2 (TRPM-2), TRP vanilloid (TRPV) dan voltage gate Ca^{2+} channel (VGCC) dan influx Ca^{2+} akan meningkat dengan aktivasi via ROS. Jalur molekuler ini menyebabkan gejala neurologis (Naziroğlu, Merve Dikici and Dursun, 2012).

Salah satu inhibitor poten dalam apoptosis neuron adalah 1,4-dihydropiridine calcium channel blocker terutama amlodipine. Amlodipine menghambat perubahan nucleus akibat apoptosis dalam hal kondensasi kromatin dan pembelahan DNA internucleosom. Meskipun amlodipine tidak secara signifikan menyebabkan peningkatan Ca^{2+} intraseluler yang dipicu oleh aktivasi reseptor NMDA, Amlodipin dapat menurunkan Ca^{2+} intrasel yang dipicu oleh depolarisasi KCL. Efek neuroproteksi dari CCB dapat bifasik. Dimana konsentrasi tinggi akan menghasilkan penurunan dari neuroproteksi. Sehingga memang dibutuhkan keseimbangan dari Ca^{2+} yang dibutuhkan untuk kehidupan sel dan kekurangan intrasel Ca^{2+} dapat mengganggu fungsi normal dan menyebabkan

sitoksitas. Aktivitas neuroprotektif dari CCB berhubungan dengan kemampuan mereka dalam memodulasi kadar kalsium intrasel yang merupakan mekanisme sinyaling dari apoptosis. Peningkatan kadar kalsium intrasel dibutuhkan dalam aktivasi enzim endonuclease yang terlibat pada fragmentasi DNA yang berhubungan dengan apoptosis neuron. Mekanisme alternatifnya yaitu kalsium dapat mengubah konformasi kromatin nucleus yang membuatnya mudah ditangkap oleh endonuclease tertentu yang menyebabkan fragmentasi DNA. Peningkatan selular kalsium berhubungan dengan peningkatan radikal bebas yang merupakan stimulus dari apoptosis, yang merupakan hasil dari aktivasi phospholipase A₂, NO synthetase dan xanthine oxidase. Penghambatan dari kanal kalsium akan menyebabkan penurunan dari kadar kalsium sitosol dan pelepasan glutamate sehingga aktivitas apoptosis berkurang (Mason *et al.*, 1999).

Penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.* menyebutkan bahwa terdapat efek neuroprotektif dari dihidropiridine Ca²⁺ antagonis yaitu amlodipine besylate dan amlodipine camsylate dalam menurunkan kematian sel akibat stress oksidatif.

Viabilitas sel dan kadar radikal bebas dan protein sinyaling intrasel diukur setelah pemberian kultur neuron kortek dengan amlodipine dan hydrogen peroksida.

Pemberian hydrogen peroksida akan meningkatkan kadar radikal bebas di kortek neuron dan pemberian amlodipine akan menurunkan kadarnya. Pemberian amlodipine akan menurunkan p85aPI3K, phosphorylated AKt, phosphorylated GSK3B dan Bcl-2 selain itu juga meningkatkan kadar cox-2, sitokrom-c, caspase 9 dan caspase 3 (Lee *et al.*, 2011).

Penelitian lain pada hewan coba dilakukan oleh Pronobesh *et al.*, 2008.

Akumulasi Ca²⁺ pada mitokondria bertanggung jawab pada abnormalitas sel yang

berhubungan dengan iskemia dan *reperfusion injury*. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efikasi Ca^{2+} channel blocker amlodipine pada akumulasi Ca^{2+} mitokondria, status antioksidan mitokondria dan *mitochondrial respiratory enzym* pada iskemia dan *reperfusion induced (R/I) liver injury* pada tikus. R/I injury pada tikus dinilai dari penurunan marker enzim pernapasan (malat dehydrogenase, succinate dehydrogenase, dan NADH dehydrogenase), enzim antioksidan mitokondria seperti glutation, super oxide dismutase dan katalase ($p < 0.05$), kerusakan mitokondria dilihat dari transmission electron microscope. Pemberian amlodipine secara efektif mengubah enzim mitokondria yang diinduksi oleh iskemia. TEM menunjukkan perbaikan sel menuju normal dan efek sitoprotektif dari amlodipine. Amlodipine tidak hanya bekerja sebagai antagonis dari Ca^{2+} tetapi dapat menurunkan kerusakan mitokondria melalui efek antioksidannya (Pronobesh, 2008).

1.3 Pengaruh Paparan Hiperglikemi Kronis Terhadap Kadar Caspase-3 Intrasel

Pada penelitian ini dilakukan juga penilaian apoptosis berdasarkan pengukuran kadar caspase-3 sel SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia. Caspase-3 merupakan eksekutor akhir dari jalur apoptosis sel. Pada sel SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis rerata kadar caspase-3 yaitu 19.26 sedangkan rerata pada sel normoglikemia yaitu 10.46. dari analisis independent T, menunjukkan perbedaan signifikan kadar caspase-3 antara sel hiperglikemia dan sel normoglikemia dengan nilai $p = 0.000$.

Sebuah studi yang dilakukan oleh Sharifi, et. Al. menyebutkan bahwa apoptosis yang diinduksi oleh peningkatan glukosa pada sel line PC12 berhubungan

dengan aktivasi caspase-8, -9 dan -3. Cell line PC12 dipapar glukosa dosis tinggi 100mM. Pada penelitian tersebut menggunakan inhibitor caspase z-VAD-fmk untuk menghambat high glucose induced PC12 cell death. Pemberian glukosa dosis tinggi meningkatkan aktivitas caspase yang parallel dengan penurunan procaspase pada 72 jam setelah paparan. Aktivitas caspase -8,-9 dan -3 meningkat terkait dosis pada sel PC12 yang dipapar (23-100mM) selama 72 jam. Sehingga caspase-8,9 dan -3 sangat erat berkaitan dengan induksi apoptosis (Sharifi *et al.*, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Vincent *et. al.* menyebutkan bahwa setelah paparan hiperglikemia, neuron DRG akan menunjukkan depolarisasi mitokondria, pelepasan sitokrom-c mitokondria, aktivasi caspase degradasi DNA dan kondensasi kromatin. Sekitar 30% dari DRG tikus diabetes menunjukkan peningkatan caspase 3 (Vincent *et al.*, 2005).

Glucose mediated apoptosis telah dianggap sebagai mekanisme kerusakan neuron pada neuropati diabetes. Namun penyebab mekanisme molekuler yang mendasari masih belum jelas. Apoptosis merupakan kematian sel terprogram yang sangat penting dalam fisiologi dan patologi penyakit. Komponen utama dari apoptosis yaitu keluarga protease yang dinamakan caspase. Caspase terbagi menjadi 2 grup yaitu inisiator caspase seperti caspase-8, caspase -9 dan caspase-12, yang fungsi utamanya adalah untuk mengaktifkan jalur executioner caspase yaitu caspase-3,-6 dan-7 yang bertanggung jawab pada degradasi protein seluler (Sharifi *et al.*, 2009).

Sampai saat ini, terdapat 2 mekanisme utama jalur apoptosis yang mengaktifkan caspase yaitu (1) mitochondrial mediated pathway, (2) death receptor mediated pathway. Mitochondrial mediated pathway melibatkan pelepasan

sitokrom C dari mitokondria yang menyebabkan pembentukan apoptosom, yang berisi apaf-1, sitokrom-c dan procaspase-9, sehingga mengaktifasi caspase-9 dan yang pada akhirnya mengaktifasi caspase-3 dan fragmentasi DNA. Pemecahan procaspase-8 menjadi caspase-8 merupakan mekanisme biokimiawi pada death receptor mediated pathway. Setelah aktif, caspase-8 akan mengaktifasi jalur caspase melalui pemecahan langsung atau tidak langsung dengan memecah protein apoptosis Bid yang menginduksi pelepasan sitokrom-c dari mitokondria (Nandar, 2018).

1.4 Pengaruh Pemberian Amlodipin Terhadap Ekpresi Caspase-3 Intrasel.

Kadar caspase-3 juga dibandingkan antara sel normoglikemia dengan sel normoglikemia yang diberikan amlodipine 2 mg. Rata-rata kadar caspase-3 pada sel normoglikemia yaitu 10.45 sedangkan pada sel normoglikemi yang diberi amlodipine rata-ratanya yaitu 7.09. Berdasarkan hasil analisis T Test independent menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0.000$) kadar caspase-3 antara sel normoglikemia dan sel normoglikemia yang dipapar amlodipine.

Pada penelitian ini, kadar caspase-3 pada sel nomoglikemi yang dipapar amlodipine dan hiperglikemi yang dipapar amlodipine memiliki rerata yang berbeda yaitu (7.09 vs 11.05). dari analisis T test didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=0.000$) kadar caspase-3 antara sel normoglikemi yang dipapar amlodipine dan sel hiperglikemi yang dipapar amlodipine.

Hasil kadar caspase-3 pada sel hiperglikemia kontrol dan hiperglikemia amlodipine terdapat perbedaan nilai rata-rata yaitu (19.26 dan 11.05). Hasil analisis independent T test menunjukkan perbedaan signifikan kadar caspase-3 pada hiperglikemi kontrol dan hiperglikemi amlodipine. Hal ini menunjukkan pemberian

amlodipine pada sel SH-SY5Y hiperglikemia akan menurunkan kadar caspase-3 dibandingkan dengan sel hiperglikemia tanpa amlodipine.

Banyak mekanisme yang meregulasi jalur high glucose induced apoptosis.

Salah satunya yaitu pembentukan superoxide. Mitokondria sangat berperan dalam memediasi glucose induce apoptosis. Glukosa yang tinggi mengganggu transport electron yang menghasilkan peningkatan oksidasi oksigen oleh koenzim Q dan pembentukan superoksida. Superoksida kemudian bereaksi dengan nitrit oksida untuk membentuk peroksinitrit, molekul yang sangat toksik. Peroksinitrit menyebabkan disfungsi dari protein, oksidasi lipid dan memodifikasi DNA, yang menyebabkan apoptosis dan nekrosis sel. Oleh karena itu hiperglikemia dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas dan stress oksidatif. High glucose induced stress oksidatif akan melalui jalur metabolisme glukosa itu sendiri. Reduksi glukosa menjadi sorbitol oleh aldose reductase akan menggunakan NADPH yang sebaliknya akan mengganggu pembentukan NADPH dari reduced glutathione (GSH) yang akan menyebabkan kerusakan DNA. Pemberian l-cysteine akan meningkatkan glutathione yang mencegah glucose induced DNA damage dan efek proteksi dari l cysteine akan dihilangkan oleh inhibitor γ -glutamylcysteine synthase, enzim yang mengubah sistein menjadi glutathione (Smart and Li, 2007).

Selain perannya sebagai sumber ROS, rongga intramembrane mitokondria mengandung berbagai protein yang dilepaskan ke dalam sitosol untuk menyebabkan kematian sel. Salah satu yang paling banyak diteliti yaitu protein proapoptosis, sitokrom-c, yang akan memediasi molekul adaptor apoptosis protease activating factor 1 (APaf-1) ketika ada ATP dan membentuk apoptosom. Setiap apoptosom dapat mengambil 7 dimer caspase-9, (enzim protease apoptosis) yang

menyebabkan aktivasi enzim. Hal ini menyebabkan proteolitik dan maturasi katalitik enzim caspase-3 dan caspase lain yang memediasi apoptosis hyperglycemia cell death (Smart and Li, 2007).

Apoptosis mitokondria diregulasi oleh berbagai protein yang secara langsung dan tidak langsung mengaktivasi dan menginhibisi caspase. Protein protein ini seperti Bcl-2 family (regulator apoptosis). Bcl-2 dibagi lagi menjadi tipe subdivisi protein. Contohnya adalah antiapoptosis meliputi Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X1 dan Mcl-1 sedangkan proapoptosis meliputi Bim, Bad, Bid yang berisi BH3 domain. Protein yang hanya berisi BH3 domain menghambat aktivitas antiapoptosis dari Bcl-2 secara langsung dengan mengikat dan mencegah inhibisinya pada pembentukan Bax homo-oligomer. Bax berisi banyak domain BH3 dan menyebabkan permeabilitas membrane mitokondria sehingga menyebabkan pelepasan dari sitokrom c dan membentuk apoptosom dengan Apaf-1. Ketiga mekanisme ini terlibat dalam high glucose induced apoptosis tergantung dari tipe sel dan jaringan. Ortiz et al melaporkan pada sel renal tubular yang dipapar glukosa tinggi dapat menginduksi apoptosis melalui ekspresi Bax dan downregulasi Bcl-2 dan Bcl-X1 (Brezniceanu *et al.*, 2010). Federici et al, menunjukkan pada sel pancreas islet, paparan glukosa tinggi akan menyebabkan apoptosis melalui upregulasi protein Bad, Bid, dan downregulasi dari Bcl-X1 (Federici *et al.*, 2001). Nakagami et al menunjukkan sel endotel yang terpapar glukosa tinggi dapat menginduksi apoptosis dengan translokasi Bax menuju membrane mitokondria dan aktivasi caspase-9 dan caspase-3 (Nakagami *et al.*, 2001) (Smart and Li, 2007).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Zhou, 2015 menyebutkan bahwa resistensi insulin dapat meningkatkan sekresi insulin untuk menjaga sel

normoglikemi, hal ini disebut kompensasi sel Beta. Namun peningkatan sekresi insulin dapat menyebabkan kelelahan sel Beta dan apoptosis. Inhibisi influx Ca^{2+} dapat mencegah stress reticulum endoplasma dan mencegah apoptosis sel B. sel beta yang terpapar free fatty acid dan hiperglikemi dapat menginduksi jalur aktivasi JNK yang menyebabkan hasil akhir stress reticulum endoplasma dan apoptosis. Nifedipin yang merupakan L-type Ca^{2+} channel blocker, dapat menghambat aktivasi jalur JNK ini sehingga dapat mencegah apoptosis sel.

Penelitian yang dilakukan oleh (Kopecky, Liang and Bao, 2014) menyebutkan bahwa kelebihan kalsium intrasel akibat bupivacain menyebabkan neurotoksisitas. Viabilitas sel tergantung dosis bupivacaine. Pada kultur sel SH-SY5Y yang dipapar bupivacaine, kalsium intrasel akan meningkat secara drastis yang menyebabkan kematian sel neuron. Namun pemberian dyhydrochloride (calsium channel blocker T Type) akan menurunkan kalsium intrasel sehingga dapat memberikan efek neuroproteksi.

Kanal kalsium T Type juga meningkat pada pasien dengan neuropati perifer. Pada penelitian hewan coba tikus yang mengalami hyperalgesia setelah kerusakan saraf ischiadicus. Peningkatan densitas dari kanal kalsium pada serabut saraf kecil menurunkan resting potensial dari serabut saraf yang membuatnya mengalami hipereksitabilitas sehingga mengalami hyperalgesia. T Type calcium channel blocker dapat mengurangi nyeri ini dengan menurunkan resting membrane potensial akibat kerusakan saraf (Kopecky, Liang and Bao, 2014)

Park et al., 2019, meneliti tentang efek neuroproteksi dari amlodipine camsylate pada neural stem cell yang terpapar oleh oxygen glucose deprivation (OGD). Amlodipin ternyata meningkatkan viabilitas sel dan proliferasi dari neural

stem cell. Amlodipin secara bermakna meningkatkan ekspresi mitochondrial biogenesis –related protein dan mitochondrial anti apoptosis protein. Oleh karena itu AC dapat melindungi OGD injured NSC dengan menjaga fungsi dan struktur mitokondria. Amlodipin melindungi OGD –injured NSC dengan menghambat influx kalsium mitokondria, mengaktifkan jalur PI3K dan meningkatkan biogenesis protein (Park *et al.*, 2019).

1.5 Korelasi Kadar Kalsium Dan Apoptosis Pada Sel Neuron

Penelitian ini juga mengukur koefisien korelasi antara caspase-3 dan kadar Ca^{2+} intrasel sel SH-SY5Y yang telah dipapar hiperglikemia. Dari analisis tersebut didapatkan koefisien korelasi $r=0.98$ dan nilai $p=0.000$. Dari hasil analisis korelasi (r) didapat korelasi antara kadar calcium intrasel dan caspase 3 sel SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis (r) adalah 0,98. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara kadar Ca^{2+} intrasel dan caspase-3 sel SH-SY5Y yadnag dipapar hiperglikemi. Sedangkan arah hubungan adalah positif karena nilai r positif, berarti semakin tinggi kadar Ca^{2+} intrasel maka semakin meningkatkan kadar caspase 3. Hal ini berkaitan erat dengan patofisiologi bahwa hiperglikemia induce apoptosis dapat melalui beberapa jalur. Studi mengenai homeostasis Ca^{2+} pada apoptosis menunjukkan hubungan dengan protein Bcl-2. Bcl-2 telah terdeteksi terkait dengan bagian luar membran mitokondria, ER, nukleus dan sitoplasma (Rizzuto, 2006). Bcl-2 menurunkan regulasi pemasukan Ca^{2+} melalui membran plasma. Pada prinsipnya, penurunan Ca^{2+} di ER dapat menyebabkan aktivasi masuknya Ca^{2+} , dan dengan demikian menginduksi elevasi Ca^{2+} yang berkepanjangan antara lain apoptosis yang dimediasi Ca^{2+} (Pinton *et al.*, 2008).

Dari hasil analisis juga didapatkan korelasi antara Ca^{2+} intrasel dan caspase-3 pada sel SH-SY5Y yang dipapar hiperglikemia kronis (50mM) dengan pemberian amlodipine. Koefisien korelasi yaitu sebesar $r=0.985$ dengan nilai $p=0.000$. Artinya didapatkan hubungan yang signifikan antara kadar Ca^{2+} intrasel dengan kadar Caspase-3 (aktivitas apoptosis sel) yang dipapar hiperglikemia dan diberikan amlodipine.

Ion kalsium memberi peran penting pada degenerasi neuron. Kadar intraseluler Ca^{2+} diregulasi melalui beberapa kanal yang terletak pada membrane plasma seperti L-type calcium channel, reticulum endoplasma dan mitokondria.

Reaktif oxygen dan nitrogen species dapat digunakan sebagai pembawa pesan pada fungsi sel normal. Namun pada kadar stress oksidatif, mereka dapat mengganggu fisiologi normal sel dan menyebabkan kematian. Yang paling sering yaitu melalui Ca^{2+} signalling. Stress oksidatif dapat menyebabkan Ca^{2+} influx pada sitoplasma dari lingkungan ekstraseluler dan dari reticulum endoplasma(ER) atau reticulum sarkoplasma (SR) melalui membrane sel dan kanal ER/SR. Peningkatan Ca^{2+} pada sitoplasma dapat menyebabkan influk Ca^{2+} pada nuclei dan mitokondria. Pada mitokondria, akumulasi Ca^{2+} dapat mempercepat dan mengganggu metabolisme normal yang menyebabkan kematian sel. Pada nuclei, Ca^{2+} memodulasi transkripsi gen dan dapat meregulasi protein fosforilasi/defosforilasi dan memodulasi sinyal transduksi yang mengontrol apoptosis sel. Telah dilaporkan beberapa efek antioksidan dari dyhidropiridine calcium channel blocker. Hal ini berhubungan dengan efek proteksi mitokondia pada kondisi patologi seperti iskemia atau hipoksia hipobarik. Amlodipine merupakan salah satunya yang menghambat L-

type calcium channel sehingga dapat mengurangi kematian sel (Ermak and Davies, 2002).



BAB 1

PENUTUP

1.1 Kesimpulan

1. Paparan Hiperglikemia kronis pada kultur sel neuron SH-SY5Y *cell line* manusia meningkatkan kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis sel.
2. Pemberian Amlodipin pada pada kultur sel neuron SH-SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemia kronik menurunkan kadar kalsium sitosol (Ca^{2+}) dan apoptosis sel.
3. Terdapat hubungan signifikan antara kalsium sitosol dan apoptosis pada kultur sel neuron SH-SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemia kronik.
4. Terdapat hubungan signifikan kalsium sitosol dan apoptosis pada kultur sel neuron SH-SY5Y *cell line* manusia yang dipapar hiperglikemia kronik dan amlodipin

1.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah pengulangan dan dosis yang lebih banyak untuk mengetahui peran amlodipin terhadap ekspresi kalsium dan apoptosis pada kondisi hiperglikemia.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui efek amlodipin pada kondisi neuropati terkait hiperglikemia.

DAFTAR PUSTAKA

- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000) 'THE VERSATILITY AND SIGNALLING', 1(October).
- Boulton, A. J. M. *et al.* (2005) 'Diabetic neuropathies: A statement by the American Diabetes Association', *Diabetes Care*, 28(4), pp. 956–962. doi: 10.2337/diacare.28.4.956.
- Brezniceanu, M. L. *et al.* (2010) 'Reactive oxygen species promote caspase-12 expression and tubular apoptosis in diabetic nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(6), pp. 943–954. doi: 10.1681/ASN.2009030242.
- Clapham, D. E. (2007) 'Calcium Signaling', *Cell*, 131(6), pp. 1047–1058. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028.
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D. and Zhao, H. (2008) 'Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay', *Methods*, 44(3), pp. 250–254. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.008.
- Davidson, S. M. and Duchon, M. R. (2006) 'Calcium microdomains and oxidative stress', *Cell Calcium*, 40(5–6), pp. 561–574. doi: 10.1016/j.ceca.2006.08.017.
- Dyck, P. J. B. *et al.* (2001) 'Non-diabetic lumbosacral radiculoplexus neuropathy Natural history, outcome and comparison with the diabetic variety' pp. 1197–1207.
- England, J. D. *et al.* (2014) 'polyneuropathy quality measures Distal symmetric polyneuropathy quality measures'. doi: 10.1212/WNL.0000000000000397.
- Ermak, G. and Davies, K. J. A. (2002) 'Calcium and oxidative stress : from cell signaling to cell death', 38(2001), pp. 713–721.
- Federici, M. *et al.* (2001) 'High Glucose Causes Apoptosis in Cultured Human Pancreatic Islets of Langerhans', *Diabetes*, 50(6), pp. 1290–1301. doi: 10.2337/diabetes.50.6.1290.
- Feng, M. (2012) 'Calcium Imaging', *BIO-PROTOCOL*, 2(7). doi: 10.21769/BioProtoc.200.
- Fernyhough, P. and Nigel, A, C. (2011) 'Abnormal calcium homeostasis in

- peripheral neuropathies Paul', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Garrity, M. M. *et al.* (2003) 'Identifying and quantifying apoptosis: Navigating technical pitfalls', *Modern Pathology*. Nature Publishing Group, 16(4), pp. 389–394. doi: 10.1097/01.MP.0000062657.30170.92.
- Gessei, T. *et al.* (2015) *A fiber-optic sorbitol biosensor based on NADH fluorescence detection toward rapid diagnosis of diabetic complications*, *Analyst*. doi: 10.1039/c4an01593b.
- Gibson, C. J. (2008) 'Intracellular Calcium Signaling is Altered under Conditions of High Extracellular Sugar', *Yale University, ProQuest Dissertations Publishing*.
- Hosseini, A. and Abdollahi, M. (2013) 'Diabetic Neuropathy and Oxidative Stress : Therapeutic Perspectives', 2013.
- Kawano, T. (2014) 'A Current Overview of Diabetic Neuropathy – Mechanisms, Symptoms, Diagnosis, and Treatment', *peripheral neuropathy*. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/58308>.
- Kopecky, B. J., Liang, R. and Bao, J. (2014) 'T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(4), pp. 757–765. doi: 10.1007/s00424-014-1454-x.
- Kovalevich, J. and Langford, D. (2016) 'HHS Public Access', pp. 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5.
- Krames, E. S. (2015) 'The dorsal root ganglion in chronic pain and as a target for neuromodulation: A review', *Neuromodulation*, 18(1), pp. 24–32. doi: 10.1111/ner.12247.
- Lee, Y. J. *et al.* (2011) 'Amlodipine besylate and amlodipine camsylate prevent cortical neuronal cell death induced by oxidative stress', *Journal of Neurochemistry*, 119(6), pp. 1262–1270. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07529.x.
- Lukic-Panin, V. *et al.* (2007) 'Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats', *Brain Research*, 1176(1), pp. 143–150. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.038.

Mason, R. P. *et al.* (1999) 'Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells', *Journal of Neurochemistry*, 72(4), pp. 1448–1456. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721448.x.

Melli, G. and Höke, A. (2009) 'Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: A tool for drug discovery for peripheral neuropathies', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(10), pp. 1035–1045. doi: 10.1517/17460440903266829.

Nakagami, H. *et al.* (2001) 'Kinase Downstream of Bax-Caspase-3 Pathway Leads to', *Diabetes*, 50(June), pp. 1472–1481.

Nandar, S. (2018) 'Patofisiologi Biomolekular Neuropati Diabetes (Biomolecular Pathophysiology of Diabetic Neuropathy)', (July).

Naziroğlu, M., Merve Dikici, D. and Dursun, Ş. (2012) 'Role of oxidative stress and Ca²⁺ signaling on molecular pathways of neuropathic pain in diabetes: Focus on TRP channels', *Neurochemical Research*, 37(10), pp. 2065–2075. doi: 10.1007/s11064-012-0850-x.

Park, H. *et al.* (2019) 'Mitochondria damaged by Oxygen Glucose Deprivation can be Restored through Activation of the PI3K / Akt Pathway and Inhibition of Calcium Influx by Amlodipine Camsylate', *Scientific Reports*. Springer US, pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-52083-y.

Pasnoor, M. *et al.* (2013) 'Diabetic neuropathy part 1. Overview and symmetric phenotypes', *Neurologic Clinics*, 31(2), pp. 425–445. doi: 10.1016/j.ncl.2013.02.004.

Peeraer, E. *et al.* (2011) 'Pharmacological evaluation of rat dorsal root ganglion neurons as an in vitro model for diabetic neuropathy', *Journal of Pain Research*, 4, pp. 55–65. doi: 10.2147/JPR.S15452.

PERKENI (2015) *Pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus tipe 2 di indonesia 2015*.

Pinton, P. *et al.* (2008) 'Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis', *Oncogene*, 27(50), pp. 6407–6418. doi: 10.1038/onc.2008.308.

Pronobesh, C. (2008) 'Protective role of the calcium channel blocker amlodipine

against mitochondrial injury in ischemia and reperfusion injury of rat liver', *Acta Pharm*, 58, pp. 421–428. doi: 10.2478/v1007-008-0022-3.

Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2019) 'Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences', pp. 369–408. doi: 10.1152/physrev.00004.2005.

Said, G. (2007) 'Diabetic neuropathy — a review', 3(6), pp. 331–340. doi: 10.1038/ncpneuro0504.

Sandireddy, R. *et al.* (2014a) 'Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy : Futuristic Strategies Based on These Targets', 2014(Figure 1).

Sandireddy, R. *et al.* (2014b) 'Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: Futuristic strategies based on these targets', *International Journal of Endocrinology*, 2014(April). doi: 10.1155/2014/674987.

Shao, B. and Bayraktutan, U. (2013) 'Hyperglycaemia promotes cerebral barrier dysfunction through activation of protein kinase C- β ', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15(11), pp. 993–999. doi: 10.1111/dom.12120.

Sharifi, A. M. *et al.* (2009) 'Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells', *Neuroscience Letters*, 459(2), pp. 47–51. doi: 10.1016/j.neulet.2009.03.100.

Shaukat, S. (2017) *International Diabetes Federation*.

Smart, E. J. and Li, X. A. (2007) 'Hyperglycemia: Cell death in a cave', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(5), pp. 524–526. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.01.005.

Uguz, A. C., Öz, A. and Naziroğlu, M. (2016) 'Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells', *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 36(4), pp. 395–401. doi: 10.3109/10799893.2015.1108337.

Velena, A. *et al.* (2016) 'Analogues — Model Compounds Targeting Oxidative Stress'. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/1892412.

Verkhatsky, A. and Fernyhough, P. (2008) 'Mitochondrial malfunction and Ca^{2+}

dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes', *Cell Calcium*, 44(1), pp. 112–122. doi: 10.1016/j.ceca.2007.11.010.

Vincent, A. M. *et al.* (2005) 'Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons', *FASEB Journal*, 19(6), pp. 638–640. doi: 10.1096/fj.04-2513fje.

Vincent, A. M. *et al.* (2010) 'Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy', *Acta Neuropathologica*, 120(4), pp. 477–489. doi: 10.1007/s00401-010-0697-7.

Vinik, A. I. *et al.* (1992) 'Diabetic Neuropathies', 15(12), pp. 1926–1975.

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.

Warnock, A. *et al.* (2013) 'Amlodipine prevents apoptotic cell death by correction of elevated intracellular calcium in a primary neuronal model of Batten disease (CLN3 disease)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 645–649. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.113.

Wu, S. C. (2008) *Diabetic Neuropathy: Clinical Management*, *Journal of the American Podiatric Medical Association*. doi: 10.7547/0980250.

Yin, K., Baillie, G. J. and Vetter, I. (2016) 'Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison', 12, pp. 1–17. doi: 10.1177/1744806916646111.

Zhang, H. and Verkman, A. S. (2015) 'Aquaporin-1 water permeability as a novel determinant of axonal regeneration in dorsal root ganglion neurons', *Experimental Neurology*. Elsevier Inc., 265, pp. 152–159. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.01.002.