

SKRIPSI

**PENGARUH PREGABALIN TERHADAP EKSPRESI
MRNA *TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN 1*
PADA DORSAL ROOT GANGLION MENCIT DENGAN
NEUROPATI PERIFER YANG DIINDUKSI
OXALIPLATIN**



RIMAWATI STALISTATUL HUSNA

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMASI PRAKTIS
SURABAYA
2022**

Lembar Pengesahan

Pengaruh Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* Pada Dorsal Root Ganglion Mencit Dengan Neuropati Perifer yang Diinduksi Oxaliplatin

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

2022

Oleh:

**Rimawati Stalistatul Husna
NIM : 051811133043**

Usulan skripsi ini telah disetujui pada tanggal 15 Agustus 2022 oleh :

Pembimbing Utama,



Chrismawan A., S.Farm., M.Sc., Ph.D., Apt

NIP. 198402292008011003

Pembimbing Serta,



Prof. Dr. Suharjono, M.S., Apt

NIP. 195212221982031001

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Rimawati Stalistatul Husna

NIM : 051811133043

adalah mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Tugas Akhir/Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Pengaruh Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* pada Dorsal Root Ganglion Mencit dengan Neuropati Perifer yang Diinduksi Oxaliplatin

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 15 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,



Rimawati Stalistatul Husna
NIM. 051811133043

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

· Nama : Rimawati Stalistatul Husna

NIM : 051811133043

menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui abstrak Skripsi yang saya tulis dengan judul:

Pengaruh Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* pada Dorsal Root Ganglion Mencit dengan Neuropati Perifer yang Diinduksi Oxaliplatin

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau di media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 15 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,



Rimawati Stalistatul Husna
NIM. 051811133043

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkat dan rahmat serta karunia-Nya penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* pada Dorsal Root Ganglion Mencit dengan Neuropati Perifer yang Diinduksi Oxaliplatin”** dapat diselesaikan dengan baik sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.) di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Selama penyusunan skripsi ini, penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan dapat terselesaikan dengan baik apabila tidak ada dukungan dari berbagai pihak, baik secara moril maupun materiil. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. apt. Chrismawan Ardianto, S.Farm., M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing utama serta Prof. Dr. Suharjono, M.S., Apt selaku dosen pembimbing serta yang senantiasa membimbing, mengarahkan, memberikan perhatian, masukan dan motivasi yang tiada hentinya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA. selaku Rektor Universitas Airlangga beserta para wakil rektor yang telah menyediakan pendidikan dengan sarana-prasarana yang memadai.
3. Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga serta para wakil dekan yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas akademik serta non akademik selama penulis menempuh program sarjana.
4. apt. Andi Hermansyah S.Farm., M.Sc., Ph.D. dan apt. Dinda Monika Nusantara Ratri, S.Farm., M.Farm.Klin. selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Farmasi Praktis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang turut membantu kelancaran peneliti dengan sarana yang diberikan.
5. Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D. dan apt. Dewi Wara Shinta., S.Farm. selaku dosen penguji yang turut andil dalam memberikan saran dan kritik yang membangun demi perbaikan skripsi ini.

6. apt. Dra. Toetik Aryani, M.Si. selaku dosen wali yang memberikan arahan dan semangat kepada penulis selama menjadi mahasiswa di Universitas Airlangga.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen yang telah mengajar dan mendidik dengan penuh kesan serta kesabaran sehingga penulis dapat memperluas wawasan dan mencoba banyak hal baru selama menjalani pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
8. Kedua orang tua penulis, almh. Ibu Ari Suwarni, Bapak Sumarno dan saudara penulis Fajar Setyo Prasajo, serta segenap keluarga besar penulis yang senantiasa mendoakan, memberikan semangat, motivasi dan wejangan-wejangan yang sangat berharga dan dibutuhkan bagi penulis selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
9. Sahabat-sahabat seperjuangan, tempat berkeluh kesah dan bertukar pikiran dengan penulis sejak awal masuk menjadi mahasiswa di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yaitu Alda Khairunnisa Syahla dan Windy Widyaningrum.
10. Seluruh teman-teman skripsi biomedik yang menemani penulis untuk berjuang bersama-sama untuk dapat menghadapi segala rintangan ketika skripsi di departemen ini yaitu Indira, Rozi, Lailisa, Intan, There, Caca, Luthfiatur, Cladita dan Wuri.
11. Segenap kakak tingkat S2 biomedik yaitu Mas Budi, Mbak Alma, Mbak Honey, dan Mas Yusuf yang juga turut andil dalam memberikan bantuan, membagikan ilmunya, memberikan masukan dan saran kepada penulis.
12. Seluruh teman-teman Flakka, mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Angkatan 2018, utamanya Pharmacc yang senantiasa memberikan warna dalam kehidupan penulis selama menjalani pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
13. Civitas akademika FF UNAIR lainnya, khususnya bapak-bapak satpam yang senantiasa bersabar untuk menunggu tim biomedik bekerja di laboratorium baik hingga larut malam ataupun ketika sedang hari libur.
14. Seluruh pihak yang telah membantu penulis selama menyusun skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga segala ilmu dan bantuan yang telah diberikan dapat dibalas oleh Allah SWT dan dicatat sebagai amal baik. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak lepas dari kekurangan dan kesalahan, oleh karenanya kritik dan saran diharapkan demi perbaikan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat di kemudian hari bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang kefarmasian.

Penulis

RINGKASAN

Pengaruh Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* pada Dorsal Root Ganglion Mencit dengan Neuropati Perifer yang Diinduksi Oxaliplatin

Rimawati Stalistatul Husna

Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia, penyakit ini ditandai dengan adanya pertumbuhan cepat sel-sel abnormal yang kemudian menyebar mempengaruhi organ sekitarnya hingga terjadi metastasis. Berbagai agen kemoterapi diberikan, hingga dapat menyelamatkan pasien kanker. Meskipun begitu, kebanyakan para penyintas kanker mengalami efek samping dari penggunaan agen kemoterapi dan mempengaruhi kualitas hidupnya. Obat-obatan anti kanker mempengaruhi sel-sel normal dan struktur tubuh, menyebabkan berbagai efek samping yang merusak dan kadang-kadang bahkan menghancurkan, salah satu diantaranya adalah neuropati. Neuropati paling umum yang disebabkan oleh agen antineoplastik, dikenal sebagai *Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy* (CIPN). Prevalensi terjadinya CIPN yang paling tinggi adalah pada penggunaan agen kemoterapi berbasis platinum sebesar 70-100%, salah satu contoh dari agen kemoterapi ini adalah oxaliplatin.

Mekanisme utama oxaliplatin dalam menginduksi neuropati adalah akumulasi platinum dalam DRG hingga akhirnya menyebabkan terjadinya kerusakan pada saraf. Kerusakan saraf yang disebabkan oleh oxaliplatin ini mengakibatkan meningkatnya $\alpha_2\delta_1$ yang merupakan subunit dari *voltage-dependent calcium channels* (VDCC). Akibat dari peningkatan ini, juga berdampak pada NMDAR yang juga mengalami peningkatan. Presinaptik NMDAR menjadi lebih aktif ketika dalam kondisi nyeri neuropati, sehingga subunit $\alpha_2\delta_1$ secara langsung berinteraksi dengan NMDAR dan membentuk kompleks heteromerik melalui C-terminal. Kemoterapi menginduksi secara dominan ikatan antara $\alpha_2\delta_1$ dengan NMDAR pada terminal aferen primer, menyebabkan peningkatan input nosiseptif glutamatergik yang bertahan dalam jangka waktu lama sehingga nyeri kronis dipertahankan.

Pemberian pregabalin yang memiliki mekanisme kerja berikatan pada $\alpha_2\delta_1$, pregabalin dapat merusak kemampuan $\alpha_2\delta_1$ untuk memfasilitasi pengiriman sinaps dan pembentukan kompleks dengan reseptor NMDA, sehingga mengakibatkan penurunan pelepasan neurotransmitter glutamat dan mengakibatkan penurunan rasa nyeri yang terjadi. TRPA1 di mana tergolong kation-*channel* yang diekspresikan dalam neuron sensorik primer di DRG memainkan peran penting dalam hipersensitivitas terhadap rangsangan termal dan mekanik selama peradangan dan kerusakan saraf perifer yang disebabkan oleh obat kemoterapi seperti oxaliplatin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian pregabalin pada perubahan ekspresi TRPA1 di DRG mencit yang diinduksi oxaliplatin. Pada penelitian ini digunakan 42 ekor mencit yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal, kelompok model neuropati yang diinduksi oxaliplatin 3 mg/kgBB, kelompok pregabalin dosis 10;50;100 mg/kgBB. Penelitian ini dilakukan selama 22 hari, dimana pada hari ke-0, 2, 4, 6 diinjeksikan oxaliplatin secara intraperitoneal pada hari ke-8 hingga ke-14 diinjeksikan pregabalin 10;50;100 mg/kgBB secara intraperitoneal. Evaluasi respon nyeri neuropati perifer dilakukan dengan uji perilaku menggunakan *von Frey Test* untuk mendapatkan nilai *withdrawal threshold* dan uji PCR untuk mengukur ekspresi mRNA TRPA1.

Dari penelitian ini didapatkan hasil pemberian oxaliplatin 3 mg/kgBB/hari selama 4 kali pemberian, dosis kumulatif 12 mg/kgBB mampu menurunkan *withdrawal threshold* kelompok model neuropati secara signifikan. Dengan pemberian pregabalin dosis 10, 50 dan 100 mg/kgBB mampu meningkatkan *withdrawal threshold* hewan coba melalui pengukuran dengan serangkaian filamen *von Frey*. Pada hari ke-22 hasil signifikan terjadi pada kelompok dosis 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB. Dari hasil pengujian biomolekuler terjadi peningkatan ekspresi mRNA TRPA1 secara signifikan pada kelompok oxaliplatin bila dibandingkan dengan kelompok normal, sedangkan kelompok pemberian pregabalin 100 mg/kgBB mampu menurunkan ekspresi mRNA TRPA1 secara signifikan.

ABSTRACT

Effect of Pregabalin on TRPA1 mRNA Expression in CIPN-Induced Dorsal Root Ganglion of Mice with Oxaliplatin

Rimawati Stalistatul Husna

Platinum-based anticancer drugs such as oxaliplatin have a higher prevalence in occurring peripheral neuropathy pain. Patients who treat with this agent describe symptoms of paresthesias or dysesthesias. Up-regulation of the voltage-gated Ca^{2+} channel subunit $\alpha 2\delta 1$ in dorsal root ganglion (DRG) neurons correlates with the onset of neuropathic symptoms such as allodynia. Pregabalin, $\alpha 2\delta 1$ -ligand may prevent this negative effect. This study aimed to assess the effect of pregabalin on changes in TRPA1 mRNA expression in the DRG on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in mice. Through mechanical allodynia parameters with von Frey test, we can assess the withdrawal threshold of animal models. Treatment with pregabalin 50 mg/kg and 100 mg/kg intraperitoneally can increase the withdrawal threshold in mice-induced oxaliplatin significantly. In addition, administration of pregabalin 100 mg/kg significantly decreased the relative expression of TRPA1 mRNA.

Keywords: CIPN, DRG, Oxaliplatin, Pregabalin, TRPA1

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Pengesahan.....	ii
KATA PENGANTAR.....	v
RINGKASAN.....	viii
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Nyeri	6
2.2 Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy	8
2.3 Oxaliplatin	9
2.4 Mekanisme Patologis Neuropati Perifer oleh Golongan Oxaliplatin	10
2.4.1 Neuropati Akut	11
2.4.2 Neuropati Kronis.....	14
2.5 Persinyalan Nyeri di DRG	17
2.5.1 Mekanisme Utama Nyeri Kronis yang Terjadi di DRG	18
2.6 TRPA1 Dalam Memodulasi Nyeri Neuropati	18
2.7 <i>Treatment</i> Untuk CIPN.....	20
2.7.1 Terapi Perlindungan Saraf	20
2.7.2 Terapi Dengan Target Saluran Ion.....	21
2.7.3 Terapi Anti-inflamasi.....	23
2.7.4 Terapi Berbasis Neurotransmitter	24
2.7.5 Antioksidan.....	25
2.9 Metode Pengujian Nyeri Neuropati	27

2.9.1	Mechanical Allodynia.....	27
2.10	PCR.....	27
2.10.1	Tahapan PCR	28
2.10.2	RT-PCR	29
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL		30
3.1	Alur Kerangka Konseptual	30
3.2	Uraian Kerangka Konseptual.....	31
3.3	Hipotesis	32
BAB IV METODE PENELITIAN.....		33
4.1	Jenis Penelitian	33
4.2	Alat dan Bahan Penelitian	33
4.2.1	Alat Penelitian.....	33
4.2.2	Bahan Penelitian	34
4.3	Definisi Operasional	34
4.4	Subjek Penelitian	35
4.5	Etik Penelitian.....	35
4.6	Metodologi Penelitian.....	36
4.6.1	Rancangan Penelitian.....	36
4.6.2	Penyiapan Obat	36
4.6.3	Protokol Penelitian.....	37
4.6.4	Kerangka Operasional.....	38
4.6.5	Preparasi Sampel.....	39
4.6.6	Tahapan Penelitian.....	39
4.6.7	Analisis Data	44
4.6.8	Uji Statistika	44
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN		
5.1.	Pengaruh Pregabalin terhadap Mencit yang Diinduksi Oxaliplatin Menggunakan Uji Von Frey	45
5.2	Perhitungan Kadar RNA Total Sampel Dorsal Root Ganglion.....	49
5.3	Penyetaraan Kadar RNA Total Sampel Dorsal Root Ganglion.....	50
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		
6.1	Kesimpulan.....	57
6.2	Saran	57
DAFTAR PUSTAKA.....		58

LAMPIRAN	68
----------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
IV. 1 Urutan Primer yang Digunakan.....	39
IV. 2 Jenis dan Jumlah Komponen yang Ditambahkan.....	42
IV. 3 Jenis dan Jumlah Pereaksi yang Ditambahkan.....	42
IV. 4 Komponen yang Ditambahkan Pada Tahap Amplifikasi	43
V. 1 Hasil pengukuran pengaruh pregabalin terhadap nyeri neuropati perifer oleh induksi oxaliplatin yang diukur menggunakan filamen von Frey	46
V. 2 Kadar RNA total sampel DRG.	50
V. 3 Penyetaraan kadar RNA total sampel DRG	51
V. 4 Pengaruh pregabalin pada rasio relatif TRPA1 terhadap β -actin sampel DRG.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Jalur Kompleks Nyeri.	8
2. 2 Struktur Oxaliplatin	9
2. 3 Diagram Skematik Oxaliplatin Menginduksi Nyeri Neuropati	11
2. 4 Pengujian Dengan von Frey Filament	27
2. 5 Siklus dalam PCR.	28
3. 1 Alur Kerangka Konsep	30
4. 1 Diagram Pengelompokan Hewan Coba	36
4. 2 Diagram Kerangka Operasional.....	38
5.1 Pengaruh pregabalin terhadap hewan coba yang diinduksi oxaliplatin menggunakan uji von Frey	47
5. 2 Contoh Representasi Gel Hasil Elektroforesis.....	52
5. 3 Pengaruh pregabalin terhadap ekspresi mRNA TRPA1 pada DRG mencit dengan neuropati perifer oleh induksi oxaliplatin	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Tabel Analisis Statistika One-way ANOVA von Frey Pada Hari ke-0.....	69
2 Tabel Analisis Statistika Two-way ANOVA von Frey Test	71
3 Tabel Analisis Statistika One-way ANOVA DRG dengan Primer TRPA1 ..	83
4 Hasil Gel Elektroforesis Setelah Dikuantifikasi Menggunakan <i>ImageJ</i>	84
5 Sertifikat Uji Kelaikan Etik.....	86

DAFTAR SINGKATAN

AMPK	: Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
CCL	: C-C Chemokine Ligand
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
CIPN	: Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DRG	: Dorsal Root Ganglia
GABA	: Gamma-aminobarbiyturic Acid
IL -	: Interleukin –
i.p.	: Intraperitoneal
mDNA	: Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
mTOR	: <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonucleic Acid
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT–PCR	: Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
TRP	: <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA	: TRP <i>ankyrin</i>
TRPV	: TRP <i>vanilloid</i>
TRPM	: TRP <i>melastatin</i>
SSP	: Sistem Saraf Pusat
EPO	: <i>Erythropoietin</i>
IENFs	: <i>Induced Intraepidermal Nerve Fibers</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VDCC	: <i>Voltage-Dependent Calcium Channels</i>
NMDAR	: <i>N-methyl-D-aspartate Receptor</i>
UV	: Ultraviolet