

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Stroke merupakan suatu keadaan dimana terjadi penurunan aliran darah ke otak yang mengakibatkan kerusakan sel neuron otak, edema otak, dan perubahan fungsi (American Stroke Association, 2012). Terjadinya stroke terbagi menjadi stroke iskemik dan stroke pendarahan (Roger, *et al.*, 2012). Stroke iskemik terjadi akibat kurangnya aliran darah ke otak dan mengakibatkan disfungsi serta kerusakan neuron otak (Sjahrir, 2003). Stroke iskemik dapat menyebabkan kematian sel yang mengakibatkan kelainan pada fungsi tubuh (Breton dan Rodriguez, 2012). Secara mikroskopis akan tampak adanya neuron yang rusak akibat dari apoptosis dan akan tampak adanya daerah infark akibat edema otak (Breton dan Rodriguez, 2012; Jha, 2003; Kaal and Vecht, 2004) .

Kurangnya aliran darah mengakibatkan ATP berkurang dan kemudian mengakibatkan Na^+/K^+ -ATPase tidak dapat bekerja sehingga mengakibatkan masuknya Na^+ dan Ca^{2+} ke intraseluler dan keluarnya K^+ ke ekstraseluler sehingga terjadinya membran depolarisasi neuron. Kemudian terjadinya depolarisasi mengakibatkan glutamat banyak dikeluarkan ke ekstraseluler. Glutamat akan berikatan dengan reseptor NMDA yaitu NR2C dan NR2D dan kemudian akan menginduksi peningkatan Ca^{2+} (Lynch dan Guttman, 2002). Kemudian akibat dari peningkatan Ca^{2+} dapat menyebabkan kerusakan mitokondria, selain itu Ca^{2+} juga menginduksi Ras-GTP, dan memicu *axonal sprouting*. Kerusakan mitokondria mengakibatkan peningkatan ROS yang

bersama dengan caspase 3 dan menyebabkan apoptosis sehingga mengakibatkan kerusakan pada neuron (Breton dan Rodriguez, 2012).

Pada patogenesis terjadinya edema otak, penurunan kerja Aktivitas Na^+/K^+ -ATPase akan mengakibatkan Na^+ banyak yang terdapat di intraseluler sedangkan K^+ terdapat di ekstraseluler. Masuknya Na^+ ke dalam sel diikuti dengan masuknya Cl^- dan air sehingga terjadilah edema sitotoksik (Jha, 2003; Kaal and Vecht, 2004). ROS yang dikeluarkan sebagai dampak dari disfungsi mitokondria juga mengakibatkan kerusakan endotel yang menyebabkan permeabilitasnya meningkat. Hal ini mengakibatkan air banyak menuju ke ekstraseluler sehingga terjadilah edema vasogenik (Rosenberg, 2012).

Penurunan fungsi motorik terjadi akibat dari kerusakan sel neuron yang terjadi pada daerah girus presentralis lobus frontalis (korteks motorik primer) yang mengakibatkan gangguan fungsi motorik. Keutuhan sel neuron sangat diperlukan untuk menyalurkan impuls dari otak sampai ke saraf perifer yang mengatur motorik. Kerusakan pada neuron mengakibatkan menurunnya fungsi motorik (Liu *et al.*, 2011).

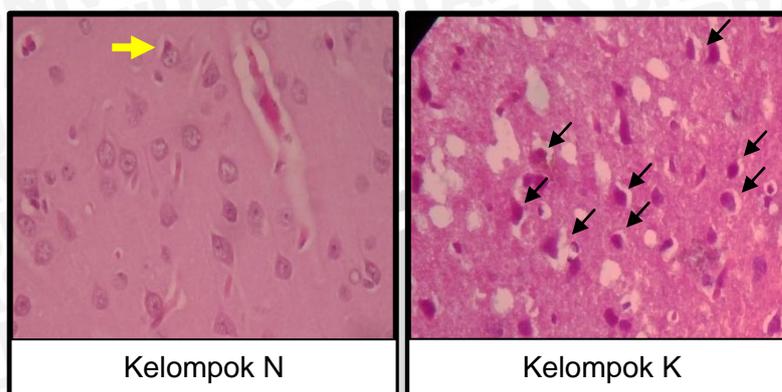
Salah satu upaya yang dilakukan untuk menurunkan jumlah neuron yang rusak, mengurangi volume infark dan memperbaiki fungsi motorik yang terjadi setelah stroke iskemik adalah menggunakan resveratrol yang terdapat pada kulit dan biji anggur. Pada ekstrak kulit anggur terdapat 24,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan pada ekstrak biji anggur 0,9850 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resveratrol (Pe´rez *et al.*, 2001; [Xiang *et al.*](#), et al 2003).

Resveratrol mampu melewati sawar darah otak dan bekerja pada sistem saraf pusat (SSP) (Quincozes-Santos dan Gottfried, 2011). Fungsi utama resveratrol berkaitan dengan regenerasi sel saraf pusat yaitu dengan

meningkatkan plastisitas. Resveratrol dapat meregenerasi sel saraf pusat dengan menginduksi pengeluaran faktor neurotropik (NGF, GDNF, dan BDNF) dan meningkatkan ekspresi reseptor tirosin kinase, TrkA dan TrkB (Valderrama *et al.*, 2009). Ketika faktor tropik ini berikatan dengan Trk, dan Trk akan teraktivasi (Zhang *et al.*, 2012). Reseptor segera mengalami proses autofosforilasi kemudian menghasilkan fosforilasi dari substrat dan Ras yang teraktivasi. Ras-GTP menginduksi Raf isoform untuk memasuki membran plasma diikuti oleh fosforilasi dari MEK1/2 dan kemudian ERK1/2 (Qi dan Elion, 2005). ERK1/2 meregulasi proliferasi, diferensiasi, meiosis, dan pembelajaran serta memori di sel saraf sehingga terjadi regenerasi sel saraf (Cavanaugh *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini dilakukan penginduksian stroke dilakukan dengan menggunakan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion* dan sehari setelahnya kadar MMP9 dari serum darah tikus diukur menggunakan ELISA kit. Didapatkan hasil rata-rata kadar MMP9 kelompok yang tidak diinduksi stroke (N) sebesar 0,582 ng/ml dan kelompok yang diinduksi stroke (K, Ra, Rb, Rc) sebesar 0,707 ng/ml. Hal ini menunjukkan bahwa penginduksian stroke iskemik berhasil dilakukan.

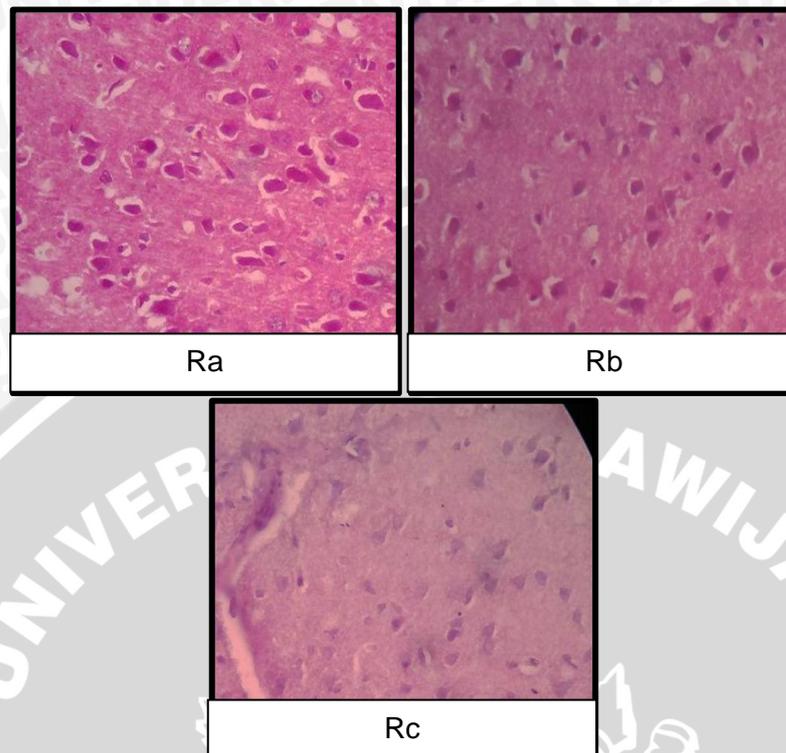
Apoptosis mengakibatkan kematian sel yang menyebabkan perubahan morfologi. Perubahan morfologi dari sel yang diinduksi stroke iskemik, tanpa diberi perlakuan, diberi ekstrak kulit dan biji anggur 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 200 mg/kgBB, dan ini dapat dilihat pada gambar 6.1 dan 6.2.



Gambar 6.1 Perbandingan Kelompok N dan Kelompok K

Kelompok N adalah kelompok tanpa perlakuan, dan kelompok K adalah kelompok yang diinduksi stroke. Kelompok N menunjukkan nukleus berupa bintang atau piramid dengan nukleus yang berwarna terang, terletak di tengah, jelas, eukromatin dan tercat terang karena sebaran kromatin merata, nukleolus prominen berwarna gelap, dan padat (panah berwarna kuning) (Junqueira dan Carneiro, 2007). Kelompok K didapatkan gambaran neuron rusak yang khas yang terdiri dari 4 ciri yaitu *eosinophilic cytoplasm*, piknosis nukleus, vakuolisasi, perikarion mengkerut (Zille *et al.*, 2012). Gambaran ini tampak pada panah berwarna hitam. Jumlah sel neuron yang rusak pada kelompok N ialah 0, tampak pada gambar tidak ada sel yang rusak. Pada kelompok K yang diinduksi stroke iskemik tampak banyak sel neuron yang rusak dengan jumlah 192.5 ± 20.68 (gambar 6.1).

Setelah diinduksi stroke iskemik, tikus diberi ekstrak kulit dan biji anggur dalam berbagai dosis selama 14 hari. Gambaran sel neuron setelah pemberian ekstrak dapat dilihat pada gambar 6.2. Ra merupakan kelompok tikus yang diberi ekstrak kulit dan biji anggur 50 mg/kgBB, Rb merupakan kelompok dengan dosis 100 mg/kgBB, dan Rc merupakan kelompok dengan 200 mg/kgBB



Gambar 6.2 Perbandingan Morfologi dan Jumlah Neuron antar Dosis Ekstrak Kulit dan Biji Anggur

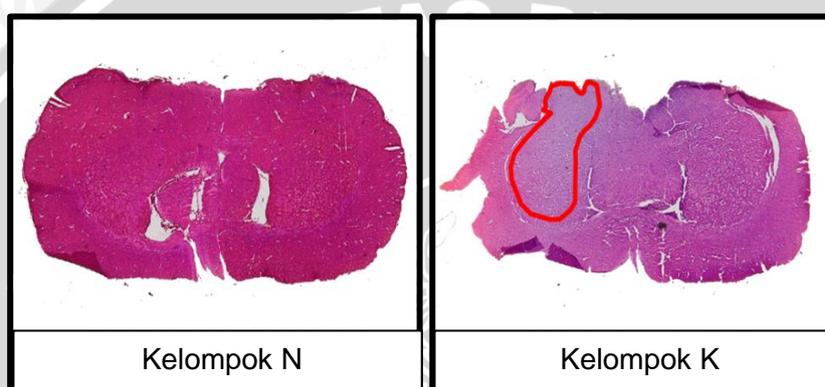
Pada Ra tampak sel neuron yang mengalami kerusakan jumlahnya masih cukup banyak dengan rata-rata 111.1 ± 44.437 walaupun telah mengalami pengurangan jumlah dari rata-rata kelompok K, kelompok Rb sebesar 90 ± 24.927 , dan kelompok Rc sebesar 46.5 ± 20.091 . Pada kelompok Rc tampak perbaikan morfologi neuron yang mendekati normal.

Pada percobaan ini tampak jumlah sel neuron rusak yang semakin menurun seiring dengan peningkatan dosis. Hal ini dapat terjadi karena ekstrak biji dan kulit anggur yang mengandung resveratrol memiliki efek dalam regenerasi di mana resveratrol berperan dalam ERK1/2 *pathway* yang mengatur plastisitas dan kemudian meregenerasi neuron. Resveratrol juga berpengaruh pada mekanisme terjadinya apoptosis dengan mengembalikan Na^+/K^+ -ATPase ke level normal, menurunkan reseptor NMDA, glutamat *uptake*, ROS, dan

menurunkan Bax dan meningkatkan antiapoptosis (Bcl2) (Simao *et al.*, 2011 ;Tsai *et al.*, 2012;Zheng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011).

Edema otak merupakan penyebab dari terbentuknya gambaran volume infark (Steve Brint, et al, 1988). Volume infark ditandai dengan adanya daerah yang terpulas pucat pada pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (Jha, 2003).

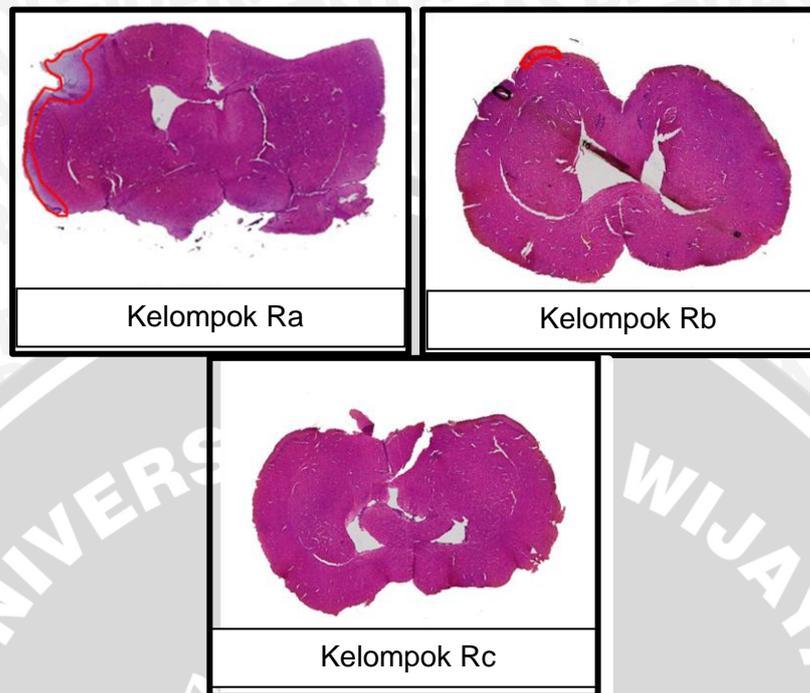
Gambaran ini tampak pada gambar 6.3.



Gambar 6.3 Perbandingan Kelompok Tanpa dan Dengan Induksi Stroke

Pada gambar 6.3 tampak pada kelompok N tidak ada daerah putih atau infark. Dengan volume infark sebesar 0. Pada kelompok K tampak adanya daerah luas yang terpulas pucat yang merupakan daerah infark. Volume infark pada kelompok K sebesar $63960149.450 \pm 26835017.440 \mu\text{m}^3$.

Dengan pemberian ekstrak biji dan kulit anggur tampak adanya perbaikan volume infark yang tampak pada gambar 6.4.

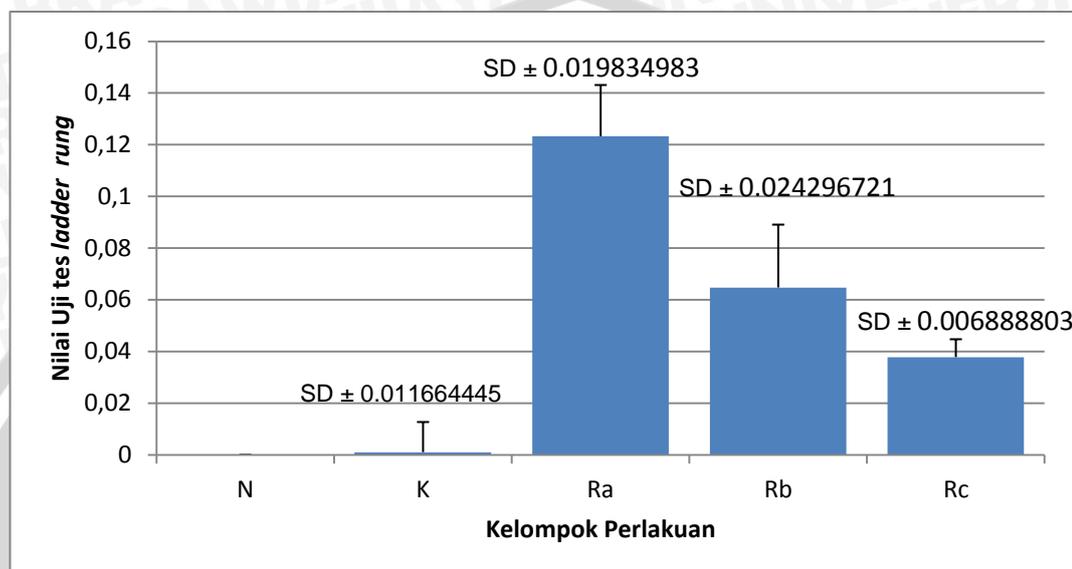


Gambar 6.4 Perbandingan Volume Infark Yang Terjadi Pada Kelompok yang Diberi Ekstrak 50mg/kgBB, 100mg/kgBB, 200mg/kgBB

Kelompok Ra tampak adanya penurunan gambaran volume infark dengan jumlah $49533004.925 \pm 36458729.234 \mu\text{m}^3$. Kelompok Rb dengan jumlah infark $49512981.750 \pm 35055126.103 \mu\text{m}^3$. Kelompok Rc dengan jumlah infark $8782341.925 \pm 8743553.714 \mu\text{m}^3$. Kelompok Rc menunjukkan gambaran infark yang paling minimal.

Resveratrol dalam ekstrak kulit dan biji anggur dapat meregenerasi sel saraf pusat sehingga dapat menurunkan volume infark. Selain itu resveratrol dapat mengatur Na^+/K^+ -ATPase sehingga dapat menurunkan edema sitotoksik (Simao *et al.*, 2011). Resveratrol juga dapat menginduksi astroglia untuk *uptake* glutamate, dan menurunkan ROS sehingga dapat mengurangi edema vasogenik (Quincozes-Santos dan Gottfried, 2011). Mekanisme inilah yang menyebabkan resveratrol mampu memberikan gambaran penurunan volume infark.

Pada penelitian ini juga dilihat perbaikan fungsi motorik dengan melihat selisih skor Ladder Rung Walking Test. Gambar grafik 6.5 menunjukkan selisih skor Ladder Rung Walking Test.



Gambar 6.5 Perbandingan Rerata Selisih Skor Ladder Rung Walking Test Pasca Stroke dan Pasca Sonde Masing-masing Kelompok Perlakuan

Skor Ladder Rung Walking Test pada grafik gambar 6.5 dihitung dari selisih antara pasca pemberian ekstrak kulit dan biji anggur dengan pasca penginduksian stroke iskemik. Tujuannya adalah untuk melihat perbaikan yang ditandai dengan meningkatnya skor. Semakin tinggi selisih skor semakin bagus perbaikan fungsi motorik yang terjadi. Kel K memiliki rata-rata selisih skor *Ladder Rung Walking test* pasca stroke dan pasca sonde sebesar $0.001028933 \pm 0.011664445$. Kelompok K hampir tidak menunjukkan perubahan skor hal ini berarti sangat sedikit terjadi perbaikan fungsi motorik. Kelompok Ra memiliki selisih skor *ladder rung walking test* pasca stroke dan pasca sonde sebesar $0.123214286 \pm 0.019834983$. Kelompok Rb sebesar $0.064744427 \pm 0.024296721$, dan kelompok Rc sebesar $0.03781401 \pm 0.006888803$. kelompok

Ra, Rb, dan Rc menunjukkan peningkatan selisih skor dan selisih skor tertinggi tampak pada kelompok Ra yang berarti kelompok Ra mengalami perbaikan fungsi yang lebih banyak.

Ekstrak kulit dan biji anggur dapat menyebabkan perbaikan fungsi motorik karena resveratrol dapat meregenerasi sel saraf dengan mekanisme *axonal sprouting*. Axonal sprouting dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan seperti NGF, BDNF, dan GDNF, dan antiapoptosis (Bcl2). Resveratrol dapat meningkatkan faktor pertumbuhan (NGF, BDNF, dan GDNF), bertindak sebagai antioksidan, dan meningkatkan Bcl2 sehingga dapat meningkatkan *axonal sprouting* (Valderrama *et al.*, 2009; Caroni, 1997). Resveratrol juga memperbaiki disfungsi endotel yang menyebabkan kekakuan dinding pembuluh darah akibat dari aterosklerosis yang merupakan salah satu penyebab stroke (Zhang *et al.*, 2009; Berrougui *et al.*, 2009). Resveratrol juga memiliki peran dalam menurunkan apoptosis sehingga menurunkan neuron yang rusak sehingga dapat terjadi perbaikan fungsi motorik.

Penurunan jumlah sel neuron yang rusak, volume infark, dan selisih skor Ladder Walking Test menunjukkan korelasi antara ketiganya. Korelasi tersebut tampak pada tabel 6.1.

Tabel 6.1 Uji korelasi antara fungsi motorik, jumlah neuron yang rusak, dan volume infark

Correlations

		Ladder_rung	Kerusakan_neuron	Volume_infark
Ladder_rung	Pearson Correlation	1	,306	,346
	Sig. (2-tailed)		,189	,136
	N	20	20	20
Kerusakan_neuron	Pearson Correlation	,306	1	,645**
	Sig. (2-tailed)	,189		,002
	N	20	20	20
Volume_infark	Pearson Correlation	,346	,645**	1
	Sig. (2-tailed)	,136	,002	
	N	20	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Dari hasil uji ini didapatkan semua variabel menunjukkan hasil $r \neq 0$ yang berarti adanya hubungan antara selisih skor *Ladder Rung Walking Test*, jumlah sel neuron yang rusak dan volume infark. Dari uji ini didapatkan korelasi antara selisih skor *Ladder Rung Walking Test* dengan jumlah neuron yang rusak sebesar 0,306 yang berarti korelasi yang cukup kuat. Korelasi yang cukup kuat ini disebabkan karena kerusakan neuron terutama yang terjadi pada daerah girus presentralis area frontal otak (korteks motorik) menyebabkan penurunan fungsi motorik yaitu melemahnya ekstremitas kontralateral (Liu *et al.*, 2011). Sehingga perbaikan pada jumlah sel neuron yang rusak juga akan memperbaiki fungsi motorik.

Selisih skor *Ladder Rung Walking Test* dan volume infark menunjukkan korelasi sebesar 0,346 yang berarti korelasi yang cukup kuat. Korelasi ini dapat terjadi karena volume infark terjadi akibat adanya edema sel neuron otak (Lin , *et*

al., 1993). Fungsi motorik tubuh dapat bekerja dengan baik apabila neuron sebagai penyalur impuls juga berfungsi normal (Chamorro *et al.*, 1997). Adanya gangguan berupa edema memungkinkan fungsi motorik juga terganggu. Untuk itu dengan pemberian ekstrak kulit dan biji anggur yang memperbaiki edema otak juga memperbaiki fungsi motorik.

Selain itu meningkatnya volume infark dan penurunan fungsi motorik memiliki penyebab yang sama yaitu ROS (Rosenberg, 2012; Ng *et al.*, 2012). ROS yang terakumulasi ini mengakibatkan kerusakan permeabilitas endotel sehingga meningkatkan edema vasogenik (Rosenberg, 2012), ROS juga menyebabkan kerusakan neuron yang menurunkan fungsi motorik. Resveratrol sebagai antioksidan bersama-sama menyebabkan perbaikan pada edema sehingga terjadi pengurangan volume infark dan memperbaiki fungsi motorik.

Sedangkan pada korelasi antara jumlah neuron yang rusak dan volume infark adalah 0,645 yang berarti termasuk korelasi kuat dengan signifikansi $p=0,002$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat korelasi yang signifikan antara jumlah sel neuron yang rusak dan volume infark. Hal ini disebabkan karena peningkatan permeabilitas sawar darah otak yang bermanifestasi dengan peningkatan volume infark dapat mengakibatkan kerusakan sel neuron sehingga dengan pemberian ekstrak kulit dan biji anggur yang mampu memperbaiki permeabilitas sawar darah otak juga mampu memperbaiki sel neuron yang rusak. Pada proses terjadinya kerusakan neuron dan edema juga memiliki jalur mekanisme yang sama yaitu eksitotoksisitas. Efek dari eksitotoksisitas ini mengakibatkan akumulasi air yaitu edema sitotoksisitas, dan juga mengakibatkan peningkatan ekspresi NMDA, Ca^{2+} , yang kemudian terjadinya apoptosis dan kerusakan neuron (Yenari dan Han, 2012). Terganggunya stabilitas sel neuron yang terjadi

pada kedua parameter ini menampakkan adanya korelasi yang kuat antara kedua parameter ini. Resveratrol memiliki fungsi dalam memperbaiki keadaan eksitotosisitas (Tsai *et al.*, 2012). Sehingga pada perbaikan kedua parameter ini menampakkan korelasi yang kuat yaitu jika terjadi penurunan pada jumlah neuron yang rusak maka terjadi pula penurunan volume infarknya.

Penelitian terdahulu belum ada yang meneliti tentang efek ekstrak kulit dan biji anggur yang memiliki kandungan resveratrol terhadap kuat lemahnya korelasi antar ketiga parameter ini (jumlah sel neuron yang rusak, infark volume, dan perbaikan fungsi motorik). Beberapa penelitian sebelumnya meneliti tentang efek resveratrol pada salah satu di antara jumlah sel neuron yang rusak, infark volume, atau fungsi motorik. Salah satunya ialah seperti pada penelitian pada tikus yang mengalami *traumatic brain injury*. Dan terbukti bahwa pemberian resveratrol murni 100 mg/kgBB mampu menurunkan keparahan pada gangguan fungsi motorik dan kognitif serta menurunkan volume kontusio. Akan tetapi pada penelitian ini tidak dinilai pula korelasi antara perbaikan fungsi tadi dengan menurunnya volume kontusio otak (Singleton, 2010).

Semua ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit dan biji anggur (*Vitis vinifera*) yang mengandung banyak resveratrol mampu menurunkan jumlah sel neuron yang rusak, menurunkan volume infark, dan memperbaiki fungsi motorik serta terdapat korelasi antara ketiga parameter tersebut, di mana korelasi yang paling kuat terdapat pada hubungan antara jumlah neuron yang rusak dan volume infark.

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, volume infark, dan uji fungsi motorik dengan menggunakan *Ladder Rung Walking Test*, serta menilai korelasi antar ketiganya. Penilaian korelasi bertujuan untuk melihat apakah terdapat hubungan antara jumlah neuron yang rusak, volume infark dan uji fungsi motorik pada pemberian ekstrak kulit dan biji anggur. Hasil yang didapatkan adalah pemberian ekstrak kulit dan biji anggur mampu menunjukkan korelasi yang cukup kuat antara uji fungsi motorik dengan jumlah neuron yang rusak dan volume infark. Pemberian ekstrak kulit dan biji anggur juga menunjukkan korelasi yang kuat antara jumlah neuron yang rusak dan volume infark.

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 akut yang dapat memperbaiki struktur sel maupun fungsi motorik. 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. Selain itu

juga dilakukan uji fungsi motorik dengan *Ladder Rung Walking Test* yang dilakukan setelah induksi stroke dan pemberian ekstrak kulit dan biji anggur. 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.

Penelitian ini juga mengevaluasi volume infark hanya melalui pembedahan pasca sonde dan dibandingkan dengan kelompok N dan K saja. Idealnya volume infark dibandingkan dengan gambaran setelah diinduksi stroke dengan menggunakan radio imaging seperti X-Ray (CT scan) atau MRI.

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.

