

SKRIPSI

**PENGARUH *CO-TREATMENT* PREGABALIN
TERHADAP EKSPRESI mRNA *TRANSIENT RECEPTOR
POTENTIAL ANKYRIN-1* DI DORSAL ROOT GANGLION
MENCIT DENGAN NEUROPATI PERIFER YANG
DIINDUKSI OXALIPLATIN**



ALDA KHAIRUNNISA SYAHLA

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

Lembar Pengesahan

**PENGARUH *CO-TREATMENT* PREGABALIN
TERHADAP EKSPRESI MRNA *TRANSIENT RECEPTOR
POTENTIAL ANKYRIN-1* DI 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:

**Alda Khairunnisa Syahla
NIM: 051811133098**

**Skripsi ini telah disetujui
pada tanggal oleh 11 Agustus 2022:**

Pembimbing Utama



**apt. Chrismawan A., S.Farm., M.Sc., Ph.D
NIP. 198402292008011003**

Pembimbing Serta



**apt. Dewi Wara S., S.Farm., M.Farm.Klin
NIP. 198510182008122002**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Alda Khairunnisa Syahla

NIM : 051811133098

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

Pengaruh co-treatment Pregabalin terhadap ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin-1* di Dorsal Root Ganglion mencit 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, 23 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Alda Khairunnisa Syahla

NIM 051811133098

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Alda Khairunnisa Syahla

N I M : 051811133098

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

Pengaruh co-treatment Pregabalin terhadap ekspresi mRNA *Transient Receptor Potential Ankyrin-1* di Dorsal Root Ganglion mencit yang diinduksi Oxaliplatin.

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau 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, 23 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Alda Khairunnisa Syahla

NIM 051811133098

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas segala rahmat, karunia, dan pertolongan-Nya penelitian skripsi yang berjudul “PENGARUH CO-TREATMENT PREGABALIN TERHADAP EKSPRESI MRNA *TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN-1* (TRPA1) DI *DORSAL ROOT GANGLION* MENCIT YANG DIINDUKSI OXALIPLATIN” dapat terselesaikan dengan sebaik-baiknya sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana strata satu (S-1) di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini sulit terwujud sebagaimana yang diharapkan, tanpa bimbingan, dukungan serta bantuan dari banyak pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis sampaikan rasa terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. apt. Chrismawan Ardianto, S.Farm, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing utama yang senantiasa sabar dan bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran, untuk membimbing, memberikan arahan, masukan, nasehat serta motivasi kepada penulis hingga akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan.
2. apt. Dewi Wara Shinta., S.Farm, M.Farm.Klin selaku dosen pembimbing serta yang senantiasa sabar dan bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan arahan dan masukan kepada penulis hingga akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas bagi penulis selama menempuh Program Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga serta seluruh Bapak/Ibu Dosen staff pengajar yang telah dengan ikhlas dan sabar membagikan ilmu-ilmunya selama penulis menempuh program sarjana.
4. Dr. apt. Aniek Setiya Budiadin, M.Si., dan apt. Bambang Subakti Zulkarnain, S.Si., M.Clin.Pharm selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan berupa kritik dan saran demi perbaikan skripsi ini.
5. apt. Andi Hermansyah S.Farm., M.Sc., Ph.D. dan apt. Dinda Monika Nusantara Ratri, S.Farm., M.Farm. Klin. selaku Kepala Departemen dan Sekretaris Departemen Farmasi Praktis yang telah membantu menyiapkan pelaksanaan seminar proposal dan seminar hasil sehingga teratur dan terjadwal dengan baik.

6. Drs. Apt. Hadi Poerwono, M.Sc., Ph.D selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama perkuliahan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Kedua orang tua penulis Mama (Norlaila Hayati) dan Abah (Sanemansyah), serta adik penulis Lebo (Alviana Maulidya Syahla) yang sangat amat penulis cintai, yang telah dengan sabar dan tanpa henti selalu ikhlas mendoakan, memberikan semangat, perhatian, dukungan dan motivasi selama menempuh Pendidikan Sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
8. Sahabat terbaik penulis Windy Widyaningrum dan Rimawati Stalistatul Husna yang telah berjuang dan tumbuh bersama mulai dari berhasil menyelesaikan tugas ospek Amerta hingga atas izin Allah juga berhasil menyelesaikan tugas akhir ini.
9. Tim Skripsi S1 Biomedik yang pada akhirnya sudah tidak “terombang-ambing” lagi menyelesaikan penelitiannya masing-masing. Terimakasih Indira, Lely, Rozi, Rima, Windy, Intan, There, Caca, Upi, Cladita dan Wuri yang walaupun berbeda topik penelitian namun selalu saling membantu dan kebersamai hingga akhir.
10. Mas Budi, Mbak Alma, Mas Yusuf, Mbak Honey dan seluruh tim skripsi S2 Biomedik yang dalam penelitian ini banyak sekali membantu terkait teknis pelaksanaan, pengoperasian alat, dan selalu bersedia membagikan ilmu dan pengalamannya saat teman-teman S1 kesusahan.
11. Teman-teman seperjuangan Flakka18 pemberi warna warni kehidupan perkuliahan yang penuh rintangan ini, terimakasih sudah tumbuh bersama dalam 4 tahun ini.
12. Civitas akademika FF UNAIR lainnya, khususnya bapak satpam yang senantiasa bersabar untuk menunggu tim biomedik selesai bekerja di lab hingga larut malam.
13. Seluruh pihak yang telah membantu penulis selama menyusun skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Semoga segala ilmu dan amal yang telah diberikan dapat dibalas oleh Allah SWT dan menjadi amal jariyah. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak terlepas dari kekurangan maupun kesalahan, oleh karenanya kritik dan saran penulis harapkan demi perbaikan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat di kemudian hari bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang kefarmasian.

Penulis

RINGKASAN

**Pengaruh *co-treatment* Pregabalin Terhadap Ekspresi mRNA
Transient Receptor Potential Ankyrin-1 di Dorsal Root Ganglion Mencit
dengan Neuropati Perifer Yang Diinduksi Oxaliplatin**

Alda Khairunnisa Syahla

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang abnormal. Angka kematian yang disebabkan karna penyakit kanker meningkat setiap tahunnya. Saat ini terdapat berbagai macam terapi pengobatan untuk pasien kanker sesuai dengan jenis kanker yang dialami, contohnya adalah penggunaan agen kemoterapi yang sesuai untuk jenis kanker nonmetastasis. Penggunaan agen kemoterapi sering kali menimbulkan banyak efek samping karna selektifitasnya yang buruk terhadap jaringan kanker dalam jaringan normal. Salah satu efek samping yang sering kali timbul ialah terjadinya neurotoksisitas yang berujung pada nyeri neuropati. Nyeri neuropati merupakan nyeri yang timbul karna adanya kerusakan pada lesi syaraf. Kondisi nyeri neuropati yang timbul akibat penggunaan agen kemoterapi dikenal dengan istilah CIPN (*Chemotherapy Induced Peripheral Neuropati*).

Salah satu agen kemoterapi yang sangat berpotensi menyebabkan neurotoksisitas adalah Oxaliplatin yang merupakan golongan platinum. Oxaliplatin merupakan agen antikanker yang banyak digunakan untuk pengobatan kanker colorectal, Penumpukan senyawa okslat di *Dorsal Root Ganglion* (DRG) diketahui menjadi pemicu utama kerusakan neuron. Neuortoksisitas yang terjadi juga diketahui disebabkan oleh homeostasis Ca^{2+} . Pada kondisi neuropati terjadi peningkatan influx Ca^{2+} dan overekspresi dari $\alpha\delta 1$ yang merupakan subunit dari VGCC.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian *co-treatment* Pregabalin terhadap ekspresi mRNA TRPA1 pada model mencit neuropati perifer yang diinduksi Oxaliplatin. Sebanyak 30 ekor hewan coba dibagi ke dalam 5 kelompok yakni kelompok kontrol syang diberikan *vehicle* yaitu normal saline dan dextrose 5%, kelompok uji yang diberikan Oxaliplatin 3 mg/kgBB/hari sebanyak 4 kali pemberian + *vehicle*, serta kelompok uji yang diberi diberikan Pregabalin *co-treatment* dengan 3 varian dosis yaitu Pregabalin 10, 50, 100 mg/kgBB/hari sebanyak 8 kali dimulai dari hari ke-0 hingga hari ke-7. Pemberian oxaliplatin dilakukan pada minggu pertama yaitu hari ke-0, 2, 4, dan 6, dan uji perilaku dilakukan sebanyak 9 kali dengan von frey.

Von Frey bertujuan untuk mengukur respon *mechanical allodynia* yang dimana merupakan salah satu manifestasi dari timbulnya nyeri neuropati pada hewan coba mencit. Pada hasil uji perilaku, diketahui terjadi penurunan nilai withdrawal threshold yang signifikan pada kelompok Oxaliplatin dibanding dengan kelompok normal ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok pregabalin tidak terjadi penurunan nilai withdrawal threshold. Penurunan nilai ini menunjukkan adanya neuropati yang berkembang pada kelompok yang diberikan Oxaliplatin. Pada penelitian ini, nyeri neuropati yang timbul dapat digolongkan dalam kategori neuropati kronis.

Penurunan nilai *withdrawal threshold* pada kelompok neuropati juga didukung dengan hasil uji molekular dimana terjadi peningkatan ekspresi TRPA1 di DRG yang

signifikan ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok yang diberikan pregabalin, tidak terjadi peningkatan ekspresi TRPA1. Neurotoksisitas yang dihasilkan akibat penggunaan Oxaliplatin menyebabkan kerusakan syaraf bahkan berujung dengan apoptosis. Adanya kerusakan syaraf ini menimbulkan hambatan pada penghantaran impuls pada sel syaraf, hal ini mendorong neuron untuk menjadi hipersensitif agar impuls saraf tadi dapat diterima dan diteruskan. Kompensasi dari hal ini menyebabkan terjadinya *mechanical allodynia* pada pasien dengan nyeri neuropati. Mechanical allodynia yaitu kondisi dimana rangsangan yang seharusnya tidak menimbulkan rasa sakit, namun menjadi menimbulkan rasa sakit pada orang yang menderitanya. Oleh sebab itu, terjadi peningkatan aktivasi serta ekspresi dari TRPA1 yang merupakan saluran kationik yang berperan penting dalam pemahaman fungsi nyeri. Pemberian senyawa yang mampu berperan sebagai neuroprotektor sangat dianjurkan diberikan pada penderita neuropati karena kemoterapi ini.

Pregabalin merupakan obat yang umum diberikan pada penderita nyeri neuropati, namun melalui mekanisme kerjanya, Pregabalin diperkirakan mampu memiliki efek neuroprotektan dimana Pregabalin bekerja dengan cara mengikat VGCC sub unit $\alpha 2\delta 1$ yang secara prospektif, terapi melalui modifikasi VGCC ini dapat berkembang pada target site yang lain seperti TRPA1 di DRG. TRPA1 merupakan saluran kationik yang berperan penting dalam pemahaman fungsi saraf sensorik pada kondisi nyeri. Berbeda dengan kelompok Oxaliplatin yang mengalami penurunan nilai withdrawal threshold hingga hari terakhir, pada hasil uji perilaku diketahui tidak terjadi penurunan nilai withdrawal threshold yang signifikan pada kelompok treatment jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Waktu paruh pregabalin diketahui sekitar 5-6 jam, pada 8 hari pemberian pregabalin, diketahui tidak terjadi penurunan ambang batas nyeri dikarenakan efek kerja dari pregabalin sebagai pain reliever. Namun 14 hari setelah pemberian Oxa + Pregabalin diketahui nyeri tetap tidak terjadi pada kelompok treatment, dimana pada kurun waktu ini seharusnya pregabalin sudah tereliminasi sempurna dalam tubuh. Hasil ini menunjukkan bahwa pregabalin mampu mencegah kerusakan neuron yang berujung tidak terjadinya nyeri neuropati dimana hal ini juga didukung dengan hasil uji molekular TRPA1 dimana pada hasil ini diketahui tidak terjadi peningkatan ekspresi TRPA1 dan tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan tidak terjadinya kerusakan neuron sehingga neuron tidak perlu menjadi lebih sensitive dan tidak terjadi overekspresi dari TRPA1.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pemberian Oxaliplatin menyebabkan terjadinya neurotoksisitas yang berujung pada timbulnya neuropati dan overekspresi dari TRPA1 kemudian dengan pemberian *co-treatment* Pregabalin dapat mencegah terjadinya kerusakan neuron tersebut sehingga neuropati overekspresi dari TRPA1 tidak terjadi.

ABSTRACT

The Effect of Pregabalin Co-treatment on Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Expression mRNA in Dorsal Root Ganglion of Mice with Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy

Alda Khairunnisa Syahla

Neuropathic pain is the most common side effect due to chemotherapy use. This condition is often known as Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy (CIPN). Oxaliplatin is a platinum-based anticancer causing neurotoxicity and mechanical allodynia. Pregabalin is thought to have a neuroprotectant effect where Pregabalin works by binding to the VGCC sub unit $\alpha 2\delta 1$. Prospectively, therapy through modification of this VGCC can develop at other target sites such as TRPA1 in DRG. This study aims to determine the effect of co-treatment pregabalin administration on changes in mRNA TRPA1 expression in the Dorsal Root Ganglion of mice with an oxaliplatin-induced CIPN model. thirty ddy male mice, divided into normal group, neuropathic induced by Oxaliplatin 3mg/kg group, and treatment group with Pregabalin in three various doses, were used in this study. The Neuropathic group only receive Oxaliplatin 3mg/Kg BW (i.p) four times, and for the treatment group, Oxaliplatin was administered co-treatment with pregabalin at a dose of 10; 50; 100 mg/kg BW on the same day eight time. There was a significant decrease in the withdrawal threshold value in the oxaliplatin group, while did not occur in the pregabalin group. Furthermore, the administration of oxaliplatin significantly increased TRPA1 expression, whereas in the pregabalin group TRPA1 expression did not increase. The results of this study indicate that pregabalin can prevent the neurotoxicity of chemotherapy.

Keywords: CIPN, Oxaliplatin, Pregabalin, TRPA1, DRG.

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Pengesahan	ii
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kemoterapi.....	7
2.2. Nyeri.....	7
2.3. Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy (CIPN)	10
2.4. Agent antikanker Oxaliplatin	11
2.4.1. Mekanisme Kerja Oxaliplatin.....	12
2.4.2. Mekanisme Neuropati oleh Oxaliplatin	13
2.4.3. Dosis Oxaliplatin	16
2.5. <i>Dorsal Root Ganglion</i> (DRG) terkait nyeri	17
2.6. Voltage-Gated Calcium Channel (VGCC) dan nyeri.....	18

2.7.	Pilihan Treatment CIPN	19
2.7.1.	Pregabalin	19
2.7.2.	Dosis Pregabalin	20
2.8.	Transient Receptor Potential (TRP)	20
2.8.1.	Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)	21
2.8.2.	Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1).....	22
2.8.3.	Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8)	22
2.9.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	23
2.10.	Tahapan PCR.....	23
2.10.1.	RT-PCR.....	24
2.11.	Behavioral Test for CIPN	24
2.11.1.	Von Frey.....	25
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....		26
3.1.	Alur Kerangka Konseptual.....	26
3.2.	Uraian Kerangka Konseptual :	27
BAB IV METODE PENELITIAN		30
4.1.	Jenis Penelitian.....	30
4.2.	Bahan dan Alat Penelitian.....	30
4.2.1.	Bahan Penelitian	30
4.2.2.	Alat Penelitian.....	30
4.3.	Definisi Operasional.....	31
4.4.	Subyek Penelitian.....	32
4.5.	Etik Penelitian	33
4.6.	Metode Penelitian.....	33
4.6.1.	Rancangan Penelitian.....	33
4.6.2.	Penyiapan Obat	34
4.6.3.	Protokol Penelitian.....	34

4.6.3.1	Penyiapan Hewan Coba	34
4.6.3.2	Pemberian Obat	34
4.6.3.3	Evaluasi Nyeri	34
4.6.3.4	Uji Molekular	35
4.6.4.	Kerangka Operasional.....	36
4.6.5.	Preparasi Sampel.....	36
4.6.6.	Tahapan Penelitian.....	37
4.6.7.	Analisis Statistik	41
4.6.8.	Uji Statistika	41
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN		42
5.1.	UJI VON FREY	42
5.2.	UJI RT-PCR.....	49
5.2.1.	Perhitungan kadar RNA total sampel DRG.....	49
5.2.2.	Penyetaraan Kadar RNA Total Sampel DRG.....	50
5.2.3.	Sintesis Cdna, Amplifikasi dan Elektroforesis	51
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		57
6.1.	KESIMPULAN	57
6.2.	SARAN	57
DAFTAR PUSTAKA		58
LAMPIRAN.....		64

DAFTAR TABEL

Table	Halaman
IV.1 Urutan Primer TRPA1 dan β -actin yang digunakan.....	36
IV.2 Jenis dan Jumlah Komponen yang Ditambahkan.....	39
IV.3 Jenis dan jumlah pereaksi yang ditambahkan.....	39
IV.4 Komponen yang ditambahkan pada tahap amplifikasi.....	40
V.1 Hasil pengukuran pengaruh Pregabalin terhadap nyeri neuropati perifer	44
V.2 Kadar RNA total sampel DRG	50
V.3 Penyetaraan Kadar RNA Total Sampel DRG	51
V.4 Rekapitulasi rasio relative mRNA TRPA1 terhadap β -actin	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Jalur nyeri nosiseptif.....	8
2.2 Jalur penghantaran nyeri.....	9
2.3 Struktur Oxaliplatin	11
2.4 Mekanisme kerja agent antikanker	12
2.5 Kerusakan Mitokondria dan Stres Oksidatif.....	13
2.6 Disfungsi ion channel	14
2.7 Dorsal Root Ganglion (DRG)	17
2.8 VGCC.	18
2.9 TRP channel.....	20
2.10 Von Frey Test.	25
4.1 Diagram pengelompokan hewan coba	33
4.2 Diagram Kerangka Operasional.....	36
5.1 Grafik pengaruh pemberian Pregabalin terhadap neuropati perifer.....	44
5.2 Contoh gel elektroforesis	52
5.3 Pengaruh Pregabalin terhadap ekspresi mRNA TRPA1 pada DRG.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Tabel hasil one way ANOVA Dorsal Root Ganglion dengan primer TRPA1	65
2 Hasil gel elektroforesis setelah dikuantifikasi dengan ImageJ	66
3 Tabel hasil one way ANOVA uji von frey hari ke-0	68
4 Tabel hasil two way ANOVA uji von frey	69
5 Sertifikat Uji Kelaikan Etik	70

DAFTAR SINGKATAN

CIPN	: <i>Chemotherapy Induced Peripheral Neuropathy</i>
DACH	: <i>Diaminosikloheksan</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DRG	: <i>Dorsal Root Ganglia</i>
GABA	: <i>gamma-aminobutyric acid</i>
IL-	: <i>Interleukin</i>
i.p	: <i>Intraperitoneal</i>
NMDAr	: <i>N-methyl-D-aspartate Acid receptor</i>
PAG	: <i>periaqueductal gray</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	: <i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TG	: <i>Trigeminal Ganglion</i>
TRP	: <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA1	: <i>Transient Receptor Potential Ankryn 1</i>
TRPM8	: <i>Transient Receptor Potential Melastatin 8</i>
TRPV1	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>
VGCC	: <i>Voltage Gated Calcium Channel</i>