

SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) PADA HIPOKAMPUS MENCIT YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK



AHMAD FACHRUL ROZI

NIM : 051811133150

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN FARMASI PRAKTIS

SURABAYA

2022

HALAMAN JUDUL

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP
FUNGSI KOGNITIF DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) PADA HIPOKAMPUS MENCIT
YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK**

AHMAD FACHRUL ROZI

051811133150

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN FARMASI PRAKTIS

SURABAYA

2022

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP
FUNGSI KOGNITIF DAN EKSPRESI MRNA *BRAIN DERIVED*
NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) PADA HIPOKAMPUS MENCIT
YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airangga**

2022

Oleh :

Ahmad Fachrul Rozi

051811133150

**Skripsi ini telah disetujui
pada tanggal 18 Agustus 2022 oleh :**

Pembimbing Utama


apt. Chrisnawan Ardianto, S.Farm., M.Sc., Ph.D.
NIP. 198402292008011003

Pembimbing Serta


apt. Mahardian Rahmadi, S. Si., M. Sc, Ph.D.
NIP. 198103142005011002

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Ahmad Fachrul Rozi

NIM : 051811133150

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

**PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP FUNGSI KOGNITIF
DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF)
PADA HIPOKAMPUS MENCIT YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK**

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila kemudian diketahui bahwa 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 digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 18 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,



Ahmad Fachrul Rozi

NIM. 051811133150

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Ahmad Fachrul Rozi

NIM : 051811133150

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

**PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP FUNGSI KOGNITIF
DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF)
PADA HIPOKAMPUS MENCIT YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK**

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 saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Surabaya, 18 Agustus 2022

Yang membuat pernyataan,



Ahmad Fachrul Rozi

NIM. 051811133150

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah, dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Segala puji penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah mencurahkan rahmat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) PADA HIPOKAMPUS MENCIT YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Tak lupa juga shalawat serta salam penulis haturkan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, baik moril maupun materiil untuk itu dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan terimakasih yang tak terhingga kepada :

1. Bapak apt. Chrismawan Ardianto, S.Farm., M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan Bapak apt. Mahardian Rahmadi, S. Si., M. Sc,Ph.D selaku dosen pembimbing serta yang senantiasa meluangkan waktu dan senantiasa sabar dalam memberikan saran, masukan, dan motivasi dalam proses penyusunan naskah dan menyelesaikan penelitian ini dengan baik. Semoga ilmu-ilmu yang Bapak sampaikan menjadi amal jariyah untuk Bapak.
2. Bapak Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA. selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan dukungan berupa fasilitas dalam penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis dalam menempuh pendidikan Program Sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
4. Bapak apt. Andi Hermansyah, S.Farm., M.Sc., Ph.D selaku Kepala Departemen Farmasi Praktis dan Ibu apt. Dinda Monika Nusantara Ratri, S.Farm., M.Farm. Klin. selaku Sekretaris Departemen Farmasi Praktis yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan selalu mengingatkan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Prof. Dr. apt. Budi Suprpti, Dra., M.Si. dan Bapak Prof. Dr. apt. Suharjono, Ms. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan sarannya demi perbaikan penyusunan skripsi ini sehingga lebih baik.

6. Ibu Dr. apt. Idha Kusumawati, M.Si. sebagai dosen wali penulis yang telah memberikan arahan, nasihat, dan motivasi selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Semua Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Semoga ilmu yang Bapak Ibu dosen berikan menjadi amal jariyah untuk Bapak dan Ibu.
8. Orang tua terkasih dan tersayang, Bapak Sucipto dan Almarhmah Ibu Lestari. yang telah mencurahkan kasih sayang, doa, perhatian, dukungan, dan ridho kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan pendidikan sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga ini. Terimakasih pula kepada ke-4 kakak saya Qurrata A'yun, Muhammad Muizzudin, Fathul Ali, dan Muhammad Hamzah yang turut memberikan semangat dan motivasi tiada henti kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kebaikan dan merahmati mereka semua.
9. Indira sebagai partner skripsi dalam topik ini yang sangat membantu mulai dari perencanaan topik sampai naskah ini selesai dan juga dalam penyaluran ide dan dalam pengambilan data di laboratorium.
10. Tim seperjuangan teman - teman, yang telah memberikan bantuan tanpa pamrih selama penelitian di laboratorium yakni Alda, Rima, Lely, Windy, Intan, Theresia, Luthfiatur, Caca, Cladita, dan Wuri. Serta kakak tingkat S2 Mas Budi, Mbak Alma, Mbak Honey, dan Mas Yusuf yang mengajarkan, membantu, dan banyak berbagi pengalaman selama melakukan penelitian ini.
11. Teman teman kuliah berkumpul, berdiskusi, bertukar pikiran, bermain dan memberikan semangat selalu, baik dalam studi di Fakultas Farmasi maupun berproses berorganisasi.
12. Seluruh teman kelas B dan angkatan FLAKKA 2018 yang telah berjuang bersama dan berbagi pengalaman dalam menempuh pendidikan di Farmasi ini.
13. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu kelancaran penyelesaian skripsi ini.

Demikian ucapan terima kasih yang bisa penulis sampaikan, semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dengan berlipat ganda. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang kefarmasian.

Penulis

RINGKASAN

PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP FUNGSI KOGNITIF DAN EKSPRESI mRNA *BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR* (BDNF) PADA HIPOKAMPUS MENCIT YANG DIINDUKSI STROKE HEMORAGIK

Ahmad Fachrul Rozi

Stroke hemoragik disebabkan oleh pecahnya pembuluh darah pada area otak sehingga suplai oksigen pada otak berkurang dan darah yang berada diluar pembuluh menyebabkan toksisitas pada sel. Hal ini menyebabkan apoptosis neuron pada bagian otak salah satunya di area hipokampus sehingga fungsi kognitif terganggu. *Brain derived neurotrophic factor* merupakan anggota neurotrofin yang memiliki peran dalam perkembangan neuron, diketahui ekspresi terbesar BDNF terdapat pada neuron hipokampus. BDNF berperan dalam peningkatan daya tahan neuron dan merangsang pertumbuhan baru, pembentukan sinapsis, dan juga menekan apoptosis sel pada bagian otak. Secara *behaviour*, fungsi kognitif dapat diketahui melalui pengujian *Y maze* yang merupakan pengujian keterampilan memori jangka pendek, serta plastisitas memori pada hewan uji. Untuk melindungi kerusakan pada neuron diperlukan suatu neuroprotektan. Eritropoietin (EPO) merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai agen neuroprotektif dan berperan sebagai antiapoptosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menganalisa adanya efek pemberian EPO dalam mengatasi stroke hemoragik melalui peningkatan fungsi kognitif dan perubahan ekspresi BDNF pada hipokampus mencit yang diinduksi stroke hemoragik.

Pada penelitian ini digunakan 40 mencit yang terbagi menjadi 5 kelompok yaitu sham dan stroke lalu kelompok stroke yang diberikan EPO dalam berbagai dosis yaitu 1000, 5000, 10.000 IU/kgBB. Model hewan stroke hemoragik diinduksi dengan metode *autologus whole blood* dan diinjeksikan melalui intracerebroventrikular (i.c.v). Setelah 3 jam induksi stroke mencit diberikan injeksi EPO pertama kali dan diinjeksikan setiap hari hingga hari ke 6 pasca induksi, penginjeksian dilakukan secara intraperitoneal (i.p). Pengukuran fungsi kognitif dilakukan pada hari ke 1,3,7, dan 14 menggunakan apparatus *Y maze*. Pada hari ke 14 setelah pengukuran fungsi kognitif mencit di *sacrifice* untuk pengambilan jaringan hipokampus yang nantinya akan diukur ekspresi gen BDNF menggunakan *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Hasil penelitian menunjukkan penurunan fungsi kognitif secara signifikan terjadi pada kelompok stroke dibandingkan kelompok sham mulai hari 3 hingga hari ke 14. Pemberian EPO 1000 IU/kgBB dan 5000 IU/kgBB cenderung meningkatkan fungsi kognitif pada hari ke 7 sedangkan pada pemberian EPO 10.000/kgBB mampu meningkatkan fungsi kognitif secara signifikan pada hari ke 7 hingga hari ke 14, hasil ini dilihat dari pengukuran *behaviour* dan dilihat akumulasi persen *alternation*-nya. Pada hasil PCR diketahui pemberian EPO cenderung meningkatkan ekspresi mRNA BDNF tetapi secara statistika tidak berpengaruh secara signifikan. Pemberian EPO dengan dosis 10.000 IU/kgBB pada kelompok stroke mampu meningkatkan kadar mRNA BDNF diatas

kelompok sham. Pemberian EPO dapat memberikan efek perbaikan terhadap fungsi kognitif mencit yang diinduksi stroke hemoragik hal ini dimungkinkan karena keterlibatan BDNF di hipokampus.

ABSTRACT

Effect of Erithropoietyn Administration on Cognitive Function and Brain Derived Neutrophic Factor (BDNF) mRNA Expression in Hippocampus of Mice Induced by Hemorrhage Stroke

Hemorrhage stroke caused by the rupture of blood vessels in the brain area so that the oxygen supply to the brain is reduced and blood outside the vessels causes cell toxicity. This causes neuronal apoptosis in parts of the brain, one of which is in the hippocampus area so that cognitive function is disrupted. The cognitive impairment after ICH is affected due to hippocampal damage. BDNF is a neurotrophin group that has an essential role in the survival and differentiation of neuron development in the hippocampus area. In addition, there is evidence that erythropoietin (EPO) promotes the proliferation and differentiation of erythroid progenitors and the survival of maturing erythroid cells. This study was aim to determined and analyzed the effect of EPO administration in overcoming hemorrhagic stroke through increased cognitive function and changes in BDNF expression in the hippocampus of mice induced hemorrhage stroke. Male adult ddY mice were subjected to sham injection or ICH induction using autologous whole blood intracerebroventricular injection. The ICH groups were injected with 1000, 5000, and 10,000 IU/kgBW EPO. Y maze test was done 1, 3, 7, and 14 days after ICH. Then sacrifice was made to take hippocampus and samples were amplified using polymerase chain reaction (PCR). The result showed ICH induction decreased cognitive function. . In comparasion to ICH group, EPO 10,000 significantly increased. PCR results showed that EPO administration tended to increase BDNF mRNA expression in hippocampus. Administration of EPO at a dose of 10,000 IU/kgBW in the stroke group was able to increase BDNF mRNA levels above the sham group. EPO ameliorates the cognitive function deficit induced by the ICH condition, possibly by modulating the hippocampal BDNF expression

Keywords: hemorrhage stroke, erythropoietin, cognitive function, hippocampus

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RINGKASAN	x
ABSTRACT.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiiiv
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN TEORI	5
2.1 Tinjauan Tentang Stroke	5
2.1.1 Faktor Stroke	5
2.1.2 Stroke Iskemik.....	6
2.1.3 Stroke Hemoragik.....	7
2.1.4 Patofisiologi Stroke Hemoragik	7
2.2 Model Induksi Stroke Hemoragik Pada Hewan.....	8
2.2.1 <i>Whole Blood</i>	8
2.2.2 <i>Collagenase</i>	8
2.3 Tinjauan Tentang Hipokampus	9
2.4 Tinjauan Tentang Eritropoietin	9
2.4.1 Karakteristik Eritropoietin.....	10
2.4.2 Penggunaan Eritropoietin	11
2.4.3 Farmakokinetik Eritropoietin	12
2.4.4 Mekanisme Antiapoptosis Eritropoietin.....	12
2.5 Tinjauan Tentang BDNF(<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)	13
2.6 Uji Perilaku Y maze	14
2.7 Tinjauan Tentang PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	15
2.7.1 Pengertian PCR	15

2.7.2 Tahapan PCR	16
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....	17
3.1 Alur Kerangka Konseptual.....	17
3.2 Uraian Kerangka Konseptual	18
3.3 Hipotesis.....	19
BAB IV METODE PENELITIAN	20
4.1 Jenis Penelitian.....	20
4.2 Materi Penelitian	20
4.2.1 Bahan Penelitian	20
4.2.2 Alat Penelitian	21
4.3 Definisi Operasional.....	22
4.4 Subyek Penelitian.....	22
4.5 Metodologi Penelitian	23
4.5.1 Rancangan Penelitian	23
4.5.2 Protokol Penelitian	23
4.5.3 Penyiapan Obat.....	24
4.5.4 Kerangka Operasional	25
4.5.5 Preparasi Sampel	27
4.5.6 Tahapan Penelitian	28
4.5.7 Uji Statistika	31
4.5.8 Etik Penelitian	31
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	32
5.1 Hasil Penelitian	32
5.1.1 Pengaruh Eritropoietin pada Fungsi Kognitif mencit yang Diinduksi Stroke Hemoragik dengan metode <i>Y maze</i>	32
5.1.2 Pengaruh Eritropoietin Terhadap Berat Badan Mencit yang Diinduksi Stroke Hemoragik	34
5.1.3 Pengaruh Eritropoietin Terhadap Ekspresi mRNA BDNF pada Hipokampus Mencit yang Diinduksi Stroke Hemoragik.....	35
5.2 Pembahasan.....	38
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	45
6.1 Kesimpulan	45
6.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
IV.1 Konsentrasi dan dosis anestesi hewan coba	24
IV.2 Urutan primer BDNF dan β -actin yang digunakan	26
IV.3 Jenis dan jumlah komponen yang ditambahkan	29
IV.4 Jenis dan jumlah pereaksi yang ditambahkan	29
IV.5 Komponen yang ditambahkan untuk tahap amplifikasi	30
V.1 Nilai rata-rata % <i>alternation</i> pada kelompok sham dan stroke	31
V.2 Nilai rata-rata % <i>alternation</i> pada kelompok stroke dan stroke + EPO berbagai dosis	32
V.3 Kadar mRNA total sampel hipokampus mencit	35
V.4 Perbandingan rata-rata (mean) intensitas band BDNF dan β -actin pada sampel hipokampus mencit	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Letak hipokampus pada otak	9
2.2 Mekanisme EPO sebagai antiapoptosis	11
2.3 Model apparatus Y <i>maze</i>	13
2.4 Tahapan <i>polymerase chain reaction</i>	14
3.1 Alur kerangka konseptual	16
4.1 Diagram pengelompokan hewan coba	22
4.2 Kerangka operasional penelitian	24
4.3 Setting Y <i>maze</i> saat pengujian	26
5.1 Pengukuran fungsi kognitif mencit kelompok sham dan stroke.	32
5.2 Pengukuran pengaruh eritropoietin terhadap fungsi kognitif mencit yang diinduksi stroke hemoragik.	33
5.3 Pengaruh pemberian eritropoietin terhadap berat badan mencit yang diinduksi stroke hemoragik	34
5.4 Ekspresi relatif BDNF terhadap β -actin pada hipokampus mencit	37

DAFTAR SINGKATAN

BAX	= <i>Bcl-2 Associated X protein</i>
BCL-2	= <i>B-Cell Lymphoma - 2</i>
BDNF	= <i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CREB	= <i>cAMP-responsive elementbinding protein</i>
DNA	= <i>Deoxy nucleic acid</i>
EPO	= <i>Erythropoietin</i>
EpoR	= <i>Erythroid progenitor cells</i>
MAPK	= <i>Mitogen activated protein kinase</i>
Nf- κ B	= <i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
NMDA	= <i>N-methyl-d-aspartate</i>
PCR	= <i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	= <i>Phosphoinostide 3-kinase</i>
PLC γ	= <i>Phospolipase C-gamma</i>
RNA	= <i>Ribo nucleic acid</i>
ROS	= <i>Reactive oxygen species</i>
TrkB	= <i>Tropomyosin receptor kinase</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>