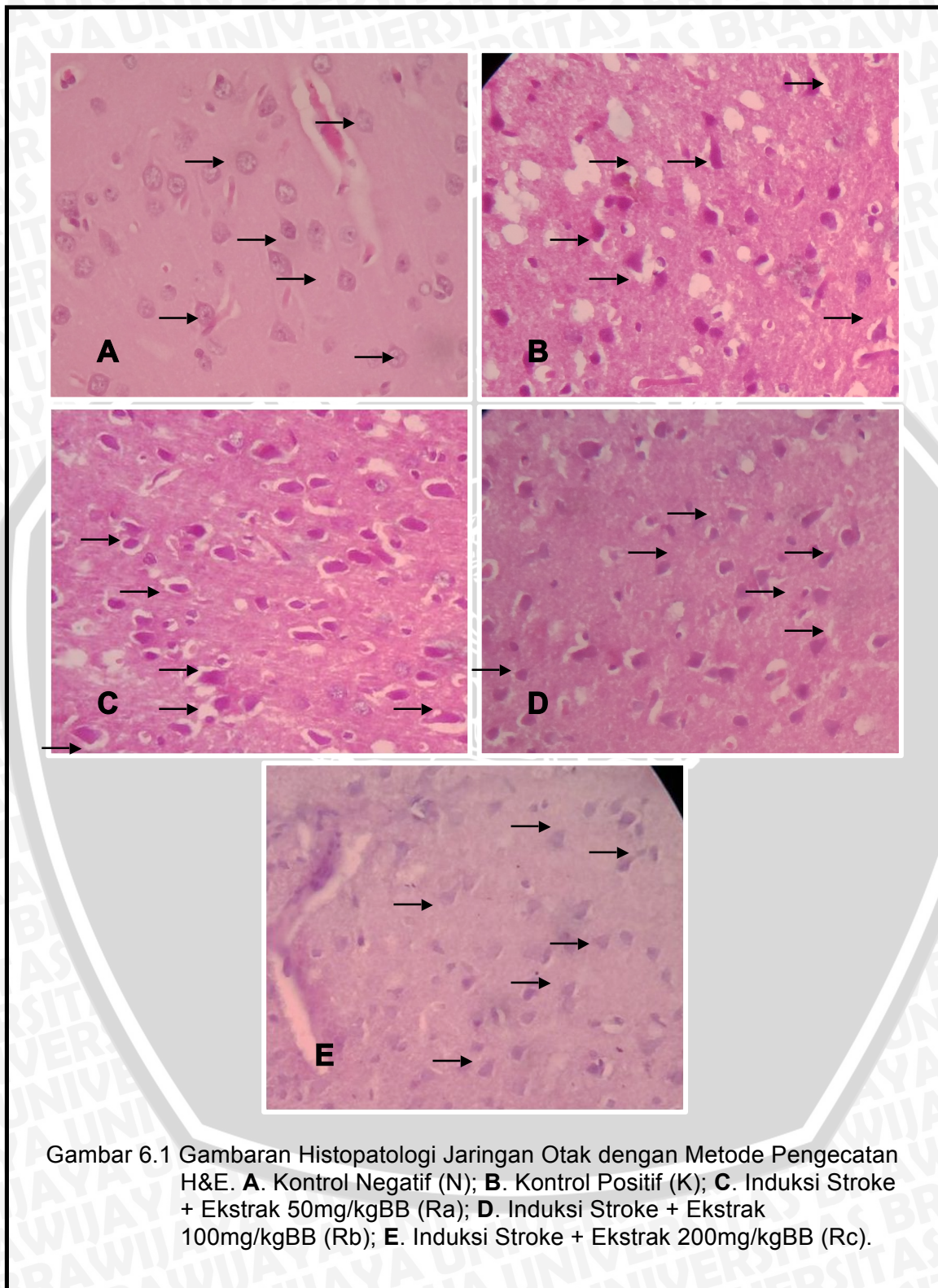


BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Stroke iskemik adalah suatu keadaan patologi, di mana otak mengalami kekurangan pasokan oksigen dan nutrisi (Sjahrir, 2003). Penelitian ini menggunakan subjek penelitian tikus model stroke, yaitu galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus ini diinduksi stroke dengan menggunakan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion*. Dengan metode ini, pasokan darah ke otak akan terhambat dan terjadilah stroke akibat penyumbatan atau disebut juga stroke iskemik. Setelah melakukan penginduksian stroke, dilakukan pengecekan kadar marker MMP-9 dari serum darah yang diambil dari ekor tikus. Marker MMP-9 merupakan biomarker petunjuk stroke, dan kadarnya akan meningkat setelah periode stroke iskemik (Reynolds *et al*, 2003). Hasil dari pengukuran kadar marker MMP-9 menunjukkan peningkatan pada kelompok yang diinduksi stroke (K, Ra, Rb, dan Rc), dengan rata-rata 0.707 ng/ml. Sedangkan pada kelompok yang tidak diinduksi stroke (N), rata-rata kadar marker MMP-9 nya adalah 0.582 ng/ml. Dengan begitu, tikus yang digunakan dalam penelitian ini terbukti telah mengalami stroke iskemik.



Gambar 6.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Otak dengan Metode Pengecatan H&E. **A.** Kontrol Negatif (N); **B.** Kontrol Positif (K); **C.** Induksi Stroke + Ekstrak 50mg/kgBB (Ra); **D.** Induksi Stroke + Ekstrak 100mg/kgBB (Rb); **E.** Induksi Stroke + Ekstrak 200mg/kgBB (Rc).

Gambaran neuron yang sehat, seperti tampak pada gambar 6.1(A), memiliki gambaran neuron yang normal. Gambaran neuron normal (tanda panah) adalah sel neuron yang berbentuk bintang atau piramid, dengan sitoplasma yang jernih, nukleus yang eukromatin, dan nukleolus yang prominen (Bloom dan Fawcett, 2002). Gambaran tersebut merupakan gambaran yang tampak pada semua preparat otak tikus kelompok N dengan metode pengecatan H&E. Pada proses penghitungan jumlah neuron yang rusak pada kelompok N, hasilnya adalah 0 pada semua sediaan slide histopatologinya. Semua tikus pada kelompok N tidak ditemukan adanya gambaran morfologi neuron yang rusak pada jaringan otaknya, yang berarti kelompok ini memiliki otak yang normal.

Pada fase awal patofisiologi sel neuron, terjadi gangguan pada Na^+/K^+ -ATPase akibat kegagalan dalam membentuk ATP oleh mitokondria. Gangguan ini akan menyebabkan depolarisasi membran (Bano, *et al.*, 2005). Terjadinya depolarisasi pada membran sel neuron dan astrosit akan menyebabkan peningkatan glutamat di celah sinaps (Atri *et al.*, 2009). Glutamat akan berikatan dengan reseptor NMDA dan akan memasukkan ion Ca^{2+} ke dalam sel (Lynch dan Guttman, 2002).

Masuknya Ca^{2+} ke dalam sel akan mengaktifkan berbagai kaskade yang akan menyebabkan kerusakan pada neuron otak. Di antaranya adalah disfungsi mitokondria, stress oksidatif, peroksidasi lipid, dan inflamasi. Kerusakan yang terjadi pada pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan gambaran sel yang mengalami kerusakan akibat mekanisme apoptosis dan nekrosis setelah stroke iskemik. Seperti tampak pada gambar 6.1 (B), gambaran ini merupakan gambaran histopatologi dari kelompok penelitian K. Pada gambar tersebut (tanda panah) tampak adanya neuron otak yang berbeda dengan bentukan normalnya.

Neuron pada gambar tersebut tampak lebih gelap warnanya, bila dibandingkan dengan gambaran neuron pada gambar 6.1 (A). Selain itu perikarionnya mengkerut. Pengkerutan itu akan menyebabkan adanya celah antara neuron dengan jaringan ikat di sekitarnya, yang disebut sebagai vakuolisasi. Pengkerutan terjadi akibat adanya proses kerusakan pada neuron tersebut. Nukleus yang dalam keadaan normal berwarna terang atau eukromatin, menjadi berwarna gelap (Zille *et al.*, 2012). Hal ini disebabkan karena adanya kondensasi kromatin oleh karena teraktivasi jalur yang menyebabkan neuron mengalami apoptosis. Jalur tersebut salah satunya adalah caspase 3, 9 (Lo *et al.*, 2003), dan 12 (Nakka, 2008), yang diaktifkan melalui peristiwa disfungsi mitokondria dan retikulum endoplasma akibat stroke iskemik. Kondensasi dari kromatin ini disebut sebagai istilah nukleus piknotik pada gambaran histopatologi. Sitoplasma juga akan berwarna lebih gelap dikarenakan terjadinya proses kerusakan dan pepadatan pada organela-organela di dalamnya (Zille *et al.*, 2012).

Berdasarkan proses penghitungan yang dilakukan, kelompok K memiliki rata-rata jumlah neuron yang rusak (dalam 10 lapangan pandang) 192.5, dengan standard deviasi ± 20.68 . Angka ini menunjukkan bahwa tikus yang hanya dilakukan penginduksian stroke saja tanpa diberikan ekstrak kulit dan biji anggur memiliki jumlah neuron yang rusak yang begitu banyak dibandingkan dengan kelompok N, di mana tidak ditemukan neuron yang rusak sama sekali.

Penelitian ini hendak menilai efek pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) dalam memperbaiki keadaan stroke iskemik, terutama perbaikan morfologi sel neuron otaknya. Ekstrak kulit dan biji anggur mengandung salah satu jenis polifenol tanaman, yaitu resveratrol. Resveratrol memiliki banyak sekali manfaat dalam memulihkan keadaan neuron setelah terjadi iskemik.

Manfaat utama resveratrol terhadap sel neuron otak adalah, mekanismenya dalam memulihkan kembali gambaran morfologi sel neuron otak dari keadaan rusak menjadi normal kembali. Mekanisme ini disebut sebagai regenerasi. Secara umum, regenerasi dapat diartikan sebagai penggantian dan perbaikan terhadap jaringan atau organ pada organisme yang telah rusak atau mengalami kerusakan yang parah (Carlson, 2007). Mekanisme kerja resveratrol dalam memperbaiki sel neuron, dapat dilaksanakan melalui berbagai jalur dalam patofisiologi seluler stroke iskemik.

Pemberian resveratrol dapat merubah gambaran histopatologi neuron otak menjadi pulih kembali, seperti yang ditunjukkan pada pada gambar 6.1 (C). Gambar tersebut merupakan gambaran neuron otak tikus kelompok Ra (ekstrak kulit dan biji anggur 50 mg/kgBB). Pada gambar tersebut (tanda panah) tampak adanya perbaikan pada morfologi neuron, yaitu gambaran perikarion yang tidak terlalu mengkerut dan vakuolisasi yang tidak sebesar pada gambar 6.1 (B). Berdasarkan hasil penghitungan, rata-rata jumlah neuron yang rusak pada kelompok Rb adalah sebesar 111.1, dengan standard deviasi ± 44.437 . Nominal ini lebih kecil daripada kelompok K, yang memiliki rata-rata jumlah neuron yang rusak sebesar 192.5, dengan standard deviasi ± 20.68 . Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak kulit dan biji anggur dosis 50 mg/kgBB dapat memperbaiki morfologi neuron dan menurunkan jumlah neuron yang rusak bila dibandingkan dengan kelompok K.

Berbeda dengan gambar sebelumnya, gambar 6.1 (D), yang merupakan gambaran preparat otak kelompok Rb (ekstrak kulit dan biji anggur 100 mg/kgBB), memiliki gambaran morfologi yang lebih mendekati normal (tanda panah). Gambaran neuronnya mengalami perbaikan ke arah mendekati normal

apabila dibandingkan dengan gambaran neuron kelompok K dan Ra. Rata-rata jumlah neuron yang rusak pada kelompok ini adalah sebesar 90, dengan standard deviasi ± 24.927 . Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak kulit dan biji anggur dosis 100 mg/kgBB mampu menurunkan jumlah neuron yang rusak lebih banyak dibandingkan dengan kelompok Ra.

Gambaran histopatologi neuron kelompok Rc (ekstrak kulit dan biji anggur 200 mg/kgBB), memiliki gambaran morfologi neuron yang paling mendekati normal (N). Tampak gambaran neuron (tanda panah) dengan ukuran perikarion yang normal, tidak ada vakuolisasi, warna sitoplasma tidak gelap, dan tidak ada gambaran piknotik nukleus. Berdasarkan rata jumlah neuron yang rusak (46.5, dengan standard deviasi ± 20.091), tampak bahwa jumlah neuron yang rusak paling sedikit adalah kelompok Rc apabila dibandingkan dengan kelompok K. Dengan demikian, pemberian ekstrak kulit dan biji anggur dosis 200 mg/kgBB terbukti mampu menurunkan jumlah neuron yang rusak, dengan penurunan yang paling besar apabila dibandingkan dengan kelompok dosis yang lainnya (Ra dan Rb).

Pada uji analisa data dengan menggunakan *One-way ANOVA*, pemberian ekstrak kulit dan biji anggur memberikan perbedaan yang bermakna dalam hal jumlah neuron yang rusak, pada kelompok perlakuan (Ra, Rb, dan Rc) bila dibandingkan dengan kelompok K. Hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikansi $p < 0.05$ ($p = 0.000$). Selanjutnya pada uji komparasi Post Hoc (HSD Tukey), kelompok Rc (induksi stroke + ekstrak kulit dan biji anggur dosis 200 mg/kgBB) memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan dengan ketiga kelompok yang lainnya ($p = 0.000$ dikomparasikan dengan K, $p = 0.12$ dengan Ra, dan $p = 0.47$ dengan Rb).

Mekanisme pemulihan kerusakan otak oleh resveratrol adalah sebagai berikut. Resveratrol mampu mengembalikan fungsi pompa Na^+/K^+ -ATPase. Dengan perbaikan pada pompa tersebut, maka tidak akan terjadi depolarisasi membran (Atri *et al.*, 2009). Dengan begitu, glutamat tidak akan menyebabkan eksitotoksitas dengan meningkatkan pemasukan ion Ca^{2+} ke dalam sel. Dengan menghambat mekanisme eksitotoksitas, resveratrol mampu memperbaiki keadaan disfungsi mitokondria dan retikulum endoplasma. Disfungsi mitokondria dapat dipulihkan karena mekanisme resveratrol yang mampu mengembalikan ekspresi Bax dan Bcl-2 di membran mitokondria (Bournival *et al.*, 2009). Pulihnya keadaan mitokondria tidak akan mengaktifkan kaskade caspase, baik caspase 3,9, maupun 12.

Resveratrol juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan kadar SOD (Liu *et al.*, 2011). SOD berfungsi untuk merubah bentuk oksigen radikal menjadi bentuk yang lebih tidak reaktif. Dengan berubahnya reaktifitas oksigen radikal, maka tidak akan terjadi reaksi dengan radikal nitrit, sehingga tidak akan terbentuk peroksinitrit. Peran resveratrol terhadap radikal bebas menjadi begitu penting karena peroksinitrit juga mampu menyebabkan kerusakan neuron otak (Dongoran, 2007).

Enzim PLA2 juga memiliki pengaruh buruk pada neuron, karena kemampuannya dalam menyebabkan peroksidasi lipid dan menghasilkan produk aldehyd yang sangat merugikan. Resveratrol juga mengaktifkan jalur AMPK (Shin *et al.*, 2009) dan mampu menurunkan kadar aldehyd (MDA dan 4-HNE), sehingga kerusakan yang terjadi dapat dipulihkan (Liu *et al.*, 2011; Kutuk *et al.*, 2003). Selain itu, proses inflamasi juga turut berperan dalam meningkatkan akumulasi sel-sel inflamasi, seperti neutrofil, monosit, makrofag, dan leukosit, di

lokasi iskemik dan memperparah kerusakan otak (Dongoran, 2007). Di sini resveratrol juga memiliki kemampuan untuk menurunkan NF- κ B sehingga peristiwa inflamasi dapat teratasi (Sun *et al.*, 2011).

Mekanisme resveratrol yang tidak kalah pentingnya adalah efeknya dalam memperbaiki fungsi astrosit. Astrosit yang fungsinya pulih akan menghasilkan berbagai faktor pertumbuhan neuron (NGF, BDNF, dan GDNF) (Xue *et al.*, 2007) yang akan berikatan dengan reseptor Trk (Hughes, 2012). Ikatan ini akan mengaktifkan Ras-GTP dan kemudian Raf. Kemudian akan terjadi aktivasi jalur MEK1/2 dan ERK1/2 (Qi dan Elion, 2005). Jalur ERK1/2 ini memiliki fungsi yang sangat penting dalam memicu plastisitas neuron otak yang akan meregenerasi kerusakan yang terjadi pada otak (Cavanaugh *et al.*, 2008). Dalam hal ini, resveratrol melalui peningkatan plastisitas kemudian memicu regenerasi neuron yang mampu memperbaiki kerusakan yang terjadi di dalam neuron, sehingga morfologi neuronpun akan kembali normal.

Efek ekstrak kulit dan biji anggur dalam mengurangi jumlah neuron yang rusak tergantung pada dosis ekstrak yang diberikan. Hal tersebut tampak pada hasil penghitungan jumlah neuron yang rusak pada seluruh kelompok perlakuan yang diberi ekstrak. Hasilnya adalah sebagai berikut berturut-turut untuk kelompok Ra, Rb, dan Rc adalah 111.1 ± 44.437 , 90 ± 24.927 , dan 46.5 ± 20.091 . Berdasarkan hasil ini dan evaluasi melalui uji komparasi Post Hoc, dosis yang mampu menyebabkan penurunan jumlah neuron yang rusak paling signifikan adalah kelompok Rc (induksi stroke + ekstrak 200 mg/kgBB)

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini meneliti tentang efek pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) sebagai terapi rehabilitasi pasca stroke iskemik. Untuk menilai

hasil dari penelitian ini, variabel tergantung yang diamati adalah jumlah neuron yang rusak. Penilaian jumlah neuron yang rusak bertujuan untuk melihat apakah ekstrak kulit dan biji anggur mampu mengurangi jumlah neuron yang rusak dengan memperbaiki morfologinya. Hasil yang didapatkan adalah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur mampu menurunkan jumlah neuron yang rusak secara signifikan.

Sesuai dengan hasil yang telah didapatkan dari penelitian ini, maka ekstrak kulit dan biji anggur merupakan kandidat pengobatan alternatif yang poten untuk pasien setelah mengalami stroke iskemik. Namun, untuk bisa diaplikasikan ke manusia, penelitian ini masih memerlukan penelitian-penelitian lanjutan. Sehingga, penelitian ini juga bisa dijadikan dasar teori dan bahan pertimbangan bagi peneliti lain untuk melakukan penelitian lanjutan dengan pembahasan yang lebih mendalam terkait dengan efek ekstrak kulit dan biji anggur dalam mengobati kerusakan akibat stroke iskemik. Selain itu, penelitian ini juga bisa dijadikan sebagai bahan pertimbangan bagi pasien untuk memilih macam pengobatan yang hendak digunakan.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini mengevaluasi tanda-tanda kerusakan neuron otak dengan melihat histopatologi jaringan otak yang diambil melalui pembedahan hewan coba setelah diberikan perlakuan dan pemeliharaan selama 2 minggu. Jadi, yang dievaluasi dari penelitian ini hanyalah gambaran histopatologi neuron setelah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur saja. Perbandingan gambaran neuron yang digunakan dalam penelitian ini adalah perbandingan dengan kelompok N dan K, yaitu kelompok yang tidak diinduksi stroke dan tidak mendapat ekstrak, dan kelompok yang hanya diinduksi stroke tanpa menerima ekstrak. Idealnya,

terdapat perbandingan antara kondisi neuron setelah penginduksian stroke dan setelah pemberian terapi dengan ekstrak kulit dan biji anggur. Perbandingan yang ideal seharusnya juga dilakukan dari masing-masing objek penelitian. Dengan kata lain, didapatkan hasil berupa data pre-sonde dan pasca-sonde dari masing-masing objek penelitian.

Ekstrak kulit dan biji anggur, menurut literatur, mengandung resveratrol. Resveratrol merupakan senyawa polifenol tanaman yang memiliki peran penting dalam memperbaiki sel neuron otak yang mengalami kerusakan. Penelitian ini hanya melihat perbaikan yang terjadi setelah pemberian ekstrak, berdasarkan mekanisme perbaikan neuron yang diperankan oleh resveratrol. Dalam ekstrak kulit dan biji anggur, mengandung banyak sekali zat-zat lain yang mungkin juga memiliki pengaruh yang baik terhadap perbaikan sel neuron setelah stroke iskemik. Penelitian ini hanya melakukan pengecekan kandungan resveratrol dalam ekstrak menggunakan uji TLC. Uji ini merupakan uji kualitatif yang digunakan untuk mengetahui keberadaan zat dalam suatu ekstrak. Idealnya, dilakukan suatu uji yang dapat mengukur kadar resveratrol dalam ekstrak secara kuantitatif. Selain itu, sebaiknya perlu dilakukan pengecekan kadar zat-zat lain yang ditemukan dalam ekstrak kulit dan biji anggur. Tujuannya adalah untuk mengetahui keberadaan dan jumlah zat lain yang terkandung dalam ekstrak. Tidak menutup kemungkinan akan ditemukan zat lain yang memiliki kerja yang sinergis dengan kerja resveratrol, atau bahkan memiliki cara kerja yang bersifat antagonis dengan resveratrol.