

## REVIEW ARTIKEL: METODE PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIKONVULSAN SEBAGAI SKRINING PENGOBATAN EPILEPSI

**Praditya Alfathan, Nasrul Wathoni**

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran  
Jalan Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363  
steverbs10@gmail.com

Diserahkan 27/06/2019, diterima 01/08/2019

### ABSTRAK

Antikonvulsan adalah suatu aktivitas yang diberikan oleh senyawa tertentu yang dapat mengobati penyakit yang memiliki gejala kejang seperti epilepsi. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui potensi obat yang ingin dikembangkan untuk penyakit epilepsy. Pengujian antikonvulsan ini dibagi dengan tiga cara yaitu secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Dalam pengujian ini terdapat uji MES, Neurotoksisitas, Induksi PTZ, Induksi PIL, Midazolam Sleeping Assay, *Electrophysiological recording*, [3H] Flunitrazepam Binding, [3H]-t-Butylbicycloortho benzoate ([3H] TBOB) Binding, dan *molecular docking*.

**Kata kunci:** Pengujian aktivitas, Epilepsi, Antikonvulsan, *In vivo*, *In vitro*, *In silico*

### ABSTRACT

*Anticonvulsant is an activity which given by certain compounds that can treat certain seizure related disease such as epilepsy. The test for identifying anticonvulsant activity consist of three methods: in vitro, in vivo, and in silico. In this test there were MES, Neurotoksisitas, Induksi PTZ, Induksi PIL, Midazolam Sleeping Assay, Electrophysiological recording, [3H] Flunitrazepam Binding, [3H]-t-Butylbicycloortho benzoate ([3H] TBOB) Binding, and molecular docking.*

**Keyword:** Activity test, anticonvulsant, *In vivo*, *In vitro*, *In silico*.

### PENDAHULUAN

Epilepsi merupakan penyakit yang menyerang bagian otak yang ditandai gangguan dalam fluktuasi muatan listrik yang tidak teratur oleh sel-sel otak, sehingga memberikan efek kejang-kejang pada bagian tubuh. Epilepsi dapat diturunkan secara genetik, dimana saat seorang individu dilahirkan terdapat abnormalitas pada

sirkuit (hubungan sinaps di bagian korteks dysplasia, reseptor (reseptor GABA), dan kanal ion (mutasi kanal potassium). [1]

Epilepsi merupakan penyakit kronik umum yang menyerang 50 juta individu di seluruh dunia. Prevalensi median epilepsi di negara maju mencapai 5,8 per 1.0000 dan untuk negara berkembang mencapai 15,4 per 1.000. Data tersebut

memperlihatkan bahwa epilepsi lebih banyak menyerang individu di negara berkembang dibandingkan negara maju.[2]

Pengobatan epilepsi bertujuan untuk membantu individu bebas dari kejang saat fase bangkit. Salah satu pengobatan dari epilepsi adalah antikonvulsan. Pengujian aktivitas antikonvulsan banyak dilakukan untuk menemukan obat yang efektif dan efisien. Terdapat tiga pengujian utama obat antikonvulsan yaitu *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico*. Pengujian ini dipilih sesuai dengan aktivitas antikonvulsan yang ingin didapat. Tujuan dari *review artikel* ini adalah untuk mengenal ketiga pengujian utama dari antikonvulsan dan menjadi bahan referensi dalam penelitian

### POKOK BAHASAN

Pengujian aktivitas antidiabetes dapat diuji dengan tiga acara yaitu secara *in vivo*, *in vitro* dan *in silico*. Pengujian secara *in vivo* pada hewan dibagi menjadi lima metode yaitu metode streptozotocin, uji MES, Neurotoksisitas, Induksi PTZ, Induksi PIL, dan Midazolam *Sleeping Assay*. Pengujian secara *in vitro* dibagi menjadi tiga metode yaitu metode *Electrophysiological recording*, [3H] Flunitrazepam Binding, dan [3H]-t-Butylbicycloortho benzoate ([3H]TBOB) Binding. Pengujian *in silico* dengan menggunakan *molecular docking*.

### PENGUJIAN IN VIVO

*Uji MES (Maximal Electroshock Seizure)*

Uji MES merupakan pengujian yang banyak dilakukan di seluruh dunia dikarenakan efeknya yang efektif untuk menimbulkan kejang tonik-klonik pada mencit. Pengujian ini dilakukan dengan cara memberikan sejumlah stimulus listrik pada bagian mencit melalui elektroda yang dipasang di bagian telinga mencit menggunakan sebuah klip. Hal ini akan merangsang mencit untuk mulai kejang. Pengujian ini relatif mudah dan murah untuk dilakukan, oleh karena itu pengujian ini menjadi standar di seluruh dunia. Ada beberapa parameter standar yang digunakan dalam pengujian ini seperti, arus listrik untuk mencit 50 mA dan tikus 150 mA, frekuensi 50-60 Hz, dan durasi stimulus 0.2 detik.[3]. Pada penelitian [4] menggunakan phenacyl triazole hydrazones sebagai kandidat antikonvulsan. Mencit diberikan dosis sampel 30, 50, dan 100 mg/kg secara intraperitoneal, setelah 30 menit pemberian sampel, mencit diberikan arus listrik 50 mA dengan frekuensi 60 Hz dengan interval 0,2 detik. Modifikasi pengujian MES dapat dilakukan pada mencit dengan mengubah spesifikasi arus 25 mA, 50 Hz, 500 V, dan durasi stimulus 0,2 detik. [5]

#### *Uji Neurotoksisitas*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui efek obat terhadap koordinasi motor tubuh. Pengujian ini menggunakan model *rotarod* dimana mencit akan ditempatkan di atas batang yang berputar. Seekor mencit yang memiliki fungsi tubuh normal dapat bertahan di atas batang berputar

selama 30 detik. Pada penelitian [6] mencit diberikan sampel dengan dosis 30 mg/kg secara i.p dan ditempatkan diatas batang berputar pada interval waktu 30, 60, 90, dan 120 menit.

#### *Uji Induksi Pentylenetetrazol (PTZ)*

Pentylenetetrazol adalah senyawa kimia yang dapat menginduksi kejang dengan cara berikatan dengan reseptor GABA-A. Senyawa ini banyak digunakan untuk menimbulkan kejang pada hewan uji untuk menguji aktivitas suatu antikonvulsan. Pada penelitian [7] mencit diberikan sampel dengan dosis 85 mg/kg secara i.p dan setelah 30 menit mencit diberikan PTZ (80 mg/kg i.p) lalu mencit diobservasi selama 30 menit untuk melihat adanya kejang klonik-tonik.

#### *Uji Induksi Pilocarpine (PIL)*

Pada penelitian [8] mencit dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok uji. Kelompok kontrol tidak diberikan sampel obat dan kelompok uji diberikan sampel obat. Sampel obat yang digunakan adalah asam anakardik dengan dosis 10, 25, 50, 100, dan 150 mg/kg secara intraperitoneal. Setelah 30 menit, mencit diobservasi untuk respon tremor, kejang, dan peripheral kolinergik. Modifikasi intrepetasi data dapat dilakukan dengan menggunakan *Racine Scale* [9]

#### *Midazolam Sleeping assay*

Pengujian ini dilakukan untuk melihat aktifitas sedative dari antikonvulsan. Pada

penelitian [10] mencit dibagi menjadi 4 kelompok dan diberikan masing-masing air suling 10 mL/kg, PB1 (0,5 dan 1 mg mg/kg) dan diazepam 3 mg/kg secara intraperitoneal. Setelah 30 menit, semua mencit diberikan midazolam 1 mg/kg untuk menginduksi efek sedatif. Mencit diobservasi untuk melihat tanda sedatif.

### **PENGUJIAN IN VITRO**

#### *Electrophysiological recording*

Saat kejang terjadi hipereksitasi dari neuron yang ada diotak sehingga menyebabkan pelepasan arus listrik yang bersamaan. Peristiwa ini digunakan sebagai parameter untuk melihat potensi dari antikonvulsan. Preparasi sampel untuk pengujian ini melibatkan pemotongan kepala mencit dan mengambil bagian otak nya. Otak mencit yang sudah dipisahkan dipotong pada bagian temporal, subiculum, perirhinal, enorhinal korteks, hipokampus (CA1 hingga CA3), dan girus dentat. Potongan ini disimpan dalam kamar yang diisi cairan cerebrospinal yang diberikan oksigen. [11]

Pada penelitian [12] otak mencit diambil dan dipotong sagittal 400 µm dan disimpan dalam jaring nilon dengan suhu 31–32°C dengan laju perfusi 1 ml/menit dan didiamkan selama 1 jam sebelum pengujian.

Pengujian dilakukan dengan merekam ekstraseluler dengan elektroda borosilikat yang diisi dengan 1 M NaCl. Ujung elektroda platinum berdiameter 50 µm dengan jarak 25 µm ditempatkan pada str. Radiatum diantara area CA3 dan CA1

dengan arus konstan 400 $\mu$ A. Potongan otak mencit dikatakan tervalidasi untuk pengujian bila alat menunjukkan fEPSP (Field Excitatory Post Synaptic Potential) dengan *spike* amplitude diantara 10 dan 15 mV dan tidak menunjukkan *spike* pada simulasi supramaksimal. Obat kemudian diberikan dengan waktu 20-30 menit perfusi dan data dianalisis. Pada penelitian [13] otak dari tikus berumur 2-3 minggu diberikan perfusi oksigen. Sampel diberikan bersama asam kynurenic 1mM dan diukur menggunakan *whole-cell voltage clamp* pada arus -30 mV hingga -60 mV.

#### *[3H]Flunitrazepam Binding*

Studi in vitro untuk mengetahui potensi antikonvulsan dilakukan berdasarkan prinsip ikatan antikonvulsan dengan reseptor GABA. Pada pasien epileptis akan mengalami kejang yang disebabkan oleh abnormalitas dari reseptor GABA di otak. Reseptor GABA terdiri dari 2 jenis yaitu GABA-A dan GABA-B. GABA-A bertugas untuk meregulasi pemasukan ion klorida ke dalam sel, dan GABA-B bertugas untuk meregulasi pemasukan ion kalsium ke dalam sel. [14] Salah satu golongan obat yang mempengaruhi reseptor GABA adalah golongan benzodiazepin. Mekanisme benzodiazepine adalah menginduksi pemasukan ion klorida melalui reseptor GABA-A. [15] [3H]Flunitrazepam merupakan salah satu situs untuk label pada reseptor GABA. Pada penelitian [16] otak dari tikus diambil dan dimasukkan kedalam tempat penyimpanan berisi isopentana, lalu dipotong secara koronal

menjadi beberapa bagian. Potongan tersebut masukkan kedalam gelas berisi gelatin. Potongan dipindahkan kedalam tempat berisi es dan diberikan 50 mM Tris-HCL(pH 7.4) dan 120 mM NaCl selama 30 menit. Sejumlah [3H]FNZ 1 nM diberikan pada potongan, lalu diobservasi dengan larutan sampel. Interpretasi data diukur menggunakan alat MCID AIS. Pada penelitian lainnya [17] setelah diberikan [3H]FNZ potongan disimpan dalam plat yang telah dicuci tiga kali dengan buffer HEPES (136 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, dan 9 mM glukosa pH 7.3). Potongan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C lalu aktivitas diukur menggunakan *Optiphas* Hisafe2

#### *[3H]-t-Butylbicycloorthobenzoate*

#### *([3H]TBOB) Binding*

Situs label yang dapat digunakan sebagai studi in vitro lainnya adalah ([3H]TBOB)[18]. Pada penelitian[19] pengujian dilakukan dengan mengambil potongan otak mencit dan diberikan sampel uji selama 60 menit, dan diikat kepada situs picrotoxinin dengan 1.84 nM [3H]TBOB, lalu diinkubasi selama 30 menit. Setelah inkubasi dimasukkan buffer dingin dan dipisahkan secara cepat dengan penyedotan. Potongan sel dibilas dua kali dengan buffer dingin dan diberikan NaOH 0,2 N selama 24 jam pada suhu 4°C. Sampel diukur menggunakan *OptiPhase cocktail*.

### *Succinic semialdehyde assay*

Pengujian ini didasarkan pada pengukuran succinic semialdehyde yang dihasilkan oleh  $\gamma$ -aminobutirat (GABA) di dalam otak. Hal ini menjadi acuan untuk pengujian antikonvulsan untuk menghambat aktivitas dari GABA dan memberikan efek untuk pengobatan epilepsy. Perubahan GABA menjadi glutamate memberikan eksitasi neuron di dalam otak, lalu menimbulkan efek konvulsan pada pasien epilepsy. [20]

Pada penelitian yang dilakukan oleh [19][21] buffer berisi 0,1 M asam  $\alpha$ -ketoglutarat dan 0,25 M  $\gamma$ -aminobutirat yang telah diatur pada pH 8.4 menggunakan NaOH. Sampel diambil dan diletakkan dalam tabung yang telah didinginkan dalam es, dan ditambahkan 5  $\mu$ L buffer substrat dan didiamkan selama 2 jam pada suhu 38°C. Kurva standar dibuat dengan konsentrasi SSA dengan fluoresensi pada gelombang 405 nm dan 492 nm. Sampel dibandingkan dengan vigabatrin dan scopolin untuk melihat efektivitas dari antikonvulsan,

### **PENGUJIAN *IN SILICO***

#### *Molecular docking*

Pengujian ini merupakan uji dengan menggunakan bantuan komputasi dalam mengetahui struktur 3D molekul dan mempelajari sisi aktif yang berperan didalam molekul. Pengujian ini dapat membantu dalam menentukan bagian dari antikonvulsan yang beraktivitas pada reseptor atau ligan tertentu. Interaksi dari benzodiazepine dengan

senyawa derivat terhadap reseptor GABA digambarkan dengan Discovery Studio 4.0[22] Pada penelitian [23] terdapat beberapa derivat dari triazolo-benzodiazepin, namun dari semua derivat hanya senyawa 6h yang memiliki potensi terbesar, maka untuk studi ini sampel yang digunakan adalah 6h. Pengujian dilakukan dengan menggunakan software AutoDock 1.5.6. Senyawa 6h telah berikatan  $\pi$  dengan  $\gamma$ 2Glu189 dan  $\alpha$ 1 His101 melalui benzodiazepine. Dibandingkan dengan senyawa 6e yang berinteraksi dengan empat residu, senyawa 6h dapat berinteraksi dengan enam residu. Dari analisis tersebut senyawa 6h dapat digunakan sebagai agonis reseptor benzodiazepine.

### **KESIMPULAN**

Dari pemaparan dapat diketahui berbagai metode untuk pengujian antikonvulsan secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Metode tersebut dapat digunakan dan dipilih sesuai kebutuhan untuk mengetahui aktivitas antikonvulsan.

### **REFERENSI**

1. Stafstrom, C.E. and L. Carmant, *Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. 5(6).
2. Hui Yin, Y., N. Ahmad, and M. Makmor-Bakry, *Pathogenesis of epilepsy: challenges in animal models*. Iran J Basic Med Sci, 2013. 16(11): p. 1119-32.
3. Castel-Branco, M.M., et al., *The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009. 31(2): p. 101-6.

4. Dehestani, L., et al., *Design, synthesis, in vivo and in silico evaluation of phenacyl triazole hydrazones as new anticonvulsant agents*. Bioorganic Chemistry, 2018. **78**: p. 119-129.
5. Skalicka-Wozniak, K., et al., *The anticonvulsant and anti-plasmid conjugation potential of Thymus vulgaris chemistry: An in vivo murine and in vitro study*. Food Chem Toxicol, 2018. **120**: p. 472-478.
6. Mishra, C.B., et al., *Discovery of potent anti-convulsant carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis, in vitro and in vivo appraisal*. Eur J Med Chem, 2018. **156**: p. 430-443.
7. Kothayer, H., et al., *Synthesis, in vivo and in silico evaluation of novel 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives as potential anticonvulsant agents*. Drug Dev Res, 2019. **80**(3): p. 343-352.
8. Luiz Gomes, A.J., et al., *Anticonvulsant effect of anacardic acid in murine models: Putative role of GABAergic and antioxidant mechanisms*. Biomed Pharmacother, 2018. **106**: p. 1686-1695.
9. de Oliveira, E.G., et al., *Reconstituted spray-dried phenytoin-loaded nanocapsules improve the in vivo phenytoin anticonvulsant effect and the survival time in mice*. Int J Pharm, 2018. **551**(1-2): p. 121-132.
10. Adil, S., et al., *In silico and in vivo investigation of ferrocene-incorporated acyl ureas and homoleptic cadmium carboxylate derivatives for anticonvulsant, anxiolytic, and sedative potential*. Drug Dev Res, 2018. **79**(4): p. 184-197.
11. Campos, G., et al., *In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy*. Epilepsy Res, 2018. **146**: p. 63-86.
12. Uwera, J., S. Nedergaard, and M. Andreasen, *A novel mechanism for the anticonvulsant effect of furosemide in rat hippocampus in vitro*. Brain Res, 2015. **1625**: p. 1-8.
13. Elsas, S.M., et al., *Passiflora incarnata L. (Passionflower) extracts elicit GABA currents in hippocampal neurons in vitro, and show anxiogenic and anticonvulsant effects in vivo, varying with extraction method*. Phytomedicine, 2010. **17**(12): p. 940-9.
14. Treiman, D.M., *GABAergic mechanisms in epilepsy*. Epilepsia, 2001. **42 Suppl 3**: p. 8-12.
15. Hauser, C.A.E., et al., *Flunitrazepam Has an Inverse Agonistic Effect on Recombinant  $\alpha 6 \beta 2 \gamma 2$ -GABA<sub>A</sub> Receptors via a Flunitrazepam-binding Site*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(18): p. 11723-11727.
16. Lauren, H.B., et al., *Status epilepticus alters zolpidem sensitivity of [3H]flunitrazepam binding in the developing rat brain*. Neuroscience, 2007. **146**(2): p. 802-11.
17. Sunol, C., et al., *Activity of B-nor analogues of neurosteroids on the GABA(A) receptor in primary neuronal cultures*. J Med Chem, 2006. **49**(11): p. 3225-34.
18. Rijn, C., et al., *GABA-Dependent Modulation of [3H]TBOB Binding to the GABA<sub>A</sub> Receptor Complex*. 1997. p. 275-279.
19. Arrifano, G.P.F., et al., *Clarified Acai (Euterpe oleracea) Juice as an Anticonvulsant Agent: In Vitro Mechanistic Study of GABAergic Targets*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 2678089.
20. Mishra, N., et al., *Anticonvulsant activity of Benkara malabarica (Linn.) root extract: In vitro and in vivo investigation*. J Ethnopharmacol, 2010. **128**(2): p. 533-6.
21. Salvador, R.A. and R.W. Albers, *The distribution of glutamic-gamma-aminobutric transaminase in the nervous system of the rhesus monkey*. J Biol Chem, 1959. **234**(4): p. 922-5.

22. Mohammadi-Khanaposhtani, M., et al., *Design, synthesis, pharmacological evaluation, and docking study of new acridone-based 1,2,4-oxadiazoles as potential anticonvulsant agents*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2016. **112**: p. 91-98.
23. Shafie, A., et al., *Novel fused 1,2,3-triazolo-benzodiazepine derivatives as potent anticonvulsant agents: design, synthesis, in vivo, and in silico evaluations*. Mol Divers, 2019.