

# *Jfi* Jurnal Farmasi Indonesia



*Centella asiatica*

**VOLUME 7** ❖ NOMOR 4 ❖ JULI 2015

ISSN 1412 - 1107

# **jfi** *Jurnal Farmasi Indonesia*

Terbit sejak 1 Januari 2002

Terakreditasi SK Menteri Pendidikan dan Kebudayaan  
Nomor : 212/P/2014

Diterbitkan oleh Pengurus Pusat

**Ikatan Apoteker Indonesia**

Terbit 2 kali setahun pada bulan Januari dan Juli

**Jurnal Farmasi Indonesia** adalah jurnal ilmiah resmi Ikatan Apoteker Indonesia. Isi Jurnal mencakup semua aspek dalam ilmu pengetahuan dan teknologi kefarmasian antara lain farmakologi, farmakognosi, fitokimia, farmasetika, kimia farmasi, biologi molekuler, bioteknologi, farmasi klinik, farmasi komunitas, farmasi pendidikan, dan lain-lain.

Jurnal mengundang makalah ilmiah dari teman sejawat, baik apoteker maupun bukan apoteker yang isinya dapat memacu kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kefarmasian dan bidang-bidang lain yang berkaitan. Makalah dapat berupa laporan hasil penelitian atau telaah pustaka (*critical review*).

Jurnal Farmasi Indonesia dapat diperoleh di Sekretariat PP IAI atau Redaksi Jurnal Farmasi Indonesia

---

**ISSN: 1412-1107**

© Copyright 2015 Ikatan Apoteker Indonesia

**Gambar cover oleh:** Erna Sinaga dan Ramli Badrudin

**Printing :** PT ISFI Penerbitan

**Gambar cover:**

Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.)

**Harga Berlangganan:**

Rp. 200.000,- per tahun (2 Nomor)

---

***Dipersembahkan Untuk Kemajuan  
Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kefarmasian  
di Indonesia***

**Pemimpin Umum/  
Penanggung Jawab**

Drs. Nurul Falah Edy Pariang, Apt.

**Ketua Dewan Editor**

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS, Apt.

**Editor Pelaksana**

Dr. Christina Avanti, MSi, Apt.

**Anggota Dewan Editor**

Prof. Dr. Shirly Kumala, MBiomed, Apt.

Prof. Dr. Eddy Meiyanto, Apt.

Prof. Dr. Daryono Hadi Tjahjono, MSc, Apt.

Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, MS, PhD, Apt.

Dr. Umi Athijah, MS, Apt.

Dr. Arry Yanuar, MSi, Apt.

Raymond R. Tjandrawinata, PhD, MS, MBA.

**Manajer Administrasi**

Dra. Chusun Hamli, MKes, Apt.

**Manajer Sirkulasi**

Drs. Azwar Daris, MKes, Apt.

**Sekretaris Redaksi**

Ramli Badrudin

Siti Kusnul Khotimah, S.Sos.

**Alamat Redaksi/Penerbit**

Jl. Wijayakusuma No.17 Tomang - Jakarta Barat

Telepon/Fax 021- 56943842

E-mail:

*editor@jfionline.org*

*jurnalfarmasiindonesia@gmail.com*

online submission website: *jfionline.org*

|                                                                                                                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chemical Constituents and Antibacterial Activities of Leaves of Sumatran King Fern (<i>Angiopteris evecta</i> G. Forst HOFFM.)</b><br>Vivi Anggia, Amri Bakhtiar, and Dayar Arbain                                                  | 195 - 202 |
| <b>Isolasi dan Karakterisasi Asam Asiatat dari Ekstrak Etanol Herba Pegagan (<i>Centella Asiatica</i>. (L.) Urban)</b><br>Ida Musfiroh, Tresna Nursyamsiah, Entris Sutrisna, Ahmad Muhtadi, Rahmana E. Kartasasmita dan Slamet Ibrahim | 203 - 209 |
| <b>Aktivitas Antelmintik Ekstrak Air Daun Puguntano <i>Curanga fel-terrae</i> (Lour.) Merr.</b><br>Popi Patilaya dan Dadang Irfan Husori                                                                                               | 210 - 215 |
| <b>Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol dari Akar dan Batang Tumbuhan Sekunyit (<i>Fibraurea Tinctoria</i> Lour)</b><br>Rahayu Utami, Nofri Hendri Sandi, Syilfia Hasti dan Sutri Delvia                                          | 216 - 222 |
| <b>Perbandingan Efek Antipiretik antara Ibuprofen dengan Campuran Ibuprofen dan Kafein</b><br>Dian Ayu Juwita, Deni Noviza, dan Erizal                                                                                                 | 223 - 227 |
| <b>Ekspresi dan Kadar GABA pada Palatum Sekunder Mencit Prenatal dengan Paparan Diazepam di Periode Organogenesis</b><br>Rika Yulia, Kuntoro, Heru Santoso, dan Win Darmanto                                                           | 228 - 232 |
| <b>Sintesis Sorbent Ekstraksi Fase Padat dengan Teknik Molecular Imprinting dengan Monomer Akrilamid untuk Ekstraksi Glibenklamid dari Serum Darah</b><br>Aliya Nur Hasanah, Rahmana Emran Kartasasmita, dan Slamet Ibrahim            | 233-241   |
| <b>Uji Aktivitas <i>In-silico</i> Senyawa Baru 1-Benzil-3-benzoilurea Induk dan Tersubstitusi sebagai Agen Antiproliferatif</b><br>Farida Suhud                                                                                        | 242 - 251 |
| <b>Efek Kronis Minuman Berenergi pada Ginjal</b><br>Suharjono, Zamrotul Izzah, Mareta Rindang A., Aniek Setya B., dan Mahardian Rahmadi                                                                                                | 252 - 257 |
| <b>Indeks</b>                                                                                                                                                                                                                          |           |
| <b>Petunjuk bagi Penulis</b>                                                                                                                                                                                                           |           |
| <b>Guidelines for Authors</b>                                                                                                                                                                                                          |           |

## Ekspresi dan Kadar GABA pada Palatum Sekunder Mencit Prenatal dengan Paparan Diazepam di Periode Organogenesis

Rika Yulia<sup>1</sup>, Kuntoro<sup>2</sup>, Heru Santoso<sup>3</sup>, dan Win Darmanto<sup>4</sup>

**ABSTRACT:** This study aimed to analyze changes in expression and levels of Gamma-aminobutyric acid (GABA) neurotransmitters in the palate of prenatal mice exposed to diazepam in the period of organogenesis. GABA is required in palate formation. About 27 mices (*Mus musculus*) of known age and weight were used. They were divided in three groups, i.e. control group which were injected daily with distilled water, the second groups were injected daily with diazepam 8 mg/kg/day and the third groups were injected daily with diazepam 16 mg/kg/day. All groups were administered intraperitoneally injection during the organogenesis phase (9<sup>th</sup> – 15<sup>th</sup> days). Increased GABA level significantly shown in treated groups. The result showed that the exposure of diazepam during the period of organogenesis cause increased of GABA level.

**Keywords:** Cleft palate, organogenesis, diazepam, GABA, prenatal mice

**ABSTRAK:** Penelitian ini bertujuan menganalisis perubahan ekspresi dan kadar Neurotransmitter *Gamma-aminobutyric acid* (GABA) pada palatum mencit prenatal, yang terpapar diazepam dalam periode organogenesis. Paparan diazepam dalam periode organogenesis menyebabkan tidak terjadinya penyatuan lempeng palatum sehingga terjadi celah palatum. GABA berperan dalam pembentukan palatum. Duapuluh tujuh (27) ekor mencit (*Mus musculus*) betina, bunting, yang sudah diketahui umur dan berat badannya digunakan dalam penelitian ini. Hewan coba dibagi menjadi tiga (3) kelompok, yaitu kelompok kontrol, diberi aquades, kelompok uji I diberi injeksi diazepam 8 mg/kg/BB dan kelompok uji II diberi injeksi diazepam 16 mg/kg/BB setiap hari. Pemberian secara intraperitoneal dalam periode organogenesis, yaitu gestasi hari ke 9 sampai 15. Hasil pemeriksaan imunohistokimia menunjukkan tidak terjadi peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan GABA, tetapi pemeriksaan menggunakan Elisa Reader, memperlihatkan terjadinya peningkatan kadar GABA pada kelompok uji. Analisis hasil menunjukkan bahwa paparan diazepam dalam periode organogenesis menyebabkan terjadinya peningkatan kadar GABA jaringan palatum pada mencit prenatal.

**Kata kunci:** Celah palatum, organogenesis, diazepam, GABA, mencit prenatal

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

<sup>2</sup> Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga

<sup>3</sup> SMF Obgyn RS Dr. Soetomo

<sup>4</sup> Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

---

### Korespondensi:

Rika Yulia

Email: rika.y73@gmail.com



## PENDAHULUAN

Diazepam, suatu senyawa psikoaktif, prototip dari obat sedatif golongan benzodiazepin, digunakan secara luas untuk mengatasi ansietas, *painful musculoskeletal*, epilepsi dan *psychosomatic disease* (1,2). Diazepam memiliki beberapa efek pada proses perkembangan embrio seperti pembelahan sel, mitosis dan interaksi antar sel, sehingga memungkinkan timbulnya efek teratogenik pada embrio (1,3). Efek teratogenik diazepam, kemungkinan besar paling beresiko pada trimester pertama kehamilan.

Beberapa penelitian menggunakan hewan coba telah membuktikan bahwa penggunaan diazepam selama gestasi dapat menyebabkan celah orofacial (*orofacial clefting*), namun sampai saat ini, efek pada manusia masih merupakan kajian yang banyak diperdebatkan (2, 4, 5). Pemberian diazepam di periode organogenesis terbukti menyebabkan tidak terjadinya penyatuan lempeng palatum sehingga terjadi celah palatum (*cleft palate*), pada mencit prenatal (6).

Celah palatum (*cleft palate*) merupakan salah satu bentuk cacat bawaan di daerah kraniofasial pada bayi baru lahir yang paling sering ditemui (7), dan mengakibatkan gambaran wajah yang abnormal dan gangguan bicara sehingga membutuhkan penanganan yang ekstensif (8). Di Indonesia *cleft lip* dan *cleft palate* adalah salah satu dari empat jenis cacat bawaan yang paling sering dijumpai (9).

Pembentukan palatum, organ yang memisahkan rongga mulut dan rongga hidung merupakan suatu proses yang berlangsung cepat dalam perkembangan embrio vertebrata, membutuhkan beberapa tahapan kritis. Kegagalan dalam tahapan proses tersebut menyebabkan terjadinya celah palatum (10, 11). Etiologinya sangat kompleks dan multifaktorial, baik faktor genetik maupun faktor lingkungan terlibat dan diregulasi melalui mekanisme molekular yang sangat rumit (11).

Neurotransmitter diduga berperan dalam elevasi lempeng palatum (*Shelf elevation*). Neu-

rotransmitter *Gamma-aminobutyric acid* (GABA), suatu neurotransmitter inhibitori utama pada sistem saraf pusat, diketahui tidak saja meregulasi aktivitas neuron tetapi juga migrasi sel, *survival*, proliferasi dan diferensiasi baik sel neuron dan non-neuron (10). GABA dibutuhkan dalam pembentukan palatum (12). Keberadaan GABA endogen atau asam glutamate dekarboksilase 67 (Gad 67), salah satu enzim yang berperan dalam sintesis GABA, telah terdeteksi pada lempeng palatum (10). Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh diazepam terhadap neurotransmitter GABA.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Bahan uji Diazepam yang digunakan adalah valium produksi Roche, setiap ampul berisi 5 mg/ml.

### Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*), strain BALB/C, betina, dewasa, bunting, berat badan 20-40 gram serta embrio mencit yang diperoleh pada gestasi hari ke 15 dari masing-masing induk. Jumlah sampel yang digunakan 27 ekor, dibagi menjadi tiga (3) kelompok, yaitu kelompok kontrol, uji I dan uji II, masing-masing sembilan (9) ekor.

Mencit bunting diperoleh dengan cara mengumpulkan dua ekor mencit betina yang sedang dalam fase estrus dalam satu kandang dengan satu ekor mencit jantan fertil semalaman. Apabila esok harinya dijumpai sumbat vagina, maka pada hari itu ditetapkan sebagai gestasi hari ke-0. Setelah bunting, mencit dikelompokkan menjadi tiga kelompok secara random yaitu kelompok kontrol yang diberi larutan fisiologis, kelompok uji I diberi diazepam dengan dosis 8 mg/KgBB dan kelompok uji II diberi diazepam dengan dosis 16 mg/KgBB. Pemberian bahan dilakukan secara intraperitoneal selama fase embriogenesis yaitu gestasi hari ke 9 sampai 15.

## Pengumpulan sampel embrio

Induk mencit dikorbankan dengan cara dislokasi servikal pada gestasi hari ke 15. Induk mencit dibedah, embrio diambil, dibersihkan dengan larutan fisiologis. Bagian kepala embrio diambil.

## Pemeriksaan Imunohistokimia

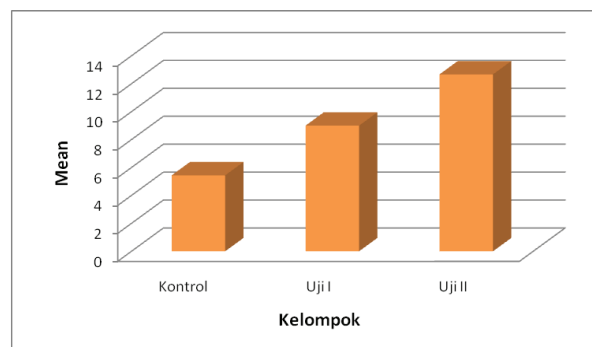
Untuk penilaian ekspresi GABA, potongan jaringan diproses dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal, yaitu monoklonal anti GABA, sesuai protokol standar. Pemeriksaan imunohistokimia menggunakan metode peroksidase, yaitu enzim oksidoreduktatif horse radish peroksidase (HRP) dengan donor electron 3,3' diaminobenzidine (DAB). Hasil pengecatan dengan metode ini akan menimbulkan warna coklat.

## Pemeriksaan kadar GABA

Kuantifikasi GABA dilakukan dengan menggunakan pemeriksaan *Enzym Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

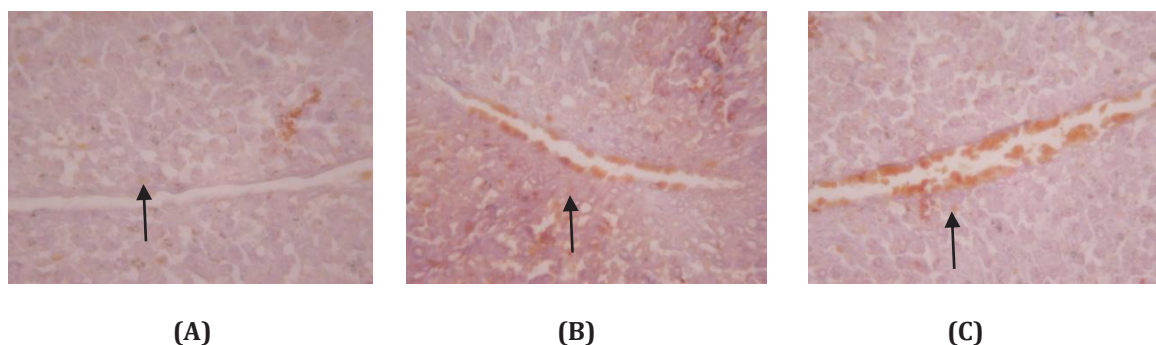
Hasil imunohistokimia menunjukkan rerata jumlah sel epitel palatum mencit prenatal yang mengekspresikan GABA terjadi peningkatan bermakna hanya pada kelompok uji II, yaitu kelom-



**Gambar 1.** Grafik Rerata Jumlah Sel Epitel Palatum Mencit Prenatal yang Mengekspresikan GABA

pok yang mendapat pemberian diazepam dosis 16 mg/kgBB (Gambar 1 dan 2). Hasil ini tidak sesuai teori yang ada karena diazepam adalah agonis GABA, bekerja meningkatkan GABA, sehingga seharusnya pemberian diazepam dengan dosis 8 mg/KgBB juga meningkatkan jumlah GABA. Salah satu penyebab, diperkirakan karena GABA bersifat ekstraseluler, sehingga pengamatannya menjadi lebih sulit.

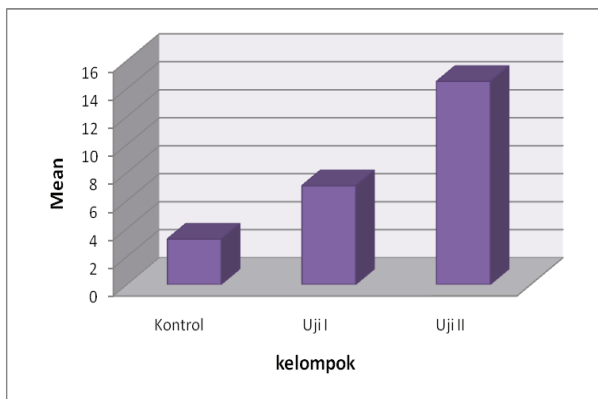
Untuk memperkuat hasil imunohistokimia pada pemeriksaan ekspresi GABA pada jaringan palatum embrio mencit, dilakukan pemeriksaan kadar. Hasil menunjukkan perbedaan karena pada pemeriksaan kadar GABA dengan ELISA, semua kelompok uji menunjukkan peningkatan jumlah GABA yang signifikan (Gambar 3). Hal ini diperkirakan karena GABA berada diekstra-



**Gambar 2.** Sel Epitel Palatum Mencit Prenatal yang mengekspresikan GABA

Keterangan : Kelompok Kontrol (A), Uji I (B) Uji II (C)

Teknik imunohistokimia menggunakan rabbit poliklonal anti GABA, pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Tanda panah menunjukkan ekspresi GABA



**Gambar 3.** Grafik Rerata Kadar GABA Jaringan Palatum Mencit Prenatal

seluler, sehingga deteksi dengan imunohistokimia menjadi kurang akurat. Peningkatan kadar GABA membuktikan bahwa diazepam dapat meningkatkan kadar GABA dan diduga berkorelasi dengan terjadinya celah palatum.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Marinucci (1), yang mencoba menginvestigasi apakah diazepam yang bekerja pada *gamma-aminobutyric acid receptor* (GABRB3) mempunyai implikasi dalam regulasi pembentukan palatum, menemukan bahwa ekspresi gen GABRB3 lebih tinggi pada penderita celah palatum yang tidak terpapar diazepam dibandingkan yang terpapar diazepam. GABRB3 merupakan reseptor dari neurotransmitter *Gamma-aminobutyric acid* (GABA).

Implikasi bahwa GABA berperan dalam pembentukan palatum juga telah ditelusuri dalam suatu penelitian genetik pada mencit yang mengalami defisiensi subunit  $\beta 3$  dari reseptor GABA<sub>A</sub> atau defisiensi Gad 67, ternyata semuanya mengalami celah palatum tanpa malformasi kraniofasial lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa GABA diperlukan dalam jumlah tertentu untuk pembentukan palatum.

Diazepam merupakan agonis GABA, secara tidak langsung mengaktivasi reseptor GABA<sub>A</sub> dan membutuhkan GABA untuk mengekspresikan efeknya, atau dengan kata lain memodulasi efek GABA. Telah diketahui bahwa diazepam menyebabkan perubahan alosterik, sehingga mening-

katkan kerja GABA pada reseptor GABA<sub>A</sub>. Peningkatan kerja GABA karena induksi diazepam diduga memiliki korelasi dengan terjadinya celah palatum pada embrio mencit yang terpapar diazepam di periode organogenesis.

Untuk mencegah potensi terjadinya efek teratogenesis dan efek buruk lainnya pada fetus atau bayi baru lahir, maka sebaiknya penggunaan obat selama kehamilan dihindari. Efek biologis suatu obat berkaitan dengan struktur kimia dari senyawa induk maupun metabolitnya, dan sifat fisika-kimianya akan menentukan apakah obat tersebut menginduksi efek lokal atau sistemik. Sebagian besar obat menimbulkan efek setelah diabsorpsi dan didistribusikan dalam tubuh (efek sistemik). Jumlah obat yang mencapai sirkulasi sistemik (bioavailabilitas) merupakan faktor penting untuk toksisitas sistemik.

Penentuan efek teratogenik suatu obat, merupakan suatu proses yang kompleks, berdasarkan sejumlah data eksperimen pada hewan dan pengalaman manusia. Pada umumnya data toksisitas diperoleh dari eksperimen pada hewan. Hasil suatu studi harus diinterpretasikan dengan memperhatikan hasil studi toksisitas lainnya dan harus mempertimbangkan keterbatasan bila data dari uji pada hewan diekstrapolasikan dengan kondisi paparan pada manusia. Memahami mekanisme kerja suatu zat teratogenik khususnya obat, penting untuk perkembangan obat di masa depan yang bebas resiko pada janin.

## KESIMPULAN

Paparan diazepam dalam periode organogenesis menyebabkan terjadinya peningkatan kadar GABA jaringan palatum pada mencit prenatal.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIKTI melalui program hibah doktor.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Marunucci L, Balloni S, Bodo M, Carinci F, Pezzetti F, Stabellini G, Carmela C, Lumare E. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. *Toxicology* 2008; 257: 10-11.
2. Gidai J, Acs N, Banhidly F, Czeizel AE. No association found between use of very large doses of diazepam by 112 pregnant women for a suicide attempt and congenital abnormalities in their offspring. *Toxicology and Industrial Health* 2008; 24: 29-39.
3. Cannizzaro EM, Martier M, Gagliano F, Plescia M, La Barbera G, Mantia, A, Mineo G, Cannizzaro C. Reversal of prenatal diazepam induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. *Behavioural Brain Research* 2005; 161: 320-330.
4. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngol* 2007; 71: 1509-1519.
5. Igbal MM, Sobhan T, Ryals T. Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate and the nursing infant. *Psychiatric Services* 2002; 53(1): 39-49.
6. Yulia R. Ekspresi Protein Caspase-9 dan Gambaran Histologi Palatum sekunder Mencit Prenatal akibat Paparan Diazepam di Periode Organogenesis. *Jurnal Farmasains* 2011; 1(4): 180-184.
7. Iseki S, Ishii-Suzuki M, Tsunekawa N, Yamada Y, Eto K, Obata K. Experimental induction of palate shelf elevation in glutamate decarboxylase 67-deficient mice with cleft palate due to vertically oriented palatal sheft. *Birth Defects Research (part A)* 2007; 79: 688-695.
8. Meng, L., Bian, Z., Torensma, R and J.W. Von den Hof., 2009. Biological Mechanisms in Palatogenesis and Cleft Palate. *Journal of Dental Research*. 88(1), 22-33.
9. Kadri, N., [et,al]., 1995. Congenital Malformations and Detormations in Provincial Hospitals in Indonesia. *Congo Anom*. 35:411-423.
10. Gritli-Linde A, 2007. Molecular control of secondary palate development. *Developmental Biology*. 301, 309-326.
11. Sheng-jun, L.U., Wei H.E., Bing S.H., Tian M.E.N.G., Xiao-yu L.I., Yu-rong L.I.U., 2009. A preliminary study on the teratogenesis of dexamethasone and the preventive effect of vitamin B12 on murine embryonic palatal shelf fusion in vitro. *Journal of Zhejiang University Science B*, 4 : 306-312.
12. Ding R., Tsunekawa N., Obata K., 2004. Cleft Palate by Picrotoxin or 3-MP and Palatal Shelf elevation in GABA-deficient mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 26:587-592.